

ICS 65.120

CCS B 46



# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 914—202X

代替 NY/T 914-2004

## 饲料中氢化可的松的测定

Determination of hydrocortisone in feeds

(公开征求意见稿)

202X - XX - XX 发布

202X - XX - XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件代替NY/T 914—2004《饲料中氢化可的松的测定 高效液相色谱法》，与NY/T 914—2004相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了方法的适用范围（见第1章，2004版的第1章）
- b) 更改了高效液相色谱法的检出限，增加了定量限（见第1章，2004版的第1章），
- c) 更改了原理的表述（见第4章，2004版的第3章）
- d) 增加了试样净化步骤（见4.5.2）；
- e) 修改了检测波长为245 nm（见4.5.3.1，2004版的7.2.1）；
- f) 增加了液相色谱-串联质谱法（见第5章）。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：四川省饲料工作总站 [农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）]。

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2004年首次发布的为NY/T 914—2004；

——本次为第一次修订。

# 饲料中氢化可的松的测定

## 1 范围

本文件描述了饲料中氢化可的松的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中氢化可的松的测定。

本文件高效液相色谱法配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为0.5 mg/kg，定量限为1.0 mg/kg；添加剂预混合饲料的检出限为1.0 mg/kg，定量限为2.0 mg/kg。液相色谱-串联质谱法配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为2 μg/kg，定量限为5 μg/kg；添加剂预混合饲料的检出限为4 μg/kg，定量限为10 μg/kg。

## 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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 高效液相色谱法

### 4.1 原理

试样中的氢化可的松用甲醇提取，经石墨化碳黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化后，用高效液相色谱仪检测，外标法定量。

### 4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.3 乙腈：色谱纯。

4.2.4 二氯甲烷：色谱纯。

4.2.5 淋洗液：甲醇+水=50+50。

- 4.2.6 洗脱液：二氯甲烷+甲醇=10+90。
- 4.2.7 30%乙腈溶液：30 mL 乙腈加水稀释至 100 mL，混匀。
- 4.2.8 标准储备溶液（1.0 mg/mL）：称取氢化可的松标准品（CAS：50-23-7，纯度不低于 97%）50 mg（精确至 0.01 mg）于 50 mL 容量瓶中，用甲醇溶解定容，混匀，于-18℃以下避光保存，有效期为 3 个月。
- 4.2.9 标准系列溶液：准确移取适量体积的标准储备溶液（4.2.8），用 30%乙腈溶液（4.2.7）稀释，定容，配制成浓度分别为 0.5 μg/mL，1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、50.0 μg/mL 的标准工作液，混匀，于 2~8℃避光保存，有效期为 1 个月。
- 4.2.10 石墨化碳黑固相萃取柱：500 mg/6 mL，或性能相当者。
- 4.2.11 氨基固相萃取柱：500 mg/6 mL，或性能相当者。
- 4.2.12 微孔滤膜：0.45 μm，有机系。

### 4.3 仪器设备

- 4.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。
- 4.3.2 分析天平：感量 0.0001 g 和 0.01 mg。
- 4.3.3 离心机：转速不低于 8000 r/min。
- 4.3.4 涡旋混合器。
- 4.3.5 振荡器。
- 4.3.6 固相萃取装置。
- 4.3.7 氮吹仪。

### 4.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，避光保存，备用。

### 4.5 试验步骤

#### 4.5.1 提取

平行做两份试验。

配合饲料、浓缩饲料、精料补充料：称取试样 2 g，（精确到 0.000 1 g），置于 50 mL 离心管中，准确加入甲醇 20.0 mL，涡旋混匀 30 s，振荡提取 15 min，8 000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 10.0 mL，于 50℃ 下氮气吹干，加入 2 mL 甲醇溶解残渣，再加入 8 mL 水，混匀，备用。

添加剂预混合饲料：称取试样 1 g（精确到 0.000 1 g），置于 50 mL 离心管中，准确加入甲醇 20.0 mL，涡旋混匀 30 s，振荡提取 15 min，8 000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 10.0 mL，于 50℃ 下氮气吹干，准确加入 1.0 mL 30%乙腈溶液（4.2.7）溶解，备用。

#### 4.5.2 净化

配合饲料、浓缩饲料、精料补充料：石墨化碳黑固相萃取柱（4.2.10）依次用 6 mL 二氯甲烷、6 mL 甲醇、6 mL 水活化，取备用液（4.5.1）全部过柱。用 3 mL 淋洗液（4.2.5）淋洗，抽干。将预先用 6 mL 洗脱液（4.2.6）活化好的氨基固相萃取柱（4.2.11）串接在碳黑固相萃取柱下方，6 mL 洗脱液（4.2.6）

洗脱，收集洗脱液，于50℃下氮气吹干，残余物用1.00 mL 30%乙腈溶液（4.2.7）溶解，用0.45 μm 滤膜（4.2.12）过滤后上机测定。

添加剂预混合饲料：备用液用0.45 μm 滤膜（4.2.12）过滤后上机测定。

### 4.5.3 测定

#### 4.5.3.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长250 mm，柱内径4.6 mm，粒径5 μm，或性能相当者；

流动相：乙腈+水=30+70；

流速：1.0 mL/min；

柱温：30℃；

进样量：20 μL；

检测波长：245 nm

#### 4.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（4.2.9）和试样溶液（4.5.2）上机测定。氢化可的松标准溶液的高效液相色谱图参见附录A。

#### 4.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中氢化可的松保留时间应与标准系列溶液中氢化可的松的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

#### 4.5.3.4 定量

以氢化可的松的标准系列溶液中的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于0.99。试样溶液与标准溶液中氢化可的松的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应将试样提取液用甲醇（4.2.2）稀释（稀释倍数n）至线性范围内，重新试验。单点校准定量时，试样溶液中氢化可的松的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

## 4.6 试验数据处理

试样中氢化可的松的含量以质量分数  $\omega_1$  计，单位为毫克每千克（mg/kg），多点校准按公式（1）计算：

$$\omega_1 = \frac{\rho_1 \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m_1 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho_1$ ——从标准曲线查得的试样溶液氢化可的松的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

$V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ ——移取上清液的体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——上机前最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_1$ ——试样质量，单位为克（g）；

$n$ ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

单点校准按公式（2）计算：

$$\omega_1 = \frac{A_1 \times \rho_{s1} \times V \times V_2 \times 1000}{A_{s1} \times V_1 \times m_1 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$\rho_{sl}$ ——标准溶液中氢化可的松的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

$A_l$ ——试样溶液中氢化可的松色谱峰面积；

$A_{sl}$ ——标准溶液中氢化可的松的色谱峰面积；

$V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$V_1$ ——移取上清液的体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$V_2$ ——上机前最终定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$m_1$ ——试样质量，单位为克（ $\text{g}$ ）；

$n$ ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

#### 4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的10%。

### 5 液相色谱-串联质谱法

#### 5.1 原理

试样中的氢化可的松用甲醇提取，经石墨化碳黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化后，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配外标法定量。

#### 5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 0.1%甲酸水溶液：1 mL 甲酸加水稀释至 1 L，混匀。

5.2.2 标准中间溶液（10.0  $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准储备液（4.2.8）1 mL 于 100 mL 容量瓶，用甲醇定容，于 2~8  $^{\circ}\text{C}$  避光保存，有效期为 1 个月。

5.2.3 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，有机系。

5.2.4 其它同 4.2

#### 5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

5.3.2 分析天平：感量 0.000 1 g 和 0.01 mg。

5.3.3 离心机：转速不低于 8000 r/min。

5.3.4 涡旋混合器。

5.3.5 振荡器。

5.3.6 固相萃取装置。

5.3.7 氮吹仪。

#### 5.4 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过0.42 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，避光保存，备用。选取类型相同，均匀一致、且在待测物保留时间处，仪器响应值小于方法定量限30%的饲料样品，作为空白样品。

## 5.5 试验步骤

### 5.5.1 提取

同4.5.1。

### 5.5.2 净化

配合饲料、浓缩饲料、精料补充料：前同4.5.2，用0.22 μm 滤膜（5.2.3）过滤后上机测定。添加剂预混合饲料：备用液用0.22 μm 滤膜（5.2.3）过滤后上机测定。

### 5.5.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白样品，按5.5.1和5.5.2处理得到空白残余物，用30%乙腈溶液（4.2.7）稀释标准中间液（5.2.2），配制成2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL标准系列溶液，各取1.0 mL溶解空白残余物，配制成浓度为2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL基质匹配标准系列溶液。

### 5.5.4 测定

#### 5.5.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒径2.4 μm，或性能相当者。

柱温：30℃。

流速：0.3 mL/min。

进样量：5 μL。

流动相：A相：乙腈（4.2.3）；B相：0.1%甲酸水溶液（5.2.1），梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0.00	20	80
5.00	50	50
7.00	90	10
7.01	20	80
10.00	20	80

#### 5.5.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI<sup>+</sup>）。

检测方式：多反应监测（MRM）。

毛细管电压：3.5 kV。

干燥气温度：300℃。

干燥气流速：5 L/min。

雾化器压力：45 psi。

氢化可的松的定性离子对、定量离子对及其他参考质谱条件等见表2。

表2 氢化可的松的定性、定量离子对及其他参考质谱条件

被测物名称	监测离子对 (m/z)	碰撞能量 (eV)
氢化可的松	362.9/120.9 <sup>a</sup>	20
	362.9/308.9	15
<sup>a</sup> 为定量离子。		

#### 5.5.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液（5.5.3）和试样溶液（5.5.2）上机测定。氢化可的松标准溶液的定性定量离子色谱图参见附录B。

#### 5.5.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液中氢化可的松的保留时间相对偏差应在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中氢化可的松定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在对应的氢化可的松。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50 (含)	>10~20 (含)	≤10
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

#### 5.5.4.5 定量

以氢化可的松基质匹配标准系列溶液的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于0.99。试样溶液与标准溶液中氢化可的松的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新试验或将试样溶液用甲醇（4.2.2）稀释（稀释倍数n）至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中氢化可的松的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

### 5.6 试验数据处理

试样中氢化可的松的含量以质量分数 $\omega_2$ 计，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ），多点校准按公式（3）计算：

$$\omega_2 = \frac{\rho_2 \times V \times V_2 \times 1000}{V_1 \times m_2 \times 1000} \times n \dots \dots \dots (3)$$

式中：

$\rho_2$ ——由标准曲线得到的试样溶液中氢化可的松的质量浓度，单位为纳克每毫升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；

$V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$V_1$ ——移取上清液的体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；



$V_2$ ——上机前最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_2$ ——试样质量，单位为克（g）。

$n$ ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

单点校准按公式（4）计算：

$$\omega_2 = \frac{A_2 \times \rho_{s2} \times V \times V_2 \times 1000}{A_{s2} \times V_1 \times m_2 \times 1000} \times n \dots\dots\dots (4)$$

式中：

$A_2$ ——试样溶液中氢化可的松的色谱峰面积；

$A_{s2}$ ——基质匹配标准溶液中氢化可的松的色谱峰面积；

$\rho_{s2}$ ——基质匹配标准溶液中氢化可的松的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

$V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$V_1$ ——移取上清液的体积，单位为毫升（mL）；

$V_2$ ——上机前最终定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_2$ ——试样质量，单位为克（g）。

$n$ ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

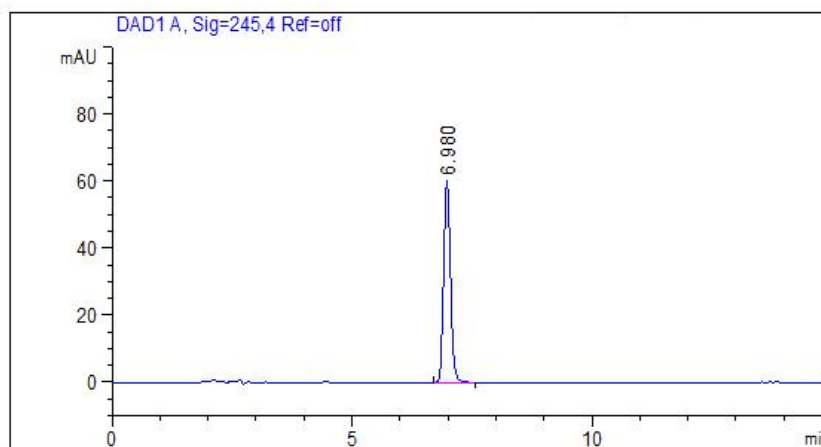
测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

## 5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%

**附录 A**  
**(资料性)**  
**氢化可的松标准溶液的高效液相色谱图**

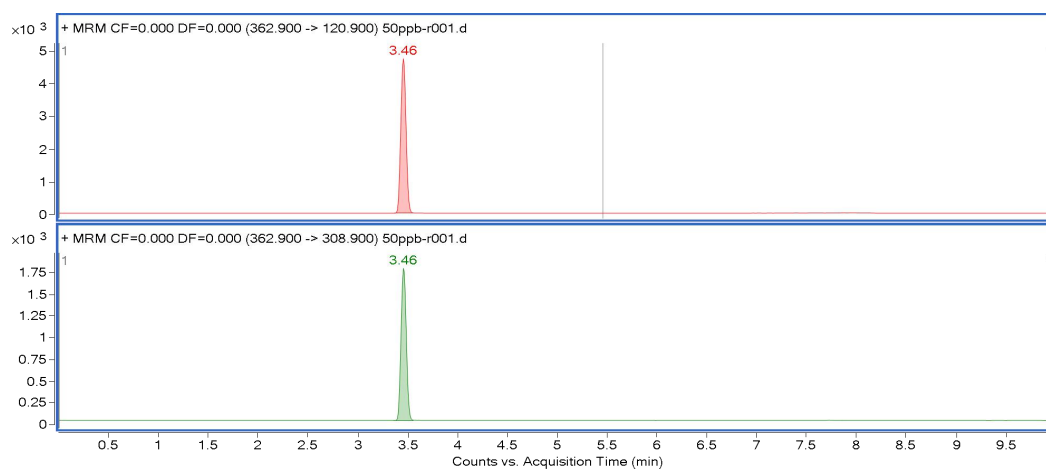
A.1 氢化可的松标准溶液的高效液相色谱图，见图A.1。



图A.1 氢化可的松标准溶液（5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）的高效液相色谱图

附录 B  
(资料性)  
氢化可的松标准溶液的定性定量离子色谱图

B.1 氢化可的松标准溶液的定性定量离子色谱图，见图B.1。



图B.1 氢化可的松标准溶液（50 ng/mL）的定性定量离子色谱图

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中氢化可的松的测定》

编制说明

（公开征求意见稿）

起草单位：四川省饲料工作总站农业农村部饲料质量  
监督检验测试中心（成都）

2021年3月

目 录

一、标准制定背景及任务来源	2
二、主要工作过程	4
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	5
四、采用国际标准	30
五、与现行法律法规和强制性标准的关系	30
六、重大分歧意见的处理经过和依据	30
七、标准作为强制性或推荐性标准的意见	30
八、贯彻标准的要求和措施建议	30
九、废止现行有关标准的建议	31
十、其他应予说明的事项	31
主要参考文献	31

## 一、标准制定背景及任务来源

### 1. 标准制定背景

氢化可的松（Hydrocortisone）是一种糖皮质激素类药物，分子式： $C_{21}H_{30}O_5$ ，分子量：362.46，CAS号：50-23-7，结构式见图1：

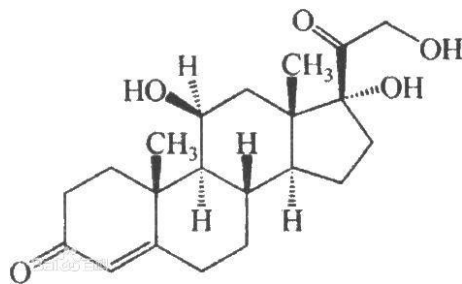


图1 氢化可的松结构式

糖皮质激素药物由于良好的抗炎、抗免疫、抗毒素和抗休克作用，在兽医临床防治动物疫病上被广泛应用。糖皮质激素可分为内源性糖皮质激素及人工合成的糖皮质激素，其中内源性糖皮质激素包括可的松和氢化可的松等；人工合成的糖皮质激素包括地塞米松、倍他米松、双氟米松、曲安西龙、甲基波尼松龙以及波尼松龙等。这类药物同 $\beta$ -受体激动剂和合成类固醇激素一样，具有增加体重，脂肪再分配作用，在饲料中使用能起到治病、促生长作用，对猪的增重效果明显。因此，糖皮质激素类药物容易被一些养殖户滥用。动物生长过程中过量使用糖皮质激素会导致其在动物源性食品中残留，给人体健康带来极大的危害。因此，世界各国都十分重视动物性食品中糖皮质激素残留的监测，并规定了最大残留量，我国目前动物性食品中规定了最大残留限量的糖皮质激素有地塞米松、倍他米松。

经查证，目前糖皮质激素类药物未列入《饲料原料目录》、《饲料添加剂品种目录》、《饲料药物添加剂品种目录》中，仅可作为兽药使用，并且要严格遵守休药期，因此在商品饲料生产中禁止添加使用，糖皮质激素类药物作为饲料中的促生长使用是绝对非法的。早在 2004 年，农业部就制定发布并实施了 NY/T 914-2004《饲料中氢化可的松的测定 高效液相色谱法》农业行业标准，由于标准实施时间太久，标准检测方法陈旧，特别是前处理方法过于简单，仅用甲醇提取后直接上机测定，没有净化、浓缩步骤，标准使用过程中，饲料基质复杂，杂质干扰特别大，对色谱柱和仪器污染严重，需进行进一步修订。

查阅标准，目前国内有关饲料中糖皮质激素类药物的检测标准还有：

(1) 农业部 1068 号公告-2-2008 《饲料中 5 种糖皮质激素的测定 高效液相色谱法》<sup>[1]</sup>

(2) 农业部 1063 号公告-5-2008 《饲料中 9 种糖皮质激素的检测 液相色谱—串联质谱法》<sup>[2]</sup>（包含氢化可的松）

查阅相关文献<sup>[3][4]</sup>，饲料中糖皮质激素类药物的检测也多采用液相色谱法和液相色谱串联质谱法，因此，我们修订 NY/T 914-2004 的主要内容确定为修订老标准中已有的高效液相色谱法，并增加液相色谱串联质谱法，以满足饲料中高低浓度氢化可的松的检测要求。

## 2.任务来源

根据 2016 年全国饲料工业标准化技术委员会下达的饲料工业国家标准、行业标准制修订文件，农业农村部饲料质量监督检验测试中

心（成都）承担了 NY/T 914-2004《饲料中氢化可的松的测定 高效液相色谱法》农业行业标准修订工作（项目编号 2016-29-87），该标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

## 二、主要工作过程

### 1.成立标准编制小组

计划任务下达后，我中心成立标准起草小组，对标准起草工作进行分工，明确任务职责，确保项目顺利实施。

### 2.查询国内外相关标准和文献资料

查阅了国内外有关标准和参考文献等技术资料，选取具有代表性的参考资料作为标准起草中的主要技术参考文本。

### 3.确定标准制定技术路线，制定原则

本标准依据氢化可的松的理化性质的基础上，本着科学和准确的原则，结合我国现阶段实验水平制定。

### 4.进行论证实验，建立新标准方法

通过实验摸索，优化样品前处理条件和上机条件，修订饲料中氢化可的松的高效液相色谱法，建立液相色谱-串联质谱法。

### 5.编写标准征求意见稿

2019年5月，根据收集和查阅的相关资料文献以及实验测定结果，最终形成标准征求意见稿，编写标准文本内容和编制说明。

### 6.征求专家意见

总共发送“征求意见稿”26份，回函25份，合并相同意见后共计



65 条，在此基础上修改征求意见稿，形成标准预审稿。

## 7. 组织方法验证

2020 年 7 月，本标准方法经山东省饲料质量检验所、河南省兽药饲料监察所和农业农村部食品质量监督检验测试中心（成都）3 家单位验证。验证结果表明，该标准方法设计合理，实用有效。

## 8. 标准的预审

在全国饲料工业标准化技术委员会的指导下，标准编制小组邀请山东省饲料质量检验所、中国农科院质标所、河南省兽药饲料监察所等单位 8 位专家于 2021 年 2 月 3 日对标准进行了预审，并提出意见。标准编制小组根据预审会专家组的意见和建议，进一步补充有关数据、修改完善标准文本和编制说明，形成标准公开征求意见稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核。

# 三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

## 1. 标准编制原则

本标准是依据氢化可的松的理化性质，本着科学和准确的原则，结合我国现阶段实验水平制定的。在标准制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，依据 GB/T 1.1 - 2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的要求，以参照国内外相关标准与文献为基础而编制，确保方法标准的科学性、可行性和可靠性。

## 2. 修订内容的说明

本次修订除按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 对标准进行编辑性修改外，主要针对 NY/T 914-2004 存在的问题，修改了标准方法适用范围，液相色谱法增加了净化步骤，修改了检测波长为

245nm, 增加了液相色谱-串联质谱法, 修订后标准与原标准、参考标准的对比详见表 1。

表 1 修订后标准与原标准、参考标准的对比

序号	对比条目	原标准 (NY/T 914-2004)	参考标准 (农业部 1063 号公告 -5-2008)	修订后	修订说明
1	标准名称	《饲料中氢化可的松的测定 高效液相色谱法》	《饲料中 9 种糖皮质激素的检测 液相色谱-串联质谱法》	《饲料中氢化可的松的测定》	由于增加了液相色谱串联质谱法, 现标准存在两种方法, 原标准名称已不符合现标准内容。
2	检测对象	氢化可的松	泼尼松龙、泼尼松、甲基泼尼松龙、氢化可的松、倍氯米松、地塞米松、倍他米松、醋酸氟氢可的松和醋酸可的松	氢化可的松	检测对象与原标准一致。
3	检测方法	HPLC	LC-MS/MS	HPLC 和 LC-MS/MS	现标准增加了液相色谱-串联质谱法。
4	适用范围	配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料	配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料	配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料	增加了标准的适用范围, 根据标准内容重新描述。
5	检出限和定量限	本方法最低检测限为 0.05mg/kg。	本标准最低检出限为 2 μg/kg, 最低定量限为 5μg/kg	本文件高效液相色谱法配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为 0.5 mg/kg, 定量限为 1.0	增加了高效液相色谱法的定量限和液相色谱-串联质谱法的检出限和定量

序号	对比条目	原标准 (NY/T 914-2004)	参考标准 (农业部 1063 号公告-5-2008)	修订后	修订说明
				mg/kg; 添加剂预混合饲料的检出限为 1.0 mg/kg, 定量限为 2.0 mg/kg。液相色谱-串联质谱法在配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为 2 µg/kg, 定量限为 5 µg/kg; 在添加剂预混合饲料的检出限为 4 µg/kg, 定量限为 10 µg/kg。	限。
6	原理	用甲醇提取试样中的氢化可的松, 以乙腈、水作为流动相, 用高效液相色谱-紫外检测法分离测定。	试样中的糖皮质激素药物经甲醇提取后, 浓缩蒸干, 溶解后用固相萃取柱净化, 液相色谱-串联质谱法测定, 外标法定量。	HPLC: 试样中的氢化可的松用甲醇提取、经石墨化碳黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化后, 用高效液相色谱仪检测, 外标法定量。 LC-MS/MS: 试样中的氢化可的松用甲醇提取、经石墨化碳黑固相萃取柱和氨基固相萃取柱净化后, 用液相色谱-串联质谱仪检测, 基质匹配外标法定量。	因为方法增加了净化步骤, 因此原理进行了重新描述。

序号	对比条目	原标准 (NY/T 914-2004)	参考标准 (农业部 1063 号公告-5-2008)	修订后	修订说明
7	提取步骤	按不同的饲料产品, 准确称取配合饲料、浓缩饲料 2-10g, 预混料 0.5-4g, 置于 250mL 玻璃具塞三角瓶中, 加入 40mL 甲醇, 往复振荡 30min, 静止 10min, 过滤, 再向饲料中分别加入 30mL 甲醇, 重复提取 2 次。合并 3 次提取液, 用甲醇定容至 100mL。取 10mL 置离心管中, 3000r/min 离心 5min, 取上清液用 0.45μm 微孔有机滤膜作为试样制备液, 供高效液相色谱分析。	称取试样 5g, (准确至 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入甲醇 15mL, 涡旋混合 1min, 振荡提取 15 min, 6000 r/min 离心 10 min, 移取上清液。重复提取一次, 合并上清液。于 40℃ 下旋转蒸至尽干。加入 4 mL 甲醇溶解残渣, 再加入 16 mL 水, 混匀。6000 r/min 离心 10 min, 已取上清液, 备用。	配合饲料、浓缩饲料、精料补充料: 称取试样 2 g, (精确到 0.0001 g), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入甲醇 20.0 mL, 涡旋混匀 30 s, 振荡提取 15 min, 8000 r/min 离心 5 min, 准确移取上清液 10.0 mL, 于 50℃ 下氮气吹干, 加入 2 mL 甲醇溶解残渣, 再加入 8 mL 水, 混匀, 备用。 添加剂预混合饲料: 称取试样 1 g (精确到 0.0001 g), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入甲醇 20.0 mL, 涡旋混匀 30 s, 振荡提取 15 min, 8000 r/min 离心 5 min, 准确移取上清液 10.0 mL, 于 50℃ 下氮气吹干, 准确加入 1.00 mL 30% 乙腈溶液溶解, 备用。	明确了不同类型饲料样品称样量, 对提取方法进行了优化, 减少了有机溶剂的使用, 简化了提取方式, 缩短了提取时间, 并且方法学考察效果良好。
8	净化步骤	/	取碳黑固相萃取柱依次用二氯甲烷、甲醇、水各 6mL 活化, 取备用液全部过柱。用 1mL 甲	配合饲料、浓缩饲料、精料补充料: 石墨化碳黑固相萃取柱依次用 6 mL 二氯甲烷、6 mL 甲醇、	参考农业部 1063 号公告-5-2008 的净化方式, 增加了净化步骤, 并优化了淋

序号	对比条目	原标准 (NY/T 914-2004)	参考标准 (农业部 1063 号公告-5-2008)	修订后	修订说明
			醇淋洗, 抽干。将预先用 6 mL 洗脱液活化好的氨基固相萃取柱串接在碳黑固相萃取柱下方。6 mL 洗脱液洗脱, 收集洗脱液于 50℃ 下氮气吹干。残余物用 30% 乙腈溶液 0.5mL 溶解, 涡旋混匀, 6000r/min 高速离心 10min, 取上清液适量, 供液相色谱-串联质谱仪测定。	6 mL 水活化, 取备用液全部过柱。用 3 mL 淋洗液淋洗, 抽干。将预先用 6 mL 洗脱液活化好的氨基固相萃取柱串接在碳黑固相萃取柱下方, 收集洗脱液, 于 50℃ 下氮气吹干, 残余物用 1.00 mL 30% 乙腈溶液溶解, 用 0.45μm/ 0.22μm 滤膜过滤后上机测定。  添加剂预混合饲料: 备用液用 0.45μm/ 0.22μm 滤膜过滤后上机测定。	洗液和洗脱液条件。
9	HPLC 法 色谱条件	色谱柱: C18 柱, 长 240 mm, 内径 4.6 mm (i.d.), 粒径 5 μm 或相当者; 柱温: 室温; 流动相: 乙腈+水=25+75 (V+V); 流速: 1.0 mL/min; 波长: 254 nm 进样量: 20 μL。	/	色谱柱: C18 柱, 柱长 250 mm, 柱内径 4.6 mm, 粒径 5 μm, 或性能相当者; 流动相: 乙腈+水=30+70; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30℃; 进样量: 20 μL; 检测波长: 245 nm	明确了柱温为 30℃, 根据氢化可的松紫外最大吸收波长修改了检测波长为 245nm。

序号	对比条目	原标准 (NY/T 914-2004)	参考标准 (农业部 1063 号公告 -5-2008)	修订后	修订说明
10	LC-MS/MS 色谱条件	/	色谱柱: BEH C18 柱 (100 mm ×2.1 mm, 1.7 μm,) 或相当者。 柱温: 30℃。 流速: 0.3 mL/min。 进样量: 5 μL。 流动相: A 相: 乙腈; B 相: 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱。	色谱柱: C18 柱, 柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 2.4 μm, 或 性能相当者。 柱温: 30℃。 流速: 0.3 mL/min。 进样量: 5 μL。 流动相: A 相: 乙腈; B 相: 0.1% 甲酸水溶液, 梯度洗脱。	增加了液相色谱-串联质谱法, 色谱条件与参考标准相近。
11	LC-MS/MS 质谱条件	/	离子源: 电喷雾离子源 扫描方式: 负离子扫描 (ESI <sup>-</sup> ) 检测方式: 多反应监测。 定量离子对: 407.4/331.3 定性离子对: 407.4/361.3	电离方式: 电喷雾电离, 正离子 模式 (ESI <sup>+</sup> )。 检测方式: 多反应监测 定量离子对: 362.9/120.9 定性离子对: 362.9/308.9	增加了液相色谱-串联质谱法, 质谱条件采用正离子模式。
12	精密度要求	两个平行测定的相对偏差不 大于 10%	在同一实验室由同一操作人员 使用同一仪器完成的两个平行 测定的相对偏差不大于 20%。	<b>HPLC:</b> 在重复性条件下, 两次 独立测定结果与其算术平均值的 绝对差值不大于该算术平均值的 10%。 <b>LC-MS/MS:</b> 在重复性条件下, 两次独立测定结果与其算术平均 值的绝对差值不大于该算术 平均值的 20%	高效液相色谱法精密度要求 与原标准一致; 液相色谱- 串联质谱法精密度要求与参 考标准一致。

### 3. 主要技术内容确定的依据

#### 3.1 高效液相色谱法

##### 3.1.1 色谱条件的确定

氢化可的松属于中等极性化合物，在一般的 C<sub>18</sub> 色谱柱上有一定保留，流动相试验了甲醇-水、乙腈-水系统，在乙腈-水系统下，氢化可的松响应较高、峰形良好。

将氢化可的松标准溶液进行紫外扫描，得到其紫外光谱图见图 2，由图可知，其在 245nm 处有最大紫外吸收，这与 2015 年版中国兽药典选取的波长一致，最终选取 245nm 作为检测波长。

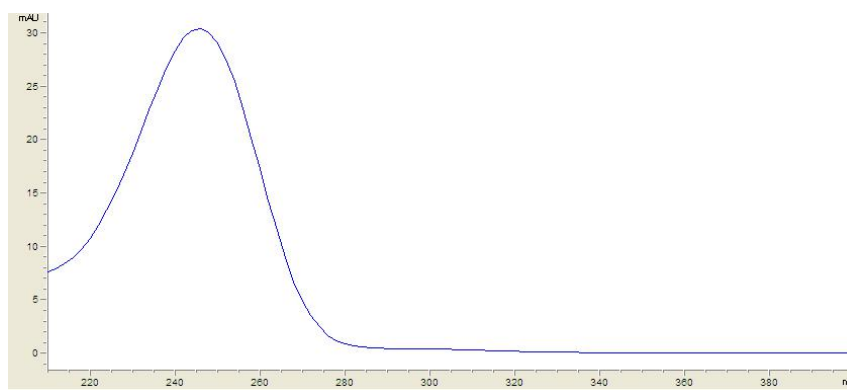


图 2 氢化可的松紫外光谱图

经优化，高效液相色谱条件确定如下：

色谱柱：C<sub>18</sub> 柱，柱长 250 mm，柱内径 4.6 mm，粒度 5 μm；

流动相：乙腈+水（30+70）；

柱温：室温；

流速：1.0 mL/min；

进样量：20 μL；

检测波长：245nm

标准溶液色谱图见图 3：



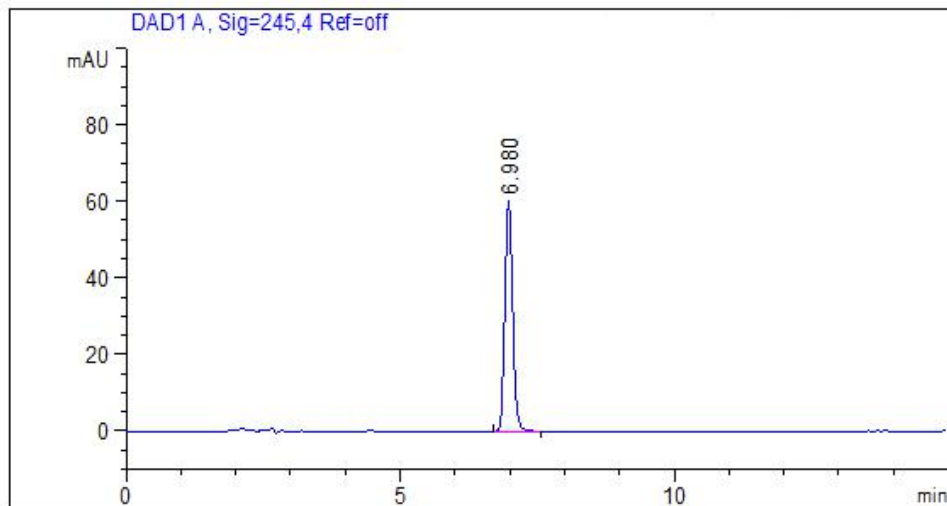


图3 氢化可的松标准溶液色谱图

### 3.1.2 前处理方法的确定

#### (1) 提取条件

氢化可的松为白色或类白色的结晶性粉末；无臭，初无味，随后有持续的苦味；遇光渐变质。在乙醇或丙酮中略溶，在三氯甲烷中微溶，在乙醚中几乎不溶，在水中不溶，属于中等极性化合物，试验采用甲醇提取液提取效果理想，也与 NY/T 914-2004 中提取溶剂相同。

#### (2) 净化条件

本方法先后比较了 C18、HLB、MCX、MAX、碳黑固相萃取柱、HLB+氨基柱、碳黑+氨基柱对糖皮质激素的净化效果。结果发现，单一采用 C18、MAX 和碳黑固相萃取柱小柱净化回收率很低，采用 HLB、MCX 小柱回收率虽然较高，但是杂质干扰严重，净化效果不理想。查阅相关文献和标准，有采用正相和反相两种性质的固相萃取柱联合应用净化的方法，我们先后比较了 HLB+氨基柱、碳黑+氨基柱对提取液的净化效果，结果发现碳黑+氨基柱对其净化效果最好，且回收率稳定，重现性较好。同时这也是农业部 1068 号公告-2-2008 和农业部 1063 号公告-5-2008 选用的净化柱。为保证碳黑固相

萃取柱的吸附，提取液经氮气吹干后采用 2 mL 甲醇、8 mL 水复溶后过柱，效果较好。

参考农业部 1068 号公告-2-2008 和农业部 1063 号公告-5-2008 的净化方式，我们做了空白饲料添加回收试验，发现回收率仅 60%左右，经分析试验，发现回收率低的主要原因是淋洗液淋洗损失和洗脱液洗脱不完全。因此，我们进一步优化了淋洗液和洗脱液，比较了不同比例体积淋洗液和洗脱液的效果（表 1、2），为保证淋洗效果，采用 3mL 甲醇+水（50+50）淋洗，采用二氯甲烷+甲醇（10+90）洗脱，回收率较高。

表 1 不同淋洗液的回收率比较

淋洗液	甲醇	甲醇+水 (80+20)	甲醇+水（50+50）		
			1mL	2mL	3mL
回收率%	66	72	83	86	85

表 2 不同洗脱液的回收率比较

洗脱液	甲醇	二氯甲烷+甲醇			
		70+30	50+50	30+70	10+90
回收率%	70	62	72	76	84

### 3.1.3 分析步骤的确定

在方法学考察过程中，我们发现对配合饲料、浓缩饲料、精料补充料，方法回收率在 70%-110%，在考察添加剂预混料时，除维生素预混料外，复合预混料、微量元素预混料的回收率较低，复合预混料低于 60%，微量元素预混料低于 30%，可能是由于该类饲料中较高含量的载体、稀释剂、矿物质、微量元素等对方法净化过程造成影响，致使回收率很低。我们对该类饲料又试验了不过固相萃取柱净化，直接提取浓缩后测定的方法，回收率能满足测定要求。因此，我们最终针对不同类型的饲料分别采用不同的前处理方法。

### (1) 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料

称取试样 2 g, (精确到 0.0001 g), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入甲醇 20.0 mL, 涡旋混匀 30 s, 振荡提取 15 min, 5000 r/min 离心 5 min, 准确移取上清液 10.0 mL, 氮气吹干, 加入 2 mL 甲醇溶解残渣, 再加入 8 mL 水, 混匀, 备用。

碳黑固相萃取柱依次用 6 mL 二氯甲烷、6 mL 甲醇、6 mL 水活化, 取备用液全部过柱。用 3 mL 淋洗液淋洗, 抽干。将预先用 6 mL 洗脱液活化好的氨基固相萃取柱串接在碳黑固相萃取柱下方, 6 mL 洗脱液洗脱, 收集洗脱液, 于 50℃ 下氮气吹干, 残余物用 1.00 mL 30% 乙腈溶液溶解, 用 0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。

### (2) 添加剂预混合饲料

称取试样 1 g (精确到 0.0001 g), 置于 50 mL 离心管中, 准确加入甲醇 20.0 mL, 涡旋混匀 30 s, 振荡提取 15 min, 5000 r/min 离心 5 min, 准确移取上清液 10.0 mL, 氮气吹干, 准确加入 1.00 mL 30% 乙腈溶液溶解, 备用。

备用液用 0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。

#### 3.1.4 固相萃取柱容量考察

净化方法中采用了 500mg/6 mL 规格的碳黑固相萃取柱, 为考察小柱容量, 防止上样和淋洗过程出现过载现象, 我们用空白饲料样品添加高浓度水平的氢化可的松, 按上述方法进行处理上机, 回收率见表 3。

表 3 固相萃取柱容量考察结果

	平均回收率%				
	500mg/kg	800mg/kg	1000mg/kg	1500mg/kg	2000mg/kg
配合饲料	93.2	89.2	82.6	88.7	91.3

浓缩饲料	86.9	86.3	90.6	91.4	87.1
精料补充料	88.7	93.6	92.3	88.5	86.9

结果表明，饲料中目标化合物含量至少在 2000 mg/kg 以内，不会出现小柱过载情况。

### 3.1.5 方法学考察

#### (1) 检出限和定量限

在本试验条件下，在空白饲料中添加不同浓度的氢化可的松标准溶液，经提取测定，根据信噪比 (S/N) =3 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数，得出配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限的检出限为 0.5 mg/kg，添加剂预混合饲料的检出限为 1.0 mg/kg；根据信噪比 (S/N) =10 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数，得出配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的定量限为 1.0mg/kg，添加剂预混合饲料的定量限为 2.0 mg/kg。

#### (2) 线性范围

将浓度分别为 0.5 $\mu$ g/mL、1.0 $\mu$ g/mL、5.0 $\mu$ g/mL、10.0 $\mu$ g/mL、20.0 $\mu$ g/mL、50.0 $\mu$ g/mL 的氢化可的松标准工作液分别进样 20 $\mu$ L，以进样浓度 C ( $\mu$ g/mL) 为横坐标，以峰面积 A 为纵坐标，做标准曲线。结果表明，氢化可的松标准工作液在 0.5~50.0 $\mu$ g/mL 浓度范围内有良好的线性关系。标准曲线和回归方程见图 5。

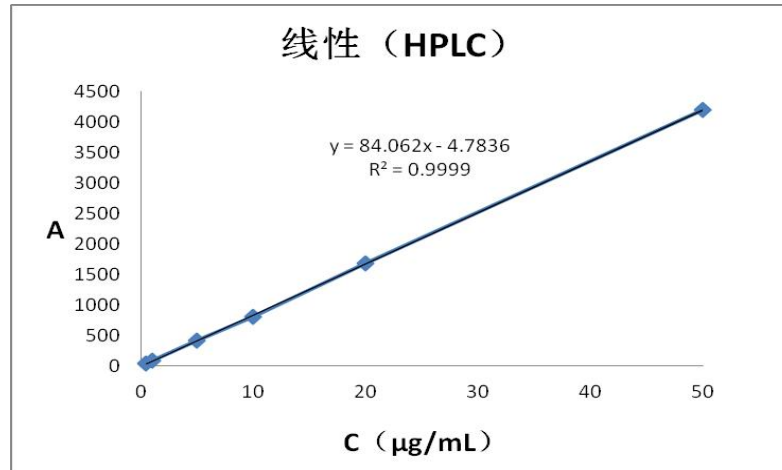


图 5 标准曲线和回归方程 (HPLC)

### (3) 方法的准确度和精密度

为了考察方法准确度和精密度，猪、禽配合饲料、浓缩饲料、预混饲料和精料补充料分别进行了加标回收率试验，每种饲料采用几个不同水平的添加量，每个水平平行测定 5 份，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差结果见表 6-表 12。

表 6 猪配合饲料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
1	I	78.1	81.9	77.4	82.5	76.7	79.3	3.4%	3.7%
	II	82.2	84.3	81.3	85.4	77.6	82.2	3.7%	
	III	80.6	75.9	80.1	75.2	79.3	78.2	3.2%	
5	I	76.6	76.3	78.7	82.5	81.3	79.1	3.5%	4.0%
	II	85.2	84.1	80.9	82.6	87	84.0	2.8%	
	III	83.4	81.5	82.2	88.9	82.8	83.8	3.5%	
10	I	76.3	82.4	76.6	78.1	76.8	78.0	3.2%	4.4%
	II	81.5	84.6	83.3	80.7	82.4	82.5	1.8%	
	III	84.6	81.2	82	88.9	87.3	84.8	3.9%	

表 7 禽配合饲料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
1	I	83.9	90.2	84.6	83.5	82.2	84.9	3.7%	4.3%
	II	78.6	82.1	83	81.5	83.6	81.8	2.4%	
	III	89.2	88.4	84.6	83.2	92.7	87.6	4.3%	
5	I	81.2	81.8	76.5	78.3	75.8	78.7	3.4%	3.5%
	II	85.6	84.4	83	82.2	81.8	83.4	1.9%	
	III	79.4	76.3	80.5	82.1	81.5	80.0	2.9%	
10	I	73.8	79.6	78.9	75.6	78.9	77.4	3.3%	4.9%
	II	84.2	81.3	79.9	86	84.2	83.1	3.0%	
	III	82.2	85.6	86.1	81.7	88.7	84.9	3.4%	

表 8 猪浓缩饲料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
1	I	72	76.3	74.1	75.6	74.4	74.5	2.2%	4.1%
	II	75.8	77.9	72.1	78.3	77.2	76.3	3.3%	
	III	81.3	79.5	80.7	76.6	83.2	80.3	3.0%	
10	I	101.2	107.4	103	104.4	102.6	103.7	2.3%	4.6%
	II	96.2	96.2	92.3	94.1	93.5	94.5	1.8%	
	III	102.3	104.6	105.8	102.8	98.7	102.8	2.6%	
50	I	84.2	80.6	78.8	82.6	83.6	82.0	2.7%	3.8%
	II	87.5	86.3	82.8	84.4	85	85.2	2.1%	

	III	88.9	91.6	84.3	85.6	88.8	87.8	3.3%	
--	-----	------	------	------	------	------	------	------	--

表 9 禽浓缩饲料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
1	I	84.3	83.1	85.4	82.3	78.6	82.7	3.1%	3.4%
	II	84.5	87.7	88.6	82.5	87	86.1	2.9%	
	III	85.1	80	82.6	79.5	83.2	82.1	2.8%	
10	I	86.5	82.4	87.2	83.6	87.8	85.5	2.8%	3.5%
	II	82.4	82.5	78.6	84.3	82.1	82.0	2.5%	
	III	87.4	82.6	85.3	90.2	88.3	86.8	3.4%	
50	I	82.3	87	84.8	86.5	81.6	84.4	2.9%	4.4%
	II	88.4	89.3	81.7	89.6	87.5	87.3	3.7%	
	III	91.3	92.4	90.7	88.9	95.6	91.8	2.7%	

表 10 猪预混料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
2	I	74.7	81.6	82.9	75.5	82.6	79.5	5.1%	4.7%
	II	77.4	82.6	82.5	84.7	81.2	81.7	3.3%	
	III	73.6	76.3	83.1	84.2	75.6	78.6	6.1%	
10	I	87.7	82.3	91.2	82.5	87.3	86.2	4.4%	5.1%
	II	93.3	82.5	85.9	84.6	83.3	85.9	5.0%	
	III	86.7	74.3	82.6	82.7	88.2	82.9	6.5%	
100	I	75.1	75.2	85.2	84.2	82.8	80.5	6.2%	6.8%
	II	95.2	88.9	83.6	84.4	92.7	89.0	5.7%	

	III	87.7	92.6	88.6	82.1	93.4	88.9	5.1%	
--	-----	------	------	------	------	------	------	------	--

表 11 禽预混料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
2	I	71.5	72.9	73.5	70.4	73.8	72.4	2.0%	4.5%
	II	78.3	77.9	74.2	76.3	68.8	75.1	5.2%	
	III	80.2	74.2	79.6	70.7	76.9	76.3	5.2%	
10	I	87.6	84.1	92.5	86.4	88.2	87.8	3.5%	3.8%
	II	89.7	92.5	91.5	92.3	89.7	91.1	1.5%	
	III	82.1	90.4	93.7	88.9	84.3	87.9	5.3%	
100	I	85.4	74.3	85.4	89.4	81.2	83.1	6.9%	5.0%
	II	82.8	85.2	84.6	90.4	80.7	84.7	4.3%	
	III	78.9	87.8	88.4	80.2	85.4	84.1	5.2%	

表 12 精料补充料方法回收率试验结果 (HPLC)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
1	I	88.9	85.5	83.9	82.3	87.1	85.5	3.0%	3.6%
	II	86.5	82.3	92.1	84.2	88.6	86.7	4.4%	
	III	82.3	87.6	81.1	89.6	84.3	85.0	4.2%	
5	I	84.8	91.8	93.8	85.7	86	88.4	4.6%	4.2%
	II	84.7	82.5	86.1	84.5	89.4	85.4	3.0%	
	III	85.4	87.6	80.9	92.5	91.3	87.5	5.3%	
10	I	94.5	90.2	86.9	84.5	86	88.4	4.5%	4.2%



II	88.4	87.1	85.4	89.2	93.5	88.7	3.4%
III	92.5	85.6	84.7	80.3	87.6	86.1	5.2%

结果表明，在浓度为 1 mg/kg~100 mg/kg 的添加回收试验中，氢化可的松高效液相色谱法的平均回收率在 72.4%~103.7% 范围内，方法的批内变异系数在 1.5%~6.9%，批间变异系数在 3.4%~6.8%。空白饲料样品和添加回收饲料样品色谱图见图 6~图 17。

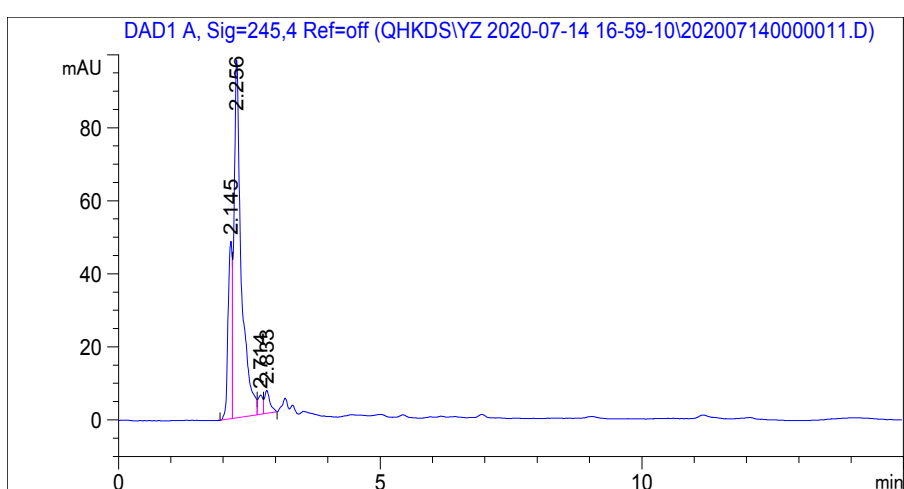


图 6 空白配合饲料色谱图

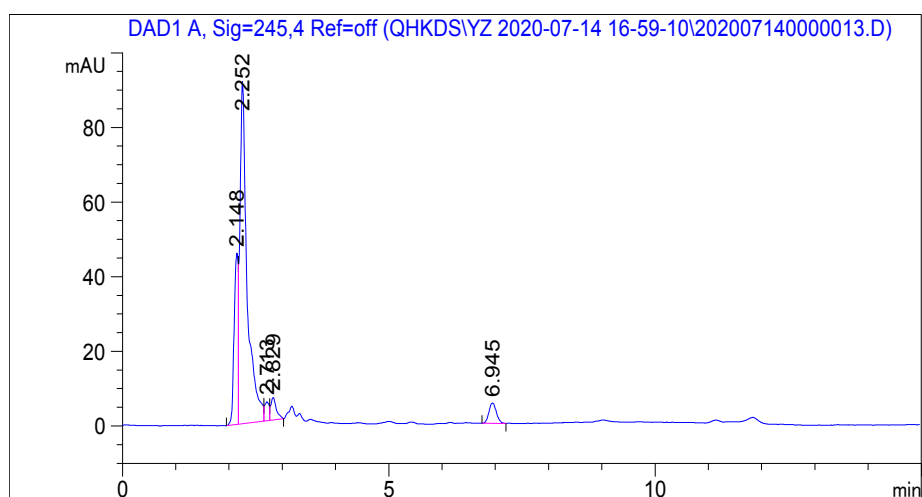


图 7 配合饲料（1 mg/kg）添加回收样品色谱图

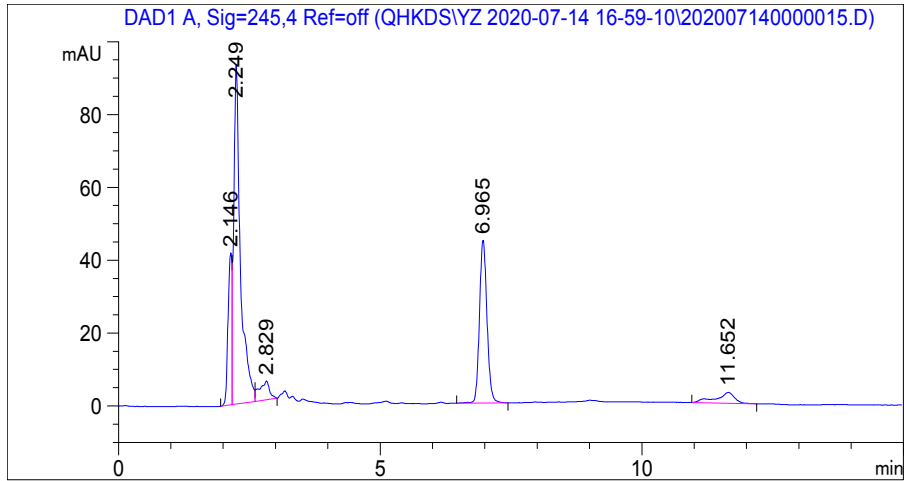


图 8 配合饲料 (10 mg/kg) 添加回收样品色谱图

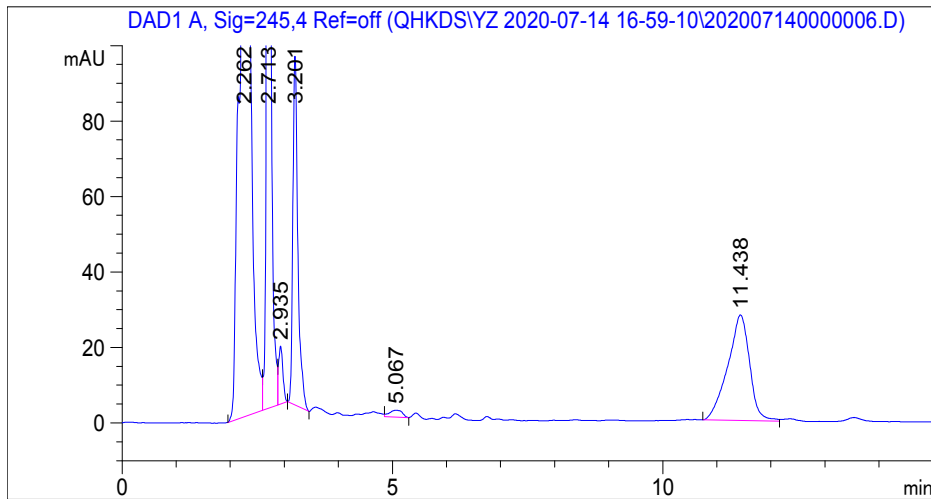


图 9 空白浓缩饲料色谱图

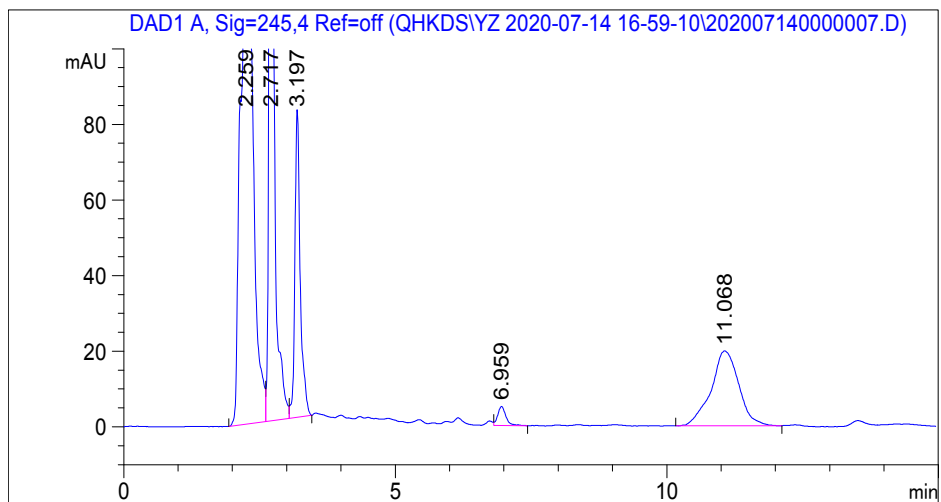


图 10 浓缩饲料 (1mg/kg) 添加回收样品色谱图

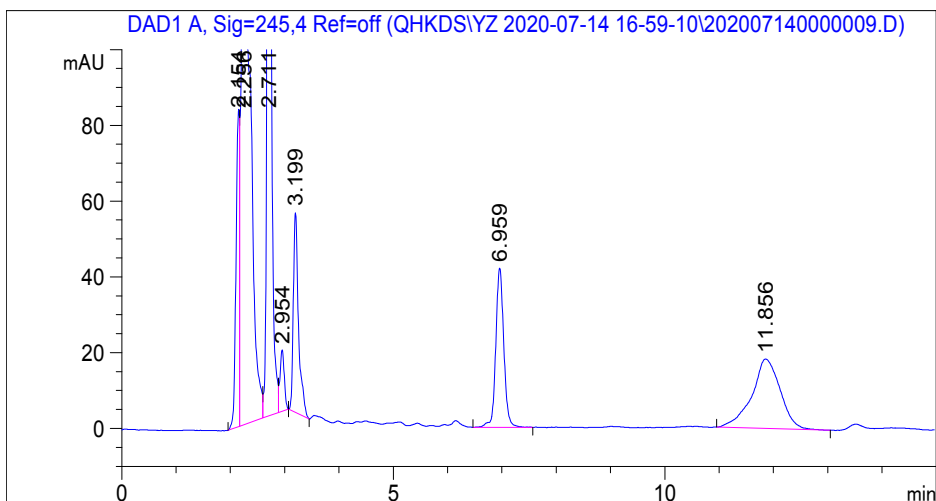


图 11 浓缩饲料（10mg/kg）添加回收样品色谱图

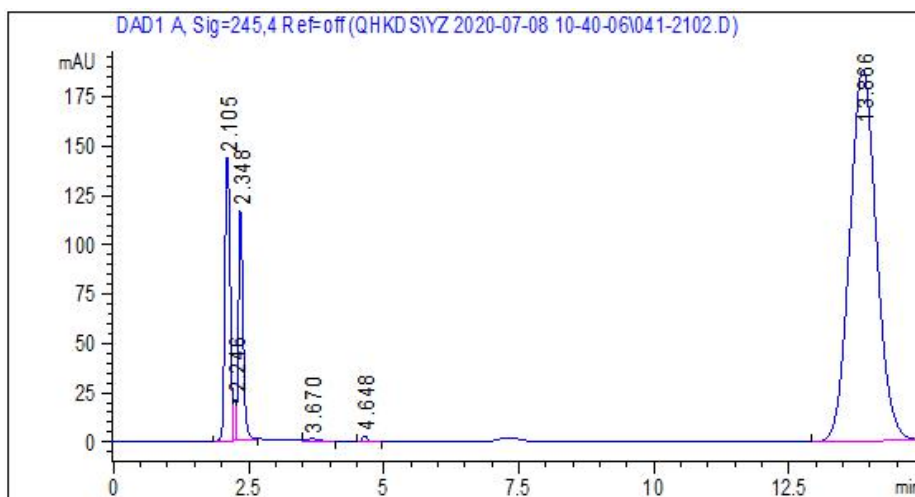


图 12 空白预混料色谱图

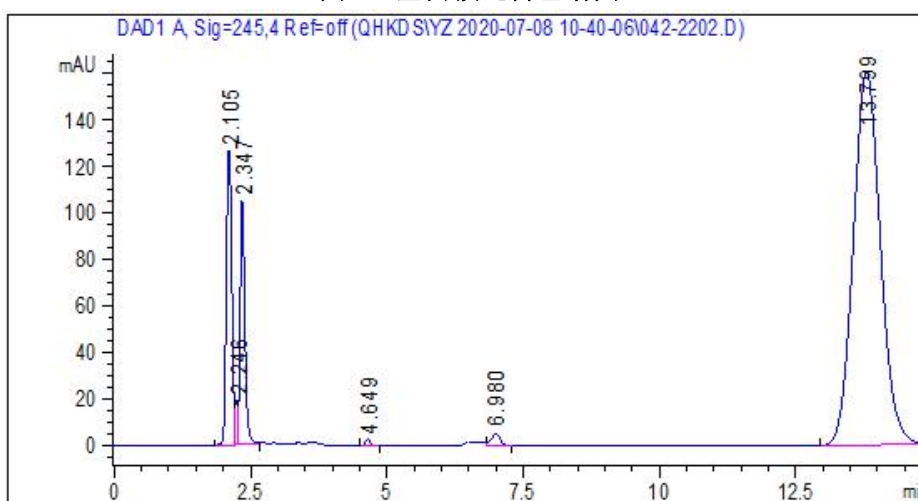


图 13 预混料（2 mg/kg）添加回收样品色谱图

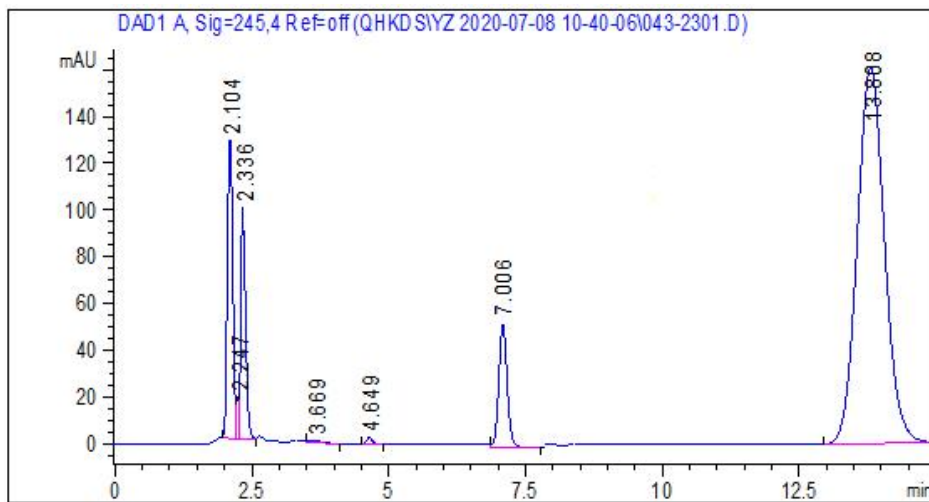


图 14 预混料 (10 mg/kg) 添加回收样品色谱图

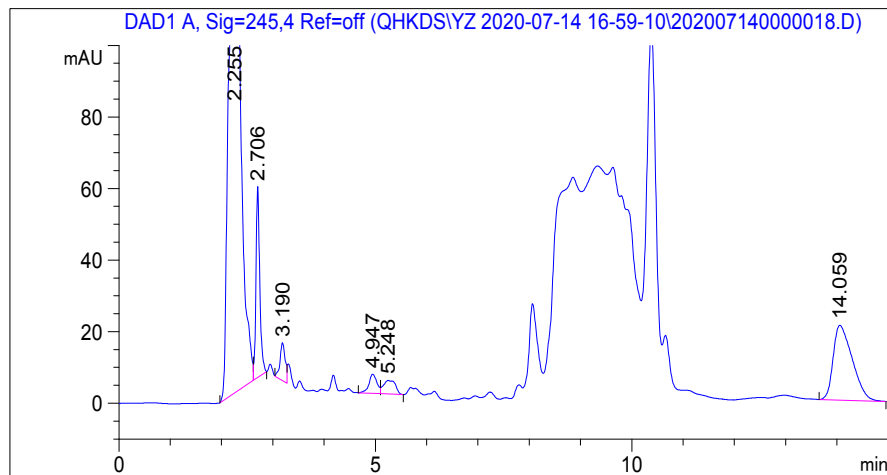


图 15 空白精料补充料色谱图

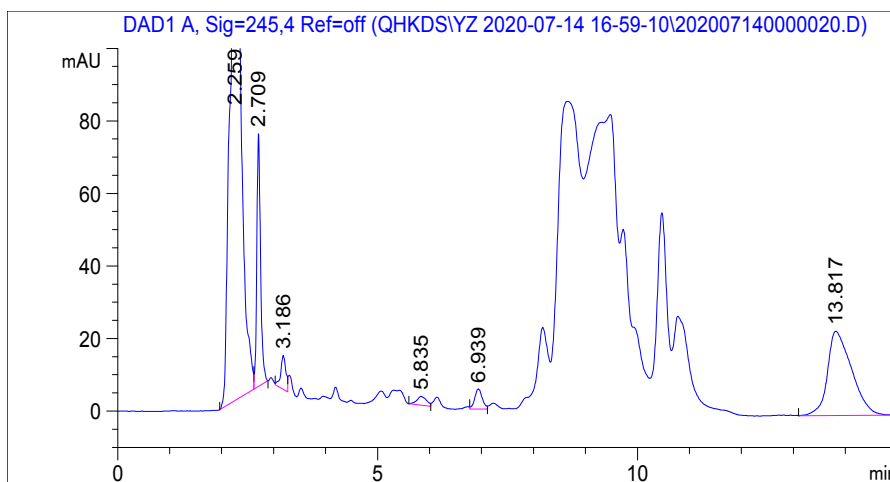


图 16 精料补充料 (1 mg/kg) 添加回收样品色谱图

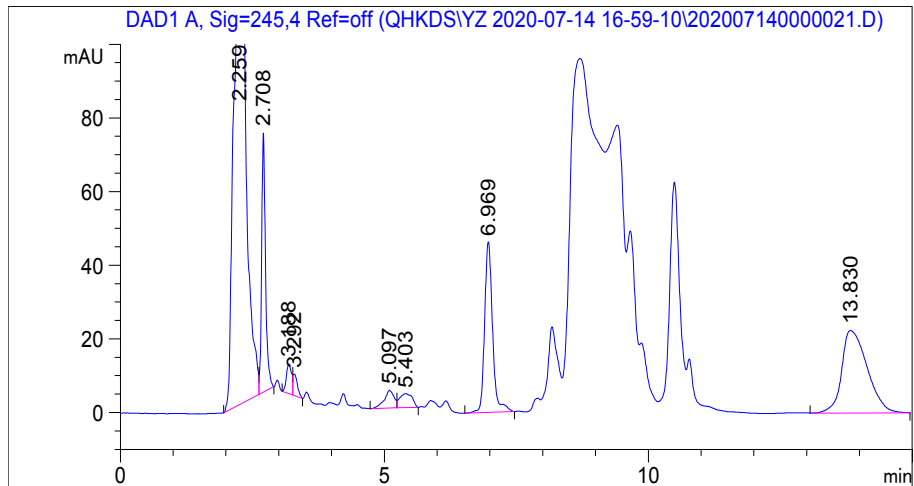


图 17 精料补充料 (10 mg/kg) 添加回收样品色谱图

#### (4) 干扰试验

泼尼松龙、醋酸可的松、甲基泼尼松龙、倍氯米松、氟氢可的松、地塞米松、倍他米松、甲基泼尼松为常见的糖皮质激素类药物，为考察该类物质对检测方法的干扰，在本方法试验条件下进行测试，结果见图 18，另外，试验还考察了 24 种磺胺类和 4 种四环素类常见药物对检测方法的干扰，结果见图 19。结果表明，在该试验条件下，糖皮质激素类、磺胺类、四环素类药物不会干扰氢化可的松的测定。

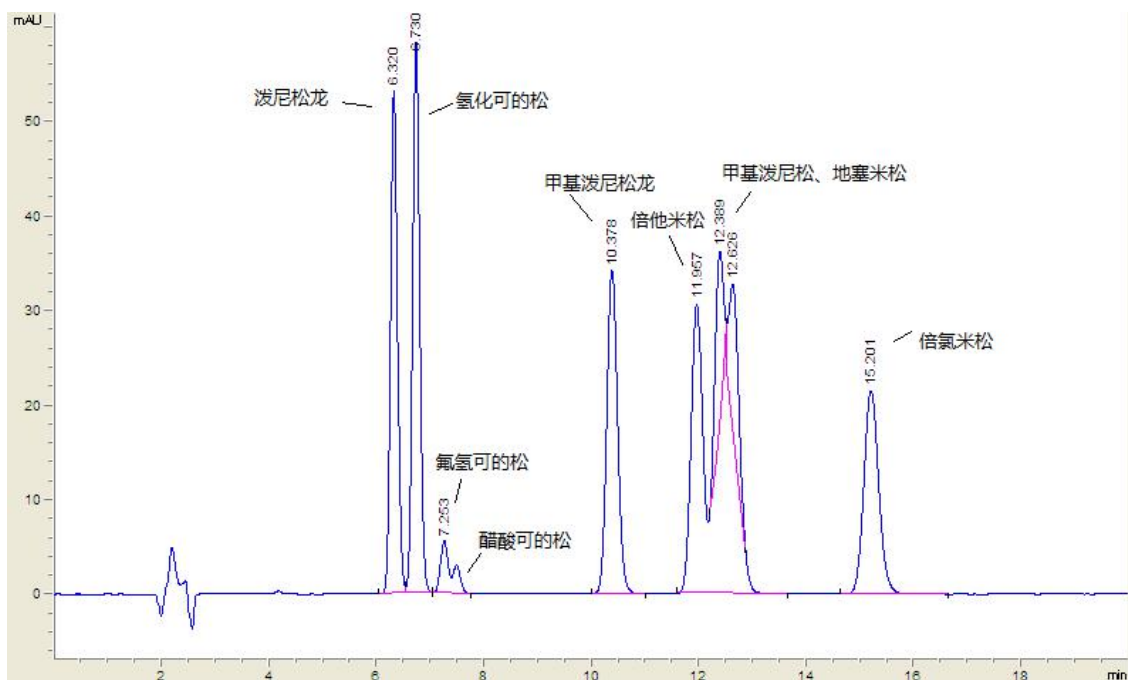


图 18 同类药物干扰试验色谱图

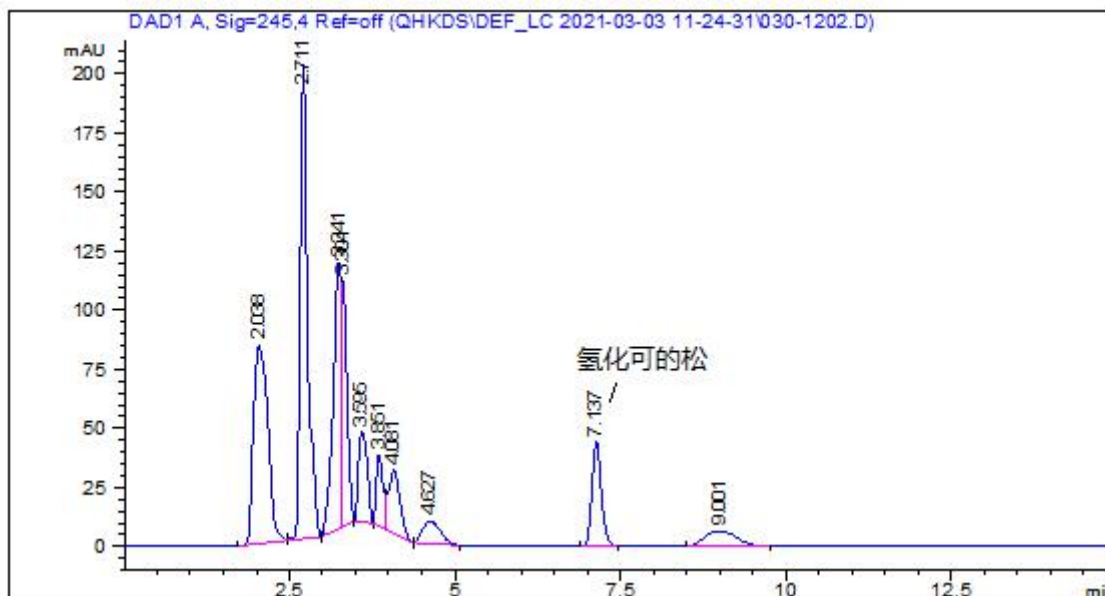


图 19 常见药物干扰试验色谱图

### 3.1.6 标准溶液稳定性

氢化可的松标准储备液（1mg/mL）在-18℃以下条件下避光保存3个月，每隔一个月，取出储备液稀释至1.00μg/mL，并重新称取固体标准品配制标准溶液，以新配制的标准溶液测定储备液的浓度，结果见表20，说明标准储备液在该条件下储存，3个月内稳定，无明显降解和变化。

表 20 标准储备液稳定性

	氢化可的松储备液（1mg/mL）			
时间（月）	0	1	2	3
浓度（μg/mL）	1.00	0.98	1.03	0.96
RSD（%）	3.01			

## 3.2 液相色谱-串联质谱法

### 3.2.1 色谱条件的确定

氢化可的松属于中等极性化合物，在一般的C<sub>18</sub>色谱柱上有一定保留，流动相试验了的甲醇-水、乙腈-水系统，在乙腈-水系统下，氢化可的松响应较高、峰形良好。采用梯度洗脱方式能更好的分离杂质、减小峰宽、保护色谱

柱。经优化，色谱条件确定如下：

色谱柱：C<sub>18</sub>柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 2.4 μm，或性能相当者。

柱温：30℃。

流速：0.3 mL/min。

进样量：5 μL。

流动相：A 相：乙腈；B 相：0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱程序见表 4。

表 4 梯度洗脱程序

时间 (min)	A 相(%)	B 相(%)
0.00	20	80
5.00	50	50
7.00	90	10
7.01	20	80
10.00	20	80

### 3.2.2 质谱条件的确定

将氢化可的松标准溶液进行质谱扫描获得一级和二级质谱图，选择响应值最高、干扰最小的且具有代表性的两对离子分别作为定量离子对和定性离子对。选择正离子扫描模式多反应监测，优化毛细管电压、碰撞能量等质谱参数，获得最终质谱参考条件：

离子源：电喷雾离子源；

扫描方式：正离子扫描；

检测方式：多反应监测；

毛细管电压、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度；

定性离子对、定量离子对等参数见表 5，在优化条件下的典型色谱图见图

4。

表 5 氢化可的松的定性、定量离子对及碰撞能量参考值

名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	碰撞能量 (eV)
氢化可的松	362.9/120.9	362.9/120.9	20
	362.9/308.9		15

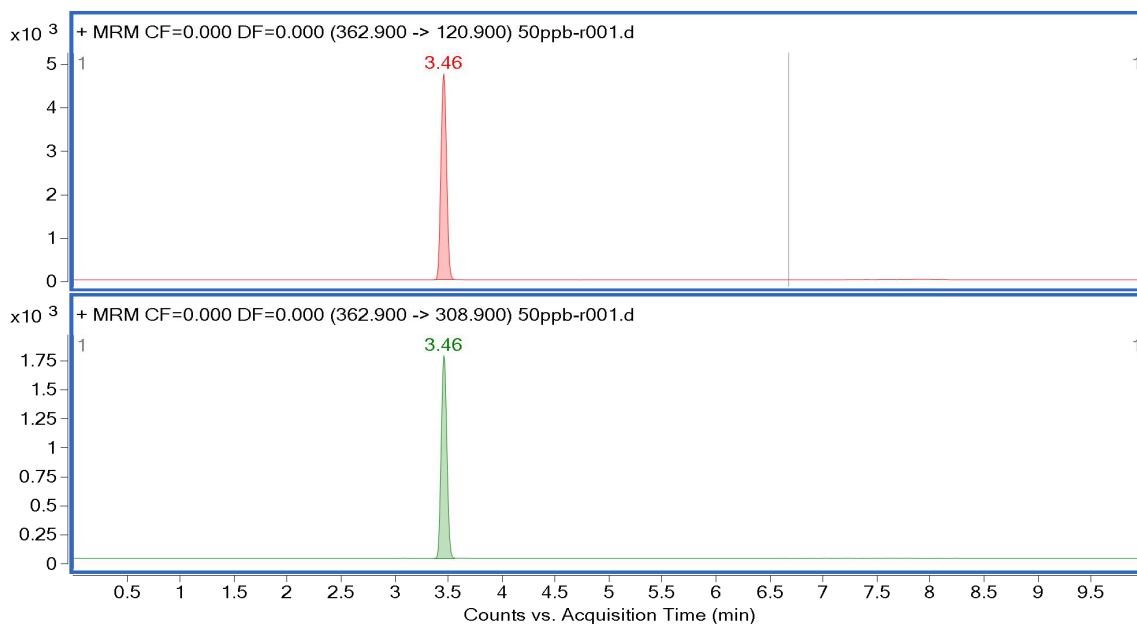


图 4 氢化可的松标准溶液特征离子色谱图

### 3.2.3 分析步骤的确定

样品提取净化

化条件的优化同“3.1 高效液相色谱法”。最终的样品分析步骤如下：

#### (1) 配合饲料、浓缩饲料、精料补充料

称取试样 2 g，（精确到 0.0001 g），置于 50 mL 离心管中，准确加入甲醇 20.0 mL，涡旋混匀 30 s，振荡提取 15 min，5000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 10.0 mL，氮气吹干，加入 2 mL 甲醇溶解残渣，再加入 8 mL 水，混匀，备用。

碳黑固相萃取柱依次用 6 mL 二氯甲烷、6 mL 甲醇、6 mL 水活化，取备用液全部过柱。用 3 mL 淋洗液淋洗，抽干。将预先用 6 mL 洗脱液活化好的氨基固相萃取柱串接在碳黑固相萃取柱下方，6 mL 洗脱液洗脱，收集洗脱液，



于 50℃ 下氮气吹干，残余物用 1.00 mL 30% 乙腈溶液溶解，用 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

## (2) 添加剂预混合饲料

称取试样 1 g (精确到 0.0001 g)，置于 50 mL 离心管中，准确加入甲醇 20.0 mL，涡旋混匀 30 s，振荡提取 15 min，5000 r/min 离心 5 min，准确移取上清液 10.0 mL，氮气吹干，准确加入 1.00 mL 30% 乙腈溶液溶解，备用。

备用液用 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

### 3.2.4 方法学考察

#### (1) 检出限和定量限

在本试验条件下，在空白饲料中添加不同浓度的氢化可的松标准溶液，经提取测定，根据信噪比 (S/N) = 3 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数，得出配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的检出限为 2 μg/kg，添加剂预混合饲料的检出限为 4 μg/kg；根据信噪比 (S/N) = 10 的峰响应值和样品前处理的稀释倍数，得出配合饲料、浓缩饲料、精料补充料的定量限为 5 μg/kg，添加剂预混合饲料的定量限为 10 μg/kg。

#### (2) 线性范围

取空白基质饲料 7 份，按样品前处理方法提取净化，制备多个饲料空白基质样品溶液，再配制成将浓度分别为 5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 的氢化可的松基质匹配标准工作液，供液相色谱-串联质谱测定。以待测物定量离子峰面积与浓度作标准曲线，线性方程为  $y=349.5x-674.6$ ，相关系数  $r=0.9989$ 。结果表明，氢化可的松标准工作液在 5.0~500 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。标准曲线和回归方程见图 19。

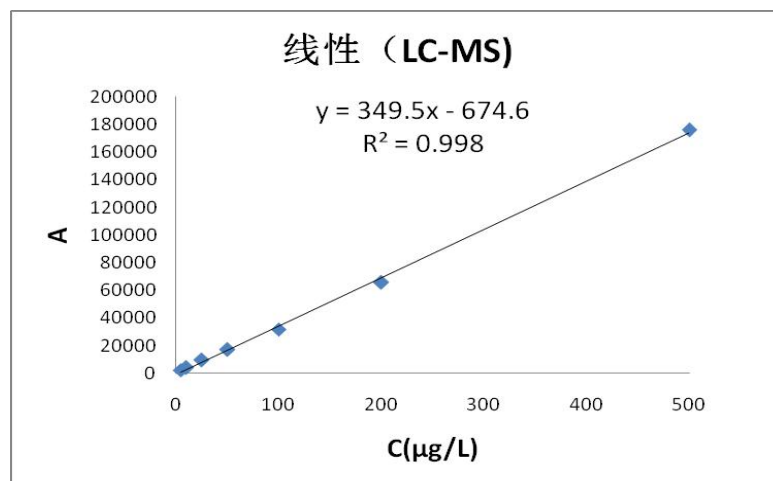


图 19 LC-MS/MS 标准曲线和回归方程

### (3) 方法的准确度和精密度

为了考察方法准确度和精密度，猪、禽配合饲料、浓缩饲料和预混饲料分别进行了加标回收率试验，每种饲料采用几个不同水平的添加量，每个水平平行测定 5 份，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差结果见表 13-表 19。

表 13 猪配合饲料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
0.005	I	92	89.2	93.1	85.6	82.7	88.5	4.9%	4.4%
	II	87.6	83	90.1	82.5	84.4	85.5	3.8%	
	III	88.1	91.5	84.6	83.1	80.5	85.6	5.0%	
0.05	I	88.5	84.2	83.3	89.3	82.4	85.5	3.7%	3.5%
	II	79.5	88.6	81.3	86	84.2	83.9	4.3%	
	III	85.7	86.2	87.3	82.1	80.6	84.4	3.4%	
0.2	I	85.4	86.4	82.8	88.8	84.4	85.6	2.6%	3.7%
	II	89.4	85.5	86.5	82.6	87	86.2	2.9%	
	III	84.6	80.4	89.6	77.9	85.8	83.7	5.5%	

1	I	85.8	93.5	89.6	94.5	86.3	89.9	4.4%	4.9%
	II	84	90.3	92.7	83.6	81.4	86.4	5.6%	
	III	81.7	82.2	84.9	86.9	90.8	85.3	4.4%	

表 14 禽配合饲料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率%					平均回收率%	批内RSD%	批间RSD%
		1	2	3	4	5			
0.005	I	99.4	99.4	104.8	95.2	94.8	98.7	4.1%	4.9%
	II	89.8	93.5	92.6	95.1	91.4	92.5	2.2%	
	III	92.7	92.6	92.1	88.4	85.6	90.3	3.5%	
0.05	I	93.7	91.6	90.8	92.8	96.2	93.0	2.3%	3.1%
	II	90.8	93.2	94	95.5	87.5	92.2	3.4%	
	III	88.4	86	94.2	93.1	92	90.7	3.8%	
0.2	I	93.1	86.7	89	92.4	93.8	91.0	3.3%	4.9%
	II	81	81.7	79.8	85.4	86.2	82.8	3.4%	
	III	87.5	82.6	84.3	90.5	85.4	86.1	3.5%	
1	I	88.5	83.9	84.8	87.6	93.7	87.7	4.4%	4.3%
	II	92.5	96.1	89.5	88.4	90.3	91.4	3.3%	
	III	84.2	85.8	86.5	82.9	92.2	86.3	4.1%	

表 15 猪浓缩饲料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率%					平均回收率%	批内RSD%	批间RSD%
		1	2	3	4	5			
0.005	I	107.7	103.2	106.8	102.3	101	104.2	2.8%	3.3%
	II	102.3	95.1	101.4	105.8	104.6	101.8	4.1%	

	III	98.5	103.6	102.5	101.7	96.7	100.6	2.9%	
0.2	I	89.2	89	90	95.5	88.7	90.5	3.1%	4.8%
	II	84	90.1	88.4	92.6	95.4	90.1	4.8%	
	III	94.3	102.5	94.8	97.7	91.6	96.2	4.3%	
1	I	104.3	106.5	106.9	102.3	98.7	103.7	3.2%	2.4%
	II	103.2	105.4	101.7	102.3	102	102.9	1.5%	
	III	101.8	98.7	106.3	104.2	100.9	102.4	2.9%	
5	I	97.1	97.3	97.6	95.2	92.6	96.0	2.2%	2.3%
	II	95.8	96.1	92.1	89.9	93.5	93.5	2.8%	
	III	94.3	92.5	95.7	97.4	94.2	94.8	1.9%	

表 16 禽浓缩饲料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率%					平均回收率 %	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
0.005	I	106.7	109.6	105.3	101.5	102.8	105.2	3.0%	2.4%
	II	104.5	102.3	108.7	104.6	100.7	104.2	2.9%	
	III	101.2	103.3	105.6	102.9	104.8	103.6	1.7%	
0.2	I	87.6	87.3	89.6	92.5	89	89.2	2.3%	2.9%
	II	89.4	92.3	94.6	95.6	93.7	93.1	2.6%	
	III	89.7	92.7	95.6	90.1	93.4	92.3	2.6%	
1	I	102.3	105.6	101.4	106	102.9	103.6	2.0%	2.1%
	II	100.7	103.5	101.4	102.8	104.3	102.5	1.4%	
	III	105.8	106.7	103.9	108.4	105	106.0	1.6%	
5	I	102.6	103.8	102.5	103.6	101.4	102.8	0.9%	2.3%

	II	103.6	102.8	100.7	98.2	104.6	102.0	2.5%	
	III	104.1	102.5	105.6	108.9	106.3	105.5	2.3%	

表 17 猪预混料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率%					平均回收率%	批内RSD%	批间RSD%
		1	2	3	4	5			
0.01	I	85.9	82.7	78.8	85.4	80.9	82.7	3.6%	4.8%
	II	76.3	75.3	72.6	84.0	76.8	77.0	5.5%	
	III	82.1	78.5	75.6	81.2	77.5	79.0	3.4%	
0.5	I	87.1	87.2	88.7	82.3	79.4	84.9	4.6%	5.0%
	II	88.5	85.3	83.4	92.6	94.5	88.9	5.3%	
	III	84.6	85.9	92.7	93.6	92.5	89.9	4.7%	
5	I	94.5	102.5	93.5	92.3	90.7	94.7	4.8%	5.4%
	II	92.5	101.6	90.3	103.4	93.2	96.2	6.1%	
	III	87.6	86.5	92.1	95.2	88.8	90.0	4.0%	
10	I	84.1	84.4	88.1	86.6	89.3	86.5	2.6%	4.2%
	II	94.5	92.4	86.7	93.1	86.2	90.6	4.2%	
	III	95.2	92.6	87.1	93.5	85.6	90.8	4.6%	

表 18 禽预混料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定批次	回收率%					平均回收率%	批内RSD%	批间RSD%
		1	2	3	4	5			
0.01	I	85.6	78.8	75.2	80.1	75.5	79.0	5.3%	5.1%
	II	77.9	78.1	87.8	84.2	74.9	80.6	6.5%	

	III	75.3	79.1	84.4	83.8	79.5	80.4	4.7%	
0.5	I	105.8	103.6	102.2	102.8	104.7	103.8	1.4%	2.4%
	II	105.3	103.6	102	107.6	105.3	104.8	2.0%	
	III	102.5	98.8	104.8	102.1	97.9	101.2	2.8%	
5	I	91.2	96.7	93.4	89.9	90.5	92.3	3.0%	4.0%
	II	95.5	86.2	88.4	84.8	85.7	88.1	4.9%	
	III	86.9	88.7	86.9	87.5	93.7	88.7	3.2%	
10	I	90.8	89.8	87.2	90.8	94.5	90.6	2.9%	5.1%
	II	90.4	93.6	101.7	97.0	103.4	97.2	5.6%	
	III	102.5	94.2	98.7	95.2	91.3	96.4	4.5%	

表 19 精料补充料方法回收率试验结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	测定 批次	回收率%					平均 回收率%	批内 RSD%	批间 RSD%
		1	2	3	4	5			
0.005	I	83.7	85.8	80	78.2	76.4	80.8	4.8%	4.4%
	II	79.2	84.1	77.5	86.3	87.4	82.9	5.3%	
	III	84.5	82.3	75.6	81.8	82.2	81.3	4.1%	
0.05	I	86	91.7	90.1	85.7	92.4	89.2	3.5%	4.7%
	II	85.4	87.9	81.1	84.6	80.8	84.0	3.6%	
	III	87.6	82.6	84.8	82	77.5	82.9	4.5%	
0.2	I	82.1	87.1	83.5	78.9	84.3	83.2	3.6%	4.1%
	II	88.9	82.3	85.7	90.2	81.7	85.8	4.4%	
	III	82.6	86.7	80.3	88.7	89.6	85.6	4.7%	
1	I	87.5	92.2	89.9	92.5	94.8	91.4	3.0%	5.1%

II	91.7	94.2	88.6	87.4	80.5	88.5	5.9%
III	84.5	82.3	86.7	80.4	85.5	83.9	3.0%

结果表明，在浓度范围 0.005 mg/kg~10 mg/kg 的添加回收试验中，氢化可的松的液相色谱质谱法平均回收率在 77.0%~106.0%，方法的批内变异系数在 0.9%~6.5%，批间变异系数在 2.1%~5.4%。空白饲料样品和添加回收饲料样品色谱图见图 20~图 31。

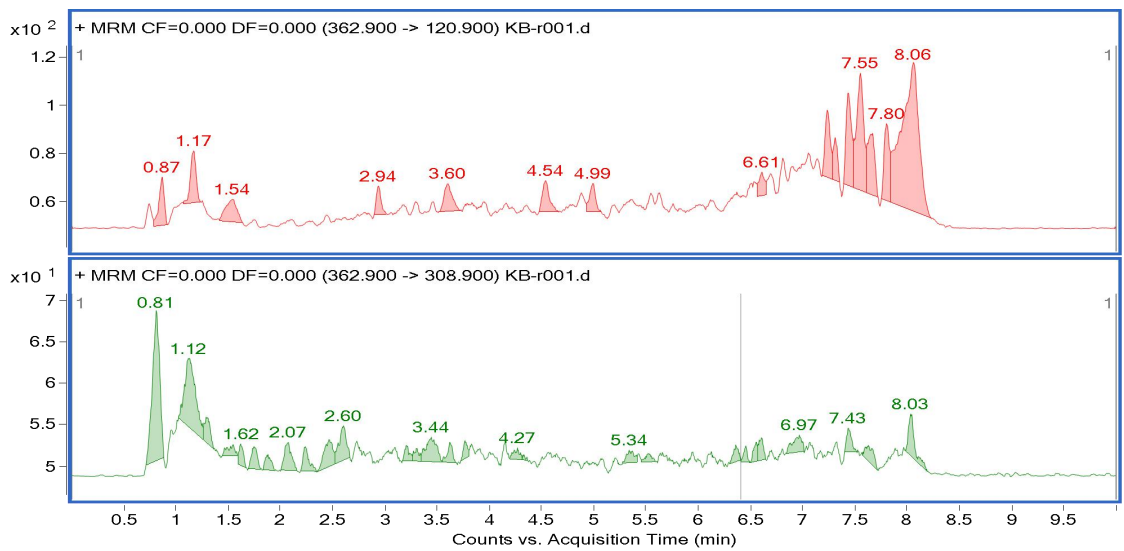


图 20 空白配合饲料色谱图

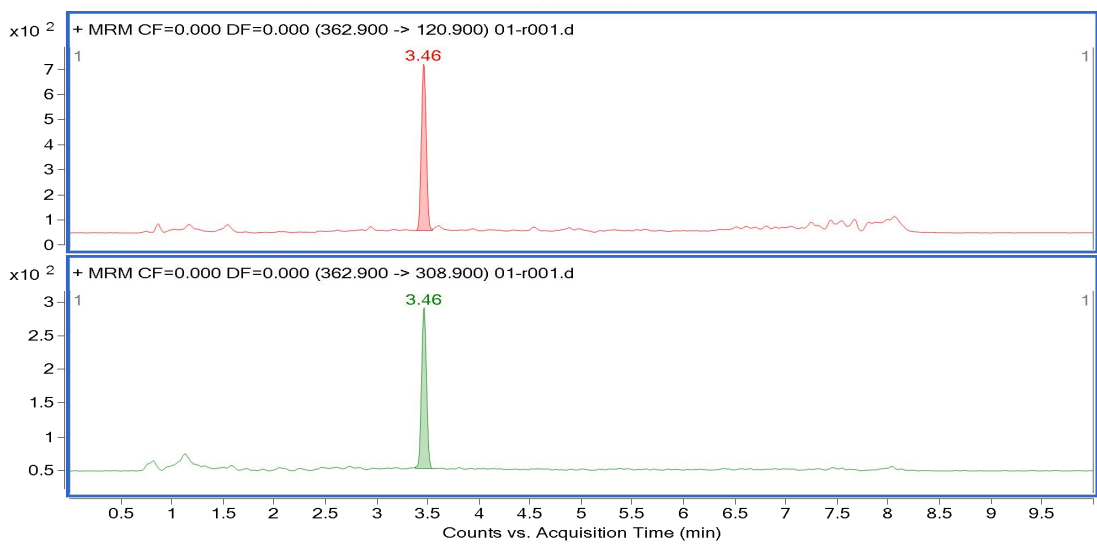


图 21 配合饲料 (0.005 mg/kg) 添加回收样品色谱图

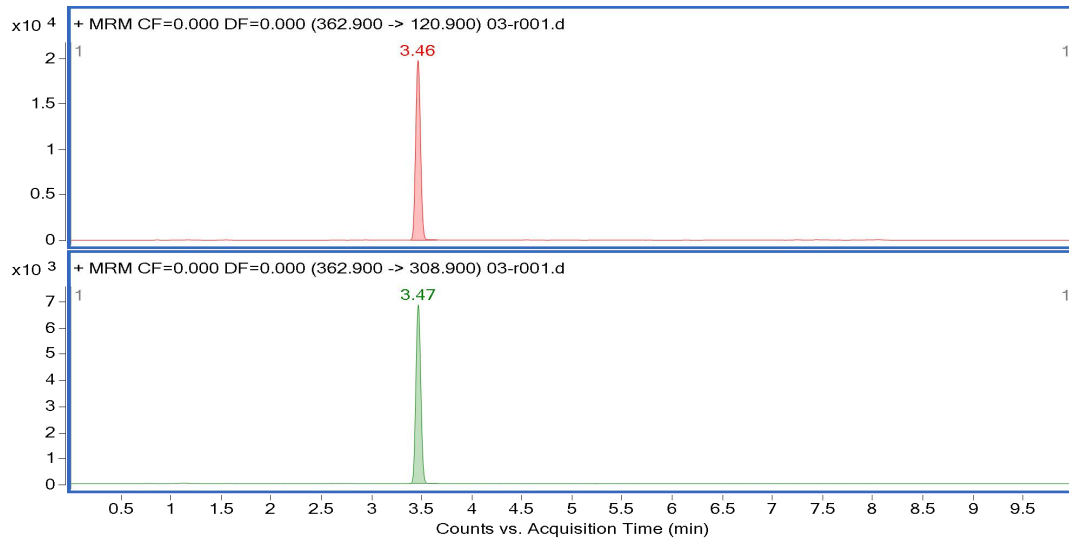


图 22 配合

饲料 (0.2 mg/kg) 添加回收样品色谱图

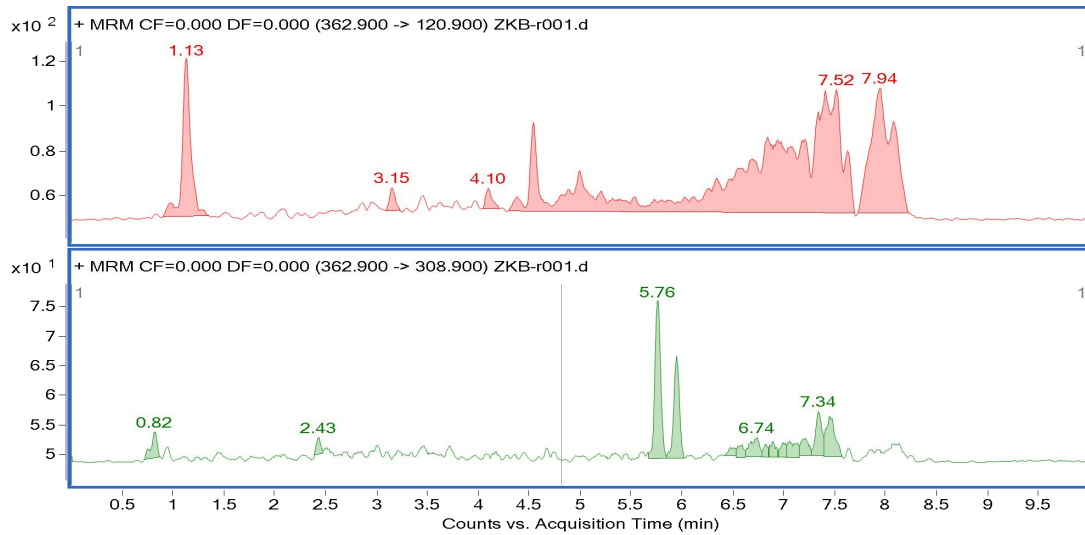


图 23 空白浓缩饲料色谱图

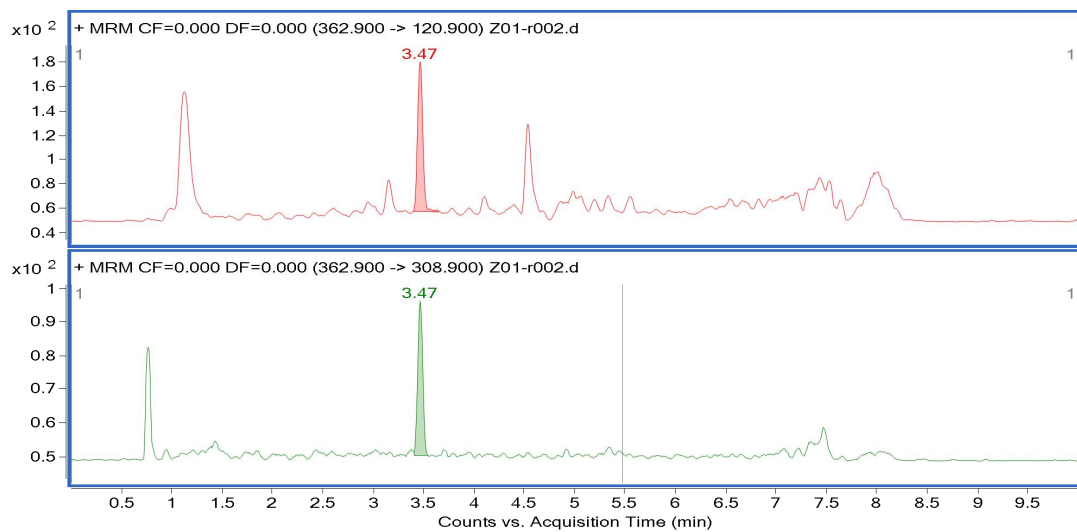


图 24 浓缩饲料 (0.005 mg/kg) 添加回收样品色谱图



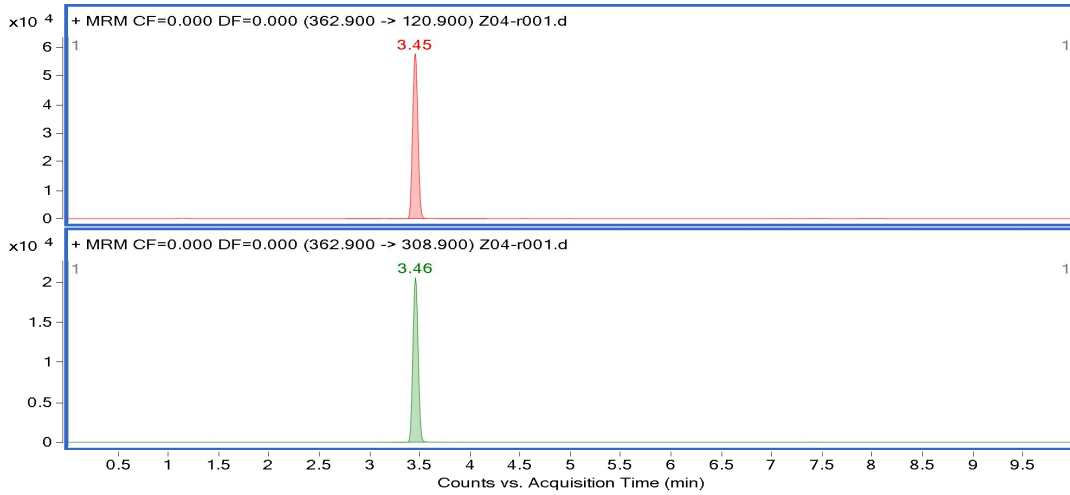


图 25 浓缩饲料（1 mg/kg）添加回收样品色谱图

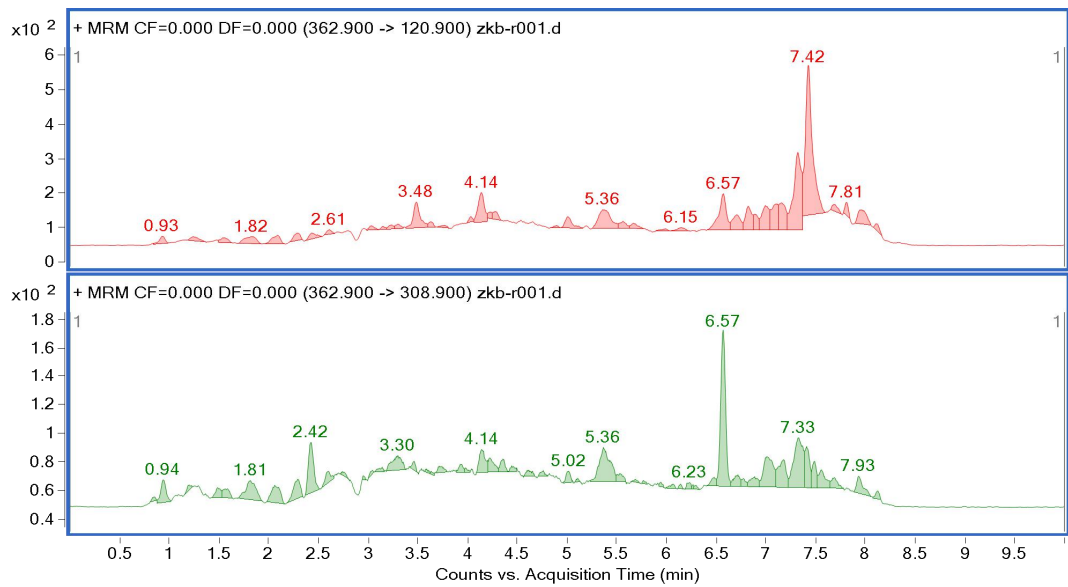


图 26 空白预混合饲料色谱图

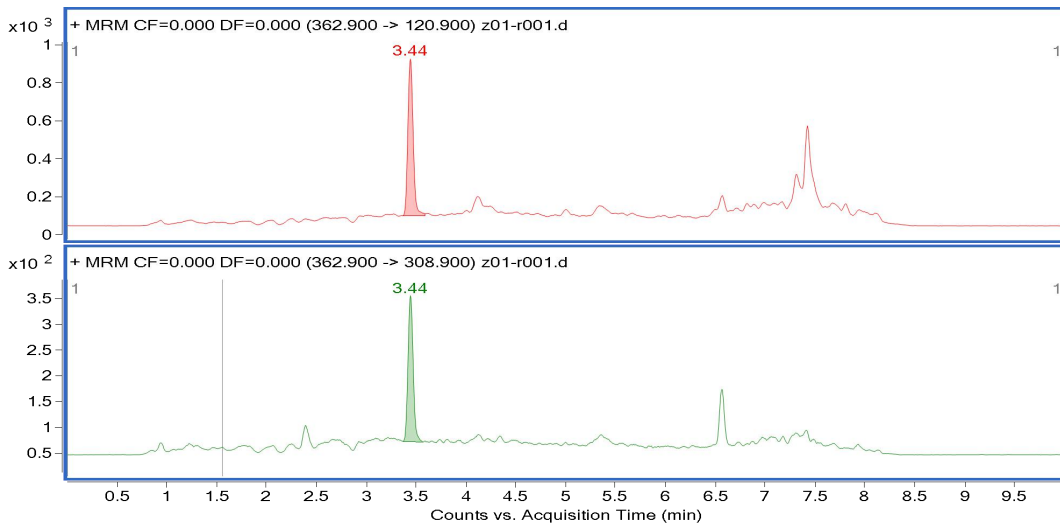


图 27 预混合饲料（0.01 mg/kg）添加回收样品色谱图

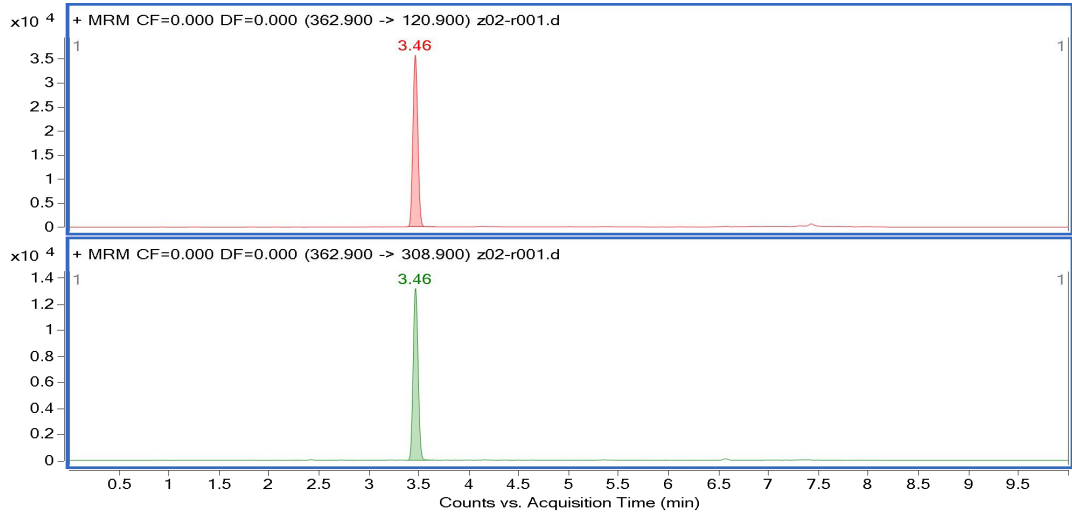


图 28 预混合饲料 (0.5 mg/kg) 添加回收样品色谱图

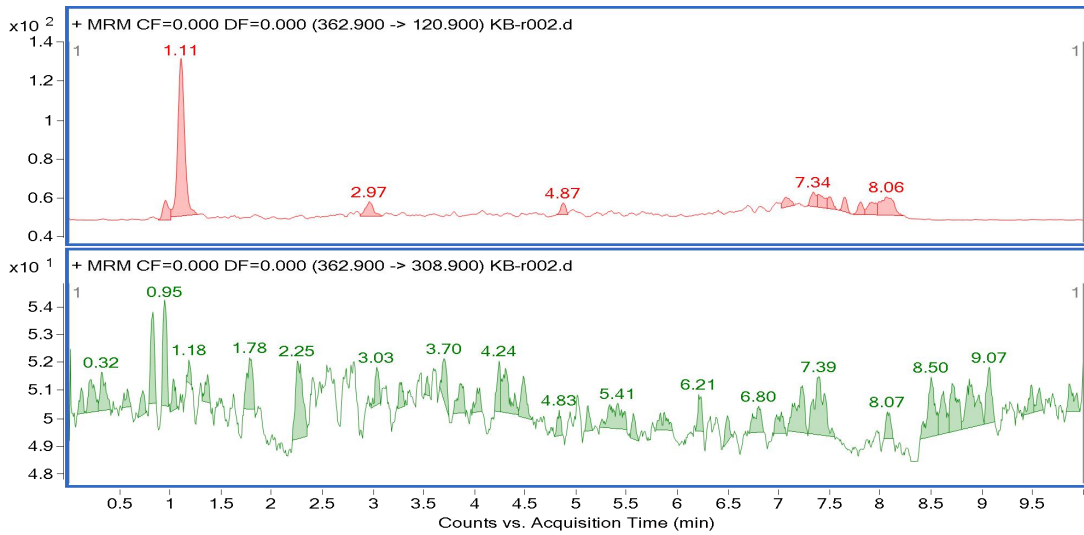


图 29 空白精料补充料色谱图

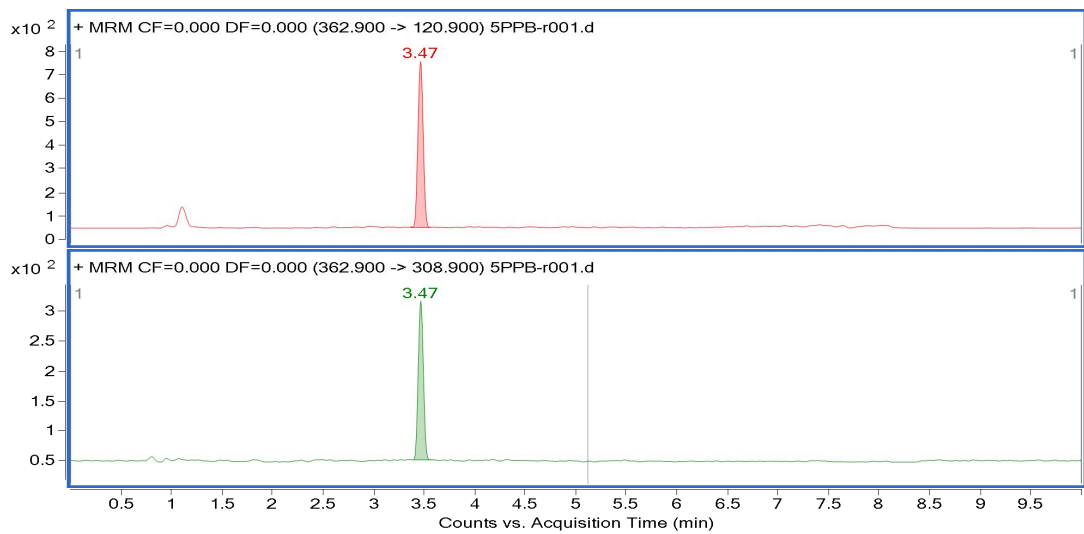


图 30 精料补充料 (0.005 mg/kg) 添加回收样品色谱图

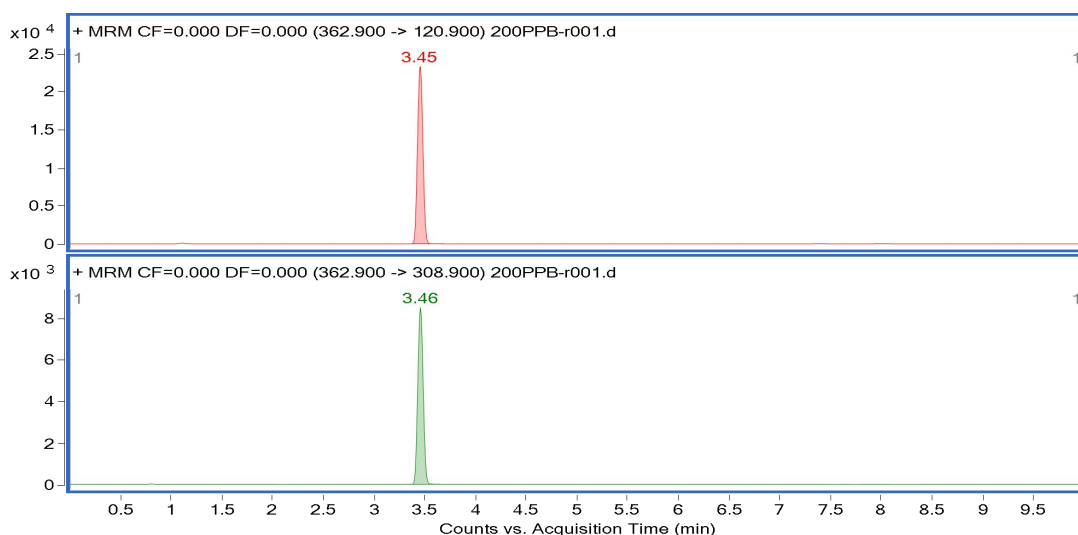


图 31 精料补充料（0.2 mg/kg）添加回收样品色谱图

### 3.2.5 标准溶液稳定性

氢化可的松标准中间液（10 $\mu$ g/mL）在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下避光保存 1 个月，分别于 0 周、1 周、2 周、3 周、4 周测定峰面积，结果见表 21，说明标准中间液在该条件下储存，1 个月内稳定，无明显降解和变化。

表 21 标准中间液稳定性

	氢化可的松标准中间液（10 $\mu$ g/mL）				
时间（周）	0	1	2	3	4
液相色谱峰面积	588	572	579	566	561
RSD（%）	1.9				

### 3.2.6 基质效应研究

用经前处理的空白样品基质溶液配制的基质匹配标准溶液，与用流动相配制的等浓度的纯溶剂标准溶液在相同色谱条件下分别进样，两者响应信号的比值，即可得到待测成分在该色谱条件下的基质效应大小。其计算公式为：  
**Matrix effect (ME) = B/A × 100%**（A：等浓度待测成分纯溶剂标液的响应；B：基质匹配标准溶液的响应），这种考察方法可更全面、客观地量化评价基质效

应。当 ME 值等于或接近 100 时，表明不存在基质效应得影响；当 ME 值大于 100 时，表明存在离子增强作用，当 ME 值小于 100 时，表明存在离子抑制作用。一般 ME 在 85%~115%之间可视为无基质效应。

分别用配合饲料、浓缩饲料和预混料的空白基质溶液配制基质加标溶液，与同浓度的纯溶剂标准溶液（0.2 $\mu$ g/mL）的响应进行比较，结果见表 22。实验结果表明，除禽浓缩饲料外，该前处理方法所获基质溶液对标准品的质谱响应均有较大的影响，有比较明显的基质抑制作用，因此选择基质匹配标准溶液进行校正定量。

表 22 基质效应结果

	猪配合料	禽配合料	猪浓缩料	禽浓缩料	猪预混料	禽预混料
纯溶剂 标液面积 A	69390	69390	69390	46603	58920	58920
基质加标 面积 B	46602	42615	40804	44628	29484	25639
ME	67.2%	61.4%	58.8%	95.8%	50.0%	43.5%

### 3.3 关于标准范围是否适用于水产饲料的考察

按照标准预审会专家组建议，补充了 5 种水产饲料的添加回收试验，实验结果见表 23 和表 24，结果表明，高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法的回收率大多低于 60%，不满足 GB/T 27404-2008

实验室质量控制规范的要求，认为该标准不适用于水产饲料的检测。

表 23 水产饲料添加回收率结果（HPLC）

添加浓度 mg/kg	平均回收率%				
	鱼料 A	鱼料 B	鱼料 C	鱼料 D	鱼料 E
1	59.7	60.3	34.2	34.6	/
5	57.3	61.9	52.4	43.1	/
10	67.6	65.2	57.2	55.1	/

表 24 水产饲料添加回收率结果 (LC-MS/MS)

添加浓度 mg/kg	平均回收率%				
	鱼料 A	鱼料 B	鱼料 C	鱼料 D	鱼料 E
0.005	52.2	51.4	42.6	28.9	24.6
0.05	57.1	47.9	39.7	41.6	33.3
1	50.3	41.2	37.5	42.3	19.3

#### 四、采用国际标准

未采用任何国际标准和国外先进标准。

#### 五、与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

#### 六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准修订过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献资料，向国家和省部级饲料检测试验室、主要大中型饲料企业试验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的科研院所、检测机构等单位有关专家充分征求意见，并按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善，无重大分歧意见。

#### 七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

本标准的颁布实施，对加强饲料安全监管、保障我国养殖畜禽的质量安全具有重要意义，建议本标准以推荐性标准颁布、实施。

#### 八、贯彻标准的要求和措施建议

发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。

## 九、废止现行有关标准的建议

该标准发布、实施后，建议废除 NY/T 914-2004《饲料中氢化可的松的测定 高效液相色谱法》。

## 十、其他应予说明的事项

无。

## 主要参考文献

- [1] 农业部 1068 号公告《饲料中 5 种糖皮质激素的测定 高效液相色谱法》
- [2] 农业部 1063 号公告《饲料中 9 种糖皮质激素的检测液相色谱—串联质谱法》
- [3] 河南农业大学韩立、王艳玲等《饲料和尿液样品中糖皮质激素的检测方法研究》
- [4] 贾振民、班付国、吴宁鹏等《饲料中糖皮质激素类药物含量的 UPLC-M
- [5] S/MS 检测方法的研究》