

# 中华人民共和国国家标准

农业部 2224 号公告—3—2015

---

## 饲料中雌二醇的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of estradiol in feeds—  
Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

2015-01-30 发布

2015-04-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量与标准检测技术研究所。

本标准主要起草人:陈刚、王凯强、朱丹、米晓霞、李思聪、郑晓春。

## 饲料中雌二醇的测定 液相色谱—串联质谱法

### 1 范围

本标准规定了饲料中雌二醇含量测定的液相色谱—串联质谱方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充料中雌二醇的测定。

本方法检出限为  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为  $2.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。适用浓度范围为  $2.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

### 3 原理

试样经乙酸乙酯—正己烷混合溶液提取，离心后取上清液用二羟基固相萃取柱净化，高效液相色谱—串联质谱测定，内标法定量。

### 4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 氨水。

4.3 乙酸乙酯。

4.4 正己烷。

4.5 雌二醇对照品：纯度 $\geq 99\%$ 。

4.6  $d_4$ -雌二醇对照品：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.7 乙酸乙酯—正己烷混合溶液(50+50, V/V)：取乙酸乙酯与正己烷各 500 mL，混匀。

4.8 0.1%氨水溶液：取氨水(4.2)1.0 mL 加水稀释至 1 000 mL。

4.9 雌二醇标准储备液(1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )：称取雌二醇对照品(4.5)10 mg(精确到 0.01 mg)，用甲醇(4.1)溶解并定容至 10 mL，配制成 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液， $-20^\circ\text{C}$  避光保存，有效期为 3 个月。

4.10 雌二醇标准工作液：吸取雌二醇标准储备液(4.9)适量，用甲醇(4.1)逐级稀释配制成雌二醇浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液，现配现用。

4.11  $d_4$ -雌二醇标准储备液(1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )：称取  $d_4$ -雌二醇对照品(4.6)10 mg(精确到 0.01 mg)，用甲醇(4.1)溶解并定容至 10 mL，配制成 1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准储备液， $-20^\circ\text{C}$  避光保存，有效期为 3 个月。

4.12  $d_4$ -雌二醇标准工作液：吸取  $d_4$ -雌二醇标准储备液(4.11)适量，用甲醇(4.1)逐级稀释配制成雌二醇浓度为 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液，现配现用。

4.13 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜(有机相)。

4.14 二羟基固相萃取柱：3 mL, 500 mg 或性能相当者。

## 5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱—串联质谱仪,配有电喷雾离子源(ESI)。
- 5.2 旋涡混合器。
- 5.3 振荡器。
- 5.4 分析天平:感量 0.01 mg。
- 5.5 天平:感量 0.01 g。
- 5.6 高速冷冻离心机:转速不低于 12 000 r/min,可控温范围 4℃。
- 5.7 氮吹仪。
- 5.8 固相萃取装置。
- 5.9 粉碎机。

## 6 试样的制备与保存

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的样品,四分法缩减取样。按 GB/T 20195 制备试样,粉碎过 0.30 mm 孔径筛,充分混匀。装入密闭容器中,置于-20℃冰柜中避光保存。

## 7 测定步骤

### 7.1 提取

称取试样 5 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 聚丙烯离心管中,加入  $d_4$ -雌二醇标准工作液(4.12)100  $\mu$ L,涡旋震荡 30 s,加入乙酸乙酯—正己烷混合溶液(4.7)10 mL,充分振荡 15 min,于 12 000 r/min,4℃ 条件下离心 15 min,转移上清液至 25 mL 容量瓶中,残余物用乙酸乙酯—正己烷混合溶液(4.7)10 mL 重复提取一次,合并上清液,用乙酸乙酯—正己烷混合溶液(4.7)定容至刻度,混匀备用。

### 7.2 净化

二羟基固相萃取柱(4.14)用乙酸乙酯—正己烷混合溶液(4.7)3 mL 活化。配合饲料和精料补充料取上述备用液 5.0 mL 过柱。浓缩饲料和添加剂预混合饲料取上述备用液 0.5 mL 过柱。收集上样液,用乙酸乙酯—正己烷混合溶液(4.7)3 mL 洗脱,收集洗脱液于离心管中,于 40℃ 下氮气吹干,残余物用 0.5 mL 甲醇漩涡溶解,过 0.22  $\mu$ m 滤膜(4.13)供液相色谱—串联质谱仪分析。

### 7.3 标准曲线的制备

分别准确吸取雌二醇标准工作液(4.10)和  $d_4$ -雌二醇标准工作液(4.12)适量,用甲醇稀释,配制成雌二醇浓度为 5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、300 ng/mL、500 ng/mL,内标浓度均为 20 ng/mL 的系列标准溶液,供高效液相色谱—串联质谱测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标,对应的标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

### 7.4 测定

#### 7.4.1 色谱条件

色谱柱: $C_{18}$ 柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 3.5  $\mu$ m,pH 适用范围 2~11.5 或其相当的色谱柱。

流动相:A:0.1%氨水(4.8),B:甲醇(4.1)。

流速:300  $\mu$ L/min。

柱温:30℃。

进样量:5  $\mu$ L。

流动相梯度及洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间, min	A(0.1%氨水), %	B(甲醇), %
0	50	50
5	5	95
8	5	95
10	50	50
12	50	50

## 7.4.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI)。

质谱扫描方式:负离子扫描。

检测方式:多反应监测(MRM)。

脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体。

喷雾电压、碰撞能等参数应优化至最优灵敏度。

监测离子参数情况见表 2。

表 2 选择离子参数设定

化合物	母离子	定量离子	定性离子	锥孔电压, V	碰撞能量, eV
雌二醇	271.2	145.2	145.2	180	56
			183.3		54
d <sub>4</sub> -雌二醇	275.2	147.2	147.2	180	56
			187.0		56

## 7.4.3 定性测定

在上述条件下雌二醇及内标色谱保留时间为 5.93 min。通过试样色谱图的保留时间与相应标准品的保留时间、各色谱峰的特征离子与相应浓度标准溶液各色谱峰的特征离子相对照定性,试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 5%;试样特征离子的相对丰度与浓度相当混合标准溶液的相对丰度一致,相对丰度偏差不超过表 3 的规定,则可判断试样中存在相应的被测物。

表 3 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	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差, %	±20	±25	±30	±50

## 7.4.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,取试样溶液和相应的标准溶液,做单点或多点校准,按内标法以峰面积比计算即得。标准溶液及试样溶液中雌二醇及其内标 d<sub>4</sub>-雌二醇的峰面积之比均在仪器检测的线性范围之内。标准溶液定量离子色谱图参见附录 A 中图 A.1。

## 8 结果计算与表示

## 8.1 结果计算

单点校准试样中雌二醇的浓度 C<sub>i</sub>按式(1)计算:

$$C_i = \frac{A_i A'_{is} C_s C_{is}}{A_{is} A_s C'_i} \dots\dots\dots (1)$$

或标准曲线校准,由式(2)求得 a 和 b:

$$\frac{A_s}{A'_{is}} = a \frac{C_s}{C_{is}} + b \dots\dots\dots (2)$$

则试样溶液中雌二醇的浓度 C<sub>i</sub>按式(3)计算:

$$C_i = \frac{C_{is}}{a} \left( \frac{A_i}{A_{is}} - b \right) \dots\dots\dots (3)$$

试样中雌二醇含量  $X$  以质量分数计,单位为纳克每克( $\text{ng/g}$ ),按式(4)计算。

$$X = \frac{C_i V_1 V_2}{m V_3} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- $C_i$  —— 试样溶液中雌二醇的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );
- $C_{is}$  —— 试样溶液中雌二醇内标的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );
- $C_s$  —— 标准溶液中雌二醇的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );
- $C'_{is}$  —— 标准溶液中雌二醇内标的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng/mL}$ );
- $A_i$  —— 试样溶液中雌二醇的峰面积;
- $A_{is}$  —— 试样溶液中雌二醇内标的峰面积;
- $A_s$  —— 标准溶液中雌二醇的峰面积;
- $A'_{is}$  —— 标准溶液中雌二醇内标的峰面积;
- $V_1$  —— 上机前最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $V_2$  —— 总提取定容液体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $V_3$  —— 加入 SPE 净化柱的提取液体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $m$  —— 称取的试样质量,单位为克( $\text{g}$ )。

## 8.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

## 9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的 20%。

附录 A  
(资料性附录)

雌二醇和内标( $d_4$ -雌二醇)多反应监测(MRM)定量离子色谱图

雌二醇和内标( $d_4$ -雌二醇)混合标准溶液定量离子色谱图见图 A.1。

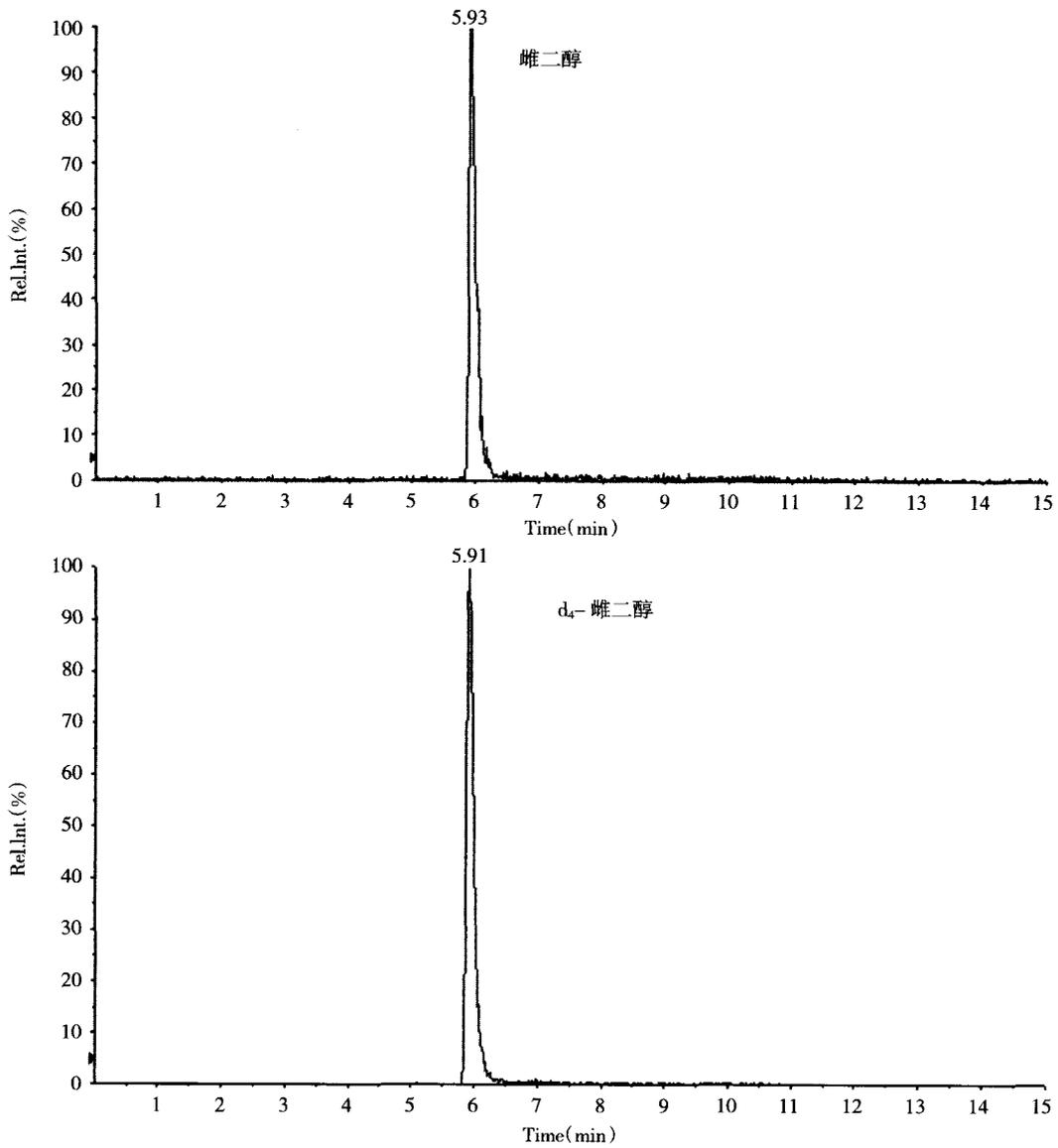


图 A.1 雌二醇(5 ng/mL)和  $d_4$ -雌二醇(20 ng/mL)混合标准溶液定量离子色谱图