

中华人民共和国国家标准

农业部 958 号公告 — 10 — 2007

水产品中雌二醇残留量的测定 气相色谱—质谱法

Determination of estradiol residues in fishery products
Gas chromatography-mass spectrometry method

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部渔业局提出。

本标准由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会归口。

本标准起草单位：中国海洋大学。

本标准主要起草人：林洪、江洁、徐杰、邹龙、曹立民。

水产品中雌二醇残留量的测定

气相色谱—质谱法

1 范围

本标准规定了水产品中 β -雌二醇残留量的气相色谱—质谱测定方法。

本标准适用于水产品可食部分中 β -雌二醇残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

酸性条件下，以乙腈提取样品中的 β -雌二醇，经过正己烷脱脂， C_{18} 固相萃取柱净化，硅烷化试剂衍生化后，用气相色谱—质谱仪测定，内标法定量。

4 试剂

4.1 所有试剂应无干扰峰，除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水符合 GB/T 6682 一级水指标。

4.2 β -雌二醇标准品：纯度 $\geq 97\%$ 。

4.3 β -雌二醇- D_2 标准品：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.4 乙腈：色谱纯。

4.5 甲醇：色谱纯。

4.6 正己烷：色谱纯。

4.7 正丙醇。

4.8 乙酸钠缓冲溶液(0.2 mol/L, pH 5.2)：取 0.2 mol/L 乙酸钠溶液 237 mL 和 0.2 mol/L 乙酸溶液 63 mL，混匀，用冰乙酸调至 pH 5.2。

4.9 乙酸溶液(0.1%)：取 0.25 mL 冰乙酸，加水溶解，定容至 250 mL。

4.10 β -雌二醇标准贮备溶液：准确称取 β -雌二醇 0.01 g，用甲醇溶解，定容于 100 mL 容量瓶中，使成浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液， -18°C 存放，存放时间不超过 6 个月。

4.11 β -雌二醇- D_2 内标贮备溶液：准确称取 β -雌二醇- D_2 0.01 g，用甲醇溶解，定容于 50 mL 容量瓶中，使成浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液， -18°C 存放，存放时间不超过 6 个月。

4.12 β -雌二醇标准工作溶液：临用前，准确吸取 β -雌二醇标准贮备溶液，用甲醇稀释成浓度为 0.005 $\mu\text{g/mL}$ ~0.25 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液， 4°C 暂时存放。

4.13 β -雌二醇- D_2 内标工作溶液：临用前，准确吸取内标标准贮备溶液，用甲醇稀释成浓度为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 标准工作液， 4°C 暂时存放。

4.14 衍生化试剂：准确称取 0.01 g 二硫赤藓糖醇(DTE)，溶解于 5 mL N-甲基三甲基硅基三氟乙酰

胺(MSTFA),然后在液面下加入 10 μ L 三甲基碘硅烷(TMIS),混匀,4℃放置过夜后使用,避光防潮密封保存。衍生化试剂应是无色,如果发生棕红色等颜色变化,表明试剂失效。

5 仪器

- 5.1 气相色谱单四极杆质谱联用仪;配备电子轰击电离(EI)离子源。
- 5.2 电子天平:感量 0.000 1 g。
- 5.3 旋涡混合器。
- 5.4 高速冷冻离心机:最大转速 10 000 r/min。
- 5.5 固相萃取仪。
- 5.6 氮吹仪。
- 5.7 具塞离心管:50 mL。
- 5.8 鸡心瓶:50 mL。
- 5.9 具塞刻度玻璃管:10 mL。
- 5.10 C_{18} 固相萃取柱:填料 500 mg,3 mL,选用 Cleanert ODS C_{18} (封端),或相当者。
- 5.11 样品反应瓶:2 mL,去活,螺纹口。

6 测定步骤

6.1 样品预处理

取水产品可食部分,切为不大于 0.5 cm $\times$ 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的小块后混匀,充分匀浆,冷冻保存备用。

6.2 提取

称取样品 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,加入 100 μ L 内标工作溶液,再加入 5 mL 乙酸钠缓冲溶液(4.8),均质 1 min 后,加入 10 mL 乙腈,旋涡混合 1 min,超声提取 15 min。取出离心管,10 000 r/min 4℃离心 10 min,上清液倒入另一 50 mL 具塞离心管中。残渣中加入 10 mL 乙腈,按上述方法再提取一次,上清液合并于 50 mL 离心管中。

注:均质机清洗方法,先用大量水浸洗,再用乙腈浸洗,最后用蒸馏水浸洗。

6.3 脱脂

向盛装上清液的离心管中加入 10 mL 正己烷,加塞剧烈振荡 1 min $\sim$ 2 min,10 000 r/min 4℃离心 5 min,用滴管吸弃上层正己烷层。再加入 10 mL 正己烷,按上述方法重复洗涤一次,所得溶液转移至鸡心瓶,加入 0.5 mL 正丙醇,摇匀,于 45℃水浴条件下减压旋转蒸发至干。

残渣中加入 1 mL 乙腈,超声波清洗瓶壁 1 min 后,用 5 mL 注射器吸取,重复上述操作,合并乙腈至 5 mL 注射器,用针头过滤器经有机系滤膜过滤至 10 mL 具塞刻度玻璃管中,加水至 10 mL,旋涡混匀。

6.4 C_{18} 柱净化

C_{18} 固相萃取柱,顺序用 6 mL 甲醇、3 mL 乙酸溶液(4.9)和 3 mL 水清洗并活化,弃掉洗涤液。吸取待测溶液(6.3)过柱,弃掉流出液。用 3 mL 水洗涤 C_{18} 柱,弃掉流出液。再用 9 mL 乙腈洗脱,将洗脱液接收至 10 mL 玻璃管中,于 50℃下氮气吹至约 1 mL,用滴管吸至样品反应瓶中,用 0.5 mL 乙腈洗玻璃管,合并至同一样品反应瓶中,氮气吹干,应防潮。

注意:以上步骤应连续做完,不应让吸附剂变干,过柱的流速保持 1 mL/min $\sim$ 2 mL/min。

6.5 衍生化

6.5.1 试样的衍生化

向吹干的残留物中准确加入 100 μ L 衍生化试剂(4.14),盖紧塞子并旋涡混合 1 min,在 60℃烘箱中

反应 30 min, 冷却至室温, 于 48 h 内进行气相色谱—质谱分析。

6.5.2 标准溶液的衍生化

吸取一定量的 β -雌二醇标准工作溶液和 100 μL 内标标准工作溶液于样品反应瓶中, 氮气吹干, 以下按 6.5.1 的步骤操作。

6.6 测定

6.6.1 色谱条件

色谱柱: DB-5MS 石英毛细管柱, 固定相(5%苯基)-甲基聚硅氧烷, 25 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.52 μm ; 或与之相当的色谱柱。

载气: 高纯氦气, 纯度 $\geq 99.999\%$, 流速 1.0 mL/min。

进样口温度: 250 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样方式及进样量: 不分流进样, 1 μL 。

升温程序: 初始柱温 120 $^{\circ}\text{C}$, 保持 2 min, 然后以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 升至 250 $^{\circ}\text{C}$, 再以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 300 $^{\circ}\text{C}$, 保持 5 min。

6.6.2 质谱条件

离子源: EI 源, 电离能量 70 eV。

离子源温度: 230 $^{\circ}\text{C}$ 。

四极杆温度: 150 $^{\circ}\text{C}$ 。

接口温度: 280 $^{\circ}\text{C}$ 。

溶剂延迟: 3 min。

扫描质量范围: 40 amu $\sim$ 500 amu。

选择离子监测(SIM): β -雌二醇衍生物(m/z): 416、326、285、232; β -雌二醇- D_2 衍生物(m/z): 418、328、287、234。

6.6.3 气相色谱-质谱分析

6.6.3.1 定性方法

样品峰与标准的保留时间之差不多于 0.10 min, 并且在扣除背景后的样品质谱图中, 所选择的特征离子均出现, 并且样品峰的各选择离子相对强度与标准相应选择离子相对强度相一致时(参见附录图 A1、A2), 可以判断检出 β -雌二醇。在 6.6.1 和 6.6.2 规定的条件下, β -雌二醇和内标 β -雌二醇- D_2 衍生物的特征离子、特征离子相对强度和允许相对偏差应符合表 1 要求。

表 1 β -雌二醇和 β -雌二醇- D_2 衍生物的特征离子、特征离子相对强度和允许相对偏差

名称	特征离子 m/z	相对强度 %	允许相对偏差 %
β -Estradiol-(OTMS) $_2$	416	100	—
	285	74	± 10
	232	24	± 15
	326	12	± 20
β -Estradiol- D_2 -(OTMS) $_2$	418	100	—
	287	80	± 10
	234	22	± 15
	328	10	± 20

6.6.3.2 定量方法

以 β -雌二醇衍生物定量离子(m/z 416)与 β -雌二醇- D_2 衍生物定量离子(m/z 418)质量色谱图(见附录图 A3)的峰面积比单点或多点校准定量。当单点校准定量时根据样品溶液中 β -雌二醇含量情况,选择峰面积相近的标准工作溶液进行定量,同时标准工作溶液和样品液中 β -雌二醇响应值均应在仪器检测的线性范围之内。

7 计算

样品中 β -雌二醇的含量按公式(1)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times 1000}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——样品中 β -雌二醇含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_s ——标准工作溶液中 β -雌二醇含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A ——试样液中 β -雌二醇与 β -雌二醇- D_2 衍生物定量离子的峰面积比值;

V ——样品最终体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准工作溶液中 β -雌二醇与 β -雌二醇- D_2 衍生物定量离子的峰面积比值;

m ——样品质量,单位为克(g)。

8 方法回收率

本方法的回收率 $\geq 60\%$ 。

9 方法检测限

本方法检测限: $0.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10 方法精密度

本方法相对标准偏差 $\leq 15\%$ 。

11 方法的线性范围

本方法的线性范围: $0.005\mu\text{g}/\text{mL} \sim 0.25\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

附录 A
(资料性附录)

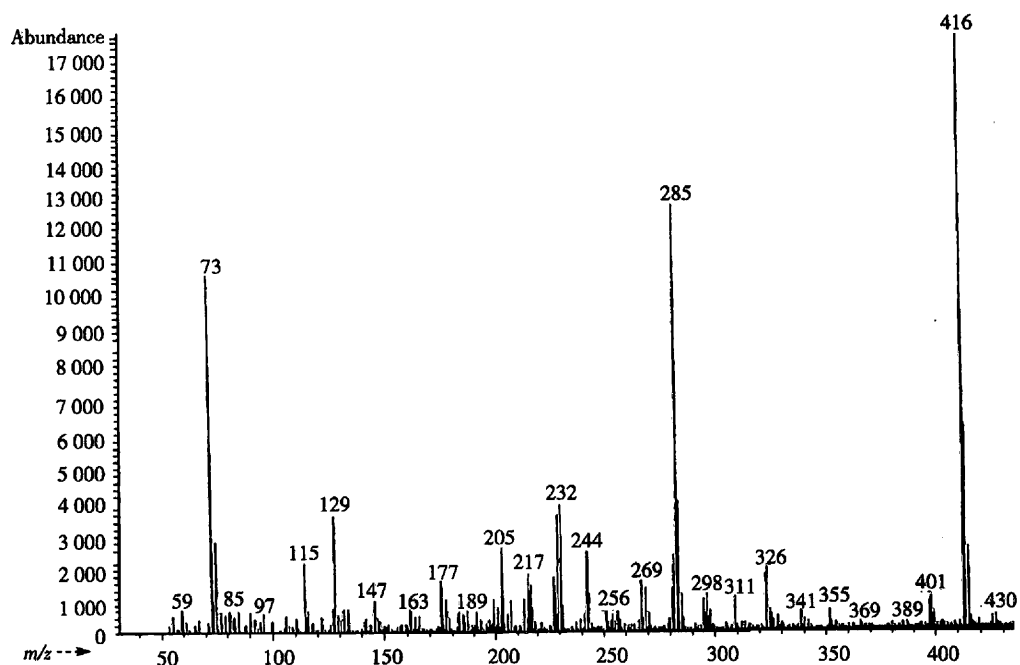


图 A.1 β -雌二醇全扫描质谱图 (特征离子 m/z : 416, 326, 285, 232; 定量离子 m/z : 416)

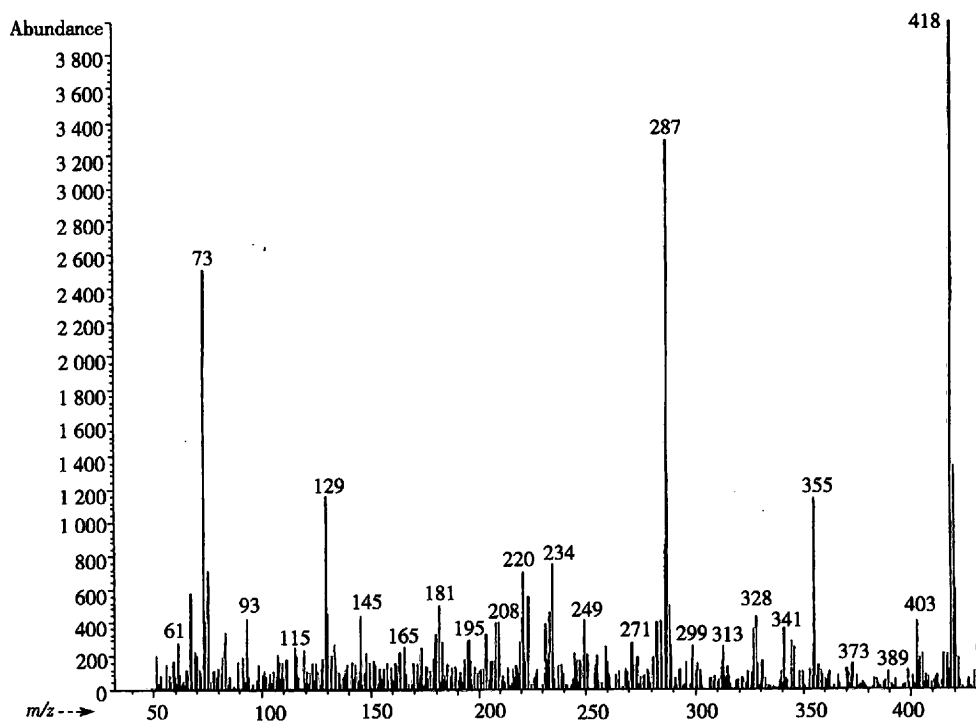


图 A.2 β -雌二醇- D_2 全扫描质谱图 (特征离子 m/z : 418, 328, 287, 234; 定量离子 m/z : 418)

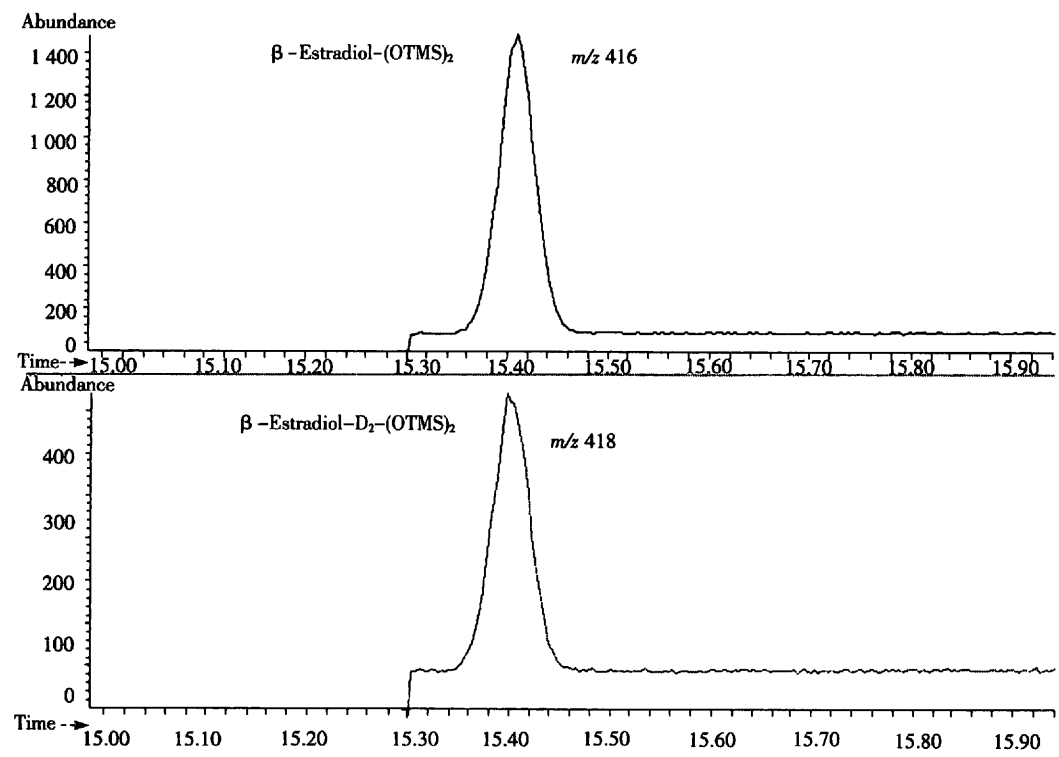


图 A. 3 β -雌二醇(0. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)与 β -雌二醇- D₂ 标准溶液(0. 05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)衍生物的定量离子的质量色谱图

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
水产品中雌二醇残留量的测定
气相色谱—质谱法

农业部 958 号公告—10—2007

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码: 100026 网址: www.ccap.com.cn)

中国农业出版社印刷厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

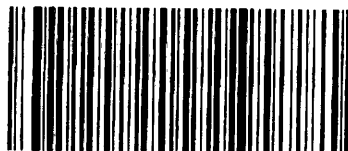
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 7 千字

2008 年 3 月第 1 版 2008 年 3 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·1451 印数: 1~500 册

定价: 10.00 元



农业部 958 号公告—10—2007

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 65005894