

团体标准

T/NAIA 2024-xxxx

谷物籽粒霉菌毒素检测技术规程

Detection procedures for mycotoxin in Grains

2024-xx-xx发布

2024-xx-xx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。

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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出、归口并实施。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏农林科学院农作物研究所。

本文件主要起草人：李彩虹、张维军、赵子丹、葛谦、王彩艳、刘霞、开建荣、杨静、王永宏、赵如浪、张文杰、何金尚、王晓静、王晓菁。

谷物籽粒霉菌毒素检测技术规程

1 范围

本文件规定了谷物籽粒中伏马毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素A、T-2毒素、黄曲霉毒素的超高效液相色谱-质谱联用（UPLC-MS/MS）测定的样品制备、方法步骤和技术要点。

本文件适用于稻类、麦类、玉米、高粱、粟、黍、黄米、荞麦等谷物籽粒及其制品中霉菌毒素的检测。

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 2761 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量
- GB 5009.22 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 5009.240 食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定
- GB/T 5009.1 食品卫生检验方法 理化部分 总则
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
- GB/T 14699.1 饲料 采样
- GB/T 17480 饲料中黄曲霉毒素B1的测定 酶联免疫吸附法
- GB/T 28716 饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
- GB/T 28718 饲料中T-2毒素的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的伏马毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素A、T-2毒素、黄曲霉毒素用乙腈-水溶液提取，经混合净化材料萃取净化，氮气吹干后用乙腈-水溶液定容，经超高效液相色谱分离，串联质谱法测定，外标法定量。

5 检测方法

5.1 样品的采集

霉菌毒素在样品中分布不均匀,且含量都在 ppb 级别,如果没有足够大的采样量,会造成较大误差。因此,采样的时候要使用探针式采样器等专门的采样工具,做到多点、随机、均匀,使得每个部位都有相同的概率被取到。

5.2 样品的保存

采集的样品应具有代表性。采集的样品及时检测,对不能及时检测的,应置于 0 - 4℃ 冷藏短期保存或 -18℃ 保存。

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 中规定的一级水。

6.1 试剂

6.1.1 乙腈 (CH_3CN): 色谱纯。

6.1.2 甲醇 (CH_3OH): 色谱纯。

6.1.3 甲酸 (CH_2O_2): 色谱纯。

6.1.4 乙酸铵 ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$): 色谱纯。

6.1.5 混合净化材料: 氯化钠 1.5 g, 硫酸镁 3.5 g, 柠檬酸钠 1.0 g。

6.2 试剂配制

6.2.1 80%乙腈溶液 (8+2, 体积比): 取 20 mL 水加入 80mL 乙腈 (6.1.1) 中, 混匀。

6.2.2 50%乙腈溶液 (5+5, 体积比): 取 50 mL 水加入 50mL 乙腈 (6.1.1) 中, 混匀。

6.2.3 乙酸铵-甲酸水溶液 (2 mmol/L): 称取 0.1542 g 乙酸铵 (6.1.4), 用 0.1%甲酸水溶液溶解并稀释至 1000 mL, 摇匀。

6.2.4 0.1% 甲酸甲醇溶液 (体积分数): 取 1mL 甲酸 (6.1.3) 用甲醇 (6.1.2) 定容到 1000 mL。

6.3 标准品

6.3.1 FB_1 标准品 ($\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$, CAS: 116355-83-0): 纯度 $\geq$ 98%, 或有证标准溶液。

6.3.2 FB_2 标准品 ($\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$, CAS: 116355-84-1): 纯度 $\geq$ 97.9%, 或有证标准溶液。

6.3.3 FB_3 标准品 ($\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$, CAS: 136379-59-4): 纯度 $\geq$ 98.5%, 或有证标准溶液。

6.3.4 DON 标准品 ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$, CAS: 51481-10-8): 纯度 $\geq$ 99.38%, 或有证标准溶液。

6.3.5 3-ADON 标准品 ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_6$, CAS: 50722-38-8): 纯度 $\geq$ 99.0%, 或有证标准溶液。

6.3.6 15-ADON 标准品 ($\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}_7$, CAS: 88337-96-6): 纯度 $\geq$ 99.8%, 或有证标准溶液。

6.3.7 ZEN 标准品 ($\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{O}_5$, CAS: 17924-92-4): 纯度 $\geq$ 99.7%, 或有证标准溶液。

6.3.8 OTA 标准品 ($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$, CAS: 303-47-9): 纯度 $\geq$ 99.0%, 或有证标准溶液。

6.3.9 T-2 标准品 ($C_{24}H_{34}O_9$, CAS: 21259-20-1): 纯度 $\geq 96.55\%$, 或有证标准溶液。

6.3.10 AFT B₁ 标准品 ($C_{17}H_{12}O_6$, CAS: 1162-65-8): 纯度 $\geq 98.0\%$, 或有证标准溶液。

6.3.11 AFT B₂ 标准品 ($C_{17}H_{14}O_6$, CAS: 7220-81-7): 纯度 $\geq 98.0\%$, 或有证标准溶液。

注: 标准物质可以使用满足要求的商品化标准溶液。

6.4 标准溶液的配制

分别吸取 11 种霉菌毒素标准溶液适量, 用乙腈将 FB₁、FB₂、FB₃ 稀释为 0.005、0.02、0.1、0.5、1.0 mg/L 浓度系列; DON、3-ADON、15-ADON 稀释为 0.02、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L 浓度系列; AFT B₁、AFT B₂ 稀释为 0.001、0.005、0.01、0.05、0.1 mg/L 浓度系列; ZEN、T-2、OTA 稀释为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg/L 浓度系列的混合标准工作溶液。

7 仪器与设备

7.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪: 配有电喷雾离子源 (ESI)。

7.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.0001 g。

7.3 高速粉碎机: 10000 r/min。

7.4 振荡器。

7.5 离心机: 4000 r/min。

7.6 涡旋混合器。

7.7 氮吹仪。

7.8 离心管: 50 mL, 塑料。

7.9 滤膜: 0.22 μm , 有机相。

7.10 pH 计。

8 分析步骤

8.1 样品的制备

将谷物籽粒按四分法缩分至 1 kg, 全部用谷物高速粉碎机 (7.3) 磨碎并细至粒度小于 1 mm, 混匀分成 2 份作为试样, 分别装入洁净的容器内, 密封, 标识后置于 4 °C 下避光保存。在制样的操作过程中, 应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

8.2 样品的提取与净化

准确称取样品 2 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管, 加入 20.00 mL 提取液 (6.2.1), 振荡提取 40 min, 加入混合净化材料 (6.1.5), 振摇约 1 min, 于 4000 r/min 离心 5 min, 吸取 3.00 mL 上清液于 15 mL 离心管中, 经氮气吹干后, 用 1.50 mL 定容液 (6.2.2) 溶解, 涡旋 30 s, 过 0.22 μm (7.9) 滤膜后, 上机测定。

8.3 液相色谱—串联质谱法测定

8.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: T3 柱, 100 mm×2.1 mm, 粒径 1.8 μm, 或性能相当者。
- b) 柱温: 40 °C。
- c) 进样量: 2 μL。
- d) 流动相、流速及梯度洗脱条件见表 1。

流动相 A: 乙酸铵-甲酸水溶液 (6.2.3)。

流动相 B: 0.1% 甲酸甲醇溶液 (6.2.4)。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱参考条件

时间 / min	流速 / (mL/min)	流动相 A / %	流动相 B / %
0	0.4	90	10
1.0	0.4	85	15
2.0	0.4	80	20
6.0	0.4	40	60
10.0	0.4	17	83
11.0	0.4	90	10
13.0	0.4	90	10

8.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源。
- b) 扫描方式: 正离子扫描和负离子模扫描。
- c) 离子源喷雾电压: 正离子模式 5500V、负离子模式 4500V。
- d) 离子源温度: 550°C。
- e) 雾化气、气帘气、碰撞气、辅助加热气均为高纯氮气, 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- f) 检测方式: 多反应监测, 参数详见表 2、表 3。

表 2 ESI+监测模式分析参数

名称	保留时间/min	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞能量/eV
FB ₁	8.73	722.4/334.4	722.4/334.4	54
		722.4/352.4		50
FB ₂	10.03	706.4/336.51	706.4/336.51	50
		706.4/318.61		54
FB ₃	9.46	706.4/336.50	706.4/336.50	50
		706.4/318.60		50

DON	4.26	297.1/249.1 297.1/203.2	297.1/249.1	16 21
3-ADON	6.42	339.2/203.2 339.2/231.1	339.2/203.2	21 18
3-ADON	6.41	339.3/321.2 339.3/137.1	339.3/321.2	12 19
AFT B ₁	7.74	313.1/285.1 313.1/241.1	313.1/285.1	33 50
AFT B ₂	7.50	315.1/287.1 315.1/259.1	315.1/287.1	35 40
T-2 毒素	9.39	484.2/305.1 484.2/245.1	484.2/305.1	19 19

表 3 ESI-监测模式分析参数

名称	保留时间/min	定性离子对/m/z	定量离子对/m/z	碰撞能量/eV
ZEN	10.02	317.1/175.0 317.1/273.0	317.1/175.0	-32 -27
OTA	10.06	402.2/358.2 402.2/211.0	402.2/358.2	-28 -38

8.3.3 定性测定

用高效液相色谱-串联质谱联用法对样品进行定性判定。在相同试验条件下，样品中应呈现定量离子对和定性离子对的色谱峰，被测物质的质量色谱峰保留时间与标准溶液中对应物质的质量色谱峰保留时间一致；样品色谱图中所选择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的偏差不超过表 4 规定范围，则可以判断样品中存在对应的目标物质。

表 4 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%

8.3.4 空白试验

除不称取试样外，均按上述操作步骤同时进行。

8.3.5 标准曲线的制作

在 8.3.1、8.3.2 液相色谱串联质谱仪分析条件下，将混合标准系列溶液由低到高浓度进样检测，以 11 种毒素色谱峰的峰面积与浓度作图，得到标准曲线回归方程，其线性相关系数应大于 0.99。

8.3.6 试样溶液的测定

在 8.3.1、8.3.2 液相色谱串联质谱仪分析条件下，取 8.2 处理得到的待测溶液进样，试液中待测物的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应适当减少取样量后重新测定。

9 结果计算和表达

按式（1）计算试样中各霉菌毒素的含量，计算结果需将空白值扣除。

$$X = \frac{A \times C_s \times V_1 \times V_3}{A_s \times m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中霉菌毒素的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A —— 试样中霉菌毒素的峰面积；

V_1 —— 试样中加入的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_2 —— 分取溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 —— 定容溶液体积，单位为毫升（mL）；

C_s —— 标准工作液中霉菌毒素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

A_s —— 标准工作液中霉菌毒素的峰面积；

m —— 试样的质量，单位为克（g）。

注：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。

10 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不大于这两个测定值算术平均值的 15%。

11 定量限

本方法的定量限 FB₁、FB₂、FB₃、ZEN、OTA、T-2、AFT B₁、AFT B₂ 为 0.001 mg/kg，DON、3-ADON、15-ADON 为 0.005 mg/kg。

12 技术要点

12.1 样品必须具有代表性。毒素分布不均匀且含量很低，要做到多点、随机、均匀，使得每个部位都有相同的概率被取到。

12.2 在取样、处理样品时，要求器具干燥无污染，在储存期间，环境要干燥，长时间储存必须在 -18℃ 以下，防止样品被污染。

12.3 由于样品粉末很细，加 80%乙腈溶液液振荡提取时，容易结块，要通过涡旋或其他方式打碎结块，使样品均匀分散在提取液中。

12.4 有些谷物籽粒脂肪含量高，如玉米，氮吹后用 50%乙腈溶液定容时，会有脂肪漂浮在溶液上方，过膜后溶液澄清方可上机测定。

13 结果判定

按 GB 2761 规定的标准执行。
