**团体标准**

**《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》编制说明**

**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**

**2022年12月**

**一、编制背景及任务来源**

1. **标准编制背景**

稻谷是一种禾本科植物，脱壳后即为大米，是世界三大主要粮食作物之一。我国水稻常年种植面积3000万公顷、产量2亿吨左右，是世界上水稻产量第一、种植面积第二大的国家[1]。广西优质稻种植源远流长，历史悠久，是长江以南稻米的重要产区，全区每年水稻种植面积稳定在 3000 万亩左右，稻谷年产量在 1200 万吨以上，优质稻年产超 300 万吨以上。广西稻米一直有“北有五常稻花香，南有广西晚百香”的美誉[2]。大米中富含多种氨基酸和蛋白质、生物碱、维生素以及人体必需的营养成分。随着居民消费水平升级，人们对于大米的要求不再局限于饱腹，而是对其口感及绿色生态特性更为重视，具有优质香味的大米更受青睐。2-乙酰基-1-吡咯啉（2-AP）是目前已经探明的香米的特征风味物质，其含量的高低直接影响香米的品质与价格。但由于该成分在天然大米中的含量通常低至微克每千克，在采用现代分析检测方法测定时，可能受到样品基质干扰、色谱分离共流出的等问题的影响[3]。

2-乙酰基-1-吡咯啉（2-AP），分子式C6H9NO（化学结构式如图1）为淡黄色液体，是一种天然香物质，易溶于热水、乙醇和乙醚，是一种沸点比较低的小分子杂环化合物，其相对分子质量为111.14[3]。目前，常见的2-乙酰基吡咯啉的鉴定方法可分为定性分析和定量分析。定性分析方法主要为咀嚼法、热水法、氢氧化钾浸泡法3种，均是传统的感官评鉴方法，应用这些方法存在人员感官差异较大，鉴定结果准确性和可靠性难以保证以及缺乏定量分析结果等缺陷。但目前应用于稻米香气收集的技术，如超临界流体萃取（SPE）、溶剂萃取法、固相微萃取（SPME）、同时蒸馏萃取（SDE）和柱吸附等技术，存在设备投资高、样品及试剂消耗量大、操作步骤复杂和收集浓缩耗时等缺点，难以满足育种工作中大批量试验材料的鉴定工作[4]。常用的检测方法主要有气相色谱（GC）法或气相色谱－质谱（GC-MS）法、气相色谱－嗅觉测试（GC-olfactory，GC-O）法、高效液相色谱－串联质谱（HPLC-MS/MS）法等[3]。



图1:2-AP化学结构式

因此，本标准的制定，意义在于通过测定大米2-AP含量能够为市售香米的真假鉴别提供借鉴，同时筛选优质稻米品种，提高大米生产水平，实现大米的可持续性健康发展。

1. **任务来源**

《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》标准涉及测定大米2-乙酰基-1-吡咯啉含量，属于新制定标准，由广西壮族自治区分析测试研究中心提出。

**二、编制过程**

1. **项目启动**

为确保团体标准《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》编制工作的顺利开展，2022年3月，广西壮族自治区分析测试研究中心、广西西大检测有限公司等组建了项目编制组，明确工作职责，定期召开会议研究工作。项目课题组按GB/T1.1、GB/T1.2的要求，各编写小组人员开展了资料收集与分析、方法优化与调查等相关工作。从科研与生产实践两方面出发，进行前期广泛调查及数据收集，汇集各方面的资料，确定了编制时间进度安排，编写了《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》（征求意见稿）。

1. **收集国内外相关资料**

**（1）相关研究资料**

编制工作启动后，收集同行相关研究报告，征求了相关院校、生产单位、国内同行和专家的意见，汇总整理，形成了标准编制所需的基础资料。

**（2）国内相关标准概况**

根据检索，截止2022年4月30日，目前我国现行的国标及行业标准中，还没有相应的测定大米中2-乙酰基-吡咯琳含量的方法，有必要建立大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量测定的标准，规范实验室现有分析手段。本标准制定及实施后，能够填补大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量分析方法的空白。本方法适应目前场地调查的要求，分析方法准确、适用。

**（3）国外相关标准概况**

目前为止，暂未查询到关于大米中2-乙酰基-吡咯琳含量测定方面的国际标准和国外标准等。

1. **标准编写**

项目课题组按照《中华人民共和国标准化法》、《团体标准管理规定》的要求，并结合广西大米实际情况，起草了团体标准《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》（讨论稿）。

8月，项目编制组充分讨论《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》（讨论稿），再次对讨论稿进行了详细研究，并修改完善形成《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》（征求意见稿）。

1. **征求意见**

12月，项目编制组通过讨论，充分征求相关院校、国内同行和专家对《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳气相色谱-质谱法》（征求意见稿）的意见，并修改完善标准，形成《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》（送审稿）。

**三、编制原则和主要内容确定**

1. **编制原则**

标准制定以保证适用的前提下，内容力求完整、准确、易于理解，充分注重标准的科学性、先进性、适用性、经济合理性、安全可靠性、切实可行及协调统一性为基本原则。编制本标准遵循如下依据：

GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》

GB/T27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》

GB/T27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测

1. **主要内容确定**

本标准规定了大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量测定的前处理方法、仪器检测方法、检出限及定量限，适用于测定大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量。

**（1）前处理方法的选择**

大米试样脱壳后经冷冻研磨仪研磨成粉状，保存于-80摄氏度冰箱。准确称取1.0g（精确至0.0001g）试样至12mL螺纹盖培养管中，加入1mL提取剂，水浴加热后，涡旋混匀，静置冷却20min，用1mL注射器吸取上层清液过0.22μm聚四氟乙烯滤膜，待测。

本标准结合应兴华等、赖政炀等建立的前处理方法基础上 [5]，对比了提取溶剂、提取时间影响因素的提取效率，优化提取工艺以确保得到最适最优的提取效率。实验数据汇总详见下列图表。

表1 不同提取溶剂的提取效率对比

|  |  |
| --- | --- |
| 提取条件 | 2-AP回收率 |
| 提取溶剂 | 提取时间h | 提取温度℃ |
| 二氯甲烷 | 3 | 80 | 75.32% |
| 无水乙醇 | 3 | 80 | 72.97% |
| 二氯甲烷+无水乙醇（1+1） | 3 | 80 | 93.96% |

表2 不同提取时间的提取效率比对

|  |  |
| --- | --- |
| 提取条件 | 2-AP回收率 |
| 提取溶剂 | 提取时间h | 提取温度℃ |
| 二氯甲烷+无水乙醇（1+1） | 2 | 80 | 71.35% |
| 3 | 80 | 93.96% |
| 4 | 80 | 64.38% |



图2 不同提取试剂的2-AP（约6.4min）峰型对比

实验表明，在现有的仪器条件下，二氯甲烷提取的试样的峰型较宽，无水乙醇提取的回收率相对较低，因此方法选择了以二氯甲烷+无水乙醇（1+1）作为提取剂，提取时间为3h继续试验。

实际的实验操作中，结合仪器条件，仍可以采用较合适的溶剂，只要能够证明其能有效得从样品中提取出待测组分。

**（2）仪器参数**

由于2-AP属于微量成分，选择离子SIM模式采集离子少，用于检测选定质荷比离子的离子流时间变长，因此选择SIM模式能够提高分析灵敏度。

气相色谱条件:

 a）仪器型号：安捷伦气相质谱联用仪7890A-5975C

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

 c) 载气条件：流速1.0ml/min,不分流

 d) 进样口温度：200℃，进样量：1μL

 e) 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；

 f) 溶剂延迟时间：4min

质谱条件:

 a) 选择离子监测（SIM）：2-AP（m/z）：83（定量离子）,111,69,43；

 b) 电离方式：电子轰击电离源（EI源，电子能量70eV）

 c) 离子源温度：230℃

 d) MS四级杆温度：150℃

e) 电离电压：-70V

**（3）检出限及定量限**

参照国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）和GB/T 5009.1-2003的方法，以3倍基线噪声作为检出限，10倍基线噪声作为定量限[6]。称样量为1g,定容体积为1mL时，检出限为2.5μg/kg，定量限为10μg/kg。

**（4）标准曲线的建立和线性范围的确定**

取1000mg/L 2-乙酰基-1-吡咯啉储备液，用空白基质溶液稀释，配成质量浓度分别10，20,50,100,200,500,1000ng/ml的标准工作溶液（参考浓度，可根据实际需要调整）。

由低质量浓度到高质量依次对标准系列溶液进样，以标准系列溶液中目标组分浓度为横坐标，以其对应的定量离子（83）峰面积为纵坐标，建立校准曲线。校准曲线的相关系数≥0.995，否则重新绘制校准曲线。

表3 标准曲线

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 编号 | 浓度ng/ml | 峰面积Ab\*s |
| Std1 | 10 | 202 |
| Std2 | 20 | 391 |
| Std3 | 50 | 1336 |
| Std4 | 100 | 2992 |
| Std5 | 200 | 5952 |
| Std6 | 500 | 14536 |
| Std7 | 1000 | 28785 |
| 回归曲线 | Y=28.9X-19.581 |
| 相关系数 | R2=0.9998 |

**（5）标准方法的验证数据**

 详见验证报告。

**四、标准实施建议**

1. **广泛宣传**

《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》作为广西今后大米香味评估的参考，各相关单位应充分利用多种形式广泛宣传，营造一个良好氛围。

1. **组织实施**

待标准发布后，相关单位应尽快制定指导计划，促使相关单位和个人组织实施。

1. **评价和改进**

定期对《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳含量的测定 气相色谱-质谱法》开展科学性、有效性、适宜性的评价，通过评价工作发现目前标准中存在问题和改进的方向，对现有标准进行完善。

**五、标准水平**

**（一）、与现有标准及修订中的标准协调配套情况**

本文件与现有标准及修订中的标准协调配套，未发现冲突情况。

**（二）、涉及国内外专利及处置情况**

经查，本文件没有涉及国内外专利。

**六、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本文件与有关现行法律、法规和强制性国家标准具有一致性，无冲突之处。

**七、重大分歧意见的处理经过和依据**

无。

**八.标准作为强制性或推荐性国家（或行业）标准的建议**

无。

**九.贯彻标准的要求和措施建议**

无。

**十、废止现行有关标准的建议**

无。

**十一、其他应予以说明的事项**

无。

《大米中2-乙酰基-1-吡咯琳气相色谱-质谱法》

 标准编制组

2022年12月20日

**参考文献**

1. 徐春春,纪龙,陈中督,方福平.中国水稻生产、市场与进出口贸易的回顾与展望[J].中国稻米,2021,27(04):17-21.
2. 潘登,陈可夫.藤县：“广西香米”扶贫与品牌兼得[J].农家之友,2020(04):11.
3. 胡亚微,杨洋,彭锦峰.香米特征香味成分2-乙酰基-1-吡咯啉提取及检测方法研究进展[J].色谱,2020,38(07):768-774.
4. 赖政炀,陈孟君,杨钦沾,陆冬萍,曾秋梅.正交法优化水浴加热辅助提取香稻中2-乙酰基吡咯啉含量条件研究[J].现代食品,2020(21):210-214.DOI:10.16736/j.cnki.cn41-1434/ts.2020.21.063.
5. 应兴华,徐霞,陈铭学,欧阳由男,朱智伟,闵捷.气相色谱-质谱技术分析香稻特征化合物2-乙酰基吡咯啉[J].色谱,2010,28(08):782-785.
6. 刘洪,饶得花,任永浩,邱友媚,陈兴林,徐振江.香稻香气特征化合物2–乙酰基–1–吡咯啉测定方法的建立[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2015,41(03):234-238.DOI:10.13331/j.cnki.jhau.2015.03.002.