



# 中华人民共和国国家标准

GB×××××-××××

## 食品安全国家标准 动物性食品中二苯乙烯类药物残留量的 测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standards-  
Determination of stilbenes residues in animal-derived foods by  
liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××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

本文件系首次发布。

征求意见稿

# 食品安全国家标准

## 动物性食品中二苯乙烯类药物残留量的测定

### 液相色谱-串联质谱法

#### 1 范围

本文件规定了猪、牛、羊、鸡组织（肌肉、肝脏、肾脏和脂肪）、鸡蛋、牛奶中己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于猪、牛、羊、鸡组织（肌肉、肝脏、肾脏和脂肪）、鸡蛋、牛奶中己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚残留量的测定。

#### 2 规范性引用文件

下列文件中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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

#### 4 原理

试样中残留的药物经酶解后用乙腈提取(脂肪样品先经乙腈提取，吹干复溶后再酶解)，加入正己烷和乙酸乙酯后进行液-液-液三相体系净化，取中间层氮吹复溶后通过碳酸钠溶液液液萃取和硅胶柱固相萃取进行净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配内标法定量。

#### 5 试剂与材料

以下所用的试剂，除特别说明外均为分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

##### 5.1 试剂

5.1.1 乙腈（ $\text{CH}_3\text{CN}$ ）：色谱纯。

5.1.2 氢氧化钠（ $\text{NaOH}$ ）。

5.1.3 正己烷（ $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ）。

5.1.4 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）。

5.1.5 乙酸铵 ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ )。

5.1.6 乙酸 ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )。

5.1.7 碳酸钠 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )。

5.1.8  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶 ( $\beta$ -glucuronidase/arylsulfatase)： $\beta$ -葡萄糖醛酸酶 4.5U/mL，芳基硫酸酯酶 14U/mL。

## 5.2 溶液的配制

5.2.1 乙酸铵溶液 (0.02 mol/L)：取乙酸铵 1.54 g，加水溶解并稀释至 800 mL 左右，调节 pH 至 5.2，稀释至 1000 mL，混匀。

5.2.2 10%碳酸钠溶液：取碳酸钠 50 g，加水 450 mL 使其完全溶解。

5.2.3 40%乙腈溶液：取乙腈 200 mL，加水定容至 500 mL，混匀。

5.2.4 乙酸乙酯+正己烷 (15: 85)：取 75 mL 乙酸乙酯、正己烷 425 mL，混匀。

5.2.5 乙酸乙酯+正己烷 (30: 70)：取 150 mL 乙酸乙酯、正己烷 350 mL，混匀。

## 5.3 标准品

己烯雌酚、己烷雌酚、己二烯雌酚、己烯雌酚-D<sub>8</sub>、己烷雌酚-D<sub>4</sub> 和己二烯雌酚-D<sub>6</sub>，含量均 $\geq$ 95%，见附录 A。

## 5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液：取二苯乙烯类药物标准品各 10 mg，精密称定，分别于 100 mL 棕色量瓶，用乙腈溶解并稀释至刻度，制成浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$  保存，有效期 12 个月。

5.4.2 同位素内标储备液：取二苯乙烯类药物同位素内标标准品各 1.0 mg，精密称定，分别于 10 mL 棕色量瓶，用乙腈溶解并稀释至刻度，制成浓度均为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$  保存，有效期 12 个月。

5.4.3 混合标准储备液 (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )：分别准确移取己烯雌酚、己烷雌酚和己二烯雌酚标准储备液各 0.5 mL，于 10 mL 棕色量瓶，用乙腈稀释至刻度。-18 $^{\circ}\text{C}$  保存，有效期 12 个月。

5.4.4 混合内标储备液 (5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )：分别准确移取己烯雌酚-D<sub>8</sub>、己烷雌酚-D<sub>4</sub> 和己二烯雌酚-D<sub>6</sub> 标准储备液各 0.5 mL，于 10 mL 棕色量瓶，用乙腈稀释至刻度。-18 $^{\circ}\text{C}$  保存，有效期 12 个月。

5.4.5 混合内标工作液：准确移取混合内标储备液 0.2 mL 于 10 mL 棕色量瓶中，用乙腈稀释至刻度。该溶液中各内标浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。现用现配。

5.4.6 混合标准工作液：准确移取混合标准储备液、混合内标工作液适量，用 40%乙腈溶液稀释成浓度为 1.0、2.0、5.0、20、50 和 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  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 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。现用现配。

## 5.5 材料

5.5.1 硅胶固相萃取小柱：500 mg，3mL，或相当者。

5.5.2 针头式过滤器（通用型滤膜）：尼龙材质，孔径0.22 μm，或性能相当者。

## 6 仪器和设备

6.1 液相色谱串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 氮吹仪。

6.4 恒温振荡器。

6.5 固相萃取装置。

6.6 离心管：聚丙烯塑料离心管，50 mL。

6.7 离心机：6000 r/min 或以上。

6.8 pH 计。

6.9 旋涡混合器。

## 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。

取新鲜或解冻的空白或供试牛奶，混合均匀。

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳后混合均匀。

——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。

### 7.2 试料的保存

-18℃ 以下保存。

## 8 测定步骤

### 8.1 提取

### 8.1.1 肌肉、肝脏、肾脏、鸡蛋、牛奶

取试样5 g（精确至±0.05 g），于50 mL离心管，准确加入混合内标工作液100 μL，混合15s，加乙酸铵溶液10 mL、β-葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶50 μL，涡旋1 min，37℃±1℃振荡酶解12 h。酶解后以6000 r/min离心2 min，收集提取液，然后在残渣中加入乙腈10 mL，涡旋1 min，6000 r/min离心2 min，取乙腈层，残渣再加入乙腈10 mL，重复提取，合并提取液。

### 8.1.2 脂肪

取试样5 g（精确至±0.05 g），准确加入混合内标工作液100 μL，混合15s，加入正己烷15 mL，涡旋1 min，再加入乙腈10 mL后涡旋1 min，6000 r/min离心2 min，取乙腈层，样品中再加入乙腈10 mL，重复萃取，合并乙腈层，50℃氮气吹干，加入乙酸铵溶液10 mL、β-葡萄糖醛酸酶/芳基硫酸酯酶50 μL，涡旋1 min，37℃±1℃振荡酶解12 h，后续操作步骤同8.1.1中酶解后处理步骤。

## 8.2 净化

提取液中加入正己烷8 mL和乙酸乙酯2 mL，涡旋1 min，6000 r/min离心2 min，取中间乙腈层，50℃氮吹至干，用乙酸乙酯10 mL溶解残渣，转移至50 mL离心管，加入10%碳酸钠溶液2 mL，涡旋混合1 min，以6000 r/min离心2 min，弃去下层水相，再加入10%碳酸钠溶液2 mL，重复上述步骤后将乙酸乙酯转移至10 mL试管，50℃氮气吹干。

用乙酸乙酯+正己烷（15：85）溶液2 mL溶解残渣，转移至已依次用正己烷5 mL、乙酸乙酯5 mL活化并抽干处理后的硅胶柱上，待溶液过柱后再用正己烷5 mL淋洗，弃去正己烷淋洗液，抽干柱子，用乙酸乙酯+正己烷（30：70）溶液5 mL洗脱，收集洗脱液，50℃氮气吹干，用40%乙腈溶液1.0 mL溶解残渣，涡旋混匀，0.22 μm滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

## 8.3 基质匹配标准曲线的制备

取空白试样依次按8.1和8.2处理，50℃水浴氮气吹干后分别加入1.0 mL混合系列标准工作溶液（5.4.6），过0.22 μm滤膜，得内标浓度均为10 μg/L的1.0、2.0、5.0、20、50和200 μg/L的系列基质匹配标准工作溶液，供液相色谱-串联质谱测定。以定量离子对峰面积与内标物离子对峰面积的比值为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

## 8.4 测定

### 8.4.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C<sub>18</sub>色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）或相当者；

- b) 流动相: A: 水, B: 乙腈, 梯度洗脱程序见表1;
- c) 流速: 0.3 mL/min;
- d) 柱温: 35 °C;
- e) 进样量: 10  $\mu$ L。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	水 (%)	乙腈 (%)
0	70	30
1.0	70	30
2.5	60	40
4.5	60	40
5.0	10	90
6.0	10	90
6.1	70	30
7.5	70	30

#### 8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源。
- b) 扫描方式: 负离子扫描。
- c) 检测方式: 多反应监测 (MRM)。
- d) 毛细管电压: 2.5 KV。
- e) RF透镜电压: 0.5 V。
- f) 离子源温度: 150 °C。
- g) 脱溶剂气温度: 600 °C。
- h) 锥孔气流速: 50 L/h。
- i) 脱溶剂气流速: 1000 L/h。
- j) 倍增器电压: 650 V。
- k) 二级碰撞气: 氩气。
- l) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量参考值见表2。

表 2 定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

中文名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
己烯雌酚	267.1>237.1	267.1>222.2	40	24
	267.1>222.2			35
己烷雌酚	269.2>134.1	269.1>134.1	34	14
	269.2>119.1			36
己二烯雌酚	265.0>93.0	265.0>93.0	40	26
	265.0>249.1			24
己烯雌酚-D <sub>8</sub>	275.2>228.2	275.2>228.2	40	35
己烷雌酚-D <sub>4</sub>	273.1>136.2	273.1>136.2	34	18
己二烯雌酚-D <sub>6</sub>	271.0>95.0	271.0>95.0	40	24

#### 8.4.3 测定法

取试料溶液和基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，内标法计算。基质匹配标准溶液及试料溶液中目标药物的特征离子质量色谱峰峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。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相对偏差在±2.5%以内，且试料溶液中的离子相对丰度与基质匹配标准溶液中的离子相对丰度相比，符合表3的要求，则可判定为样品中存在对应的待测物质。羊肉添加样品多反应监测色谱图见附录B.1。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/(%)	允许偏差/(%)
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

#### 8.5 空白试验

除不加试料外，均按上述测定步骤进行。

### 9 结果计算和表述

试料中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算：



$$X = \frac{A_i A'_{is} C_s C_{is} V}{A_{is} A_s C'_{is} m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X$ ——试样溶液中二苯乙烯类药的残留量，单位为微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )；

$C_{is}$ ——试样溶液中二苯乙烯类药物内标浓度，单位为微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )；

$C_s$ ——对照溶液中二苯乙烯类药物浓度，单位为微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )；

$C'_{is}$ ——对照溶液中二苯乙烯类药物内标浓度，单位为微克每升 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )；

$A_i$ ——试样溶液中二苯乙烯类药物的峰面积；

$A_{is}$ ——试样溶液中二苯乙烯类药物内标的峰面积；

$A_s$ ——对照溶液中二苯乙烯类药物的峰面积；

$A'_{is}$ ——对照溶液中二苯乙烯类药物内标的峰面积；

$V$ ——定容体积，单位为毫升 (mL)；

$m$ ——试料的质量，单位为克 (g)；

计算结果扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。己烯雌酚结果计算为顺反式两个异构体之和。

## 10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度

### 10.1 灵敏度

本方法在猪、牛、羊、鸡组织（肌肉、肝脏、肾脏和脂肪）、鸡蛋和牛奶中的检测限为  $0.50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为  $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 10.2 准确度

本方法在  $1\sim 50 \mu\text{g}/\text{kg}$  添加浓度水平上的回收率为  $80\%\sim 120\%$ 。

### 10.3 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)

二苯乙烯类药物的英文名称、分子式、CAS号

二苯乙烯类药物的英文名称、分子式和CAS号见表A.1。

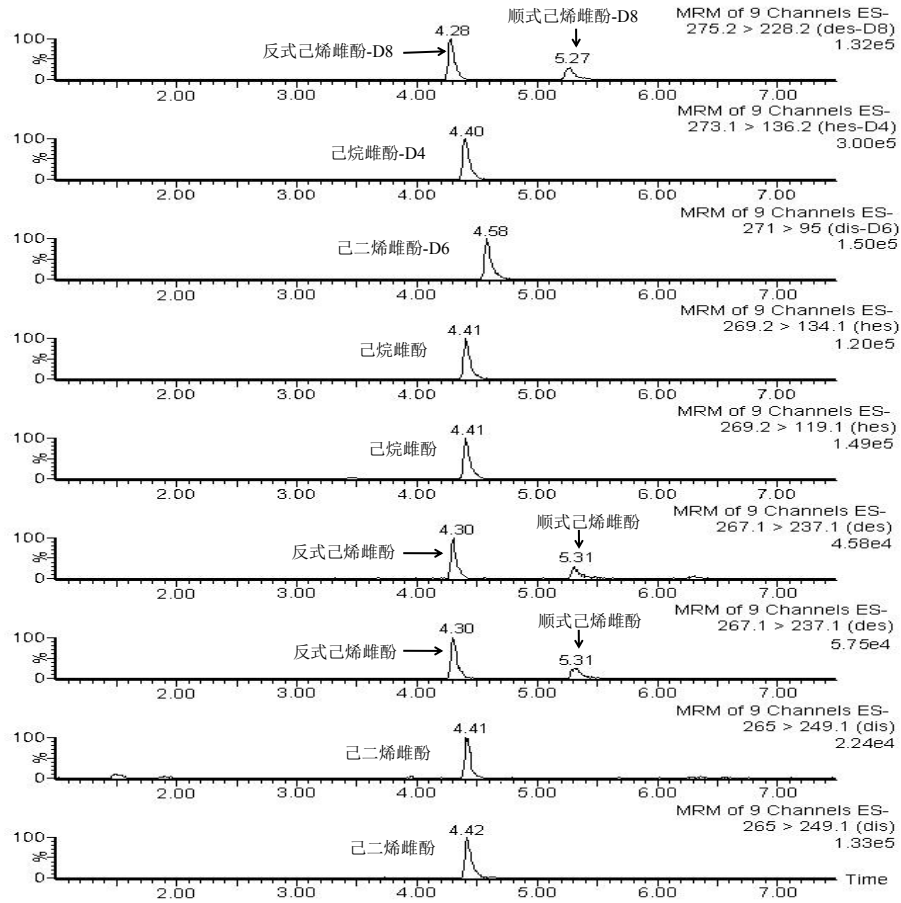
表A.1 二苯乙烯类药物的英文名称、分子式、CAS号

化合物	英文名称	分子式	CAS号
己烯雌酚	diethylstilbestrol	$C_{18}H_{20}O_2$	6898-97-1
己烷雌酚	hexestrol	$C_{18}H_{22}O_2$	84-16-2
己二烯雌酚	dienestrol	$C_{18}H_{18}O_2$	84-17-3
己烯雌酚-D <sub>8</sub>	diethylstilbestrol-d <sub>8</sub>	$C_{18}H_{12}D_8O_2$	91318-10-4
己烷雌酚-D <sub>4</sub>	hexestrol-d <sub>4</sub>	$C_{18}H_{18}D_4O_2$	1189950-25-1
己二烯雌酚-D <sub>6</sub>	dienestrol-d <sub>6</sub>	$C_{18}H_{12}D_6O_2$	91297-99-3

附录 B  
(资料性)

羊肉添加样品液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图

羊肉添加样品液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图见图B.1。



图B.1 羊肉添加样品(添加浓度1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 内标添加浓度2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )液相色谱串联质谱MRM 色谱图