

中华人民共和国国家标准

农业部 1077 号公告—6—2008

水产品中玉米赤霉醇类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of zeranols residues in aquatic products
by LC-MS/MS method

2008-08-11 发布

2008-08-11 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

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：农业部渔业环境及水产品质量监督检验测试中心(哈尔滨)、哈尔滨市食品工业研究所。

本标准主要起草人：战培荣、孙言春、杨桂玲、陈忠祥、杨旭、覃东立、孙娜、卢玲、王海涛、赵彩霞、陆九韶。

水产品中玉米赤霉醇类残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了水产品中玉米赤霉醇类残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于水产品中 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮单个或多个混合物残留量的液相色谱-串联质谱检测。

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

SC/T 3016 水产品抽样方法

3 原理

用乙腈提取试样中的六种玉米赤霉醇类，用正己烷脱脂，经过氨基固相萃取柱净化后，用液相色谱-串联质谱仪测定，色谱保留时间和质谱特征离子共同定性，外标法定量。

4 试剂

以下所用试剂，除特殊注明外均为分析纯试剂，试验用水符合 GB/T 6682 一级水要求。

- 4.1 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮标准品，纯度均大于 97%。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 正己烷：色谱纯。
- 4.4 乙酸乙酯：色谱纯。
- 4.5 甲醇：色谱纯。
- 4.6 无水硫酸钠：640℃烘干 4 h，干燥保存。
- 4.7 正己烷-乙酸乙酯(60+40)：准确量取正己烷 60 mL 和乙酸乙酯 40 mL，混匀。
- 4.8 正己烷-乙酸乙酯(20+80)：准确量取正己烷 20 mL 和乙酸乙酯 80 mL，混匀。
- 4.9 乙腈溶液(20%)：取 20 mL 乙腈，加水溶解，定容至 100 mL。
- 4.10 乙腈饱和的正己烷溶液：乙腈 100 mL 中加入 15 mL 正己烷，混匀，备用。
- 4.11 标准储备液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：精确称取适量的 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮，用甲醇分别配成浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液，-18℃冰箱中保存，贮存期 1 年。
- 4.12 混合标准储备液(1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：分别准确吸取 1.0 mL 的 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮标准储备液至 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释定容，-18℃冰箱中保存，贮存期 6 个月。

4.13 混合标准工作溶液:准确吸取混合标准储备液,用乙腈溶液(4.9)稀释成浓度为 0.50 ng/mL~100.00 ng/mL 系列标准工作液,4℃暂时存放。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱联用仪(配电喷雾离子源)。
- 5.2 涡旋混合器。
- 5.3 离心机:4 000 r/min。
- 5.4 分析天平:感量为 0.01 g。
- 5.5 分析天平:感量为 0.000 01 g。
- 5.6 组织匀浆机。
- 5.7 旋转蒸发器。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 氮吹仪。
- 5.10 鸡心瓶:100 mL。
- 5.11 具塞聚丙烯离心管:50 mL。
- 5.12 具塞刻度玻璃管:10 mL。
- 5.13 氨基固相萃取柱:规格为 500 mg,3 mL。

6 测定步骤

6.1 试样预处理

按 SC/T 3016 的规定执行。

6.2 提取净化

称取(5.00±0.02) g 试样于 50 mL 离心管中,加入 3 g 无水硫酸钠(4.6),涡动 20 s,加乙腈(4.2)15 mL,充分均质混匀,4 000 r/min 离心 10 min,取上清液于另一离心管中。另取一 50 mL 离心管,加入 10 mL 乙腈(4.2),清洗刀头。清洗液用来溶解上一步的残余物,重复提取一次,合并两次提取液。提取液中加入乙腈饱和的正己烷溶液(4.10)15 mL,充分震荡,3 000 r/min 离心 5 min,弃上层正己烷。再加乙腈饱和的正己烷溶液(4.10)10 mL 重复脱脂一次。下层转至 100 mL 鸡心瓶中,50℃旋蒸至近干,加乙酸乙酯 5 mL,涡动 1 min,静置 30 s,上清液转移至 50 mL 离心管。鸡心瓶中加正己烷 10 mL,涡动 30 s,静置 30 s,上清液转移至同一个离心管。再用正己烷 10 mL 洗涤鸡心瓶一次,合并三次残余物溶解液,备用。

氨基固相萃取柱依次用乙酸乙酯和正己烷各 5 mL 活化,取备用液全部过柱(流速不超过 1 mL/min),再依次用正己烷、正己烷-乙酸乙酯(4.7)各 5 mL 淋洗。依次用正己烷-乙酸乙酯(4.8)和乙酸乙酯各 4 mL 洗脱,合并两次洗脱液,50℃氮气吹干。

残余物用乙腈溶液(4.9)1.0 mL 溶解,涡动混匀,过 0.2 μm 滤膜,供液相色谱-串联质谱仪测定。

6.3 空白添加标准曲线的制备

分别精确取 6 种玉米赤霉醇类药物混合标准储备液适量,添加到 5.00 g 空白试样中,制得浓度在 0.00 μg/kg~100.00 μg/kg 范围内的 5~7 个不同添加浓度的试样,按 6.2 步骤操作,供液相色谱-串联质谱仪测定。

6.4 测定

6.4.1 色谱条件

- a) 色谱柱:BEH C₁₈(2.1×50 mm,粒径 1.7 μm);或相当者。

- b) 流动相:A相:水;B相:乙腈。
 c) 流速:0.3 mL/min。
 d) 柱温:35℃。
 e) 进样体积:10 μL。
 f) 流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间, min	A相, %	B相, %
0	85	15
3	15	85
3.5	10	90
4	10	90
4.3	85	15
5.5	85	15

6.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:电喷雾离子源。
 b) 扫描方式:负离子扫描。
 c) 检测方式:多反应监测(MRM)。
 d) 电离电压:2.6 kV。
 e) 离子源温度:110℃。
 f) 雾化温度:380℃。
 g) 雾化气流速:600 L/h。
 h) 药物保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 玉米赤霉醇类药物的保留时间、定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

药物名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
α-玉米赤霉醇	2.15	321>277	321>277	40	20
		321>303		40	23
β-玉米赤霉醇	1.99	321>277	321>277	40	20
		321>303		40	23
α-玉米赤霉烯醇	2.20	319>275	319>275	40	20
		319>301		40	22
β-玉米赤霉烯醇	2.02	319>275	319>275	40	20
		319>301		40	22
玉米赤霉酮	2.48	319>275.2	319>275	40	20
		319>205		40	20
玉米赤霉烯酮	2.51	317>273	317>273	40	18
		317>175		40	18

6.4.3 定性依据

在同样的测试条件下,阳性样品保留时间与标准物质保留时间之间的相对标准偏差应在±5%以内,且监测到的离子的相对丰度,用与最强离子基峰的强度百分比表示,应当与浓度相当的校正标准相对丰度一致,校正标准可以是标准品溶液,也可以是添加了标准物质的样品。基峰与次强碎片离子相对丰度比符合表 3 的要求。空白添加标准溶液的质量色谱图和玉米赤霉醇类药物子离子的质谱图见附录 A 中的图 A.1~图 A.7。

表 3 基峰与次强碎片离子丰度比的要求

相对丰度, %	允许偏差, %
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

6.4.4 定量测定

按 6.4.1 和 6.4.2 设定仪器条件,待仪器稳定后,取样品制备液和空白添加混合标准工作溶液进行测定,作单点或多点校准,外标法计算样品中药物的残留量,定量离子采用丰度最大的二级特征离子碎片。样品溶液及空白添加混合标准工作溶液中 α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇、α-玉米赤霉烯醇、β-玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。

6.5 空白试验

除不加标样外,按照上述测定条件和步骤进行平行操作。

7 结果计算

试样中玉米赤霉醇类的残留量按公式(1)计算,测定结果扣除空白值,保留三位小数;

单点校准:

$$X = \frac{X_s A m_s}{A_s m} \dots\dots\dots (1)$$

或空白添加标准曲线校准:由 $A_s = aX_s + b$,求得 a 和 b,代入公式(1)。

式中:

- X——测试样品中玉米赤霉醇类的残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- X_s ——空白添加样品中相应玉米赤霉醇类的浓度,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- A——待测样品溶液中相应玉米赤霉醇类的峰面积;
- A_s ——空白添加样品溶液中相应的玉米赤霉醇类的峰面积;
- m_s ——空白添加样品质量,单位为克(g);
- m——待测样品质量,单位为克(g)。

8 方法灵敏度、准确度和精密度

8.1 灵敏度

6 种玉米赤霉醇类残留的检测限均为 $0.50 \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限均为 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

8.2 准确度

本方法在添加浓度范围为 $1.00 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 20.00 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时的回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

8.3 精密度

本方法批间相对标准偏差 $<15\%$ 。批内相对标准偏差 $<15\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
玉米赤霉醇类特征离子质量色谱图和质谱图

A.1 玉米赤霉醇类标准溶液特征离子质量色谱图

玉米赤霉醇类标准溶液特征离子质量色谱图见图 A.1。

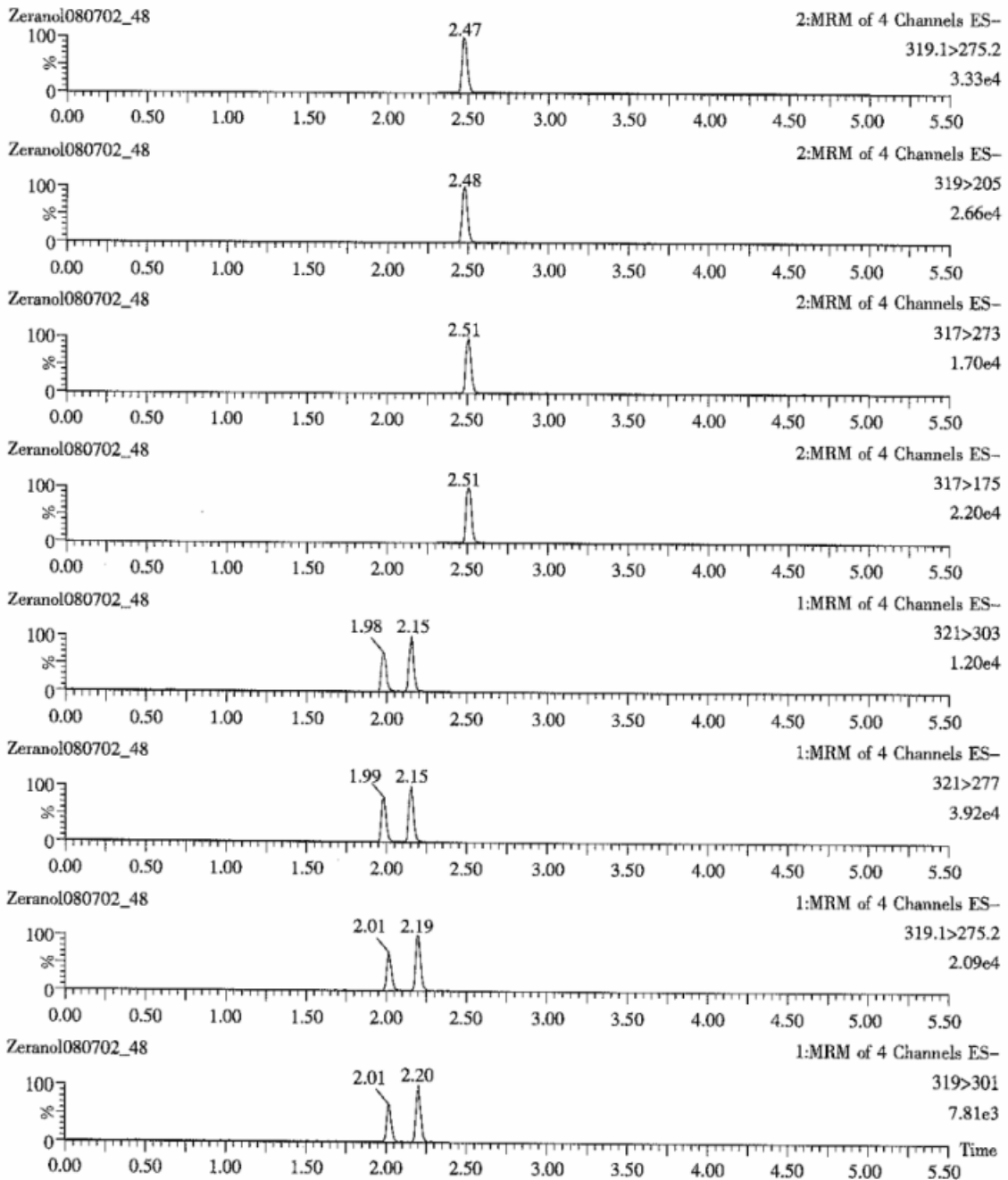


图 A.1 玉米赤霉醇类标准溶液特征离子质量色谱图

A.2 β -玉米赤霉醇与 α -玉米赤霉醇子离子扫描质谱图

β -玉米赤霉醇与 α -玉米赤霉醇子离子扫描质谱图见图 A.2。

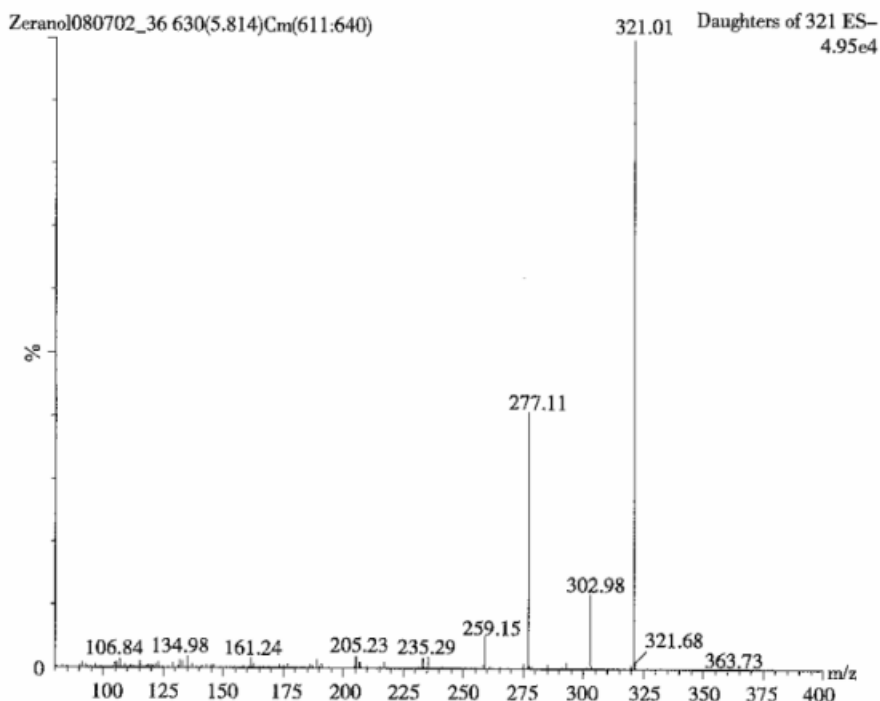


图 A.2 β -玉米赤霉醇与 α -玉米赤霉醇子离子扫描质谱图

A.3 β -玉米赤霉烯醇与 α -玉米赤霉烯醇子离子扫描质谱图

β -玉米赤霉烯醇与 α -玉米赤霉烯醇子离子扫描质谱图见图 A.3。

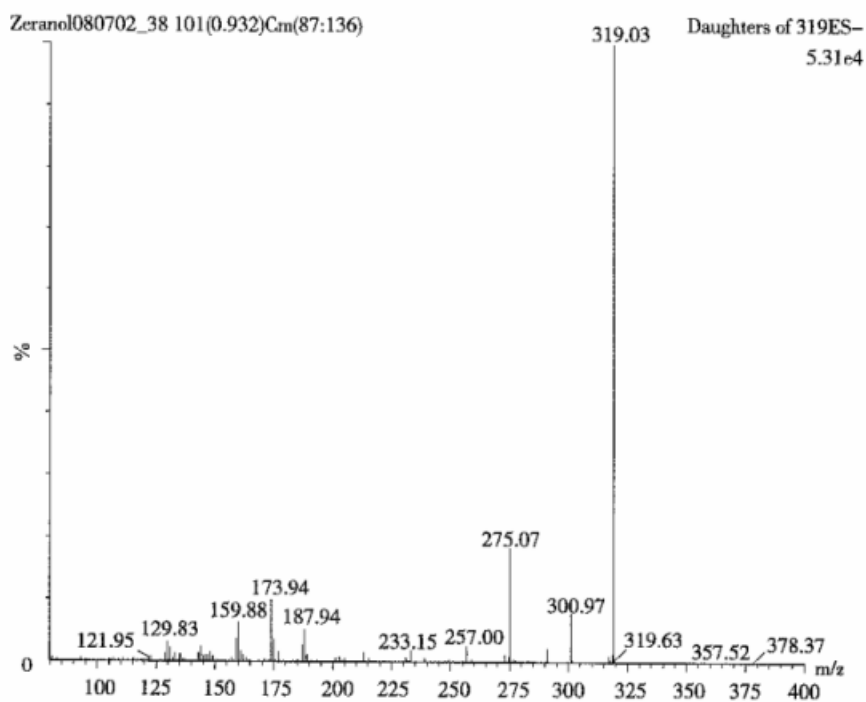


图 A.3 β -玉米赤霉烯醇与 α -玉米赤霉烯醇子离子扫描质谱图

A.4 玉米赤霉酮子离子扫描质谱图

玉米赤霉酮子离子扫描质谱图见图 A.4。

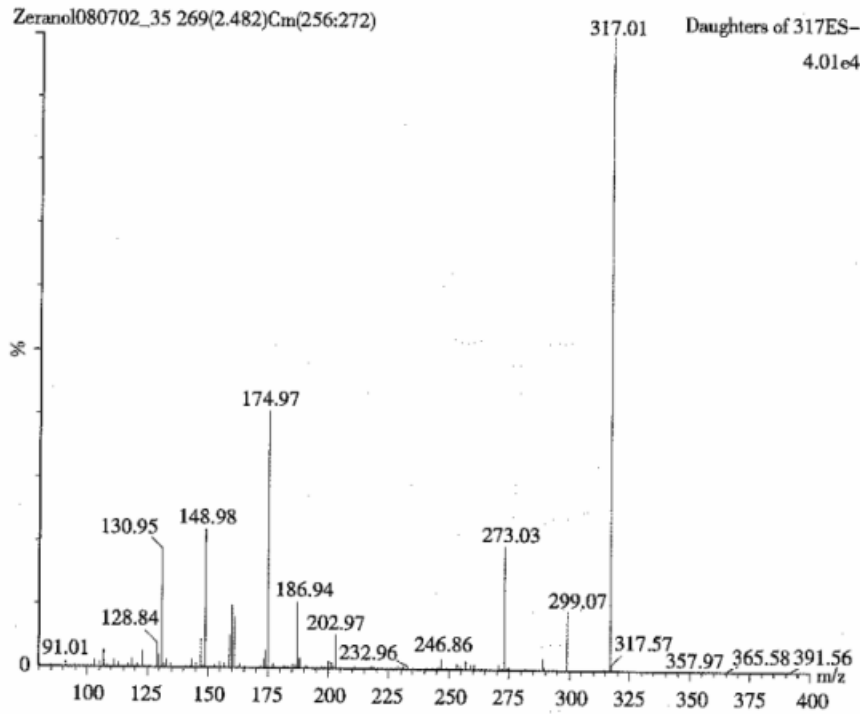


图 A.4 玉米赤霉酮子离子扫描质谱图

A.5 玉米赤霉烯酮子离子扫描质谱图

玉米赤霉烯酮子离子扫描质谱图见图 A.5。

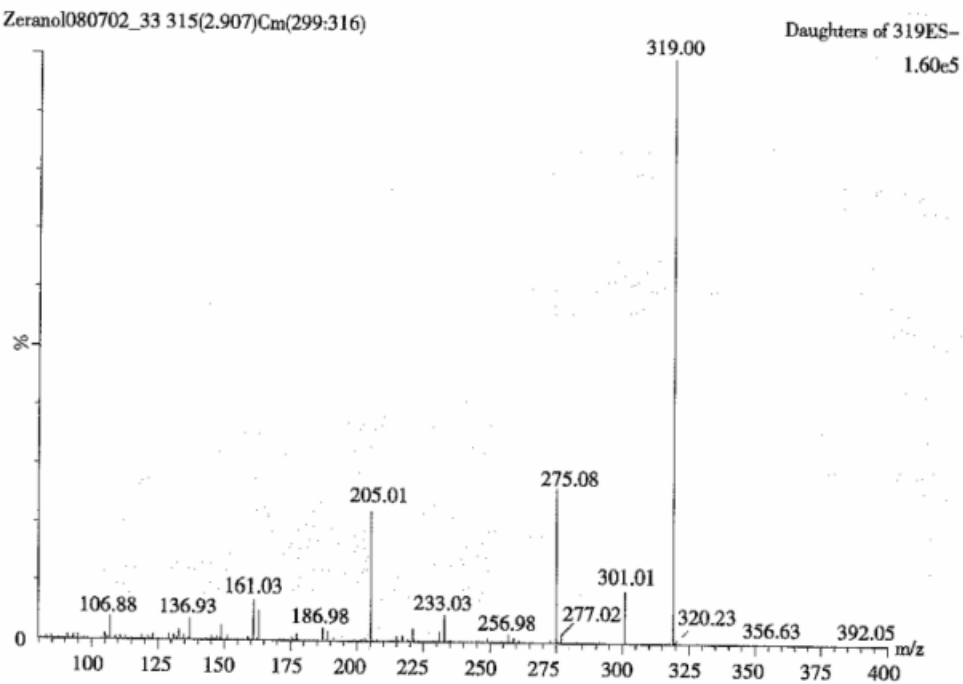


图 A.5 玉米赤霉烯酮子离子扫描质谱图

A.6 基质(鱼)加标回收率色谱图

基质(鱼)加标回收率色谱图(0.5 μg/kg)见图 A.6。

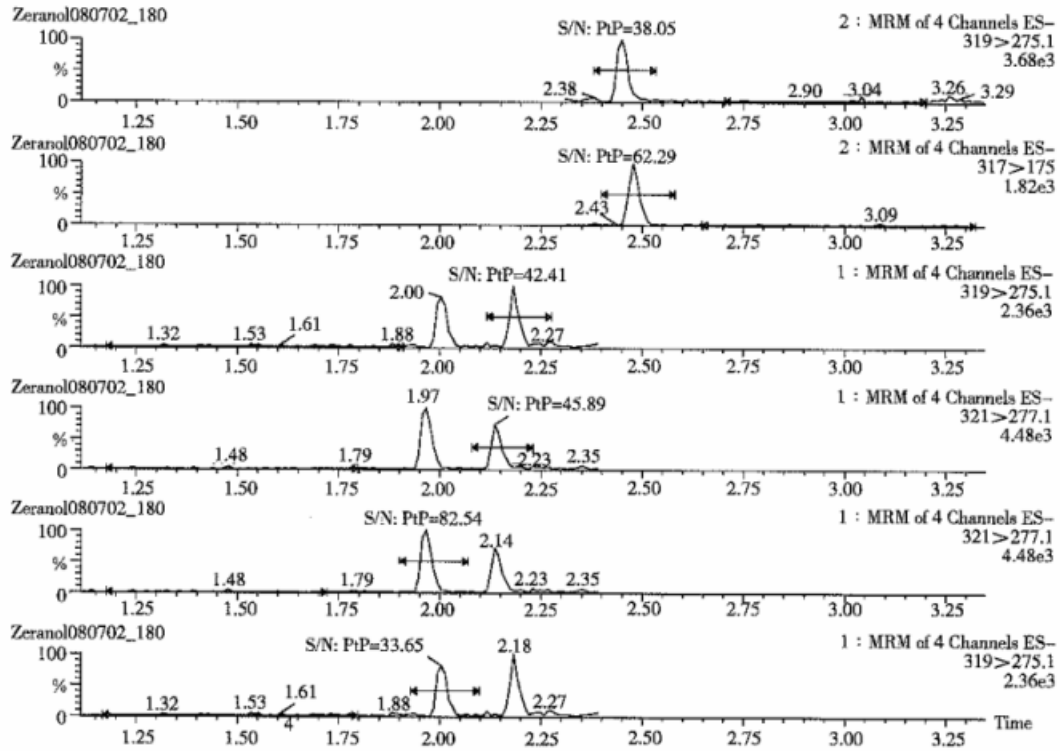


图 A.6 基质(鱼)加标回收率色谱图(0.5 μg/kg)

A.7 鱼空白色谱图

鱼空白色谱图见图 A.7。

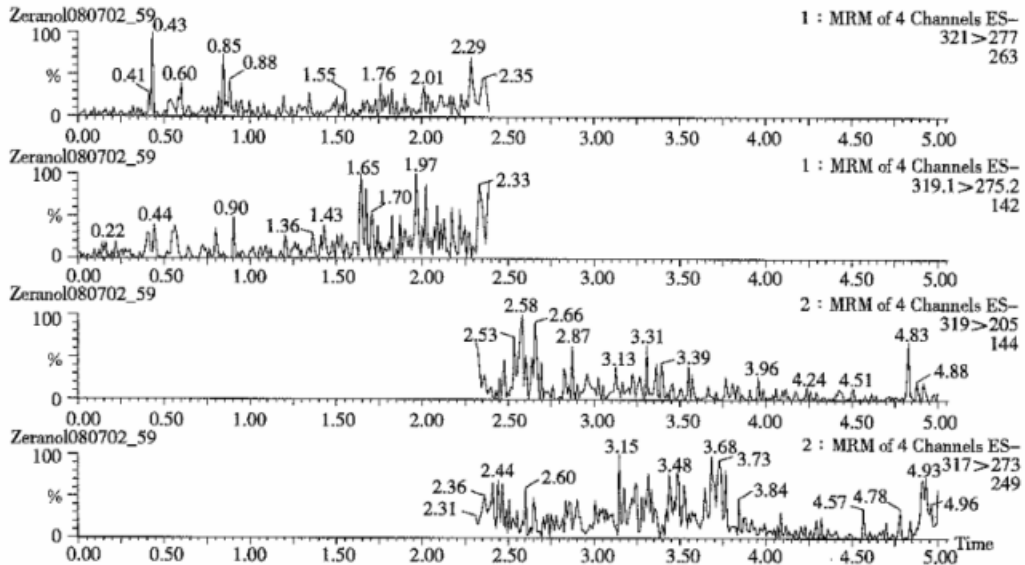


图 A.7 鱼空白色谱图