

T/GZTPA

团体标准

T/GZTPA 0001- 2019

茶叶、茶青中赤霉酸残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of gibberellin acid residue in tea and tea leaves

Liquid chromatography tandem mass spectrometry

2019-12-26 发布

2020-01-01 实施

贵州省绿茶品牌发展促进会

发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由北京勤邦生物科技有限公司提出。

本标准由贵州省绿茶品牌发展促进会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、北京勤邦生物科技有限公司。

本标准主要起草人：金芬、王静、邵华、金茂俊、余永新、郑鹭飞、王珊珊、张鹏、李春梅、冯才伟、崔海峰。

T/GZTPA

茶叶、茶青中赤霉酸残留量的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了茶叶、茶青中赤霉酸残留量液相色谱-质谱/质谱的测定方法。

本标准适用于贵州省绿茶品牌发展促进会会员生产的茶叶、茶青中赤霉酸残留例行监测和风险评估时使用。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8302 茶 取样

3 原理

试样中残留的赤霉酸采用乙腈-乙酸溶液提取，固相萃取柱净化，用液相色谱-质谱/质谱测定，外标法定量。

4 试剂与材料

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

4.1 试剂

4.1.1 乙腈 (CH₃CN)：色谱纯。

4.1.2 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

4.1.3 乙酸 (CH₃COOH)：色谱纯。

4.1.4 乙酸铵 (CH₃COONH₄)：色谱纯。

4.1.5 无水硫酸镁 (MgSO₄)：分析纯

4.1.6 氯化钠 (NaCl)：分析纯。

4.2 溶液配制

4.2.1 0.5%乙酸-乙腈：吸取5 mL乙酸，加入乙腈定容至1000 mL，混匀。

4.2.2 5 mM乙酸铵溶液（含0.5%乙酸）：准确称取192.7 mg 乙酸铵于500 mL容量瓶中，用少量水溶解后加入2.5 mL乙酸，再用水定容至刻度，混匀，现用现配。

4.2.3 5 mM乙酸铵-甲醇溶液（含0.5%乙酸）：准确称取192.7 mg 乙酸铵于500 mL容量瓶中，用少量甲醇溶解后加入2.5 mL乙酸，再用甲醇定容至刻度，混匀，现用现配。

4.3 标准品

赤霉酸标准品 (gibberellic acid, GA3, CAS 号为 77-06-5, 分子式为 $C_{19}H_{22}O_6$): 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100 mg (精确至0.01 mg) 赤霉酸标准品, 用甲醇溶解并定容于50 mL 容量瓶中, 溶液浓度为2 mg/mL。0~4 °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提取液将标准储备液稀释成10、20、50、100、200、500 ng/mL 的标准工作溶液, 临用前配制。

4.5 材料

4.5.1 石墨化碳黑固相萃取柱或相当: 500 mg, 6 mL。

4.5.2 有机相微孔滤膜: 0.22 μ m。

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: 感量1 mg和0.01 mg。

5.3 涡旋混合器。

5.4 粉碎机。

5.5 氮吹浓缩仪。

5.6 离心机: 最大转速10000 r/min。

6 分析步骤

6.1 试样制备与保存

6.1.1 试样制备

按 GB/T 8302 抽取茶叶、茶青样品, 将样品粉碎, 混匀, 密封, 作为试样。

6.1.2 试样保存

将茶叶试样保存在-4°C, 将茶青试样于-18 °C 以下冷冻保存。

在抽样和制样的操作过程中, 应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

6.2 提取

6.2.1 茶叶样品

称取 2 g 试样 (精确至 1 mg) 于 50 mL 具塞塑料离心管中, 加入 10 mL 水和 10 mL 0.5% 乙酸-乙腈提取溶剂, 涡旋 1 min, 以 10000 r/min 离心 5 min。静置片刻, 上清液移取到另一 50 mL 具塞塑料离心管中。残渣再加入 10 mL 提取溶剂提取一次, 合并两次上清液。在上清液中再加入 1 g 氯化钠和 2 g 无水硫酸镁, 涡旋 1 min, 以 10000 r/min 离心 5 min, 上清液待净化。

6.2.2 茶青样品

称取 5 g 试样（精确至 1 mg）于 50 mL 具塞塑料离心管中，加入 10 mL 0.5%乙酸-乙腈提取溶剂，其余提取步骤同 6.2.1。

6.3 净化

用 5 mL 乙腈预淋洗石墨化碳黑固相萃取柱，弃去流出液。将 1 mL 待净化的上清液加入石墨化碳黑固相萃取柱中，待提取液全部流出后，再用 5 mL 乙腈洗脱萃取柱，重力洗脱，收集全部洗脱液，40 °C 下氮吹至近干，用 1 mL 甲醇复溶，过 0.22 μm 滤膜，供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

6.4 测定

6.4.1 液相色谱-质谱/质谱

液相色谱-质谱/质谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 液相色谱柱，5 μm，2.1 mm×150 mm 或相当；
- b) 流动相：5 mM 乙酸铵溶液（含 0.5%乙酸）- 5 mM 乙酸铵-甲醇溶液（含 0.5%乙酸），梯度洗脱程序参见表 1；

表 1 梯度洗脱程序表

时间 (min)	5 mM /L 乙酸铵-0.5%乙酸 水溶液 (流动相 A)	5 mM /L 乙酸铵-0.5%乙酸 甲醇溶液 (流动相 B)
0	85	15
2	85	15
6	40	60
8	40	60
9	85	15
15	85	15

- c) 柱温：40 °C；
- d) 流速：0.2 mL/min；
- e) 进样量：5 μL。
- f) 离子源：电喷雾离子源；
- g) 扫描方式：负离子扫描；
- h) 检测方式：多反应监测；
- i) 雾化气、气帘气及辅助气均为高纯氮气或其他合适气体；使用前应调解各气体流量以及离子源温度（TEM）使质谱灵敏度达到检测要求，参考条件参见附录 A；
- j) 电喷雾电压（ESI）、碰撞电压（CE）、去簇电压（DP）、碰撞室入口电压（EP）、碰撞室出口电压（CXP）应优化至最佳灵敏度，监测离子和定量离子等详细条件参见附录 A 中表 A.1。

6.4.2 液相色谱-质谱/质谱测定

根据样液中被测物的含量情况，选定响应值适宜的标准工作溶液进行色谱分析，标准工作液应有六

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 9.6 min。标准溶液的选择性离子流图参见附录 B 中图 B.1。

6.4.3 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 2 的规定，则可判断样品中存在目标化合物。

表 2 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%

6.5 空白试验

空白试验不加试样，均按上述步骤进行操作。

7 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。

$$X = \frac{C_i \times V \times 1000}{m \times 1000} \times n$$

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 ——称样量，单位为克（ g ）。

n ——稀释倍数。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

9 定量限和回收率

9.1 定量限

本方法的定量限：茶叶 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，茶青 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 回收率

不同基质中添加浓度水平下的回收率范围参见附录 C。

附录 A

(资料性附录)

监测离子对及电压参数：

- a) 电喷雾电压(ESI): -4500 V;
- b) 雾化气压力(GS1): 40 Psi;
- c) 气帘气压力(CUR): 5 Psi;
- d) 辅助气流速(GS2): 40 Psi;
- e) 离子源温度(TEM): 450 °C;
- f) 离子对、碰撞电压 (CE)、去簇电压 (DP)、碰撞室入口电压 (EP)、碰撞室出口电压 (CXP) 见表 A.1。

表 A.1 离子对、CE、DP、EP、CXP 参数表

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	CE (V)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)
赤霉素	-345.2	-143.1 ^a	-40	-90	-10	-15
		-221.2	-30	-90	-10	-15
^a 定量离子						

T/GZTPA

附录 B
(资料性附录)
赤霉酸标准品选择性离子流图

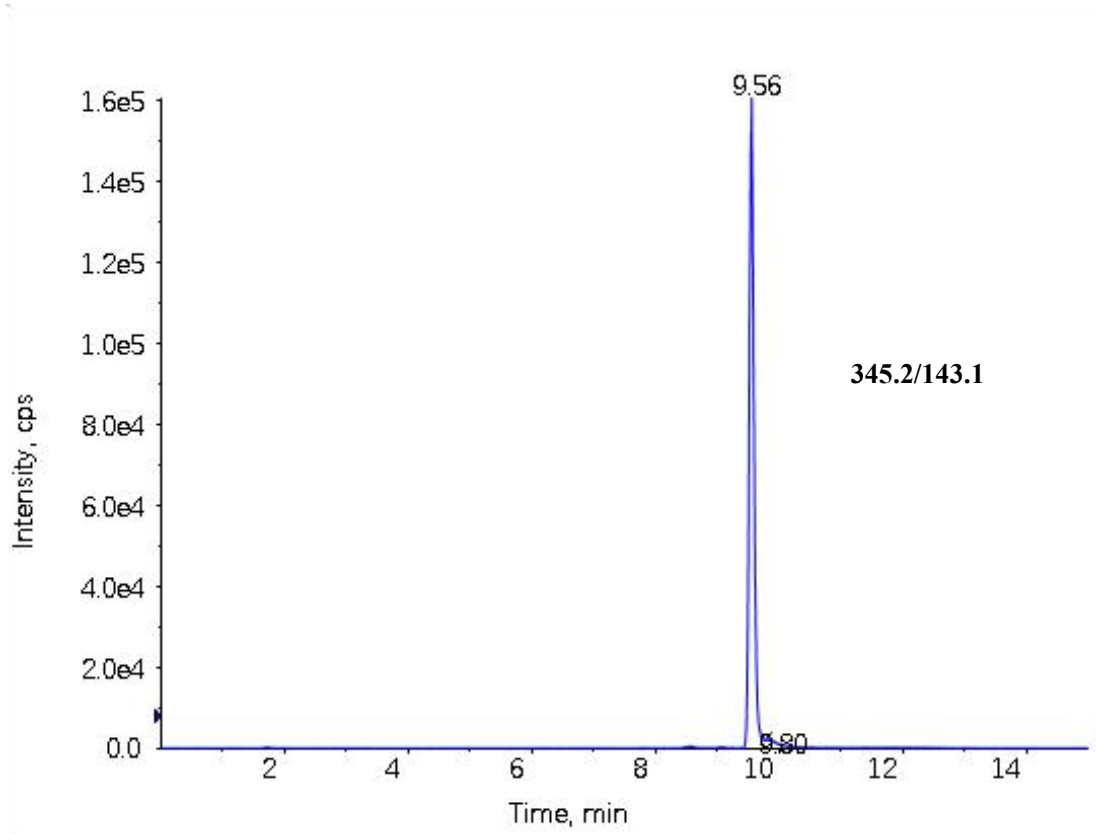


图 B.1 赤霉酸 (0.2 mg/L) 标准品的选择性离子流图

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 (μg/kg)	回收率范围 (%)	RSD 范围 (%)
茶叶	100	91.1~95.2	2.05
	200	76.3~82.3	3.46
	400	86.4~91.4	2.53
茶青	100	90.9~93.9	1.63
	200	72.3~82.3	5.86
	400	80.1~92.5	6.29

T/GZTPA