



中华人民共和国国家标准

GB 31658.7—2021

食品安全国家标准

动物性食品中 17β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法

National food safety standard—

Determination of 17β -estradiol, estriol, ethinylestradiol and estrone residues in animal products by gas chromatography-mass spectrometry method

2021-09-16 发布

2022-02-01 实施



中华人民共和国农业农村部

中华人民共和国国家卫生健康委员会 发布

国家市场监督管理总局

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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了牛、羊、猪、鸡肌肉和猪肝脏、肾脏、脂肪中类固醇激素类药物(17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇、雌酮)残留量检测的制样和气相色谱-质谱测定方法。

本文件适用于牛、羊、猪、鸡肌肉和猪肝脏、肾脏、脂肪中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇、雌酮残留量的检测。

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

3 术语与定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇、雌酮,经酶解、提取、净化和衍生,气相色谱-质谱法测定,外标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 5.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 5.1.3 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$)。
- 5.1.4 正己烷(C_6H_{14})。
- 5.1.5 甲苯($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)。
- 5.1.6 氢氧化钠(NaOH)。
- 5.1.7 醋酸钠($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。
- 5.1.8 醋酸铵($\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$)。
- 5.1.9 冰醋酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)。
- 5.1.10 二硫赤藓糖醇($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, DTE)。
- 5.1.11 三甲基碘硅烷($\text{C}_3\text{H}_9\text{ISi}$, TMIS)。
- 5.1.12 葡萄糖醛酸酶/芳香基硫酸酯酶。
- 5.1.13 N-甲基三甲基硅基三氟乙酰氨(MSTFA)。

5.2 标准品

5.2.1 17 β -雌二醇(17 β -Estradiol, $C_{18}H_{24}O_2$, CAS 号:50-28-2):含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.2.2 雌三醇(Estriol, $C_{18}H_{24}O_3$, CAS 号:50-27-1):含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.2.3 炔雌醇(Ethinylestradiol, $C_{20}H_{24}O_2$, CAS 号:57-63-6):含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.2.4 雌酮(Estrone, $C_{18}H_{22}O_2$, CAS 号:200-164-5):含量 $\geq 98.0\%$ 。

5.3 溶液配制

5.3.1 氢氧化钠溶液(1.0 mol/L):取氢氧化钠 40 g,用水溶解并稀释至 1 000 mL。

5.3.2 醋酸钠缓冲液(pH 5.2):取醋酸钠 19.0 g,用水溶解并稀释至 500 mL,用醋酸调节 pH 至 5.2。

5.3.3 醋酸铵溶液(2.0 mol/L):取醋酸铵 46.25 g,用水溶解并稀释至 300 mL。

5.3.4 甲醇水溶液:取 400 mL 甲醇,加水至 1 000 mL。

5.3.5 乙酸乙酯正己烷溶液:取乙酸乙酯 10 mL,加正己烷使溶解并稀释至 100 mL。

5.3.6 衍生化试剂:称取二硫赤藓糖醇 0.01 g,用 N-甲基三甲基硅基三氟乙酰氨 5 mL 溶解,在液面下加入三甲基碘硅烷 10 μ L,混匀,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 放置过夜,避光防潮密封保存。衍生化试剂应无色,如果发生棕色等颜色变化,表明试剂失效。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液(100 μ g/mL):取 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮标准品各约 10 mg,精密称定,分别加甲醇适量使溶解并稀释定容至 100 mL 容量瓶,配成浓度为 100 μ g/mL 的标准储备液。-18 $^{\circ}$ C 以下保存,有效期 6 个月。

5.4.2 混合标准工作液(1 μ g/mL):分别精密量取 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮标准储备液各 1 mL 于 100 mL 容量瓶,用甲醇稀释至刻度,配制成浓度均为 1 μ g/mL 的混合标准工作液。2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存,有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 C_{18} 固相萃取柱:500 mg/3 mL,或相当者。

5.5.2 硅胶固相萃取柱:500 mg/3 mL,或相当者。

6 仪器和设备

6.1 气相色谱-质谱联用仪:配 EI 源。

6.2 分析天平:感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 氮吹仪。

6.4 固相萃取装置。

6.5 移液器:量程 200 μ L~1 000 μ L。

6.6 移液器:量程 20 μ L~100 μ L。

6.7 均质机。

6.8 涡旋混合器。

6.9 离心机:10 000 r/min。

6.10 烘箱。

6.11 pH 计。

6.12 旋转蒸发仪。

6.13 鸡心瓶:100 mL。

7 试料的制备与保存

7.1 试料的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试组织,绞碎,并使均质。

- a) 取均质后的供试样品,作为供试试料;
- b) 取均质后的空白样品,作为空白试料;
- c) 取均质后的空白样品,添加适宜浓度的标准工作液,作为空白添加试料。

7.2 试料的保存

—18℃以下保存,3个月内进行分析检测。

8 测定步骤

8.1 提取

取试样 5 g(准确至±0.02 g),于 50 mL 离心管,加醋酸钠缓冲液 10 mL,均质 1 min,涡旋振荡 2 min,加葡萄糖醛酸酶/芳香基硫酸酯酶 20 μ L,50℃酶解 2 h,加乙酸乙酯 20 mL,涡旋振荡 3 min,10 000 r/min离心 5 min,收集上清液于 100 mL 鸡心瓶中,残渣中加乙酸乙酯 20 mL,重复提取 1 次,合并上清液,40℃水浴旋转蒸发至近干,用氢氧化钠溶液 6 mL 分 3 次溶解洗涤鸡心瓶,洗液转入 50 mL 离心管中,加正己烷 20 mL,涡旋振荡 1 min,10 000 r/min 离心 5 min,收集下层清液,加醋酸铵溶液 1 mL,用冰醋酸调 pH 至 5.0~5.2,备用。

8.2 净化

取 C₁₈固相萃取柱,依次用甲醇、水各 5 mL 活化。取备用液,过柱,分别用水、甲醇水溶液各 5 mL 淋洗,抽干,加甲醇 5 mL,洗脱,收集洗脱液,50℃水浴氮气吹干。加乙酸乙酯正己烷溶液 5 mL 使溶解,备用;取硅胶固相萃取柱,加正己烷 5 mL 活化,取备用液过柱,淋洗,抽干,加乙腈 5 mL,洗脱,收集洗脱液,50℃水浴氮气吹干。

8.3 衍生

加甲苯、衍生化试剂各 100 μ L 于上述氮气吹干的玻璃试管中,振荡混合,封口,于 80℃烘箱中衍生 60 min,冷却,供 GC-MS 测定。

8.4 标准工作曲线制备

精密量取混合标准工作液适量,用甲醇稀释成浓度分别 10 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L、500 μ g/L、1 000 μ g/L 系列标准溶液,各准确量取 500 μ L,50℃水浴氮气吹干,按步骤 7.3 进行衍生,冷却后再各加甲苯 300 μ L 进行 GC-MS 测定。以 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮各浓度为横坐标,相应的定量离子峰面积为纵坐标,绘制标准曲线或求线性回归方程。

8.5 测定

8.5.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱:MS 石英毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μ m),或相当者;
- b) 载气为高纯 He,恒流 1.0 mL/min;
- c) 进样口温度 220℃;
- d) 不分流进样;
- e) 进样体积:1 μ L;
- f) 色谱柱起始温度 100℃,保持 1 min;20℃/min 的升温速率升至 200℃,保持 3 min;20℃/min 的升温速率升至 260℃,保持 5 min;再以 20℃/min 的升温速率升至 280℃,保持 3 min。

8.5.2 质谱参考条件

- a) 离子源(EI)温度:230℃;
- b) EM 电压:高于调谐电压 200 V;
- c) 电子能量:70 eV;
- d) GC/MS 传输线温度:280℃;
- e) 四极杆温度:150℃;
- f) 选择离子监测(SIM):17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和雌酮衍生物的监测离子见表 1。

表 1 待测物衍生物的监测离子

化合物	定性离子	定量离子
17β-雌二醇	232,285,326,416	416
雌三醇	311,345,414,504	504
炔雌醇	285,300,425,440	425
雌酮	231,309,399,414	414

8.5.3 测定法

取试料溶液和标准溶液,作单点或多点校准,以色谱峰面积定量,外标法计算。标准溶液及试料溶液中待测药物的特征离子质量色谱峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的相对离子丰度与标准溶液中的相对离子丰度相比,符合表 2 的要求。标准溶液质谱图见附录 A。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

单位为百分号

相对丰度	>50	20~50	10~20	≤10
允许偏差	±10	±15	±20	±50

8.6 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

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m}$$

(1)

式中:

- X —— 试样中相应的类固醇激素类药物残留量的数值,单位微克每千克(μg/kg);
- C_s —— 标准工作液中相应的类固醇激素类药物含量的数值,单位微克每升(μg/L);
- A —— 试样中相应的类固醇激素类药物的峰面积;
- A_s —— 标准溶液中相应的类固醇激素类药物的峰面积;
- V —— 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)。

10 检测方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法检测限为 0.5 μg/kg,定量限为 1.0 μg/kg。

10.2 准确度

本方法在 1.0 μg/kg~10.0 μg/kg 添加浓度水平的回收率在 60%~110%。

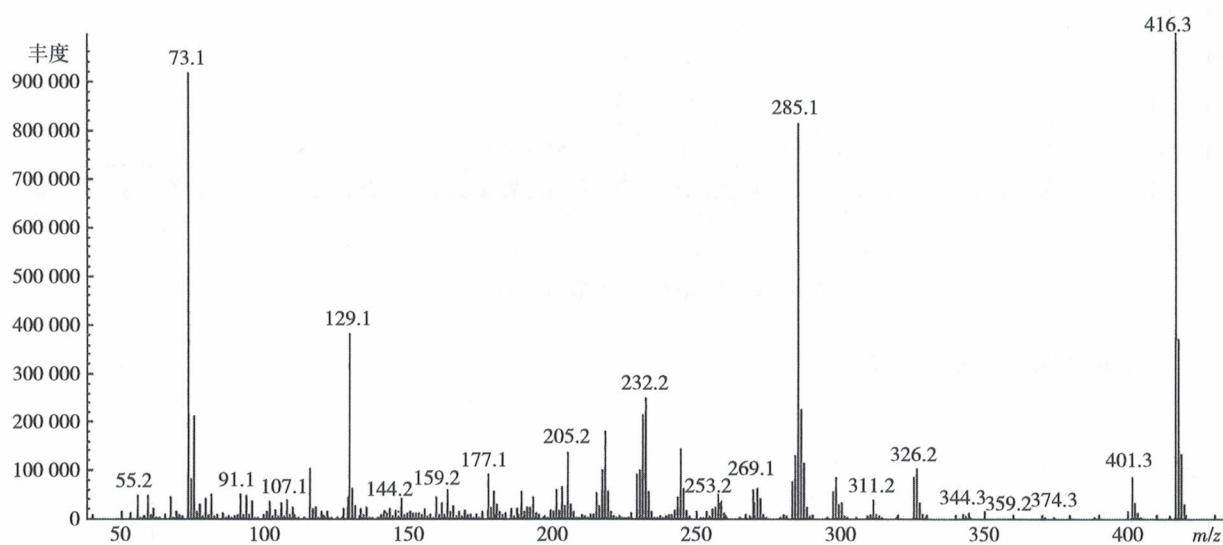
10.3 精密度

本方法的批内变异系数 CV≤15%,批间变异系数 CV≤20%。

附录 A
(资料性)
全扫描质谱图

A.1 17 β -雌二醇衍生物全扫描质谱图

见图 A.1。

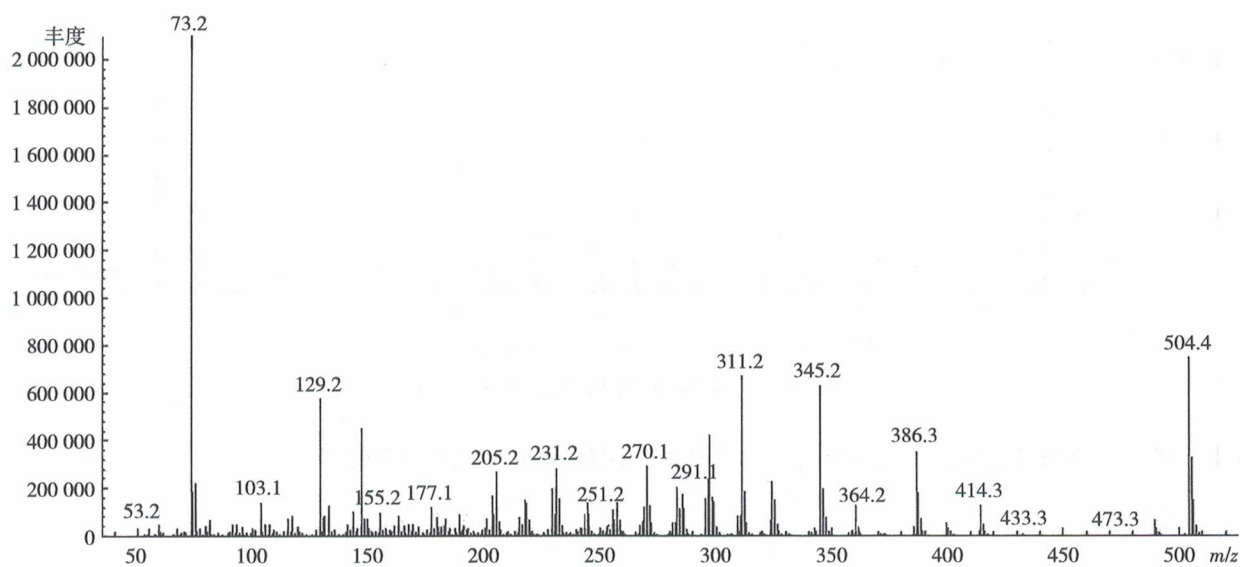


注:特征离子 m/z : 232, 285, 326, 416; 定量离子 m/z : 416。

图 A.1 17 β -雌二醇衍生物全扫描质谱图

A.2 雌三醇衍生物全扫描质谱图

见图 A.2。

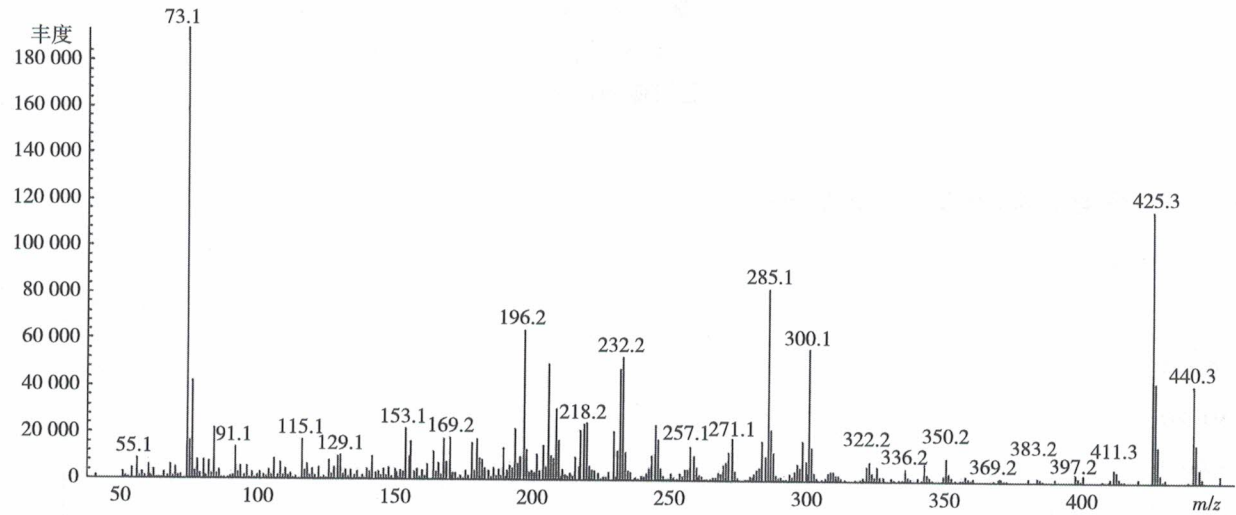


注:特征离子 m/z : 311, 345, 414, 504; 定量离子 m/z : 504。

图 A.2 雌三醇衍生物全扫描质谱图

A.3 炔雌醇衍生物全扫描质谱图

见图 A.3。

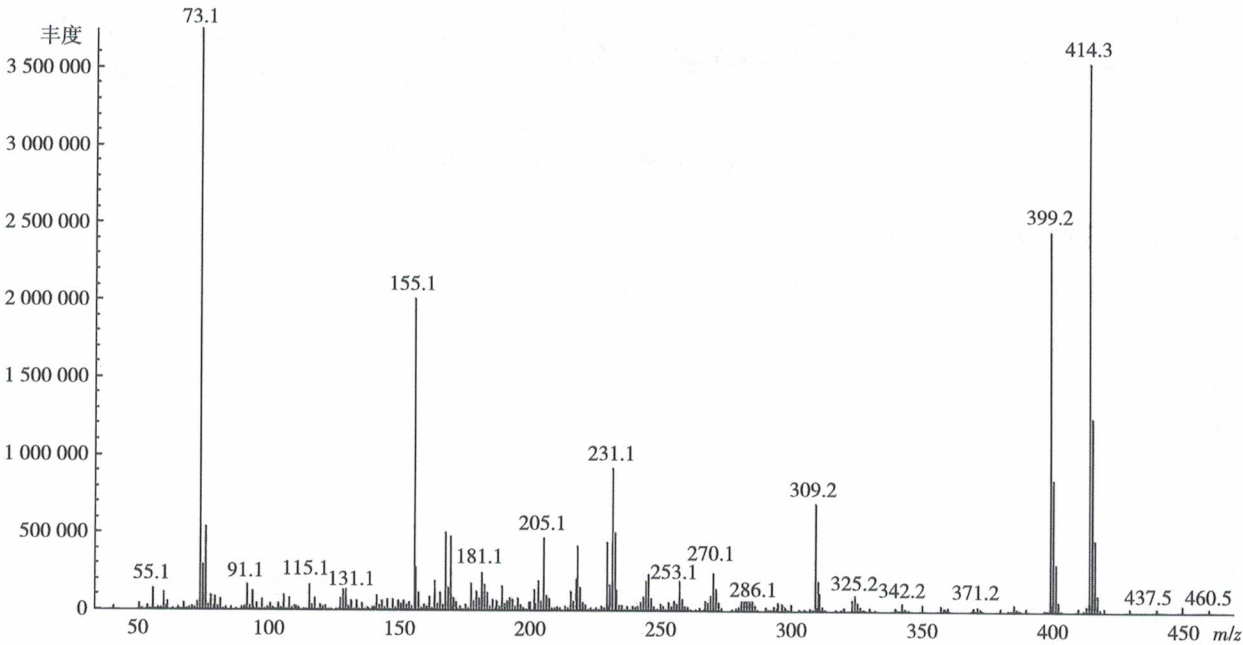


注:特征离子 m/z : 285, 300, 425, 440; 定量离子 m/z : 425。

图 A.3 炔雌醇衍生物全扫描质谱图

A.4 雌酮衍生物全扫描质谱图

见图 A.4。

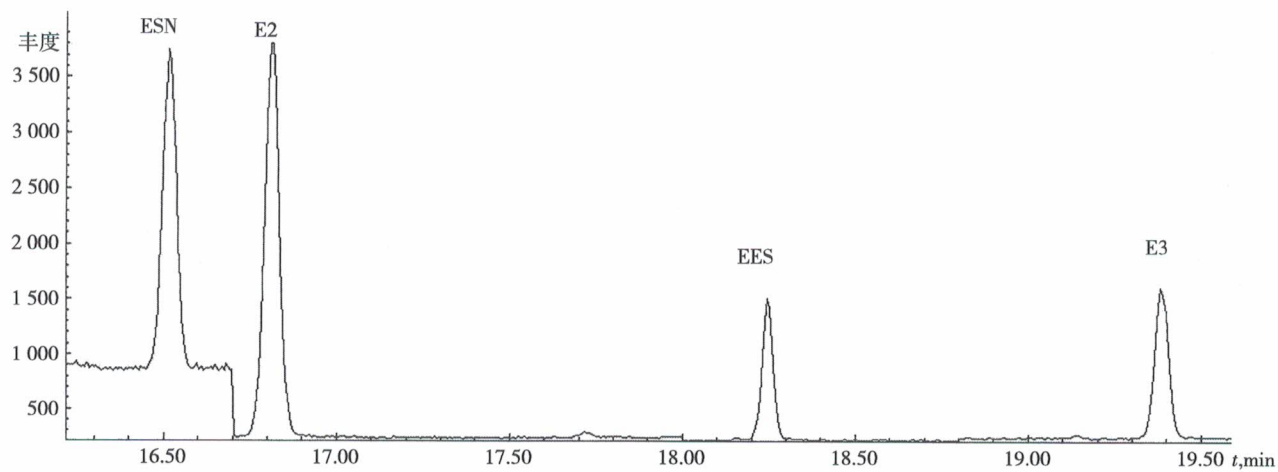


注:特征离子 m/z : 231, 309, 399, 414; 定量离子 m/z : 414。

图 A.4 雌酮衍生物全扫描质谱图

A.5 雌酮、17β-雌二醇衍生物、炔雌醇衍生物和雌三醇衍生物标准溶液色谱图

见图 A.5。



标引序号说明：
ESN——雌酮衍生物；
E2——17 β -雌二醇衍生物；
EES——炔雌醇衍生物；
E3——雌三醇衍生物。

图 A.5 雌酮、17 β -雌二醇衍生物、炔雌醇衍生物和雌三醇衍生物标准溶液色谱图

中华人民共和国
国家标准
食品安全国家标准
动物性食品中 17 β -雌二醇、雌三醇、炔雌醇和
雌酮残留量的测定 气相色谱-质谱法

GB 31658.7—2021

* * *

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

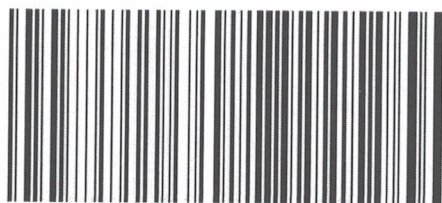
* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

2022 年 1 月第 1 版 2022 年 1 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·8758

定价: 24.00 元



GB 31658.7—2021

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261