



中华人民共和国国家标准

GB 31660.2—2019

食品安全国家标准 水产品中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯 雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌 二醇、雌三醇残留量的测定 气相色谱-质谱法

National food safety standard—

Determination of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A,
diethylstilbestrol, estrone, 17 α -ethinylestradiol, 17 β -estradiol
and estriol residues in fishery products
by gas chromatography mass spectrometry

2019-09-06 发布

2020-04-01 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
国家市场监督管理总局

发布

前 言

本标准系首次发布。

食品安全国家标准

水产品中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇残留量的测定 气相色谱-质谱法

1 范围

本标准规定了水产品中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇残留量检测的制样和气相色谱-质谱测定方法。

本标准适用于鱼、虾、蟹、贝类、海参、鳖等水产品可食组织中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇残留量的检测。

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

3 原理

试样中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇残留经乙酸乙酯提取，凝胶渗透色谱及固相萃取净化，七氟丁酸酐衍生，气相色谱-质谱法测定，外标法定量。

4 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。

4.1 试剂

4.1.1 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）：色谱纯。

4.1.2 丙酮（ CH_3COCH_3 ）：色谱纯。

4.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）：色谱纯。

4.1.4 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

4.1.5 环己烷（ C_6H_{12} ）：色谱纯。

4.1.6 七氟丁酸酐（ $\text{C}_8\text{F}_{14}\text{O}_3$ ）。

4.1.7 碳酸钠（ Na_2CO_3 ）。

4.2 溶液制备

4.2.1 碳酸钠溶液：称取碳酸钠 10 g，用水溶解并稀释至 100 mL，混匀。

4.2.2 50%环己烷乙酸乙酯溶液：环己烷与乙酸乙酯等体积混合。

4.2.3 50%甲醇水溶液：甲醇与水等体积混合。

4.3 标准品

辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇含量均 \geq 98.0%，详见附录 A。

4.4 标准溶液制备

4.4.1 标准贮备液：取辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇标准品各约 10mg，精密称定，于 10 mL 棕色量瓶，用甲醇溶解并稀释至刻度，配成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。-18 $^{\circ}$ C 以下保存，有效期 6 个月。

4.4.2 混合标准工作液：分别精密量取标准储备液适量，用甲醇稀释，配成浓度为：辛基酚 50 μ g/L，壬基酚、双酚 A 30 μ g/L，己烯雌酚 50 μ g/L，雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇 100 μ g/L 的混合标准工作液。2~8 $^{\circ}$ C 避光保存，有效期 1 周。

4.5 材料

4.5.1 聚苯乙烯凝胶填料：Bio-Beads S-X3，200~400 目。

4.5.2 HLB 固相萃取柱：60 mg/3 mL，或相当者。

4.5.3 凝胶净化柱：长 25 cm，内径 2 cm，具活塞玻璃层析柱。将 50%环己烷乙酸乙酯溶液浸泡过夜的聚苯乙烯凝胶填料以湿法装入柱中，柱床高 20 cm。柱床始终保持在 50%环己烷乙酸乙酯溶液中。

5 仪器和设备

5.1 气相色谱质谱联用仪：配 EI 源。

5.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

5.3 均质机。

5.4 离心机：4000 r/min。

5.5 涡旋混合器。

5.6 氮吹仪。

5.7 固相萃取装置。

5.8 聚丙烯离心管：50 mL。

5.9 具塞玻璃离心管：10 mL。

5.10 梨形瓶：100 mL。

6 试料的制备与保存

6.1 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。

——取均质后的供试样品，作为供试试料。

——取均质后的空白样品，作为空白试料。

——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。

6.2 试料的保存

-18℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取

取试料5 g（准确至±20 mg），于50 mL离心管，加碳酸钠溶液3 mL，乙酸乙酯20 mL，漩涡混匀，超声提取10 min，4 000 r/min离心10 min，取上清液至100 mL梨形瓶中。残渣用乙酸乙酯10 mL重复提取一次，合并上清液，于40℃旋转蒸发至干，用50%环己烷乙酸乙酯溶液5 mL溶解残留物，备用。

7.2 净化

7.2.1 凝胶净化

将备用液转至凝胶净化柱上，用50%环己烷乙酸乙酯溶液110 mL淋洗，根据凝胶净化洗脱曲线确定收集淋洗液的体积，40℃旋转蒸干，残渣用甲醇1 mL溶解，加水9 mL稀释，备用。

凝胶净化柱洗脱曲线的绘制：将5 mL混合标准溶液上柱，用50%环己烷乙酸乙酯溶液淋洗，收集淋洗液，每10 mL收集一管，于40℃水浴中氮吹至干。按7.3的方法衍生，气相色谱-质谱法测定，根据淋洗体积与回收率的关系确定需要收集的淋洗液体积。

7.2.2 固相萃取净化

固相萃取柱依次用甲醇5 mL、水5 mL活化，取备用液过柱，控制流速不超过2 mL/min，用50%甲醇水溶液10 mL淋洗，抽干，用甲醇10 mL洗脱，控制流速不超过2 mL/min。收集洗脱液于10 mL具塞玻璃离心管中，于40℃水浴中氮气吹干。

7.3 衍生

于上述具塞玻璃离心管中加入七氟丁酸酐30 μL、丙酮70 μL，盖紧盖，漩涡混合30 s，于30℃恒温箱中衍生30 min，氮气吹干，精密加入正己烷0.5 mL，漩涡混合10 s，溶解残余物，供GC-MS分析。

7.4 标准曲线的制备

取混合标准工作溶液50 μL、100 μL、200 μL、500 μL、1 000 μL于1.5 mL样品反应瓶中，40℃水浴中氮吹至干，按7.3方法衍生，制成辛基酚、己烯雌酚浓度均为5 μg/L、10 μg/L、25

$\mu\text{g/L}$ 、 $50 \mu\text{g/L}$ 、 $100 \mu\text{g/L}$ 的梯度系列，壬基酚、双酚A浓度均为 $3 \mu\text{g/L}$ 、 $6 \mu\text{g/L}$ 、 $15 \mu\text{g/L}$ 、 $30 \mu\text{g/L}$ 、 $60 \mu\text{g/L}$ 的梯度系列，雌酮、 17α -乙炔雌二醇、 17β -雌二醇、雌三醇浓度均为 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $20 \mu\text{g/L}$ 、 $50 \mu\text{g/L}$ 、 $100 \mu\text{g/L}$ 、 $200 \mu\text{g/L}$ 的梯度系列。分别取 $1 \mu\text{L}$ 进样，以定量离子峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线。

7.5 测定

7.5.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱：HP-5ms石英毛细管柱（ $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$ ），或相当者；
- b) 载气：高纯氦气，纯度 $\geq 99.999\%$ ，流速 1.0 mL/min ；
- c) 进样方式：无分流进样；
- d) 进样量： $1 \mu\text{L}$ ；
- e) 进样口温度： 250°C ；
- f) 柱温：初始柱温 120°C ，保持 2 min ，以 15°C/min 升至 250°C ，再以 5°C/min 升至 300°C ，保持 5 min 。

7.5.2 质谱参考条件

- a) 离子源：EI源；
- b) 离子源温度： 230°C ；
- c) 四极杆温度： 150°C ；
- d) 接口温度： 280°C ；
- e) 溶剂延迟： 7 min ；
- f) 选择离子监测（SIM）：辛基酚、壬基酚、双酚A、己烯雌酚、雌酮、 17α -乙炔雌二醇、 17β -雌二醇、雌三醇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
辛基酚	402、345、303、275	303
壬基酚	416、345、303、275	303
双酚A	620、605、331、315	605
己烯雌酚	660、631、341、447	660
17α -乙炔雌二醇	474、459、446、353	474
雌酮	466、409、422、356	466
17β -雌二醇	664、409、451、356	664
雌三醇	449、663、409、356	449

7.5.3 测定法

- a) 定性测定

在同样测试条件下，试样液中待测物的保留时间与标准工作液中待测物的保留时间偏差在±0.10 min以内，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的特征离子均应出现，且检测到的离子的相对丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致。其允许偏差应符合表2要求。

表2 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

相对离子丰度，%	允许偏差，%
>50	±10
20~50	±15
10~20	±20
≤10	±50

b) 定量测定

按7.5.1和7.5.2设定仪器条件，以标准工作溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，作单点或多点校准，按外标法计算试样中药物的残留量，定量离子见表1。标准溶液衍生物的特征离子质量色谱图见附录B。

7.6 空白试验

除不加试料外，均按上述测定步骤进行。

8 结果计算和表述

试料中待测药物残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{C_s \times A \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —试样中被测组分的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C_s —标准溶液中被测组分的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

A —试样溶液中被测组分的峰面积；

A_s —标准溶液中被测组分的峰面积；

V —试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —试料质量，单位为克（ g ）。

计算结果需扣除空白值。测定结果用两次平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限：辛基酚、己烯雌酚分别为 $0.2\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，壬基酚、双酚A分别为 $0.1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，雌酮、 17α -乙炔雌二醇、 17β -雌二醇、雌三醇分别为 $0.3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ；定量限：辛基酚、己烯雌酚分别为 $0.5\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，壬基酚、双酚A分别为 $0.3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ；雌酮、 17α -乙炔雌二醇、 17β -雌二醇、雌三醇分别为 $1.0\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

辛基酚、己烯雌酚在 $0.5\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内，回收率为70%~110%；壬基酚、双酚A在 $0.3\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 6\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内，回收率为70%~110%；雌酮、 17α -乙炔雌二醇、 17β -雌二醇、雌三醇在 $1.0\ \mu\text{g}/\text{kg}\sim 20\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内，回收率为70%~110%。

9.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录A
(资料性附录)

药物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号信息

表 A.1 8 种药物中英文通用名称、化学分子式、CAS 号信息

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
辛基酚	Octylphenol	$C_{14}H_{22}O$	140-66-9
壬基酚	Nonylphenol	$C_{15}H_{24}O$	25154-52-3
双酚 A	Bisphenol A	$C_{15}H_{16}O_2$	80-05-7
己烯雌酚	Diethylstilbestrol	$C_{18}H_{20}O_2$	6898-97-1
雌酮	Estrone	$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7
17 α -乙炔雌二醇	17 α -ethinylestradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	57-63-6
17 β -雌二醇	17 β -estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2
雌三醇	Estriol	$C_{18}H_{24}O_3$	50-27-1

附录 B
(资料性附录)
特征离子质量色谱图

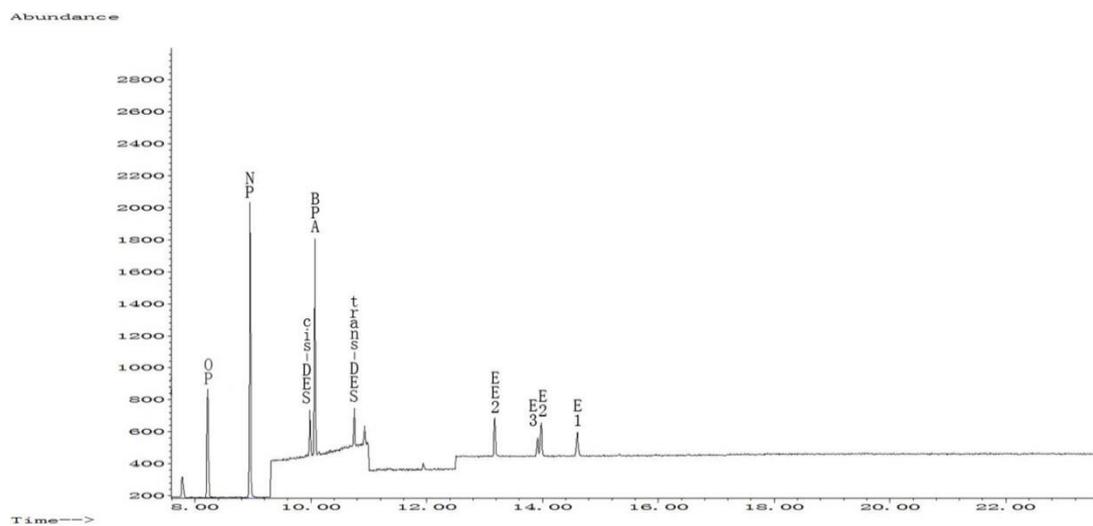


图 B.1 标准溶液衍生物特征离子质量色谱图

(辛基酚、己烯雌酚均为 $10\ \mu\text{g/L}$; 壬基酚、双酚 A 均为 $6\ \mu\text{g/L}$; 17α -乙炔雌二醇、雌三醇、 17β -雌二醇、雌酮均为 $20\ \mu\text{g/L}$)