|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.080 |
| CCS | |  | | --- | |  |   G 21 |

团体标准

T/GXAF XXXX—XXXX

大米中风味物质2-乙酰基-1-吡咯啉含量的测定

气相色谱质谱法

Determination of 2-acetyl-1-pyrroline in rice by gas chromatography-mass spectrometry

20XX - XX - XX发布

20XX - XX - XX实施

广西肥料协会  发布

1. 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。

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。

本文件由广西壮族自治区分析测试研究中心提出。

本文件由广西肥料协会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区分析测试研究中心、广西大学、广西西大检测有限公司、广西壮族自治区产品质量检验研究院。

本文件主要起草人：范晓苏、韦婷彦、黄一帆、裴根、潘扬昌、黄宏飞、沈方科、刘双斌、何善廉、陈桂鸾、韦英亮、梁鑫佳、莫达松。

大米中风味物质2-乙酰基-1-吡咯啉含量的测定 气相色谱质谱法

* 1. 范围

本文件描述了气相色谱质谱法测定大米中风味物质2-乙酰基-1-吡咯啉含量的原理，规定了试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、结果计算和表述、精密度等的要求。

本文件适用于大米中风味物质2-乙酰基-1-吡咯啉含量的测定。

* 1. 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/T 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 原理

大米试样在水浴加热条件下经二氯甲烷提取，气相色谱-质谱法测定，内标法定量。

* 1. 试剂和材料
     1. 除特别说明外，下列试剂均为分析纯。
     2. 水为GB/T 6682 规定的一级水
     3. 二氯甲烷：色谱纯
     4. 无水硫酸钠：用前在105℃烘4h后备用，玻璃干燥器中储存
     5. 2-乙酰基-1-吡咯啉标准品（2-AP）
     6. 2,4,6-三甲基吡啶（TMP）
     7. 0.22μm有机滤膜
     8. 12mL螺纹盖培养管，或相当者
     9. 标准溶液配制：

5.9.1 2-乙酰基-1-吡咯啉(2-AP)标准储备液（10%w/w于甲苯）：准确称取2-乙酰基-1-吡咯啉0.1000g，置于10.0mL容量瓶中，加二氯甲烷溶解并定容至刻度，配置称浓度为1000mg/L储备液，于-80℃下避光保存，有效期6个月；

5.9.2 内标储备液：准确称取2,4,6-三甲基吡啶（TMP）0.0100g，置于10.0mL容量瓶中，加二氯甲烷溶解并定容至刻度，配置称浓度为1000mg/L储备液，于-20℃下避光保存，有效期6个月；

5.9.3 内标工作液：取适量内标储备液，用二氯甲烷稀释浓度约为10mg/L的标准工作液，有效期1个月；

5.9.4 基质标准曲线液：取1000mg/L 2-乙酰基-1-吡咯啉储备液，用基质溶液稀释，配成质量浓度分别15、50、100、200、500、1000ng/ml的标准工作溶液，待用；

5.9.5 基质标准工作液：需现配现用。

* 1. 检测方法主要仪器和设备

包括但不限于以下内容：

——气相色谱-质谱联用仪：气相色谱-质谱，EI源；

——电子天平：感量0.1g和0.1mg；

——冷冻研磨仪；

——恒温水浴锅。

* 1. 分析步骤
     1. 试样的制备与贮藏

按照GB 5491的规定将不少于1000g大米（已脱壳）混匀，四分法取样，放入冷冻研磨仪中粉碎制成试样，放入密封袋中密封，做上标记，并置于-80℃条件下保存，待测。

* + 1. 试样提取

准确称取1g（精确至0.0001g）制备好的试样于12mL螺纹盖培养管中，加入10mg/L内标标准工作液0.01mL，向瓶中加入1mL二氯甲烷，80℃下水浴提取3h，涡旋混匀，冷却静置20min，经0.22μm滤膜过滤，滤液供气相色谱质谱仪测定。

* + 1. 仪器分析条件

7.3.1 气相色谱条件

a）色谱柱：BP-5MS（30m×0.25mm×0.25μm）毛细管气相色谱柱或等效柱；

b) 载气条件：氦气，纯度≥99.999%，流速：1.0ml/min；

c) 进样方式：不分流进样；

d) 进样口温度：200℃；

e) 进样量：1μL；

f) 柱温箱升温程度：炉温初始为50℃，保持2min，以8℃/min升温至100℃保持2min，以50

℃/min升温至280℃，保持2min；

7.3.2 质谱条件

a）电离方式：电子轰击电离源（EI源）；

b) 离子源温度：300℃；

c) 传输线温度：280℃；

d) 溶剂延迟时间：4min；

e) 选择离子监测（SIM）：2-AP（m/z）：111、83、43（定量离子）；TMP（m/z）：121（定量离子）、106、79

* + 1. 测定法

6.4.1 定性测试

进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致，并且在扣除背景后的样品质谱

中，所选择的离子均出现，所选择的离子丰度比与标准样品的离子丰度比相一致，相似度在允差之内（见表 1），则可判断样品中存在2-AP。如果不能确证，应重新进样，以扫描方式（有足够灵敏度）或采用增加其他确证离子的方式或用其他灵敏度更高的分析仪器来确证。

表1 使用气相色谱-质谱定性时相对离子丰度最大容许误差

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 相对离子丰度 | >50％ | 20％～50％ | 10％～20％ | ≤10％ |
| 允许的相对偏差 | ±10％ | ±15％ | ±20％ | ±50％ |

表2 2-AP和TMPP特征离子、特征离子相对丰度和允许相对偏差

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 名称 | 特征离子m/z | 相对强度% | 允许相对偏差% |
| 2-AP | 43\* | 100 | - |
| 83 | 13 | ±20％ |
| 111 | 5 | ±50％ |
| TMP | 121\* | 100 | - |
| 79 | 25 | ±15％ |
| 106 | 15 | ±20％ |

\*表示定量离子

6.4.2 定量测试

本方法以2-AP定量离子（m/z 43）与TMP定量离子（m/z121）质量色谱图（见附录A）的峰面积比多点校准定量，内标法定量。为减少基质的影响，定量采用基质混合标准工作溶液，。

* + 1. 平行试验

按以上步骤对统一试样进行平行测定。

* + 1. 空白试验

除不称取试样外，均按上述步骤进行。

* 1. 结果计算和表述

试样中2-乙酰基-1-吡咯啉（2-AP）的含量按公式（1）计算：

…………（1）

式中：

——试样中2-AP含量，单位为微克每千克（mg/kg）；

——试样溶液中2-AP与TMP定量离子的峰面积比值；

——标准溶液中2-AP与TMP定量离子的峰面积比值；

——标准溶液中2-AP浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

——定容体积的数值，单位为毫升（mL）；

——试样质量的数值，单位为克（g）；

1000 ——单位换算系数

注：计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

* 1. 精密度
     1. 在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与其算术平均值的比值（百分率），依据GB/T 27404-2008重复性要求，本标准中重复性应符合附录B的要求。
     2. 在再现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值与其算术平均值的比值（百分率），依据GB/T 27404-2008再现性要求，本标准中再现性应符合附录C的要求。
  2. 定量限和回收率
     1. 检出限和定量限

称样量为1g,定容体积为1mL时，检出限为0.005mg/kg，定量限为0.015mg/kg。

* + 1. 回收率

当添加水平为0.030mg/kg～0.40μg/kg时，大米中的2-乙酰基-1-吡咯啉加标回收率范围为80％～110％。

* 1. 线性范围

本方法的线性范围为15ng/mL~1000ng/mL。

**附录A**



图A.1 2-AP与TMP标准溶液SIM色谱图

**附录B**

**（规范性附录）**

**实验室内重复性要求**

**表B.1 实验室内重复性要求**

|  |  |
| --- | --- |
| 被测组分含量 mg/kg | 精密度 % |
| ＞0.001 ≦0.01 | 32 |
| ＞0.01 ≦0.1 | 22 |
| ＞0.1 ≦1 | 18 |
| ＞1 | 14 |

**附录C**

**（规范性附录）**

**实验室间再现性要求**

**表C.1 实验室间再现性要求**

|  |  |
| --- | --- |
| 被测组分含量 mg/kg | 精密度 % |
| ＞0.001 ≦0.01 | 46 |
| ＞0.01 ≦0.1 | 34 |
| ＞0.1 ≦1 | 25 |
| ＞1 | 19 |