

团体标准

T/HZBX XXX—2023

食品中毒黄素和米酵菌酸的测定液相色谱- 质谱/质谱法

Determination of flavin and oryzac acid in food poisoning by liquid chromatography-
mass spectrometry/mass spectrometry

（征求意见稿）

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

惠州市标准化协会 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。

本文件由惠州市食品药品检验所提出。

本文件由惠州市标准化协会归口。

本文件主要起草单位：惠州市食品药品检验所、广东省惠州市质量技术监督标准与编码所、广东省惠州市质量计量监督检测所。

本文件主要起草人：赵智锋、陈嘉聪、张丰芸、王晓琴、叶文芳、黄秀丽、朱文娟、车宇慧、黄永德、游泽文、陈文财、甘文静、宁燕凌、邓频、周松海。

食品中毒黄素和米酵菌酸的测定液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了食品中毒黄素和米酵菌酸的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于食品中毒黄素和米酵菌酸的测定。

本文件中中毒黄素的检出限为0.1 ng/mL，定量限为0.2 ng/mL；米酵菌酸的检出限为0.05 ng/mL，定量限为0.1 ng/mL。

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于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有修改单）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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

QuEChERS：一种用于农产品检测的快速样品前处理技术（Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe）

dSPE EMR-Lipid：一种加入新型吸附剂材料的QuEChERS技术，能够选择性去除高脂肪含量基质（如猪肉）中的主要脂质组分而不会造成分析物意外损失。

5 原理

均质后试样用80%甲醇超声萃取，取上清液经QuEChERS净化处理，离心，液相色谱-质谱/质谱法测定，外标法定量。

6 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

6.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

6.2 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

6.3 毒黄素（C₇H₇N₅O₂，CAS 号：84-82-2）：纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

6.4 米酵菌酸（C₂₈H₃₈O₇，CAS 号：11076-19-0）：纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

6.5 QuEChERS dSPE EMR-Lipid：增强型脂质去除净化管。

6.6 80%（V/V）甲醇水溶液：量取20 mL水于80 mL甲醇（6.1）中，混合均匀。

6.7 0.1%甲酸水溶液：取1 mL甲酸（6.2），加水定容至1000 mL，混匀备用。

6.8 标准储备溶液

- 6.8.1 米酵菌酸标准储备液(0.1 μg/mL): 准确称取米酵菌酸标准品 10 mg(精确至 0.01 mg), 用甲醇溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。置于-18 ℃冰箱中避光保存, 有效期为 3 个月。
- 6.8.2 毒黄素标准储备液(0.1 μg/mL): 准确称取毒黄素标准品 10 mg(精确至 0.01 mg), 用甲醇溶解, 转移至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。置于-18 ℃冰箱中避光保存, 有效期为 3 个月。
- 6.8.3 混合标准工作溶液: 分别吸取米酵菌酸和毒黄素标准储备溶液用甲醇稀释定容, 依次配制成浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、25.0 ng/mL 的标准系列工作液, 临用时配制。

7 仪器与设备

- 7.1 液相色谱-质谱/质谱仪: 配有电喷雾离子源。
- 7.2 天平: 感量为 0.01 g 和 0.01 mg。
- 7.3 离心机: 转速≥5000 r/min。
- 7.4 氮吹仪。
- 7.5 涡旋混合器。
- 7.6 超声波振荡器。
- 7.7 微孔有机过滤膜(孔径 0.22 μm)。
- 7.8 恒温水浴锅。
- 7.9 高速均质仪。
- 7.10 移液器: 5 mL、10 mL。
- 7.11 具塞塑料离心管: 50 mL。

8 测定步骤

8.1 提取

在50 mL塑料离心管中称入经初步粉碎后的样品5 g(精确至0.01 g), 将离心管置于1000 r/min高速均质仪中均质1 min。均质好的试样中加入10 mL 80%(V/V) 甲醇水溶液, 旋紧盖子高速涡旋震荡混匀3 min, 混匀后的试样于8000 r/min高速离心机中离心5 min, 吸取上清液5 mL用于下一步净化。

8.2 净化

将5 mL提取液置于15 mL QuEChERS-EMR(内含dSPE EMR-Lipid净化剂)净化管中, 高速涡旋震荡3 min使净化剂与试液充分混合, 混匀后的净化管于高速离心机中8000 r/min 离心5 min, 取上清液2 mL于全自动平行浓缩仪中浓缩至近干(氮吹, 40℃水浴), 用甲醇复溶至1 mL, 然后过0.22 μm有机膜, 待测定。

8.3 测试

8.3.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱: C18 色谱柱, 2.1 mm×100 mm, 1.7 μm 或同等性能的色谱柱;
- b) 流速: 0.3 mL/min;
- c) 进样体积: 5 μL;
- d) 流动相: A:0.1 %甲酸水溶液, B:乙腈。梯度洗脱见表 1:

表1 流动性梯度洗脱条件

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
1.5	80	20
2.5	5	95
5	5	95

表1 流动性梯度洗脱条件（续）

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
6	80	20
7	80	20

8.3.2 质谱/质谱参考条件

- 参考条件如下：
- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
 - b) 扫描方式：正、负离子；
 - c) 检测方式：多反应监测（MRM）；
 - d) 雾化气：氮气；
 - e) 脱溶剂管温度：250 ℃；
 - f) 离子源温度：400 ℃；
 - g) 雾化气流量：3 L/min；
 - h) 干燥气流量：15 L/min；
 - i) 定量离子对、定性离子对、碰撞电压、Q₁Pre 偏差、Q₃Pre 偏差具体参数见表 2。

表2 毒黄素和米酵菌酸的多反应监测条件

化合物	母离子（m/z）	子离子（m/z）	Q ₁ Pre 偏差（V）	碰撞电压 CE	Q ₃ Pre 偏差（V）
毒黄素	193. 90	109. 05 ^a	-29	-23	-21
		137. 10	-13	-16	-14
米酵菌酸	485. 05	397. 25 ^a	24	18	23
		441. 30	25	10	15
注：表2所列参考质谱条件仅供参考，当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。					
^a 为定量离子。					

8.3.3 定性测定

按照高效液相色谱-质谱/质谱条件测定试样和标准工作溶液，记录试样和标准溶液中各化合物的色谱保留时间，当试样中检出与某标准品色谱峰保留时间一致的色谱峰（变化范围在±2.5 %之内），并且试样色谱图所选定的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比（k）的偏差不超过表3规定的范围，可以确定试样中检出相应化合物。

表3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度（%）	k>50	50≥k>20	20≥k>10	k≤10
允许的最大偏差（%）	± 20	± 25	± 30	± 50

8.3.4 定量测定

将混合标准工作溶液（6.8.3）分别按仪器参考条件（8.3）进行测定，得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作溶液的浓度为横坐标，以定量离子的色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.3.5 试样溶液的测定

- 按下列步骤进行：
- a) 将试样溶液（8.1）按仪器参考条件（8.2）进行测定，得到样品溶液中对组分的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测液中组分的浓度，平行测定次数不少于 2 次。

b) 标准物质色谱图参见附录 A。

8.3.6 空白溶液的测定

空白溶液，除不添加样品外其余按步骤8.1、8.2进行操作。

9 结果的计算

试样中被测物的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000} \times f \quad \text{在此处键入公式。} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中被测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——从标准曲线得到待测液中目标物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000——单位换算系数；

f —— 稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

10 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数平均值的15 %。

11 方法检出限和定量限

11.1 毒黄素的检出限为 0.1 ng/mL，定量限为 0.2 ng/mL；米酵菌酸的检出限为 0.05 ng/mL，定量限为 0.1 ng/mL；

11.2 空白试验应无干扰。

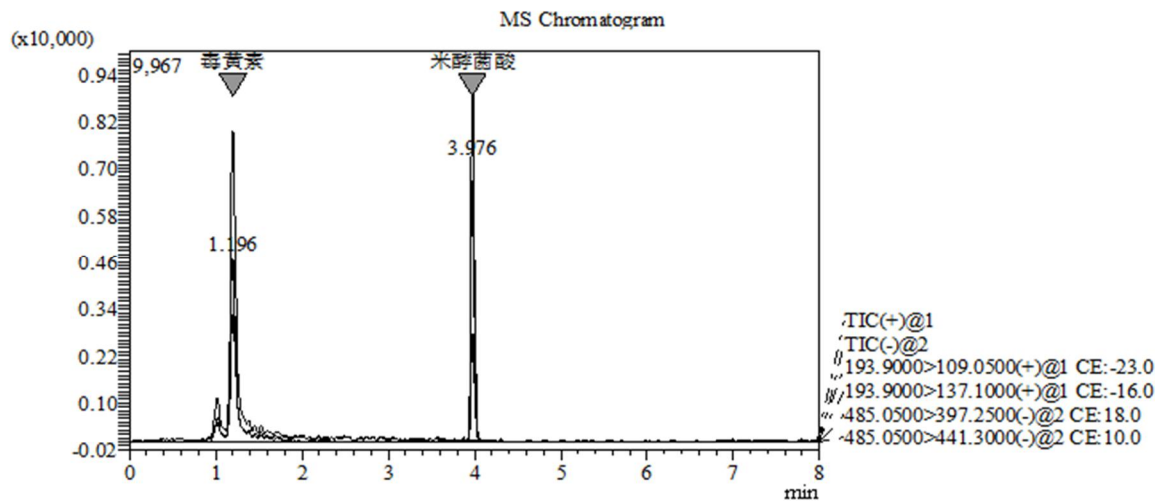
12 回收率

以玉米面、云耳、河粉和木耳为样品基质考察方法的精密度和准确度。进行三个水平，六平行的重复测定。在方法检出限、两倍方法检出限、十倍方法检出限，三个加标水平下，添加回收率及精密度参见附录B。

附 录 A
(资料性)
毒黄素和米酵菌酸多反应监测色谱图

A. 1 毒黄素和米酵菌酸多反应监测色谱图

见图A. 1。



图A. 1 毒黄素和米酵菌酸多反应监测色谱图（10 ng/mL）

附 录 B
(资料性)

样品的添加浓度及回收率的实验数据

B.1 样品的添加浓度及回收率的实验数据

见表B.1。

表 B.1 样品的添加浓度及回收率的实验数据

基质	添加水平 (μ g/L)		毒黄素回收率范围 (%)	RSD (%)	米酵菌酸回收率范围 (%)	RSD (%)
	毒黄素	米酵菌酸				
云耳	0.1	0.05	86.8~90.6	3.61	89.4~93.2	2.39
	0.2	0.1	88.6~92.6	1.65	89.3~94.7	1.63
	1.0	0.5	90.2~94.0	1.27	96.9~103.6	0.95
黑木耳	0.1	0.05	89.6~93.4	4.25	89.2~94.4	2.72
	0.2	0.1	90.6~94.9	2.97	93.7~97.4	1.56
	1.0	0.5	92.8~95.7	1.63	94.4~98.1	1.85
玉米面	0.1	0.05	87.1~90.8	3.95	88.9~92.7	1.70
	0.2	0.1	94.2~97.9	1.77	89.0~94.4	2.76
	1.0	0.5	93.9~96.7	1.37	94.3~96.9	1.13
河粉	0.1	0.05	91.5~101.4	2.09	88.9~93.2	4.04
	0.2	0.1	88.9~92.6	2.45	91.5~94.2	2.68
	1.0	0.5	89.4~94.8	1.51	96.8~98.9	3.07