

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 666—2023

沃柑中春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐残 留量的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of kasugamycin or iminoctadine tris(albesilate) residues
in orah — Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2023 - 12 - 29 发布

2024 - 01 - 04 实施

广西标准化协会 发 布

前 言

本文件参照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。

本文件由广西分析测试协会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西博测检测技术服务有限公司、广西壮族自治区产品质量检验研究院、广西益谱检测技术有限公司、广西绿保环境监测有限公司、农业农村部亚热带果品蔬菜质量检验检测中心、广西壮族自治区分析测试研究中心、百色市检验检测中心、广西众晟生物科技有限公司、广西东盟食品检验检测中心、广西壮族自治区林业科学研究院、南宁市武鸣区经济作物技术服务中心、横州市综合检验检测中心、广西工商学校、崇左市江州区农业农村局、钦州市钦北区农业技术推广站、鹿寨县农业技术推广中心。

本文件主要起草人：苏丽梅、何京明、覃当麟、石梁稳、黄秋琳、黄勇明、韦东、刘守廷、黄芳、潘泳花、杜寒春、陈侣桦、杨旭萍、黄伍艳、黄庐聪、吕丽兰、廖燕玲、张思敏、韦升坚、曾永明、唐念念、邓玉秀、易祚锋、唐标、周信力、黄守健、农振炼、韦仕伟、陈喜强、廖武放、何小娟、黄莹颖、刘素华、李灿玲、余芙蓉。

沃柑中春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了沃柑中春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐残留量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于沃柑中春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐残留量的测定。

本文件春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐(以双胍辛胺计)的检出限分别为0.006 mg/kg和0.0015 mg/kg; 定量限分别为0.02 mg/kg和0.005 mg/kg。

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 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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品中残留物经甲酸水溶液提取,HLB固相萃取柱净化后,分别经SCX固相萃取柱、WCX固相萃取柱净化,液相色谱-串联质谱法检测,外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂为分析纯以上试剂,水为GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN , CAS 号: 75-05-8): 色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH , CAS 号: 67-56-1): 色谱纯。

5.1.3 甲酸(HCOOH , CAS 号: 64-18-6): 色谱纯。

5.1.4 盐酸(HCl , CAS 号: 7647-01-0): 浓度 36%~38%。

5.1.5 氨水(NH_4OH , CAS 号: 1336-21-6): 浓度 22%~25%。

5.1.6 二氯甲烷(CH_2Cl_2 , CAS 号: 75-09-2): 色谱纯。

5.1.7 甲酸铵(HCO_2NH_4 , CAS 号: 540-69-2): 色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 甲酸溶液(0.2%): 移取 2 mL 甲酸(5.1.3), 用水稀释至 1 000 mL, 摇匀备用。

5.2.2 乙腈溶液(1+3, V/V): 量取 10 mL 乙腈(5.1.1), 加入 30 mL 水, 摇匀备用。

5.2.3 乙腈-水酸性溶液(1+2, V/V, 0.1%甲酸): 量取 50 mL 乙腈(5.1.1), 加入 100 mL 水和 0.15 mL 甲酸(5.1.3), 摇匀备用。

5.2.4 甲酸-乙腈溶液(1+9, V/V): 量取 10 mL 甲酸(5.1.3), 加 90 mL 乙腈(5.1.1) 稀释, 摇匀备用。

5.2.5 盐酸溶液(30 mmol/L): 移取 0.25 mL 盐酸(5.1.4), 用水稀释, 定容至 100 mL。

5.2.6 氨水-甲醇溶液(5+95, V/V): 量取 50 mL 氨水(5.1.5), 加入 950 mL 甲醇(5.1.2), 摇匀

备用。

5.2.7 甲酸（0.4%）-甲酸铵（5 mmol/L）酸性水溶液：称取 0.3153 g 甲酸铵（5.1.7），溶于 100 mL 水，加入 4 mL 甲酸（5.1.3），用水定容至 1 000 mL，摇匀，过 0.22 μm 微孔过滤膜，现用现配。

5.2.8 甲酸-甲醇溶液（0.4%）：移取 4 mL 甲酸（5.1.3），用甲醇（5.1.2）定容至 1 000 mL，摇匀，过 0.22 μm 微孔过滤膜，现用现配。

5.3 标准品

5.3.1 春雷霉素盐酸盐标准品（ $C_{14}H_{25}N_3O_9 \cdot HCl \cdot H_2O$ ，CAS 号：200132-83-8）：纯度 $\geq 96\%$ ，或有标准物质证书的春雷霉素标准溶液。

5.3.2 双胍三辛烷基苯磺酸盐标准品（ $C_{72}H_{131}N_7O_9S_3$ ，CAS 号：169202-06-6）：纯度 $\geq 99\%$ ，或双胍辛胺醋酸盐标准品（ $C_{24}H_{53}N_7O_6$ ，CAS 号：57520-17-9）：纯度 $\geq 99\%$ ，或有标准物质证书的双胍辛胺标准溶液。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 春雷霉素标准储备溶液（1 000 mg/L）

准确称取 11.9 mg 的春雷霉素盐酸盐标准品（5.3.1）（精确至 0.1 mg）于 10 mL 容量瓶中，用乙腈溶液（5.2.2）溶解，定容至刻度，避光于 0℃~4℃ 贮存，有效期 6 个月。

5.4.2 双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）标准储备溶液（1 000 mg/L）

准确称取 37.5 mg 的双胍三辛烷基苯磺酸盐（或 15.1 mg 双胍辛胺醋酸盐）标准品（5.3.2）（精确至 0.1 mg）于 10 mL 聚丙烯容量瓶中，用甲醇（5.1.2）溶解并定容至刻度，避光于 -18℃ 及以下条件贮存，有效期 6 个月。

注：双胍三辛烷基苯磺酸盐溶液不用玻璃容器存放。

5.4.3 混合标准溶液

分别移取 1.0 mL 上述标准储备溶液（5.4.1 和 5.4.2）于 10 mL 塑料容量瓶中，用乙腈-水酸性溶液（5.2.3）定容配制成 100 mg/L 的混合标准溶液，再用乙腈-水酸性溶液（5.2.3）逐级稀释，分别配制 10 mg/L 和 1 mg/L 的混合标准溶液，于 0℃~4℃ 贮存，有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 SCX 固相萃取柱：500 mg，6 mL 或相当者。

5.5.2 HLB 固相萃取柱：500 mg，6 mL 或相当者。

5.5.3 WCX 固相萃取柱：500 mg，3 mL 或相当者。

5.5.4 微孔过滤膜（有机相）：0.22 μm 或相当者。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量 0.01 mg 和感量 0.01 g。

6.3 组织捣碎仪。

6.4 涡旋振荡仪。

6.5 离心机：转速不低于 4 500 r/min，配聚丙烯离心管。

6.6 氮吹仪。

7 样品制备

沃柑样品取样部位按照 GB 2763 的规定执行。随机取样 2 kg，每个果实（去柄）十字对称切开为 4 片，取对角 2 片放入组织捣碎机中捣碎成匀浆，分取 400 g~500 g 放入带盖的无色聚乙烯容器内，贴好标签。若不能立即检验，于 -18℃ 及以下条件储存。

8 试验步骤

8.1 提取

称取10 g样品（精确至0.01 g）于50 mL离心管中，加入10 mL甲酸溶液（5.2.1），再加入5 mL二氯甲烷（5.1.6），涡旋振荡5min后，以4500r/min离心5min，上清液转移至25mL容量瓶中。再加入10mL甲酸溶液（5.2.1），重复提取一次，合并上清液，用甲酸溶液（5.2.1）定容至25 mL。

8.2 净化

8.2.1 HLB 固相萃取柱净化

HLB固相萃取柱依次用5 mL甲醇（5.1.2）、5 mL甲酸溶液（5.2.1）和2 mL提取液（8.1）预洗，弃去淋洗液，取7 mL提取液（8.1）过柱，接收净化液。

8.2.2 SCX 固相萃取柱净化

SCX固相萃取柱依次用5 mL甲醇（5.1.2）、5 mL水、5 mL盐酸溶液（5.2.5）预洗，弃去淋洗液。移取3.0 mL净化液（8.2.1）过SCX固相萃取柱，待净化液流尽，弃去。依次用5 mL水、5 mL甲醇（5.1.2）淋洗，弃去淋洗液。用10 mL甲醇-氨水溶液（5.2.6）洗脱吸附在SCX固相萃取柱上的目标物，并收集至15 mL离心管中，于45 °C水浴氮吹近干。冷却至室温，用1.0 mL乙腈-水酸性溶液（5.2.3）溶解残留物，经0.22 μm微孔滤膜过滤后备用。

8.2.3 WCX 固相萃取柱净化

WCX固相萃取柱依次用5 mL甲醇（5.1.2）和5 mL水预洗，弃去淋洗液。移取3.0 mL净化液（8.2.1）过WCX固相萃取柱，待净化液流尽，弃去。依次加入5 mL水、5 mL甲醇（5.1.2）淋洗，弃去淋洗液。再用10 mL甲酸-乙腈溶液（5.2.4）洗脱吸附在WCX固相萃取柱上的目标物，并收集至15 mL离心管中；于45 °C水浴氮吹近干，冷却至室温，用1.0 mL乙腈-水酸性溶液（5.2.3）溶解残留物，经0.22 μm微孔滤膜过滤入聚丙烯进样瓶后备用。

8.3 测定

8.3.1 只测定春雷霉素，8.2.2 过膜后直接测定；只测定双胍三辛烷基苯磺酸盐，8.2.3 过滤后直接测定。同时测定春雷霉素和双胍三辛烷基苯磺酸盐时，分别移取 0.5 mL 备用液（8.2.2）和 0.5 mL 备用液（8.2.3）于聚丙烯进样瓶，涡旋混匀后测定。

8.3.2 液相色谱条件

液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C18-AQ 2.1 mm×100 mm 粒径 1.9 μm 或相当者；
- 流动相：A 相为甲酸（0.4%）-甲酸铵（5 mmol/L）酸性水溶液（5.2.7），B 相为甲酸-甲醇溶液（5.2.8），流动相及其梯度条件见表1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40 °C；
- 进样量：3 μL。

表1 流动相及其梯度条件

时间	流动相A(%)	流动相B(%)
0.00	95	5
3.00	95	5
3.10	5	95
6.00	5	95
6.01	95	5
10.00	95	5

8.3.3 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 离子源类型：电喷雾离子源；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 电喷雾电压：正离子 4 000 V；
- 离子源温度：300 ℃；
- 雾化气压力：0.242 MPa；
- 辅助加热气压力：0.242 MPa；
- 检测方式：多反应监测，春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）的保留时间、母离子、子离子及质谱参数，参见表 2。

表2 春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）的保留时间、母离子、子离子及质谱参数

序号	中文名	英文名	电离方式	保留时间 (min)	去簇电压 (V)	离子对 I (定量) (m/z)	碰撞能 (V)	离子对 II (定性) (m/z)	碰撞能 (V)
1	春雷霉素	Kasugamycin	正	0.788	95	380.3/112.2	18	380.3/200.2	8
2	双胍辛胺	Iminoctadine	正	4.348	120	178.9/157.7	15	178.9/100.3	16

8.3.4 标准工作曲线

空白样品按照8.1、8.2进行前处理得到空白基质溶液。精确吸取一定量的混合标准溶液（5.4.3），逐级用空白基质溶液稀释成质量浓度为0.002mg/L、0.005mg/L、0.010mg/L、0.020mg/L、0.050mg/L、0.100 mg/L、0.200 mg/L、0.500 mg/L的基质匹配标准工作溶液，或逐级用空白基质溶液稀释成质量浓度与样液中浓度相近的标准品系列工作溶液，根据仪器性能和检测需要选择不少于5个浓度点。以定量离子离子的质量色谱图面积为纵坐标、相对应的基质匹配标准工作溶液质量浓度为横坐标，绘制基质匹配标准工作曲线。

8.3.5 定性

被测样品中目标物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±2.5%之内。且检测到的离子相对丰度，应当与浓度相当的校正标准溶液相对丰度一致，其允许偏差不超过表3规定的范围，则可判断样品中存在目标物。春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）标准溶液的LC-MS/MS多反应监测质量色谱图参见附录A。

表3 定性时离子丰度比的最大允许偏差

单位为百分比				
离子丰度比	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许相对偏差	±20	±25	±30	±50

8.3.6 定量。

将基质匹配标准工作溶液和样品溶液经由液相色谱-串联质谱仪检测，根据保留时间、离子丰度比进行定性；根据测得定量离子离子的质量色谱图峰面积与标准图峰面积比较进行定量。同时进行空白试验。

9 试验数据处理

样品中各农药残留量以质量分数W计，按公式(1)计算。

$$W = \frac{(\rho - \rho_0) \times V_1 \times V_3 \times f}{m \times V_2} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- W ——样品中各被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- ρ ——从基质匹配标准工作曲线中得到的样品溶液中被测物的质量浓度的数值，单位为毫克每升（mg/L）；

ρ_0 ——从基质匹配标准工作曲线中得到的空白试验溶液中被测物的质量浓度的数值，单位为毫克每升(mg/L)；

V_1 ——样品提取液总体积，单位为毫升(mL)；

V_3 ——SCX固相萃取柱净化、WCX固相萃取柱净化后样液的最终定容体积，单位为毫升(mL)；

f ——同时测定春雷霉素和双胍三辛烷基苯磺酸盐，等体积混合定容时稀释倍数， $f=2$ ：如果只测春雷霉素或只测双胍三辛烷基苯磺酸盐，直接用净化后样液测定， $f=1$ 。

m ——样品质量的数值，单位为克(g)；

V_2 ——SCX固相萃取柱净化、WCX固相萃取柱净化移取的净化液体积，单位为毫升(mL)；

计算结果 <1 mg/kg保留2位有效数字，当结果 ≥ 1 mg/kg保留3位有效数字。

10 精密度

- 10.1 在重复性条件下获得的两次独立测定结果的相对标准偏差，应符合表4的要求。
- 10.2 在再现性条件下获得的两次独立测定结果的相对标准偏差，应符合表4的要求。

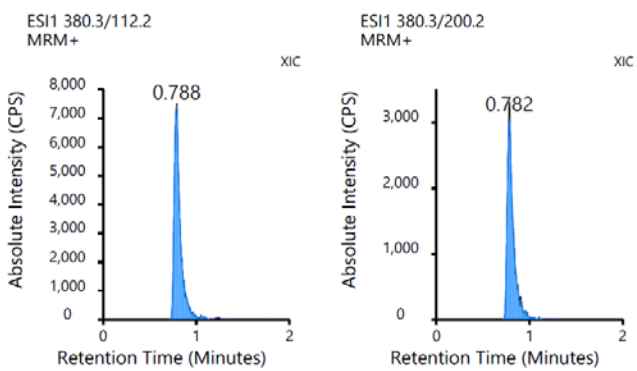
表4 目标分析物质量分数范围内的重复性、再现性相对标准偏差的要求

质量分数 (ρ)	重复性相对标准偏差	再现性相对标准偏差
$\rho \leq 0.001$ mg/kg	$\leq 30\%$	$\leq 40\%$
0.001 mg/kg $< \rho \leq 0.01$ mg/kg	$\leq 20\%$	$\leq 30\%$
0.01 mg/kg $< \rho \leq 0.1$ mg/kg	$\leq 15\%$	$\leq 20\%$
0.1 mg/kg $< \rho \leq 10\,000$ mg/kg	$\leq 10\%$	$\leq 15\%$

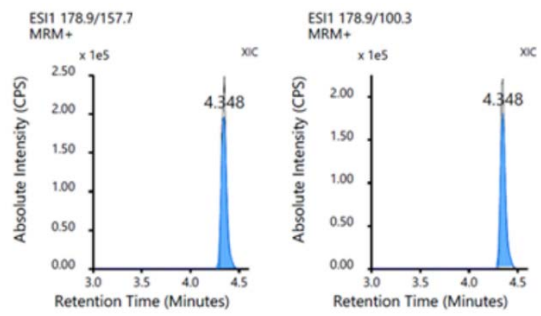
附录 A
(资料性)

春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）标准溶液多反应监测（MRM）质量色谱图

春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）标准溶液多反应监测（MRM）质量色谱图见图 A.1、图A.2。



图A.1 春雷霉素标准溶液多反应监测（MRM）质量色谱图



图A.2 双胍三辛烷基苯磺酸盐（以双胍辛胺计）标准溶液多反应监测（MRM）质量色谱图

中华人民共和国团体标准
沃柑中春雷霉素、双胍三辛烷基苯磺酸盐残留量的测定
液相色谱-串联质谱法
T/GXAS 666—2023
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究