



中华人民共和国国家标准

GB 31656.14—2022

食品安全国家标准 水产品中27种性激素残留量的测定 液相色谱—串联质谱法

National food safety standard—
Determination of 27 sex hormones residues in fishery products
by liquid chromatography—tandem mass spectrometric

2022-09-20 发布

2023-02-01 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 发布
国家市场监督管理总局

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。

本文件系首次发布。

食品安全国家标准

水产品中 27 种性激素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了水产品中 27 种性激素残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鱼、虾和蟹可食部分中己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、己烷雌酚、雌二醇、雌三醇、炔雌醇、苯甲酸雌二醇、群勃龙、诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、炔诺酮、美雄酮、甲基睾酮、康力龙、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、 21α -羟基孕酮、 17α -羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲羟孕酮和左炔诺孕酮残留量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的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

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的性激素用乙酸乙酯-甲基叔丁基醚混合溶剂和乙酸乙酯依次提取，提取液经浓缩、 C_{18} 固相萃取柱净化，用液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

5 试剂与材料

以下所用的试剂，除特别注明外均为分析纯；水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

5.1.2 正己烷(C_6H_{14})：色谱纯。

5.1.3 甲基叔丁基醚($C_5H_{12}O$)：色谱纯。

5.1.4 乙酸乙酯($C_4H_8O_2$)：色谱纯。

5.1.5 冰乙酸(CH_3COOH)。

5.1.6 三水乙酸钠($C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$)。

5.1.7 氨水($NH_3 \cdot H_2O$)。

5.2 溶液配制

5.2.1 乙酸-乙酸钠缓冲溶液：取三水乙酸钠 21.5 g、冰乙酸 2.6 mL，加水适量使溶解并稀释至 500 mL，混匀。

5.2.2 0.02%氨水：取氨水 100 μ L 于 500 mL 水中，混匀。临用前配制。

5.2.3 乙酸乙酯-甲基叔丁基醚溶液：取乙酸乙酯和甲基叔丁基醚等体积混合。

5.3 标准品

5.3.1 性激素：己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、己烷雌酚、雌二醇、雌三醇、炔雌醇、苯甲酸雌二醇、群勃龙、

诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、炔诺酮、美雄酮、甲基睾酮、康力龙、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、21 α -羟基孕酮、17 α -羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮、醋酸甲羟孕酮和左炔诺孕酮：含量 $\geq 97\%$ ，具体见附录 A。

5.3.2 内标：己烯雌酚-D₈、雌酮-D₂、雌二醇-¹³C₂、甲基睾酮-D₃、孕酮-D₉、左炔诺孕酮-D₆和甲羟孕酮-D₃：含量 $\geq 97\%$ ，具体见附录 A。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取性激素类标准品各 10 mg，精密称定，分别用甲醇适量使溶解并定容于 100 mL 棕色容量瓶，配制成浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 1 年。

5.4.2 混合标准中间液：准确量取各标准储备液适量，于 100 mL 棕色容量瓶，用甲醇稀释配制成己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、群勃龙、诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、21 α -羟基孕酮、17 α -羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲羟孕酮浓度均为 1 $\mu\text{g/mL}$ ；己烷雌酚、雌二醇、左炔诺孕酮、炔诺酮、苯甲酸雌二醇和康力龙浓度均为 2 $\mu\text{g/mL}$ ；雌三醇和炔雌醇浓度均为 4 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.4.3 混合标准工作液：准确量取混合标准中间液 10 mL，于 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、群勃龙、诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、21 α -羟基孕酮、17 α -羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲羟孕酮浓度均为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ ；己烷雌酚、雌二醇、左炔诺孕酮、炔诺酮、苯甲酸雌二醇和康力龙浓度均为 0.4 $\mu\text{g/mL}$ ；雌三醇和炔雌醇浓度均为 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 3 个月。

5.4.4 内标标准储备液：取同位素内标物各 10 mg，精密称定，分别用甲醇适量使溶解并定容于 50 mL 棕色容量瓶，配制成浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的内标单标储备溶液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 1 年。

5.4.5 混合内标工作液：分别准确量取内标储备液适量，于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成雌二醇-¹³C₂ 浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$ ；己烯雌酚-D₈、雌酮-D₂、甲基睾酮-D₃、孕酮-D₉、甲羟孕酮-D₃ 和左炔诺孕酮-D₆ 浓度均为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的混合内标工作液。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 6 个月。

5.5 材料

5.5.1 C₁₈固相萃取柱：500 mg/3 mL，或相当者。

5.5.2 微孔尼龙滤膜：0.22 μm 。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 高速离心机：10 000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 均质机。

6.6 旋转蒸发仪。

6.7 固相萃取装置。

6.8 梨形瓶：100 mL。

6.9 超声波清洗器。

6.10 塑料离心管：10 mL 和 50 mL。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按 GB/T 30891—2014 附录 B 的要求制样。

- a) 取均质的供试样品,作为供试试样;
- b) 取均质的空白样品,作为空白试样;
- c) 取均质的空白样品,添加适宜浓度的标准溶液,作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

−18℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

取试料 5 g(准确至±0.05 g),于 50 mL 离心管中,准确加入 30 μL 混合内标工作液和乙酸-乙酸钠缓冲液 10 mL,涡旋 30 s,加乙酸乙酯-甲基叔丁基醚溶液 10 mL,涡旋 1 min,超声 10 min,涡旋混合 1 min,于 8 000 r/min 离心 8 min,取上层有机相于 100 mL 梨形瓶;残渣用乙酸乙酯 10 mL 重复提取 1 次,有机相合并至梨形瓶中,于 35℃水浴旋转蒸发至干。对蒸干后有油脂残留的样品,用氮气或空气将残留在油脂中的乙酸乙酯吹除干净。加入正己烷 7 mL 溶解残留物,备用。

8.2 净化

取 C₁₈固相萃取柱,依次用甲醇、正己烷各 5 mL 活化。取备用液,过柱,控制流速不超过 1 滴/s;用正己烷 10 mL 淋洗,吹干;用甲醇 10 mL 洗脱,收集洗脱液,于 40℃水浴旋转蒸发至干。准确加入甲醇 0.85 mL,涡旋混合 1 min,再准确加入水 0.15 mL,混合 30 s,8 000 r/min,离心 8 min,上清液用 0.22 μm 尼龙滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 基质匹配标准工作曲线的制备

分别取 10 μL、25 μL、50 μL、100 μL、250 μL、500 μL 混合标准工作溶液于 5 mL 玻璃离心管中,分别加混合内标工作液 30 μL,吹干,加入经 7.1 和 7.2 步骤处理所得的基质空白溶液 1.0 mL,混合 1 min,配制成激素浓度为 2 ng/mL~400 ng/mL 系列基质匹配标准工作液,上机测定。以标准物质特征离子色谱峰的峰面积与内标物特征离子色谱峰的峰面积比值为纵坐标、相应的浓度为横坐标,绘制基质标准工作曲线。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:XBridge Shield RP18 柱(4.6 mm×150 mm,5 μm),或相当者;
- b) 流速:0.4 mL/min;
- c) 进样量:20 μL;
- d) 柱温:25℃;
- e) 流动相 A 为甲醇;流动相 B 为 0.02%氨水,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间,min	A,%	B,%
0.0	85	15
8.0	90	10
15.0	90	10
15.1	97	3
20.0	97	3
20.1	85	15
25.0	85	15

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源:ESI;
- b) 喷雾电压:3.0 kV;
- c) 离子传输管温度:350℃;

- d) 鞘气流速:13.3 L/min;
e) 辅助气流速:3.3 L/min;
f) 碰撞气压:0.199 5 Pa;
g) 检测方式:多反应监测(MRM),27种激素及内标物多反应监测母离子、子离子、碰撞能量和扫描方式见表2。

表2 27种性激素及内标物母离子、子离子、碰撞能量和扫描方式

序号	化合物名称	扫描方式	母离子 m/z	锥孔电压 V	子离子 m/z	碰撞能量 eV	内标物
1	己二烯雌酚	ESI ⁻	264.9	87	236.1	29	己烯雌酚-D ₈
					249.1 [*]	29	
2	己烯雌酚	ESI ⁻	266.9	87	237.1	30	
					251.1 [*]	28	
3	己烷雌酚	ESI ⁻	269.2	87	134.1	19	雌酮-D ₂
					119.1 [*]	48	
4	雌酮	ESI ⁻	268.9	87	183.1	45	
					145.1 [*]	40	
5	雌二醇	ESI ⁻	271.2	87	183.2 [*]	42	雌二醇- ¹³ C ₂
					145.1	43	
6	雌三醇	ESI ⁻	287.1	87	145.1	46	
					171.1 [*]	40	
7	炔雌醇	ESI ⁻	295.1	87	159.1	35	
					145.1 [*]	48	
8	苯甲酸雌二醇	ESI ⁺	377.2	126	135.1	10	甲羟孕酮-D ₃
					105.1 [*]	28	
9	17- α 羟基孕酮	ESI ⁺	331.2	126	109.1	23	
					97.1 [*]	23	
10	21- α 羟基孕酮	ESI ⁺	331.2	126	109.1	23	
					97.1 [*]	23	
11	醋酸甲羟孕酮	ESI ⁺	387.2	126	123.1	29	
					327.3 [*]	11	
12	醋酸氯地孕酮	ESI ⁺	405.2	126	309.3	14	
					301.2 [*]	19	
13	醋酸甲地孕酮	ESI ⁺	385.2	126	267.2	18	
					224.2 [*]	23	
14	甲羟孕酮	ESI ⁺	345.3	126	97.1	29	
					123.1 [*]	23	
15	炔诺酮	ESI ⁺	299.2	87	231.2	17	
					109.1 [*]	26	
16	康力龙	ESI ⁺	329.4	126	121.1	36	孕酮-D ₅
					81.1 [*]	43	
					109.1	28	
17	孕酮	ESI ⁺	315.0	87	97.1 [*]	22	左炔诺孕酮-D ₆
					109.1	30	
18	左炔诺孕酮	ESI ⁺	313.2	87	245.2 [*]	18	甲基睾酮-D ₃
					257.2	13	
19	诺龙	ESI ⁺	275.2	87	239.2 [*]	16	
					257.2 [*]	16	
20	苯丙酸诺龙	ESI ⁺	407.2	126	105.2	28	
					97.2	20	
21	睾酮	ESI ⁺	289.2	87	109.1 [*]	27	
					121.1	22	
22	勃地酮	ESI ⁺	287.2	87	135.2 [*]	13	

表 2 (续)

序号	化合物名称	扫描方式	母离子 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	子离子 <i>m/z</i>	碰撞能量 eV	内标物
23	群勃龙	ESI ⁺	271. 1	87	199. 1	18	甲基睾酮-D ₃
					253. 2 *	23	
24	甲基睾酮	ESI ⁺	303. 1	87	109. 1	26	
					97. 1 *	28	
25	雄烯二酮	ESI ⁺	287. 2	87	109. 1	24	
					97. 1 *	20	
26	美雄酮	ESI ⁺	301. 2	87	149. 2	12	
					121. 1 *	23	
27	丙酸睾酮	ESI ⁺	345. 2	126	109. 1	29	
					97. 1 *	30	
28	甲基睾酮-D ₃	ESI ⁺	306. 2	87	109. 2 *	30	—
29	孕酮-D ₃	ESI ⁺	324. 2	126	100. 2 *	27	
30	己烯雌酚-D ₈	ESI ⁻	275. 2	87	259. 4 *	28	
31	雌酮-D ₂	ESI ⁻	271. 2	87	147. 1 *	44	
32	左炔诺孕酮-D ₆	ESI ⁺	319. 2	126	251. 2 *	17	
33	甲羟孕酮-D ₃	ESI ⁺	348. 2	126	126. 2 *	27	
34	雌二醇- ¹³ C ₂	ESI ⁻	272. 9	87	147. 1	43	
注: * 为定量离子。							

8.5 测定法

8.5.1 定性测定

在同样的测试条件下,试料溶液中激素类药物的保留时间与标准工作液中激素类药物的保留时间之比偏差在±2. 5%以内;且检测到的离子的相对丰度,应当与浓度相当的校正标准溶液的离子相对丰度一致。其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	允许偏差
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

8.5.2 定量测定

取试料溶液和基质匹配标准工作液,作单点或多点校准,按内标法定量。基质匹配标准工作液及试料溶液中目标物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述色谱-质谱条件下,标准溶液特征离子质量色谱图见附录 B。

8.6 空白试验

取空白试样,除不加药物外,采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中待测药物的残留量按标准曲线或公式(1)计算。

$$X = \frac{A \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中待测物残留量的数值,单位为微克每千克(μg/kg);

- A —— 试样溶液中待测物的峰面积;
 A_{is} —— 试样溶液中内标的峰面积;
 A_s —— 标准溶液中待测物的峰面积;
 A'_{is} —— 标准溶液中内标的峰面积;
 C_{is} —— 试样溶液中内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 C_s —— 标准溶液中待测物浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 C'_{is} —— 标准溶液中内标浓度的数值,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 V —— 定容体积的数值,单位为毫升(mL);
 m —— 供试试样质量的数值,单位为克(g)。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、群勃龙、诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、 21α -羟基孕酮、 17α -羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲羟孕酮检测限为 $0.5 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$; 己烷雌酚、雌二醇、左炔诺孕酮、炔诺酮、苯甲酸雌二醇和康力龙的检测限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $2.0 \mu\text{g/kg}$; 雌三醇和炔雌醇的检测限为 $2.0 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $4.0 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法己二烯雌酚、己烯雌酚、雌酮、群勃龙、诺龙、雄烯二酮、勃地酮、睾酮、美雄酮、甲基睾酮、苯丙酸诺龙、丙酸睾酮、孕酮、 21α -羟基孕酮、 17α -羟基孕酮、甲羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸氯地孕酮和醋酸甲羟孕酮在 $1.0 \mu\text{g/kg} \sim 20 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内回收率为 $60\% \sim 120\%$; 己烷雌酚、雌二醇、左炔诺孕酮、炔诺酮、苯甲酸雌二醇和康力龙在 $2.0 \mu\text{g/kg} \sim 40 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内回收率为 $50\% \sim 120\%$; 雌三醇和炔雌醇在 $4.0 \mu\text{g/kg} \sim 80 \mu\text{g/kg}$ 添加浓度范围内回收率为 $60\% \sim 120\%$ 。

10.3 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)
性激素类药物中英文名称、化学式和 CAS 号

性激素类药物中英文名称、化学式和 CAS 号见表 A.1。

表 A.1 性激素类药物中英文名称、化学式和 CAS 号

中文名称	英文名称	化学式	CAS 号
己二烯雌酚	Dienestrol	$C_{18}H_{18}O_2$	84-17-3
己烯雌酚	Diethylstilbestrol	$C_{18}H_{20}O_2$	56-53-1
己烷雌酚	Hexestrol	$C_{18}H_{22}O_2$	84-16-2
雌酮	Estrone	$C_{18}H_{22}O_2$	53-16-7
雌二醇	β -Estradiol	$C_{18}H_{24}O_2$	50-28-2
雌三醇	Estriol	$C_{18}H_{24}O_3$	50-27-1
炔雌醇	Ethinyl Estradiol	$C_{20}H_{24}O_2$	57-63-6
苯甲酸雌二醇	β -Estradiol 3-benzoate	$C_{25}H_{28}O_3$	50-50-0
17- α 羟基孕酮	17A-acetoxypregesterone	$C_{23}H_{32}O_4$	302-23-8
21- α 羟基孕酮	Desoxycorticosterone	$C_{21}H_{30}O_3$	64-85-7
醋酸甲羟孕酮	Medroxyprogesterone Acetate	$C_{24}H_{34}O_4$	71-58-9
醋酸氯地孕酮	Chlormadinone Acetate	$C_{23}H_{29}ClO_4$	302-22-7
醋酸甲地孕酮	Megestrol Acetate	$C_{24}H_{32}O_4$	51154-23-5
左炔诺孕酮	Levonorgestre	$C_{21}H_{28}O_2$	797-63-7
甲羟孕酮	Medroxyprogesterone	$C_{22}H_{32}O_3$	520-85-4
诺龙	Nandrolone	$C_{18}H_{26}O_2$	434-22-0
苯丙酸诺龙	Nandrolone phenylpropionate	$C_{27}H_{34}O_3$	62-90-8
睾酮	Testosterone	$C_{19}H_{28}O_2$	58-22-0
勃地酮	Boldenone	$C_{19}H_{26}O_2$	846-48-0
孕酮	Progesterone	$C_{21}H_{30}O_2$	57-83-0
群勃龙	Trenbolone	$C_{18}H_{22}O_2$	10161-33-8
甲基睾酮	17-Methyltestosterone	$C_{20}H_{30}O_2$	58-18-4
雄烯二酮	Androstenedione	$C_{19}H_{26}O_2$	63-05-8
美雄酮	Methandrostenolone	$C_{20}H_{28}O_2$	72-63-9
炔诺酮	Norethindrone	$C_{20}H_{26}O_2$	68-22-4
康力龙	Stanozolol	$C_{21}H_{32}N_2O$	10418-03-8
丙酸睾酮	Testosterone propionate	$C_{22}H_{32}O_3$	57-85-2
己烯雌酚-D ₈	Diethylstilbestrol-D ₈	$C_{18}H_{12}D_8O_2$	91318-10-4
雌酮-D ₂	Estrone-D ₂	$C_{18}H_{20}D_2O_2$	56588-58-0
雌二醇- ¹³ C ₂	Estradiol- ¹³ C ₂	¹³ C ₂ C ₁₆ H ₂₄ O ₂	82938-05-4
甲羟孕酮-D ₃	Medroxyprogesterone-D ₃	$C_{24}H_{31}D_3O_4$	162462-69-3
孕酮-D ₃	Progesterone-D ₃	$C_{21}H_{21}D_3O_2$	15775-74-3
左炔诺孕酮-D ₆	Levonorgestrel-D ₆	$C_{21}H_{22}D_6O_2$	—
甲基睾酮-D ₃	Methyltestosterone-D ₃	$C_{20}H_{27}D_3O_2$	96425-03-5

附录 B
(资料性)

标准溶液及 7 种内标特征离子质量色谱图(25 $\mu\text{g/L}$)见图 B.1。

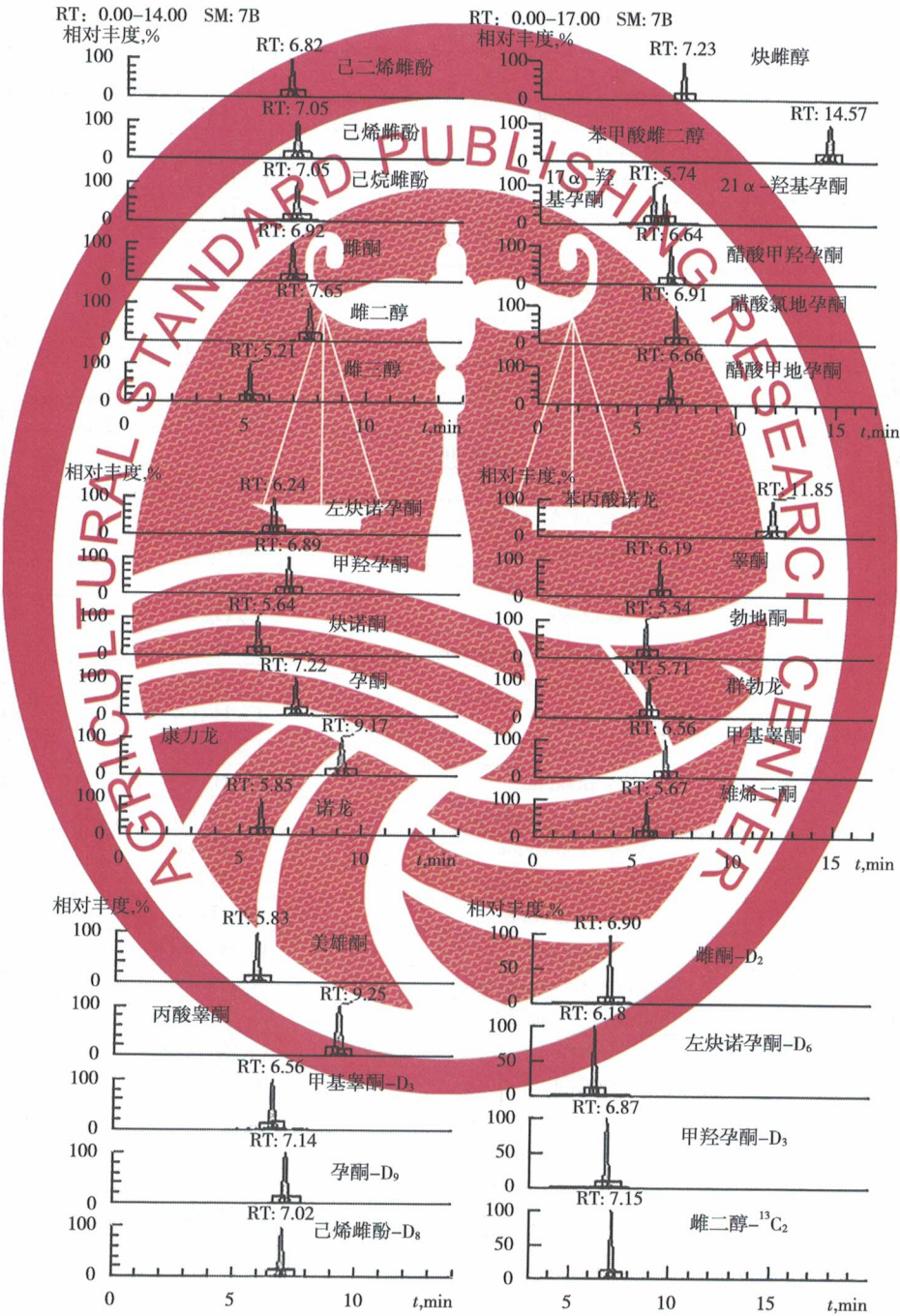


图 B.1 标准溶液及 7 种内标特征离子质量色谱图(25 $\mu\text{g/L}$)

中 华 人 民 共 和 国

国 家 标 准

食品安全国家标准 水产品中 27 种性激素
残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

GB 31656.14—2022

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版

(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 1 字数 20 千字

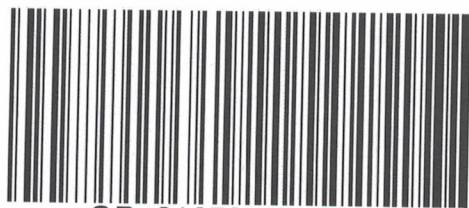
2022 年 12 月第 1 版 2022 年 12 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·9139

定价: 32.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



GB 31656.14—2022