

ICS 65.150
CCS B 50

SC

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 9447—2023

水产养殖环境(水体、底泥)中丁香酚的测定 气相色谱-串联质谱法

Determination of eugenol in water and sediment from aquaculture by gas chromatography-tandem mass spectrometry

2023-12-22 发布

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。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会渔业资源分技术委员会(SAC/TC 156/SC 10)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院南海水产研究所、中国水产科学研究院淡水渔业研究中心、中国水产科学研究院、广东开放大学。

本文件主要起草人：柯常亮、黄珂、李纯厚、刘奇、王强、肖雅元、赵东豪、宋超、孙志伟、李晋成、金晓石。



水产养殖环境(水体、底泥)中丁香酚的测定

气相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了气相色谱-串联质谱法测定水产养殖环境中丁香酚残留量的原理,给出了测定所需的试剂和材料、仪器和设备,规定了测定与分析步骤、结果计算和检测方法灵敏度、准确度、精密度。

本文件适用于水产养殖环境(水体、底泥)中丁香酚残留量的测定。

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

GB 17378.5 海洋监测规范 第5部分:沉积物分析

SC/T 9102.2 渔业生态环境监测规范 第2部分:海洋

SC/T 9102.3 渔业生态环境监测规范 第3部分:淡水

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的丁香酚经正己烷提取,固相萃取柱净化,气相色谱-串联质谱法测定,内标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 实验用水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 正己烷(C_6H_{14}):色谱纯。

5.1.3 乙酸乙酯($CH_3COOCH_2CH_3$):色谱纯。

5.1.4 丙酮(CH_3COCH_3):色谱纯。

5.1.5 盐酸: $\rho(HCl) = 1.19 \text{ g/mL}$,优级纯。

5.1.6 无水硫酸钠(Na_2SO_4):优级纯,450 °C烘烤 4 h,冷却后装入玻璃瓶中密封,于干燥器中保存备用。

5.2 溶液配制

盐酸溶液(1+5):取 50 mL 盐酸(5.1.5)慢慢加入 250 mL 实验用水(5.1.1)中。

5.3 标准品

5.3.1 丁香酚(Eugenol, $C_{10}H_{12}O_2$, CAS 号:97-53-0),含量 $\geq 99.0\%$ 。

5.3.2 氘代丁香酚(Eugenol- D_3 , $C_{10}H_9D_3O_2$, CAS 号:1335401-17-6);含量 $\geq 99.0\%$ 。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液(100 mg/L):取 10 mg 丁香酚标准品(5.3.1),精密称定,用乙酸乙酯(5.1.3)溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 100 mg/L 的丁香酚标准储备液,−18 °C 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.2 内标储备液(100 mg/L):取 10 mg 氘代丁香酚标准品(5.3.2),精密称定,用乙酸乙酯(5.1.3)溶

解并定容于 100 mL 棕色容量瓶,配制成浓度为 100 mg/L 的内标储备液,−18 °C 以下避光保存,有效期 3 个月。

5.4.3 标准使用液(1.00 mg/L):准确量取 1 mL 丁香酚标准储备液(5.4.1)于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙酸乙酯(5.1.3)定容,混匀,于 4 °C 下避光保存,有效期 1 个月。

5.4.4 内标使用液(1.00 mg/L):准确量取 1 mL 内标储备液(5.4.2)于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙酸乙酯(5.1.3)定容,混匀,于 4 °C 下避光保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 铜粉:纯度 99.5%,使用前用盐酸溶液(5.2)去除铜粉表面的氧化物,用实验用水(5.1.1)冲洗除酸,再用丙酮(5.1.4)清洗,然后用氮吹仪(6.8)吹干待用。临用前处理,保持铜粉表面光亮。

5.5.2 苯基固相萃取柱:500 mg/3 mL,或相当者。

5.5.3 氨基固相萃取柱:500 mg/3 mL,或相当者。

6 仪器和设备

6.1 气相色谱三重四极杆串联质谱仪:配电子轰击离子源(EI 源)。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 固相萃取装置,带真空泵。

6.5 低速冷冻离心机:转速 \geq 5 000 r/min。

6.6 离心管:50 mL。

6.7 超声波振荡器:频率 40 kHz。

6.8 氮吹仪。

6.9 玻璃纤维滤膜:孔径 0.45 μ m,在 400 °C 烘烤 1 h,冷却后储于磨口玻璃瓶中密封保存。

6.10 分液漏斗:100 mL。

7 样品采集与保存

海水养殖环境样品按照 SC/T 9102.2 的相关要求采集和保存,淡水养殖环境样品按照 SC/T 9102.3 的相关要求采集和保存。水样灌装时避免产生气泡和搅动,使水样充满棕色玻璃瓶,不留顶部空间。底泥样品剔除砾石和颗粒较大的动植物残骸于洁净磨口棕色玻璃瓶保存。运输过程中应密封、避光、4 °C 以下冷藏。底泥样品含水率按照 GB 17378.5 的规定执行。

8 测定步骤

8.1 提取

8.1.1 水样处理

水样经玻璃纤维滤膜(6.9)过滤后,量取 100 mL 水样于分液漏斗中,加入 150 μ L 内标使用液(5.4.4),加入 10 mL 正己烷(5.1.2),充分振荡后,静置分层,取上层清液,重复提取一次,合并提取液,待净化。

8.1.2 底泥处理

称取已测定过含水率的底泥样品 5 g(准确到 \pm 0.05 g)于离心管中,加入 5 mL 水,涡旋混合 2 min 后,加入 150 μ L 内标使用液(5.4.4),混匀,加入 5 mL 正己烷(5.1.2)涡旋混合 2 min,超声提取 10 min,于离心机中 4 °C 5 000 r/min 离心 5 min,取上清液。重复提取一次,合并提取液,于提取液中依次加入 2 g 无水硫酸钠(5.1.6)、2 g 活化铜粉(5.5.1),涡旋混合 1 min,待净化。如涡旋结束后铜粉变黑,增加铜粉的量,直至铜粉不变色。

8.2 净化

8.2.1 水样净化

取苯基固相萃取柱(5.5.2),用3 mL 乙酸乙酯(5.1.3)过柱并确保流干,再加3 mL 正己烷(5.1.2)过柱,保持柱头浸润。将水样提取液(8.1.1)加入固相萃取柱,待提取液全部流出后,用3 mL 正己烷(5.1.2)淋洗,再用3 mL 乙酸乙酯(5.1.3)洗脱并收集全部洗脱液,洗脱液用乙酸乙酯(5.1.3)定容至3.0 mL,供气相色谱串联质谱仪(6.1)测定。

8.2.2 底泥净化

取氨基固相萃取柱(5.5.3),用3 mL 乙酸乙酯(5.1.3)过柱并确保流干,再加3 mL 正己烷(5.1.2)过柱,保持柱头浸润。将底泥提取液(8.1.2)加入固相萃取柱,待提取液全部流出后,用3 mL 正己烷(5.1.2)淋洗,再用3 mL 乙酸乙酯(5.1.3)洗脱并收集全部洗脱液,洗脱液用乙酸乙酯(5.1.3)定容至3.0 mL,供气相色谱串联质谱仪(6.1)测定。

8.3 标准曲线的制备

分别移取适量丁香酚标准使用液(5.4.3)和丁香酚内标使用液(5.4.4),用乙酸乙酯(5.1.3)稀释,配制至少5个浓度点的标准系列,丁香酚的质量浓度为5.00 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$,添加的内标质量浓度为50.0 $\mu\text{g/L}$ 。也可根据仪器灵敏度或线性范围配制能覆盖样品中目标物浓度的至少5个浓度水平的标准系列。

按照仪器参考条件(8.4.1),从低浓度到高浓度依次进样测定,测得不同浓度梯度目标物及其内标物的峰面积。以目标物浓度和对应内标物浓度的比值为横坐标,以目标物峰面积与对应内标物峰面积的比值为纵坐标,绘制标准曲线。

8.4 测定

8.4.1 气相色谱串联质谱参考条件

8.4.1.1 气相色谱

气相色谱的参考条件如下:

- 色谱柱:DB-17 MS 石英色谱柱(30 m \times 0.25 mm,膜厚0.25 μm),或性能相当者;
- 进样量:1 μL ;
- 进样方式:不分流进样;
- 载气:氦气,纯度99.999%,流速为1.0 mL/min;
- 进样口温度:280 $^{\circ}\text{C}$;
- 升温程序:初始温度为80 $^{\circ}\text{C}$,保持2 min,以20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至180 $^{\circ}\text{C}$ 保持1 min,以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至280 $^{\circ}\text{C}$ 保持2 min。

8.4.1.2 质谱

串联质谱的参考条件如下:

- 离子源:EI源;
- 电子能量:70 eV;
- 离子源温度:230 $^{\circ}\text{C}$;
- 四极杆温度:150 $^{\circ}\text{C}$;
- 传输线温度:280 $^{\circ}\text{C}$;
- 淬灭气:氦气,流速为2.25 mL/min;
- 碰撞气:氮气,纯度99.999%,流速为1.5 mL/min;
- 监测方式:多反应监测模式,母离子、子离子和碰撞能量参考条件见表1。

表1 多反应监测母离子、子离子和碰撞能量参考条件

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 eV
丁香酚	164	149 ^a	5
		104	10

表 1 (续)

化合物	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	碰撞能量 eV
氘代丁香酚	167	149 ^a	10
		121	15
^a 表示为定量离子。			

8.4.2 定性分析

按照 8.4.1 测试条件,试样中丁香酚色谱峰的保留时间与标准系列中丁香酚的保留时间相比较,相对偏差不超过 0.5%;试样中丁香酚监测离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度应一致,其允许偏差应符合表 2 的要求。

表 2 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.3 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液等体积进样测定,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,按内标法计算。标准溶液及试样溶液中丁香酚的响应值均应在仪器检测的线性范围内。上述气相色谱-串联质谱条件下,标准溶液特征离子质量色谱图见附录 A。

8.4.4 空白试验

取空白试料,除不加标准溶液外,采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

水样中丁香酚的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X_1 = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{V_0} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X_1 —— 试样中丁香酚残留量的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- c_s —— 标准样溶液中丁香酚浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A —— 试样溶液中丁香酚的色谱峰面积;
- A_s —— 标准溶液中丁香酚的色谱峰面积;
- c_i —— 试样溶液中内标物的质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- c_{si} —— 标准溶液中内标物的质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A_{si} —— 标准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 —— 试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- V_0 —— 试样体积的数值,单位为毫升(mL)。

底泥样中丁香酚的残留量按标准曲线或公式(2)计算。

$$X_2 = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1}{(1-\omega)} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X_2 —— 试样中丁香酚残留量的数值,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c_s —— 标准样溶液中丁香酚浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A —— 试样溶液中丁香酚的色谱峰面积;
- A_s —— 标准溶液中丁香酚的色谱峰面积;

- c_i —— 试样溶液中内标物的质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- c_{si} —— 标准溶液中内标物的质量浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
- A_{si} —— 标准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 —— 试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g);
- w —— 试样含水率的数值,单位为百分号(%)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

水样中丁香酚的检出限为 $0.2 \mu\text{g/L}$,定量限为 $0.5 \mu\text{g/L}$;底泥中丁香酚的检出限为 $2 \mu\text{g/kg}$,定量限为 $5 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

水样中添加浓度为 $0.5 \mu\text{g/L} \sim 50 \mu\text{g/L}$ 时,回收率为 $70\% \sim 120\%$;底泥中添加浓度为 $5 \mu\text{g/kg} \sim 50 \mu\text{g/kg}$ 时,回收率为 $70\% \sim 120\%$ 。

10.3 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)

丁香酚及氘代丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图

丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.1, 氘代丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.2。

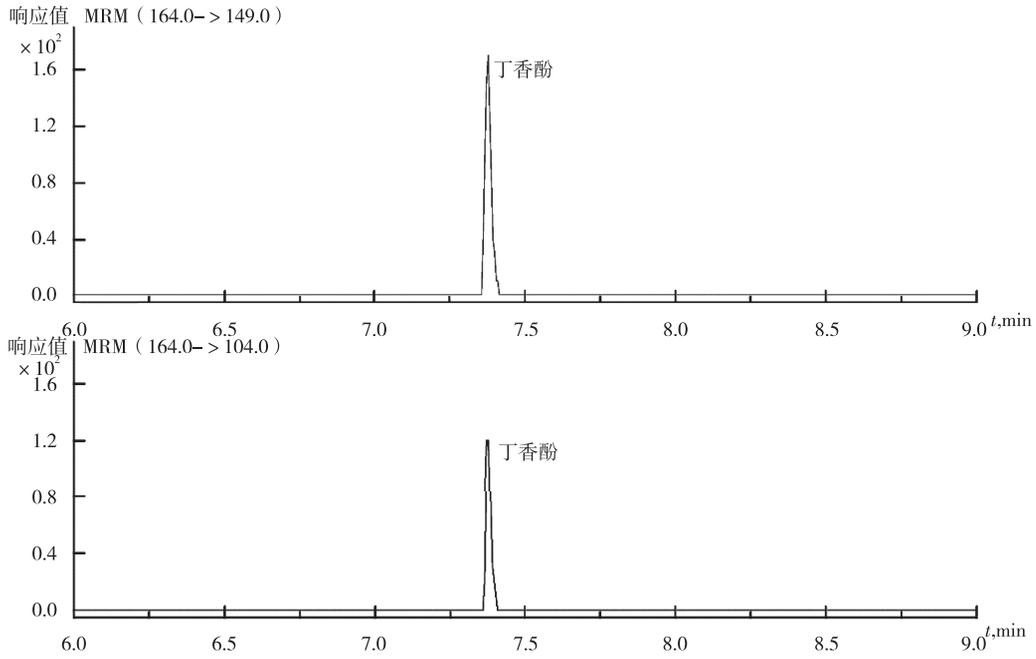


图 A.1 丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图 (10 $\mu\text{g/L}$)

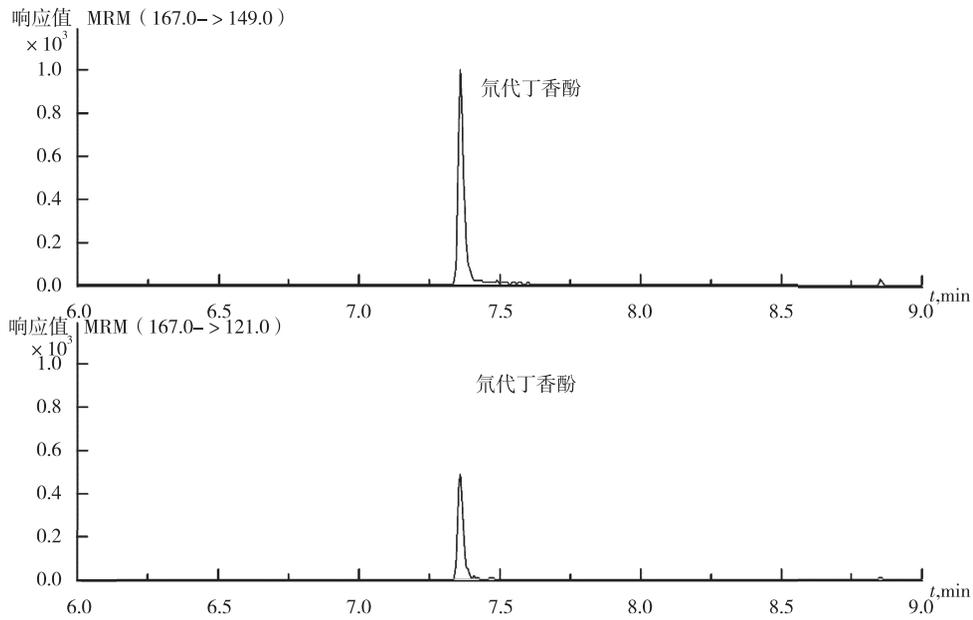


图 A.2 氘代丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图 (50 $\mu\text{g/L}$)