



中华人民共和国国家标准

GBxxxx—20xx

食品安全国家标准
鱼可食性组织中水杨酸残留量的测定
液相色谱-串联质谱法

National food safety standard-

Determination of salicylic acid residue in edible tissues of fish
by liquid chromatography- tandem mass spectrometry

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx发布

xxxx-xx-xx实施

中华人民共和国农业农村部
中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局

发布

征求意见稿

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。

征求意见稿

食品安全国家标准

鱼可食性组织中水杨酸残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了鱼可食性组织中水杨酸残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于鱼皮、肌肉中水杨酸残留量的测定。

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/T 30891 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中残留的水杨酸，用 5%甲酸乙腈溶液提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

5 试剂与材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.2 甲酸（HCOOH）：质谱级。

5.2 溶液配制

5.2.1 5%甲酸乙腈溶液：取甲酸 5 mL，用乙腈稀释至 100 mL。

5.2.2 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL。

5.3 标准品

水杨酸（Salicylic acid, C₇H₆O₃, CAS 号：69-72-7），水杨酸-D₄（Salicylic acid-D₄, C₇H₂D₄O₃, CAS 号：78646-17-0），含量均≥95%。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液：取水杨酸、水杨酸-D₄标准品各适量（相当于有效成分约 10 mg），精密称定，分别用乙腈溶解并稀释定容于 100 mL 容量瓶中，配制成浓度为 100 μg/mL 的水杨酸和水杨酸-D₄标准储备液，-18 ℃保存，有效期 3 个月。

5.4.2 标准工作液：分别精密量取 100 μg/mL 的水杨酸、水杨酸-D₄标准储备液各 1 mL，于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释至刻度，配制成浓度为 1 μg/mL 的水杨酸和水杨酸-D₄标准工作液，2~8 ℃保存，有效期 1 个月。

5.5 材料

5.5.1 微孔尼龙滤膜：0.22 μm。

5.5.2 增强型脂质去除固相萃取柱：300 mg/3 mL，或相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 振荡器。

6.5 高速冷冻离心机：10 000 r/min。

6.6 氮吹仪。

6.7 固相萃取装置。

7 试样的制备与保存

7.1 试样的制备

按GB/T 30891附录B的要求制样。

——取均质的供试样品，作为供试试样。

——取均质的空白样品，作为空白试样。

——取均质的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试样。

7.2 试样的保存

-18 ℃以下保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取试料（2±0.05）g，置于50 mL塑料离心管，添加水杨酸-D₄标准工作液40 μL，加5%甲酸乙腈溶液10.0 mL，涡旋混匀1 min，中速振荡提取5 min，4 ℃ 10000 r/min离心5 min。取上清液备用。

8.2 净化

将固相萃取柱安装到预先清洁过的真空萃取装置上,直接取上清液5.0 mL通过小柱,保持自然流速,收集全部流出液。40 °C水浴氮气吹至近干,加入0.1%甲酸溶液1.0 mL溶解残余物,涡旋混匀,过0.22 μm微孔滤膜,供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的制备

精密量取1 μg/mL的水杨酸、水杨酸-D₄标准工作液适量,用0.1%甲酸溶液稀释配制成水杨酸浓度分别为2μg/L、5μg/L、10 μg/L、20μg/L、50μg/L、100μg/L、200 μg/L,水杨酸-D₄的浓度为20 μg/L的系列标准工作溶液,临用现配,供液相色谱-串联质谱测定。以测试药物和其对应的内标的特征离子质量色谱峰面积比为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈(150 mm×2.1 mm, 粒径 1.8 μm), 或相当者;
- b) 柱温: 30°C;
- c) 进样量: 10 μL;
- d) 流速: 0.3 mL/min;
- e) 流动相: A: 0.1%甲酸乙腈溶液; B: 0.1%甲酸溶液;
- f) 梯度洗脱: 流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 min	A: %	B: %
0.0	5	95
0.5	5	95
6	60	40
6.3	90	10
9.3	90	10
9.4	5	95
11.0	5	95

8.4.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾（ESI）离子源；
- b) 扫描方式：负离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测；
- d) 喷雾电压：-4500 V；
- e) 离子源温度：550 °C；
- f) 雾化气（Gas1）：379 kpa；
- g) 辅助加热气（Gas2）：234 kpa；
- h) 气帘气（Curtain gas）：241 kpa；
- i) 测试药物定性离子对、定量离子对及对应的去簇电压和碰撞能量见表 2。

表2 水杨酸的定性离子对、定量离子对及对应去簇电压和碰撞能量

被测物名称	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV
水杨酸	137.0>93.0	137.0>93.0	-20	-24
	137.0>65.0			-40
水杨酸-D ₄	141.0>97.0	141.0>97.0	-20	-24

8.4.3 测定法

8.4.3.1 定性测定

在相同测试条件下，试料溶液中水杨酸与其内标水杨酸-D₄的保留时间之比与标准溶液中水杨酸与其内标水杨酸-D₄的保留时间之比偏差在0.1min 以内；且检测到的相对离子丰度，应与浓度相当的校正标准溶液相对离子丰度一致，其允许偏差为±40%。

8.4.3.2 定量测定

取试料溶液和标准溶液，作单点或多点校准，按内标法定量。标准溶液及试料溶液中目标物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。在上述液相色谱-串联质谱条件下，标准溶液中各特征离子质量色谱图见附录A。

8.5 空白试验

取空白试料，除不加药物外，采用相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中水杨酸的残留量按标准曲线或公式（1）计算：

$$X = \frac{A_i \times A'_{is} \times C_s \times C_{is} \times V \times V_2}{A_{is} \times A_s \times C'_{is} \times V_1 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X — 试样中水杨酸残留量的数值，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

C_{is} — 试料溶液中水杨酸-D₄浓度的数值，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

C_s — 标准溶液中水杨酸浓度的数值，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

C'_{is} — 标准溶液中水杨酸-D₄浓度的数值，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

A_i — 试料溶液中水杨酸的峰面积；

A_{is} — 试料溶液中水杨酸-D₄的峰面积；

A_s — 标准溶液中水杨酸的峰面积；

A'_{is} — 标准溶液中水杨酸-D₄的峰面积；

V — 溶解残余物所用试料溶液体积的数值，单位为毫升 (mL)；

V_1 — 用于净化浓缩的提取液体积的数值，单位为毫升 (mL)；

V_2 — 提取液体积的数值，单位为毫升 (mL)；

m — 供试试料质量的数值，单位为克 (g)。

注：计算结果以平行测定结果的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

10 方法灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

本方法水杨酸的检出限为3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法水杨酸在10~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为70%~120%。

10.3 精密度

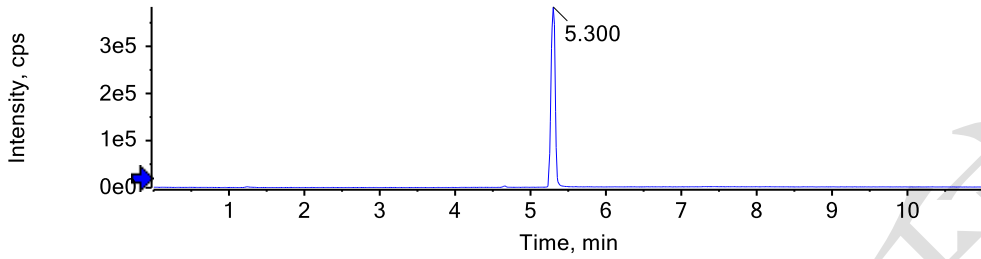
本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录A
(资料性)

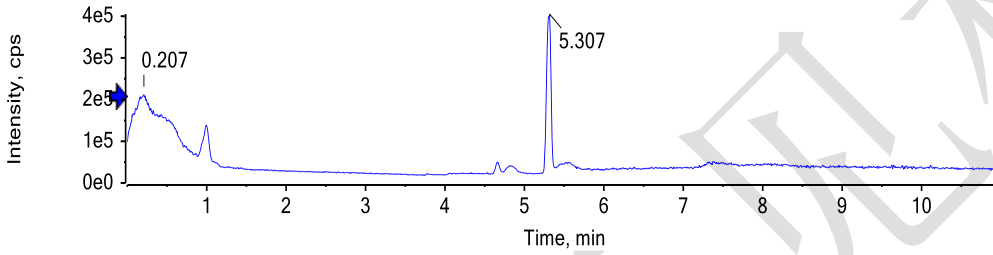
标准溶液特征离子质量色谱图

水杨酸标准溶液特征离子质量色谱图见图A.1。

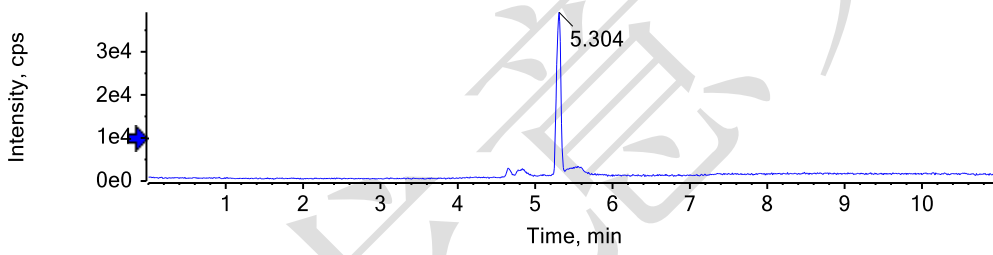
XIC from 20210824sa.wiff (sample 16) - s20ppb, -MRM (3 transitions): IS (141.0 / 97.0)



XIC from 20210824sa.wiff (sample 16) - s20ppb, -MRM (3 transitions): SA 1 (137.0 / 93.0)



XIC from 20210824sa.wiff (sample 16) - s20ppb, -MRM (3 transitions): SA 2 (137.0 / 65.0)



图A.1 水杨酸标准溶液特征离子质量色谱图 (20 $\mu\text{g/L}$)