

附件：9



中华人民共和国国家标准

GB××××—××××

食品安全国家标准

植物源性食品中灭瘟素残留量的测定

液相色谱-质谱联用法

National food safety standard

determination of blasticidin-S residues in foods of plant origin

liquid chromatography tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

201×-××-××发布

201×-××-××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

本标准首次发布。

征求意见稿

食品安全国家标准

植物源性食品中灭瘟素残留量的测定 液相色谱-质谱联用法

1 范围

本标准规定了植物源性食品中灭瘟素（blasticidin-S）残留量的液相色谱-质谱联用测定方法。

本标准适用于植物源性食品中灭瘟素农药残留量的测定。

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

试样中灭瘟素用乙酸水溶液萃取，再经净化处理后，采用液相色谱-质谱联用法检测，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙酸（ CH_3COOH ，CAS 号：64-19-7），色谱纯。

4.1.2 乙腈（ CH_3CN ，CAS 号：75-05-8），色谱纯。

4.1.3 甲酸（ HCOOH ，CAS 号：64-18-6），色谱纯。

4.1.4 甲酸铵（ HCOONH_2 ，CAS 号：540-69-2）。

4.1.5 甲醇（ CH_3OH ，CAS 号：67-56-1），色谱纯。

4.2 溶液配制

4.2.1 乙腈溶液（10+90）：将 100 mL 乙腈加入到 900 mL 水中，混匀。

4.2.2 乙酸-乙腈-水（2+10+88）：将 2 mL 乙酸、10 mL 乙腈加入到 88 mL 水中，混匀。

4.2.3 甲酸-甲醇溶液（10+90）：将 100 mL 甲酸加入到 900 mL 甲醇中，混匀。

4.2.4 20 mmol/L甲酸铵水溶液 (pH=3.5)：称取0.385g乙酸铵溶解于适量水中，用水定容至1000 mL，用乙酸调PH至3.5。

4.3 标准品

灭瘟素标准品 (C₁₇H₂₆N₈O₅, CAS 号：2079-00-7)，纯度≥99.6%。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备溶液 (100 mg/L)：准确称取 10 mg (精确到 0.1 mg) 灭瘟素标准品于 50 mL 烧杯中，用乙腈溶液 (4.2.1) 溶解并转移至 100 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混匀，-18℃冷冻避光保存，有效期 3 个月。

4.4.2 标准工作溶液 (10 mg/L)：吸取 1 mL 标准储备溶液，加到 10 mL 容量瓶中，用乙腈溶液 (4.2.1) 定容，-18℃冷冻避光保存，有效期 1 个月。

4.5 材料

4.5.1 固相萃取柱：弱阳离子交换固相萃取小柱 (500 mg/6 mL，带羧基官能团的弱阳离子交换柱)。

4.5.2 滤膜：0.22 μm，水系。

4.5.3 十八烷基键合硅胶 (C18)：40 μm ~ 60 μm。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱：带电喷雾离子源 (ESI)。

5.2 分析天平：感量 0.000 1 g 和感量 0.0 1 g。

5.3 组织捣碎机。

5.4 离心机：转速不低于 10000 r/min。

5.5 旋转蒸发器。

5.6 振荡混合器 (1200 次/min)。

5.7 涡旋混合器。

6 试样制备

蔬菜、水果和食用菌样品按相关标准取一定量，取样部位按GB 2763规定执行。对于个体较小的样品，取样后全部处理；对于个体较大的基本均匀样品，可在对称轴或对称面上分割或切成小块后处理；对于细长、扁平或组分含量在各部分有差异的样品，可在不同部位切取小片或截成小段处理；取后的样品将其切碎，充分混匀，用四分法取样或直接放入组织捣碎机中捣碎成匀浆。匀浆放入聚乙烯容器中。

取谷类样品500 g，粉碎后使其全部可通过425 μm 的标准网筛，放入聚乙烯瓶或袋中。取油料作物、茶叶、坚果和香辛料样品各500g，粉碎后充分混匀，放入聚乙烯瓶或袋中。

植物油类搅拌均匀。

试样于-18℃以下温度条件下保存。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 谷类、茶叶、香辛料、坚果、植物油

称取5 g(精确到0.01 g)试样于100 mL离心管中，参见附录A补水，涡旋振荡2 min。加入20 mL 乙酸-乙腈-水溶液(4.2.2)，涡旋2 min，振荡提取30 min后，以8 000 r/min转速离心10 min，倾出上清液，向装残渣的离心管中加入20 mL乙酸-乙腈-水溶液(4.2.2)重复上述提取步骤两次，合并上清液，用提取液定容至100 mL，混匀，待净化。

7.1.2 水果、蔬菜、食用菌

称取20 g(精确到0.01 g)试样于100 mL离心管中，按照附录A所列基质含水量补水，涡旋振荡2 min，加入20 mL乙酸-乙腈-水溶液(4.2.2)，涡旋2 min，振荡提取30 min后，以8000 r/min离心10 min，倾出上清液，向装残渣的离心管中加入20 mL乙酸-乙腈-水溶液(4.2.2)，重复上述提取步骤两次，合并提取液，用提取液定容至100 mL，混匀，待净化。

7.2 净化

7.2.1 谷类、茶叶、香辛料、坚果、植物油

用弱阳离子交换固相萃取小柱净化，固相萃取小柱分别用水、甲醇、水各5 mL进行活化后，吸20 mL提取液上样过柱，分别用5 mL水，5 mL甲醇淋洗，抽干淋洗液，最后用10 mL甲酸-甲醇溶液(4.2.3)进行洗脱，洗脱液收集至50 mL梨形瓶中，于40℃条件下旋转蒸干，用乙酸-乙腈-水溶液(4.2.2)溶解并转移至5 mL容量瓶中，用乙酸-乙腈-水溶液(4.2.2)定容至5 mL，过0.22 μm 微孔滤膜后，待测。

7.2.2 水果、蔬菜、食用菌

从提取液中吸取5 mL放入10 mL离心管中，加入100 mg的C18粉，涡旋3 min后，以8000 r/min的速度离心10 min，取上清液过0.22 μm 微孔滤膜后，待测。

7.3 仪器参考条件

7.3.1.液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: HILIC 100 mm×2.1 mm (内径), 1.7 μm 或相当者;
- b) 柱温: 室温;
- c) 流动相: A: 20 mmol/L 甲酸铵水溶液 (pH=3.5) B: 乙腈, 流动相梯度洗脱条件见表 1;
- d) 流速: 0.25 mL/min
- e) 进样量: 10 μL;

表 1 梯度洗脱条件 (V_A+V_B)

时间 min	流动相 V _A	流动相 V _B
0	10	90
0.5	10	90
2.0	30	70
4.5	90	10
5.0	10	90

7.3.2. 质谱参考条件

- a) 离子源类型: 电喷雾离子源;
- b) 喷雾电压: 2.8 kV;
- c) 毛细管温度: 550 °C;
- d) 雾化气流量: 600 L/h;
- e) 碰撞气类型: 氮气;
- f) 扫描方式: 正离子扫描;
- g) 检测方式: 多反应监测 (MRM), 监测条件见表 2。

表 2 灭瘟素多反应监测 (MRM) 的条件

化合物	定性离子对	定量离子对	锥孔电压 (volts)	碰撞能量 (volts)
灭瘟素	423.2/312.2	423.2/312.2	70	22
	423.2/171.2		70	29

7.3 基质标准工作曲线的配制

通过 7.1 和 7.2 制得空白基质溶液, 将标准中间溶液稀释成质量浓度为 0.01 μg/mL、0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL 和 0.2 μg/mL 的系列基质标准溶液, 基质标准溶液应现配现用。以测得峰面积为纵坐标, 对应的标准溶液质量浓度为横坐标, 绘制标准曲线, 求回归方程和相关系数。

7.5 定性及定量

7.5.1 保留时间

被测试样中灭瘟素色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在 $\pm 2.5\%$ 之内。

7.5.2 定量离子、定性离子及子离子丰度比

在相同实验条件下进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致，并且在扣除背景后的样品质谱图中，目标化合物的质谱定性离子应出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与质量浓度相当的标准溶液相比，其相对偏差不超过表 3 规定的范围，则可判断样品中存在灭瘟素。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许相对偏差

相对离子丰度 (%)	> 50	> 20~50	> 10~20	≤ 10
允许的最大偏差 (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

7.6 试样溶液的测定

将基质标准溶液和待测溶液分别注入液相色谱-质谱联用仪中，以保留时间和定性离子定性，外标法定量。样品中灭瘟素质量浓度应在标准工作曲线质量浓度范围内，超过标准工作曲线最高点的则应稀释后再进行分析。

7.7 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的测定步骤等进行平行操作。

8 结果计算

试料中灭瘟素残留量以质量分数 ω 计，单位以毫克每千克(mg/kg)表示，按公式(1)计算：

$$\omega = \frac{V_1 \times A_i \times V_3}{V_2 \times A_{si} \times m} \times \rho \dots \dots \dots (1)$$

式中：

ω —试样中灭瘟素残留量，单位为毫克每千克 (mg/kg)；

ρ —标准溶液中灭瘟素的质量浓度，单位为毫克每升(mg/L)；

A_i —样品溶液中灭瘟素的峰面积；

A_{si} —农药标准溶液中灭瘟素的峰面积；

V_1 —提取溶剂总体积，单位为毫升(mL)；

V_2 —用于净化的提取溶液体积，单位为毫升(mL)；

V_3 —样品溶液定容体积，单位为毫升(mL)；

m —试样的质量，单位为克(g)；

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，保留两位有效数字，当计算结果大于 1 mg/kg 时保留三位有效数字。

9 精密度

9.1 在重复性条件下，两次独立测定结果的绝对差不大于重复性限 (r)，重复性限 (r) 的数据为：
质量含量为 0.05 mg/kg 时，重复性限 (r) 为 0.0639；

质量含量为 0.1 mg/kg 时，重复性限 (r) 为 0.179；

质量含量为 0.2 mg/kg 时，重复性限 (r) 为 0.482。

9.2 在再现性条件下，两次独立测定结果的绝对差不大于再现性限 (R)，再现性限 (R) 的数据为：

质量含量为 0.05 mg/kg 时，再现性限 (R) 为 0.0181；

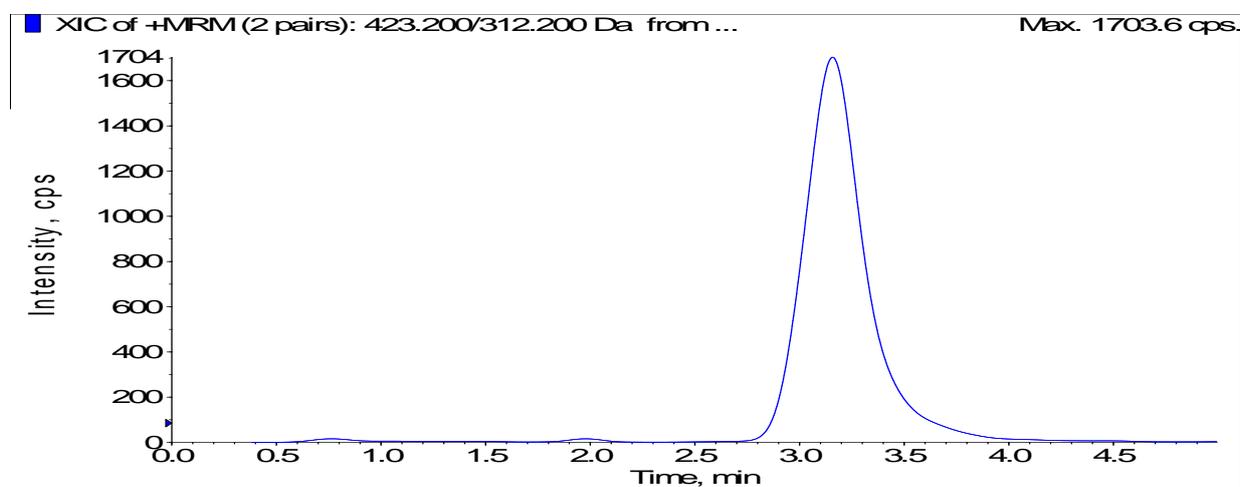
质量含量为 0.1 mg/kg 时，再现性限 (R) 为 0.0432；

质量含量为 0.5 mg/kg 时，再现性限 (R) 为 0.100。

10 其他

方法的定量限为 0.05 mg/kg。

11 图谱

图1 灭瘟素标准溶液 (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 色谱图

附 录 A
(资料性附录)

所选基质含水量、称样量及提取前补水量信息表

表 A.1 所选基质含水量、称样量及提取前补水量信息表

基质名称	含水量 %	称样量 g	提取前补水量 g
结球甘蓝	85	20	3.0
芹菜	95	20	1.0
番茄	95	20	1.0
茄子	90	20	2.0
马铃薯	80	20	4.0
萝卜	95	20	1.0
菜豆	75	20	5.0
韭菜	85	20	3.0
苹果	85	20	3.0
桃	90	20	2.0
葡萄	80	20	3.0
柑橘	85	20	3.0
香蕉	75	20	5.0
木瓜	90	20	2.0
香菇	90	20	2.0
杏仁	<10	5	10
大豆油	<10	5	10
糙米	<10	5	10
小麦	<10	5	10
玉米	<10	5	10
花生	<10	5	10
绿茶	<10	2	10
花椒	<10	2	10

注¹：不包含在本表中的基质可根据其含水量测试结果进行补水。
注²：按照基质含水量补水至10g。