

团体标准

T/ NAIA×××-××××

枸杞中 15 种真菌毒素的测定 液相色谱-质谱联用法

Determination of 15 mycotoxin in wolfberry

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2024-××-××发布

2024-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所，宁夏回族自治区食品检测研究院。

本文件主要起草人：赵子丹、牛艳、王晓静、吴燕、李谦、刘霞、苟春林、开建荣、杨静、张锋锋、陈翔、赵丹青、石欣、纪丽香。

本文件为首次发布。

枸杞中 15 种真菌毒素的测定

液相色谱-质谱联用法

1 范围

本文件规定了枸杞中 15 种真菌毒素的液相色谱-质谱联用测定方法。

本文件适用于枸杞中 15 种真菌毒素（黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2、伏马毒素 B1、B2、B3、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇（3-AcDON）、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇（15-AcDON）、玉米赤霉烯酮（ZEN）、T-2 毒素、赭曲霉毒素 A（OTA））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。

3 术语和定义

无。

4 原理

试样用乙腈溶液提取，提取液经填料净化后，液相色谱-质谱联用仪检测，外标法定量。

5 试剂与材料

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

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH₃OH，CAS 号：67-56-1）：色谱纯。

5.1.2 乙腈（CH₃CN，CAS 号：75-05-8）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH，CAS 号：64-18-6）：色谱纯。

5.1.4 氯化钠（NaCl，CAS 号：7647-14-5）。

5.1.5 无水硫酸镁（MgSO₄，CAS 号：7487-88-9）。

5.1.6 乙酸铵（CH₃COONH₄，CAS 号：631-61-8）。

5.2 溶液配制

5.2.1 80%乙腈溶液（80+20，体积比）：量取 20 mL 水加入 80 mL 乙腈中，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸 80%乙腈溶液：量取 1.0 mL 甲酸于容量瓶中，用 80%乙腈溶液定容至 1000

mL, 摇匀。

5.2.3 50%乙腈溶液 (50+50, 体积比): 量取 50 mL 水加入 50 mL 乙腈中, 混匀。

5.2.4 乙酸铵-甲酸水溶液 (2 mmol/L): 称取 0.1541 g 乙酸铵, 用 0.1%甲酸水溶液溶解并稀释至 1000 mL, 摇匀。

5.2.5 0.1%甲酸甲醇溶液: 量取 1.0 mL 甲酸于容量瓶中, 用甲醇溶液定容至 1000 mL, 摇匀。

5.3 标准品

黄曲霉毒素 B1 标准品 (CAS 号 1162-65-8, 纯度 99.5%)、黄曲霉毒素 B2 标准品 (CAS 号 7220-81-7, 纯度 99.8%)、黄曲霉毒素 G1 标准品 (CAS 号 1165-39-5, 纯度 99.9%)、黄曲霉毒素 G2 标准品 (CAS 号 7241-98-7, 纯度 99.9%)、黄曲霉毒素 M1 标准品 (CAS 号 6795-23-9, 纯度 91.0%)、黄曲霉毒素 M2 标准品 (CAS 号 6885-57-0, 纯度 99.8%)、伏马毒素 FB1 标准品 (CAS 号 116355-83-0, 纯度 99.6%)、伏马毒素 FB2 标准品 (CAS 号 116355-84-1, 纯度 99.9%)、伏马毒素 FB3 标准品 (CAS 号 1422359-85-0, 纯度 99.8%)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 标准品 (CAS 号 51481-10-8, 纯度 99.9%)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-AcDON) 标准品 (CAS 号 50722-38-8, 纯度 99.8%)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-AcDON) 标准品 (CAS 号 88337-96-6, 纯度 99.9%)、玉米赤霉烯酮 (ZEN) 标准品 (CAS 号 17924-92-4, 纯度 99.9%)、T-2 毒素标准品 (CAS 号 21259-20-1, 纯度 99.5%)、赭曲霉毒素 A (OTA) 标准品 (CAS 号 303-47-9, 纯度 99.6%)。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液 (1000 mg/L): 准确称取约 10 mg (精确至 0.1 mg) 相应的标准品, 用乙腈 (5.1.2) 溶解并定容至 10 mL, 避光-18 °C 及以下条件保存。

5.4.2 混合标准储备溶液 (20 mg/L~50 mg/L): 吸取一定量的标准储备溶液于容量瓶中用乙腈 (5.1.2) 定容至刻度, 避光-18°C 及以下条件保存。

5.4.3 混合标准溶液 (5 mg/L): 吸取一定量的混合标准储备溶液(5.4.2)于容量瓶中, 用乙腈 (5.1.2) 定容至刻度, 避光-18°C 及以下条件保存。

5.5 材料

5.5.1 微孔滤膜 (有机相): 13mm×0.22μm, 或相当者。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪: 配有电喷雾离子源 (ESI)。

6.2 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 g。

6.3 离心机: 4000 r/min。

6.4 高速粉碎机: 10000 r/min。

6.5 组织捣碎机。

6.6 涡旋混合器。

7 分析步骤

7.1 试样制备

鲜枸杞样品随机取样 1 kg，充分混匀，全部用组织捣碎机匀浆后，放入聚乙烯瓶中，于 -18℃及以下条件保存。

干枸杞样品随机取样 500 g，粉碎后充分混匀，放入聚乙烯袋中，于 -18℃及以下条件保存。

7.2 样品提取与净化

7.2.1 提取

将试样充分混匀，鲜果试样称取 5 g，干果试样称取 2 g，精确至 0.01 g，置于 50 mL 离心管中，加入 20.0 mL 乙腈溶液（5.5），经振荡提取 40 min 后，4000 r/min 离心 5 min，待净化。

7.2.2 净化

吸取 6.00 mL 上清液至 15 mL 离心管中（1.5 g 无水硫酸镁和 1.0 g 氯化钠），涡旋混匀 1 min 后，吸取 4 mL 上清液经氮气吹干，用乙腈溶液（5.2.3）定容至 1 mL，过微孔滤膜（5.5.1），待测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，2.1 mm（内径）×100 mm，粒径 1.7 μm，或相当者；
- b) 流动相：A 相为乙酸铵-甲酸水溶液（5.2.4），B 相为 0.1%甲酸甲醇溶液（5.2.5），流动相梯度条件见表 1；
- c) 流速：0.4 mL/min；
- d) 柱温：40 ℃；
- e) 进样量：2 μL。

表 1 流动相及其梯度条件（V_A+V_B）

时间 min	V _A %	V _B %
0.00	90	10
1.00	85	15
2.00	80	20
6.00	40	60
10.00	17	83
11.00	90	10
13.00	90	10

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源类型：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子和负离子同时扫描；

- c) 电喷雾电压：正离子5500 V，负离子-4500V；
- d) 离子源温度：550 ℃；
- e) 喷雾气流速：50 L/h；
- f) 气帘气流速：50 L/h；
- g) 多反应监测：每种真菌毒素分别选择至少2个子离子。所有需要检测的子离子按照出峰顺序，分时段分别检测。每种真菌毒素的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数，参见附录A。

7.3.3 基质匹配标准工作曲线

选择空白枸杞样品按照 7.2 部分进行前处理，得到空白基质溶液。精确吸取一定量的混合标准溶液，逐级用空白基质溶液稀释成质量浓度为 0.001 mg/L、0.002 mg/L、0.005 mg/L、0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L 和 0.5 mg/L 的基质匹配标准工作溶液，根据仪器性能和检测需要选择不少于 5 个浓度点，供液相色谱质谱联用仪测定。以真菌毒素定量用子离子的质量色谱图峰面积为纵坐标，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。

7.3.4 定性及定量

7.3.4.1 保留时间

被测试样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。

7.3.4.2 离子丰度比

按照上述条件进行样品测定，若检测样品的色谱峰保留时间与标准品一致，且与质量浓度相当的基质标准溶液的相对丰度一致，相对丰度允许偏差不得超过表 2 规定的范围，则可判断样品中存在目标被测物。

表 2 定性确证相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	20%至 50%	10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

本方法的标准物质 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图参见附录 B。

7.3.4.3 定量

外标法定量。

7.4 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算

试样中各真菌毒素残留量以质量分数 X 计，单位为毫克每千克（mg/kg），按公式(1)计算。

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ —— 基质匹配标准工作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 —— 提取液体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_3 —— 定容液体积的数值，单位为毫升（mL）；

V_2 —— 分取液体积的数值，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量的数值，单位为克（g）。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示，保留 2 位有效数字，含量超 1 mg/kg 时保留 3 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测试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 C 的要求。

10 定量限

本方法对 15 种真菌毒素的定量限为 0.001 mg/kg~0.01 mg/kg(见附录 D)。

附录 A

(资料性)

15种真菌毒素的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数

15种真菌毒素的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数，见表A.1。

表A. 1 15种真菌毒素的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数

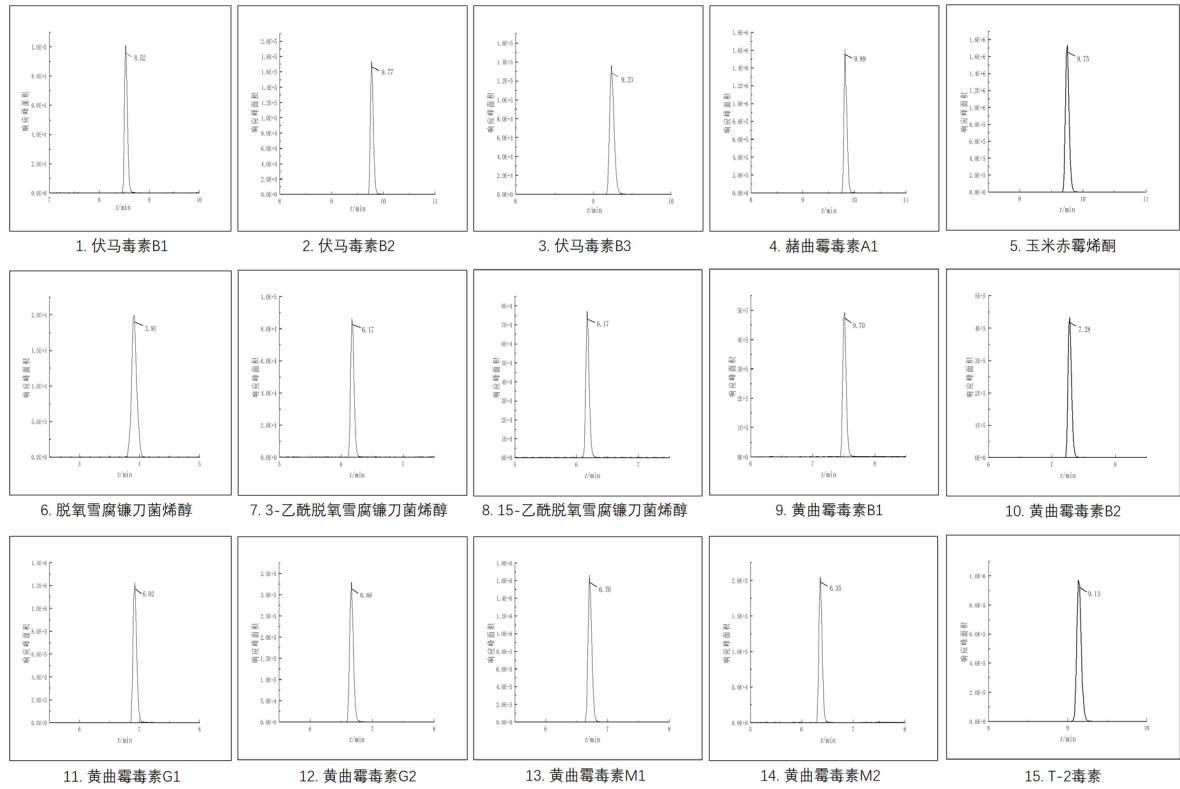
序号	中文名称	英文名称	电离方式	保留时间 min	去簇电压 V	离子对 I	碰撞能 V	离子对 II	碰撞能 V
1	黄曲霉毒素 B1	Aflatoxin B1	正	7.51	142	313.1/285.1	33	313.1/241.1	51
2	黄曲霉毒素 B2	Aflatoxin B2	正	7.28	135	315.1/287.1	35	315.1/259.1	40
3	黄曲霉毒素 G1	Aflatoxin G1	正	6.92	100	329.0/243.0	36	329.0/200.1	40
4	黄曲霉毒素 G2	Aflatoxin G2	正	6.66	100	331.1/285.0	37	331.1/245.0	40
5	黄曲霉毒素 M1	Aflatoxin M1	正	6.71	120	329.1/272.9	31	329.1/258.9	35
6	黄曲霉毒素 M2	Aflatoxin M2	正	6.35	120	331.1/273.1	38	331.1/258.1	38
7	伏马毒素 B1	Fumonisin B1	正	8.53	50	722.4/334.4	54	722.4/352.4	50
8	伏马毒素 B2	Fumonisin B2	正	9.78	85	706.4/336.51	50	706.4/318.61	54
9	伏马毒素 B3	Fumonisin B3	正	9.24	85	706.4/336.50	50	706.4/318.60	50
10	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	正	3.91	65	296.9/249.1	16	296.9/231.1	15
11	3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-acetyldeoxynivalenol	正	6.18	65	339.2/231.1	15	339.2/203.2	20
12	15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-acetyldeoxynivalenol	正	6.18	65	339.3/321.2	13	339.3/137.1	19
13	玉米赤霉烯酮	Zearalenone	负	9.74	-130	317.1/175.0	-32	317.1/131.0	-30
14	T-2 毒素	T-2 toxin	正	9.14	58	484.2/305.1	19	484.2/245.1	19
15	赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A	负	9.82	-90	402.2/358.2	-28	402.2/211.0	-38

附录 B

(资料性)

15种真菌毒素多反应监测 (MRM) 质量色谱图

15种真菌毒素多反应监测 (MRM) 质量色谱图见图B.1。



图B.1 15种真菌毒素多反应监测 (MRM) 质量色谱图

附录 C
(规范性)
实验室内重复性要求

实验室内重复性要求，见表C.1。

表C.1 实验室内重复性要求

被测组分含量 mg/kg	精密度(RSD) %
$>0.001 \leq 0.01$	≤ 20
$>0.01 \leq 0.1$	≤ 15
>1	≤ 10

附录 D

(资料性)

15种真菌毒素中英文名称和方法定量限

15种真菌毒素中英文名称和方法定量限，见表D.1。

表D. 1 15种真菌毒素中英文名称和方法定量限

序号	中文名	英文名	方法定量限，mg/kg
1	黄曲霉毒素 B1	aflatoxin B1	0.001
2	黄曲霉毒素 B2	aflatoxin B2	0.001
3	黄曲霉毒素 G1	aflatoxin G1	0.001
4	黄曲霉毒素 G2	aflatoxin G2	0.001
5	黄曲霉毒素 M1	aflatoxin M1	0.001
6	黄曲霉毒素 M2	aflatoxin M2	0.001
7	伏马毒素 B1	fumonisin B1	0.005
8	伏马毒素 B2	fumonisin B2	0.005
9	伏马毒素 B3	fumonisin B3	0.005
10	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	deoxynivalenol	0.01
11	3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-acetyldeoxynivalenol	0.01
12	15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-acetyldeoxynivalenol	0.01
13	玉米赤霉烯酮	zearalenone	0.001
14	T-2 毒素	T-2 toxin	0.001
15	赭曲霉毒素 A	ochratoxin A	0.001
