



中华人民共和国国家标准

GB/T 21982—2008

动物源食品中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮 残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of residues of zearalanol, β -zearalanol, α -zearalenol, β -zearalenol, zearalanone and zearalenone in foodstuffs of animal origin—
LC-MS/MS method

2008-06-06 发布

2008-07-03 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准附录 A、附录 B 和附录 C 均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局提出。

本标准由中华人民共和国国家认证认可监督管理委员会归口。

本标准由中国检验检疫科学研究院负责起草。

本标准主要起草人：彭涛、于静、严矛、代汉慧、李晓娟、国伟、陈冬东、李建中、李淑娟、唐英章。

动物源食品中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮 残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了动物源食品中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮残留量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于牛肉、猪肉、牛肝、牛奶和鸡蛋中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮残留量的定性确证和定量测定。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

3 方法提要

样品经 β -葡萄糖苷酸/硫酸酯复合酶水解后，采用乙醚提取，经液液分配、HLB固相萃取柱净化后，液相色谱-质谱/质谱检测和确证，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

- 4.1 甲醇:高效液相色谱级。
- 4.2 乙腈:高效液相色谱级。
- 4.3 无水乙醚。
- 4.4 三氯甲烷。
- 4.5 氢氧化钠。
- 4.6 三水合乙酸钠。
- 4.7 磷酸:纯度大于85%。
- 4.8 冰乙酸。
- 4.9 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液:称取20 g 氢氧化钠(4.5)用水溶解并定容至1 L。
- 4.10 0.05 mol/L 乙酸钠缓冲溶液:称取6.8 g 乙酸钠(4.6)用900 mL 水溶解，冰乙酸调pH值至4.8,定容至1 L。
- 4.11 磷酸-水溶液(1+4,体积比):取10 mL 磷酸和40 mL 水混合。
- 4.12 甲醇-水溶液(1+1,体积比):取50 mL 甲醇和50 mL 水混合。
- 4.13 β -葡萄糖苷酸/硫酸酯复合酶:96 000 U/mL β -葡萄糖苷酸酶,390 U/mL 硫酸酯酶(H-2, Form Helix pomatia)。
- 4.14 标准品:玉米赤霉醇(zearalanol, CAS:26538-44-3)、 β -玉米赤霉醇(β -zearalanol, CAS:42422-68-4)、

α -玉米赤霉烯醇(α -zearalenol, CAS:36455-72-8)、 β -玉米赤霉烯醇(β -zearalenol, CAS:71030-11-0)、玉米赤霉酮(zearalanone, CAS:5975-78-0)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, CAS:17924-92-4),纯度均大于等于99%。

4.15 标准储备溶液:分别准确称取适量标准品(精确至0.000 1 g),用乙腈溶解,配制成浓度为100 μ g/mL的标准储备溶液,-18℃以下冷冻避光保存,有效期3个月。

4.16 混合中间标准溶液:准确移取各1 mL标准储备液(4.15)于10 mL容量瓶中,用乙腈定容至刻度,配制成浓度为10 μ g/mL的混合中间标准溶液,0℃~4℃冷藏避光保存,有效期1个月。

4.17 混合标准工作溶液:根据需要用乙腈把混合中间标准溶液(4.16)稀释成适合浓度的混合标准工作溶液,现用现配。

4.18 固相萃取柱:*N*-乙烯吡咯烷酮和二乙烯基苯共聚物填料,Oasis HLB,6 mL,500 mg,或相当者。使用前依次用5 mL甲醇和5 mL水预淋洗。

4.19 微孔滤膜:0.20 μ m,有机相型。

4.20 氮气:纯度大于等于99.999%。

4.21 氩气:纯度大于等于99.999%。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪:配备电喷雾离子源(ESI)。

5.2 组织捣碎机。

5.3 天平:感量为0.000 1 g和0.01 g。

5.4 均质器:10 000 r/min。

5.5 振荡器。

5.6 恒温振荡器。

5.7 离心机:4 000 r/min。

5.8 pH计:测量精度 \pm 0.02 pH单位。

5.9 氮吹仪。

5.10 涡旋混合器。

5.11 旋转蒸发器。

5.12 超声清洗器。

5.13 浓缩瓶:100 mL。

5.14 具塞离心管:50 mL。

5.15 刻度试管:10 mL。

6 试样制备

在制样的操作过程中,应防止样品污染或发生残留物含量的变化。

6.1 肌肉和内脏

从原始样品取出有代表性样品约500 g,用组织捣碎机充分捣碎混匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于-18℃以下冷冻避光保存。

6.2 牛奶

从原始样品取出有代表性样品约500 g,充分混匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于0℃~4℃冷藏避光保存。

6.3 鸡蛋

从原始样品取出有代表性样品约500 g,去壳后用组织捣碎机搅拌充分混匀,均分成两份,分别装入洁净容器作为试样,密封,并标明标记。将试样置于0℃~4℃冷藏避光保存。

7 分析步骤

7.1 水解

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,加入 10 mL 乙酸钠缓冲溶液(4.10)和 0.025 mL β -葡萄糖苷酸/硫酸酯复合酶(4.13),涡旋混匀,于 37℃ 水浴中振荡 12 h。

7.2 提取

水解后加入 15 mL 无水乙醚,振荡提取 5 min 后,以 4 000 r/min 离心 2 min,将上清液转移至浓缩瓶中,再用 15 mL 无水乙醚重复提取一次,合并上清液,40℃ 以下旋转浓缩至近干。加入 1 mL 三氯甲烷溶解残渣,超声波助溶 2 min 后,转入 10 mL 离心管中,再用 3 mL 氢氧化钠溶液(4.9)润洗浓缩瓶后转移至同一离心管中,涡旋混匀,以 4 000 r/min 离心 2 min,吸取上层氢氧化钠溶液。再用 3 mL 氢氧化钠(4.9)重复润洗、萃取一次,合并氢氧化钠萃取液,加入 1 mL 磷酸-水溶液(4.11),混匀后待净化。

7.3 净化

将样品提取液(7.2)转入 HLB 固相萃取柱(4.18)。用 5 mL 水、5 mL 甲醇-水溶液(4.12)淋洗,弃去;再用 10 mL 甲醇进行洗脱,收集洗脱液。整个固相萃取净化过程控制流速不超过 2 mL/min。洗脱液在 40℃ 以下用氮气吹干。残留物用 1.0 mL 乙腈溶解,涡旋混匀后,过 0.2 μ m 微孔滤膜,供仪器检测。

7.4 混合基质标准溶液的制备

称取 5 份 5 g 空白试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞离心管中,分别加入相应体积的混合中间标准溶液(4.16)或混合标准工作溶液(4.17),配制成浓度为 1,5,10,50 和 100 μ g/kg 的混合基质标准溶液,然后按 7.1“加入 10 mL 乙酸钠缓冲溶液……”操作。

8 测定

8.1 液相色谱条件

- 色谱柱:CAPCELLPAK C₁₈, 50 mm×2.0 mm(内径), 2 μ m, 或相当者。
- 柱温:40℃。
- 流速:0.2 mL/min。
- 进样量:5 μ L。
- 流动相及梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/ min	乙腈/ %	水/ %
0	25	75
5	70	30
6	70	30
9	25	75

8.2 质谱条件

参见附录 A。

8.3 液相色谱-质谱/质谱测定

8.3.1 定性测定

按照上述条件测定样品和混合基质标准溶液,如果样品的质量色谱峰保留时间与混合基质标准溶液一致;定性离子对的相对丰度与浓度相当的混合基质标准溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差不得超过表 2 的规定,则可判断样品中存在相应的被测物。

表 2 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

8.3.2 定量测定

按照外标法进行定量计算。按浓度由小到大的顺序,依次分析混合基质标准溶液(7.4),得到浓度与峰面积的工作曲线。样品溶液中分析物的响应值应在工作曲线范围内。在上述液相色谱-质谱/质谱条件下, β -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮的保留时间依次为 3.18,3.25,3.61,3.72,4.32,4.38 min。混合基质标准溶液的液相色谱-质谱/质谱多反应监测(MRM)色谱图参见图 B.1。

9 结果计算

试样中分析物的残留含量,按式(1)或用检测仪器的数据处理机计算:

$$X_i = \frac{c_i \times V}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i ——试样中分析物的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_i ——从混合基质标准曲线上得到的样液中分析物的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——最终样液所代表的试样质量,单位为克(g)。

10 测定低限

本标准的测定低限为 0.001 mg/kg。

11 回收率和精密度

参见表 C.1。

附录 A
(资料性附录)
质谱条件

电离方式:电喷雾电离(ESI-);
毛细管电压:3.0 kV;
源温度:120℃;
去溶剂温度:350℃;
锥孔气流:氮气,流速 100 L/h;
去溶剂气流:氮气,流速 600 L/h;
碰撞气:氩气,碰撞气压 2.60×10^{-4} Pa;
扫描方式:负离子扫描;
检测方式:多反应监测(MRM),多反应监测条件见表 A.1。

表 A.1 多反应监测条件¹⁾

中文名称	英文名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ s	锥孔电压/ V	碰撞能量/ eV	保留时间/ min
β-玉米赤霉醇	β-zearalanol	321.1	277.2 ^a	0.2	40	18	3.18
			303.2	0.2	40	20	
β-玉米赤霉烯醇	β-zearalenol	319.1	275.1 ^a	0.2	40	20	3.25
			301.1	0.2	40	22	
玉米赤霉醇	zearalanol	321.1	277.2 ^a	0.2	40	18	3.61
			303.2	0.2	40	20	
α-玉米赤霉烯醇	α-zearalenol	319.1	275.1 ^a	0.2	40	20	3.72
			301.1	0.2	40	22	
玉米赤霉酮	zearalanone	319.1	275.1 ^a	0.2	40	20	4.32
			301.1	0.2	40	22	
玉米赤霉烯酮	zearalenone	317.1	174.9 ^a	0.2	30	25	4.38
			273.9	0.2	30	20	
^a 用于定量。							

1) 非商业性声明:表 A.1 所列参数是在 Waters Quattro Premier 质谱仪上完成的,此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的仪器。

附录 B
(资料性附录)

混合基质标准样品多反应监测(MRM)色谱图

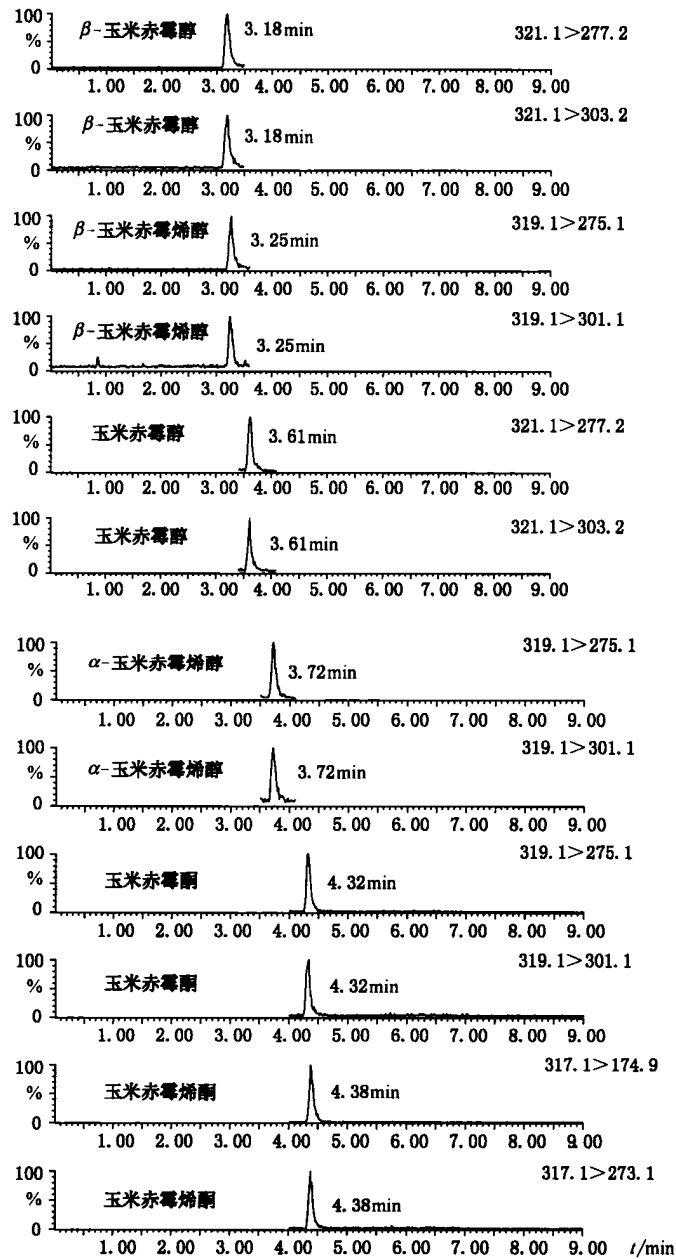


图 B.1 混合基质标准样品多反应监测(MRM)色谱图
(添加浓度为 0.001 mg/kg)

附 录 C
(资料性附录)
添加回收数据

表 C.1 5种动物源食品中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮的添加回收率($n=10$)

食品名称	化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/ %	最大相对标准偏差/ %
牛肝	β -玉米赤霉醇	1	86.0~108.0	9.1
		10	86.3~109.7	8.6
		20	89.4~108.7	5.7
	β -玉米赤霉烯醇	1	91.0~109.0	7.0
		10	86.9~107.7	7.5
		20	89.1~106.8	5.6
	玉米赤霉醇	1	86.0~107.0	5.7
		10	86.3~104.7	7.1
		20	88.9~108.5	7.4
	α -玉米赤霉烯醇	1	84.0~104.0	6.5
		10	83.9~109.6	9.4
		20	83.7~109.1	8.4
	玉米赤霉酮	1	86.0~107.0	7.7
		10	85.2~105.8	8.3
		20	88.7~104.0	4.8
	玉米赤霉烯酮	1	87.0~104.0	6.5
		10	90.8~109.4	6.3
		20	84.0~109.6	8.5
鸡蛋	β -玉米赤霉醇	1	85.0~107.0	8.7
		10	95.7~109.6	4.9
		20	84.8~108.0	8.5
	β -玉米赤霉烯醇	1	86.0~106.0	6.9
		10	86.5~109.7	6.6
		20	87.9~108.9	7.3
	玉米赤霉醇	1	87.0~108.0	8.5
		10	85.4~105.9	6.5
		20	83.8~97.6	6.6

表 C.1 (续)

食品名称	化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/ %	最大相对标准偏差/ %
鸡蛋	α -玉米赤霉烯醇	1	84.0~106.0	7.1
		10	86.7~105.4	6.2
		20	84.0~109.7	8.1
	玉米赤霉酮	1	85.0~108.0	8.6
		10	84.6~109.3	7.2
		20	84.3~108.7	8.1
	玉米赤霉烯酮	1	84.0~110.0	9.7
		10	89.8~106.8	6.3
		20	85.0~109.7	10.7
牛奶	β -玉米赤霉醇	1	89.0~106.0	5.6
		10	89.6~106.0	6.2
		20	87.6~104.8	6.1
	β -玉米赤霉烯醇	1	87.0~108.0	6.9
		10	87.1~103.0	6.4
		20	87.0~104.7	7.4
	玉米赤霉醇	1	90.0~108.0	6.4
		10	92.1~108.5	5.4
		20	88.5~106.1	6.3
	α -玉米赤霉烯醇	1	90.0~110.0	6.5
		10	89.7~106.7	5.6
		20	88.4~104.5	5.3
	玉米赤霉酮	1	89.0~109.0	6.9
		10	92.5~106.1	5.4
		20	87.8~105.5	6.4
	玉米赤霉烯酮	1	89.0~106.0	5.6
		10	87.4~101.2	4.6
		20	90.2~104.3	4.8
猪肉	β -玉米赤霉醇	1	86.0~107.0	7.8
		10	90.4~108.6	5.6
		20	86.5~105.1	6.8
	β -玉米赤霉烯醇	1	89.0~103.0	5.1
		10	87.0~103.3	5.5
		20	86.9~107.3	6.3

表 C.1 (续)

食品名称	化合物	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/ %	最大相对标准偏差/ %
猪肉	玉米赤霉醇	1	87.0~105.0	6.8
		10	88.2~104.4	5.3
		20	90.7~104.5	4.2
	α -玉米赤霉烯醇	1	87.0~109.0	7.1
		10	91.6~109.7	6.0
		20	91.2~98.7	3.4
	玉米赤霉酮	1	90.0~102.0	4.7
		10	89.8~108.0	6.4
		20	89.2~107.6	6.1
	玉米赤霉烯酮	1	86.0~108.0	7.3
		10	88.9~107.2	5.8
		20	92.9~109.2	5.6
牛肉	β -玉米赤霉醇	1	88.0~105.0	5.9
		10	88.6~104.5	4.9
		20	85.8~103.5	5.7
	β -玉米赤霉烯醇	1	89.0~108.0	7.6
		10	88.7~106.5	6.4
		20	89.9~105.1	6.1
	玉米赤霉醇	1	88.0~103.0	4.5
		10	88.3~109.6	7.3
		20	89.2~103.8	6.2
	α -玉米赤霉烯醇	1	91.0~99.0	6.0
		10	86.1~104.6	2.9
		20	91.9~107.0	4.5
	玉米赤霉酮	1	87.0~107.0	3.3
		10	89.3~104.2	2.5
		20	87.3~104.6	4.7
	玉米赤霉烯酮	1	92.0~109.0	3.3
		10	88.4~109.3	2.5
		20	89.3~107.2	5.7