

DBS61

陕西省食品安全地方标准

DBS61/0012—2022

食品安全地方标准
蜂蜜中 16 种激素残留的测定
液相色谱-质谱/质谱法

2022-07-14 发布

2023-01-14 实施

陕西省卫生健康委员会 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。本标准代替DBS61/0012-2016《食品安全地方标准 蜂蜜中16种激素残留的测定液相色谱-质谱/质谱法》

本标准与DBS 61/0012-2016相比，主要变化如下：

——修改了原标准的结构；

请注意本文的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文的附录A、附录B、附录C、附录D、附录E均为资料性附录。

本文由陕西省卫生健康委员会发布并归口。

本文由中华人民共和国西安海关技术中心提出并起草。

本文主要起草人：张璐，何强，王菡，孔祥虹，李莹，邹阳，施妍婧，李子豪

本次为第一次修订。

食品安全地方标准

蜂蜜中 16 种激素残留的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中16种激素残留的液相色谱-质谱/质谱的检测方法。

本标准适用于蜂蜜中糖皮质激素（曲安西龙、泼尼松龙、氢化可的松、甲基泼尼松龙、地塞米松、氟米松、曲安奈德、醋酸氟氢松、氟氢可的松、醋酸可的松、醋酸地塞米松、醋酸泼尼松）、雄性激素（甲睾酮、睾酮）、孕激素（孕酮）、肾上腺皮质激素（醋酸去氧皮质酮）16种激素残留量检测。

。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样经酶解，用乙腈提取目标化合物后，经固相萃取净化，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和GB/T6682中规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙腈（ CH_3CN , CAS: 75-05-8）：色谱纯。

4.1.2 甲醇（ CH_3OH , CAS: 67-56-1）：色谱纯。

4.1.3 甲酸（ CH_2O_2 , CAS: 64-48-6）：色谱纯。

4.1.4 二氯甲烷（ CH_2Cl_2 , CAS:75-09-2）。

4.1.5 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, CAS:631-61-8）。

4.1.6 乙酸（ CH_3COOH ,CAS:64-19-7）。

4.1.7 β -葡萄糖醛苷酶/芳香基硫酸酯酶（ β -glucuronidase/arylsulfatase）：含有 β -葡萄糖醛苷酶 134600 U/mL，芳香基硫酸酯酶 5200 U/mL。

4.1.8 无水硫酸钠（ Na_2SO_4 ,CAS:7757-82-6）：650 °C灼烧 4 h，在干燥器中冷却至室温，贮于密封瓶中备用。

4.2 溶液配制

4.2.1 乙酸铵溶液（0.2 mol/L）：称取 15.4 g 乙酸铵，加入 1000 mL 水溶解，用乙酸调节 pH 到 5.2。

4.2.2 二氯甲烷-甲醇（6+4，体积比）：60 mL 二氯甲烷和 40 mL 甲醇混合。

4.2.3 甲酸水溶液（0.1%）：准确量取 1 mL 甲酸加水稀释至 1000 mL。

4.2.4 乙腈-水溶液（1+9，体积比）：10 mL 乙腈和 90 mL 水混合。

4.3 标准品

糖皮质激素：曲安西龙、泼尼松龙、氢化可的松、甲基泼尼松龙、地塞米松、氟米松、曲安奈德、醋酸氟氢松、氟氢可的松、醋酸可的松、醋酸地塞米松、醋酸泼尼松；雄性激素：甲睾酮、睾酮；孕激素：孕酮；肾上腺皮质激素：醋酸去氧皮质酮，纯度均大于 97%，物质英文名称及 CAS 号见附录 A。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备液（1 mg/mL）：分别准确称 10.0 mg 各标准品，精密称定，于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容至刻度，摇匀，配制为 1mg/mL 的标准储备溶液，-20℃避光保存，可保存 12 个月。

4.4.2 混合标准中间溶液（1μg/mL）：分别准确量取 1 mg/mL 标准储备液各 0.025 mL，于 25 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，0℃~4℃避光保存，可保存 6 个月。

4.4.3 混合标准工作溶液：根据需要，临时吸取一定量的混合标准中间溶液（4.4.2）用水稀释，配制适当浓度的标准工作溶液 0℃~4℃避光保存，可保存 6 个月。

4.5 材料

4.5.1 HLB固相萃取柱：60 mg/3 mL，或相当者。使用前依次用6 mL二氯甲烷-甲醇（4.2.2）、6 mL甲醇、6 mL水活化。

4.5.2 氨基固相萃取柱：60 mg/3 mL，或相当者。使用前用6 mL二氯甲烷-甲醇（4.2.2）活化。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01g。

5.3 旋转蒸发器。

5.4 振荡器。

5.5 涡旋混匀器：转速 3000 r/min。

5.6 高速离心机：转速 4500 r/min。

5.7 固相萃取装置。

5.8 氮吹仪。

5.9 聚四氟乙烯离心管：50 mL。

5.10 有机系滤膜：0.22 μm。

5.11 移液枪：100 μL，1.0 mL，10.0 mL。

6 试样制备与保存

对无结晶的实验室样品，将其搅拌均匀。对有结晶的样品，在封闭情况下，置于不超过60℃的水浴中温热，震荡，待样品全部融化后搅匀，迅速冷却至室温，分出500 g作为试样，制备好的样品置于样品瓶中，密封，并做上标记。

7 测定步骤

7.1 提取

准确称取试样5 g（精确至0.01 g），于50 mL离心管中，加入20 mL 0.2 mol/L乙酸铵溶液（4.1.5），涡旋混合，再加入β-葡萄糖醛苷酶/芳香基硫酸酯酶100 μL，于37 °C ± 1 °C振荡酶解12 h。取出冷却至室温，加入20 mL乙腈振荡提取15 min，4500 r/min下离心5 min，取乙腈层过无水硫酸钠漏斗。再加入15 mL乙腈，重复上述提取过程。合并乙腈层，40 °C下旋转蒸发至近干，用10 mL 0.2 mol/L乙酸铵溶液（4.2.1）溶解，待净化。

7.2 净化

待净化液（7.1）以1.5 mL/min的速度上样于活化过的HLB固相萃取柱（4.5.1）。将小柱减压抽干。再将活化过的氨基柱（4.5.2）串联在HLB固相萃取柱下方。用8 mL二氯甲烷-甲醇（4.2.2）洗脱并收集洗脱液，取下HLB小柱，再用2 mL二氯甲烷-甲醇（4.2.2）洗脱氨基固相萃取柱，合并洗脱液，于40 °C氮气吹至近干，用1 mL乙腈-水（4.12）溶解残渣，涡旋混匀，滤膜（5.10）过滤，待测定。

7.3 基质匹配标准曲线的制备

精密量取标准中间溶液，于经提取、蒸干后的空白试料残余物中，经适量1 mL乙腈-水（4.12）稀释至1 mL，使16种激素浓度为5、10、25、50、100 ng/mL，滤过，制成基质匹配标准工作溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定，以特征离子峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：Hypersil GOLD aQ（2.1×100 mm，3.0 μm），或相当者；
- b) 柱温：40 °C；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 进样量：10.0 μL；
- e) 流动相：乙腈-0.1 %甲酸水，梯度洗脱，洗脱条件参见附录B；

7.4.2 糖皮质激素质谱参考条件

- a) 电离源：电喷雾离子源；
- b) 离子化方式：负离子模式；
- c) 检测模式：选择离子反应监测；
- d) 喷雾电压：2500 V；
- e) 气化温度：300 °C；
- f) 鞘气（N₂）：0.525 L/min；
- g) 辅助气（N₂）：4.5 L/min；

- h) 离子传输管温度：300 ℃；
- i) 去簇电压：2.0 V；
- j) 碰撞气 (Ar)：199.9 Mpa。
- k) 特征离子参见附录C.1。

7.4.3 雄性激素、孕激素、肾上腺皮质激素质谱参考条件

- a) 电离源：电喷雾离子源；
- b) 离子化方式：正离子模式；
- c) 检测模式：选择离子反应监测；
- d) 喷雾电压：3300 V；
- e) 气化温度：300 ℃；
- f) 鞘气 (N₂)：0.525 L/min；
- g) 辅助气 (N₂)：4.5 L/min；
- h) 离子传输管温度：300 ℃；
- i) 去簇电压：2.0 V；
- j) 碰撞气 (Ar)：199.9 Mpa
- k) 特征离子参数见附录C. 2。

7.4.4 测定法

7.4.4.1 定性测定

在同样测试条件下，试样中激素类药物的保留时间与标准工作溶液中激素类药物的保留时间相比，偏差在±5%以内，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表1要求。

表1 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

相对丰度，%	允许偏差，%
>50	±20
> 20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

7.4.4.2 定量测定

按7.4.1，7.4.2和7.4.3设定仪器条件，以基质匹配标准溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，做单点或多点校准，按外标法计算试样中药物的残留量，定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片，标准溶液特征离子流色谱图见附录D。

7.5 平行试验

按照7.1至7.4所述的测定条件和步骤对同一试样进行平行试验测定。

7.6 空白试验

除不称取试样外，均上述的测定步骤进行。

8 结果计算和表达

试样中待测药物的残留量按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times c_s \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots(1)$$

X —试样中被测组分的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）

A —试样溶液中被测组分的峰面积；

c_s —基质匹配标准溶液中被测组分的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

V —样液最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；

A_s —基质匹配标准溶液中被测组分的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

m —试样质量，单位为克（ g ）。

计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

9 方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法曲安西龙、泼尼松龙、氢化可的松、甲基泼尼松龙、地塞米松、氟米松、曲安奈德、醋酸氟氢松、氟氢可的松、醋酸可的松、醋酸地塞米松、甲睾酮、睾酮、孕酮、醋酸去氧皮质酮检出限为 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，醋酸泼尼松检出限为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，曲安西龙、泼尼松龙、氢化可的松、甲基泼尼松龙、地塞米松、氟米松、曲安奈德、醋酸氟氢松、氟氢可的松、醋酸可的松、醋酸地塞米松、甲睾酮、睾酮、孕酮、醋酸去氧皮质酮定量限为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，醋酸泼尼松定量限为 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

蜂蜜中各种激素的回收率试验数据见附录E，在 $1.0\sim 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上的回收率范围为 $68.2\%\sim 102.2\%$ 。

9.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)

16种激素残留的CAS号、分子式、分子量及英文名称

16种激素残留的CAS号、分子式、分子量及英文名称见表A.1

表 A.1 16种激素残留的CAS号、分子式、分子量及英文名称

中文通用名称	英文通用名称	CAS号	分子式	分子量
醋酸泼尼松龙	PrednisoloneAcetate	52-21-1	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	402.48
醋酸可的松	CortisoneAcetate	50-04-4	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	402.48
泼尼松龙	Prednisolone	50-24-8	C ₂₁ H ₂₈ O ₅	360.44
氢化可的松	Hydrocortisone	50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	362.47
甲基泼尼松龙	Methyl-prednisolone	83-43-2	C ₂₂ H ₃₀ O ₅	374.47
醋酸地塞米松	Dexamethasone Acetate	55812-90-3	C ₂₄ H ₃₁ FO ₇	434.5
地塞米松	Dexamethasone	50-02-2	C ₂₂ H ₂₉ FO ₅	392.46
曲安西龙	Triamcinolone	124-94-7	C ₂₁ H ₂₇ FO ₆	394.44
氟米松	Flumethasone	2135-17-3	C ₂₂ H ₂₈ F ₂ O ₅	410.45
氟氢可的松	Fludrocortisone	127-31-1	C ₂₁ H ₂₉ FO ₅	380.45
曲安奈德	Triamcinolone	76-25-5	C ₂₄ H ₃₁ FO ₆	434.49
醋酸氟氢松	FluocinoloneAcetonide	67-73-2	C ₂₄ H ₃₀ F ₂ O ₆	452.49
睾酮	Testosterone	58-22-0	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	288.42
甲睾酮	Methyltestosterone	58-18-4	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302.45
孕酮	Progesterone	57-83-0	C ₂₁ H ₃₀ O ₂	314.46
醋酸去氧皮质酮	21-Hydroxyprogesterone-21-acetate	56-47-3	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	372.51

附录 B
(资料性附录)
参考液相色谱条件

16种激素残留的参考液相色谱条件见表B.1

表 B.1 16种激素残留的参考液相色谱条件

时间/min	乙腈/%	0.1 %甲酸水/%
0.0	20	80
1.0	50	50
3.0	65	35
7.0	85	15
9.0	100	0
10.0	100	0
11.0	20	80
12.0	20	80

附录 C
(资料性附录)
参考质谱条件¹⁾

16种激素残留的参考质谱条件见表C.1和表C.2。

表 C.1糖皮质激素的参考质谱条件

化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	S-Lens 电压 (V)	碰撞电压 (eV)
醋酸泼尼松龙	2.80	447.2	329.1	85	21
			401.2 ^a		11
醋酸可的松	4.20	401.2	329.3	89	23
			341.1 ^a		16
泼尼松龙	3.26	405.2	280.1	63	39
			329.1 ^a		21
氢化可的松	3.29	407.3	297.1	66	32
			331.2 ^a		20
甲基泼尼松龙	3.48	419.3	309.1	69	34
			343.2 ^a		20
醋酸地塞米松	4.53	433.2	361.2	95	21
			353.2 ^a		21
地塞米松	3.57	437.2	307.1	69	34
			361.2 ^a		21
曲安西龙	3.04	439.2	363.1	51	25
			345.1 ^a		21
氟米松	3.60	455.2	305.0	75	38
			379.1 ^a		21
氟氢可的松	4.06	467.2	349.1	65	35
			421.2 ^a		15
曲安奈德	3.72	479.3	337.1	80	26
			413.2 ^a		24
醋酸氟氢松	3.84	497.3	355.1	105	34
			431.2 ^a		23

注：对不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

^a为定量离子。

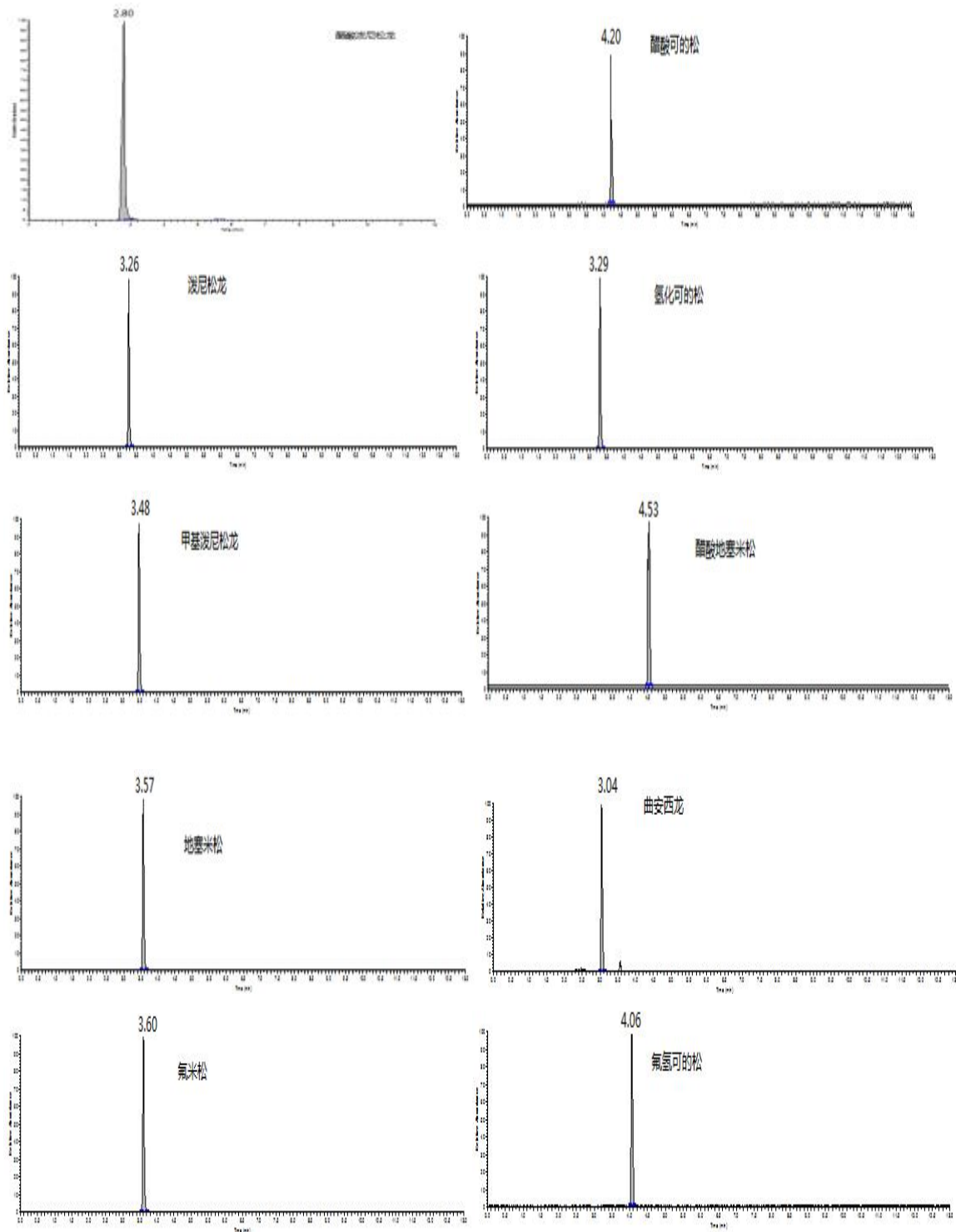
1) 非商业性声明：附录D中所列参考质谱条件是在Thermo TSQ Vantage质谱仪上完成的，此处列出试验用仪器型号仅为提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家及型号的仪器。

表C.2 雄性激素、孕激素、肾上腺皮质激素参考质谱条件

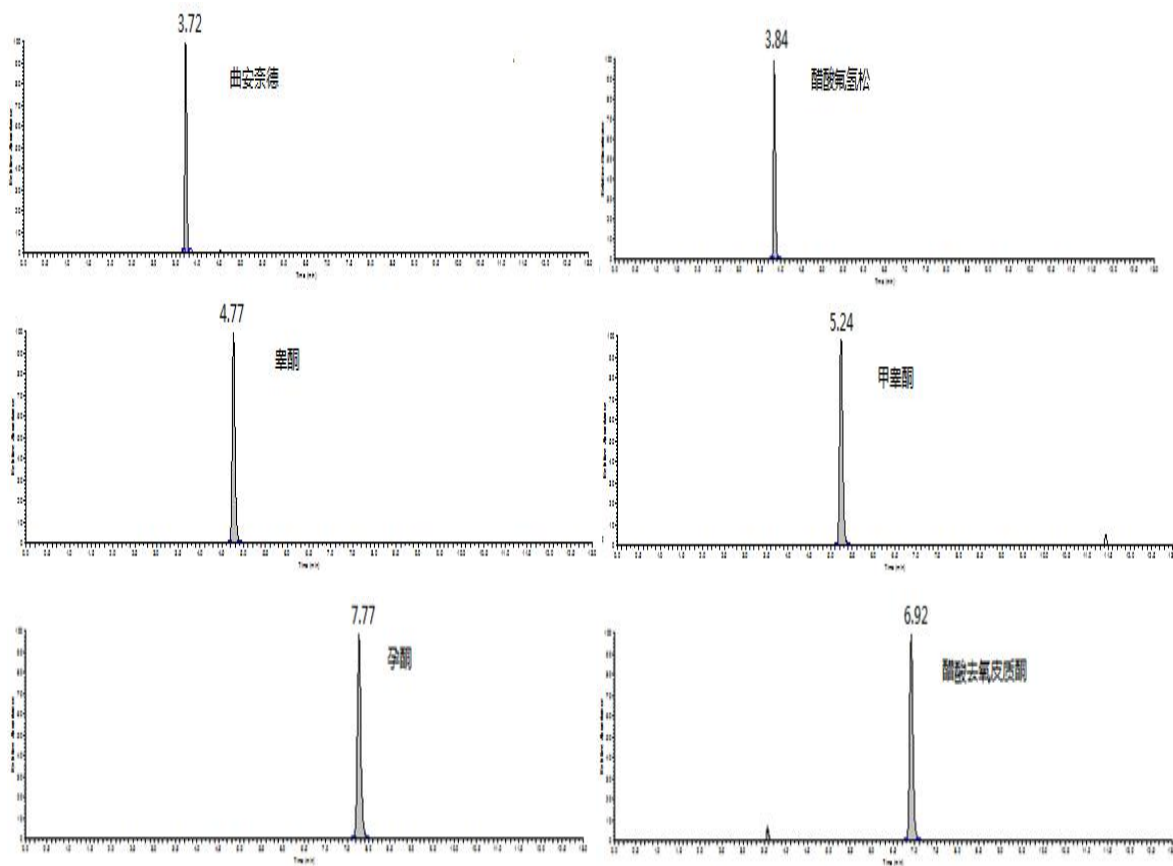
化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	S-Lens 电压 (V)	碰撞电压 (eV)
睾酮	4.77	289.2	97.1	78	20
			109.1 ^a		25
甲睾酮	5.24	303.3	97.1	86	28
			109.0 ^a		28
孕酮	7.77	315.3	97.0	87	26
			109.0 ^a		22
醋酸去氧皮质酮	6.92	373.3	109.0	86	31
			97.0 ^a		25
注：对不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。					
^a 为定量离子。					

附录 D
(资料性附录)
标准溶液特征离子质量色谱图

标准溶液特征离子质量色谱图见图D.1



图D.1 16种激素残留混合标准溶液特征离子质量色谱图



图D.1 (续)

附录 E
(资料性附录)
方法的加标回收率和相对标准偏差

16种激素残留在蜂蜜样品中的加标回收率和相对标准偏差 (RSD) 见表E.1

表E.1 16种激素残留在蜂蜜样品中的加标回收率和相对标准偏差

化合物	添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/ %	RSD/ %
醋酸泼尼松	2.00	74.2	3.2
	5.00	93.7	7.0
	10.00	87.0	4.4
醋酸可的松	1.00	71.8	3.6
	2.00	99.3	4.8
	5.00	95.6	2.8
泼尼松龙	1.00	70.2	6.1
	2.00	84.2	4.3
	5.00	86.1	1.3
氢化可的松	1.00	80.4	3.5
	2.00	83.4	1.9
	5.00	74.7	3.1
甲基泼尼松龙	1.00	83.0	1.9
	2.00	81.5	1.0
	5.00	76.7	2.4
醋酸地塞米松	1.00	68.2	6.4
	2.00	75.1	3.1
	5.00	75.9	1.4
地塞米松	1.00	77.1	7.5
	2.00	88.4	7.5
	5.00	81.1	6.8
曲安西龙	1.00	70.4	1.7
	2.00	76.2	1.9
	5.00	76.0	4.3
氟米松	1.00	74.6	5.5
	2.00	96.7	8.6
	5.00	100.1	1.0
氟氢可的松	1.00	102.2	2.1
	2.00	101.4	5.2
	5.00	99.4	1.6
曲安奈德	1.00	95.3	5.4
	2.00	98.7	2.0
	5.00	87.7	4.7
醋酸氟氢松	1.00	91.4	3.8

化合物	添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/ %	RSD/ %
	2.00	95.4	1.6
	5.00	88.5	5.4
睾酮	1.00	93.2	8.4
	2.00	89.6	7.2
	5.00	89.2	2.6
甲睾酮	1.00	88.5	5.3
	2.00	75.7	4.7
	5.00	90.7	2.0
孕酮	1.00	78.5	3.6
	2.00	78.4	2.5
	5.00	90.1	1.2
羟基醋酸去皮质酮	1.00	79.6	5.3
	2.00	76.5	2.6
	5.00	81.7	1.8