



中华人民共和国国家标准

GB/T 22967—2008

牛奶和奶粉中 β -雌二醇残留量的测定 气相色谱-负化学电离质谱法

Determination of β -estradiol residues in milk and milk powder—
Gas chromatography-negative-ion chemical ionization
mass spectrometry method

2008-12-31 发布

2009-05-01 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、附录 B 为资料性附录。

本标准由国家质量监督检验检疫总局提出并归口。

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：王建华、张艺兵、郭翠、王境堂、孙忠松、庞国芳。

牛奶和奶粉中 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

本标准规定了牛奶和奶粉中 β -雌二醇残留量气相色谱-负化学电离质谱测定方法。

本标准适用于牛奶和奶粉中 β -雌二醇残留量的测定。

本标准的方法检出限：牛奶 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，奶粉 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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—2008, ISO 3696:1987, MOD)

3 原理

牛奶和奶粉中雌二醇经过酶水解，用乙腈作为蛋白沉淀剂和提取剂进行提取，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/芳基硫酸苷酶：*Helix pomatia*，每毫升含 β -葡萄糖苷酸酶 100 000 单位，每毫升硫酸酯酶 $\leq 1 000$ 单位。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：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 正丙醇：分析纯。

4.9 衍生化试剂：五氟苯甲酰氯，在避光、防潮环境冷冻储藏。

4.10 碳酸氢钠。

4.11 三水乙酸钠。

4.12 氯化钠。

4.13 0.1%乙酸溶液：移取 0.1 mL 冰乙酸，用水定容 100 mL。

- 4.14 乙酸钠缓冲液(pH=5.2):称取 43 g 三水乙酸钠(4.11)用水溶解,加入 25.2 g 冰乙酸用水定容至 1 000 mL。
- 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(9+1):将 10 mL 吡啶和 90 mL 干燥的乙酸乙酯(4.15)混合,室温保存。
- 4.17 0.5 mol/L 碳酸氢钠(NaHCO₃)溶液:称 5 g NaHCO₃ 于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度。
- 4.18 Oasis HLB 固相萃取柱¹⁾或相当者:60 mg,3 mL。使用前分别依次用 6 mL 甲醇,3 mL 0.1% 乙酸溶液和 3 mL 纯水活化,保持柱体湿润。
- 4.19 标准物质:β-雌二醇,纯度≥99%。
- 4.20 内标标准物质:β-雌二醇-2,4,16,16-4 氘代(β-雌二醇 D4),纯度≥99%。
- 4.21 β-雌二醇标准溶液:准确称量 10 mg 标准物质(4.19)分别于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)定容至刻度,浓度 100 μg/mL,储备液储存于-20℃。再以甲醇稀释成适用浓度的溶液,保存于 4℃ 冰箱中。
- 4.22 内标标准溶液:准确称量 10 mg 内标标准物质(4.20)分别于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2)定容至刻度,浓度 100 μg/mL,储备液储存于-20℃。再以甲醇稀释成适用浓度的溶液,保存于 4℃ 冰箱中。
- 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 内标标准溶液(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~200 μL,200 μL~1 000 μL,1 000 μL~5 000 μL。
- 5.4 分析天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 5.5 冷冻离心机:最低温度-4℃,最大转速 10 000 r/min。
- 5.6 涡旋混匀器。
- 5.7 氮气浓缩仪。
- 5.8 水平振荡器。
- 5.9 旋转蒸发仪。
- 5.10 旋涡振荡器。

6 试样制备与保存

6.1 试样的制备

6.1.1 牛奶:取有代表性试样约 500 g,搅拌均匀后装入洁净容器内,密封,并做好标识。

6.1.2 奶粉:取有代表性试样约 500 g,搅拌均匀后装入洁净容器内,密封,并做好标识。准确称取 12 g 乳粉试样(精确到 0.01 g)于 250 mL 烧杯中,少量多次加入 50 mL 煮沸并冷却到 60℃ 左右的水溶解,冷却至室温后,移入 100 mL 容量瓶中,用少量水分次淋洗烧杯,淋洗液一并移入容量瓶,再用水定容到刻度,混匀,制备成奶粉复原乳试样。

6.2 试样的保存

将试样于 4℃ 保存。

1) Oasis HLB 固相萃取柱是 Waters 公司产品的商品名称,给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不是表示对该产品的认可。如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效产品。

7 测定步骤

7.1 提取

准确移取 2.0 g 牛奶或量取 2.0 mL 奶粉复原乳试样(6.1.2)置于 50 mL 具塞离心管中,加入 5 mL 乙酸钠缓冲溶液(4.14)、约 1 g 氯化钠(4.12),旋涡振荡 1 min 后,加入 10 mL 乙腈(4.3),充分旋涡混合 1 min,于水平振荡器上(5.8)剧烈振荡 2 min,超声提取 10 min,7 000 r/min 于 4 °C 离心 10 min,用吸管将上清液移入另一离心管。残渣中加入 10 mL 乙腈,按上述方法再提取一次,合并上清液。

上清液中加入 10 mL 正己烷(4.5),剧烈振荡 2 min,7 000 r/min 于 4 °C 离心 5 min,吸正己烷,弃去下层溶液转移至梨形瓶,加入 0.5 mL 正丙醇(4.8)于 40 °C 水浴旋转蒸发(约剩余 1 mL 左右不能完全蒸干)。加入 1 mL 乙腈,旋涡振荡 1 min,转移至 10 mL 离心管,再用 1 mL 乙腈清洗瓶一次,溶液转移至上述离心管后,用纯水定容到 10 mL。

7.2 净化

将提取液(7.1)移入下接 Oasis HLB 柱(4.18)的贮液器中,溶液以不大于 1 mL/min 的流速通过 Oasis HLB 柱,待溶液完全流出后,用 3 mL 纯水洗柱,弃去全部淋出液,抽干。最后用 9 mL 乙腈洗脱,收集洗脱液于 10 mL 具塞离心管(5.2)中,用氮气浓缩仪(5.7)吹干。

7.3 衍生化

在上述 10 mL 具塞离心管中依次加入 85 μ L 干燥的乙酸乙酯(4.15),500 μ L 乙酸乙酯-吡啶(4.16),20 μ L 五氟苯甲酰氯(4.9),混匀,于 60 °C 放置 15 min 后,用氮气浓缩仪吹干。加入 500 μ L 0.5 mol/L 碳酸氢钠溶液(4.17),涡旋振荡,待溶液澄清后,准确加入 1 mL 异辛烷,混合提取,静置,取上清液进行测定。

7.4 测定条件

7.4.1 气相色谱-质谱测定参考条件

- a) 色谱柱:HP-5MS,0.25 μ m,30 m \times 0.25 mm(内径)或相当者;
- b) 载气:氮气,纯度 \geq 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 °C 保持 2 min,然后以 15 °C/min 升温至 250 °C,再以 5 °C/min 升温至 300 °C 保持 8 min;
- e) 进样量:1 μ L;
- f) 进样方式:无分流进样;
- g) 进样口温度:300 °C;
- h) 接口温度:280 °C;
- i) 负化学源:150 eV;
- j) 离子源温度:150 °C;
- k) 四极杆温度:106 °C;
- l) 反应气:甲烷,纯度 \geq 99.99%;
- m) 反应气流量:2 mL/min;
- n) 选择离子监测:监测离子、丰度比、允许相对偏差见表 1。

表 1 监测离子、丰度比、允许相对偏差

监测离子(m/z)	丰度比/%	允许相对偏差/%
660	100	—
661	40	\pm 25
448	80	\pm 20
450	44	\pm 25

7.4.2 定性测定的依据

被测样品色谱峰的保留时间与标准工作溶液相一致；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表 1 中所列允许相对偏差。

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，β-雌二醇衍生物参考保留时间约为 26 min。β-雌二醇和内标衍生物总离子流图和质谱图参见附录 A 中的图 A. 1、图 A. 2、图 A. 3。

本方法中牛奶中 β-雌二醇添加浓度及其平均回收率的试验数据参见附录 B。

7.5 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤进行。

8 结果计算

牛奶中 β-雌二醇的测定结果按式(1)计算：

$$X = c_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{c_i}{c_{si}} \times \frac{A_{si}}{A_i} \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X——试样中被测物残留量，单位为微克每千克(μg/kg)；
- c_s ——基质标准工作溶液中被测物的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- A——试样溶液中被测物的色谱峰面积；
- A_s ——基质标准工作溶液中被测物的色谱峰面积；
- c_i ——试样溶液中内标物的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- c_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的浓度，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- A_{si} ——基质标准工作溶液中内标物的色谱峰面积；
- A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积；
- V——样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；
- m——试样溶液所代表试样的质量，单位为克(g)。

计算结果应扣除空白值。

9 精密度

9.1 一般规定

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是以 95% 的可信度来计算。

9.2 重复性

在重复性试验条件下，牛奶中 β-雌二醇的含量在 0.25 μg/kg ~2.0 μg/kg 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：

$$r = 0.239\ 9\ m - 0.013\ 8 \dots\dots\dots(2)$$

式中：

m ——β-雌二醇测定值的浓度，单位为微克每升(μg/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。

9.3 再现性

在再现性试验条件下，牛奶中 β-雌二醇的含量在 0.25 μg/kg~2.0 μg/kg 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:

$$R = 0.2867m + 0.0103 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

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

附录 A
(资料性附录)

β-雌二醇和内标衍生物总离子流图和质谱图

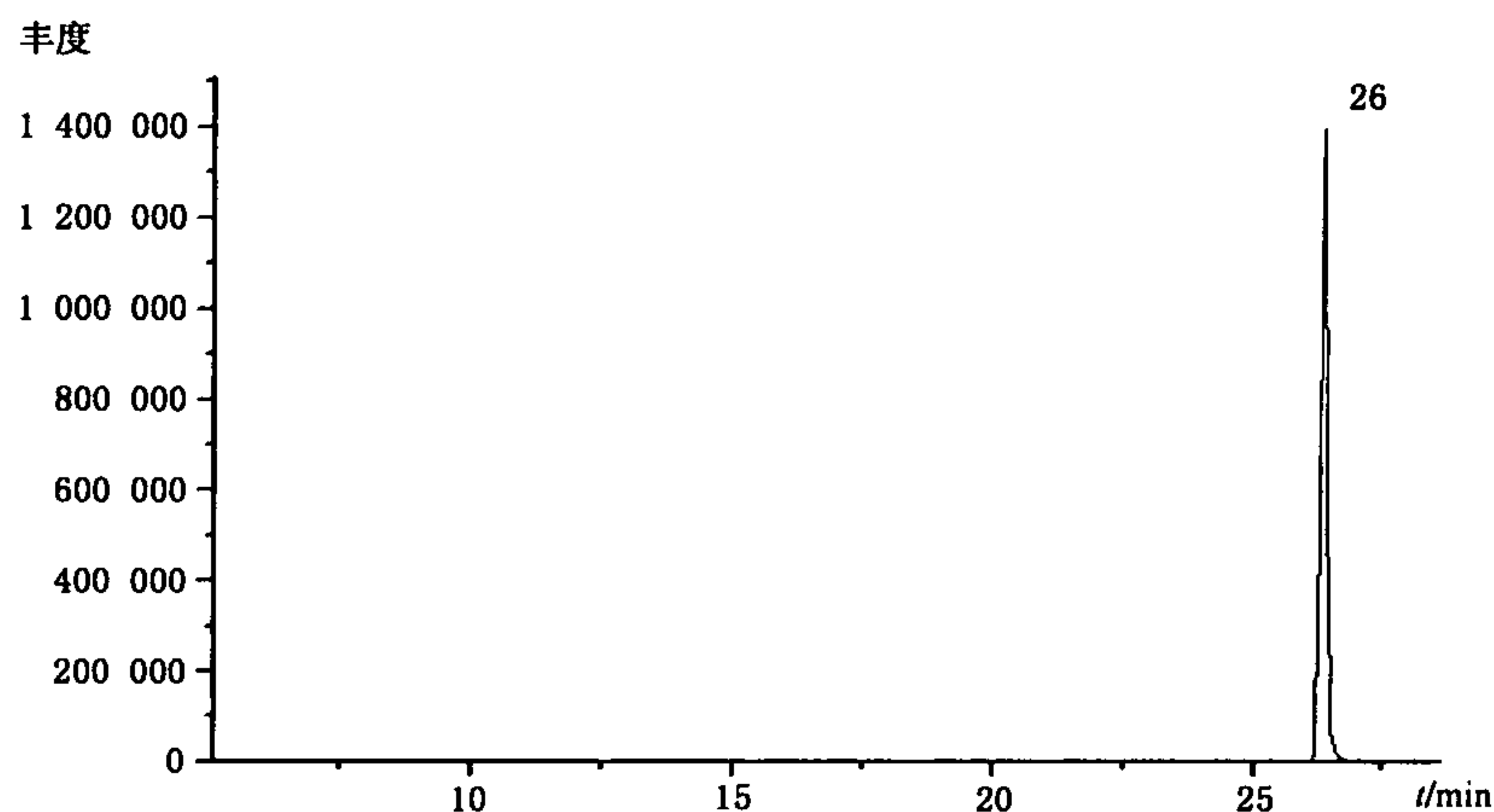


图 A.1 β-雌二醇和内标衍生物总离子流图

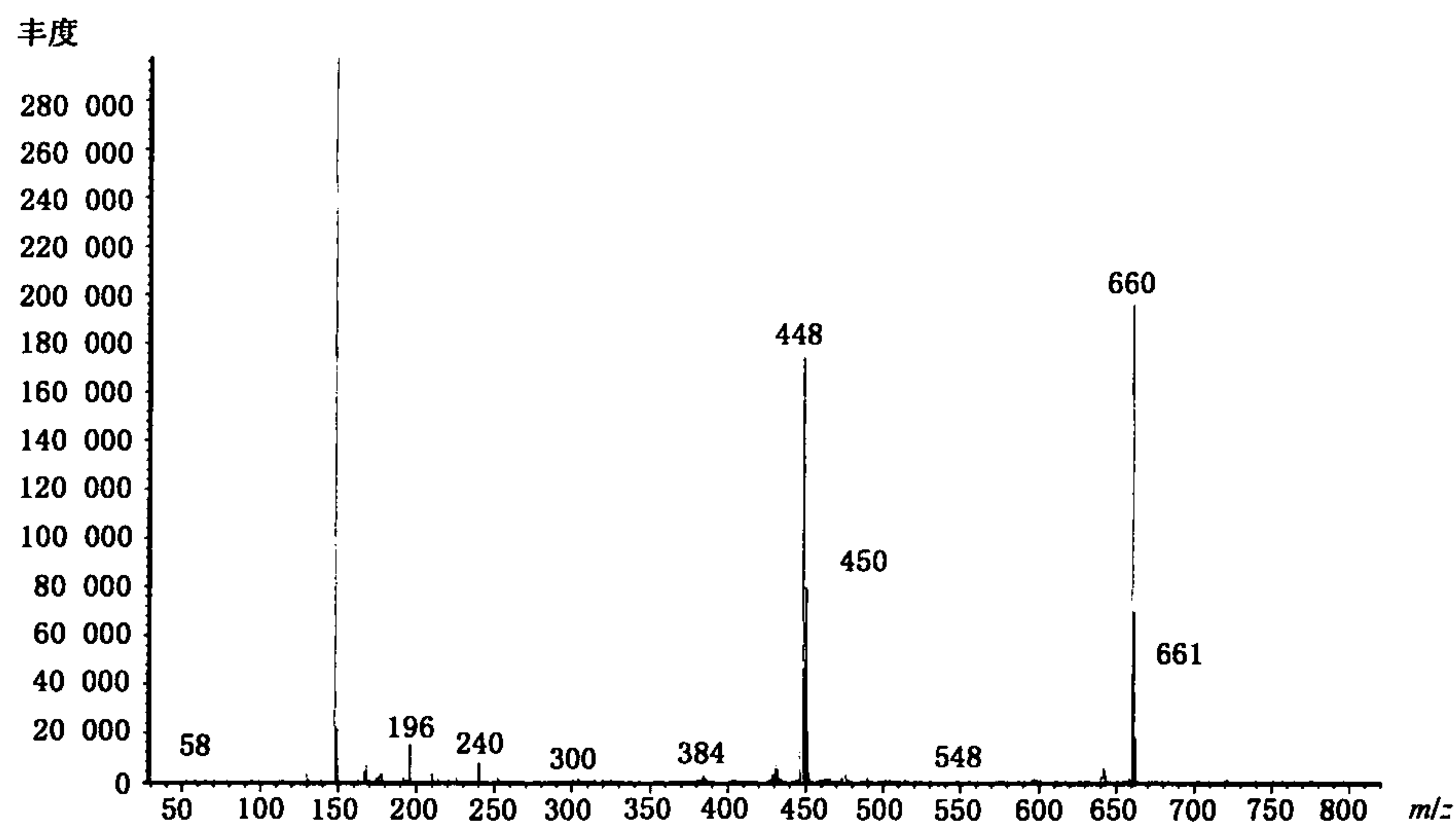


图 A.2 β-雌二醇标准物质衍生物质谱图

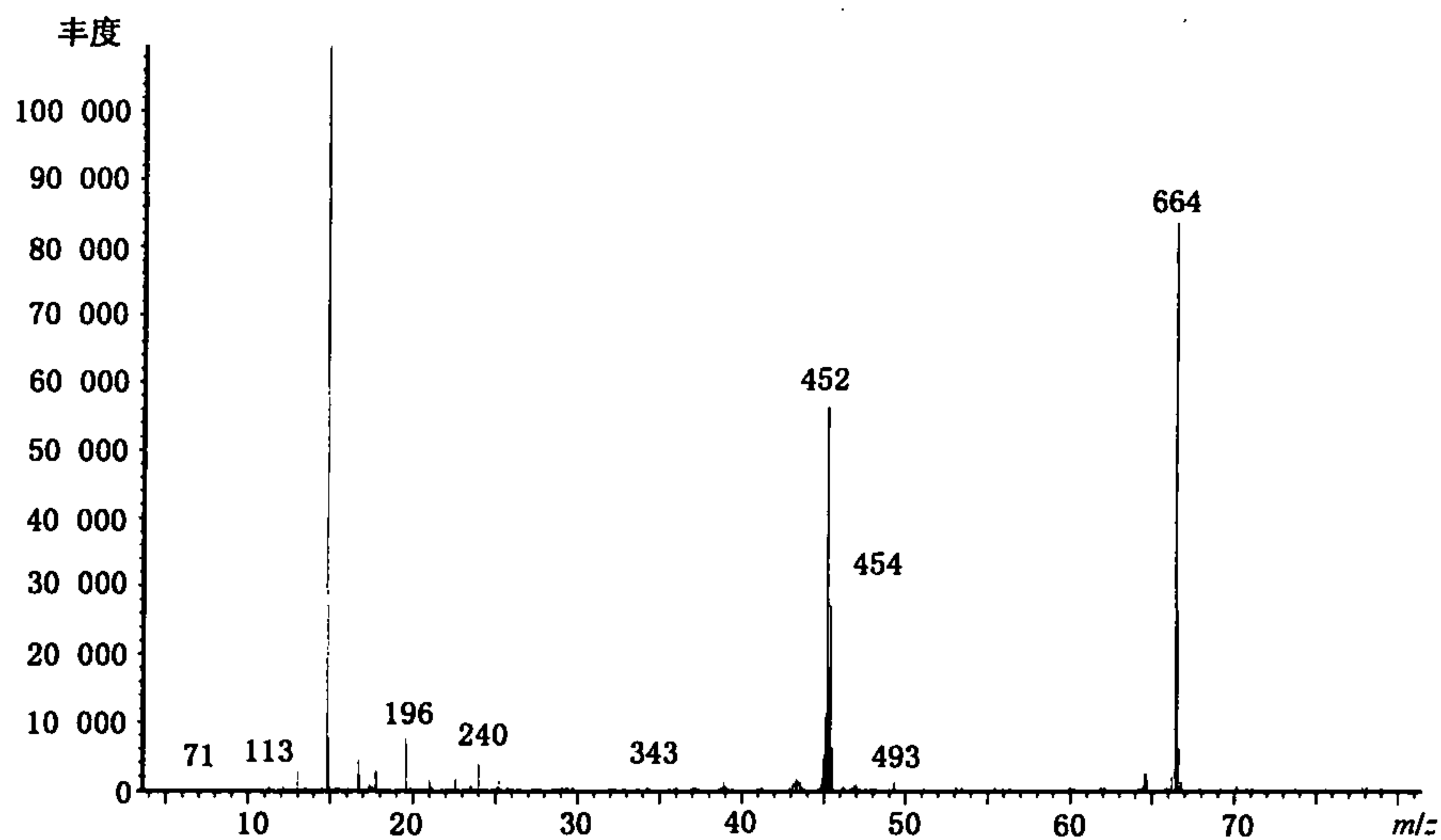


图 A.3 β-雌二醇 D4 标准物质衍生物质谱图

附 录 B
(资料性附录)
回 收 率

本方法中牛奶中 β -雌二醇添加浓度及其平均回收率的试验数据:

在 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 95.3%;

在 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 89.7%;

在 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 84.1%;

在 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,平均回收率为 87.1%。
