

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 GB 31658.30—2025

1、适用范围

本文件规定了猪、牛、羊、鸡等动物组织(肌肉、肝脏、肾脏和脂肪)和禽蛋、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。(本实验样品采用牛奶、猪脂肪)

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

参考标准：《GB 31658.30—2025 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》

2、溶液的配制

1) 标准储备液(1000 $\mu\text{g/mL}$)：取二苯乙烯类药物各标准品适量(相当于有效成分 1mg)，精密称定，用 1 mL 乙腈溶解，配制成浓度均为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 12 个月。

2) 同位素内标储备液(1000 $\mu\text{g/mL}$)：取二苯乙烯类药物各同位素内标标准品适量(相当于有效成分 1 mg)，精密称定，用 1 mL 乙腈溶解，配制成浓度均为 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 12 个月。

3) 混合标准储备液(10 $\mu\text{g/mL}$)：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 0.01 mL，用乙腈稀释至 1 mL，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 12 个月。

4) 混合内标储备液(10 $\mu\text{g/mL}$)：分别准确移取己烯雌酚-D8 和己二烯雌酚-D6 标准储备液各 0.01 mL，用乙腈稀释至 1 mL，配制成浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 12 个月。

5) 混合标准工作液(1 $\mu\text{g/mL}$)：准确移取混合标准储备液适量，用乙腈溶液稀释成浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液，现用现配。

- 6) 混合内标工作液 (2 $\mu\text{g/mL}$): 准确移取混合内标储备液适量, 用乙腈溶液稀释成浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液, 现用现配。
- 7) 乙酸铵溶液(0.02 mol/L): 称取乙酸铵 1.51 g, 加水约 800 mL 溶解, 用乙酸调节 pH 至 5.2, 加水至 1000 mL, 混匀。
- 8) 10%碳酸钠溶液: 取碳酸钠 50 g, 加水 450 mL 使其完全溶解。
- 9) 40%乙腈溶液: 取乙腈 200 mL, 加水至 500 mL, 混匀。
- 10) 乙酸乙酯+正己烷(15: 85): 取 75 mL 乙酸乙酯、正己烷 425 mL, 混匀。
- 11) 乙酸乙酯+正己烷(70: 30): 取 350 mL 乙酸乙酯、正己烷 150 mL, 混匀。

3、提取

3.1 牛奶

称取试料(5 ± 0.05)g, 于 50 mL 离心管, 准确加入混合内标工作液 20 μL , 混合 15s, 加乙酸铵溶液 10 mL、 β -葡萄糖醛酸酶 50 μL , 涡旋 1min, (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 振荡酶解 12h。酶解后以 9000 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。

3.2 猪脂肪

称取试料(5 ± 0.05)g, 于 50 mL 离心管, 准确加入混合标准工作液 20 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 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 加乙酸铵溶液 10 mL、 β -葡萄糖醛酸酶 50 μL , 涡旋 1 min, (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 振荡酶解 12h。酶解后以 9000 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。

4、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(在做脂肪试料时, 如分层只有 2 层, 可在每个离心管中加入约 2.5g 氯化钠, 再进行涡旋和离心), 50°C 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在 50°C 下氮气吹干。用乙酸乙酯+正己烷(15: 85)溶液 2 mL 溶解残渣, 备用。

SPE: Silica 500 mg/3 ml

活化: 正己烷 5 mL、乙酸乙酯 5 mL, 抽干

上样: 备用液全部过柱, 弃去

淋洗: 正己烷 5 mL 淋洗, 弃去, 抽干

洗脱: 乙酸乙酯+正己烷(30: 70)溶液 5 mL 洗脱, 收集

浓缩与复溶: 收集的洗脱液于 50°C 氮气吹干, 用 40%乙腈溶液 1 mL 溶解残渣, 涡旋混匀, 0.22 μ m 滤膜过滤, 供液相色谱-串联质谱测定。

5、注意事项

加标水平: 5 g 样中加入 20 μ L 1 μ g/mL 混合对照溶液, 因此加标水平为 4 μ g/kg, 最终机度数为 20 ng/mL。

6、色谱条件

6.1 UPLC 条件

色谱柱: Ultimate UHPLC LP-C18, 1.8 μ m, 2.1 $\times$ 100mm

流动相: A: 水; B: 乙腈

柱温: 35°C;

流速: 0.3 mL/min;

进样体积: 5 μ L;

梯度洗脱程序: 见表 1

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%
0.00	70	30
1.00	70	30
2.50	60	40
4.50	60	40
5.00	10	90
6.00	10	90
6.10	70	70
10.00	70	70

6.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）；

扫描方式：负离子扫描；

检测方式：多反应监测（MRM）模式；

离子喷雾电压：-4500 V；离子源温度：500℃；

气帘气（CUR）10 psi；雾化气（GS1）20 psi；辅助气（GS2）10 psi。

其他质谱参数：见表 2

液质仪器型号：AB Sciex TRIPLE QUAD 4500

表 2 多反应监测模式（MRM）参数

化合物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	去簇电压 DP/V	碰撞能 CE/V
己烯雌酚	267.1	237.1*	-26	-40
	267.1	222.2	-26	-44
己烷雌酚	269.2	119.1*	-10	-46
	269.2	134.1	-10	-18
己二烯雌酚	265	93*	-24	-28
	265	249.1	-24	-30
己烯雌酚-D8	275.2	228.2*	-26	-42
己二烯雌酚-D6	271	95*	-40	-28

* 为定量离子。

7、色谱图或者加标回收率结果

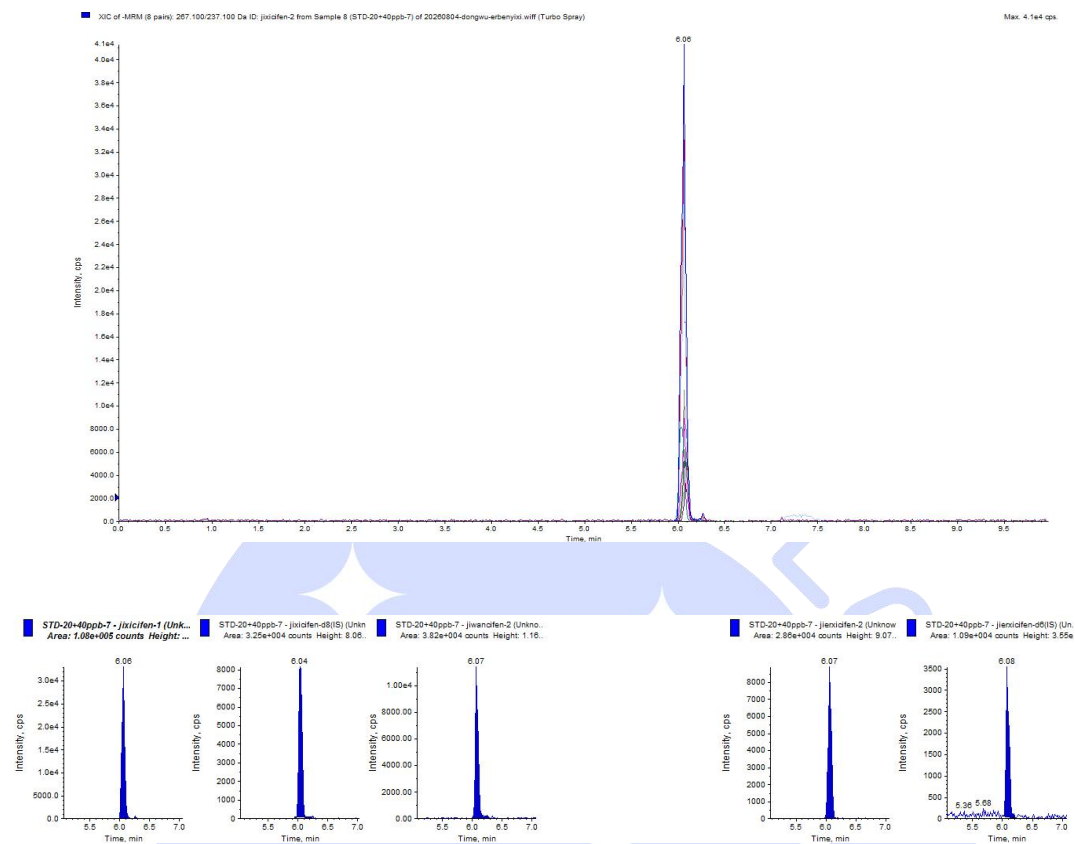


图 1. 对照溶液 20 ng/mL，内标 40 ng/mL 图谱

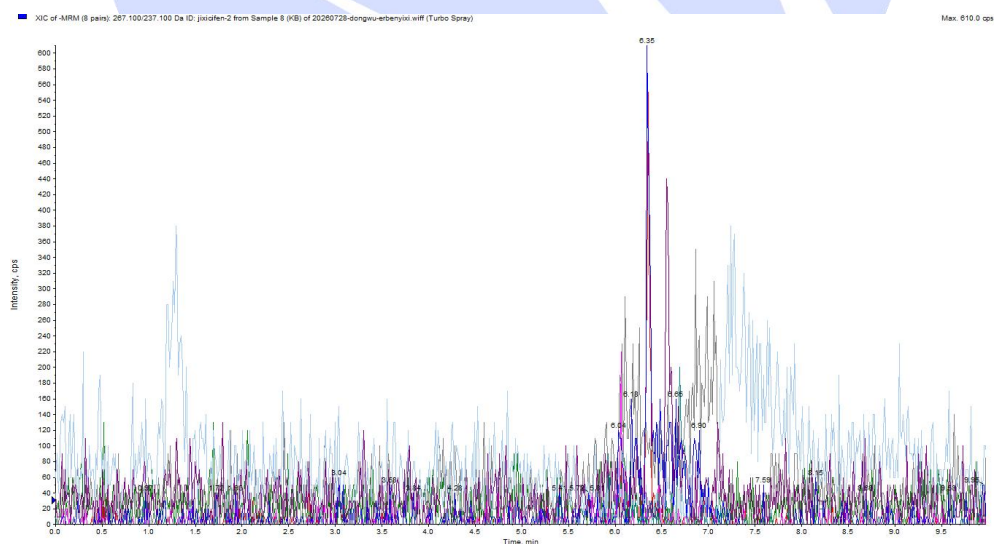


图 2 牛奶样品空白图谱

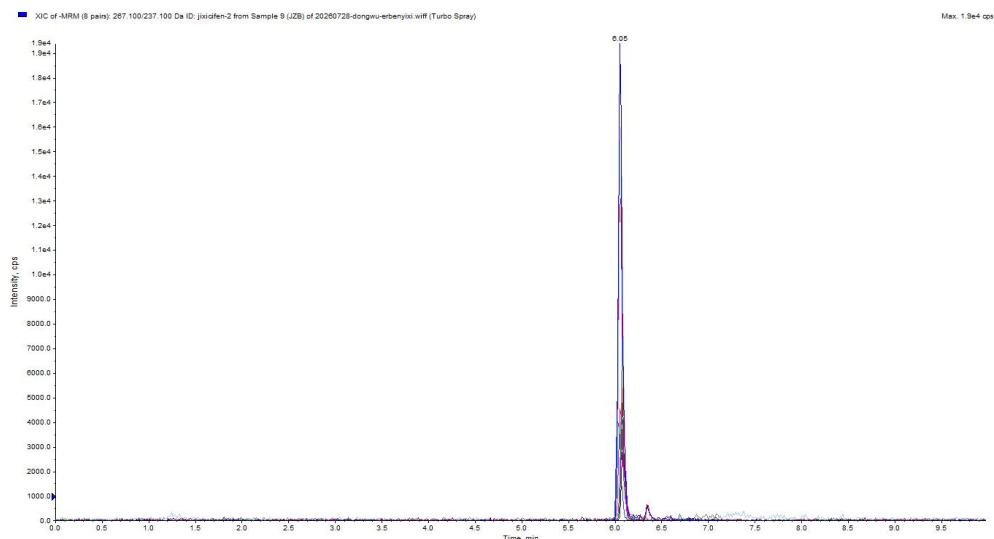


图 3 牛奶样品基质标 $4\text{ }\mu\text{g/kg}$ 图谱

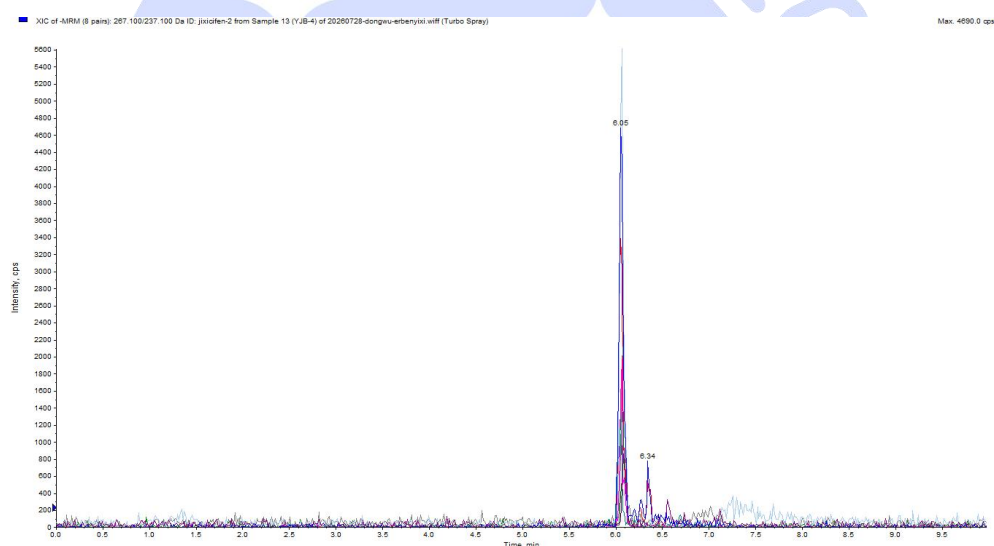


图 4 牛奶样品样加标 $4\text{ }\mu\text{g/kg}$ 图谱

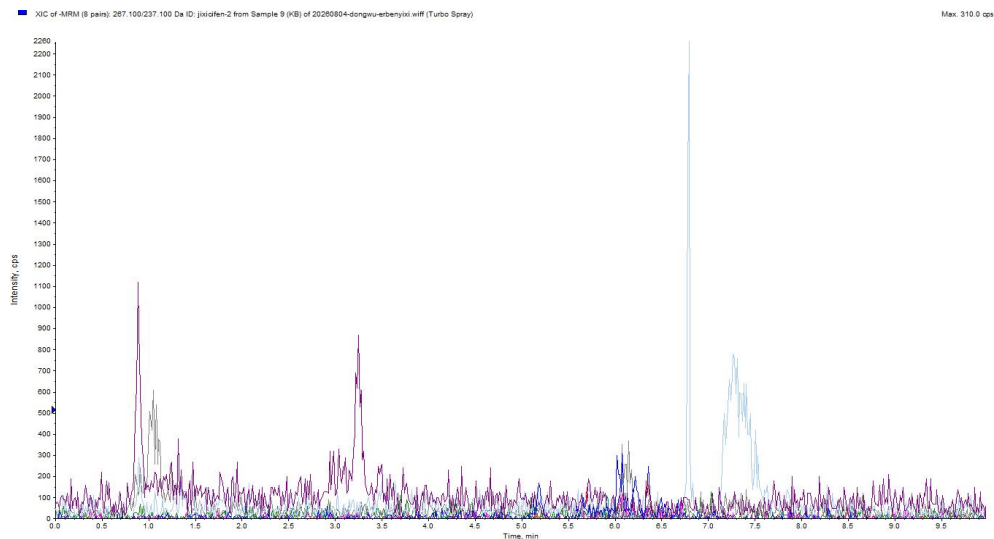


图 5 猪脂肪样品空白图谱

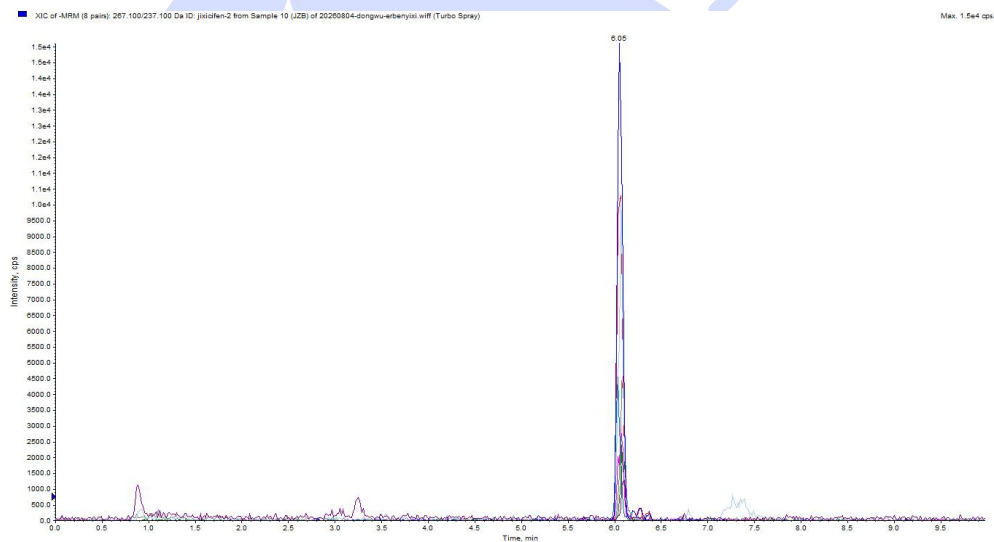


图 6 猪脂肪样品基质标 4 $\mu\text{g/kg}$ 图谱

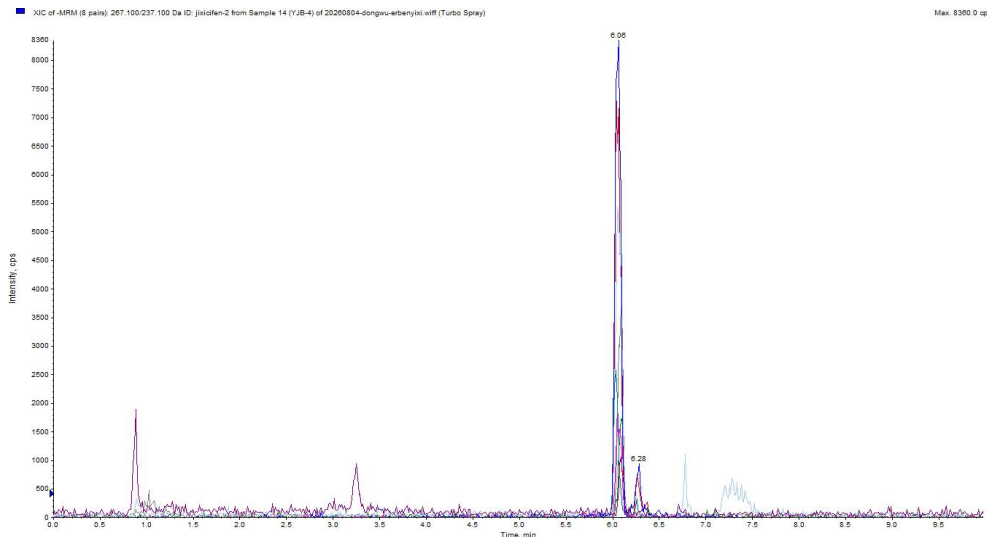


图 7 猪脂肪样品加标 4 $\mu\text{g/kg}$ 图谱

表 3. 加标回收率表（加标水平为 4 $\mu\text{g/kg}$ ）

试料	牛奶		猪脂肪	
物质	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
己烯雌酚	113.76%	4.22%	118.22%	5.53%
己烷雌酚	93.93%	7.32%	111.10%	6.15%
己二烯雌酚	86.09%	3.05%	97.66%	4.61%

8、相关产品信息

货号	名称	规格
DP1618-1	离心管	50mL 尖底离心管，配橙色实心盖，未灭菌，25 个/包
DP1639-1	离心管	15mL 尖底离心管，配橙色实心盖，未灭菌，25 个/包
00821-39191	盖子+垫片	白色特氟龙/红色硅胶隔垫，9mm 蓝色短螺纹开口盖 中心孔 6mm，100/pk

00821-40927	样品瓶	2ml 透明短螺纹广口进样瓶 带书写处 9-425 11.6*32mm 新包装 一级水解玻璃, 100/pk
00500-11005	Welchrom SPE 柱	Silica,500mg/3ml,50/pk
00208-11012	UHPLC 色谱柱	Ultimate UHPLC LP-C18, 1.8 μ m, 2.1 $\times$ 100mm

