

T/HBIQA

河北省检验检疫学会团体标准

T/HBIQA 0001.5—2023

兽药制剂中非法添加 14 种蛋白同化激素 类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of illegally adulterated fourteen anabolic androgenic
steroids in veterinary drug preparations

Liquid chromatography tandem mass spectrometry

2024-02-01 发布

2024-05-01 实施

河北省检验检疫学会 发布

前 言

本文件按照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。

本文件为T/HBIQA 0001的第5部分。T/HBIQA 0001已经发布了以下部分：

- T/HBIQA 0001.1-2023：兽药制剂中非法添加3种氯霉素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.2-2023：兽药制剂中非法添加5种硝基咪唑类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.3-2023：兽药制剂中非法添加22种 β -受体激动剂类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.4-2023：兽药制剂中非法添加8种硝基咪唑类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.5-2023：兽药制剂中非法添加14种蛋白同化激素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.6-2023：兽药制剂中非法添加5种雌激素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.7-2023：兽药制剂中非法添加9种糖皮质激素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.8-2023：兽药制剂中非法添加药物安眠酮和唑吡坦的测定；
- T/HBIQA 0001.9-2023：兽药制剂中非法添加4种吩噻嗪类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.10-2023：兽药制剂中非法添加4种巴比妥类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.11-2023：兽药制剂中非法添加19种非甾体类抗炎药物的测定；
- T/HBIQA 0001.12-2023：兽药制剂中非法添加4种喹噁啉类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.13-2023：兽药制剂中非法添加9种抗病毒类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.14-2023：兽药制剂中非法添加22种 β -内酰胺类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.15-2023：兽药制剂中非法添加4种四环素类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.16-2023：兽药制剂中非法添加25种磺胺类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.17-2023：兽药制剂中非法添加19种喹诺酮类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.18-2023：兽药制剂中非法添加7种大环内酯类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.19-2023：兽药制剂中非法添加5种多肽类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.20-2023：兽药制剂中非法添加6种聚醚类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.21-2023：兽药制剂中非法添加药物泰妙菌素和沃尼妙林的测定；
- T/HBIQA 0001.22-2023：兽药制剂中非法添加8种苯并咪唑类药物的测定；
- T/HBIQA 0001.23-2023：兽药制剂中非法添加可乐定和赛庚啶的测定；
- T/HBIQA 0001.24-2023：兽药制剂中非法添加3种林可酰胺类药物的测定。

请注意本文件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。

本文件由河北省检验检疫学会提出并归口。

本文件起草单位：石家庄海关技术中心、河北省兽药饲料工作总站、河北科星药业有限公司、河北省乡村振兴促进中心、河北省动物微生态制剂产业技术研究院。

本文件主要起草人：王敬、艾连峰、王建昌、项佳林、甄理、边佳伟。

兽药制剂中非法添加 14 种蛋白同化激素类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了兽药制剂中非法添加 14 种蛋白同化激素类药物的液相色谱-串联质谱检测和确证方法。

本文件适用于兽药制剂中非法添加群勃龙、勃地龙、诺龙、睾酮、美雄酮、甲睾酮、脱氢表雄酮、丙酸诺龙、丙酸睾酮、黄体酮、雄诺龙、司坦唑醇、美替诺龙、苯丙酸诺龙等14种蛋白同化激素类药物的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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
中华人民共和国兽药典

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的蛋白同化激素类药物用乙腈提取，经分散固相萃取净化、稀释后，用液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

除另有规定外，试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.1 乙腈（ CH_3CN ），色谱纯。

5.1.2 甲醇（ CH_4O ），色谱纯。

5.1.3 甲酸（ CH_2O_2 ），色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 0.1%甲酸水溶液：量取 1.0 mL 甲酸（5.1.3），用水定容至 1000 mL，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸水-乙腈（1:1, v/v）：取 50 mL 0.1%甲酸水溶液（5.2.1），与 50 mL 乙腈（5.1.1）混匀备用。

5.3 标准品

5.3.1 群勃龙、勃地龙、诺龙、睾酮、美雄酮、甲睾酮、脱氢表雄酮、丙酸诺龙、丙酸睾酮、黄体酮、雄诺龙、司坦唑醇、美替诺龙、苯丙酸诺龙等 14 种蛋白同化激素，纯度均大于等于 95%，各化合物基本信息详见附录 A 表 A.1。

5.4 标准溶液的配制

5.4.1 标准储备液（1 mg/mL）：分别称取 14 种蛋白同化激素标准品（5.3.1）10 mg（精确至 0.1 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）溶解并定容至刻度，2 °C~8 °C 避光保存。

5.4.2 混合标准中间液（1 μg/mL）：准确吸取标准储备液（5.4.1）各 0.10 mL，置于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，2 °C~8 °C 冷藏保存。

5.4.3 标准工作溶液：准确量取适量混合标准中间液（5.4.2），用 0.1%甲酸水-乙腈水溶液（5.2.2）稀释，配制成浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的系列标准工作溶液，2 °C~8 °C 避光保存，现用现配。

5.5 材料

5.5.1 无水硫酸镁，CAS 号：7487-88-9。

5.5.2 乙二胺-N-丙基硅烷硅胶（PSA）：40 μm~60 μm。

5.5.3 十八烷基甲硅烷改性硅胶（C₁₈）：40 μm~60 μm。

5.5.4 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 离心机：转速不低于 4 000 r/min。

6.3 往复式振荡器。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 天平：感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

从原始样品中取出部分有代表性样品，片剂、颗粒等固体样品，经捣碎混匀后全部过三号筛，然后用四分法缩分出适量试样，均分成两份，装入清洁容器内，密封后作出标记，一份作为试样，一份作为留样。液体样品混匀后取出部分作为试样，其余样品作为留样。

7.2 试样保存

药品按产品说明书规定的条件保存。

注 1：在取样、制样的操作过程中，应防止样品受到污染或发生分析物含量的变化。

8 分析步骤

8.1 提取

称取 2.0 g 样品（精确至 0.01 g）于具塞锥形瓶中，加入 20 mL 乙腈，置于往复式振荡器以 120 r/min 振荡提取 30 min，4 000 r/min 离心 5 min，上清液转移至 50 mL 容量瓶中。再用 20 mL 乙腈重复提取一次，4 000 r/min 离心 5 min，合并上清液于容量瓶中，用乙腈定容至刻度，待净化。

8.2 净化

取 1.2 mL 上清液加入到内含 900 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA（5.5.2）和 50 mg C₁₈（5.5.3）的 2 mL 塑料离心管中，涡旋混匀 1 min。4 000r/min 离心 5 min，准确吸取 0.50 mL 上清液用 0.1% 甲酸水溶液（5.2.1）定容至 1 mL，过 0.22 μm 滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 液相色谱-串联质谱参考条件

8.3.1 参考色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，100 mm×2.1 mm，1.7 μm，或相当者；
- b) 流动相：乙腈（A）+0.1% 甲酸水溶液（B）；梯度洗脱，洗脱条件见表 1；
- c) 色谱柱温度：40 °C；
- d) 进样量：5 μL。

表1 梯度洗脱条件

时间(min)	流速(mL/min)	A	B
0.00	0.35	20	80
1.00	0.35	20	80
5.00	0.35	90	10
6.00	0.35	100	0
6.50	0.35	20	80
8.00	0.35	20	80

8.3.2 参考质谱条件

- a) 离子化方式：电喷雾正离子扫描模式（ESI+）；
- b) 质谱扫描方式：多反应监测（MRM）；
- c) 其他参考质谱条件见附录 A 中的表 A.1。

8.4 液相色谱-串联质谱测定

8.4.1 定性测定

在同样的测试条件下，试样溶液的保留时间在基质匹配标准溶液保留时间±0.1 min之内，（保留时间小于2 min的药物，保留时间偏差在5%之内）；试样溶液中的离子相对丰度在基质匹配标准溶液离子相对丰度±40%之内。

8.4.2 定量测定

取试样溶液和相应的基质匹配标准溶液，作单点或多点校准。试样溶液中待测物的响应值应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-串联质谱条件下，基质匹配标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录 B。

8.4.3 空白实验

除不加样品外，按上述相同条件和步骤进行。

注 2：化学兽药制剂和非法添加的药物可能会造成相应项目的实验污染，应加强实验环境的控制以及所用器皿、仪器的维护清洗。

9 结果计算

试样中 14 种蛋白同化激素类药物的含量由色谱数据处理软件计算，或按式（1）计算：

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_3}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times C \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中被测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A ——样品溶液中被测物的峰面积；

A_s ——标准溶液中被测物的峰面积；

C ——标准溶液中被测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_1 ——提取溶剂总体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——净化后吸取出的提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——样品溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试料的质量，单位为克（g）。

计算结果保留两位有效数字，当结果大于 1 mg/kg 时保留三位有效数字。

10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法检出限为 0.05 mg/kg，定量限为 0.1 mg/kg。

10.2 准确度

本方法对针剂、粉剂和酞剂中 14 种蛋白同化激素类药物在 0.1 mg/kg~1.0 mg/kg 添加浓度的回收率范围为 80%~110%。

10.3 精密度

本方法相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

全国团体标准信息平台

附录 A
(资料性)
参考质谱条件

参考质谱条件¹⁾:

- a) 电喷雾电压: 0.5 kV;
- b) 锥孔电压: 20V;
- c) 去溶剂气温度: 500°C;
- d) 去溶剂气流速: 1 000 L/Hr;
- e) 锥孔反吹气流速: 150 L/Hr;
- f) 雾化气压力: 7 Bar;
- g) 碰撞气: 高纯氦气;
- h) 其他参数见表 A.1。

表A.1 被测物的参考保留时间、监测离子对和裂解能量

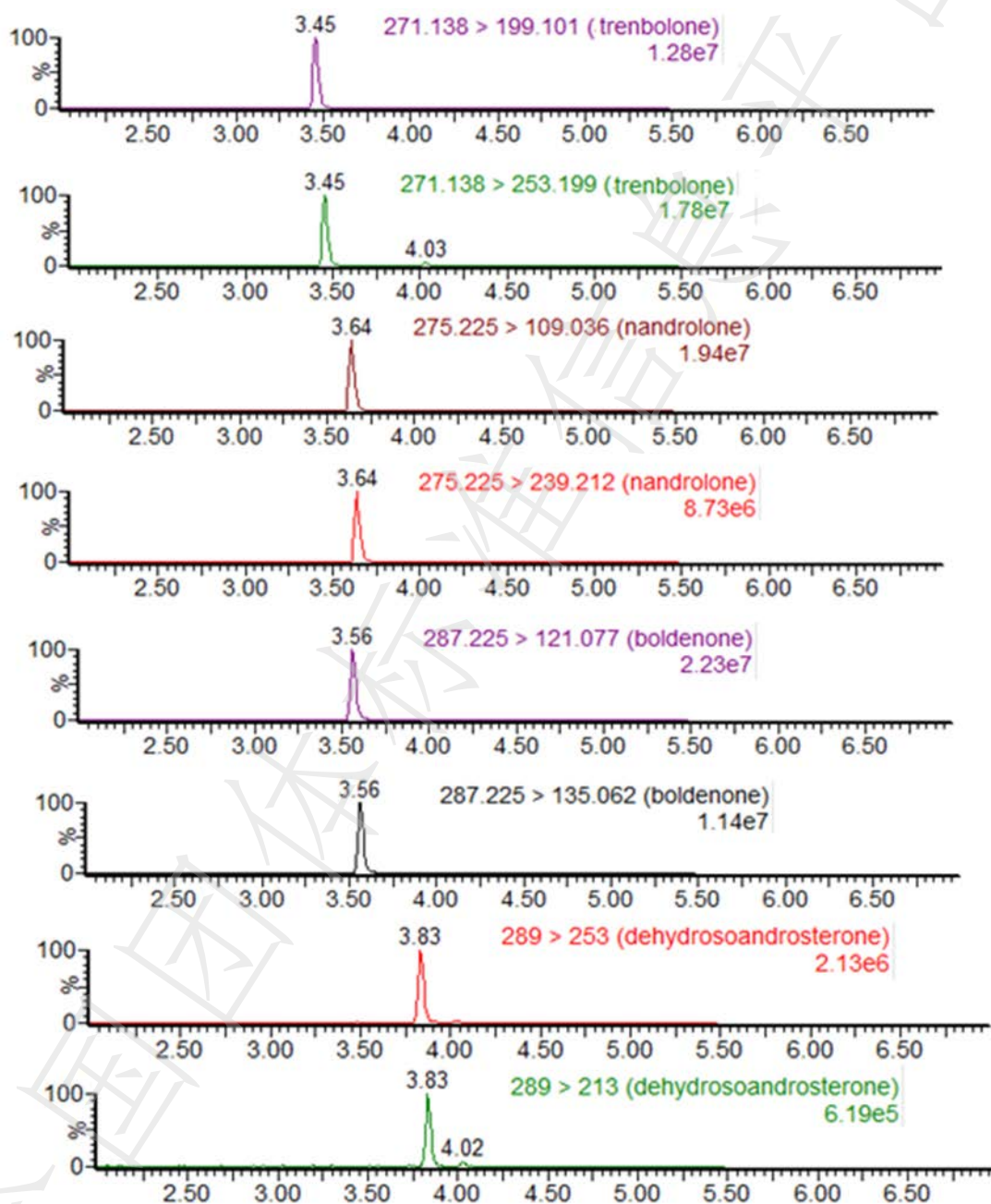
分析物	英文名	CAS号	保留时间 (min)	离子对 m/z	碰撞能量(CE) ev
群勃龙	Trenbolone	1061-33-8	3.47	271.1/253.2*	18
				271.1/199.1	32
勃地龙	Boldenone	846-48-0	3.57	287.2/121.1*	24
				287.2/135.1	14
诺龙	Nandrolone	433-22-0	3.66	275.2/109.0*	24
				275.2/239.2	16
睾酮	Testosterone	58-22-0	3.85	289.2/97.0*	22
				289.2/109.1	26
美雄酮	Methandienone	72-63-9	3.74	301.2/121.1*	26
				301.2/283.2	10
司坦唑醇	Stanozolol	10418-03-8	3.78	329.3/81.0*	46
				329.3/121.1	36
脱氢表雄酮	Dehydroepiandrosterone	53-43-0	3.85	289.0/253.0*	12
				289.0/213.0	20
甲睾酮	17-methyltestosterone	58-18-4	4.04	303.3/109.0*	24
				303.3/97.1	22
美替诺龙	Methenolone	153-00-4	4.05	303.1/83.0*	23
				303.1/187.2	20
雄诺龙	Stanolone	521-18-6	4.27	291.3/255.3*	15
				291.3/81.0	30
黄体酮	Progesterone	57-83-0	4.76	315.3/97.0*	20
				315.3/109.1	24
丙酸诺龙	Nandrolone	7207-92-3	5.35	331.2/257.2*	14

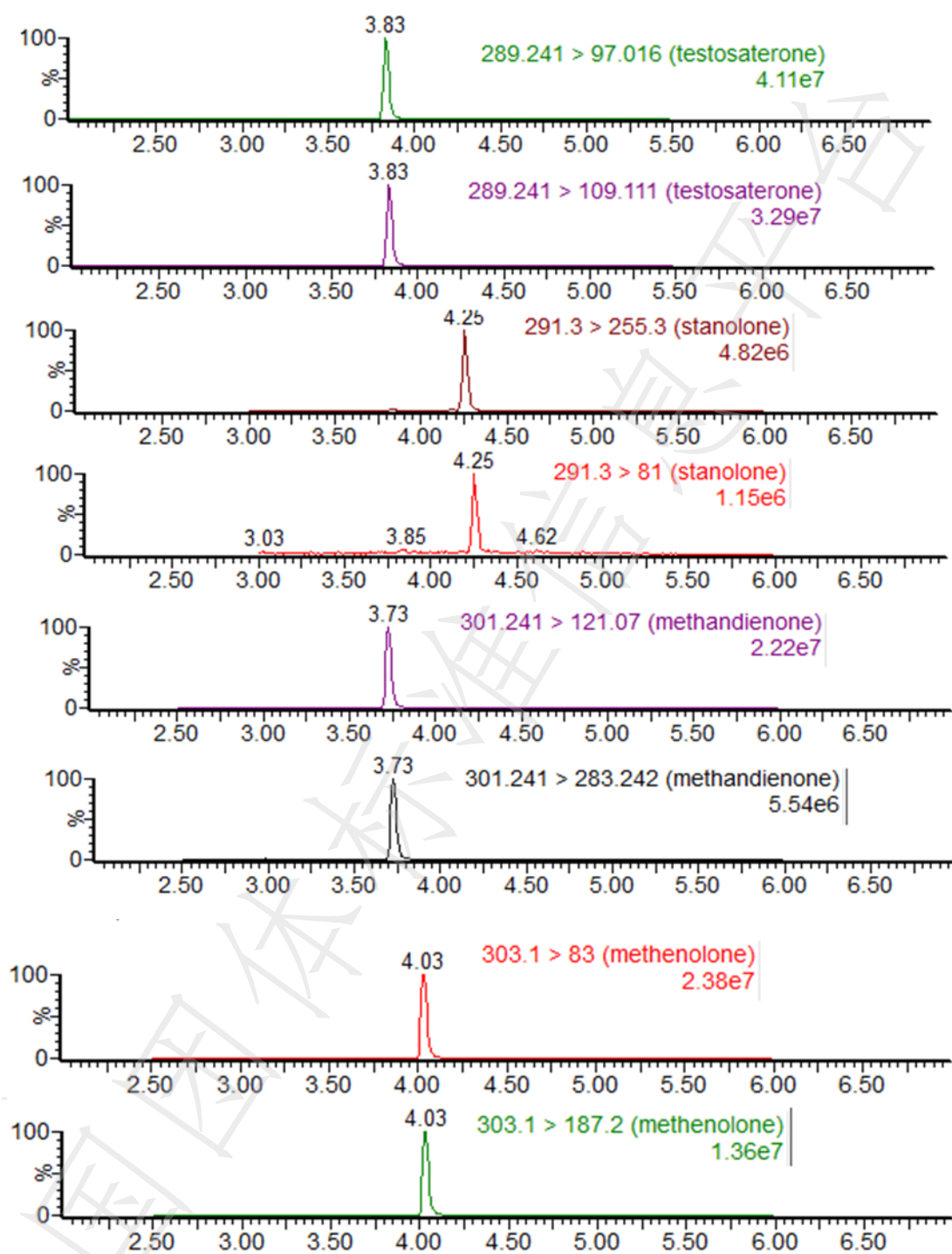
1) 非商业性声明: 附录 A 所列参考质谱条件是在 Waters XEVO-TQS 型液质联用仪上完成的, 此处列出试验用仪器型号仅为提供参考, 并不涉及商业目的, 鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的仪器。

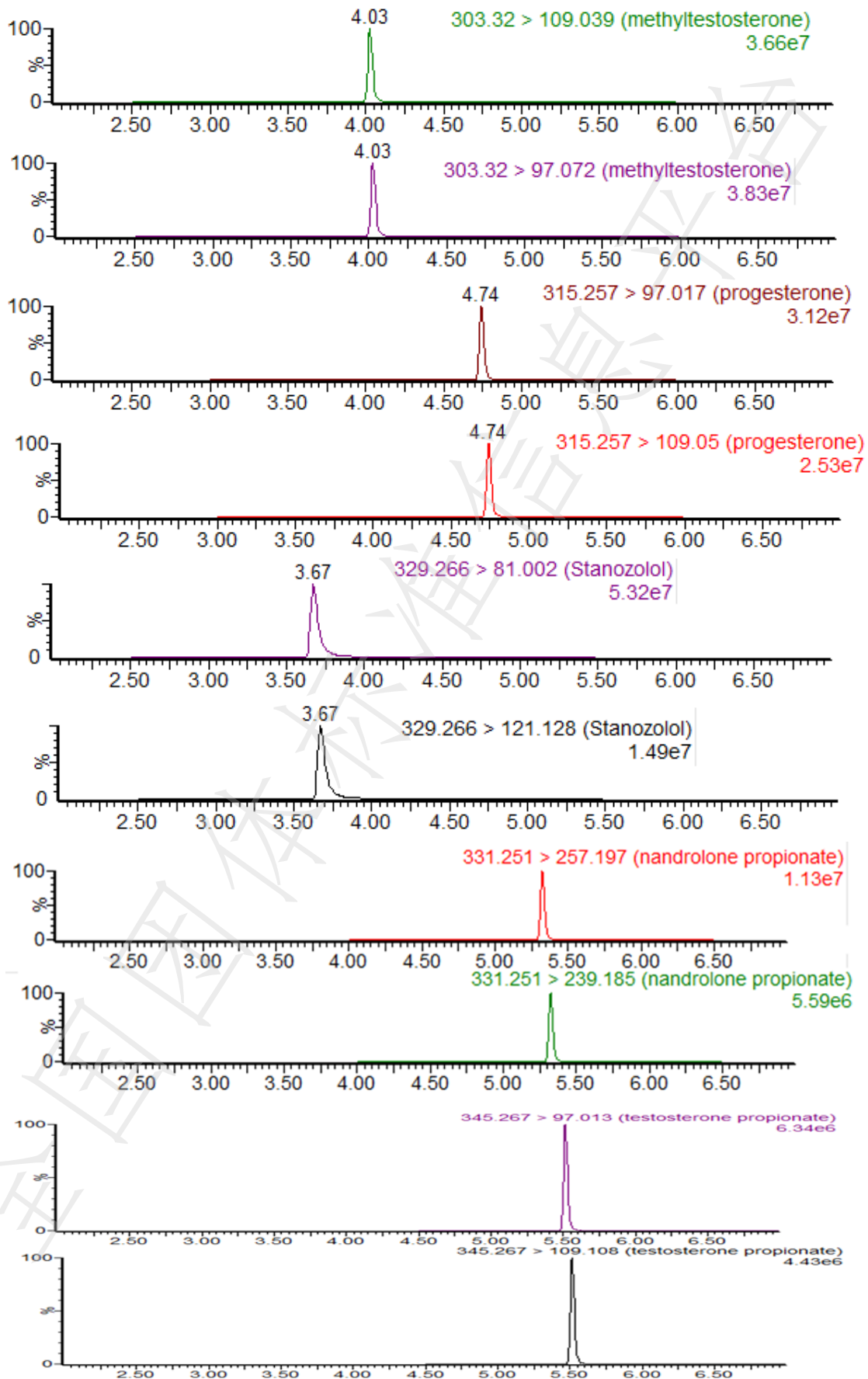
分析物	英文名	CAS号	保留时间 (min)	离子对 m/z	碰撞能量(CE) ev
	17-propionate			331.2/239.2	16
丙酸睾酮	Testosterone propionate	57-85-2	5.54	345.3/97.0*	20
				345.3/109.1	26
苯丙酸诺龙	Nandrolone phenylpropionate	62-90-8	5.88	407.1/105.1*	28
				407.1/257.2	24

注：*为定量离子对，对于不同质谱仪器，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

附录 B
(资料性)
标准溶液多反应监测色谱图







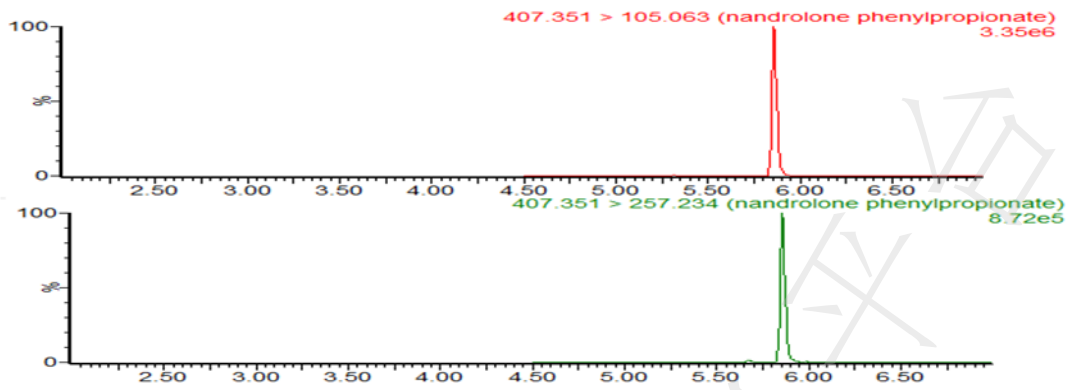


图 B.1 14 种蛋白同化激素类药物标准溶液多反应监测色谱图 (20 ng/mL)