

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 282 号—1—2020

饲料中炔雌醇等8种雌激素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of eight kinds of estrogens including estriol in feeds—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2020-03-20 发布

2020-07-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)、石家庄市兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:吴银良、赵健、吕燕、杨挺、朱勇、李云、付岩、陈国、张艳、章豪、张亮、江潇潇、王全胜。

饲料中炔雌醇等 8 种雌激素类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中雌三醇、雌酮、炔雌醇、 17α -雌二醇、 17β -雌二醇、己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚等雌激素类药物的液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于肉粉和肉骨粉等饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料和精料补充料中雌激素类药物的测定。

本标准的方法检测限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的雌激素类药物经乙腈振荡提取, 吹干后用乙酸乙酯溶解, 再通过液液萃取净化, 液相色谱-串联质谱法测定, 内标法定量。

4 试剂或材料

除非另有说明, 在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 雌激素类药物对照品: 雌三醇、雌酮、炔雌醇、 17α -雌二醇、 17β -雌二醇、己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚的纯度均大于 95%。

4.2 甾代雌激素类药物对照品: 雌三醇- D_3 、雌酮- D_2 、炔雌醇- D_4 、 17α -雌二醇- D_2 、 17β -雌二醇- D_2 、己烯雌酚- D_8 、己烷雌酚- D_4 和己二烯雌酚- D_6 的纯度均大于 95%。

4.3 乙腈: 色谱纯。

4.4 乙酸乙酯。

4.5 5.0% 碳酸钠溶液: 取 50 g 碳酸钠, 用水溶解, 加 950 mL 水溶解, 混匀。

4.6 40% 乙腈溶液: 取 200 mL 乙腈与 300 mL 水混匀。

4.7 20% 乙腈溶液: 取 200 mL 乙腈与 800 mL 水混匀。

4.8 雌激素类药物和甾代雌激素类药物标准储备液: 准确称取适量已知纯度的雌激素类药物对照品雌三醇、雌酮、炔雌醇、 17α -雌二醇、 17β -雌二醇、己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚及甾代雌激素类药物对照品雌三醇- D_3 、雌酮- D_2 、炔雌醇- D_4 、 17α -雌二醇- D_2 、 17β -雌二醇- D_2 、己烯雌酚- D_8 、己烷雌酚- D_4 和己二烯雌酚- D_6 , 精准至 0.00001 g , 分别置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈(4.3)使之完全溶解, 并定容至刻度, 使最终浓度分别为 $100 \mu\text{g/mL}$, -18°C 保存, 有效期 6 个月。

4.9 雌激素类药物标准中间液: 分别准确移取雌三醇、雌酮、炔雌醇、 17α -雌二醇、 17β -雌二醇、己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚标准储备液(4.8)各 5.0 mL, 置于 100 mL 棕色容量瓶中, 用乙腈(4.3)定容至刻度。该溶液中各雌激素类药物浓度为 $5.0 \mu\text{g/mL}$, -18°C 保存, 有效期 6 个月。

4.10 甾代雌激素类药物标准中间液: 分别准确移取雌三醇- D_3 、雌酮- D_2 、炔雌醇- D_4 、 17α -雌二醇- D_2 、 17β -

雌二醇-D₂、己烯雌酚-D₈、己烷雌酚-D₄和己二烯雌酚-D₆标准储备液(4.8)各 5.0 mL,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用乙腈(4.3)定容至刻度。该溶液中各雌激素浓度为 5.0 μg/mL, -18℃ 保存,有效期 6 个月。

4.11 甾代雌激素类药物标准工作液:准确移取甾代雌激素类药物标准中间液(4.10)1.0 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中,用乙腈定容至刻度。该溶液中各雌激素浓度为 500 μg/L,临用现配。

4.12 雌激素类药物标准工作液:准确移取雌激素类药物标准中间液(4.9)及其甾代雌激素类药物标准中间液(4.10)适量,用 20%乙腈溶液(4.7)稀释成浓度为 1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L、20 μg/L、50μg/L 和 200 μg/L 的系列标准工作溶液,每一标准工作溶液含各内标浓度均为 12.5 μg/L,临用现配。

5 仪器设备

- 5.1 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。
- 5.2 离心机:最大转速 10 000 r/min 或以上。
- 5.3 分析天平:感量 0.01 mg。
- 5.4 天平:感量 0.01 g。
- 5.5 振荡器。
- 5.6 涡旋混合仪。
- 5.7 氮吹浓缩仪。
- 5.8 塑料离心管:50 mL。

6 样品

按照 GB/T 14699.1 抽取有代表性的样品,用四分法缩减至 500 g。按照 GB/T 20195 制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀后装入密闭容器。

7 试验步骤

7.1 提取

取试样 5 g(精确至 0.01 g),置于 50 mL 塑料离心管中,准确加入甾代雌激素类药物标准工作液(4.11)50 μL,涡旋混合 15 s,加入 25 mL 乙腈(4.3)后于振荡器上振荡提取 30 min,4 000 r/min 离心 2 min,收集乙腈提取液在 40℃水浴中氮吹,至近干后加入 10 mL 乙酸乙酯(4.4)溶解残渣。

7.2 净化

在 7.1 得到的乙酸乙酯溶液中加入 2 mL 5%碳酸钠溶液(4.5),涡旋混合 1 min,5 000 r/min 离心 3 min,弃去下层水相,加入 2 mL 5%碳酸钠溶液(4.5),重复上述步骤后将乙酸乙酯层移入另一 50 mL 尖底塑料离心管中,在 40℃水浴中氮气吹干,准确加入 1 mL 40%的乙腈溶液(4.6),10 000 r/min 离心 10 min,吸取 0.5 mL 上层清液,加 0.5 mL 水混合均匀,待测。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱:C₁₈柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.8 μm;或性能相当者。
- 流速:0.4 mL/min。
- 进样量:10 μL。
- 柱温:35℃。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间,min	水,%	乙腈,%
0	80	20
1.0	80	20
7.0	45	55

表 1 (续)

时间, min	水, %	乙腈, %
8.0	45	55
8.1	80	20
10	80	20

7.3.2 质谱参考条件

离子源:电喷雾离子源。

扫描方式:负离子扫描。

检测方式:多反应监测(MRM)。

脱溶剂气、锥孔气均为高纯氮气;碰撞气为高纯氩气或其他合适气体。使用前,应调节各气体流量,以使质谱灵敏度达到检测要求。

毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压优化至最佳灵敏度。

定性离子对、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 雌激素类药物和内标物定性离子对、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量参考值

中文名称	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
雌三醇	3.44	287.10>145.06 287.10>170.95	287.10>170.95	62	48 52
雌酮	6.89	269.13>145.02 269.13>159.02	269.13>145.02	58	44 48
炔雌醇	6.74	294.97>144.90 294.97>158.79	294.97>144.90	48	46 38
17 α -雌二醇	6.56	270.91>144.90 270.91>238.95	270.91>144.90	48	52 46
17 β -雌二醇	6.19	270.91>144.90 270.91>238.95	270.91>144.90	48	52 46
己烯雌酚	7.32	267.15>237.04 267.15>251.04	267.15>237.04	48	38 34
己烷雌酚	7.51	269.01>133.95 269.01>118.95	269.01>133.95	34	40 24
己二烯雌酚	7.49	265.01>92.95 265.01>249.01	265.01>92.95	44	32 34
雌三醇-D ₃	3.44	289.97>172.93	289.97>172.93	50	42
雌酮-D ₂	6.87	271.05>144.96	271.05>144.96	52	42
炔雌醇-D ₄	6.76	298.97>146.90	298.97>146.90	50	48
17 α -雌二醇-D ₂	6.51	272.96>146.96	272.96>146.96	72	44
17 β -雌二醇-D ₂	6.16	272.96>146.96	272.96>146.96	72	44
己烯雌酚-D ₈	7.28	275.10>245.02	275.10>245.02	44	38
己烷雌酚-D ₄	7.52	273.35>136.18	273.35>136.18	34	22
己二烯雌酚-D ₆	7.62	270.71>94.74	270.71>94.74	42	42

7.4 定性测定

在相同试验条件下,试样中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值与标准溶液中待测物质的保留时间与相应内标物保留时间的比值偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且试样中各组分两个定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液的相应定性离子相对丰度一致,偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

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

7.5 定量测定

在仪器最佳工作条件下,混合标准工作液与试样交替进样,采用内标法定量,每种雌激素选择对应的同位素内标物进行定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。当试样的上机液浓度超过线性范围时,需根据测定浓度稀释后进行重新测定。上述色谱和质谱条件下,8 种雌激素类药物标准溶液的特征离子质量色谱图参见附录 A 中的图 A.1。

8 试验数据处理

试样中雌激素类药物的含量 X_i ,以质量分数表示,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$),按式(1)或式(2)计算。

$$\text{单点校准: } X_i = \frac{C_i \times A_{is} \times A'_{is} \times C_{is} \times V \times 1000}{C'_{is} \times A_{is} \times A_s \times m \times 1000} \times \rho \quad (1)$$

$$\text{或标准曲线校准: } X_i = \frac{C_i \times V \times 1000}{m \times 1000} \times \rho \quad (2)$$

式中:

C_i ——由标准曲线得出的试样溶液中相应的雌激素类药物浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

C_{is} ——试样溶液中相应的雌激素类药物内标浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

C_s ——标准溶液中相应的雌激素类药物浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

C'_{is} ——标准溶液中相应的雌激素类药物内标浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

A_i ——试样溶液中相应的雌激素类药物的峰面积;

A_{is} ——试样溶液中相应的雌激素类药物内标的峰面积;

A_s ——标准溶液中相应的雌激素类药物的峰面积;

A'_{is} ——标准溶液中相应的雌激素类药物内标的峰面积;

V ——残余物定容体积,单位为毫升(mL),数值为 1.0;

m ——试样的质量,单位为克(g);

ρ ——残余物定容后稀释倍数;

1 000 ——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果与其平均值的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

附录 A
(资料性附录)

8 种雌激素类药物标准溶液特征离子质量色谱图

8 种雌激素类药物标准溶液特征离子质量色谱图见图 A. 1。

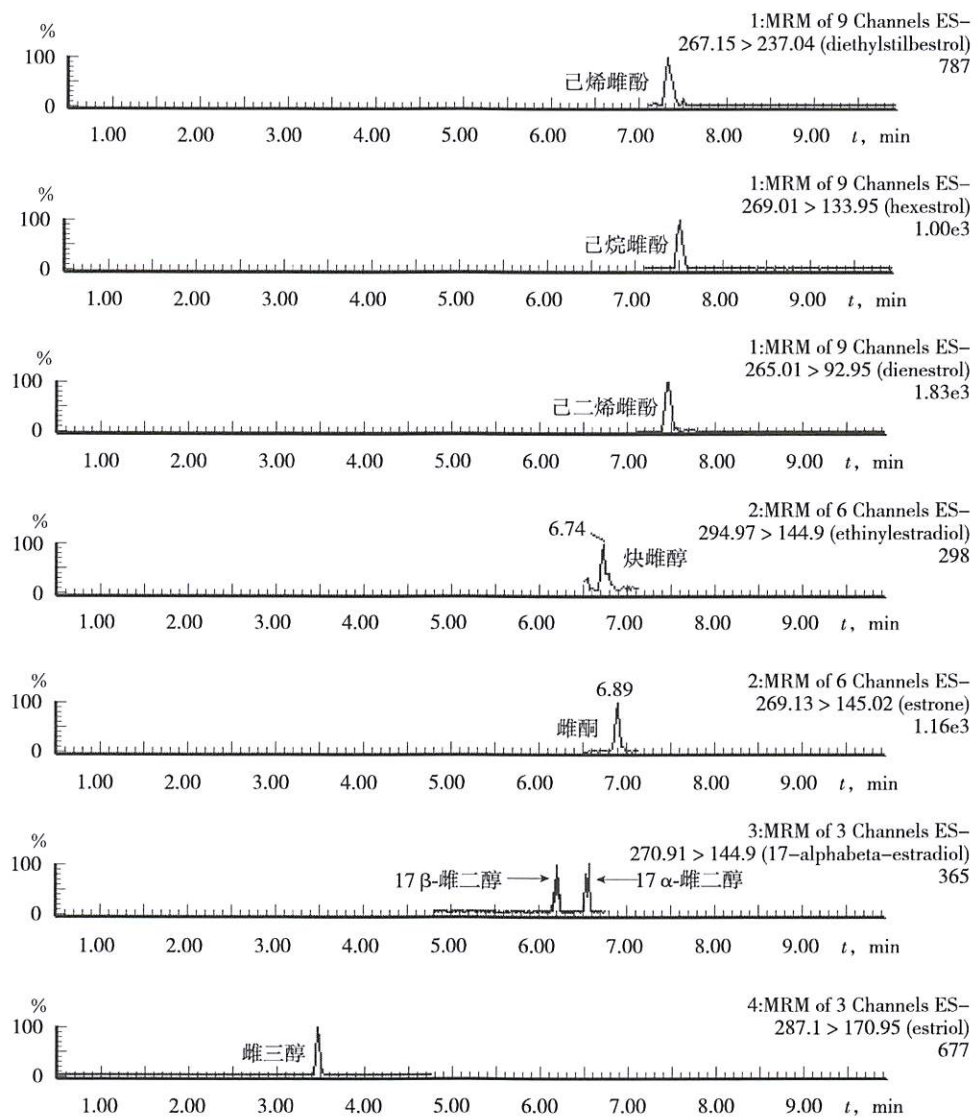


图 A. 1 8 种雌激素类药物标准溶液 (1.0 μg/L) 特征离子质量色谱图

中华人民共和国
国家标准

饲料中炔雌醇等8种雌激素类药物的测定
液相色谱-串联质谱法

农业农村部公告第282号—1—2020

* * *

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:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

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 15 千字

2020年6月第1版 2020年6月北京第1次印刷

书号: 16109·8078

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第282号—1—2020