

牛猪肝肾和肌肉组织中玉米赤霉醇、 玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、 双烯雌酚残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了牛猪肝肾和肌肉组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于牛猪肝肾和肌肉组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定。

本标准的方法检出限：牛猪肝肾和肌肉组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮和己烷雌酚为 0.5 μg/kg，己烯雌酚和双烯雌酚为 1.0 μg/kg。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分：总则与定义 (GB/T 6379.1—2004, ISO 5725-1:1994, IDT)

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分：确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法 (GB/T 6379.2—2004, ISO 5725-2:1994, IDT)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法 (GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 原理

试样中残留的玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚用叔丁基甲基醚和乙酸盐缓冲溶液加酶解剂分别提取，硅胶固相萃取柱净化后浓缩，用液相色谱-串联质谱仪测定，保留时间和离子丰度比定性，内标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 叔丁基甲基醚：色谱纯。

4.2 乙酸：优级纯。

4.3 乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。

4.4 乙酸盐缓冲溶液：0.2 mol/L, pH = 5.2。称取 2.72 g 乙酸(4.2)和 12.95 g 乙酸钠(4.3)溶解于 800 mL 水中，用氢氧化钠溶液(4.6)调节 pH 值至 5.2 ± 0.1 ，加水定容至 1 000 mL。

4.5 氢氧化钠：优级纯。

4.6 氢氧化钠溶液：3 mol/L。称取 120 g 氢氧化钠(4.5)溶于 1 000 mL 去离子水中。

4.7 甲醇：色谱纯。

GB/T 20766—2006

- 4.8 乙腈:色谱纯。
- 4.9 乙酸乙酯:色谱纯。
- 4.10 正己烷:色谱纯。
- 4.11 二氯甲烷:色谱纯。
- 4.12 溶解液:正己烷+二氯甲烷(60+40)。量取 60 mL 正己烷(4.10)与 40 mL 二氯甲烷(4.11)混合。
- 4.13 淋洗液:乙酸乙酯+正己烷(6+94)。量取 6 mL 乙酸乙酯(4.9)与 94 mL 正己烷混合。
- 4.14 洗脱液:乙酸乙酯+正己烷(60+40)。量取 60 mL 乙酸乙酯与 40 mL 正己烷混合。
- 4.15 β -葡萄糖苷酸酶:H-2 型,含 β -葡萄糖苷酸酶 124 400 units/mL,硫酸酯酶 3 610 units/mL。
- 4.16 激素及代谢物标准物质:玉米赤霉醇(包括 α -玉米赤霉醇和 β -玉米赤霉醇,各 50%),纯度 $\geq 97\%$;玉米赤霉酮,纯度 $\geq 97\%$;己烯雌酚,纯度 $\geq 99\%$;己烷雌酚,纯度 $\geq 98\%$;双烯雌酚,纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.17 激素及代谢物标准溶液:分别准确称取适量的玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、双烯雌酚和己烷雌酚标准物质,用甲醇(4.7)配制成 1.0 mg/mL 标准储备溶液。再根据需要以甲醇配制成不同浓度的混合标准溶液作为标准工作溶液,保存于 4℃ 冰箱中,可使用三个月。
- 4.18 内标标准物质:氘代玉米赤霉醇(包括 α -玉米赤霉醇-4 氘代和 β -玉米赤霉醇-4 氘代,各 50%),纯度 $\geq 99\%$;己烯雌酚-8 氘代,纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.19 内标标准溶液:准确称取适量玉米赤霉醇-4 氘代和己烯雌酚-8 氘代标准物质,用甲醇分别配制成 1.0 mg/mL 内标标准储备溶液。再以甲醇稀释成与 5 ng/mL 玉米赤霉醇和己烯雌酚峰面积或峰高相当浓度的混合内标标准工作溶液,保存于 4℃ 冰箱中,可使用三个月。
- 4.20 硅胶固相萃取柱:500 mg,3 mL。使用前用 6 mL 正己烷分两次预洗硅胶柱,流速均为 4 mL/min。
- 4.21 0.45 μ m 滤膜。

5 仪器

- 5.1 液相色谱-串联质谱联用仪:配有大气压化学电离源。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.3 自动固相萃取仪或固相萃取装置。
- 5.4 高速均质器:转速大于 10 000 r/min。
- 5.5 氮气浓缩仪。
- 5.6 涡旋振荡器。
- 5.7 离心机:转速大于 3 000 r/min。
- 5.8 pH 计:测量精度 ± 0.2 pH 单位。
- 5.9 具塞试管:25 mL,50 mL。
- 5.10 微量注射器:25 μ L,100 μ L。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取有代表性样品 500 g,绞碎后搅拌均匀,制成实验室样品。试样分为两份,置于样品盒中,密封,并做上标记。

6.2 试样保存

制备好的试样置于 -18°C 冰柜保存。

7 测定步骤

7.1 基质混合标准溶液的制备

7.1.1 试样的称取

称取 5 个阴性样品,每个样品为 5 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,分别加入不同量混合标准工作溶液(4.17),使玉米赤霉醇、玉米赤霉酮和己烷雌酚的浓度为 1.25 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、12.5 ng/mL、25 ng/mL;己烯雌酚和双烯雌酚的浓度为 2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL。再分别加入适量内标标准溶液(4.19),使内标物浓度均为 10 ng/mL。

7.1.2 提取

加入 20 mL 叔丁基甲基醚(4.1),在 10 000 r/min 转速下高速均质(5.4)1 min。3 000 r/min 离心(5.7) 5 min,将上清液全部转移至另一 50 mL 具塞试管(5.9)中备用。离心管中的残渣置于通风橱中挥发 30 min,加入 15 mL 乙酸盐缓冲液(4.4),高速均质 1 min,3 000 r/min 离心 5 min,将上清液全部转移至另一 25 mL 具塞试管(5.9)中,并在氮气浓缩仪(5.5)上于 40℃ 水浴中吹去残余叔丁基甲基醚后,加入 80 μ L β -葡萄糖苷酸酶(4.15)混匀,于 52℃ 烘箱中放置过夜。在此缓冲溶液中加入氢氧化钠溶液(4.6)将溶液 pH 值调至 7,加入 10 mL 叔丁基甲基醚,充分混合,3 000 r/min 离心 2 min。移取叔丁基甲基醚层与前述的叔丁基甲基醚提取液混合,在氮气浓缩仪上于 40℃ 水浴中吹干。加入 1 mL 溶解液(4.12),涡旋 30 s 溶解,待净化。

7.1.3 净化

把样液转入硅胶固相萃取柱(4.20),流速为 2 mL/min,在样品试管中加入 3 mL 淋洗液(4.13),混合后过柱,流速为 2 mL/min,用 3 mL 淋洗液以 3 mL/min 的速度淋洗,加入 2 mL 空气以 4 mL/min 的速度吹过硅胶柱。用 6 mL 洗脱液(4.14)洗脱,流速为 2 mL/min,加入 2 mL 空气以 6 mL/min 的速度吹过硅胶柱,收集洗脱液。将洗脱液在氮气浓缩仪上于 40℃ 水浴中吹干,加入 1 mL 流动相,涡旋 30 s 溶解。溶液经滤膜(4.21)过滤后,供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 试样溶液的制备

称取待测样品 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入内标标准工作溶液,使内标物含量均为 2.0 μ g/kg。按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.3 空白基质溶液的制备

称取阴性样品 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 棕色离心管中,按 7.1.2 和 7.1.3 操作。

7.4 测定

7.4.1 液相色谱条件

- 色谱柱:ZORBAX Eclipse SB-C₈, 3.5 μ m, 150 mm $\times$ 4.6 mm 或相当者;
- 柱温:25℃;
- 流动相:乙腈+水(70+30);
- 流速:1.0 mL/min;
- 进样量:50 μ L。

7.4.2 质谱条件

- 离子化方式:大气压化学电离;
- 扫描方式:负离子扫描;
- 检测方式:多反应监测(MRM);
- 离子源温度:325℃;
- 雾化气压力:0.103 5 MPa;
- 气帘气压力:0.069 0 MPa;

GB/T 20766—2006

- g) 辅助气压力:0.241 5 MPa;
h) 喷雾器电流:—5 μ A;
i) 电喷雾电压:—4 500 V;
j) 定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压,见表 1。

表 1 五种激素及代谢物的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

药物名称	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	碰撞气能量/V	去簇电压/V
玉米赤霉醇	321.1/277.2	321.1/277.2	—35	—100
	321.1/303.2		—35	—100
玉米赤霉酮	319.3/205.1	319.3/205.1	—42	—126
	319.3/160.9		—34	—126
玉米赤霉醇-4 氘代	325.1/208.9	325.1/263.1	—36	—100
	325.1/263.1		—38	—100
己烯雌酚	267.0/222.1	267.0/222.1	—40	—90
	267.0/237.1		—40	—90
双烯雌酚	265.0/221.1	265.0/236.1	—35	—90
	265.0/235.1		—32	—90
己烷雌酚	269.0/119.0	269.0/134.0	—22	—75
	269.0/134.0		—46	—75
己烯雌酚-8 氘代	275.1/227.9	275.1/245.0	—40	—73
	275.1/245.0		—40	—74

7.4.3 液相色谱-串联质谱测定

7.4.3.1 定性测定

每种被测组分选择 1 个母离子,2 个以上子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质和内标物的保留时间之比,也就是相对保留时间,与混合基质标准校准溶液中对应的相对保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内;样品谱图中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的混合基质标准校准溶液谱图中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差 %

相对离子丰度	>50	$>20\sim 50$	$>10\sim 20$	≤ 10
允许的最大偏差	± 20	± 25	± 30	± 50

7.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,基质混合标准溶液(7.1)分别进样,以工作溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。采用内标法进行定量测定。样品溶液中玉米赤霉醇、己烯雌酚、己烷雌酚和双烯雌酚激素的响应值应在工作曲线范围内。在上述色谱条件和质谱条件下,标准物质液相色谱-串联质谱的多反应监测(MRM)色谱图参见图 A.1。

本方法的添加回收率数据参见附录 B。

7.5 平行试验

按以上步骤,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,均按上述步骤同时完成空白试验。

8 结果计算

试样中被测物的测定结果可由数据处理系统按内标法自动计算,也可按式(1)计算:

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X——试样中被测物残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A——试样溶液中被测物的色谱峰面积;
- A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积;
- c_i ——试样溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积;
- A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积;
- V——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- m——试样溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:玉米赤霉醇和己烯雌酚的峰面积或峰高值分别是其两异构体峰面积或峰高值的和。

9 精密度

本标准的精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ,牛猪组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚的含量范围及重复性方程见表 3。

如果差值超过重复性限,应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.2 再现性

在再现性试验条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ,牛猪组织中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚的含量范围及再现性方程见表 3。

表 3 含量范围及重复性和再现性方程

化合物名称	含量范围/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	重复性限 r	再现性限 R
玉米赤霉醇	0.25~5.00	$\lg r = 0.969\,5 \lg m - 0.732\,6$	$\lg R = 0.815\,2 \lg m - 0.634\,3$
玉米赤霉酮	0.25~5.00	$\lg r = 1.188\,8 \lg m - 0.593\,9$	$\lg R = 1.206\,4 \lg m - 0.519\,5$
己烯雌酚	0.50~10.00	$\lg r = 1.019\,8 \lg m - 0.876\,3$	$\lg R = 1.084\,6 \lg m - 0.562\,1$
双烯雌酚	0.50~10.00	$\lg r = 0.540\,1 \lg m - 0.290\,8$	$\lg R = 0.878\,1 \lg m - 0.247\,1$
己烷雌酚	0.25~5.00	$\lg r = 0.954\,6 \lg m - 0.737\,9$	$\lg R = 0.908\,8 \lg m - 0.447\,3$

注: m 为两次测定结果的算术平均值。

GB/T 20766—2006

附录 A (资料性附录)

玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚标准物质
及玉米赤霉醇-4 氘代、己烯雌酚-8 氘代内标物的多反应监测(MRM)色谱图

玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚标准物质及玉米赤霉醇-4 氘代、己烯雌酚-8 氘代内标物的多反应监测(MRM)色谱图,见图 A. 1。

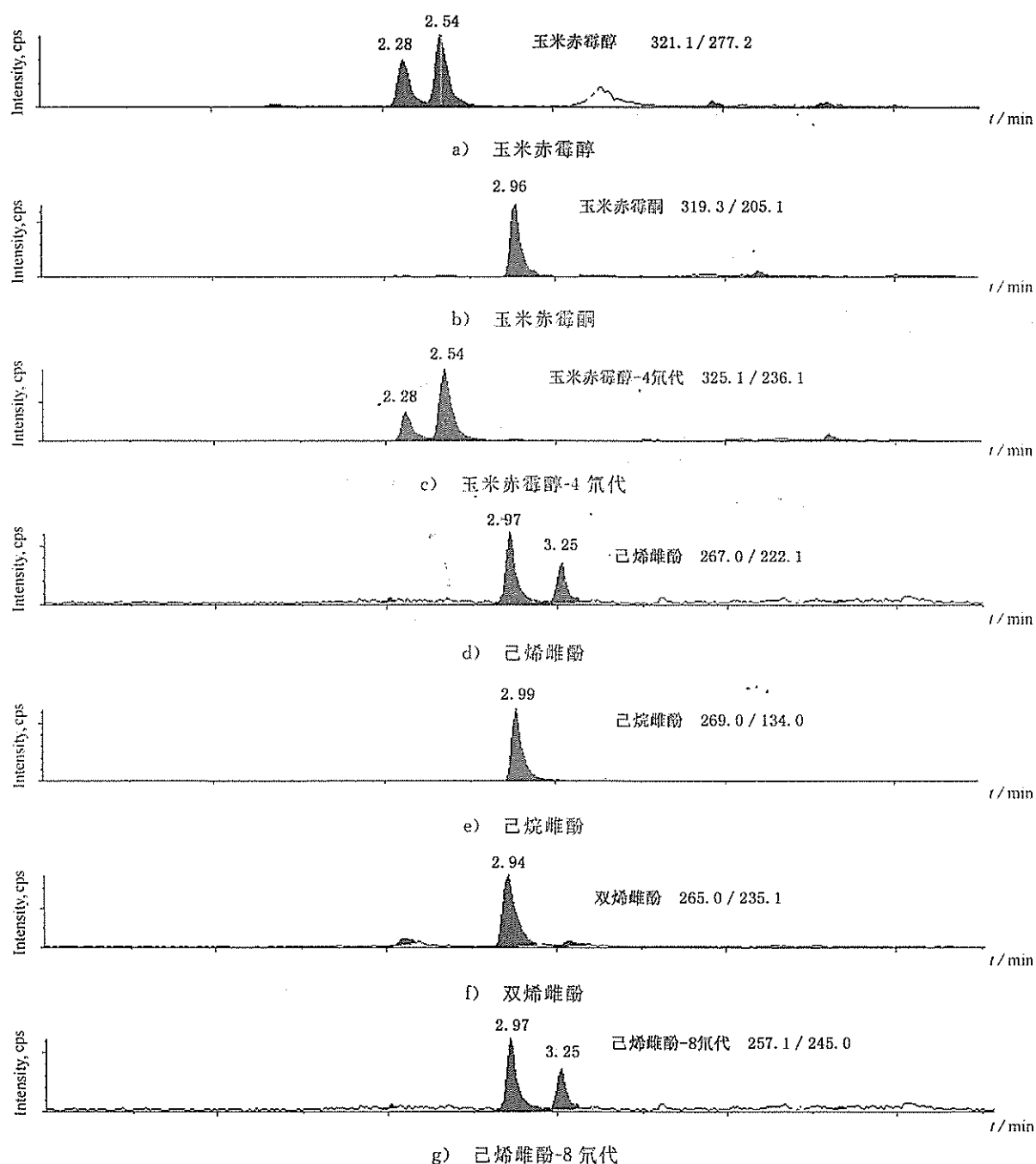


图 A. 1 玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚标准物质
及玉米赤霉醇-4 氘代、己烯雌酚-8 氘代内标物的多反应监测(MRM)色谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

五种激素及代谢物添加浓度及其平均回收率的试验数据,见表 B.1。

表 B.1 五种激素及代谢物添加浓度及其平均回收率的试验数据

激素名称	添加浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/(%)
玉米赤霉醇	0.5	84.93
	2.5	88.58
	5.0	91.35
玉米赤霉酮	0.5	76.10
	2.5	79.18
	5.0	101.00
己烯雌酚	1.0	80.12
	5.0	78.67
	10.0	102.70
双烯雌酚	1.0	74.83
	5.0	93.00
	10.0	99.53
己烷雌酚	0.5	91.33
	2.5	72.67
	5.0	92.47