



中华人民共和国国家标准

GB/T 22992—2008

牛奶和奶粉中玉米赤霉醇、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

Determination of zearalanol, zearalanone, diethylstilbestrol, hexestrol and
dienoestrol multi-residues in milk and milk powder—
LC-MS-MS method

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准的附录 A、附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：许泓、吴延晖、何佳、张骏、张曼、林安清、庞国芳。



牛奶和奶粉中玉米赤霉醇、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

本标准规定了牛奶和奶粉中玉米赤霉醇(zearalanol)、玉米赤霉酮(zearalanone)、己烯雌酚(diethylstilbestrol)、己烷雌酚(hexestrol)、双烯雌酚(dieno-estrol)残留量液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准用于牛奶和奶粉中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚残留量的测定。

本标准方法检出限：牛奶中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烷雌酚、己烯雌酚和双烯雌酚为 $1.0 \mu\text{g/L}$ ；奶粉中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烷雌酚、己烯雌酚和双烯雌酚为 $8.0 \mu\text{g/kg}$ 。

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—2008, ISO 3696:1987, MOD)

3 原理

用乙腈作为蛋白沉淀剂和提取剂进行提取，阴离子固相萃取柱进行净化，用液相色谱-串联质谱仪测定，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。

4.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 氨水。

4.5 甲酸。

4.6 氢氧化钠。

4.7 5 mol/L 氢氧化钠溶液：称取 200 g 氢氧化钠，用蒸馏水定容到 1 L。

4.8 淋洗液：氨水-水(1+19)。

4.9 洗脱液：甲酸-甲醇(1+19)。

4.10 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%)纯度大于等于 97%；玉米赤霉酮，纯度大于等于 97%；己烯雌酚，纯度大于等于 99%；己烷雌酚，纯度大于等于 99%。

98%；双烯雌酚，纯度大于等于 98%。

4.11 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(4.2)配制成 1 mg/mL 标准贮备溶液。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。

4.12 内标标准物质： α -玉米赤霉烯醇-4 氘代，纯度大于等于 99%；己烯雌酚-8 氘代，纯度大于等于 98%。

4.13 内标标准溶液：准确称取适量玉米赤霉烯醇-4 氘代和己烯雌酚-8 氘代标准物质，用甲醇(4.2)分别配制成 1 mg/mL 标准贮备溶液。再以甲醇稀释成适用浓度的混合内标工作溶液，保存于 4℃冰箱中。

4.14 基质提取液：空白样品，除不加入标准工作溶液(4.11)和内标工作溶液(4.13)外，其他操作同 7.1.1 及 7.1.2 处理后得到的溶液。

4.15 基质标准工作溶液：将标准工作溶液(4.11)及内标工作溶液(4.13)混合后在氮吹仪中吹干，以基质提取液(4.14)溶解，涡旋 30 s 后即为基质标准工作溶液。

4.16 Oasis MAX 阴离子固相萃取柱¹⁾或相当者：60 mg, 3 mL。

4.17 滤膜：0.2 μ m。

5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱联用仪：配有电喷雾电离源。

5.2 自动固相萃取仪或固相萃取装置。

5.3 氮气吹干仪。

5.4 涡旋振荡器。

5.5 离心机：转速大于 3 500 r/min。

5.6 高速离心机：转速大于 9 000 r/min，温度可控制在 4℃。

6 试样的制备

6.1 牛奶

取 50 mL 新鲜或解冻的牛奶混合均匀，3 500 r/min 离心 5 min，取下层。

6.2 奶粉

取 12.5 g 奶粉于烧杯中，加适量 35℃~50℃水将其慢慢溶解，转移至 100 mL 容量瓶中，待冷却至室温，用水定容混匀。取 50 mL，以 3 500 r/min 离心 5 min，取下层。

7 测定步骤

7.1 混合基质标准校准溶液的制备

7.1.1 样品量取

于 50 mL 离心管中，分别加入不同量混合标准工作溶液(4.11)，使各被测组分玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烷雌酚、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工作溶液(4.13)，使其浓度均为 10 ng/mL，在氮吹仪上于 40℃水浴中吹干。取 5 个阴性样品，每个样品为 5 mL，置于上述离心管中涡旋混合后，加 10 mL 乙腈，涡旋混合 3 min，3 500 r/min 离心 10 min，取上清液于离心管中，再向样品中加入 5 mL 乙腈，同前操作，合并提取液，50℃下氮吹至体积小于 0.1 mL。加水 10 mL，用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 11.0，4℃，

1) Oasis MAX 阴离子固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称，给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不是表示对该产品的认可。如果其他产品具有相同的效果，则可使用这些等效产品。

9 000 r/min离心 5 min,备用。

7.1.2 提取净化

固相萃取净化条件:先用 2 mL 甲醇、2 mL 水将柱子活化,流速均为 4 mL/min。将 7.1.1 样品上清液上柱,流速为 1 mL/min,依次用 1 mL 淋洗液(4.8)、0.5 mL 甲醇以 3 mL/min 的速度淋洗,通入 20 mL 空气以 4 mL/min 的速度吹过 Oasis MAX 柱。用 4 mL 洗脱液(4.9)洗脱,流速为 1 mL/min,加入 30 mL 空气以 6 mL/min 的速度吹过 Oasis MAX 柱,收集洗脱液。将洗脱液在氮吹仪上于 40 ℃ 水浴中吹干,加入 1 mL 流动相,涡旋 30 s 溶解。溶液过 0.2 μm 滤膜后,供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 实测样品溶液的制备

取待测样品 5 mL 于 50 mL 离心管中,加入适量内标标准工作溶液(4.13),使其最终定容浓度均为 10 ng/mL。按 7.1.1 及 7.1.2 操作。

7.3 空白基质溶液的制备

取阴性样品 5 mL 于 50 mL 离心管中,按 7.1.1 及 7.1.2 操作。

7.4 测定条件

7.4.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱:ZORBAX Eclipse SB-C₈,3.5 μm,150 mm×4.6 mm(内径)或相当者;
- b) 柱温:25 ℃;
- c) 流动相:乙腈-水(7+3);
- d) 流速:0.5 mL/min;
- e) 进样量:50 μL。

7.4.2 质谱条件

质谱条件如下:

- a) 离子化方式:电喷雾电离;
- b) 扫描方式:负离子扫描;
- c) 检测方式:多反应监测(MRM);
- d) 离子源温度:350 ℃;
- e) 雾化气压力:0.083 MPa;
- f) 气帘气压力:0.124 0 MPa;
- g) 辅助气 1 压力:0.275 6 MPa;
- h) 辅助气 2 压力:0.241 2 MPa;
- i) 喷雾器电流:−5 μA;
- j) 电喷雾电压:−4 500 V;
- k) 定性离子对、定量离子对、碰撞能量和去簇电压见表 1。

表 1 5 种激素及代谢物的定性离子对、定量离子对、碰撞能量和去簇电压

化合物名称	定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	碰撞能量/V	去簇电压/V
玉米赤霉醇	320.6/277.2	321.1/277.2	−42	−110
	321.1/161.0		−40	−100
玉米赤霉酮	318.7/160.8	318.7/160.8	−40	−110
	318.7/107.0		−45	−110
玉米赤霉烯醇-4 氘代	322.9/159.9	322.9/159.9	−50	−90
	322.9/130.1		−43	−90

表 1 (续)

化合物名称	定性离子对(<i>m/z</i>)	定量离子对(<i>m/z</i>)	碰撞能量/V	去簇电压/V
己烯雌酚	266.9/251.0	266.7/251.0	—35	—90
	266.9/237.1		—40	—90
双烯雌酚	264.7/249.1	264.7/249.1	—36	—80
	264.7/235.0		—36	—80
己烷雌酚	269.0/118.9	269.0/134.0	—23	—70
	269.0/134.0		—52	—70
己烯雌酚-8 氘代	275.0/258.9	275.0/258.9	—37	—90
	275.0/245.0		—42	—90

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,在相同实验条件下,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±2.5%之内;且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,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 <i>K</i>	<i>K</i> >50	20< <i>K</i> < 50	10< <i>K</i> < 20	<i>K</i> ≤10
允许最大偏差	±20	±25	±30	±50

7.4.3.2 定量测定

配制系列混合基质标准工作溶液(7.1)分别进样,绘制标准工作曲线。检查仪器性能,确定线性范围。用色谱数据工作站或选取与样品含量接近含有内标的标准工作液进行定量。样品溶液中玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚的响应值应在工作曲线范围内。标准品的液相色谱-串联质谱色谱图参见附录 A 中的图 A.1。本方法检测牛奶中的激素及代谢物添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B 中的表 B.1。

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

玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚的测定按式(1)计算:

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

式中:

- X*——试样中被测物残留量,单位为微克每千克(μg/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)。
计算结果应扣除空白值。玉米赤霉醇和己烯雌酚将 2 种异构体面积或峰高值相加后以总量计算。

9 精密度

9.1 一般规定

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。

9.2 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限 r ，玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚在牛奶中的添加浓度范围及重复性方程见表 3，在奶粉中的添加浓度范围及重复性方程见表 4。

表 3 牛奶中的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每升

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
玉米赤霉醇	1.0~10	$\lg r=0.965\ 6\ \lg m-1.089\ 7$	$\lg R=0.962\ 5\ \lg m-0.712\ 8$
玉米赤霉酮	1.0~10	$\lg r=0.966\ 0\ \lg m-1.144\ 5$	$\lg R=0.915\ 2\ \lg m-0.651\ 3$
己烯雌酚	1.0~10	$\lg r=0.984\ 4\ \lg m-1.093\ 5$	$\lg R=0.205\ 8\ \lg m+0.011\ 9$
双烯雌酚	1.0~10	$\lg r=0.073\ 5\ \lg m+0.001\ 6$	$\lg R=1.081\ 3\ \lg m-0.798\ 2$
己烷雌酚	1.0~10	$\lg r=0.976\ 0\ \lg m-1.044\ 5$	$\lg R=0.925\ 2\ \lg m-0.661\ 3$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

表 4 奶粉中的添加浓度范围及重复性和再现性方程 单位为微克每千克

化合物名称	添加浓度范围	重复性限 r	再现性限 R
玉米赤霉醇	10~100	$\lg r=0.965\ 6\ \lg m-1.089\ 7$	$\lg R=0.962\ 5\ \lg m-0.712\ 8$
玉米赤霉酮	10~100	$\lg r=0.966\ 0\ \lg m-1.144\ 5$	$\lg R=0.915\ 2\ \lg m-0.651\ 3$
己烯雌酚	10~100	$\lg r=0.984\ 4\ \lg m-1.093\ 5$	$\lg R=0.205\ 8\ \lg m+0.011\ 9$
双烯雌酚	10~100	$\lg r=0.073\ 5\ \lg m+0.001\ 6$	$\lg R=1.081\ 3\ \lg m-0.798\ 2$
己烷雌酚	10~100	$\lg r=0.976\ 0\ \lg m-1.044\ 5$	$\lg R=0.925\ 2\ \lg m-0.661\ 3$
注： m 为两次测定结果的算术平均值。			

如果差值超过重复性限 r ，应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

9.3 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限 R ，玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚在牛奶中的添加浓度范围及再现性方程见表 3，在奶粉中的添加浓度范围及再现性方程见表 4。

附 录 A
(资料性附录)
标准物质液相色谱-串联质谱图

玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚标准物质液相色谱-串联质谱图，见图 A.1。

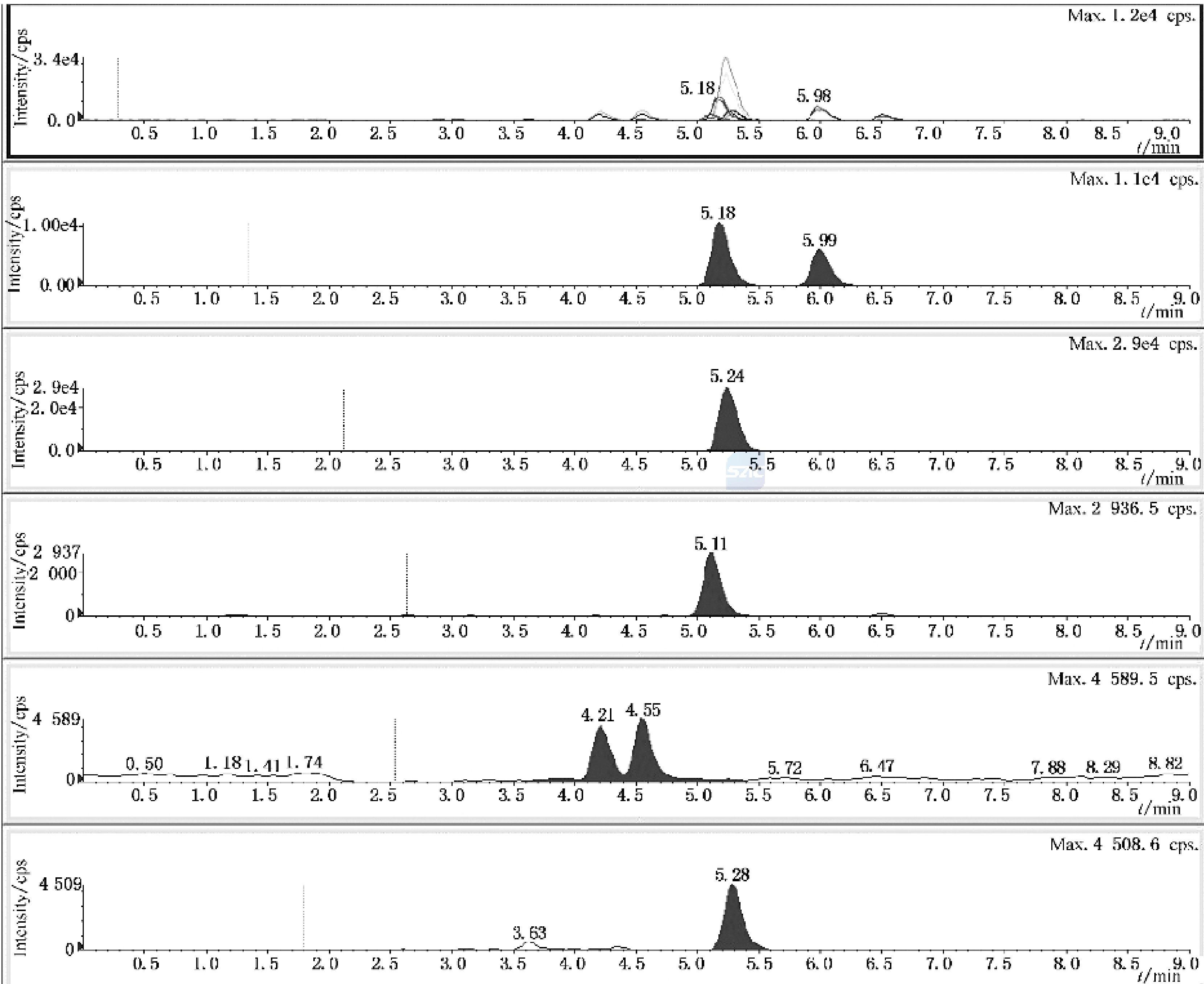


图 A.1 玉米赤霉醇、玉米赤霉酮、己烯雌酚、己烷雌酚、双烯雌酚标准物质液相色谱-串联质谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法检测牛奶中的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 添加浓度及其平均回收率的试验数据

化合物名称	添加浓度/($\mu\text{g/L}$)	平均回收率/%
玉米赤霉醇	1.0	84.93
	2.0	88.58
	5.0	91.35
	10.0	97.80
玉米赤霉酮	1.0	76.10
	2.0	79.18
	5.0	101.0
	10.0	102.4
己烯雌酚	1.0	80.12
	2.0	78.67
	5.0	102.7
	10.0	96.35
双烯雌酚	1.0	74.83
	2.0	93.00
	5.0	99.53
	10.0	95.32
己烷雌酚	1.0	91.33
	2.0	72.67
	5.0	92.47
	10.0	100.6