中华人民共和国国家标准

GB 5009.240—xxxx

食品安全国家标准
食品中伏马菌素的测定

（征求意见稿）

202x-xx-xx 发布　　202x-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 5009.240-2016《食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定》。

本标准与GB 5009.240-2016相比，主要变化如下：

——标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中伏马菌素的测定”；

——扩大了方法的适用范围；

——修改了各方法的线性范围；

——修改了各方法的检出限、定量限；

——修改了柱容量及柱回收率验证方法。

食品安全国家标准
食品中伏马菌素的测定

1 范围

本标准规定了食品中伏马菌素的测定方法。

本标准适用于谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品、植物油脂中伏马菌素B_1、伏马菌素B_2、伏马菌素B_3（以下简称FB_1、FB_2、FB_3）的测定。

第一法 免疫亲和柱净化-柱后衍生高效液相色谱法

2 原理

试样经提取、净化、C18反向色谱柱分离，邻苯二甲醛衍生，高效液相色谱-荧光检测器检测，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_3OH）：色谱纯。

3.1.2 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

3.1.3 甲酸（ HCOOH）：色谱纯。

3.1.4 乙酸（CH_3COOH）。

3.1.5 氢氧化钠（NaOH）。

3.1.6 氯化钠（NaCl）。

3.1.7 磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）。

3.1.8 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

3.1.9 氯化钾（KCl）。

3.1.10 硼砂（$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$）。

3.1.11 2-巯基乙醇（C_2H_6OS）。

3.1.12 邻苯二甲醛（C_8H_6O，OPA）。

3.1.13 吐温-20（$C_{58}H_{114}O_{26}$）。

3.1.14 盐酸（HCl）。

3.2 试剂配制

3.2.1 甲酸-水溶液（0.1%）：准确移取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL，混合均匀。

3.2.2 乙腈-水溶液（50+50）：分别量取 500 mL 乙腈和 500 mL 水，混合均匀。

3.2.3 乙腈-水溶液（20+80）：分别量取 20 mL 乙腈和 80 mL 水，混合均匀。

3.2.4 甲醇-乙酸溶液（98+2）：准确移取 2 mL 乙酸，用甲醇稀释至 100 mL，混合均匀。

3.2.5 氢氧化钠溶液（2 mol/L）：准确称取氢氧化钠 8.0 g，加 50 mL 水溶解，冷却后，用水稀释至 100 mL，混合均匀。

3.2.6 磷酸盐缓冲液（PBS）：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 980 mL 水溶解，用盐酸调整 pH 至 7.4，用水稀释至 1000 mL，混合均匀。

3.2.7 吐温-20/PBS 溶液（0.1%）：准确称取 1.0 g 吐温-20，加入磷酸盐缓冲液并稀释至 1000 mL，混合均匀。

3.2.8 硼砂溶液（0.05 mol/L，pH 10.5）：称取硼砂 19.1 g，溶于 980 mL 水中，用氢氧化钠溶液调 pH 至 10.5，用水稀释至 1000 mL，混合均匀。

3.2.9 衍生溶液：称取 2.0 g 邻苯二甲醛，溶于 20 mL 甲醇中，用硼砂溶液（0.05 mol/L，pH 10.5）稀释至 500 mL，加入 2-巯基乙醇 500 μL，混匀，过滤后装入棕色瓶中，室温避光，可保存一周。

3.3 标准品

3.3.1 伏马菌素 B_1（$C_{34}H_{59}NO_{15}$，FB_1，CAS 号：116355-83-0），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.2 伏马菌素 B_2（$C_{34}H_{59}NO_{14}$，FB_2，CAS 号：116355-84-1），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.3.3 伏马菌素 B_3（$C_{34}H_{59}NO_{14}$，FB_3，CAS 号：136379-59-4），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 标准储备溶液（100 μg/mL）：分别准确称取 FB_1、FB_2、FB_3 各 10 mg（精确至 0.01 mg）至小烧杯中，用乙腈-水溶液（50+50）溶解，分别转移至 100 mL 容量瓶中，以乙腈-水溶液（50+50）定容至刻度。于-18 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

3.4.2 混合标准储备溶液：准确移取 FB_1 标准储备液 1.0 mL、FB_2 和 FB_3 标准储备液各 0.5 mL 至同一 10 mL 容量瓶中，加乙腈-水溶液（50+50）稀释至刻度，FB_1 浓度为 10 μg/mL、FB_2 和 FB_3 浓度为 5 μg/mL。于-18 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

3.4.3 混合标准工作溶液：准确移取混合标准储备溶液 1.0 mL 至 10.0 mL 容量瓶中，加乙腈-水溶液（50+50）稀释，定容至刻度，FB_1 浓度为 1 μg/mL、FB_2 和 FB_3 浓度为 0.5 μg/mL。于 4℃下避光保存，有效期 6 个月。

3.4.4 混合标准系列工作溶液：准确移取混合标准工作溶液，用乙腈-水溶液（20+80）稀释，配制成 FB_1 浓度依次为 20.0 ng/mL、80.0 ng/mL、160 ng/mL、240 ng/mL、320 ng/mL、400 ng/mL、480 ng/mL，FB_2 和 FB_3 浓度依次为 10.0 ng/mL、40.0 ng/mL、80.0 ng/mL、120 ng/mL、160 ng/mL、200 ng/mL、240 ng/mL 的系列混合标准工作溶液，临用现配。

3.5 材料

3.5.1 免疫亲和柱（柱容量及柱回收率验证方法参见附录 B）。

注：对于每个批次的亲和柱在使用前需进行柱容量及柱回收率验证。

3.5.2 微孔滤膜：0.45 μm，有机型。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，带荧光检测器。

4.2 柱后衍生系统。

4.3 天平：感量 0.01 g 和 0.01 mg。

4.4 均质器：转速≥2000 r/min。

4.5 振荡器（转速≥1000 转/分）或超声波提取仪（功率≥500 W）。

4.6 离心机：转速≥4000 r/min。

4.7 氮吹仪。

5 分析步骤

5.1 试样制备

谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品采样量不低于 1 kg；样品量不到 1 kg，取全部样品。用高速粉碎机将其粉碎，过筛，使其粒度小于 1 mm。混合均匀后缩分至 100 g，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 ℃下避光保存。

植物油脂采样量不低于 1 kg；样品量不到 1 kg，取全部样品。将样品直接装入洁净的容器。混合均匀后缩分至 100 g，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 ℃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伏马菌素含量的变化。

5.2 试样提取

5.2.1 谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品

准确称取试样 20 g（精确至 0.01 g）于 250 mL 三角烧瓶中，准确加入 100 mL 乙腈-水（50+50）提取液，超声或振荡提取 20 min，转移 20 mL 溶液至 50 mL 离心管中，在 4000 r/min 下离心 5 min，待净化。

5.2.2 植物油脂

植物油脂提取过程同 5.2.1，提取液在下层。

5.3 试样净化

5.3.1 婴幼儿谷类辅助食品

准确移取5.0 mL提取液，加入45.0 mL吐温-20/PBS溶液进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过免疫亲和柱，流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用10 mL PBS缓冲液和10 mL水淋洗免疫亲和柱，分别用1 mL甲醇-乙酸溶液洗脱免疫亲和柱3次，收集合并洗脱液，55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

5.3.2 谷物及其制品、植物油脂

准确移取0.5 mL 提取液，加入4.5 mL吐温-20/PBS溶液进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过免疫亲和柱，流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用10 mL PBS缓冲液和10 mL水淋洗免疫亲和柱，分别用1 mL甲醇-乙酸溶液洗脱免疫亲和柱3次，收集合并洗脱液。55℃

下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

注：由于不同厂商提供的免疫亲和柱操作程序可能不同，实际操作时，请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

5.4 仪器参考条件

5.4.1 色谱柱：C18 色谱柱：250 mm×4.6 mm，5 μm，或相当者。

5.4.2 检测波长：激发波长 335 nm；发射波长 440 nm。

5.4.3 流动相：A：甲酸-水溶液（0.1%）；B：甲醇。梯度洗脱，洗脱程序见表 1。

5.4.4 流动相流速：0.8 mL/min。

5.4.5 衍生液流速：0.4 mL/min。

5.4.6 柱温：40℃。

5.4.7 反应器温度：40℃。

5.4.8 进样量：50 μL。

表 1 流动相洗脱程序

时间/min	流动相 A/（%）	流动相 B/（%）
0.00	45.0	55.0
2.00	45.0	55.0
9.00	30.0	70.0
14.00	10.0	90.0
14.50	10.0	90.0
15.00	45.0	55.0
22.00	45.0	55.0

5.5 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液从低浓度到高浓度分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积。以标准溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

5.6 试样溶液的测定

将待测溶液进样，得到对应的峰面积，根据标准曲线计算待测溶液中 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度。

5.7 空白试验

不称取试样，按5.2和5.3的步骤做空白实验。

6 分析结果的表述

$$X=\frac{(\rho-\rho_0)\times V_1\times V_2\times 1000}{m\times V_3\times 1000}\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

X——待测样品中 FB_1、FB_2、FB_3 的含量，单位为微克每千克（μg/kg）。

ρ——待测溶液中 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

ρ_0——空白试验测得 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

m——样品的称样量，单位为克（g）。

V_1——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）。

V_2——进样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）。

V_3——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）。

1000——换算系数。

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。

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20%。

8 其他

谷物及其制品、植物油脂，当称样量为20.0 g 时，FB_1、FB_2、FB_3的检出限分别为：60.0 μg/kg、30.0 μg/kg、30.0 μg/kg；定量限分别为：200 μg/kg，100 μg/kg，100 μg/kg。

婴幼儿谷类辅助食品，当称样量为 20.0 g 时，FB_1、FB_2、FB_3 的检出限分别为：6.00 μg/kg、3.00 μg/kg、3.00 μg/kg；定量限分别为：20.0 μg/kg，10.0 μg/kg，10.0 μg/kg。

第二法 高效液相色谱-串联质谱法

9 原理

试样经提取、加入同位素内标、稀释、净化、C18反向色谱柱分离，串联质谱检测，内标法定量。

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 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

10.1.2 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

10.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

10.1.4 氯化钠（NaCl）。

10.1.5 磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）。

10.1.6 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

10.1.7 氯化钾（KCl）。

10.1.8 吐温-20（$C_{58}H_{114}O_{26}$）。

10.1.9 乙酸（CH_3COOH）。

10.2 试剂配制

10.2.1 甲酸-水溶液（0.1%）：准确移取 1.0 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL 水中，混合均匀。

10.2.2 乙腈-甲醇溶液（50+50）：分别量取 500 mL 甲醇和 500 mL 乙腈，混合均匀。

10.2.3 乙腈-水溶液（50+50）：分别量取 500 mL 乙腈和 500 m 水，混合均匀。

10.2.4 乙腈-水溶液（20+80）：分别量取 20 mL 乙腈和 80 mL 水，混合均匀。

10.2.5 甲醇-水溶液（60+20）：分别量取 600 mL 甲醇和 200 mL 水，混合均匀。

10.2.6 甲醇-乙酸溶液（99+1）：准确移取 1.0 mL 乙酸，用甲醇稀释至 100 mL，混合均匀。

10.2.7 甲醇-乙酸溶液（98+2）：准确移取 2.0 mL 乙酸，用甲醇稀释至 100 mL，混合均匀。

10.2.8 磷酸盐缓冲液（PBS）：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 980 mL 水溶解，用盐酸调整 pH 至 7.4，用水稀释至 1000 mL，混合均匀。

10.2.9 吐温-20/PBS 溶液（0.1%）：准确称量 1 g 吐温-20，加入磷酸盐缓冲液并稀释至 1000 mL，混合均匀。

10.3 标准品

10.3.1 伏马菌素 B_1（FB_1，$C_{34}H_{59}NO_{15}$，CAS 号：116355-83-0，纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.2 伏马菌素 B_2（FB_2，$C_{34}H_{59}NO_{14}$，CAS 号：116355-84-1），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.3 伏马菌素 B_3（FB_3，$C_{34}H_{59}NO_{14}$，CAS 号：136379-59-4），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.3.4 $^{13}C_{34}$-伏马菌素 B_1 标准溶液（$^{13}C_{34}$-FB_1，25 μg/mL）。

10.3.5 $^{13}C_{34}$-伏马菌素 B_2 标准溶液（$^{13}C_{34}$-FB_2，10 μg/mL）。

10.3.6 $^{13}C_{34}$-伏马菌素 B_3 标准溶液（$^{13}C_{34}$-FB_3，10 μg/mL）。

10.4 标准溶液配制

10.4.1 标准储备溶液（100 μg/mL）：分别准确称取 FB_1、FB_2、FB_3 各 10 mg（精确至 0.01 mg）至小烧杯中，用乙腈-水溶液（50+50）溶解，分别转移至 100 mL 容量瓶中定容至刻度，FB_1、FB_2、FB_3 浓度分别为 100 μg/mL。于-18 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

10.4.2 混合标准储备溶液：准确移取 FB_1 标准储备液 1.0 mL、FB_2 和 FB_3 标准储备液各 0.5 mL 至同一 10 mL 容量瓶中，加乙腈-水溶液（50+50）稀释，定容至刻度，FB_1 浓度为 10 μg/mL、FB_2 和 FB_3 浓度分别为 5 μg/mL 的混合标准溶液。于-18 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

10.4.3 混合标准工作溶液：准确移取混合标准储备溶液 1.0 mL 至 10 mL 容量瓶中，加乙腈-水溶液（50+50）稀释，定容至刻度，FB_1 浓度为 1.0 μg/mL、FB_2 和 FB_3 浓度分别为 0.5 μg/mL 的混合标准工作溶液。于 4 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

10.5 同位素内标溶液配制

10.5.1 混合同位素标准储备溶液：准确移取 $^{13}C_{34}$-FB_1（25 μg/mL）、$^{13}C_{34}$-FB_2（10 μg/mL）、$^{13}C_{34}$-FB_3（10 μg/mL）各 1 mL 至同一 10 mL 容量瓶中，加乙腈-水液（50+50）稀释，定容至刻度，$^{13}C_{34}$-FB_1

浓度为 2.5 μg/mL、$^{13}C_{34}$-FB_2 和 $^{13}C_{34}$-FB_3 浓度分别为 1 μg/mL，于-18 ℃以下避光保存，有效期 6 个月。

10.5.2 混合同位素标准工作溶液：准确移取 1.0 mL 混合同位素标准储备溶液至 10 mL 容量瓶中，加乙腈-水液（50+50）稀释，定容至刻度，$^{13}C_{34}$-FB_1 250 ng/mL、$^{13}C_{34}$-FB_2 和 $^{13}C_{34}$-FB_3 浓度分别为 100 ng/mL，于 4 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

10.6 混合标准系列工作溶液配制

准确移取混合标准工作溶液，用乙腈-水溶液（20+80）稀释，加入混合同位素标准工作溶液，配制成 FB_1 浓度依次为 20.0 ng/mL、80.0 ng/mL、160 ng/mL、240 ng/mL、320 ng/mL、400 ng/mL、480 ng/mL，FB_2 和 FB_3 浓度依次为 10.0 ng/mL、40.0 ng/mL、80.0 ng/mL、120 ng/mL、160 ng/mL、200 ng/mL、240 ng/mL 的系列混合标准工作溶液，每个标准工作溶液中含有 $^{13}C_{34}$-FB_1 50.0 ng/mL、$^{13}C_{34}$-FB_2 和 $^{13}C_{34}$-FB_3 20.0 ng/mL，临用现配。

10.7 材料

10.7.1 免疫亲和柱（柱容量及柱回收率验证方法参见附录 B）。

注：对于每个批次的亲和柱在使用前需进行柱容量及柱回收率验证。

10.7.2 强阴离子交换固相萃取柱（6 mL，500 mg）

10.7.3 微孔滤膜：0.22 μm，有机型。

11 仪器和设备

11.1 高效液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源。

11.2 天平：感量 0.01 g 和 0.01 mg。

11.3 均质器：转速≥2000 r/min。

11.4 振荡器（转速≥1000 转/分）或超声波提取仪：功率≥500 W。

11.5 离心机：转速≥4000 r/min。

11.6 氮吹仪。

12 分析步骤

12.1 试样制备

谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品采样量不低于 1 kg；样品量不到 1 kg，取全部样品。用高速粉碎机将其粉碎，过筛，使其粒度小于 1 mm。混合均匀后缩分至 100 g，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 ℃下避光保存。

植物油脂采样量不低于 1 kg；样品量不到 1 kg，取全部样品。将样品直接装入洁净的容器。混合均匀后缩分至 100 g，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 ℃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伏马菌素含量的变化。

12.2 试样提取

12.2.1 谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品

准确称取试样 20 g（精确至 0.01 g）于 250 mL 三角烧瓶中，准确加入 100 mL 乙腈-水（50+50）提取液，超声或振荡提取 20 min。转移 20 mL 溶液至 50 mL 离心管中，在 4000 r/min 下离心 5 min，待净化。

12.2.2 植物油脂

植物油脂提取过程同 12.2.1，提取液在下层。

12.3 试样净化

12.3.1 免疫亲和柱净化

12.3.1.1 婴幼儿谷类辅助食品

准确移取5.0 mL提取液，加入200 μL混合同位素标准工作溶液，45.0 mL吐温-20/PBS溶液进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过免疫亲和柱，流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用10 mL PBS缓冲液和10 mL水淋洗免疫亲和柱，分别1 mL甲醇-乙酸溶液（98+2）洗脱免疫亲和柱3次，收集合并洗脱液。55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

12.3.1.2 谷物及其制品、植物油脂

准确移取0.5 mL 提取液，加入200 μL混合同位素标准工作溶液，4.5 mL吐温-20/PBS溶液进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过免疫亲和柱，流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用10 mL PBS缓冲液和10 mL水淋洗免疫亲和柱，分别1 mL甲醇-乙酸溶液（98+2）洗脱免疫亲和柱3次，收集合并洗脱液。55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

12.3.2 强阴离子交换固相萃取净化柱

12.3.2.1 婴幼儿谷类辅助食品

准确移取5.0 mL提取液，加入200 μL混合同位素标准工作溶液，15.0 mL甲醇-水溶液（60+20）进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过强阴离子交换固相萃取柱（使用前按要求活化），流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用8 mL甲醇水溶液和3 mL甲醇淋洗，10 mL甲醇-乙酸溶液（99+1）洗脱，收集合并洗脱液。55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

12.3.2.2 谷物及其制品、植物油脂

准确移取0.5 mL提取液，加入200 μL混合同位素标准工作溶液，5.0 mL甲醇-水溶液（60+20）进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过强阴离子交换固相萃取柱（使用前按要求活化），流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用8 mL甲醇水溶液和3 mL甲醇淋洗，10 mL甲醇-乙酸溶液（99+1）洗脱，收集合并洗脱液。55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

注1：由于不同厂商提供的免疫亲和柱操作程序可能不同，实际操作时，请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

注2：两种净化方式选其一。

12.4 仪器参考条件

12.4.1 液相色谱条件

a）色谱柱：C18柱（粒径1.7 μm，2.1 mm×100 mm），或相当者；

b）流动相：A 甲酸-水溶液（0.1%）；B 乙腈-甲醇溶液（50+50）；

c）梯度洗脱，梯度见表2；

d）流速：0.35 mL/min；

e）柱温：35 ℃；

f）进样量：10 μL。

表 2 流动相洗脱程序

时间/min	流动相 A/（%）	流动相 B /（%）
0.00	70.0	30.0
2.30	30.0	70.0
4.00	30.0	70.0
4.20	0	100
4.80	0	100
5.00	70.0	30.0

12.4.2 质谱条件

a） 离子化模式：ESI+

b） 质谱扫描方式：MRM（多反应监测）

c） 毛细管电压：3.0 kV

d） 离子源温度：150℃

e） 锥孔反吹气流量：50 L/h

f） 锥孔电压：30 V

g） 脱溶剂气温度：350℃

h） 脱溶剂气流量：800 L/h

监测离子对信息见表 3。

表 3 伏马菌素 B_1、B_2、B_3 的质谱参数

化合物	母离子（m/z）	定量子离子（m/z）	碰撞能量（eV）	定性子离子（m/z）	碰撞能量（eV）
FB_1	722	352	25	334	35

FB_2	706	336	35	354	30
FB_3	706	336	35	354	30
$^{13}C_{34}$-FB_1	756	374	35	356	40
$^{13}C_{34}$-FB_2	740	358	35	376	30
$^{13}C_{34}$-FB_3	740	358	35	376	30

12.5 标准曲线的制作

将伏马菌素混合标准系列工作液按浓度由低到高分别注入液相色谱-质谱仪中，获得相应的峰面积，以目标物质和各自内标的浓度比为横坐标，峰面积比值为纵坐标，绘制标准工作曲线。

12.6 定性测定

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围应在±2.5%之内。每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物试样溶液中的离子相对丰度与标准溶液的离子相对丰度比符合表 4 的要求。

表 4 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）	k≥50%	50 %> k≥20 %	20 %> k≥10 %	k≤10 %
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

12.7 定量测定

将 12.3 处理得到的试样溶液经液相色谱-串联质谱仪分析，得到伏马菌素 FB_1、FB_2、FB_3 峰面积与对应的同位素内标物峰面积比值，根据标准曲线计算待测液中伏马菌素 FB_1、FB_2、FB_3 的含量。标准工作溶液和样液中待测物的响应值均应在仪器线性响应范围内，如果含量超过标准曲线范围，则重新取样，增加相应内标添加量，使内标浓度与待测液浓度相匹配，然后稀释到适当浓度后分析。

12.8 空白试验

不称取试样，按 12.2 和 12.3 的步骤做空白实验。

13 分析结果的表述

本方法采用内标法定量。

$$X=\frac{(\rho-\rho_0)\times V_1\times V_2\times 1000}{m\times V_3\times 1000}\cdots\cdots(2)$$

式中：

X——待测样品中 FB_1、FB_2、FB_3 的含量，单位为微克每千克（μg/kg）。

ρ——按照内标法在标准曲线中对应的 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

ρ_0——空白试验测得 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

m——样品的称样量，单位为克（g）。

V_1——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）。

V_2——进样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）。

V_3——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）。

1000——换算系数

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。

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 20%。

15 其他

谷物及其制品、植物油脂，当称样量为 20.0 g 时，FB_1、FB_2、FB_3 的检出限分别为：60.0 μg/kg、30.0 μg/kg、30.0 μg/kg；定量限分别为：200 μg/kg，100 μg/kg，100 μg/kg。

婴幼儿谷类辅助食品，当称样量为20.0 g时，FB_1、FB_2、FB_3的检出限分别为：6.00 μg/kg、3.00 μg/kg、3.00 μg/kg；定量限分别为：20.0 μg/kg，10.0 μg/kg，10.0 μg/kg。

第三法 免疫亲和柱净化-柱前衍生高效液相色谱法

16 原理

试样经提取、净化、邻苯二甲醛衍生、C18反向色谱柱分离。采用荧光检测器检测，外标法定量。

17 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。

17.1 试剂

17.1.1 甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

17.1.2 乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

17.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

17.1.4 甲酸铵（NH_4COOH）：色谱纯。

17.1.5 乙酸（CH_3COOH）。

17.1.6 氢氧化钠（NaOH）。

17.1.7 氯化钠（NaCl）。

17.1.8 磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）。

17.1.9 磷酸二氢钾（KH_2PO_4）。

17.1.10 氯化钾（KCl）。

17.1.11 硼砂（$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$）。

17.1.12 2-巯基乙醇（C_2H_6OS）。

17.1.13 邻苯二甲醛（$C_8H_6O_2$，OPA）。

17.1.14 吐温-20（$C_{58}H_{114}O_{26}$）。

17.2 试剂配制

17.2.1 甲酸铵-甲酸水溶液（0.1 mol/L，pH：3.3）：称取 6.3 g 甲酸铵，溶于 980 mL 水中，用甲酸调 pH 至 3.3，用水稀释至 1000 mL，混合均匀。

17.2.2 乙腈-水溶液（50+50）：分别量取 500 mL 乙腈和 500 mL 水，混合均匀。

17.2.3 乙腈-水溶液（20+80）：分别量取 20 mL 乙腈和 80 mL 水，混合均匀。

17.2.4 甲醇-乙酸溶液（98+2）：准确移取 2.0 mL 乙酸，用甲醇稀释至 100 mL，混合均匀。

17.2.5 氢氧化钠溶液（2 mol/L）：准确称取氢氧化钠 8.0 g，加 50 mL 水溶解，冷却后，用水稀释至 100 mL 水，混合均匀。

17.2.6 磷酸盐缓冲液（PBS）：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，加 980 mL 水溶解，然后用盐酸调整 pH 至 7.4，最后用水稀释至 1000 mL，混合均匀。

17.2.7 吐温-20/PBS 溶液（0.1%）：准确称取 1.0 g 吐温-20，加入磷酸盐缓冲液并稀释至 1000 mL，混合均匀。

17.2.8 硼砂溶液（0.1 mol/L，pH 10.5）：称取硼砂 3.8 g，用水溶解并稀释至 100 mL，混合均匀。

17.2.9 衍生溶液：准确称取 40 mg 邻苯二甲醛，溶于 1 mL 的甲醇中，用硼砂溶液（0.1 mol/L）5 mL 稀释，加入 2-巯基乙醇 50 μL，混匀，过滤后装入棕色瓶中，室温避光，可保存一周。

17.3 标准品

17.3.1 伏马菌素 B_1（$C_{34}H_{59}NO_{15}$，FB_1，CAS 号：116355-83-0），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

17.3.2 伏马菌素 B_2（$C_{34}H_{59}NO_{14}$，FB_2，CAS 号：116355-84-1），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

17.3.3 伏马菌素 B_3（$C_{34}H_{59}NO_{14}$，FB_3，CAS 号：136379-59-4），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 标准储备溶液（100 μg/mL）：分别准确称取 FB_1、FB_2、FB_3 各 10 mg（精确至 0.01 mg）至小烧杯中，用乙腈-水溶液（50+50）溶解，分别转移至 100 mL 容量瓶中，以乙腈-水溶液（50+50）定容至刻度。于-18 ℃下避光保存，有效期 6 个月。

17.4.2 混合标准储备溶液：准确移取 FB_1 标准储备液 1.0 mL、FB_2 和 FB_3 标准储备液各 0.5 mL 至同一 10 mL 容量瓶中，加乙腈-水溶液（50+50）稀释，定容至刻度，FB_1 的浓度为 10 μg/mL、FB_2 和 FB_3 浓度分别为 5 μg/mL。于-18℃下避光保存，有效期 6 个月。

17.4.3 混合标准工作溶液：准确移取混合标准储备溶液 1.0 mL 至 10.0 mL 容量瓶中，加乙腈-水溶液（50+50）稀释，定容至刻度，FB_1 的浓度为 1.0 μg/mL、FB_2 和 FB_3 浓度分别为 0.5 μg/mL。于 4℃下避光保存，有效期 6 个月。

17.4.4 混合标准系列工作液：准确移取混合标准溶液，用乙腈-水溶液（20+80）稀释，配制成 FB_1 浓度依次为 20.0 ng/mL、80.0 ng/mL、160 ng/mL、240 ng/mL、320 ng/mL、400 ng/mL、480 ng/mL，FB_2 和 FB_3 浓度依次为 10.0 ng/mL、40.0 ng/mL、80.0 ng/mL、120 ng/mL、160 ng/mL、200 ng/mL、240 ng/mL 的系列混合标准工作溶液，临用现配。

17.5 材料

17.5.1 免疫亲和柱（柱容量及柱回收率验证方法参见附录 B）。

注：对于每个批次的亲和柱在使用前需进行柱容量及柱回收率验证。

17.5.2 微孔滤膜：0.45 μm，有机型。

18 仪器和设备

18.1 高效液相色谱仪：带荧光检测器。

18.2 天平：感量 0.01 g 和 0.01 mg。

18.3 均质器：转速≥2000 r/min。

18.4 振荡器（转速≥1000 转/分）或超声波提取仪：功率≥500 W。

18.5 离心机：转速≥4000 r/min。

18.6 氮吹仪。

18.7 秒表。

19 分析步骤

19.1 试样制备

谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品采样量不低于 1 kg；样品量不到 1 kg，取全部样品。用高速粉碎机将其粉碎，过筛，使其粒度小于 1 mm。混合均匀后缩分至 100 g，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 ℃下避光保存。

植物油脂采样量不低于 1 kg；样品量不到 1 kg，取全部样品。将样品直接装入洁净的容器。混合均匀后缩分至 100 g，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 ℃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伏马菌素含量的变化。

19.2 试样提取

19.2.1 谷物及其制品、婴幼儿谷类辅助食品

准确称取试样 20 g（精确至 0.01 g）于 250 mL 三角烧瓶中，准确加入 100 mL 乙腈-水（50+50）提取液，超声或振荡提取 20 min，转移 20 mL 溶液至 50 mL 离心管中，在 4000 r/min 下离心 5 min，待净化。

19.2.2 植物油脂

植物油脂提取过程同 19.2.1，提取液在下层。

19.3 试样净化

19.3.1 婴幼儿谷类辅助食品

准确移取5.0 mL提取液，加入45.0 mL吐温-20/PBS溶液进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过免疫亲和柱，流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用10 mL PBS缓冲液和10 mL水淋洗免疫亲和柱，分别用1 mL甲醇-乙酸溶液（98+2）洗脱免疫亲和柱3次，收集合并洗脱液。55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

19.3.2谷物及其制品、植物油脂

准确移取0.5 mL提取液，加入4.5 mL吐温-20/PBS溶液进行稀释，混合均匀后在4000 r/min下离心5 min，上清溶液全部过免疫亲和柱，流速控制1 mL/min~2 mL/min，然后依次用10 mL PBS缓冲液和10 mL水淋洗免疫亲和柱，分别用1 mL甲醇-乙酸溶液（98+2）洗脱免疫亲和柱3次，收集合并洗脱液。55℃下氮气吹干，加入1 mL乙腈-水溶液（20+80）溶解残渣，涡旋30 s，过微孔滤膜后，收集于进样瓶中，待测。

注：由于不同厂商提供的免疫亲和柱操作程序可能不同，实际操作时，请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

19.4 衍生

取 100 μL 标准溶液或样品溶液于进样瓶中，加入 100 μL 衍生溶液，涡旋混合 30 s，迅速转移至内插管进样瓶中，在 2 min 内进样分析。

19.5 仪器参考条件

19.5.1 色谱柱： C18 柱，150 mm×4.6 mm，5 μm 或相当者。

19.5.2 检测波长：激发波长 335 nm；发射波长 440 nm

19.5.3 流动相：A：甲酸铵-甲酸水溶液；B：甲醇。梯度洗脱，洗脱程序见表 5。

19.5.4 流速：1.0 mL/min

19.5.5 柱温：40℃

19.5.6 进样量：50 μL

表 5 流动相洗脱程序

时间/min	流动相 A/（%）	流动相 B/（%）
0.00	30.0	70.0
5.00	28.0	72.0
6.00	25.0	75.0
11.00	22.0	78.0

11.10	30.0	70.0
16.00	30.0	70.0

19.6 标准曲线的制作

将混合标准系列工作液从低浓度到高浓度分别注入高效液相色谱仪中，测定相应的峰面积。以标准溶液浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

19.7 试样溶液的测定

将待测溶液进样，得到对应的峰面积，根据标准曲线计算待测溶液中 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度。

19.8 空白试验

不称取试样，按19.2、19.3和19.4的步骤做空白实验。

20 分析结果的表述

$$X = \frac{(\rho-\rho_0)\times V_1\times V_2\times 1000}{m\times V_3\times 1000} \quad \cdots\cdots (3)$$

式中：

X——待测样品中 FB_1、FB_2、FB_3 的含量，单位为微克每千克（μg/kg）。

ρ——待测溶液中 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

ρ_0——空白试验测得 FB_1、FB_2、FB_3 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）。

m——样品的称样量，单位为克（g）。

V_1——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）。

V_2——进样溶液的定容体积，单位为毫升（mL）。

V_3——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）。

1000——换算系数

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。

21 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 20%。

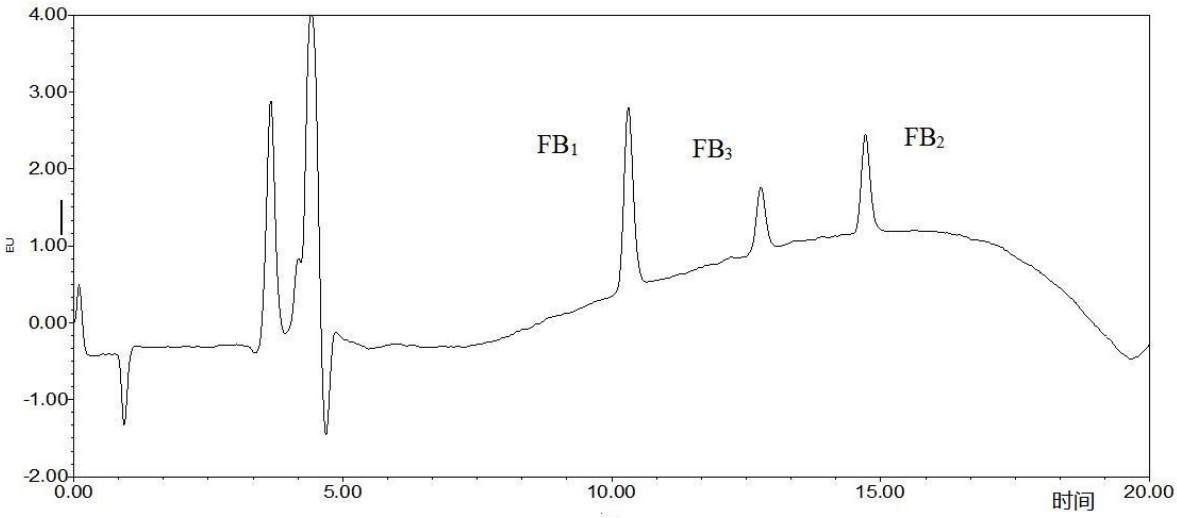
22 其他

谷物及其制品、植物油脂，当称样量为20.0 g时，FB_1、FB_2、FB_3的检出限分别为：60.0 μg/kg、30.0 μg/kg、30.0 μg/kg；定量限分别为：200 μg/kg，100 μg/kg，100 μg/kg。

婴幼儿谷类辅助食品，当称样量为 20.0 g 时，FB_1、FB_2、FB_3 的检出限分别为：6.00 μg/kg、3.00 μg/kg、3.00 μg/kg；定量限分别为：20.0 μg/kg，10.0 μg/kg，10.0 μg/kg。

附录 A

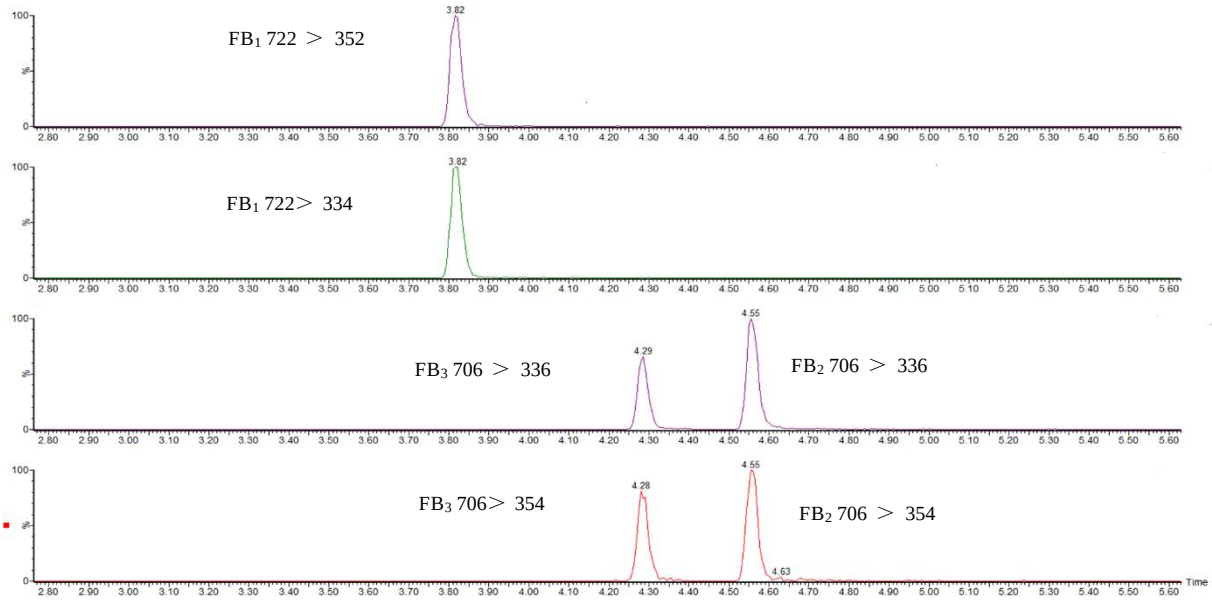
液相色谱图



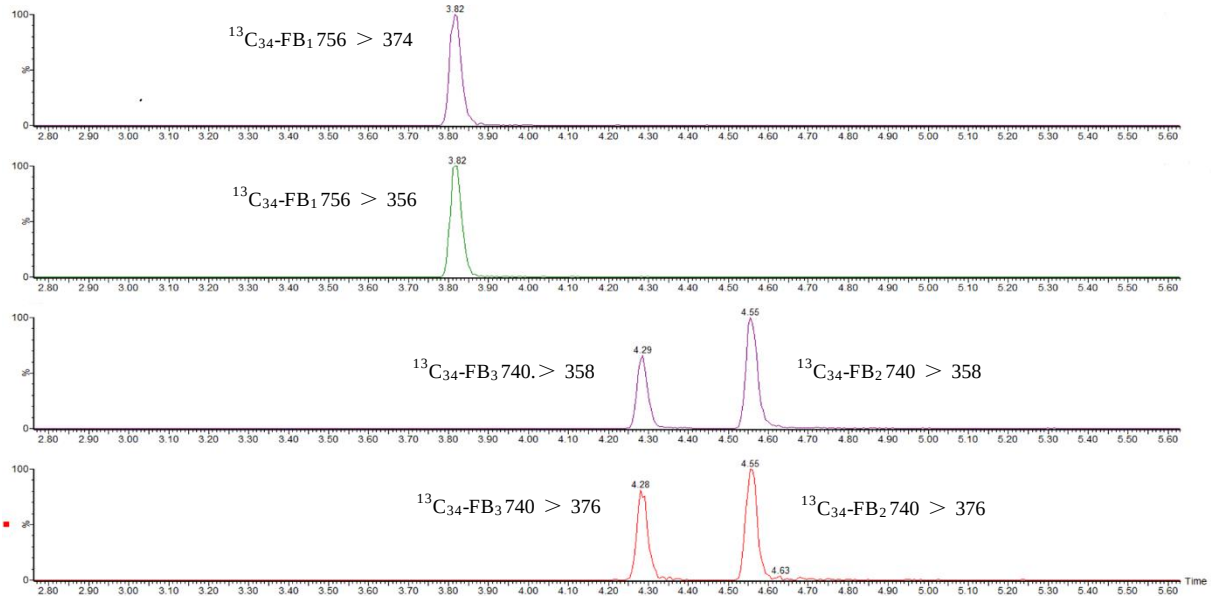
A.1 柱后衍生-高效液相色谱图（FB_1、FB_2、FB_3浓度分别为 100 ng/mL、50 ng/mL、50 ng/mL）液相色谱-串联质谱法色谱图

附录 B

MRM 质谱色谱图

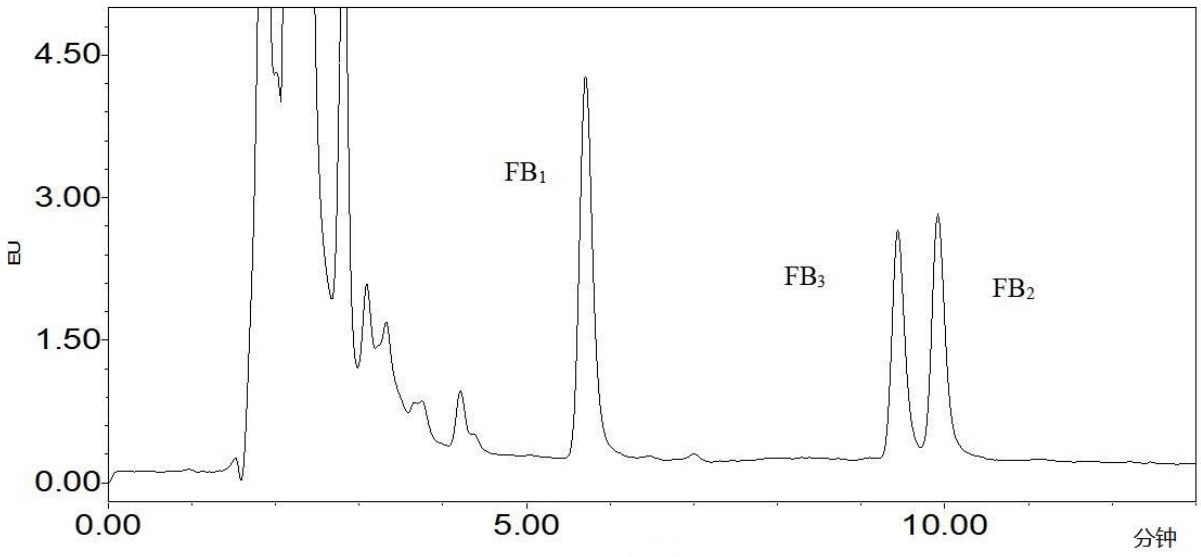


B.1 伏马菌素标准溶液 MRM 色谱图（FB_1、FB_2、FB_3 浓度分别为 100 ng/mL、50 ng/mL、50 ng/mL）



B.2 伏马菌素对应的同位素内标 MRM 色谱图（$^{13}C_{34}$-FB_1、$^{13}C_{34}$-FB_2、$^{13}C_{34}$-FB_3 浓度分别为 50 ng/mL、20 ng/mL、20 ng/mL）

附录 C



C.1 柱前衍生-高效液相色谱图（FB_1、FB_2、FB_3浓度均为 100 ng/mL、50 ng/mL、50 ng/mL）

附录 D

柱容量及柱回收率验证方法

柱容量验证方法：

准确移取FB_1标准储备溶液（100 μg/mL）250 μL至50 mL容量瓶中，用吐温-20/PBS溶液（0.1%）定容至刻度，充分混匀。分别取同一批次3根免疫亲和柱，每根柱的上样量为10 mL（5 μg FB_1）。经上样、淋洗、洗脱，收集洗脱液，用氮气吹至约1 mL，用乙腈-水溶液（20+80）定容至10 mL，用液相色谱仪分离测定FB_1的含量。

结果判定：结果FB_1≥4.5 μg，为柱容量满意。

柱回收率验证方法：

准确移取FB_1、FB_2及FB_3标准储备溶液（100 μg/mL）各50 μL至50 mL容量瓶中，用吐温-20/PBS溶液（0.1%）定容至刻度，充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱，每根柱的上样量为10 mL（FB_1、FB_2及FB_3各1 μg）。经上样、淋洗、洗脱，收集洗脱液，用氮气吹至约1 mL，用乙腈-水溶液（20+80）定容至10 mL，用液相色谱仪分离测定FB_1、FB_2 及FB_3 的含量。

结果判定：结果FB_1≥0.9 μg，FB_2≥0.9 μg，FB_3≥0.9 μg，则FB_1、FB_2 及FB_3回收率≥90%，为柱回收率满意。