

ICS 65.020

B 20

团 体 标 准

T/AFFI XXX-2023

葡萄干中 8 种真菌毒素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

阿拉尔果业行业联合会 发布

目 录

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 原理	2
5 试剂与材料	2
6 仪器和设备	3
7 分析步骤	3
8 结果计算	5
9 精密度	6
10 其他	6

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由新疆兵团第一师阿拉尔市果业行业联合协会提出。

本文件由新疆兵团第一师阿拉尔市果业行业联合协会归口。

本文件起草单位：新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院、新疆兵团第一师阿拉尔市果业行业联合协会、新疆艾旗斯德检测科技有限公司

本文件主要起草人：孙蕾、韩璿烜、丁煜玮、寇雷、宋敏、李慧、何军、祁来芳、付晓静、陈晨

本文件实施应用中的疑问，请咨询新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院（乌鲁木齐市河北东路 188 号）。

新疆维吾尔自治区产品质量监督检验研究院：联系电话：0991-3191180；邮编：830011

本文件为首次发布。

葡萄干中 8 种真菌毒素残留量的测定液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准适用于新疆地区葡萄干。

本标准规定了葡萄干中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、伏马毒素 B2、展青霉素的检验方法。

本文件适用于本地区葡萄干中 8 种真菌毒素残留量的检测。

2 规范性引用文件

本文件中引用的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

3 术语和定义

本文无术语和定义。

4 原理

试样经粉碎，用 1%甲酸-乙腈溶液提取，提取液经分散固相萃取净化，液相色谱-三重四级杆质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂与材料

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

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（色谱纯）；

5.1.2 氯化钠（分析纯）；

5.1.3 无水硫酸镁（分析纯）；

5.1.4 甲酸（色谱纯）；

5.1.5 柠檬酸钠二水合物（分析纯）；

5.1.6 柠檬酸二钠盐倍半水合物（分析纯）；

5.1.7 1%甲酸-乙腈溶液：量取 10mL 甲酸用乙腈定容至 1000mL 容量瓶中，混匀；5.1.8 0.1% 甲酸-水溶液：量取 1mL 甲酸用纯水定容至 1000mL 容量瓶中，混匀；

5.2 标准品

黄曲霉毒素 B1（CAS 号：1162-65-8），纯度大于 98 %、黄曲霉毒素 B2（CAS 号：

7220-81-7)，纯度大于 98 %、黄曲霉毒素 G1（CAS 号：1165-39-5），纯度大于 98 %、黄曲霉毒素 G2（CAS 号：7241-98-7），纯度大于 98 %、赭曲霉毒素 A（CAS 号：303-47-9），纯度大于 98 %、T-2 毒素（CAS 号：21259-20-1），纯度大于 98 %、伏马毒素 B2（CAS 号：116355-84-1），纯度大于 95 %、展青霉素（CAS 号：149-29-1），纯度大于 98 %。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 展青霉素标准储备液的配制（1 mg/mL）：准确称取展青霉素标准品 10 mg 用乙腈定容至 10 mL，-18 ℃冷冻避光保存，有效期 12 个月。

5.3.2 展青霉素标准中间液的配制（10 μg/mL）：准确吸取展青霉素标准储备液 1.0 mL 用乙腈定容至 100 mL，-18 ℃冷冻避光保存，有效期 6 个月。

5.3.3 其他 7 种真菌毒素混合标准储备液的配制（1 mg/mL）：分别准确称取 7 种毒素标准品各 10 mg 用甲醇定容至 10 mL，-18 ℃冷冻避光保存，有效期 12 个月。

5.3.4 其他 7 种真菌毒素混合标准中间液的配制（10 μg/mL）：准确吸取混合标准储备液 1.0 mL 用甲醇定容至 100 mL，-18 ℃冷冻避光保存，有效期 6 个月。

5.4 材料

5.4.1 乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶（PSA）：粒径：40~60 μm；

5.4.2 十八烷基硅烷键合硅胶（C18）：粒径：50 μm；

5.4.3 石墨化炭黑（GCB）：粒径 40~120 μm；

5.4.4 陶瓷均质子：2 cm（长）×1 cm（外径），或相当者；

5.4.5 微孔滤膜：13 mm×0.22 μm，或相当者。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-三重四级杆质谱联用仪：配有电喷雾电离源（Electrospray ionization, ESI）；

6.2 电子天平：感量 0.01g 和 0.01 mg；

6.3 离心机：转速不低于 5000 rpm；

6.4 超声清洗仪；

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

随机取干制葡萄样品 500 g，粉碎机粉碎后备用。

7.2 试样提取

准确称取 2 g 粉碎样品（精确至 0.01g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 水，静置 30 min，加入 10 mL 1 %甲酸-乙腈提取液、1 粒陶瓷均质子，涡旋混匀 30 s，加入 5g~7g 氯化钠、1g 柠檬酸钠二水合物、0.5g 柠檬酸二钠盐倍半水合物，涡旋混匀 30 s，超声提取 20 min，5000 rpm 下离心 5 min，吸取 2 mL 上清液至含有 150 mg 无水硫酸镁、50 mg PSA、50 mg C18 的塑料离心管内，对于颜色较深的样品，离心管内另加入 25 mg GCB，涡旋混匀 30 s，静置沉降 1 min，取上清液过滤膜（5.4.5），待测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

色谱柱：当测定展青霉素时，采用 T3 色谱柱（2.1 mm×100 mm，粒度 1.8 μm），或同等性能的色谱柱；当测定其他 7 种真菌毒素时，采用 C18 色谱柱（2.1 mm×100 mm，粒度 1.9 μm），或同等性能的色谱柱。

流动相：当测定展青霉素时，A：水，B：乙腈；当测定其他 7 种真菌毒素时，A：0.1 % 甲酸-水，B：甲醇。梯度洗脱程序见表 1。

流速：0.2 mL/min；

柱温 40 °C；

进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	V_A	V_B
0.0	90	10
2.0	90	10
5.0	10	90
7.0	10	90
7.5	90	10
10.0	90	10

7.3.2 质谱参考条件

离子源类型：电喷雾电离源；

扫描方式：多反应监测模式（Multiple Reaction Monitoring, MRM），当测定展青霉素时，采用负离子扫描（ES⁻）。当测定其他 7 种真菌毒素时，采用正离子扫描（ES⁺），8 种物质母离子、子离子质谱信息见表 2；

电喷雾电压：-2500V、3500 V；

离子源温度：350 °C；

雾化气：40 Arb；

辅助气：10 Arb。

表 2 8 种真菌毒素母离子、子离子质谱信息

化合物名称	电离模式	母离子	子离子	碰撞能 (V)	去簇电压 (V)
黄曲霉毒素B ₁	正	313.1	241.2*/269.2	29.47/30.15	161
黄曲霉毒素B ₂	正	315.1	259.0*/287.1	28.55/25.05	173
黄曲霉毒素G ₁	正	329.1	214.5*/243.0	31.37/25.56	166
黄曲霉毒素G ₂	正	331.1	245.1*/313.1	28.84/22.82	183
赈曲霉毒素A	正	402.1	167.0*/358.1	35.03/18.27	137
T-2毒素	正	489.3	245.1*/327.1	26.23/22.61	189
伏马毒素B ₂	正	706.3	336.6*/353.1	37.10/31.16	169
展青霉素	负	153.0	109.1*/81.1	8.41/11.44	59

注：*表示定量离子表。

7.3.3 基质标准曲线的绘制

选择与待测样品性质相同或者相似的空白样品按照 7.1、7.2 的方法进行处理，得到空白基质溶液。精密量取一定量的展青霉素标准中间液与混合标准中间液，用空白基质溶液逐级稀释成展青霉素质量浓度为 0.050μg/mL、0.100 μg/mL、0.150 μg/mL、0.200 μg/mL、0.250 μg/mL、0.500 μg/mL，其他 7 种真菌毒素质量浓度为 0.010 μg/mL、0.020 μg/mL、0.050 μg/mL、0.100 μg/mL、0.200μg/mL、0.500 μg/mL 的基质匹配标准系列工作液。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-三重四级杆质谱联用仪分析。分别以各待测组分定量离子的色谱图峰面积作纵坐标，以相应基质匹配标准系列工作液浓度作横坐标，绘制标准曲线。

7.3.4 定性与定量

7.3.4.1 保留时间

被测组分色谱峰的保留时间应与相应标准品色谱峰保留时间接近，相对误差应当在 ±2.5 %之内。

7.3.4.2 离子丰度比

在相同实验条件下，如果检出样品中被测组分色谱峰的保留时间与相应标准品色谱峰保留时间符合 7.3.4.1 的要求，并且在扣除背景后的样品质谱图中，被测化合物所选定的两个子离子均出现，且在同一检测批次，同一化合物中，样品中被测化合物的子离子丰度比与质量浓度相当的基质标准溶液子离子丰度相比，其允许偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定样品中存在被测化合物。

表 3 定性时离子丰度比的最大允许偏差

离子丰度比	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许偏差	±20	±25	±30	±50

7.3.4.3 定量

定量采用外标法定量。

7.4 空白实验

除不加试样外，均按上述测定条件和步骤进行。

8 结果计算

试样中真菌毒素残留量按公式（1）计算。

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \tag{1}$$

式中：

- X-试样中待测组分的含量，mg/kg；
- c-从标准曲线上测得试液中待测组分的质量浓度，ng/mL；
- m-试样质量，g；
- V-试样提取液总体积，mL；
- 1000-单位换算系数；
- 注：计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

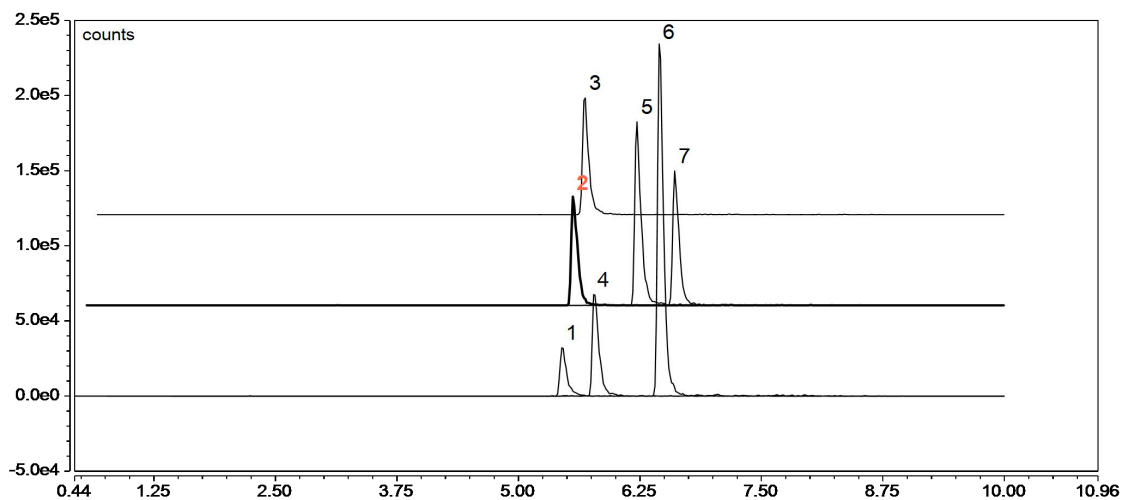
在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于算数平均值的 15%。

10 其他

8 种真菌毒素标准溶液离子色谱图见附录 A。

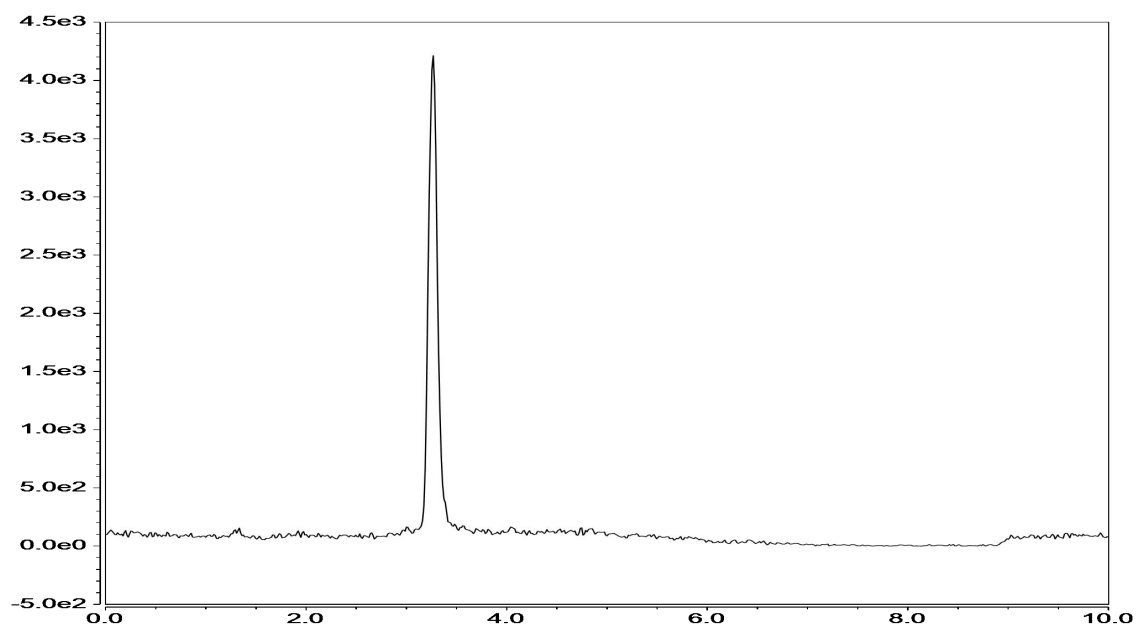
附录 A（资料性）

图 A.1 7 种真菌毒素标准溶液离子色谱图（200 ng/mL）



注： 1-黄曲霉毒素 G₂； 2-黄曲霉毒素 G₁； 3-黄曲霉毒素 B₂； 4-黄曲霉毒素 B₁； 5-伏马毒素 B₂； 6-T-2 毒素；
7-赭曲霉毒素 A

图 A.2 展青霉素标准溶液离子色谱图（200 ng/mL）



团体标准《葡萄干中 8 种真菌毒素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》编制说明

标准名称	葡萄干中 8 种真菌毒素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法	标准主要起草人	孙蕾、韩璠烜、丁煜玮、寇雷、宋敏、李慧、何军、祁来芳、付晓静、陈晨
标准制订背景： 新疆是我国葡萄干的主产地之一。葡萄干是我国食品中具有明显优势和国际竞争力的水果干制品，有很大的发展前景。真菌毒素是真菌在适宜条件下产生的一类有毒次级代谢产物，广泛存在于果蔬及其制品中。真菌毒素通过污染果蔬，进入人和动物体内产生危害，引起人和家畜的急性或慢性中毒，主要表现为肝、肾、造血系统、免疫系统和生殖系统等毒性以及致癌、致畸和致突变等作用。研究表明，食品中较为常见的真菌毒素包括赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素、T-2 毒素等。由于葡萄果实、穗轴表面存在多种曲霉属真菌，特别是黑色组曲霉，在一定的湿度和温度条件下可产生真菌毒素，并在葡萄采摘、储存、运输、加工过程中积累。因此葡萄及其制品中真菌毒素所带来的食品安全风险已引起人们的广泛关注。在这种情况下，迫切需要建立一种能够同时、快速对葡萄干中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、伏马毒素 B2、展青霉素等 8 种真菌毒素进行检测的方法。本标准的制订，将为新疆葡萄干生产提供良好的技术支撑与储备，为新疆葡萄干品质提升、经济效益提升以及社会效益提升保驾护航。			
主要工作过程： 为确保标准内容的准确性、实用性和客观真实性，为进一步提高新疆葡萄干中 8 种真菌毒素残留量检测的水平，保证标准内容科学、合理，标准起草组主要开展了以下工作： （1）成立标准起草组 2022 年 月 日，成立标准起草组，明确责任分工，进行了大量的前期走访、调研、资料研究等工作，制定项目推进计划，明确标准的研究思路 and 标准编制框架。 （2）标准调研 2022 年 月 日~ 月 日，标准起草组通过电话、邮件、网络检索等方式，对新疆部分地区的葡萄种植区域以及葡萄干加工企业进行了大量走访、调研，并与新疆大学、新疆农业大学以及新疆农业科学院的相关专家进行了大量交流，通过座谈会、调研会等形式掌握了大量有关葡萄干中真菌毒素残留的情况、检测现状以及检测技术。 （3）试验论证 为论证检验方法的准确性、实用性和客观真实性，标准组不断优化试验的前处理方法、液相色谱及质谱条件，并从方法学角度对该标准进行了充分验证，保证该标准在加标回收率、重复性以及检出限、定量限方面符合相关标准的要求，最后，确定了该标准的实用性以及可靠性。 （4）标准草案 标准起草组广泛征集了与葡萄干中真菌毒素残留、农药污染物残留量有关的标准及技术资料，如《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》（GB 5009.22-2016）、《食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》（GB 5009.96-2016）、《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》（GB 2761-2017）等标准。2023 年 月 日，标准起草组完成了本标准草案。 （5）标准研讨			

标准编制原则与主要内容：

编制原则：本标准的起草根据 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》及《中华人民共和国 食品安全法》的相关规定进行。

主要内容：本标准规定了葡萄干中 7 种真菌毒素残留量检测方法的术语和定义、检验原理、试剂与材料、仪器和设备、分析方法等。

采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况
部分检测方法参照了食品安全国家标准中检测方法的内容，目前与国际标准的水平处于等效水平。

与现行有关法律法规和强制性标准的关系

符合《标准化法》、《产品质量法》等国家有关法律、法规及《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》（GB 2761-2017）等国家标准的要求。

备案前的公示（征求意见）及意见采纳情况说明：

此行业标准经过“全国团体标准信息平台管理系统”在 2022 年 月 日- 月 日
网上征求意见，未收到任何意见。