

# 中华人民共和国国家标准

农业部 1025 号公告—19—2008

---

## 动物源性食品中玉米赤霉醇类 药物残留检测 液相色谱—串联质谱法

Determination of zearanols residues in animal derived food  
HPLC-MS/MS Method

2008-04-29 发布

2008-04-29 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国农业大学国家兽药残留基准实验室。

本标准主要起草人：沈建忠、丁双阳、肖希龙、张素霞、李晓薇、夏曦、江海洋、李建成、史为民、程林丽。

## 动物源性食品中玉米赤霉醇类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法

### 1 范围

本标准规定了动物源性食品中玉米赤霉醇类药物残留检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于猪、牛、鸡的肌肉、肝脏,牛奶和鸡蛋中 $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮单个或多个混合物残留量的液相色谱-串联质谱检测和确证。

### 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 分析实验室用水规则和试验方法

农牧发[2003]1号 兽药残留试验技术规范(试行)

### 3 制样

#### 3.1 样品的制备

取适量新鲜或解冻的空白或供试动物组织,剪碎,置于组织匀浆机中高速匀浆。

取适量新鲜或解冻的牛奶,混合均匀,6 000 r/min 离心 5 min,取下层。

取适量新鲜的鸡蛋样品,去壳后混合均匀。

#### 3.2 样品的保存

-20℃以下贮存备用。

### 4 测定方法

#### 4.1 方法原理或提要

试料中的玉米赤霉醇类药物经甲醇(或乙腈)提取,正己烷脱脂及氨基固相萃取柱或 MAX 固相萃取柱净化后,用液相色谱-串联质谱检测,色谱保留时间和质谱碎片离子共同定性,外标法定量。

#### 4.2 试剂和材料

以下所用试剂,除特殊注明外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1  $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮标准品 纯度均大于 97%。

4.2.2 甲醇 色谱纯。

4.2.3 正己烷 色谱纯。

4.2.4 乙腈 色谱纯。

4.2.5 乙酸 色谱纯。

4.2.6 乙酸乙酯。

4.2.7 氢氧化钠。

4.2.8 硫酸。

4.2.9 无水硫酸钠。

4.2.10 氨水。

4.2.11 正己烷-乙酸乙酯(60+40, v/v) 准确量取正己烷 60 mL 和乙酸乙酯 40 mL, 混匀。

4.2.12 正己烷-乙酸乙酯(20+80, v/v) 准确量取正己烷 20 mL 和乙酸乙酯 80 mL, 混匀。

4.2.13 正己烷-乙酸乙酯(45+55, v/v) 准确量取正己烷 45 mL 和乙酸乙酯 55 mL, 混匀。

4.2.14 正己烷-乙酸乙酯(10+90, v/v) 准确量取正己烷 10 mL 和乙酸乙酯 90 mL, 混匀。

4.2.15 硫酸溶液 82 mL 水中加 18 mL 浓硫酸, 混匀。

4.2.16 甲醇-氨水-水(5+5+90, v/v/v) 准确量取甲醇 5 mL、氨水 5 mL、水 90 mL, 混匀。

4.2.17 2%甲醇-乙酸乙酯 移取 2 mL 甲醇、量取 98 mL 乙酸乙酯, 混匀。

4.2.18 5%甲醇-乙酸乙酯 移取 5 mL 甲醇、量取 95 mL 乙酸乙酯, 混匀。

4.2.19 2%乙酸乙腈 移取 2 mL 乙酸、量取 98 mL 乙酸乙酯, 混匀。

4.2.20 标准储备液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 精确称取适量的  $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮, 用甲醇分别配成浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存, 有效期 1 年。

4.2.21 混合标准储备液(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 分别准确吸取 1.0 mL 的  $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮标准储备液至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释定容,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存, 有效期 6 个月。

#### 4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱联用仪(带电喷雾离子源)。

4.3.2 涡动仪。

4.3.3 离心机。

4.3.4 天平: 感量为 0.01 g。

4.3.5 分析天平: 感量为 0.000 01 g。

4.3.6 组织匀浆机。

4.3.7 旋转蒸发仪。

4.3.8 氮吹仪。

4.3.9 固相萃取装置。

4.3.10 Sep-Pak 氨基固相萃取柱或相当者, 规格为 500 mg, 3 mL。

4.3.11 Oasis MAX 固相萃取柱或相当者, 规格为 60 mg, 3 mL。

#### 4.4 测定步骤

##### 4.4.1 试料的制备

试料的制备包括:

——取制备后的供试样品, 作为供试试料。

——取制备后的空白样品, 作为空白试料。

——取制备后的空白样品, 添加适宜浓度的标准溶液作为空白添加试料。

##### 4.4.2 提取与净化

###### 4.4.2.1 肌肉组织样品

称取  $5\text{ g} \pm 0.02\text{ g}$  试料于 50 mL 离心管中, 加甲醇 15 mL, 涡动 1 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于另一离心管中。重复提取一次, 合并两次提取液。加正己烷 20 mL, 手摇 20 次, 3 000 r/min 离心

5 min, 弃上层正己烷。再加正己烷 20 mL 重复脱脂一次。下层转至 100 mL 鸡心瓶中, 50℃ 旋蒸至近干, 加乙酸乙酯 5 mL, 涡动 1 min, 静置 10 s, 上清液转移至 50 mL 离心管。鸡心瓶中加入正己烷 10 mL, 涡动 30 s, 静置 10 s, 上清液转移至同一个离心管。再用正己烷 10 mL 洗涤鸡心瓶一次, 合并 3 次残余物溶解液, 备用。

氨基固相萃取柱上加无水硫酸钠 2 g, 用玻璃棒敲匀。依次用乙酸乙酯和正己烷各 5 mL 活化, 取备用液全部过柱, 再依次用正己烷、正己烷-乙酸乙酯(60+40, v/v) 各 5 mL 淋洗。依次用正己烷-乙酸乙酯(20+80, v/v) 和乙酸乙酯各 4 mL 洗脱, 合并两次洗脱液, 50℃ 氮气吹干。

残余物中加乙腈 0.5 mL, 涡动 1 min, 加水 0.5 mL, 混匀, 过 0.2 μm 有机滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

注: 固相萃取上样液流速不超过 1 mL/min。

#### 4.4.2.2 肝脏组织样品

称取 5 g±0.02 g 试料于 50 mL 离心管中, 加甲醇 10 mL, 涡动 1 min, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中。重复提取一次, 合并两次提取液。加正己烷 10 mL, 手摇 20 次, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上层正己烷。下层于 50℃ 氮气下吹干, 加乙酸乙酯 5 mL, 涡动 1 min, 再加正己烷 20 mL, 涡动 30 s, 4 000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。

氨基固相萃取柱上加无水硫酸钠 2 g, 用玻璃棒敲匀。依次用乙酸乙酯和正己烷各 5 mL 活化, 取备用液全部过柱, 再依次用正己烷、正己烷-乙酸乙酯(45+55, v/v) 各 5 mL 淋洗。依次用正己烷-乙酸乙酯(20+80, v/v) 和 2% 甲醇-乙酸乙酯各 5 mL 洗脱, 合并两次洗脱液, 50℃ 氮气吹干。

残余物中加乙腈 0.5 mL, 涡动 1 min, 加水 0.5 mL, 混匀, 加正己烷 2 mL, 涡动 30 s, 9 000 r/min 离心 5 min, 取下层清液, 过 0.2 μm 有机滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

注: 固相萃取上样液流速不超过 1 mL/min。

#### 4.4.2.3 牛奶样品

量取 5.0 mL 试料于 50 mL 离心管中, 加 18% 的硫酸溶液 0.1 mL, 涡匀, 静置 10 min, 加正己烷 10 mL 和乙腈 20 mL, 3 000 r/min 振荡 10 min, 4 000 r/min 离心 10 min, 弃正己烷层。取提取液 12.5 mL 于离心管中, 50℃ 下氮吹至小于 0.1 mL。加水 10 mL, 用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 11.0, 9 000 r/min 离心 5 min, 备用。

MAX 固相萃取柱依次用甲醇、水各 2 mL 活化和平衡, 将备用液过柱, 依次用甲醇-氨水-水(5+5+90, v/v/v) 1 mL 和甲醇 0.5 mL 洗涤, 用 2% 乙酸乙腈 4 mL 洗脱, 收集洗脱液, 50℃ 下氮气吹干。

残余物中加乙腈 0.5 mL, 涡动 1 min, 加水 0.5 mL, 混匀, 过 0.2 μm 有机滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

#### 4.4.2.4 鸡蛋样品

称取 5 g±0.02 g 试料于 50 mL 离心管中, 加乙腈 10 mL, 涡动 1 min, 9 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于另一离心管中。重复提取一次, 合并两次提取液。取 12.5 mL 于离心管中, 50℃ 下氮吹至小于 0.1 mL。加水 10 mL, 用 5 mol/L NaOH 调节 pH 至 11.0, 9 000 r/min 离心 5 min, 备用。

MAX 固相萃取柱依次用甲醇、水各 2 mL 活化和平衡, 将备用液过柱, 依次用甲醇-氨水-水(5+5+90, v/v/v) 1 mL 和甲醇 0.5 mL 洗涤, 用 2% 乙酸乙腈 4 mL 洗脱, 收集洗脱液, 50℃ 下氮气吹干。

残余物中加乙腈 0.5 mL, 涡动 1 min, 加水 0.5 mL, 混匀, 过 0.2 μm 有机滤膜, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

#### 4.4.3 空白添加标准曲线的制备

分别精密量取 6 种玉米赤霉醇类药物混合标准贮备液适量, 添加到 5 g(mL) 空白试料中, 制得浓度在 0 μg/kg(L)~100 μg/kg(L) 范围内的 5~7 个不同添加浓度的试料, 按 4.4.2 步骤操作, 供液相色谱-串联质谱仪测定。

#### 4.4.4 测定

## 4.4.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱: XBridge C<sub>8</sub> (2.1×150 mm, 粒径 5 μm), 或相当者;  
 流动相: A 相: 0.02% 乙酸乙腈溶液; B 相: 0.02% 乙酸水溶液;  
 流速: 0.2 ml/min;  
 柱温: 室温;  
 进样体积: 20 μL;  
 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

| 时间(min) | A 相(%) | B 相(%) |
|---------|--------|--------|
| 0       | 15     | 85     |
| 8       | 90     | 10     |
| 13      | 90     | 10     |
| 14      | 15     | 85     |
| 20      | 15     | 85     |

## 4.4.4.2 质谱参考条件

离子源: 电喷雾离子源;  
 扫描方式: 负离子扫描;  
 检测方式: 多反应监测;  
 电离电压: 3.0 kV;  
 离子源温度: 80℃;  
 雾化温度: 300℃;  
 雾化气流速: 450 L/h;  
 反吹气流速: 25 L/h;  
 Q1, Q3 均为单位分辨率;  
 药物保留时间、定性定量离子对、锥孔电压和碰撞能量见表 2。

表 2 玉米赤霉醇类药物的定性离子对、定量离子对、锥孔电压和碰撞能量

| 药物名称     | 保留时间<br>(min) | 定性离子对<br>(m/z) | 定量离子对<br>(m/z) | 锥孔电压<br>(V) | 碰撞能量<br>(eV) |
|----------|---------------|----------------|----------------|-------------|--------------|
| α-玉米赤霉醇  | 11.18         | 321>277        | 321>277        | 40          | 20           |
|          |               | 321>303        |                | 40          | 23           |
| β-玉米赤霉醇  | 10.65         | 321>277        | 321>277        | 40          | 20           |
|          |               | 321>303        |                | 40          | 23           |
| α-玉米赤霉烯醇 | 11.30         | 319>275        | 319>275        | 40          | 20           |
|          |               | 319>301        |                | 40          | 22           |
| β-玉米赤霉烯醇 | 10.76         | 319>275        | 319>275        | 40          | 20           |
|          |               | 319>301        |                | 40          | 22           |
| 玉米赤霉酮    | 12.27         | 319>275        | 319>275        | 40          | 20           |
|          |               | 319>205        |                | 40          | 20           |
| 玉米赤霉烯酮   | 12.36         | 317>273        | 317>273        | 40          | 18           |
|          |               | 317>175        |                | 40          | 18           |

## 4.4.4.3 测定法

取试料溶液和空白添加标准溶液, 作单点或多点校准, 外标法计算试料中药物的残留量。试料溶液

及空白添加标准溶液中  $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮的峰面积均应在仪器检测的线性范围之内。试料溶液中的离子相对丰度与空白加标准溶液中的离子相对丰度比符合表 3 的要求。空白添加标准溶液的质量色谱图和玉米赤霉醇类药物子离子的质谱图见附录 A 中的图 A.1~图 A.5。

表 3 试料溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

| 相对丰度(%) | 允许偏差(%) |
|---------|---------|
| >50     | ±20     |
| >20~50  | ±25     |
| >10~20  | ±30     |
| ≤10     | ±50     |

#### 4.4.5 空白试验

取空白试料,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

#### 4.5 结果计算和表述

试样中玉米赤霉醇类药物的残留量按式(1)或式(2)计算:

单点校准:

$$X = \frac{X_s A m_s}{A_s m} \dots\dots\dots (1)$$

或空白添加标准曲线校准:由  $A_s = aX_s + b$ ,

求得  $a$  和  $b$ , 则

$$X = \frac{X_s A m_s}{A_s m} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

$X$ ——供试试料中玉米赤霉醇类药物残留量,  $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ ;

$X_s$ ——空白添加试料中相应玉米赤霉醇类药物的浓度,  $\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ ;

$A$ ——供试试料溶液中相应玉米赤霉醇类药物的峰面积;

$A_s$ ——空白添加试料溶液中相应的玉米赤霉醇类药物的峰面积;

$m_s$ ——空白添加试料质量或体积,  $\text{g}(\text{mL})$ ;

$m$ ——供试试料质量或体积,  $\text{g}(\text{mL})$ 。

### 5 检测方法灵敏度、准确度和精密度

#### 5.1 灵敏度

猪、牛、鸡的肌肉、牛奶、鸡蛋中  $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮的检测限为  $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ , 定量限为  $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$ 。

猪、牛、鸡的肝脏中  $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮的检测限为  $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ , 定量限为  $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

#### 5.2 准确度

本方法在猪、牛、鸡的肌肉、牛奶、鸡蛋中, 在  $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L}) \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$  添加浓度范围内回收率水平为  $60\% \sim 120\%$ 。

本方法在猪、牛、鸡的肝脏中, 在  $2.0 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  添加浓度范围内回收率水平为  $60\% \sim 120\%$ 。

#### 5.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差  $\leq 20\%$ , 批间相对标准偏差  $\leq 20\%$ 。

附录 A  
(资料性附录)

玉米赤霉醇类药物特征离子质量色谱图和质谱图

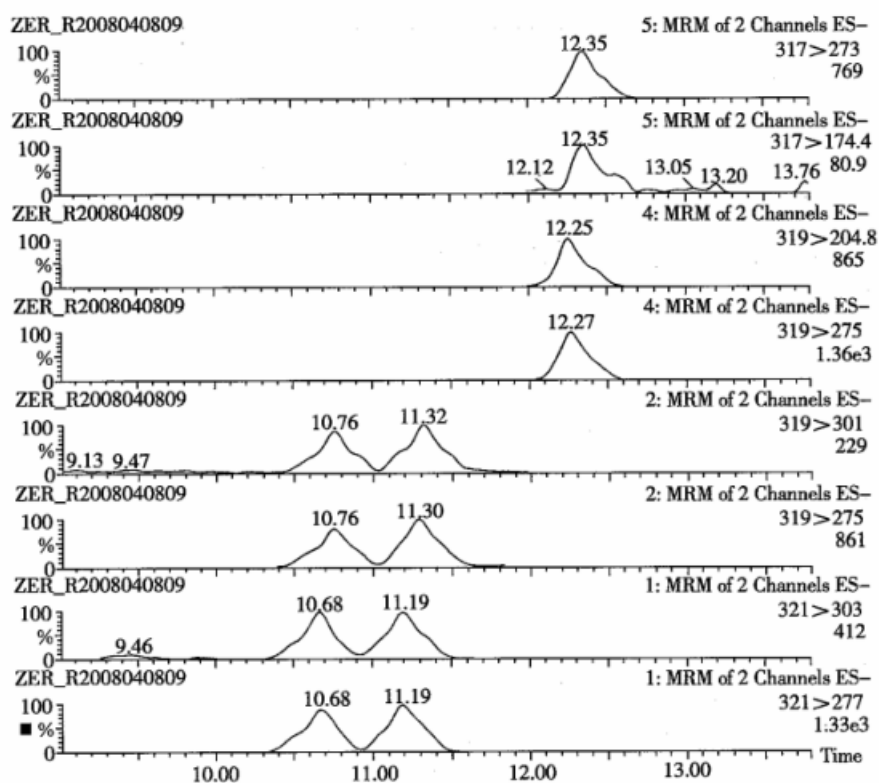


图 A.1 牛肌肉中玉米赤霉醇类药物的基质添加标准溶液特征离子质量色谱图

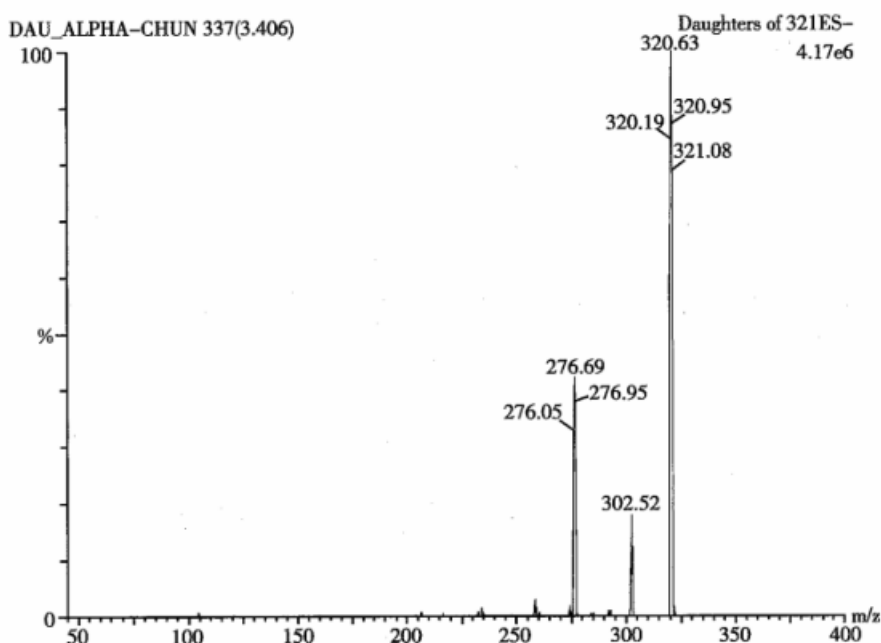


图 A.2  $\beta$ -玉米赤霉醇与 $\alpha$ -玉米赤霉醇子离子质谱图

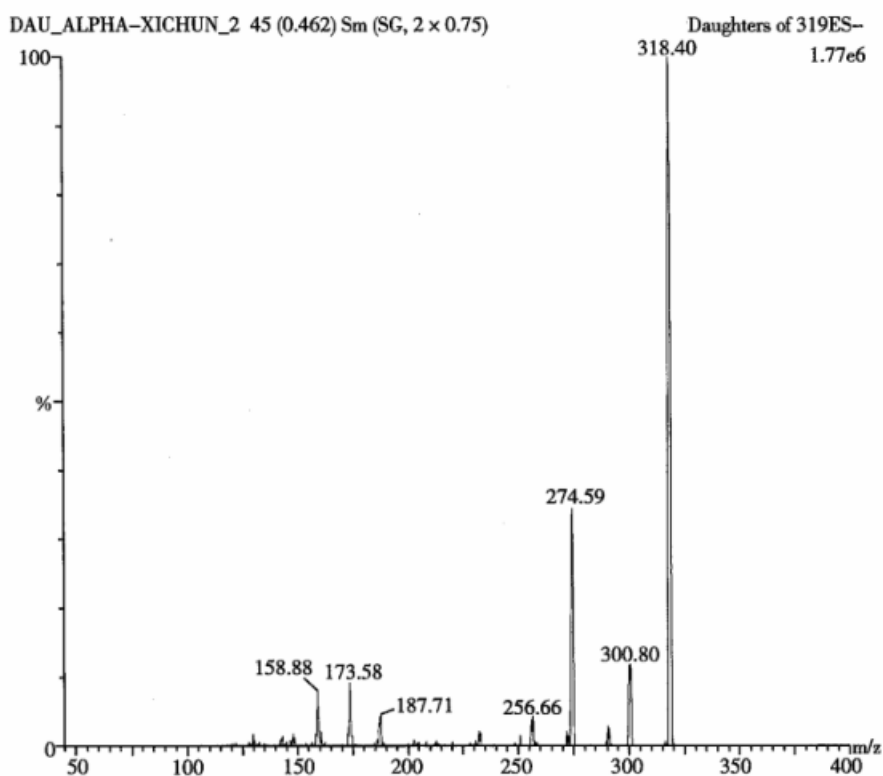


图 A.3  $\beta$ -玉米赤霉烯醇与 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇子离子扫描质谱图

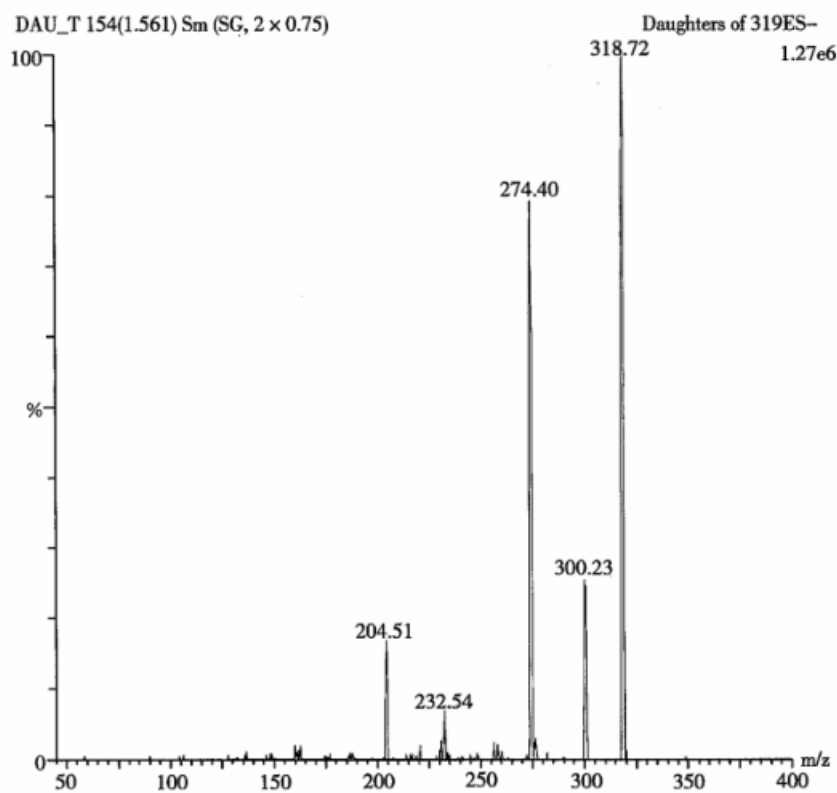


图 A.4 玉米赤霉酮子离子扫描质谱图

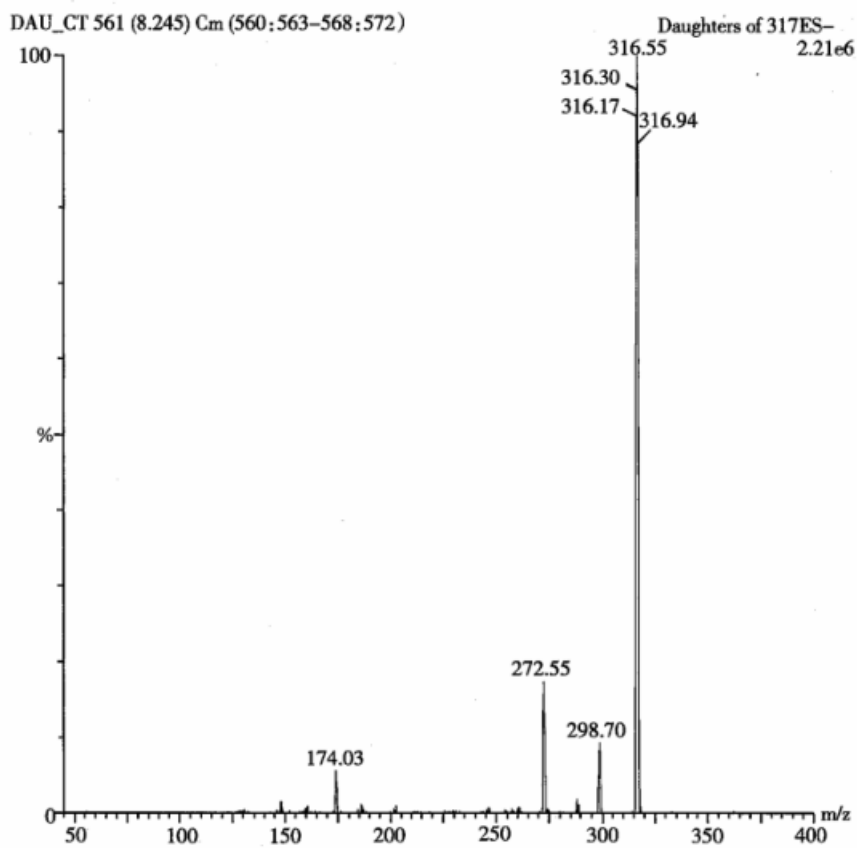


图 A.5 玉米赤霉烯酮离子扫描质谱图