

ICS 67.050

B20

团体标准

T/ NAIA XXX—2025

红曲中桔青霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of Citrinin in Red Yeast by

HPLC-MS/MS

2025-XX-XX 发布

2025-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》规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

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。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监督管理总局重点实验室（枸杞及葡萄酒质量安全））、宁夏计量质量检验检测研究院、宁夏职业技术大学、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：张瑶、龚慧、郭阳、高琳、汤丽华、刘继辉、张赫宇、张小飞。

本文件于 2025 年 XX 月 XX 日首次发布。

红曲中桔青霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了红曲中桔青霉素的液相色谱-串联质谱检测方法。

本文件适用于红曲中桔青霉素的测定。

2 规范性引用文件

下列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实验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经甲醇水溶液提取，免疫亲和柱净化，反相色谱柱分离，供液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂与材料

5.1.1 甲醇：色谱纯。

5.1.2 乙腈：色谱纯。

5.1.3 甲酸：分析纯。

5.1.4 70%甲醇水：取 70 mL 甲醇，用水定容至 100mL。

5.1.5 PBS 缓冲溶液：称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，用水溶解，调节 pH 至 7.0，水定容至 1000mL。

5.1.6 0.1%磷酸溶液：准确移取 1mL 磷酸加水定容至 1000 mL。

5.1.7 甲醇-0.1%磷酸溶液（70+30）：取 0.1%磷酸溶液 30 mL，用甲醇定容至 100 mL。

5.1.8 0.1%甲酸水溶液：取 1.0 mL 甲酸，用水稀释定容至 1000 mL，混匀。

5.1.9 0.1%甲酸乙腈溶液：取 1.0 mL 甲酸，用乙腈稀释定容至 1000 mL，混匀。

5.1.10 免疫亲和柱：3 mL，柱容量 20 ng。

5.2 标准品

桔青霉素标准品（ $C_{13}H_{14}O_5$ ，CAS 号：518-75-2），浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 标准储备液 (10.0 µg/mL)：准确移取1.0 mL桔青霉素标准品，用甲醇 (5.1.1) 定容至10.0 mL容量瓶中，于-18℃冰箱中避光保存，保存期限为3个月。

5.3.2 标准中间液 (1.0 µg/mL)：准确移取1.0mL桔青霉素标准储备液 (5.3.1) 于10mL容量瓶中，用甲醇定容，浓度为1.0 µg/mL，于4℃下保存。

5.3.3 基质标准工作液：移取适当体积的标准溶液，用阴性样品提取液将桔青霉素配制成质量浓度为1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL的标准工作液，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源。

6.2 天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 高速离心机：最大转速 9000 r/min。

6.5 氮吹仪。

6.6 有机微孔滤膜，孔径 0.22 µm，或相当者。

7 分析步骤

7.1 样品制备

将红曲样品混合均匀，搅拌破碎，装入密闭洁净容器中标记明示，冷冻保存。

7.2 样品的提取与净化

7.2.1 样品提取

称取 1.0 g (精确至 0.01 g) 红曲样品置于 50 mL 具塞离心管中，加入 20 mL 70%甲醇水 (5.1.4)，涡旋振荡提取 5min，8000r/min 离心 5 min，移取 1.0 mL 滤液，置于另一干净的离心管中，加入 19 mL PBS 缓冲溶液 (5.1.5) 稀释、混匀；以玻璃纤维滤纸过滤，待免疫亲和柱净化。

7.2.2 样品净化

准确移取 10.0 mL 上述澄清滤液过免疫亲和柱，以 1 滴/s~2 滴/s 的流速全部通过亲和柱；加入 10 mL 水溶液淋洗柱子，弃去全部流出液。准确加入 2.0 mL 甲醇-0.1%磷酸溶液 (5.1.8) 进行洗脱，收集全部洗脱液于试管中，45℃氮吹至近干，1.0 mL 甲醇溶解，过 0.22 µm 滤膜于进样小瓶中，供 HPLC-MS/MS 分析。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：Acquity BEH C18 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 3.5 µm)，或相当者；

b) 柱温：30℃。

c) 流动相：A：0.1%的甲酸水溶液 (5.1.8)，B：乙腈溶液 (5.1.9)，梯度洗脱条件见表 1。

d) 流速：0.3mL/min。

e) 进样量：5µL。

时间/min	流速/（mL/min）	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.3	70	30
2.00	0.3	25	75
3.00	0.3	5	95
8.00	0.3	25	75
9.00	0.3	70	30

7.3.2 质谱参考条件

- a) 电离方式：电喷雾离子源（ESI）。
- b) 扫描方式：正离子扫描。
- c) 检测方式：多反应监测（MRM）。
- d) 鞘气温度：325℃。
- e) 鞘气流速：10.0 L/min。
- f) 雾化器压力：310.23 kPa。
- g) 喷嘴电压：500 V。
- h) 毛细管电压：3500 V。
- i) 定性离子对、定量离子对、碎裂电压、碰撞能量等参数参见附录 A。

7.4 定性测定

经确证分析，被测物质色谱峰保留时间与标准物质一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现；同时，所选择离子的丰度比与标准溶液中相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 2），则可判定样品中存在对应的被测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	20%~50%	10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.5 定量测定

取试样溶液和相应的标准溶液，作校准曲线，以色谱峰面积定量，按外标法计算，标准溶液及试样溶液中桔青霉素响应值均应在仪器检测的线性范围内，在上述液相色谱质谱条件下，桔青霉素标准溶液的特征离子质量色谱图见附录 B。

7.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 结果计算

试样中桔青霉素的含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中各种化合物含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

C ——由标准曲线计算出的试样溶液浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V ——试样的最后定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，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。

9 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

10 定量限

红曲中桔青霉素的定量限为 $25 \mu\text{g/kg}$ 。

附录 A
(资料性附录)

表 A.1 桔青霉素的质谱参数

被测物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (v)	碰撞能量 (eV)
桔青霉素	251	233 ^a	135	17
		205	135	20
		91	135	25

注：*为定量离子

附录 B
(资料性附录)

表 B.1 桔青霉素的多反应监测（MRM）典型色谱图

