|  |  |
| --- | --- |
| ICS  |   |
| CCS  | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
|  43 |

湖南省地方标准

DB XX/T XXXX—2025

水产养殖环境(水体、底泥)中丁香酚的测定 液相色谱-串联质谱法

**Determination of eugenol in water and sediment from aquaculture environment—liquid chromatography-tandem mass spectrometry**

2025 - XX - XX发布

2025 - XX - XX实施

湖南省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc187764121)

[1 范围 1](#_Toc187764122)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc187764123)

[3 术语和定义 1](#_Toc187764124)

[4 方法原理 1](#_Toc187764125)

[5 试剂与材料 1](#_Toc187764126)

[6 仪器与设备 2](#_Toc187764127)

[7 样品 2](#_Toc187764128)

[8 测定步骤 2](#_Toc187764129)

[9 结果和计算 5](#_Toc187764130)

[10 检测方法的灵敏度、准确度和精密度 5](#_Toc187764131)

[附录A（资料性） 标准溶液特征离子质量色谱图 6](#_Toc187764132)

1. 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。

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专利的责任。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南省水产科学研究所、农业农村部渔业产品质量检验测试中心（长沙）、澧县农产品质量安全检测中心。

本文件主要起草人：李小玲、索纹纹、万译文、杨霄、尹升福、雷琴、崔先锋、曾春芳、黄华伟、刘伶俐、陈湘艺、何咏、洪波、谢玉昆

水产养殖环境(水体、底泥)中丁香酚的测定 液相色谱-串联质谱法

* 1. 范围

本文件描述了水产养殖环境（水体、底泥）中丁香酚的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于水产养殖环境（水体、底泥）中丁香酚的测定。

* 1. 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 17378.5 海洋监测规范 第5部分：沉积物分析

SC/T 9102.3 渔业生态环境监测规范 第3部分：淡水

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 方法原理

水试样中的丁香酚经固相萃取柱富集和净化；底泥试样中的丁香酚经正己烷提取，旋转蒸发浓缩，固相萃取柱富集和净化。净化后的溶液供液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

* 1. 试剂与材料
		1. 试剂

水：GB/T 6682规定的一级水。

甲醇（CH3OH）：色谱纯。

正己烷（C6H14）：色谱纯。

* + 1. 溶液配制

40%甲醇水溶液：取甲醇40 mL，用水稀释至100 mL。

50%甲醇水溶液：取甲醇50 mL，用水稀释至100 mL。

* + 1. 标准品

丁香酚（Eugenol，C10H12O2，CAS号：97-53-0），纯度大于等于99.0%。

氘代丁香酚（Eugenol-D3，C10H9D3O2，CAS号：1335401-17-6），纯度大于等于97.0%。

* + 1. 标准溶液配制

标准储备液（100 μg/mL）：取丁香酚标准品约10 mg，精密称定，用甲醇溶解并定容至100 mL棕色容量瓶，配制成浓度为100 μg/mL的标准储备液。-18 ℃以下避光保存，有效期3个月。

内标储备液（100 μg/mL）：取氘代丁香酚标准品约10 mg，精密称定，用甲醇溶解并定容至100 mL棕色容量瓶，配制成浓度为100 μg/mL的标准储备液。-18 ℃以下避光保存，有效期3个月。

标准工作液（1.0 μg/mL）：准确量取标准储备液1 mL，于100 mL棕色容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μg/mL的标准工作液。4 ℃避光保存，有效期1个月。

内标工作液（1.0 μg/mL）：准确量取内标储备液1 mL，于100 mL容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成浓度为 1.0 μg/mL的内标工作液。4 ℃避光保存，有效期1个月。

* + 1. 材料

HLB（二乙烯苯和 N-乙烯基吡咯烷酮共聚物）固相萃取柱：200 mg/6 mL，或相当者。

玻璃纤维滤膜：0.45 μm。

尼龙滤膜：0.22 μm。

* 1. 仪器与设备

液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

分析天平：感量0.01 g和0.00001 g。

冷冻干燥机。

涡旋混合器。

高速离心机：转速不低于8000 r/min。

超声波清洗器。

固相萃取装置。

氮吹仪。

旋转蒸发仪。

* 1. 样品
		1. 样品采集

水样和底泥样品按照SC/T 9102.3规定的方法进行采集。

* + 1. 试样制备

水样采样量应不少于1 L，经0.45 μm玻璃纤维滤膜过滤，置于棕色玻璃瓶中，0 ℃～4 ℃避光保存，一周内完成分析。底泥样品采样量应不少于500 g，于-20 ℃预冷冻24 h，经冷冻干燥机（-50 ℃，真空度小于20 Pa，冷冻干燥10 h）冻干，剔除石块和植物体等异物，用研钵研磨后过100目网筛，置于棕色玻璃瓶中，0 ℃～4 ℃避光保存，一个月内完成分析。

* + 1. 空白试样制备

选取不含丁香酚的同类样品，按照7.2进行制备。

* 1. 测定步骤
		1. 提取
			1. 水

移取50 mL试样（准确至0.1 mL），加入50 μL内标工作液，混合均匀。无需提取，备用。

* + - 1. 底泥

称取2 g（准确至±0.02 g）试样于50 mL离心管中，加入2 mL水润湿，加入50 μL内标工作液，涡旋混匀30 s，加入5 mL正己烷涡旋混合1 min，超声提取10 min，8000 r/min离心5 min，取上清液并转移至50 mL茄形瓶中，残渣用5 mL正己烷重复提取一次，合并上清液，于35 ℃旋转蒸发至近干，用3 mL 40%甲醇水溶液复溶，备用。

* + 1. 净化

HLB固相萃取柱依次用5 mL甲醇、5 mL水活化。取备用液过柱，控制流速不超过1.5 mL/min。待备用液全部通过小柱后，用3 mL 40%甲醇水溶液淋洗，减压抽干，用4 mL甲醇洗脱，收集洗脱液，于35 ℃氮气吹至少于0.5 mL，用50%甲醇水溶液定容至1 mL，过0.22 μm尼龙滤膜，供液相色谱-串联质谱仪测定。

* + 1. 底泥含水率测定

按照GB 17378.5规定的方法进行测定。

* + 1. 标准曲线

精密量取标准工作液、内标工作液适量，用50%甲醇水溶液配制成丁香酚浓度为5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L和200 μg/L 的系列标准工作液，其中内标溶液的浓度均为50 μg/L，供液相色谱-串联质谱仪测定。以待测物和内标物特征离子质量色谱峰峰面积比值为纵坐标、对应的待测物标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线，计算回归方程和相关系数。

* + 1. 测定
			1. 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

1. 色谱柱：C18 (100 mm×2.1 mm，粒径2.6 μm)，或相当者；
2. 流动相：A为甲醇，B为水，梯度洗脱条件见表1；
3. 进样量：5 μL；
4. 流速：0.3 mL/min；
5. 柱温：35 ℃。
6. 流动相梯度洗脱条件

| 时间min | A% | B% |
| --- | --- | --- |
| 0 | 50 | 50 |
| 1.0 | 50 | 50 |
| 5.0 | 95 | 5 |
| 7.0 | 95 | 5 |

表1　流动相梯度洗脱条件（续）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间min | A% | B% |
| 7.1 | 50 | 50 |
| 9.0 | 50 | 50 |

* + - 1. 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

1. 离子源：电喷雾离子源；
2. 扫描方式：负离子扫描；
3. 检测方式：多反应监测（MRM）
4. 喷雾电压：-4.5 kV；
5. 离子源温度：550 ℃；
6. 气帘气压力：0.24 MPa；
7. 碰撞气压力：0.06 MPa；
8. 喷雾气压力：0.34 MPa；
9. 辅助加热气压力：0.34 MPa；
10. 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量见表2。
11. 多反应监测母离子、子离子、去簇电压和碰撞能量

| 化合物名称 | 母离子m/z | 子离子m/z | 去簇电压V | 碰撞能量eV |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 丁香酚 | 163.0 | 148.0 a | -60 | -17 |
| 121.0 | -32 |
| 氘代丁香酚 | 166.1 | 147.9 | -70 | -18 |
| a 为定量离子。 |

* + - 1. 定性测定

在相同测试条件下，试样溶液中待测物的保留时间与标准溶液中待测物的保留时间一致，偏差在±2.5%以内，且试样溶液中待测物定性离子的相对丰度与浓度相当的标准溶液对应的定性离子的相对丰度一致。其允许偏差应符合表3的要求。

1. 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

 单位为百分号

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

* + - 1. 定量测定

按8.5.1和8.5.2设定仪器条件，取标准工作溶液、试样溶液、空白试样溶液等体积进样测定，内标法定量。标准工作溶液和试样溶液中目标物的响应值均应在仪器检测线性范围内。丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图参见附录A。

* + 1. 空白实验

按照8.1～8.5相同的测定步骤进行空白试样（见7.3）的测定。

* 1. 结果和计算
		1. 水样中丁香酚含量

水样中丁香酚含量按式（1）计算。计算结果应扣除空白值，保留2位有效数字。

 $X\_{1}=\frac{C\_{i}×V}{V\_{0}}$ ()

式中：

*X*1 ——试样中待测物的含量，单位为微克每升（μg/L）；

*C*i ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（μg/L）；

*V* ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

*V*0 ——试样体积，单位为毫升（mL）。

* + 1. 底泥中丁香酚含量

底泥中丁香酚含量按式（2）计算。计算结果应扣除空白值，保留2位有效数字。

 $X\_{2}=\frac{C\_{i}×V}{m×(1−w)}$ ()

式中：

*X*2 ——试样中待测物的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

*C*i ——从标准工作曲线得到的待测物溶液浓度，单位为微克每升（μg/L）；

*V* ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

*m*  试样质量，单位为克（g）；

*w* 试样含水率，单位为质量分数（%）。

* 1. 检测方法的灵敏度、准确度和精密度
		1. 灵敏度

本方法在水产养殖环境水中丁香酚的检出限为0.1 μg/L，定量限为0.2 μg/L；在水产养殖环境底泥中丁香酚的检出限为2 μg/kg，定量限为5 μg/kg。

* + 1. 准确度

本方法水在0.2 μg/L～2 μg/L添加浓度水平上的回收率为70%～120%；底泥在5 μg/kg～50 μg/kg添加浓度水平上的回收率为70%～120%。

* + 1. 精密度

本方法的批内相对标准偏差小于等于15%，批间相对标准偏差小于等于15%。

1.
2. （资料性）
标准溶液特征离子质量色谱图

标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。



1. 丁香酚定量离子色谱图



1. 丁香酚定性离子色谱图

 

c) 氘代丁香酚定量离子色谱图

* 1. 丁香酚标准溶液特征离子质量色谱图（20.0 μg/L ）

