



中华人民共和国国家标准

GB×××××-××××

食品安全国家标准

牛羊奶中玉米赤霉醇及其代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

National food safety standards-

Determination of zearalanol and its metabolites in bovine and
goat milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry
method

(公开征求意见稿)

××××-××-××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

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

征求意见稿

食品安全国家标准

牛羊奶中玉米赤霉醇及其代谢物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了牛奶和羊奶中 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于牛奶和羊奶中 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮残留量的检测，其他乳制品的检测可以参照执行。

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

试样经酶解后，依次加入乙腈、正己烷和乙酸乙酯溶剂进行涡旋提取，离心后取中间层提前液氮吹至近干，乙酸乙酯复溶，复溶液经碳酸钠溶液液液萃取和硅胶固相萃取柱进行净化，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（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.1.2 氢氧化钠（ NaOH ）。

5.1.3 正己烷（ C_6H_{14} ）。

5.1.4 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ）。

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

5.1.6 乙酸 (CH_3COOH)。

5.1.7 碳酸钠 (Na_2CO_3)。

5.1.8 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶 (β -Glucuronidase/aryl sulfatase): β -葡萄糖醛苷酶, 约 30 U/mL, 芳基硫酸酯酶, 约 60 U/mL。

5.2 溶液的配制

5.2.1 乙酸铵溶液 (0.05 mol/L): 取乙酸铵 3.85 g, 加水溶解并用水稀释至 900 mL 左右, 用乙酸调节 pH 至 4.8, 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, 用水稀释至 500 mL, 混匀。

5.2.4 15% 乙酸乙酯正己烷: 取 75 mL 乙酸乙酯, 加入正己烷稀释至 500 mL, 混匀。

5.2.5 50% 乙酸乙酯正己烷: 取 250 mL 乙酸乙酯, 加入正己烷稀释至 500 mL, 混匀。

5.3 标准品

α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮含量均 $\geq 98.5\%$, α -玉米赤霉醇-d5、 β -玉米赤霉醇-d5、玉米赤霉酮-d6 含量均 $\geq 98.0\%$, 具体见附录 A。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备液 (1 mg/mL): 分别精密称取相当于 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮 10 mg 的标准品, 用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 棕色容量瓶中, 配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。-18℃以下避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.2 同位素内标储备液: 分别精密称取相当于 α -玉米赤霉醇-d5、 β -玉米赤霉醇-d5、玉米赤霉酮-d6 各 1 mg 的标准品, 用甲醇溶解并稀释定容于 10 mL 棕色容量瓶中, 配制成浓度为 0.1 mg/mL 的内标标准储备液。-18℃以下避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准中间液 (10 $\mu\text{g/mL}$): 分别准确移取标准储备液各 0.1 mL, 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。-18℃以下避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.4 混合内标中间液 (10 $\mu\text{g/mL}$): 分别准确移取同位素内标储备液各 1.0 mL, 于 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度。-18℃以下避光保存, 有效期 6 个月。

5.4.5 混合标准工作液: 准确移取混合标准中间液 1.0 mL 于 10 mL 棕色量瓶中, 用乙腈稀释至刻度。该溶液中各标准品浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。现用现配。

5.4.6 混合内标工作液: 准确移取混合内标中间液 1.0 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 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 。现用现配。

5.4.7 混合系列标准工作液：准确移取混合标准工作液、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 $\mu\text{g/L}$ 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 50 $\mu\text{g/L}$ 。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 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱串联质谱仪：配电喷雾离子源。

6.2 天平：感量 0.01 g。

6.3 分析天平：感量 0.01 mg。

6.4 氮吹仪。

6.5 恒温振荡器。

6.6 固相萃取装置。

6.7 离心管：聚丙烯塑料离心管，50 mL。

6.8 离心机：6000 r/min 或以上。

6.9 pH 计。

6.10 旋涡混合器。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

取新鲜或解冻的空白或供试牛奶或羊奶，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 试样的保存

-18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试样（ 5 ± 0.05 ）g，于50 mL离心管，准确加入混合内标工作液50 μ L，混合15s，加乙酸铵溶液10 mL、 β -葡萄糖醛苷酶/芳基硫酸酯酶50 μ L，涡旋1 min，37℃振荡酶解16 h，冷却至室温。

8.2 净化

酶解后样品中依次加入乙腈20 mL、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℃水浴氮气吹干。

用15%乙酸乙酯正己烷溶液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固相萃取柱上，待溶液过柱后再用正己烷5 mL淋洗，抽干柱子，用50%乙酸乙酯正己烷溶液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 μ m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7.1和7.2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（4.4.7）溶解残渣，涡旋混匀，过0.22 μ m滤膜，得内标浓度均为50 μ g/L的1.0、2.0、5.0、20、50和200 μ g/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：C₁₈色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μ m）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：40℃；
- e) 进样量：10 μ L。

表1 流动相梯度洗脱条件

时间 (min)	水 (%)	乙腈 (%)
-------------	----------	-----------

0	70	30
0.5	70	30
1.5	50	50
4.0	50	50
4.5	2	98
5.5	2	98
5.6	70	30
7.0	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：3.5 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

化合物	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	锥孔电压(V)	碰撞能量 (eV)
α -玉米赤霉醇	321.2/277.2 321.2/303.2	321.2/277.2	25	24 22
β -玉米赤霉醇	321.2/277.2 321.2/303.2	321.2/277.2	25	24 22
玉米赤霉酮	319.1/205.1 319.1/275.2	319.1/275.2	25	33 20
α -玉米赤霉醇-d5	326.2/282.2	326.2/282.2	25	29
β -玉米赤霉醇-d5	326.2/282.2	326.2/282.2	25	29

玉米赤霉酮-d6	325.2/281.2	325.2/281.2	24	25
----------	-------------	-------------	----	----

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在同样测试条件下，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±1.0%以内，且试料溶液中的相对离子丰度与基质匹配标准溶液中的相对离子丰度相比在±40%以内，则可判定为样品中存在对应的待测物质。

8.4.3.2 定量测定

取基质匹配标准工作溶液与试样溶液交替进样，每种药物选择对应的同位素内标物进行定量。内标法定量试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下，基质匹配标准溶液多反应监测色谱图见附录B.1。对于试料中药物残留量超过仪器测定线性范围的，应对试样溶液采用空白基质溶液稀释后测定。

8.5 空白试验

取空白试样，除不加药物外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试料中玉米赤霉醇及其代谢产物的残留量按标准曲线或式（1）计算：

$$= \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- 试样中玉米赤霉醇及其代谢产物的残留量，单位为微克每千克（μg/kg）；
- 试样溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物内标浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- 标准溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- 标准溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物内标浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- 试样溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物的峰面积；
- 试样溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物内标的峰面积；
- 标准溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物的峰面积；

—标准溶液中玉米赤霉醇及其代谢产物内标的峰面积；

—定容体积，单位为毫升（mL）；

—试样的质量，单位为克（g）；

注：计算结果不小于 $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 的保留3位有效数字， $1\text{ }\mu\text{g/kg}$ 以下保留至小数点后2位。

10 检测方法的灵敏度、正确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法在牛奶和羊奶中的检出限为 $0.25\text{ }\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.50\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 正确度

本方法在 $0.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ ~ $2.5\text{ }\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的回收率为80%~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 $\leq 15\%$ 。

附 录 A
(资料性附录)

玉米赤霉醇及其代谢产物和内标物的分子式、英文名称、CAS号

表A.1 玉米赤霉醇及其代谢产物和内标物的分子式、英文名称、CAS号

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
α -玉米赤霉醇	α -Zearalanol	$C_{18}H_{26}O_5$	26538-44-3
β -玉米赤霉醇	β -Zearalanol	$C_{18}H_{26}O_5$	42422-68-4
玉米赤霉酮	Zearalanone	$C_{18}H_{24}O_5$	5975-78-0
α -玉米赤霉醇-d5	α -Zearalanol-d5	$C_{18}H_{21}D_5O_5$	/
β -玉米赤霉醇-d5	β -Zearalanol-d5	$C_{18}H_{21}D_5O_5$	/
玉米赤霉酮-d6	Zearalanone-d6	$C_{18}H_{18}D_6O_5$	1795020-90-4

附 录 B

(资料性附录)

牛奶基质匹配标准溶液液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图

牛奶基质匹配标准溶液液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图见图B.1。

