



# 中华人民共和国国家标准

GB5009.189—xxxx

## 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会  
国家市场监督管理总局 发布

## 前言

本标准代替GB 5009.189-2016《食品安全国家标准食品中米酵菌酸的测定》。

本标准与GB 5009.189-2016相比，主要变化如下：

- 增加了第二法液相色谱-质谱/质谱法；
- 修改了适用范围；
- 修改了液相色谱法的结果计算和表述。

# 食品安全国家标准

## 食品中米酵菌酸的测定

### 1 范围

本标准规定了食品中米酵菌酸的测定方法。

本标准第一法适用于银耳及其制品、酵米面及其制品中米酵菌酸的测定。

本标准第二法适用于银耳及其制品、木耳及其制品、谷物及其制品中米酵菌酸的测定。

### 第一法液相色谱法

### 2 原理

试样中的米酵菌酸经溶剂提取，混合型强阴离子交换柱或液液萃取法净化、浓缩后，高效液相色谱仪分析，外标法定量。

### 3 试剂和材料

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。

#### 3.1 试剂

3.1.1 甲醇（CH<sub>3</sub>OH）：色谱纯。

3.1.2 甲酸（CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）。

3.1.3 氨水（NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O）：25%~28%。

3.1.4 甲酸（CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）。

#### 3.2 试剂配制

3.2.1 氨水-甲醇溶液：量取80 mL甲醇，加入1.0 mL氨水，加水定容至100 mL，摇匀。

3.2.2 甲酸-甲醇溶液（2%）：吸取2.0 mL甲酸，加甲醇至100 mL，摇匀。

3.2.3 甲酸水溶液（pH2.5）：水用甲酸调节至pH 2.5±0.1，摇匀。

#### 3.3 标准品

米酵菌酸（C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>，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品。

注：标准物质可以使用满足溯源要求的商品化标准溶液。

#### 3.4 标准溶液配制

3.4.1 米酵菌酸标准储备液（0.1 mg/mL）：准确称取米酵菌酸标准品10.0 mg（精确至0.01 mg），用甲醇溶解，转移至100 mL容量瓶中，用甲醇定容至刻度。置于-20℃冰箱中避光保存，有效期为6个月。

3.4.2 米酵菌酸标准系列工作液：分别准确吸取米酵菌酸标准储备液用甲醇稀释定容，配制米酵菌酸浓度分别为0.1 μg/mL、0.3 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL和20.0 μg/mL的标准工作溶液，临用现配。

### 3.5 材料

固相萃取柱：混合型强阴离子交换柱（60 mg/3 mL）或等效固相萃取柱，临用前依次加5 mL甲醇和5 mL水活化，保持柱体湿润。

## 4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，配二极管阵列检测器或紫外检测器。

4.2 天平：感量分别为0.01g和0.01 mg。

4.3 固相萃取装置（带真空泵）。

4.4 氮吹仪。

4.5 旋转蒸发仪（带减压装置）。

4.6 pH计：精度为0.01。

4.7 粉碎机（带 $\phi 0.425$  mm筛）。

4.8 超声波振荡器：30 kHz ~50 kHz。

## 5 分析步骤

### 5.1 试样制备

酵米面及其制品不少于 1 kg，银耳及其制品不少于 600 g，干试样经粉碎过  $\phi 0.425$  mm 筛；鲜（湿）试样剪碎或切碎，匀浆处理，混合均匀，供检测样本每份不少于 200 g，储存于样品瓶或塑封袋中，密封冷藏保存。

#### 5.1.1 固相萃取法

##### 5.1.1.1 提取

称取20g（精确至0.01g）试样置于锥形瓶中，加入约50 mL氨水-甲醇溶液，混匀，室温下避光浸泡1h，置于超声波振荡器中超声提取约30 min后用中速滤纸过滤，将滤液转移至100 mL容量瓶中，于残渣中加入约40 mL氨水-甲醇溶液，涡旋混匀后置于超声波振荡器中超声提取约30 min后用中速滤纸过滤，将滤液转移至同一100 mL容量瓶中，并用氨水-甲醇溶液定容至刻度，混匀。准确量取50.0 mL提取液，置80℃水浴中旋转蒸发浓缩至约3 mL，待净化。

##### 5.1.1.2 净化

将浓缩后的试样全部转移到已活化的固相萃取柱中，依次用5 mL水和5 mL甲醇淋洗，弃去流出液，再用6 mL甲酸-甲醇（2%）溶液洗脱，收集洗脱液，于40℃水浴中氮吹至干，准确加入0.5 mL甲醇，涡旋溶解，混匀，经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔有机滤膜过滤后备用。

#### 5.1.2 液-液萃取法

##### 5.1.2.1 提取

称取20g（精确至0.01g）试样置于锥形瓶中，加入约20 mL甲醇，室温下避光浸泡1h，再加入约70 mL三氯甲烷和0.2 mL磷酸溶液（45.4%），振荡30 min，过滤，将滤液转移至100 mL容量瓶中，用三氯甲烷定容至刻度，混匀。准确量取40.0 mL提取液，待净化。

##### 5.1.2.2 萃取

将上述滤液移入150mL分液漏斗中，加入与滤液等体积的碳酸氢钠溶液（40g/L），振摇2min，静置待分层后，取出下层于另一分液漏斗中；再用碳酸氢钠溶液（40g/L）10mL重复提取两次，轻摇；将

三次提取的碳酸氢钠溶液合并，加入25mL三氯甲烷，振摇2min，静置分层后弃去三氯甲烷，于分液漏斗中慢慢加入盐酸溶液（6mol/L）调该溶液pH至2~3，加入石油醚50mL，振摇3min，静置分层，取出石油醚层于旋蒸瓶中，再分别用石油醚30mL和20mL各提取一次，将石油醚层并入同一瓶中，于40℃水浴中旋蒸浓缩至干，用少量甲醇分次将旋蒸瓶中提取物溶解并转移至5.00 mL玻璃离心管或浓缩瓶中，于40℃下氮吹浓缩至干，准确加入0.5mL甲醇，涡旋溶解，混匀，经0.45 μm微孔有机滤膜过滤后备用。

## 5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱柱：C<sub>18</sub>色谱柱（柱长250mm，内径4.6mm，粒径5μm）或同等性能的色谱柱；

5.2.2 流动相：甲醇+甲酸水溶液（pH2.5）=75+25；

5.2.3 流速：1.0 mL/min；

5.2.4 柱温：30℃；

5.2.5 检测波长：267nm；

5.2.6 进样量：20μL。

## 5.3 标准曲线的制作

将20μL标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中米酵菌酸的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。米酵菌酸标准溶液的色谱图参见附录A图A.1。

## 5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到峰面积，以保留时间定性，根据标准曲线得到待测液中米酵菌酸的浓度。

## 6 结果计算和表述

试样中米酵菌酸的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中米酵菌酸的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

ρ——由标准曲线得到的试样溶液中米酵菌酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V<sub>1</sub>——试样溶液提取液体积，单位为毫升（mL）；

V<sub>3</sub>——样品经净化洗脱后的最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样的称样量，单位为克（g）；

V<sub>2</sub>——用于净化量取的试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

1000——单位换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

## 7 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术平均值的10%。

## 8 其他

本方法的检出限为5μg/kg，定量限为15μg/kg。

## 第二法液相色谱-质谱/质谱法

### 9 原理

试样中的米酵菌酸用氨化甲醇提取后,混合型强阴离子交换柱净化,采用液相色谱-串联质谱仪检测,外标法定量。

### 10 试剂和材料

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。

#### 10.1 试剂

- 10.1.1 乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ ): 色谱纯。
- 10.1.2 甲酸( $\text{CH}_2\text{O}_2$ ): 色谱纯。
- 10.1.3 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ )。
- 10.1.4 氨水( $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ): 25% ~ 28%。
- 10.1.5 硫酸铵( $\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ )。

#### 10.2 试剂配制

- 10.2.1 氨水-甲醇溶液: 量取80mL甲醇,加入1.0mL氨水,加水定容到100mL,混匀。
- 10.2.2 甲酸-甲醇溶液(2%): 吸取2.0mL甲酸,加甲醇至100 mL,混匀。
- 10.2.3 0.1%甲酸水溶液: 吸取甲酸1.0 mL用水稀释至1000mL,混匀。
- 10.2.4 乙腈-水溶液(1:1): 取乙腈50mL用水稀释至100mL,混匀。

#### 10.3 米酵菌酸标准品

米酵菌酸( $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7$ , CAS号: 11076-19-0): 纯度 $\geq 95\%$ ,或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

注: 标准物质可以使用满足溯源要求的商品化标准溶液。

#### 10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 米酵菌酸标准储备液(0.1 mg/mL): 准确称取米酵菌酸标准品10.0 mg(精确至0.01 mg),用甲醇溶解,转移至100 mL容量瓶中,用甲醇定容至刻度。置于-20 °C冰箱中避光保存,有效期为6个月。
- 10.4.2 米酵菌酸标准中间液(1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 准确吸取米酵菌酸标准储备溶液100  $\mu\text{L}$ ,用甲醇稀释并定容至10.00 mL,临用配制。
- 10.4.3 米酵菌酸标准系列工作溶液: 分别准确吸取米酵菌酸标准中间液用乙腈-水溶液(1:1)稀释定容,配制成米酵菌酸浓度分别为1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0ng/mL、25.0ng/mL和50.0ng/mL的标准工作溶液。临用配制。

#### 10.5 材料

固相萃取柱: 混合型强阴离子交换柱(60 mg/3 mL)或等效固相萃取柱,临用前依次用5.0 mL甲醇和5.0 mL水活化,保持柱体湿润。

### 11 仪器和设备

- 11.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。
- 11.2 天平: 感量为0.01 mg和0.01 g。

11.3 固相萃取装置（带真空泵）。

11.4 氮吹仪。

11.5 粉碎机（带 $\phi 0.425$  mm筛）。

11.6 超声波振荡器：30 kHz ~50 kHz。

## 12 分析步骤

### 12.1 试样制备

谷物及其制品不少于1 kg，银耳及其制品、木耳及其制品不少于600 g，干试样经粉碎过 $\phi 0.425$  mm筛；鲜（湿）试样剪碎或切碎，匀浆处理，混合均匀，供检测样本每份不少于200g，储存于样品瓶或塑封袋中，密封冷藏保存。

#### 12.1.1 提取

##### 12.1.1.1 谷物及其制品、银耳及其制品、干木耳

称取2.5 g试样（精确至0.01 g）于50 mL离心管中，加入10 mL甲醇-氨水溶液（干木耳加入20 mL甲醇-氨水溶液），充分混匀，室温下置于暗处浸泡1 h后，超声提取30 min，离心5 min，取上清液至25.0 mL刻度离心管中（干木耳试样至50.0 mL刻度离心管中），残渣加入10 mL氨水-甲醇溶液（干木耳试样加入20 mL氨水-甲醇溶液）重复提取一次，合并提取液，用甲醇-氨水溶液定容至25.0 mL（干木耳试样定容至50.0 mL），准确移取5.0 mL上清液（干木耳试样准确移取10.0 mL上清液），待净化。

##### 12.1.1.2 鲜湿木耳

称取2.5 g试样（精确至0.01 g）于50 mL离心管中，加入10 mL甲醇-氨水溶液，充分混匀，室温下置于暗处浸泡1 h后加入3 g硫酸铵，超声提取30 min，离心5 min，取上清液至25.0 mL刻度离心管中，残渣加入10 mL甲醇-氨水溶液重复提取一次，合并提取液，用甲醇-氨水溶液定容至25.0 mL，准确移取5.0 mL上清液，待净化。

#### 12.1.2 净化

将待净化液转移到经活化平衡的固相萃取柱中，依次用5mL水和5mL甲醇淋洗，弃去流出液，再用6mL甲酸-甲醇溶液(2%)洗脱，收集洗脱液，于40℃水浴中氮吹至干，准确加入1.0mL乙腈-水溶液(1:1)，涡旋溶解残渣，经0.22  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱分析。

### 12.2 仪器参考条件

#### 12.2.1 液相色谱条件

- 色谱柱：C<sub>18</sub>色谱柱（柱长100 mm，柱内径2.1 mm，填料粒径1.7 $\mu\text{m}$ ）或同等性能的色谱柱；
- 流动相：A为0.1%甲酸水溶液，B为乙腈，梯度洗脱程序见表1；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40℃；
- 进样量：5 $\mu\text{L}$ 。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	流动相比例 %	
	流动相A	流动相B
0	70	30
2	30	70
6	5	95
8	5	95
8.1	70	30
10	70	30

## 12.2.2 质谱条件

- a) 离子化方式：电喷雾负离子模式；
- b) 监测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 气帘气：40 psi；
- d) 碰撞气：9 psi；
- e) 离子喷雾电压：4500V；
- f) 离子源温度：550℃；
- g) 离子选择参数见表2。

表2 离子选择参数表

中文名称	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压 V	碰撞能 V
米酵菌酸	485.3	397.2*	-67	-26
		441.2	-67	-16
*为定量离子。				

## 12.3 定性确证

按照仪器参考条件测定试样溶液和标准工作溶液，试样中的米酵菌酸质量色谱峰与标准工作溶液保留时间相比，变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内。米酵菌酸的质谱定性离子必须出现，且同一检测批次，试样中米酵菌酸的两个子离子的相对丰度比（k）与浓度相当的标准工作溶液相比，其允许偏差不超过表3规定的范围，则可判定为试样中存在米酵菌酸。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度（%）	$k > 50$	$50 \geq k > 20$	$20 \geq k > 10$	$k \leq 10$
允许的最大偏差（%）	$\pm 20$	$\pm 25$	$\pm 30$	$\pm 50$

## 12.4 定量测定

## 12.4.1 工作曲线的制作

将米酵菌酸标准系列工作溶液分别注入液相色谱-质谱/质谱仪中，测定相应的质量色谱峰面积，以标准系列工作溶液的浓度为横坐标，以质量色谱峰峰面积的响应值为纵坐标，绘制工作曲线。米酵菌酸标准溶液的质量色谱图参见附录B图B.1。

## 12.4.2 试样溶液的测定



将试样溶液按仪器参考条件进行测定，得到相应的试样溶液的质量色谱峰面积。根据工作曲线得到试样溶液中米酵菌酸的浓度。

### 13 结果计算和表述

试样中米酵菌酸含量按式（2）计算：

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$X$ ——试样中米酵菌酸的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

$\rho$ ——由工作曲线得出的试样溶液中米酵菌酸的浓度，单位为微克每升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；

$V_1$ ——试样溶液提取液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$V_3$ ——样品经净化洗脱后的最终定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

$m$ ——试样的称样量，单位为克（ $\text{g}$ ）；

$V_2$ ——用于净化移取的试样溶液体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

1000——单位换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

### 14 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术平均值的15%。

### 15 其他

本方法的检出限为1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 附录 A

## 米酵菌酸标准溶液的高效液相色谱图

米酵菌酸高效液相色谱图见图A.1。

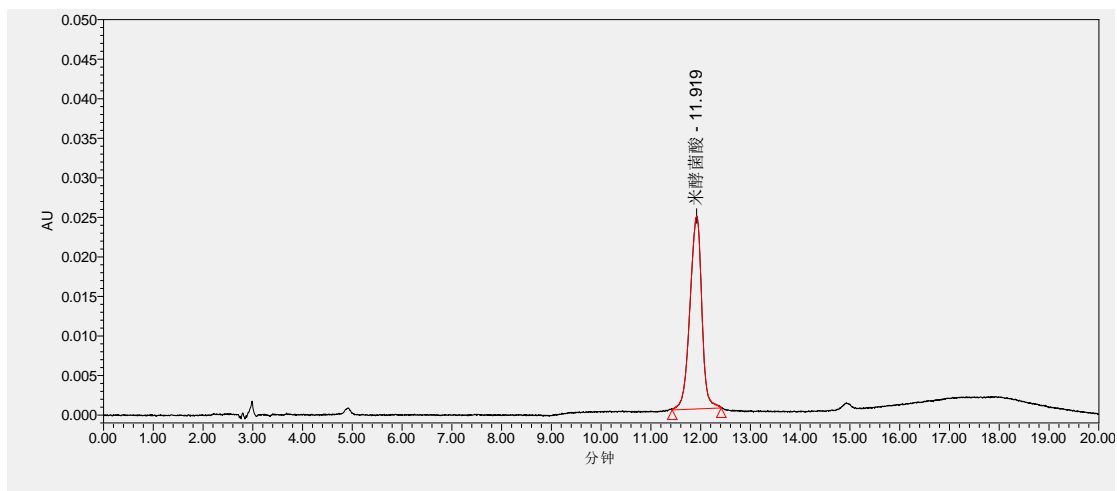


图 A.1 米酵菌酸高效液相色谱图(5  $\mu$ g/mL)

## 附录 B

## 米醇菌酸标准溶液多反应监测质量色谱图

米醇菌酸 MRM 图谱见图 B.1。

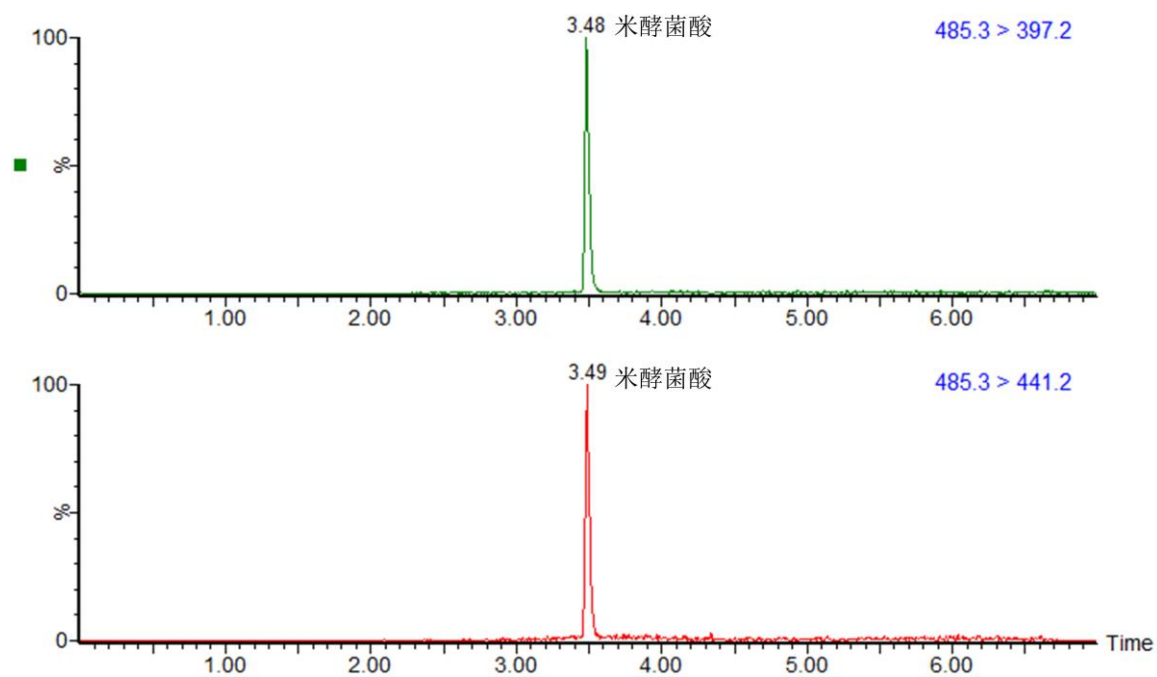


图 B.1 米醇菌酸MRM图谱 (1  $\mu$ g/L)