

中华人民共和国国家标准

GB 23200.21—2016

代替SN 0350—2012

食品安全国家标准
水果中赤霉酸残留量的测定
液相色谱-质谱/质谱法

National food safety standards—

Determination of gibberellic acid residue in fruit

Liquid chromatography - mass spectrometry

2016-12-18 发布

2017-06-18 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
中华人民共和国农业部
国家食品药品监督管理总局

发布

前 言

本标准代替SN/T 0350-2012 《进出口水果中赤霉素残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法》。

本标准与SN/T 0350-2012相比，主要变化如下：

—标准文本格式修改为食品安全国家标准文本格式；

—标准名称中“进出口水果”改为“水果”。

—标准范围中增加“其它食品可参照执行”。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

—SN/T 0350-2012。

食品安全国家标准

水果中赤霉酸残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了水果中赤霉酸残留量的制样和液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本标准适用于进出口苹果、桔子、桃子、梨和葡萄中赤霉酸残留量的检测，其它食品可参照执行。

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）适用于本文件。

GB 2763 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量

GB/T 6682分析实验室用水规格和试验方法。

3 原理

用乙腈提取试样中残留的赤霉酸，提取液经液液分配净化后，用液相色谱-质谱/质谱测定和确证，外标法定量。

4 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙腈（ C_2H_3N ）：色谱纯。

4.1.2 甲醇（ CH_4O ）：色谱纯。

4.1.3 乙酸乙酯（ $C_4H_8O_2$ ）：色谱纯。

4.1.4 甲酸（ CH_2O_2 ）：色谱级。

4.1.5 磷酸二氢钾（ K_2HPO_4 ）。

4.1.6 氢氧化钠（ $NaOH$ ）。

4.1.7 硫酸（ H_2SO_4 ）。

4.1.8 氯化钠（ $NaCl$ ）。

4.2 溶液配制

4.2.1 硫酸水溶液（pH2.5）：1滴硫酸加入100 mL水中，调节水pH为2.5。

4.2.2 磷酸盐缓冲溶液（pH7）：6.7 g磷酸二氢钾和1.2 g氢氧化钠溶解于1 L水中。

4.2.3 0.15%甲酸溶液：移取0.15 mL甲酸，用水稀释至100 mL。

4.3 标准品

4.3.1 赤霉酸标准品（gibberellic acid, CAS NO. 为77-06-5, $C_{19}H_{22}O_6$ ）：纯度 $\geq 98\%$ 。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 赤霉酸标准储备溶液：称取适量标准品，用甲醇溶解，溶液浓度为100 $\mu g/mL$ 。0°C~4°C冷藏避光保存。有效期三个月。

4.4.2 标准工作溶液：根据需要用空白样品溶液将标准储备液稀释成4、5、10、100和150 ng/mL 的标准工作溶液，相当于样品中含有8 $\mu g/kg$ 、10 $\mu g/kg$ 、20 $\mu g/kg$ 、200 $\mu g/kg$ 、300 $\mu g/kg$ 赤霉酸。临用前配制。

4.5 材料

4.5.1 有机相微孔滤膜：0.45 μm 。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平：分析天平：感量0.01 g和0.0001 g。

- 5.3 pH计。
5.4 旋转蒸发器。
5.5 旋涡混合器。
5.6 离心机:4 000 r/min。

6 试样制备与保存

从所取全部样品中取出有代表性样品约 500 g, 取样部位按 GB 2763 附录 A 执行, 用粉碎机粉碎, 混合均匀, 均分成两份, 分别装入洁净容器作为试样, 密封, 并标明标记。将试样于-18℃ 冷冻保存。在抽样和制样的操作过程中, 应防止样品污染或发生残留物含量的变化。

7 测定步骤

7.1 提取

称取5 g试样(精确到0.01 g)置于50 mL塑料离心管中, 加入25 mL乙腈和2 g氯化钠, 涡旋1 min, 以4 000 r/min离心5 min, 将上层乙腈提取液转移至浓缩瓶中, 下层溶液再用20 mL乙腈提取一次, 合并乙腈提取液, 在45℃以下水浴减压浓缩至近干, 用10 mL硫酸水溶液将残渣转移至50 mL塑料离心管中, 加入20 mL乙酸乙酯, 涡旋1 min, 以4 000 r/min离心5 min, 乙酸乙酯转移至另一50 mL塑料离心管中, 再加入20 mL乙酸乙酯, 重复上述操作, 合并乙酸乙酯提取液, 加入10 mL磷酸盐缓冲溶液, 涡旋, 以4 000 r/min离心5 min, 分取磷酸盐缓冲盐溶液, 乙酸乙酯层中再加入10 mL磷酸盐缓冲溶液提取一次, 合并磷酸盐缓冲溶液, 滴加50%硫酸溶液调节溶液pH为2.5±0.2, 加入20 mL乙酸乙酯, 涡旋1 min, 以4 000 r/min离心5 min, 将上层乙酸乙酯转移至浓缩瓶中, 磷酸盐缓冲盐溶液层中再加入20 mL乙酸乙酯提取一次, 合并乙酸乙酯提取液在45℃以下水浴减压浓缩至近干, 加10.0 mL甲醇-水(1+1, 体积比)溶解残渣, 混匀, 过0.45 μm滤膜, 供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱-质谱/质谱

液相色谱-质谱/质谱参考条件如下:

- 色谱柱: C₁₈ 柱, 150 mm×4.6 mm(i.d), 5μm 或相当者; -
- 流动相: 乙腈-0.15%甲酸水溶液(35+65, 体积比);
- 流速: 0.4 mL/min;
- 进样量: 30 μL;
- 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;
- 雾化气、气帘气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气; 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求, 参考条件参见附录A表A.1;

7.2.2 液相色谱-质谱/质谱测定

根据样液中赤霉酸的含量情况, 选定响应值适宜的标准工作液进行色谱分析, 标准工作液应有五个浓度水平。待测样液中赤霉酸的响应值均应在仪器检测的工作曲线范围内。在上述色谱条件下, 赤霉酸的参考保留时间约为 4.9 min。标准溶液的选择性离子流图参见附录 B 中图 B.1。

7.2.3 液相色谱-质谱/质谱确证

按照上述条件测定样品和标准工作液, 如果检测的质量色谱峰保留时间与标准工作液一致, 允许偏差小于±2.5%; 定性离子对的相对丰度与浓度相当标准工作液的相对丰度一致, 相对丰度允许偏差不超过表 1 规定, 则可判断样品中存在相应的被测物。

表 1 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对丰度(基峰)	>50 %	>20 %至 50 %	>10 %至 20 %	≤10 %
允许的相对偏差	±20 %	±25 %	±30 %	±50 %

7.3 空白试验

除不加试样外, 均按上述操作步骤进行。

8 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算试样中赤霉酸残留含量, 计算结果需扣除空白值:

$$X = \frac{C_i \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中赤霉酸的残留量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C_i —— 从标准曲线上得到的赤霉酸浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V —— 样液最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —— 最终样液代表的试样质量，单位为克（ g ）。

注：计算结果须扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

9.1 在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与其算术平均值的比值（百分率），应符合附录D的要求。

9.2 在再现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与其算术平均值的比值（百分率），应符合附录E的要求。

10 定量限和回收率

10.1 定量限

本方法的定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 回收率

在不同添加水平条件下的回收率数据见附录C。

附录 A
(资料性附录)

API 4000 LC-MS/MS系统电喷雾离子源参考条件

监测离子对及电压参数

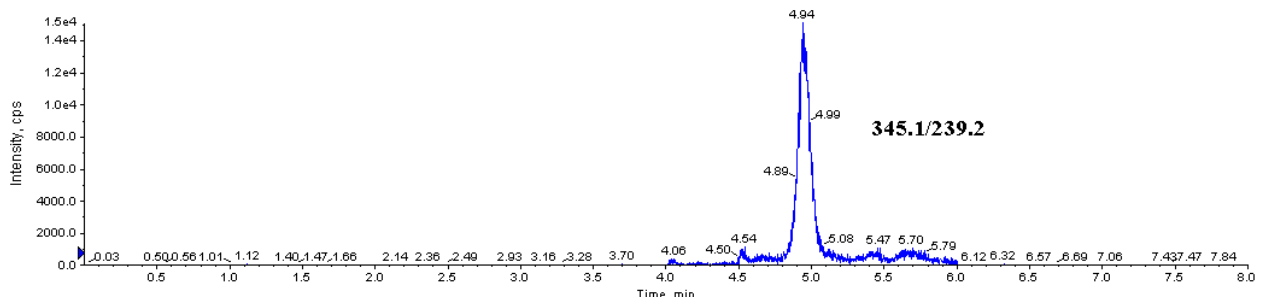
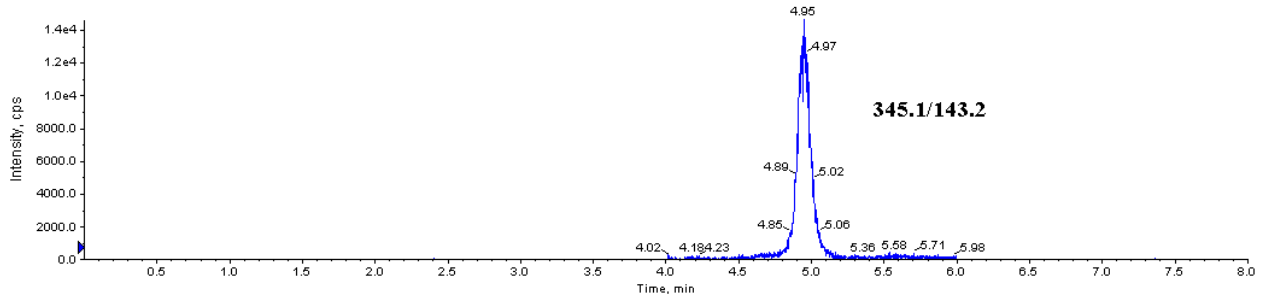
- a) 电喷雾电压(IS): -4500 V;
- b) 雾化气压力(GS1): 241.15 kPa(35 psi);
- c) 气帘气压力(CUR): 172.25 kPa(25 psi);
- d) 辅助气流速(GS2): 310.05 kPa (45 psi);
- e) 离子源温度(TEM): 550°C;
- f) 碰撞气(CAD): 6;
- g) 离子对、去簇电压 (DP)、碰撞气能量 (CE) 及碰撞室出口电压 (CXP) 见A. 1。

表 A.1 离子对、去簇电压、碰撞气能量和碰撞室出口电压

名称	母离子 <i>m/z</i>	子离子 <i>m/z</i>	去簇电压 (DP) V	碰撞气 能量 (CE) V	碰撞室出口 电压 (CXP) V
赤霉 酸	345.1	239.2*	-45 v	-21	-11 v
		143.2		-34	
注：“*”为定量离子					

非商业性声明：附录表B所列参数是在API 4000质谱仪完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

附录 B
(资料性附录)
赤霉酸标准品选择性离子流图



图B.1赤霉酸 (5 ng/mL) 标准品的选择性离子流图

附 录 C
(资料性附录)
样品的添加浓度及回收率的实验数据

表C.1 样品的添加浓度及回收率的实验数据

基质	添加浓度/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	回收率范围/%	精密度范围/%
苹果	10	70.4~98.7	7.5
	20	70.8~100.8	5.2
	200	70.3~106.0	3.2
桔子	10	74.0~97.4	4.2
	20	74.0~97.5	4.3
	200	75.2~103.6	7.1
桃子	10	71.6~99.3	13.7
	20	73.8~102.8	10.5
	200	71.6~103.0	12.6
梨	10	70.4~109.0	5.3
	20	73.3~102.2	8.8
	200	73.7~101.0	5.7
葡萄	10	70.2~98.3	13.0
	20	70.3~98.1	9.4
	200	70.0~102.0	8.9

附 录 D
(规范性附录)
实验室内重复性要求

表 D.1 实验室内重复性要求

被测组分含量 mg/kg	精密度 %
≤ 0.001	36
$> 0.001 \leq 0.01$	32
$> 0.01 \leq 0.1$	22
$> 0.1 \leq 1$	18
> 1	14

附 录 E
(规范性附录)
实验室间再现性要求

表 E.1 实验室间再现性要求

被测组分含量 mg/kg	精密度 %
≤ 0.001	54
$> 0.001 \leq 0.01$	46
$> 0.01 \leq 0.1$	34
$> 0.1 \leq 1$	25
> 1	19