

团体标准

T/CI XXX-2024

水产品中 13 种邻苯二甲酸酯单酯的 液相色谱-质谱/质谱检测方法

Determination of 13 phthalate monoesters in aquatic products by liquid
chromatography-Mass spectrometryass spectrometry

(征求意见稿)

2024-X-X 发布

2024-X-X 实施

中国国际科技促进会 发布

中国国际科技促进会 (CIAPST) 是 1988 年经中华人民共和国国务院科技领导小组批准而成立的全国性社会团体。制定团体标准、开展标准国际化和推动团体标准实施,是中国国际科技促进会的工作内容之一。任何团体和个人,均可提出制、修订中国国际科技促进会团体标准的建议并参与有关工作。

中国国际科技促进会标准按《中国国际科技促进会标准化管理办法》进行制定和管理。

中国国际科技促进会征求意见稿经向社会公开征求意见,并得到参加审定会议的 80% 以上的专家、成员的投票赞同,方可作为中国国际科技促进会标准予以发布。

在本标准实施过程中,如发现需要修改或补充之处,请将意见和有关资料寄给中国国际科技促进会标准化工作委员会,以便修订时参考。

任何团体和个人,均可对本标准征求意见稿提出意见和建议,牵头起草单位联系方式:
zhangrongrong@nbu.edu.cn。

中国国际科技促进会

地址:北京市海淀区中关村东路 89 号恒兴大厦 13F

邮政编码: 100190

电话:010-62652520 传真: 010-62652520

网址: <http://www.ciapst.org>

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由宁波大学提出。

本文件由中国国际科技促进会归口。

本文件起草单位：宁波大学、浙江万里学院、宁波市农业科学院、浙江省农业科学院、南京农业大学。

本文件主要起草人：史西志、张泽明、张蓉蓉、刘华、焦海峰、吴银良、王新全、宋素泉、石强强。

本文件为首次发布。

水产品中 13 种邻苯二甲酸酯单酯的液相色谱-质谱/质谱 检测方法

1 范围

本文件规定了测定水产养殖生物中邻苯二甲酸单酯的高效液相色谱-串联质谱法。

本文件适用于水产养殖生物中邻苯二甲酸单甲酯（MMP）、邻苯二甲酸单乙酯（MEP）、邻苯二甲酸单异丁酯（MiBP）、邻苯二甲酸单正丁酯（MnBP）、邻苯二甲酸单环己酯（MCHP）、邻苯二甲酸单苄基酯（MBZP）、邻苯二甲酸单辛酯（MOP）、邻苯二甲酸单异壬酯（MiNP）、邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯、邻苯二甲酸单（3-羧基丙基）酯（MCP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-酮基己基）酯（MEOHP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-羟基己基）酯（MEHHP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-羧基戊基）酯（MECCP）等13种邻苯二甲酸单酯的测定。

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。凡是注明日期的引用文件，仅所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）适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

原理

水产养殖生物中邻苯二甲酸单酯经固相萃取柱富集、净化后，采用高效液相色谱-串联质谱法测定。根据化合物的保留时间和特征离子峰定性，内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

4.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

4.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

4.4 乙酸胺（NH₄CH₃COOH）。

4.5 0.1%甲酸乙腈溶液：量取 1 mL 甲酸（4.3），用乙腈稀释并定容至 1000 mL。

4.6 0.1%甲酸水溶液：量取 1 mL 甲酸（4.3），用水稀释至 1000 mL。

4.7 50%甲醇乙腈：量取 50 mL 甲醇与 50 mL 乙腈混合。

4.8 标准物质：邻苯二甲酸单甲酯（MMP）、邻苯二甲酸单乙酯（MEP）、邻苯二甲酸单异丁酯（MiBP）、邻苯二甲酸单正丁酯（MnBP）、邻苯二甲酸单环己酯（MCHP）、邻苯二甲酸单苄基酯（MBZP）、邻苯二甲酸单辛酯（MOP）、邻苯二甲酸单异壬酯（MiNP）、邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯、邻苯二甲酸单（3-羧基丙基）酯（MCP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-酮基己基）酯（MEOHP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-羟基己基）酯（MEHHP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-羧基戊基）酯（MECCP），纯度 $\geq 97.0\%$ 。

4.9 内标物质：氘代邻苯二甲酸单甲酯（MMP）、邻苯二甲酸单乙酯（MEP）、邻苯二甲酸单异丁酯（MiBP）、邻苯二甲酸单正丁酯（MnBP）、邻苯二甲酸单环己酯（MCHP）、邻苯二甲酸单苄基酯（MBZP）、邻苯二甲酸单辛酯（MOP）、邻苯二甲酸单异壬酯（MiNP）、邻苯二甲酸单（2-乙基己基）酯、邻苯二甲酸单（3-羧基丙基）酯（MCP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-酮基己基）酯（MEOHP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-羟基己基）酯（MEHHP）、邻苯二甲酸单（2-乙基-5-羧基戊基）酯（MECCP），纯度 $\geq 97.0\%$ 。

4.10 13 种邻苯二甲酸单酯标准储备液：分别称取适量邻苯二甲酸单酯标准品，用甲醇溶解并定容至 10 mL，使各种磺胺和喹诺酮的浓度均为 1000 $\mu\text{g/mL}$ ， -18°C 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.11 13 种邻苯二甲酸单酯混合标准中间液：分别量取适量标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准中间液， -18°C 以下避光保存，有效期 3 个月。

4.12 内标储备液：分别称取适量内标标准品，用甲醇溶解并定容至 50 mL，使各种氘代内标的浓度均为 200 $\mu\text{g/mL}$ ， -18°C 以下避光保存，有效期 6 个月。

4.13 内标使用液：分别量取适量内标储备液于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇稀释配制成浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的内标使用液， 4°C 下避光保存，有效期 1 个月。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

5.2 电子天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

5.3 固相萃取装置。

5.4 可控温氮吹浓缩仪。

5.5 pH 计：测量精度 ± 0.2 。

5.6 涡旋混合器。

5.7 固相萃取柱：Poly Sery MAX SPE 固相萃取柱，规格为 6 mL /500 mg。

6 样品制备与保存

采集的水产品样经预研磨处理后于 -20°C 密封保存，24 h 内进行检测。

——取预处理后的供试样品，作为供试试样。

——取预处理的空白样品，作为空白试样。

——取预处理的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7 样品处理

精确称量 2.50 g (湿重, ww) 水产品样品，并转移至 50 mL PTFE 离心管中。将 2 mL 1 M 乙酸铵缓冲液 (AA, pH 6.5)、80 μL β -葡萄糖醛酸酶和内标 (200.0 $\mu\text{g/L}$) 加入管中，将混合物涡旋 3 min，在 37°C 和 300 r/min 的黑暗条件下孵育 90 min。此过程结束后立即加入 10 mL ACN: 甲醇 (MeOH) (5:5, v/v)，然后超声萃取 20 min，并在 9.0×10^3 g 离心力的条件下离心 4 min，收集上清液，重复上述步骤两次，合并上清液。将其与 5 mL ACN 饱和正己烷混合，并将样品管快速摇晃，涡旋 3 min 以除去上清液中的脂肪并再次以相同离心力离心 6 min。然后吸取 20 mL 下层溶液至试管中，并于 45°C 下，氮吹至近干，然后用 5 mL 水: (ACN:MeOH) (95:5, v/v) 复溶。Poly Sery MAX SPE 小柱 (500 mg, 6 mL) 依次用 10 mL MeOH 和 5 mL 超纯水活化，然后将 5 mL 复溶液 (pH, 10.5) 上样，通过加入氢氧化钠 (NaOH) (10 M) 来调节复溶液的 pH，上样完成后，再用 5 mL 超纯水淋洗并用真空泵泵吸以除去水分。用 10 mL MeOH: 乙酸乙酯 (EA) (2% FA, 5:5, v/v) 洗脱小柱，并于 45°C 下，使用氮气浓缩至近干。最后用 1.0 mL MeOH 复溶，并用 0.22 μm PTFE 膜过滤，转移至棕色进样小瓶中，储存在 -20°C ，待 UHPLC-MS/MS 分析。

8 分析测定

8.1 标准工作曲线制备

取一定量邻苯二甲酸单酯混合标准使用液、内标使用液于 2 mL 进样瓶中，制备至少 5 个点标准系列，邻苯二甲酸单酯在各点的质量浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 、100.0 $\mu\text{g/L}$ 和 200.0 $\mu\text{g/L}$ (参考浓度)，内标的质量浓度均为 40.0 $\mu\text{g/L}$ 。

由低浓度到高浓度依次对标准系列溶液进样，以标准系列溶液中目标组分的质量浓度为

横坐标，其对应的峰面积（或峰高）与内标物峰面积（或峰面积）的比值乘以内标物浓度的乘积为纵坐标，绘制校准曲线。

8.2 色谱参考条件

色谱柱：Waters ACQUITY UPLC®BEH Phenyl（2.1 id×100 mm，1.7 μm）柱，或其他等效色谱柱。

流动相：流动相 A 为 0.1%甲酸，流动相 B 为 0.1%甲酸乙腈。

柱温：40℃。

流速：0.35 mL/min。

进样体积：10 μL。

梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间（min）	流速 （mL/min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	0.35	90	10
0.3	0.35	90	10
1	0.35	20	80
2	0.35	10	90
3.5	0.35	5	95
4	0.35	90	10
6	0.35	90	10

8.3 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）。

扫描方式：正离子扫描。

离子喷雾电：5500 V。

离子源温度：500℃。

多离子反应监测方式（MRM），扫描参数见附录 C。

9 结果计算

9.1 定性分析

按照附录 C 中确定的母离子和子离子进行检测，在相同的实验条件下，样品中的邻苯二甲酸单酯的保留时间与标准样品中邻苯二甲酸单酯的保留时间相对标准偏差小于 2.5%，且在样品中谱图中的定性离子的相对丰度（K_{sam}）与浓度相近的标准溶液谱图中对应的定性离

子相对丰度（K_{sam}）偏差不超过表 2 的范围，则可判定样品中存在邻苯二甲酸单酯。

$$K_{sam} = \frac{A_2}{A_1} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中：

K_{sam}—样品中邻苯二甲酸单酯定性离子的相对丰度，%；

A₂ ——样品中邻苯二甲酸单酯定性离子对的峰面积（或峰高）；

A₁ ——样品中邻苯二甲酸单酯定量离子对的峰面积（或峰高）。

$$K_{std} = \frac{A_{std2}}{A_{std1}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中：

K_{std}—标准溶液中邻苯二甲酸单酯定性离子的相对丰度，%；

A_{std2}—标准溶液中邻苯二甲酸单酯定性离子对的峰面积（或峰高）；

A_{std1}—标准溶液中邻苯二甲酸单酯定量离子对的峰面积（或峰高）。

表 2 定性确认时相对离子丰度的最大允许偏差

K _{std}	K _{std} >50	20< K _{std} ≤50	10< K _{std} ≤20	K _{std} ≤10
K _{sam} 相对于 K _{std} 的最大允许 偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

9.2 定量分析

该方法中标准工作溶液和样液中药物残留的响应值均应在 y 仪器的检测线性范围内。

按下列公式（3）计算出水产品样品中邻苯二甲酸单酯的含量：

$$X = \frac{C_i \times V}{V_0} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X—样品中邻苯二甲酸单酯的含量（μg/kg）；

C_i—样品制备液中邻苯二甲酸单酯的含量（μg/kg）；

V—最终定容体积（mL）；

V₀—测定样品质量（mg）。

9.3 结果表示

当测定结果小于 1.0 μg/kg 时，保留至小数点后三位；当测定结果大于或等于 1.0 μg/kg

时，保留三位有效数字。

10 方法的灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法邻苯二甲酸单酯的检出限为 $0.07 \sim 0.88 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.24 \sim 2.93 \mu\text{g/kg}$ （ww）。

10.2 准确度

本方法回收率范围为60%~130%。

10.3 精密度

本方法的批内变异系数 $\leq 15\%$ ，批间变异系数 $\leq 15\%$ 。

11 质量保证和质量控制

11.1 空白试验

每批样品（ ≤ 20 个/批）至少做一个空白实验，空白试样中目标化合物的浓度应低于方法检出限。

11.2 校准

校准曲线的相关系数应 ≥ 0.990 ；每 20 个样品或每批次（少于 20 个样品/批）应分析测定 1 个曲线中间校准点，其测定结果与校准曲线相应点浓度的相对误差应在 $\pm 20\%$ 以内。

11.3 精密度控制

每批样品应至少测定 10%的平行双样，样品数量少于 10 个时，应至少测定一个平行双样，平行双样测定结果的相对偏差应在 $\pm 20\%$ 以内。

11.4 准确度控制

每批样品应至少测定 5%的基体加标样品，样品数量少于 20 个时，应至少测定一个基体加标样品，加标回收率应在 60%~130%之间。

12 废物处理

实验过程中产生的废液和废物应分类收集和保管，委托有资质的单位进行处理。

附录 A
(规范性)
方法的检出限和定量限

表 A. 1 方法的检出限和定量限

MAPEs	相关系数	基质效应	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
MMP	0.9979	0.99	0.88	2.93
MEP	0.9992	1.06	0.81	2.70
MOP	0.9997	0.93	0.23	0.78
MiBP	0.9990	1.03	0.12	0.41
MnBP	0.9994	0.99	0.31	1.04
MiNP	0.9998	1.07	0.21	0.69
MCPP	0.9995	1.02	0.53	1.77
MCHP	0.9995	1.00	0.18	0.62
MBZP	0.9970	0.93	0.51	1.70
MEHP	0.9996	0.99	0.17	0.58
MECPP	0.9987	1.04	0.07	0.24
MEHHP	0.9999	1.02	0.14	0.48
MEOHP	0.9999	1.04	0.08	0.27

附录 B
(规范性)
方法的精密度和准确度

表 B.1 方法的精密度和准确度 (n=6)

样品	化合物名称	实际样品浓度 (μg/L)	加标浓度 (μg/L)	加标 平均回收 率 %	批 内差异 %	批 间差异 %
水产 养殖生物	MMP	ND	5	97.4	2.4	3.2
		ND	20	99.4	1.4	1.7
		ND	80	95.5	9.9	5.3
	MEP	ND	5	100.7	2.9	4.2
		ND	20	98.1	3.4	2.3
		ND	80	101.8	5.7	9.0
	MOP	ND	5	96.9	8.4	5.5
		ND	20	97.5	2.6	4.3
		ND	80	95.0	8.7	4.7
	MiBP	ND	5	98.6	1.7	4.4
		ND	20	97.2	5.4	2.6
		ND	80	97.2	3.6	2.8
	MnBP	ND	5	98.6	3.3	1.4
		ND	20	98.5	1.8	2.3
		ND	80	90.9	8.2	1.2
	MiNP	ND	5	98.2	7.8	2.6
		ND	20	99.8	2.7	2.4
		ND	80	90.4	6.1	0.9
	MCP	ND	5	98.9	5.9	2.8
		ND	20	98.0	2.5	2.8

表 B. 1（续）

		ND	80	96.3	4.4	1.9
	MCHP	ND	5	98.3	3.4	1.7
		ND	20	100.6	6.5	1.6
		ND	80	98.0	5.7	4.7
	MBZP	ND	5	96.8	6.9	5.4
		ND	20	97.5	3.5	4.1
		ND	80	94.6	8.8	1.3
	MEHP	ND	5	100.0	3.1	0.7
		ND	20	99.9	6.6	2.3
		ND	80	92.7	5.2	2.1
	MECCP	ND	5	99.4	6.9	1.5
		ND	20	97.7	3.3	2.0
		ND	80	93.2	5.5	1.9
	MEHHP	ND	5	98.2	3.2	2.8
		ND	20	98.2	2.8	1.9
		ND	80	93.1	8.9	6.6
	MEOHP	ND	5	101.2	4.0	2.7
		ND	20	101.3	3.4	2.0
		ND	80	98.6	8.3	4.7

附录 C

(规范性)

质谱参考条件

表 C.1 方法的精密度和准确度 (n=6)

目标化合物及内标物的多离子反应监测条件见表C.1。

表 C.1 目标化合物及内标物的多离子反应监测条件

化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞电压 (V)
MMP	179.1	10	77, 107*	27, 10
MMP-D4	183.1	42	81*, 111.1	16, 10
MEP	193.1	38	77.1*, 121.1	18, 14
MEP-D4	197.1	40	81.1*, 150.1	18, 12
MOP	277.1	2	77, 127.1*	18, 16
MOP-D4	281.1	46	81.1, 127.1*	20, 16
MiBP	221.1	40	77*, 134.1	20, 12
MiBP-D4	225.1	52	80.9*, 138.1	22, 18
MnBP	221.1	15	77*, 149.1	15, 10
MnBP-D4	225.1	46	71, 81*	12, 20
MiNP	291.2	48	77, 141.1*	20, 18
MiNP-D4	295.2	48	81.1, 141.1*	22, 16
MCPP	251.1	24	103*, 165	10, 14
MCPP-D4	255.1	14	102.9*, 168.9	8, 12
MCHP	247.1	44	77, 97*	18, 14
MCHP-D4	251.1	52	81, 97*	24, 18
MBZP	255.1	42	77*, 183.1	16, 12
MBZP-D4	259.1	46	77.1*, 107.1	20, 12
MEHP	277.1	38	127.1, 134.1*	18, 14
MEHP-D4	281.2	52	80.9, 138.1*	34, 20

表 C. 1（续）

MECPP	307.1	40	113.1, 159.1*	28, 12
MECPP-D4	311.1	30	113.1, 159.1	30, 12
MEHHP	293.1	15	121*, 145.1	18, 13
MEHHP-D4	297.2	4	125.1, 145.1*	18, 14
MEOHP	291.1	50	113.1, 143.1*	20, 14
MEOHP-D4	295.1	48	125.1, 143.1*	20, 14

13种邻苯二甲酸单酯及其内标标准溶液的XIC色谱图见图C.1。

STD-M-5PPB-SF

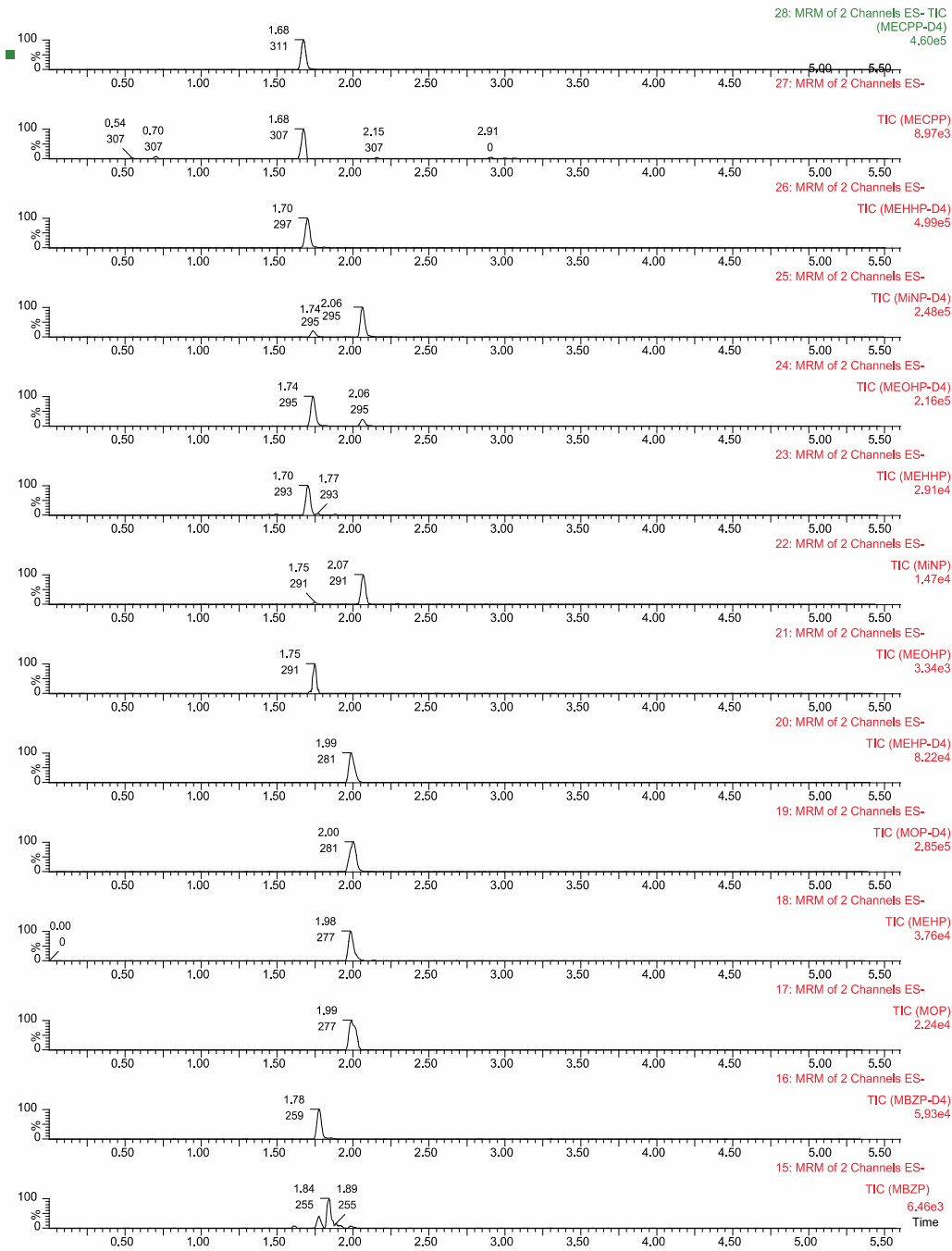


图 C.1 13 种邻苯二甲酸单酯及其内标标准工作溶液液相色谱-串联质谱色谱图

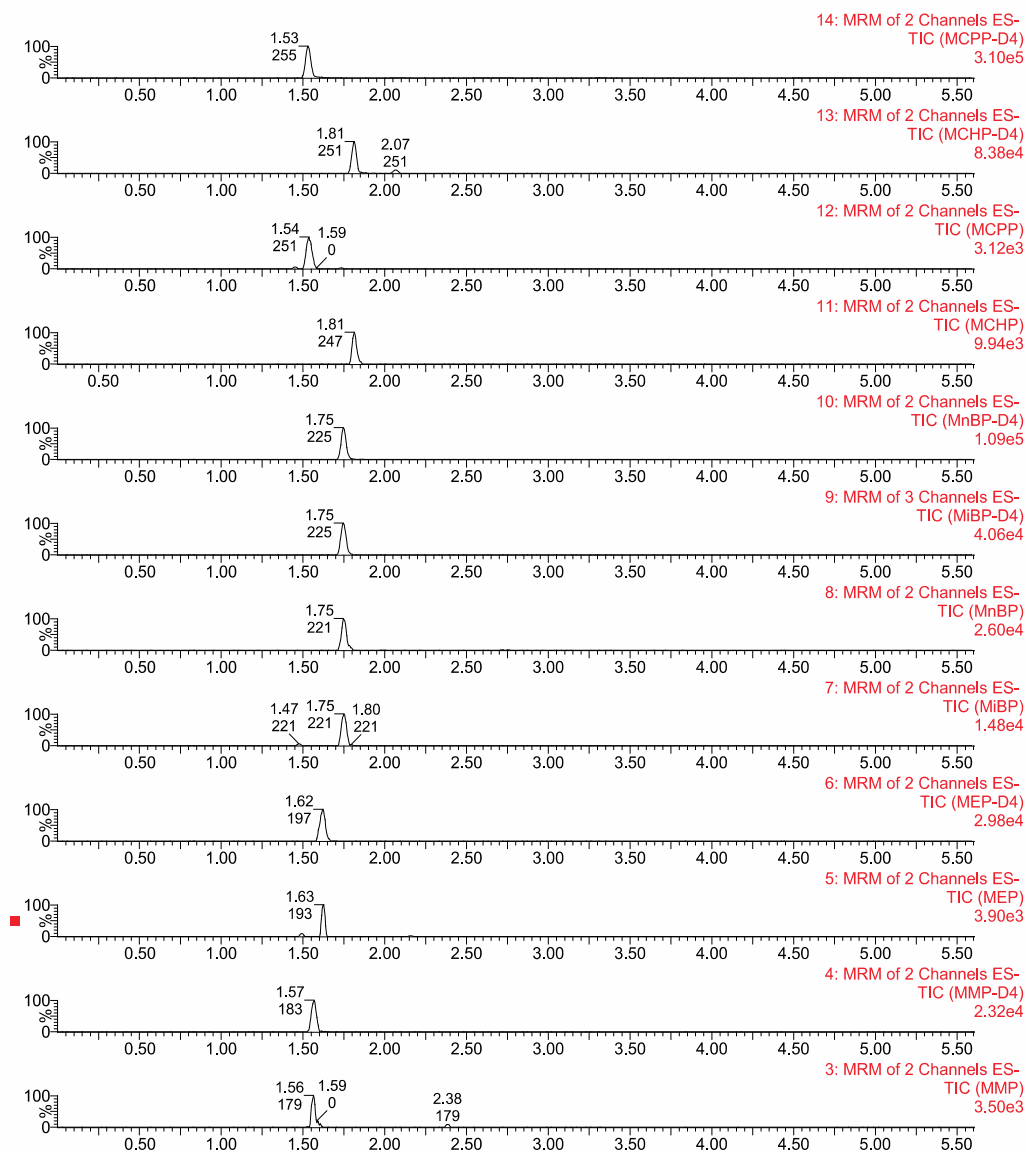


图 C. 1 (续)