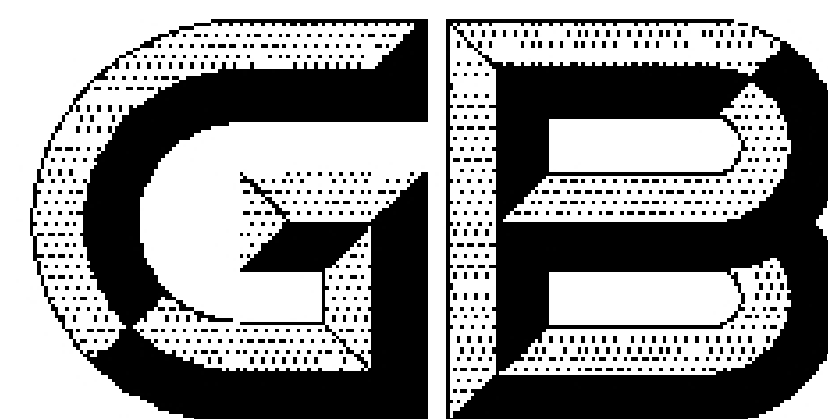




中华人民共和国国家标准

GB/T 20749—2006

牛尿中 β -雌二醇残留量的测定 气相色谱-负化学电离质谱法

Method for determination of β -estradiol residues in bovine urine—
gas chromatography-negative-ion chemical ionization
mass spectrometry method

2006-12-31 发布

2007-03-01 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 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华人民共和国质量监督检验检疫总局归口。

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、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、王建华、李杰、刘靖靖、蔡发。

本标准系首次发布的国家标准。



牛尿中 β -雌二醇残留量的测定

气相色谱-负化学电离质谱法

1 范围

本标准规定了牛尿中 β -雌二醇残留量气相色谱-负化学电离质谱测定方法。

本标准适用于牛尿中 β -雌二醇残留量的测定。

本标准的方法检出限： $0.25\ \mu\text{g/L}$ 。

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

牛尿中雌二醇经过酶水解和固相萃取柱净化后、经酰化衍生化后，用气相色谱-负化学电离质谱选择离子监测模式测定，内标法定量。

4 试剂和材料

除另有规定外，试剂均为分析纯；水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 β -葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸苷酶：Helix pomatia，含 β -葡萄糖苷酸酶 100 000 单位/mL，硫酸酯酶 $\leq 1\ 000$ 单位/mL。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 四丁基甲醚（MTBE）：色谱纯。

4.4 乙酸乙酯：色谱纯。

4.5 正己烷：色谱纯。

4.6 吡啶：色谱纯。

4.7 异辛烷：色谱纯。

4.8 衍生化试剂：五氟苯甲酰氯，在避光、防潮环境冷冻储藏。

4.9 碳酸氢钾。

4.10 三水乙酸钠。

4.11 无水硫酸钠。

4.12 甲醇+水溶液（1+1）：取 100 mL 甲醇（4.2）和 100 mL 水充分混合。

4.13 甲醇+四丁基甲醚溶液（1+9）：取 20 mL 的甲醇（4.2）和 180 mL 四丁基甲醚（4.3）充分混合。

4.14 乙酸钠缓冲液（pH=5.2）：称取 43 g 三水乙酸钠（4.10）用水溶解，加入 25.2 g 冰乙酸用水定容



至 1 000 mL,有效期 6 个月。

4.15 干燥乙酸乙酯:在密封试管中加入 500 mg 无水硫酸钠和 20 mL 乙酸乙酯,振荡混合约 30 min 后,2 000 r/min 离心 10 min。

4.16 乙酸乙酯+吡啶(90+10):将 10 mL 吡啶和 90 mL 干燥的乙酸乙酯混合,室温保存。一周内使用。

4.17 碳酸氢钾(KHCO_3)溶液:0.5 mol/L。称 5 g KHCO_3 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。一周内有效。

4.18 Oasis HLB 固相萃取柱:60 mg,3 mL 或相当者。使用前分别依次用 3 mL 四丁基甲醚(4.3),3 mL 甲醇(4.2),3 mL 纯水活化,保持柱体湿润。

4.19 标准物质: β -雌二醇,纯度 $\geq 99\%$ 。

4.20 内标标准物质: β -雌二醇-2,4,16,16-D₄,纯度 $\geq 99\%$ 。

4.21 β -雌二醇标准溶液:准确称量 10 mg 标准物分别于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)定容至刻度,浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,储备液贮存于 -20°C ,有效期一年。再以甲醇稀释成适用浓度的溶液,保存于 4°C 冰箱中。

4.22 内标标准溶液:准确称量 10 mg 标准物分别于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)定容至刻度,浓度 100 $\mu\text{g/mL}$,储备液贮存于 -20°C ,有效期一年。再以甲醇稀释成适用浓度溶液,保存于 4°C 冰箱中,可使用三个月。

4.23 标准工作溶液:将 β -雌二醇标准溶液(4.21)和 β -雌二醇 D₄(4.22)混合,按照 7.3 步骤衍生化后备用。

5 仪器

5.1 气相色谱-质谱仪:配有负化学源。

5.2 离心管:5 mL 和 10 mL,具塞。

5.3 移液器:20 μL ~100 μL ,200 μL ~1 000 μL 。

5.4 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.5 离心机。

5.6 涡旋混匀器。

5.7 氮气浓缩仪。

6 试样的制备与保存

6.1 试样的制备

取有代表性样品,制成实验室样品。试样分为两份,置于样品瓶中,密封,并做上标记。

6.2 试样保存

将试样置于 2°C ~ 8°C 下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

准确移取 2.0 mL 牛尿,置于 5 mL 具塞离心管中,加入 2 mL 乙酸钠缓冲液(4.14)、20 μL β -葡萄糖苷酸酶和芳基硫酸苷酶(4.1)、100 μL 内标溶液(4.22)于每个样品中,混匀,于 37°C 过夜。

7.2 净化

将提取液(7.1)移入下接 Oasis HLB 柱(4.18)的贮液器中,溶液以 ≤ 1 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 柱,待溶液完全流出后,用甲醇+水(4.12)洗柱,弃去全部淋出液。最后用 6 mL 甲醇+四丁基甲醚(4.13)洗脱,收集洗脱液于 10 mL 具塞离心管(5.2)中,用氮气浓缩仪(5.6)吹至约剩余 500 μL 溶

液。加入 2×2 mL 异辛烷于上述 10 mL 离心管中提取两次,以 2 000 r/min 离心 5 min。取上层液体于 5 mL 具塞离心管(5.2),于 40℃下氮气吹干。

7.3 衍生化

在上述 5 mL 具塞试管中依次加入 85 μL 干燥乙酸乙酯(4.15),500 μL 乙酸乙酯+吡啶(4.16),20 μL 五氟苯甲酰氯(4.8),混匀,于 60℃放置 20 min 后,用氮气浓缩仪吹干。加入 500 μL 0.5 mol/L KHCO₃ 溶液(4.17),涡旋振荡,待溶液澄清后,准确加入 0.4 mL 异辛烷,混合提取,静置,取上清液进行测定。

7.4 测定

7.4.1 气相色谱-质谱测定条件

- a) 色谱柱:HP-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm)石英毛细管柱或相当者;
- b) 载气:氦气,纯度≥99.999%;
- c) 流速:初始流速 1.0 mL/min,保持 5 min,然后以 1.0 mL/min 速度升至 3 mL/min;
- d) 柱温:120℃保持 2 min,然后以 15℃/min 程序升温至 250℃,再以 5℃/min 升温至 300℃保持 8 min;
- e) 进样量:1 μL;
- f) 进样方式:无分流进样;
- g) 进样口温度:300℃;
- h) 接口温度:280℃;
- i) 负化学源:150 eV;
- j) 离子源温度:150℃;
- k) 四极杆温度:106℃;
- l) 反应气:甲烷,纯度≥99.99%;
- m) 反应气流量:2 mL/min;
- n) 选择离子监测,见表 1。

表 1 选择离子监测表

监测离子(<i>m/z</i>)	离子比/(%)	允许相对偏差/(%)
660	100	—
661	40	±20
448	80	±20
450	44	±20

7.4.2 定性测定

定性测定的依据为:

- a) 被测样品色谱峰的保留时间与标准工作溶液相一致;
- b) 所选择的离子均出现,被测样品的监测离子的相对丰度与标准工作溶液的相对丰度两者之差不大于允许相对偏差(7.4.1)。

7.4.3 定量测定

配制系列标准工作溶液(4.23)分别进样,仪器测定 β-雌二醇以 *m/z* 660 为定量离子,内标 β-雌二醇 D4 以 *m/z* 664 为定量离子,以峰面积比对浓度绘制标准工作曲线,用标准工作曲线内标法对样品进行定量,样品溶液中待测物质的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,雌二醇衍生物参考保留时间约为 26 min。雌二醇和内标衍生物总离子流图和质谱图参见图 A.1、图 A.2、图 A.3。

7.5 平行试验

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,均按上述步骤进行。

8 结果计算

结果按式(1)计算

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\,000}{1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中被测组分残留量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

c ——从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品溶液所代表试样的质量,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值。

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,其重复性和再现性的值以 95% 的可信度来计算。

9.1 重复性

在重复性条件下,牛尿中雌二醇的含量在 $0.25\ \mu\text{g/L} \sim 2.0\ \mu\text{g/L}$ 范围内,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限(r),本标准的重复性限按式(2)计算:

$$r = 0.155m - 0.010\ 1 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

m ——雌二醇测定值的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$)。

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

在再现性条件下,牛尿中雌二醇的含量在 $0.25\ \mu\text{g/L} \sim 2.0\ \mu\text{g/L}$ 范围内,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限(R),本标准的再现性限按式(3)计算:

$$\lg R = 1.102 \lg m - 0.885 \dots\dots\dots(3)$$

式中:

m ——雌二醇测定值的浓度,单位为微克每升。



附录 A (资料性附录)

雌二醇和内标衍生物总离子流图和质谱图

A.1 雌二醇和内标衍生物总离子流图,见图 A.1。

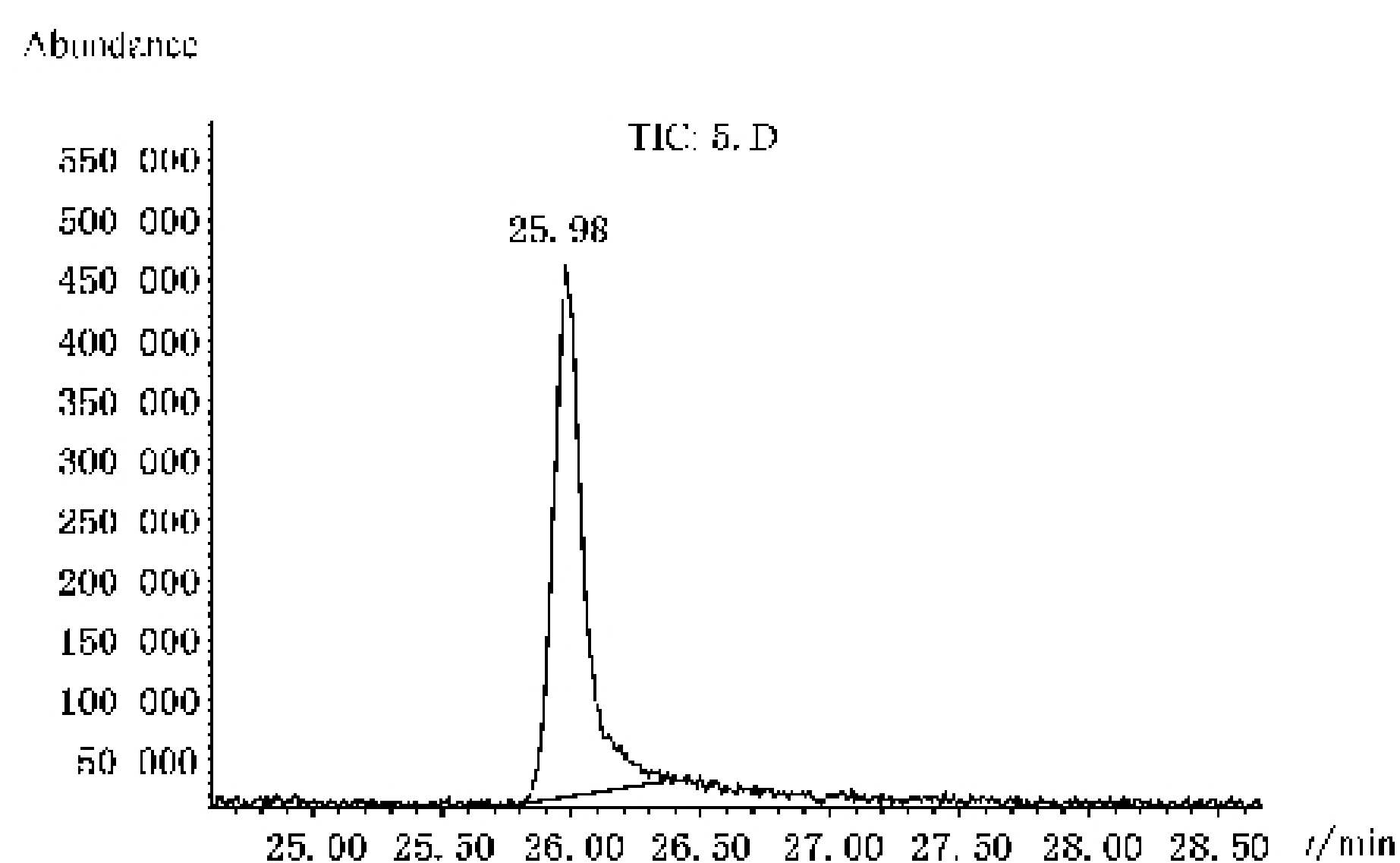


图 A.1 雌二醇和内标衍生物总离子流图

A.2 雌二醇标准物质衍生物质谱图,见图 A.2。

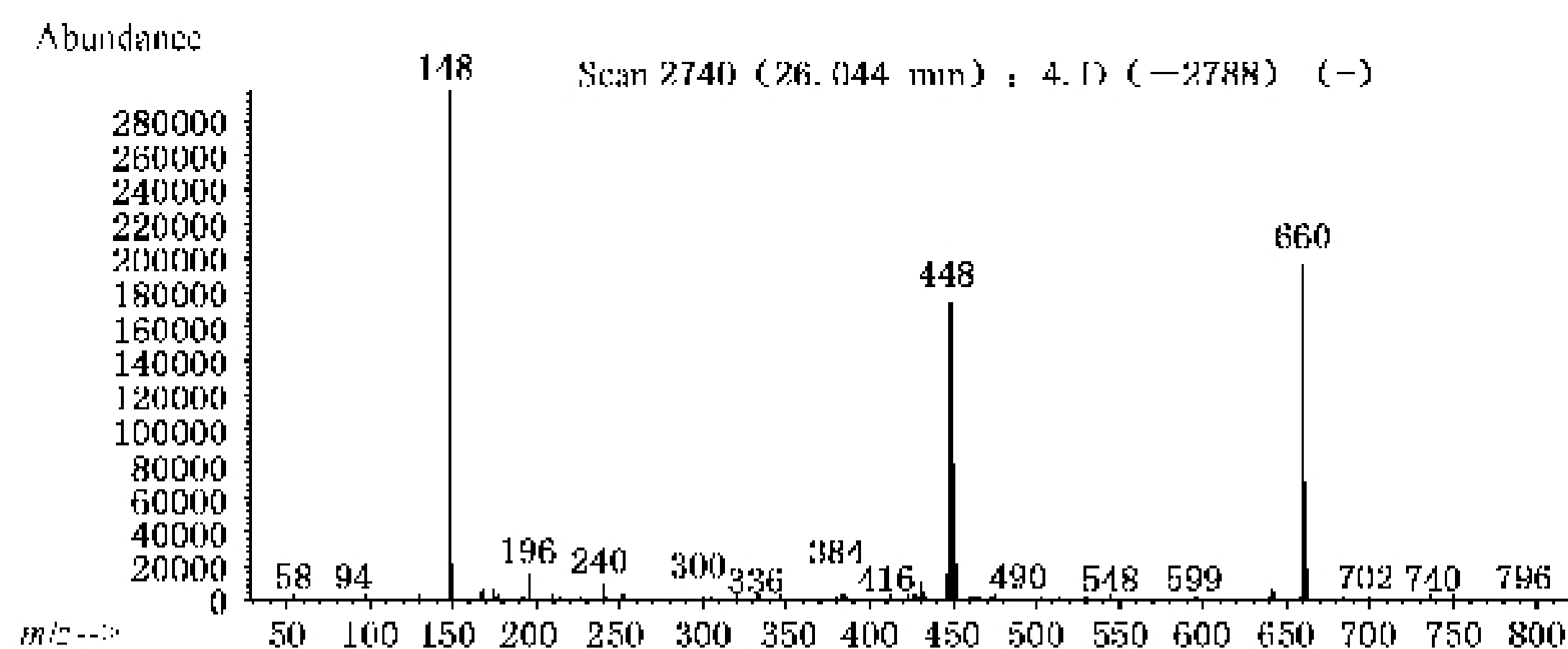


图 A.2 雌二醇标准物质衍生物质谱图

A.3 雌二醇 D4 标准物质衍生物质谱图,见图 A.3。

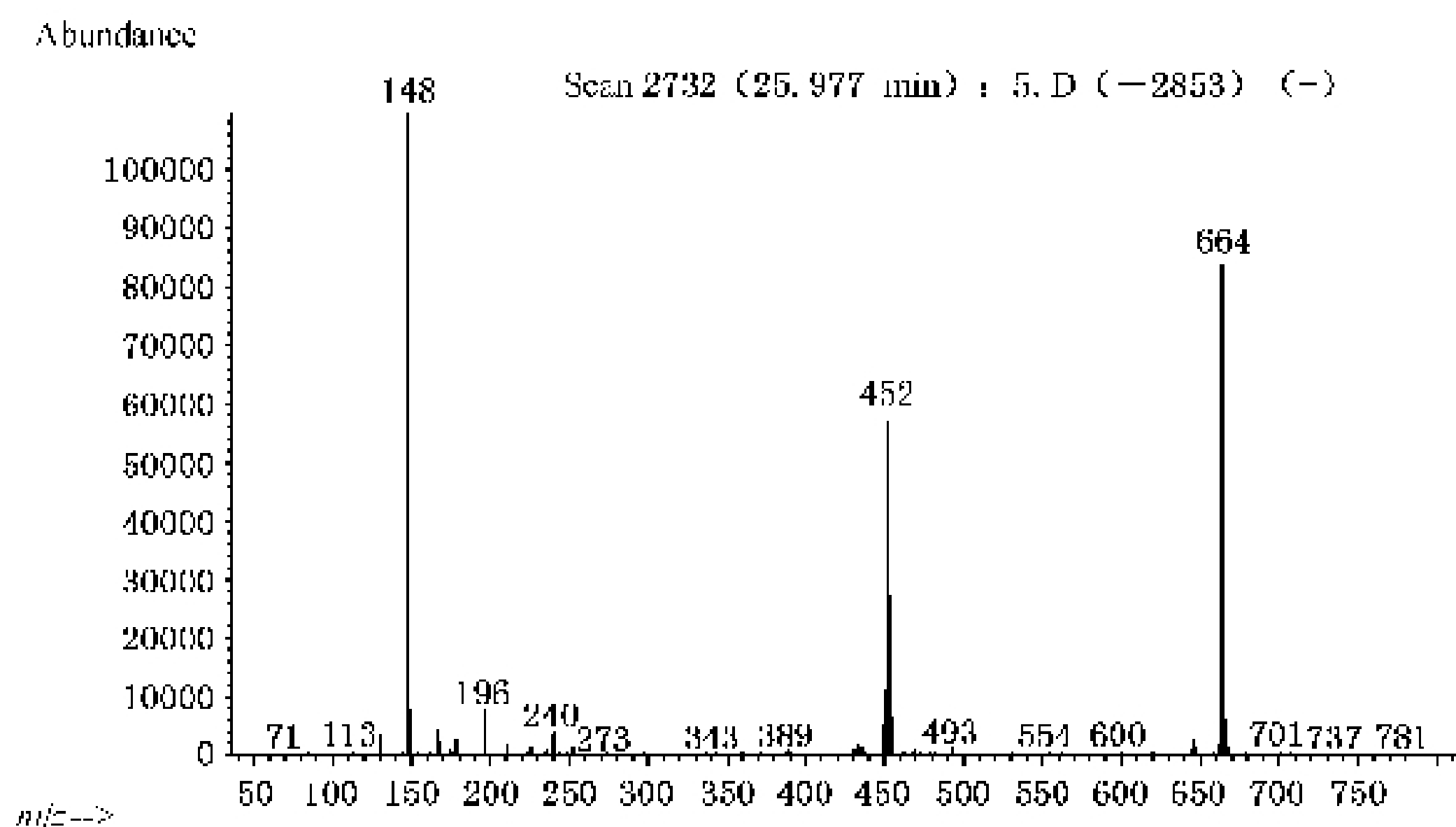


图 A.3 雌二醇 D4 标准物质衍生物质谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中雌二醇添加浓度及其平均回收率的试验数据：

在 $0.25\ \mu\text{g/L}$ 时，回收率为 100.0% ；

在 $0.5\ \mu\text{g/L}$ 时，回收率为 71.7% ；

在 $1.0\ \mu\text{g/L}$ 时，回收率为 100.7% ；

在 $2.0\ \mu\text{g/L}$ 时，回收率为 86.0% 。

