

LC-MS/MS 法测定猪肉中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮作业指导书 (SOP)

标准号：GB 31660.4-2019

■ 参考标准

GB 31660.4-2019《食品安全国家标准 动物性食品中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的测定 液相色谱 - 串联质谱法》

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

本标准规定了动物性食品中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留检测的制样和液相色谱串联质谱测定方法。

2.2 方法使用范围

本标准适用于猪、牛、羊肌肉、脂肪、肝脏、肾脏和牛奶中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮残留量的检测。

2.3 方法技术指标

本方法的检测限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法标准溶液线性范围：2~100 ng/mL （内标 20 ng/mL ）。

■ 方法原理

试样中残留的醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮经乙腈提取，正己烷除脂，混合阳离子柱净化，甲醇洗脱，液相色谱 - 串联质谱法测定，内标法定量。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，ESI 离子源

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP224W；

均质器：九阳碎肉机；

超声清洗仪：ANPEL 2150T；

离心机：BECKMAN COULTER Allegra X-30 Centrifuge；

涡旋仪：Talboys；

固相萃取装置：GL Science InertSep Manifold；

氮吹仪：ANPEL DC-12；

振荡仪：SGLCMultiS-100

旋转蒸发仪：上海一恒科学仪器有限公司 / 凯斯特生物化学仪器（苏州）有限公司 RV-211A

移液枪：5 mL，1 mL，100 μL ，10 μL

■ 标准品、试剂、耗材

醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮标准品溶液 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ：购自天津阿尔塔科技有限公司，纯度 99.9%；

内标：氘代醋酸甲地孕酮溶液 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，购自天津阿尔塔科技有限公司，纯度 98.0%；

乙腈：色谱级；

甲醇：色谱级；

甲酸：色谱级；
 乙酸：色谱级
 正己烷：色谱级
 乙酸乙酯：色谱级
 乙酸铵：色谱级；
 酶解试剂：β- 盐酸葡萄糖醛苷酶 / 芳基硫酸酯酶
 离心管：50 mL，10 mL；
 混合阳离子固相萃取柱：60 mg/3 mL；
 无针注射器：2 mL
 微孔过滤膜：SHIMSEN 疏水 PTFE 针头过滤器 0.22 μm；

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线制作

6.1.1 混合标准工作溶液配制

精密量取醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮标准贮备液（100 μg/mL）各 0.1 mL 于 10 mL 棕色量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度均为 1 μg/mL 混合标准工作液。4 °C 以下避光保存，有效期 1 个月。

6.1.2 内标工作溶液配制

精密量取氘代醋酸甲地孕酮贮备液（10 μg/mL）1 mL，于 10 mL 棕色量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 1 μg/mL 的内标标准工作液。4 °C 以下避光保存，有效期 1 个月。

6.1.3 空白基质溶液的制备

取空白基质样品，采用与样品同样的前处理方法制成空白基质溶液。

6.1.4 标准工作溶液配制

将混合标准工作溶液用空白基质溶液逐级稀释，得浓度分别为 2、5、25、50 和 100 μg/L 的基质标准工作溶液系列。现配现用。

6.2 仪器条件

液相条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GISS C18（50 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-30048-01）

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸乙腈溶液

流速：0.30 mL/min

柱温：30 °C

进样量：10 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	20
1.50	Pumps	Pump B Conc.	90
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.50	Pumps	Pump B Conc.	50
3.00	Pumps	Pump B Conc.	20
4.00	Controller	Stop	

质谱条件:

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI+

雾化气流速: 3.0 L/min

加热气流速: 10.0 L/min

干燥气流速: 10.0 L/min

加热模块温度: 400 °C

DL 温度: 250 °C

离子源温度: 300 °C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	化学式	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
醋酸甲地孕酮	Megestrolacetate	C ₂₄ H ₃₂ O ₄	595-33-5	385.40>267.30*	-11.0	-19.0	-19.0
				385.40>325.40	-11.0	-15.0	-23.0
醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesteroneacetate	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	71-58-9	387.40>327.40*	-11.0	-13.0	-16.0
				387.40>285.40	-11.0	-19.0	-20.0
氘代醋酸甲地孕酮	Megestrolacetate-D3	C ₂₄ H ₂₉ D ₃ O ₄	-	388.40>270.40*	-11.0	-18.0	-13.0

注: * 表示定量离子对

6.3 样品前处理

1) 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液配制: 取乙酸铵 15.4 g, 加水 900 mL 溶解, 用乙酸调 pH 值至 5.2, 加水稀释至 1000 mL。

2) 称取约 400 g 新鲜的猪肉, 以碎肉机搅碎, 备用。

3) 准确称取 2 g (精确至 20 mg) 样品, 置于 50 mL 聚苯乙烯聚塞离心管中。

4) 向离心管中内标工作液 40 μL, 加入 0.2 mol/L 乙酸铵缓冲液 4 mL, 涡旋混合 1 min 后加入 40 μL β- 盐葡萄糖醛苷酶 / 芳基硫酸酯酶, 于 37 °C 下避光水浴低速振荡, 酶解 12 h。

5) 在酶解后的样品中加入乙酸乙酯 10 mL, 涡旋振荡 10 min, 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液至梨形瓶中。残渣加 10 mL 乙酸乙酯重复提取 1 次, 合并上清液, 50 °C 旋转蒸发至干。

6) 在梨形瓶中加入乙腈 10 mL, 正己烷 5 mL, 溶解后转移溶液后移至 50 mL 离心管中, 低速涡旋 10 s, 3000 r/min 离心 2 min, 弃去正己烷层, 下层液于 50 °C 旋转蒸发至干, 加 30% 甲醇水溶液 3 mL, 溶解后, 备用。

7) 混合阳离子 SPE 小柱分别用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化后, 将备用液过柱。然后取 3 mL 水和 3 mL 50% 甲醇清洗小柱后抽干, 最后用 5 mL 甲醇洗脱。

8) 洗脱液使用氮吹仪在 50 °C 下氮吹至干后, 用 0.2 mL 乙腈 -0.1% 甲酸溶液 (8:2, v/v) 溶解, 涡旋混匀后, 过 0.22 μm 滤膜后, 上机测定。

6.4 加标试样

称取 2 g 猪肉试样于 50 mL 离心管中, 加入 1 μg/mL 的混合标准工作液 2 和 10 μL, 使得加标量分别为 2 和 10 ng (加标浓度为 1 和 5 μg/kg), 涡旋混合均匀, 以下同样品前处理方法。

6.5 测定

按照 6.2 的仪器分析条件进行分析, 得到响应的峰面积, 以基质标准溶液中醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮与氘代醋酸甲地孕酮的峰面积比为纵坐标, 浓度比为横坐标, 绘制内标法标准曲线。待测样品进样后, 待测物峰面积、内标峰面积及内标浓度代入曲线得到相应的浓度。

6.6 计算和报告

6.6.1 定性分析

进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子对均出现，且离子丰度比与标准样品的离子丰度比满足下方表格中允许偏差要求的，则可判断样品中存在醋酸甲地孕酮或醋酸甲羟孕酮。

离子对相对比例（和基峰比 %）	相对离子强度最大允许偏差
> 50%	±20%
> 20%~50%	±25%
> 10%~20%	±30%
≤ 10%	±50%

6.6.2 定量分析

本方法采用内标法定量测定。为减少基质的影响，定量用标准溶液应采用基质混合标准工作溶液。标准溶液的浓度应与待测化合物的浓度相近。

液相色谱串联质谱测定结果可由计算机按照内标法自动计算，也可按照下式计算：

$$X = \frac{A \times A_{is}' \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C_{is}' \times m}$$

X — 试样中被测物残留量，单位为 μg/kg；

C_s — 基质标准工作溶液中被测物的浓度，单位为 ng/mL；

C_{is} — 试样中内标的浓度，单位为 ng/mL；

C_{is}' — 基质标准工作溶液中内标物的浓度，单位为 ng/mL；

A — 试样溶液中被测物的峰面积；

A_{is}' — 基质标准工作溶液中内标物的峰面积；

A_{is} — 试样溶液中内标物的峰面积；

A_s — 基质标准工作溶液中被测物的峰面积；

V — 试样最终定容体积，单位为 mL；

m — 试样质量，单位为 g。

■ 质量控制

- 1) 在加标浓度为 1 μg/kg~5 μg/kg 的范围内，回收率为 70%~120%。
- 2) 批内相对标准偏差 ≤ 20%，批间相对标准偏差 ≤ 20%。

岛津应用云

