

团 体 标 准

T/GDFCA XXX—2023

保健食品中 14 种真菌毒素含量的高通量快速测定 超高效液相色谱-串联质谱法

Determination of mycotoxins content in health foods by Liquid chromatography
-tandem mass spectrometry

2023 -XX - XX 发布

2024 -XX - XX 实施

广东省食品流通协会 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	3
2 规范性引用文件.....	3
3 术语和定义.....	3
4 原理.....	3
5 试剂和材料.....	3
6 仪器和设备.....	4
7 试样的制备.....	4
8 测定步骤.....	4
9 结果计算和表述.....	6
10 灵敏度和准确度、精密度.....	7
附 录 A （资料性）.....	8
14 种真菌毒素的中文名称及英文名称、CAS 号、分子式及相对分子量.....	8
附 录 B （资料性）.....	8
14 种真菌毒素多反应监测（MRM）色谱图.....	8

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。

本文件由广东省食品流通协会提出并归口。

本文件起草单位：……

本文件主要起草人：……

本文件为首次发布。

保健食品中 14 种真菌毒素含量的高通量快速测定 超高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了采用超高效液相色谱-串联质谱法进行保健食品中14种真菌毒素含量的高通量快速测定的方法。

本文件适用于口服液、片剂、胶囊、颗粒剂、糖果制品等剂型保健食品中黄曲霉毒素(AFTB1, AFTB2, AFTG1, AFTG2)、伏马毒素(FB1, FB2, FB3)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、T-2毒素、杂色曲霉素(ST)、赭曲霉毒素A(OTA)、桔青霉素(CIT)和展青霉素(PAT) 14种真菌毒素含量的测定, 保健食品原辅料及其他植物性食品可参照执行。

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(包括所有的修改单)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 原理

试样中的真菌毒素, 用2%甲酸乙腈溶液提取, 提取液经氯化钠盐析后用分散固相萃取净化除杂, 净化液经氮吹浓缩、复溶、定容后, 用液相色谱-串联质谱多反应监测模式(MRM)测定, 外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外, 所用试剂均为分析纯, 水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 乙腈(C_2H_5N , CAS号: 75-05-8): 色谱纯。

5.2 甲酸(CH_2O_2 , CAS号: 64-18-06)。

5.3 2%甲酸乙腈溶液: 准确吸取20mL甲酸(5.2), 用乙腈(5.1)定容到1000mL。

5.4 甲醇(CH_4O , CAS号: 67-56-1)。

5.5 乙酸($C_2H_4O_2$, CAS号: 77671-22-9)。

5.6 甲醇乙酸水溶液: 准确吸取4mL, 用纯水定容到100mL。取其中90mL溶液, 加入10mL甲醇(5.4), 混匀。

5.7 乙酸铵($C_2H_7NO_2$, CAS号: 631-61-8)。

5.8 氯化钠($NaCl$, CAS号: 7647-14-5)。

5.9 无水硫酸镁($MgSO_4$, CAS号: 7487-88-9)。

5.10 真菌毒素标准品: 14种真菌毒素的中文名称、英文名称、CAS号、分子式及相对分子量参见附录A的表A.1, 均为有证标准物质, 纯度 $\geq 95\%$ 。

5.11 标准储备溶液: 分别称取适量(精确至0.1mg)真菌毒素标准品, 用乙腈(5.1)溶解并定容至10mL。储备溶液避光-20℃储存, 有效期1年。

5.12 混合标准溶液：分别移取适量 14 种真菌毒素标准品，用乙腈（5.1）溶解稀释定容配制成呕吐毒素（DON）、展青霉素（PAT）、桔青霉素（CIT）浓度为 5000ng/mL 的标准储备液，伏马毒素 B1（FB1）、伏马毒素 B2（FB2）、伏马毒素 B3（FB3）、玉米赤霉烯酮（ZEA）、赭曲霉毒素 A（OTA）、T-2 毒素（T-2）、杂色曲霉毒素（ST）浓度为 500ng/mL 的标准储备液，黄曲霉毒素 B1（AFTB1）、黄曲霉毒素 B2（AFTB2）、黄曲霉毒素 G1（AFTG1）、黄曲霉毒素 G2（AFTG2）浓度为 50ng/mL 的标准储备液。-20℃冰箱中避光保存。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-质谱串联仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 分析天平：感量 0.001g 和 0.01mg。
- 6.3 涡旋振荡器。
- 6.4 超声仪。
- 6.5 离心机：转速 \geq 14000 r/min
- 6.6 氮吹仪。

7 试样的制备

7.1 固态试样

将固体饮料、糖果制品、片剂研细，混匀，均分成 50~100g 两份，分别装入洁净容器内；胶囊连同胶囊壳一起捣碎，混匀，均分成两份，分别装入洁净容器，密封，并标明标记，于常温储存备用。

7.2 液体试样

将其充分搅拌均匀，均分成 50~100g 两份，分别装入洁净容器，密封，并标明标记，于常温储存备用。

8 测定步骤

8.1 样品预处理

8.1.1 固态试样或半固态试样：称取 2 g（精确到 0.01 g）样品置于 50 mL 离心管中，加入 5 mL 水，涡旋 5 min，再加入 V_1 10 mL 含 2% 甲酸乙腈溶液，涡旋 3 min 后超声提取 30 min；加入 1 g 氯化钠，涡旋 3 min，于 12000 r/min 条件下离心 5 min。吸取 6 mL 上清液置于内含 200 mg C18 填料和 1g 无水硫酸镁的 10 mL 离心管中，涡旋震荡 3 min，于 12000 r/min 下离心 5 min；移取 V_2 2.5 mL 上清液，于 40℃ 氮气吹干，用 V_3 1 mL 甲醇乙酸溶液（5.6）复溶，涡旋振荡 3 min，于 14000 r/min 条件下离心 30 min，上清液上机测定。

8.1.2 液体试样：称取 2 g（精确到 0.01 g）样品置于 50 mL 离心管中，涡旋 5 min，再加入 V_1 10 mL 含 2% 甲酸乙腈溶液，涡旋 3 min 后超声提取 30 min；加入 1 g 氯化钠，涡旋 3 min，于 12000 r/min 条件下离心 5 min。吸取 6 mL 上清液置于内含 200 mg C18 填料和 1g 无水硫酸镁的 10 mL 离心管中，涡旋震荡 3 min，于 12000 r/min 下离心 5 min；移取 V_2 2.5 mL 上清液，于 40℃ 氮气吹干，用 V_3 1 mL 甲醇乙酸溶液（5.6）复溶，涡旋振荡 3 min，于 14000 r/min 条件下离心 30 min，上清液上机测定。

8.2 混合基质匹配标准曲线绘制

取空白试样，按上述方法处理制得其空白基质溶液，准确量取混合标准溶液适量，用空白基质溶液稀释成黄曲霉毒素（AFTB1、AFTB2、AFTG1、AFTG2）浓度为 0.1、0.25、0.5、1.0、2.5、5.0 ng/mL，伏马毒素（FB1、FB2、FB3）、杂色曲霉毒素（ST）、玉米赤霉烯酮（ZEN）、赭曲霉毒素 A（OTA）、T-2 毒素（T-2）浓度为 1.0、2.5、5.0、10、25、50 ng/mL，桔青霉素（CIT）、展青霉素（PAT）、呕吐毒素（DON）浓度为 10、25、50、100、250、500 ng/mL 的基质匹配混合标准工作溶液，临用现配。供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。以上述溶液中各真菌毒素的浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.3 仪器参考条件

8.3.1 液相色谱参考条件如下（适用于展青霉素外的其他毒素）：

- a) 色谱柱：Kinetex F5 色谱柱（2.1×100 mm，2.6 μm），或性能相当者。
- b) 流速：0.4 mL/min。
- c) 柱温：40 °C。
- d) 进样量：5 μL。
- e) 流动相及梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序表

时间/min	A:0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液/%	B: 甲醇/%
0	95	5
6.0	80	20
8.0	80	20
15.0	10	90
18.0	10	90
18.1	95	5
20.0	95	5

8.3.2 液相色谱参考条件如下（适用于展青霉素）：

- a) 色谱柱：Ultra AQ C18 色谱柱（2.1×100 mm 3 μm），或性能相当者。
- b) 流速：0.3mL/min。
- c) 柱温：40°C。
- d) 进样量：5 μL。
- e) 运行时间：10min。
- f) 流动相及梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序表

时间/min	A: 水/%	B: 甲醇/%
0	95	5
3.0	95	5
6.0	5	95
8.0	5	95
8.1	95	5
10.0	95	5

8.3.3 质谱参考条件如下：

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI + /-）；
- b) 扫描模式：正、负离子扫描；
- c) 监测方式：多反应离子监测（MRM）；
- d) 离子源温度：550 °C；
- e) 碰撞气：高纯氮气，干燥气、雾化气、鞘气等均为氮气或其他合适气体；
- f) 离子喷雾电压：5500V；
- g) 雾化气压力：50psi；
- h) 气帘气压力：40psi；
- i) 辅助加热气压力：50psi；
- j) 碰撞气压力：中档；

k) 质谱优化条件参数见表 3。

表 3 真菌毒素的 UPLC-MS-MS 优化参数

化合物	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
黄曲霉毒素 B1	313.1 (+H)	285.0 ^a /241.0	150	31/45	12.7
黄曲霉毒素 B2	315.1 (+H)	287.0 ^a /259.0	150	35/40	12.5
黄曲霉毒素 G1	329.0 (+H)	243.0 ^a /283.0	150	37/34	12.3
黄曲霉毒素 G2	331.0 (+H)	245.0 ^a /285.0	150	40/37	12.0
伏马毒素 B1	722.4 (+H)	334.3 ^a /352.3	110	59/54	13.4
伏马毒素 B2	706.4 (+H)	336.4 ^a /354.3	117	57/49	14.2
伏马毒素 B3	706.4 (+H)	336.2 ^a /354.4	115	54/47	13.9
T-2 毒素	489.2(+NH ₄ ⁺)	245.1 ^a /387.1	210	36/26	13.8
杂色曲霉素	325.0 (+H)	281.0 ^a /309.9	210	50/33	14.6
桔青霉素	251.0 (+H)	233.0 ^a /191.0	160	21/35	12.1
赭曲霉毒素 A	402.0 (-H)	358.1 ^a /211.0	-150	-27/-37	14.1
呕吐毒素	297.0 (+H)	203.0 ^a /157.0	120	18/27	3.07
展青霉素	152.9 (-H)	108.9 ^a /80.8	-80	-12/-21	3.45
玉米赤霉烯酮	317.1 (-H)	175.0 ^a /273.1	-100	-34/-27	14.4

^a为定量离子

8.4 超高效液相色谱-串联质谱测定

8.4.1 定性测定

将基质匹配混合标准工作溶液和试样溶液注入高效液相色谱-串联质谱仪中，记录基质匹配混合标准工作溶液和试样溶液中各化合物的保留时间，在相同条件下，如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准工作溶液中的某组分峰的保留时间一致（变化范围在±2.5%），并且所选择的两对子离子的质荷比一致，样品溶液中的定性离子相对丰度与浓度相当标准工作溶液中定性离子的相对丰度进行比较时，相对偏差不超过表4规定的范围，则可判断样品中存在相应的被测物。

表 4 定性确定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%

8.4.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下，将基质匹配混合标准工作溶液和试样溶液注入高效液相色谱-串联质谱仪中，拟合标准工作曲线，外标法定量计算试样溶液中各待测组分浓度。试样溶液中各待测物的响应值均在仪器测定的线性范围内。14种真菌毒素典型色谱图参见附录B。

8.4.3 空白试验

取空白试样，采用完全相同的测定步骤进行测定。。

9 结果计算和表述

试样中真菌毒素的含量按式（1）计算，计算结果应扣除空白值：

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

式中：

X ——试样中待测组分含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

c ——根据标准曲线或单点校准得到的待测组分溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

V_1 ——试样提取液体积，单位为毫升（ mL ）；

V_2 ——用于净化分取的样品体积，单位为毫升（ mL ）；

V_3 ——样品经精华洗脱后的最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样的质量，单位为克（ g ）或吸取试样的体积，单位为毫升（ mL ）。

计算结果保留三位有效数字。

10 灵敏度和准确度、精密度

10.1 灵敏度

黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2的检出限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，伏马毒素B1、伏马毒素B2、伏马毒素B3、T-2毒素、杂色曲霉毒素、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮的检出限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，展青霉素、桔青霉素、呕吐毒素检出限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2的定量限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，伏马毒素B1、伏马毒素B2、伏马毒素B3、T-2毒素、杂色曲霉毒素、赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮的定量限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，展青霉素、桔青霉素、呕吐毒素的定量限为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法中固体基质和液体基质的加标回收率要求 $70\% \sim 120\%$ 。

10.3 精密度

本方法在重复性下获得的两次独立测试结果的相对标准偏差不超过 20% 。

附录 A (资料性)

14 种真菌毒素的中文名称及英文名称、CAS 号、分子式及相对分子量

14 种真菌毒素的中文名称及英文名称、CAS 号、分子式及相对分子量，见表 A.1。

表A.1 14种真菌毒素中文名称及英文名称、CAS 号、分子式及相对分子量

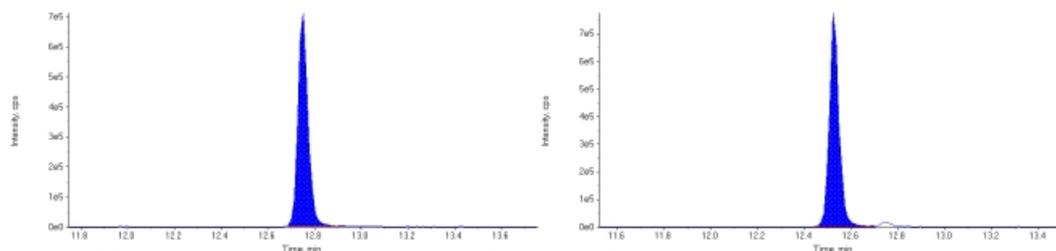
序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子量
1	黄曲霉毒素 B1	AflatoxinB1	1162-65-8	$C_{17}H_{12}O_6$	312.27
2	黄曲霉毒素 B2	AflatoxinB2	7220-81-7	$C_{17}H_{14}O_6$	314.29
3	黄曲霉毒素 G1	AflatoxinG1	1165-39-5	$C_{17}H_{12}O_7$	328.27
4	黄曲霉毒素 G2	AflatoxinG2	7241-98-7	$C_{17}H_{14}O_7$	330.29
5	伏马毒素 B1	Fumonisin B1	116355-83-0	$C_{34}H_{59}NO_{15}$	721.83
6	伏马毒素 B2	Fumonisin B2	116355-84-1	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	705.83
7	伏马毒素 B3	Fumonisin B3	1422359-85-0	$C_{34}H_{59}NO_{14}$	705.83
8	T-2 毒素	T-2 toxin	21259-20-1	$C_{24}H_{34}O_9$	466.53
9	杂色曲霉素	Sterigmatocystin	10048-13-2	$C_{18}H_{12}O_6$	324.28
10	赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A	303-47-9	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	403.813
11	玉米赤霉烯酮	Zearalenone	17924-92-4	$C_{18}H_{22}O_5$	318.36
12	展青霉素	Patulin	149-29-1	$C_7H_6O_4$	154.12
13	桔青霉素	Citrinin	518-75-2	$C_{13}H_{14}O_5$	250.25
14	呕吐毒素	Deoxynivalenol	51481-10-8	$C_{15}H_{20}O_6$	296.32

附录 B (资料性)

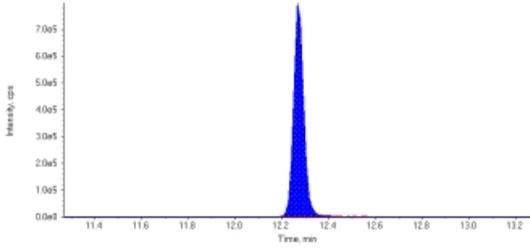
14 种真菌毒素多反应监测 (MRM) 色谱图

(资料性)

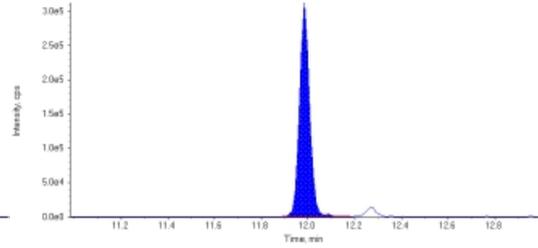
14种真菌毒素多反应监测 (MRM) 色谱图见图B.1。



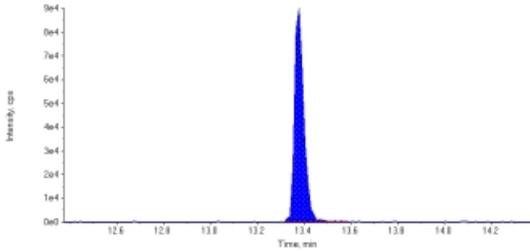
黄曲霉毒素 B1



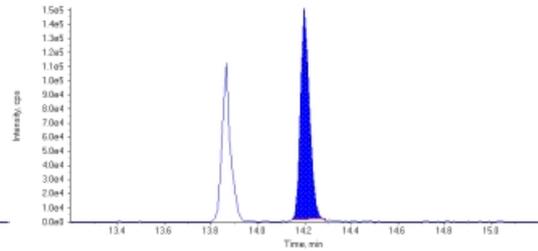
黄曲霉毒素 B2



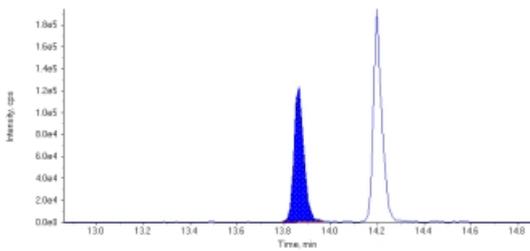
黄曲霉毒素 G1



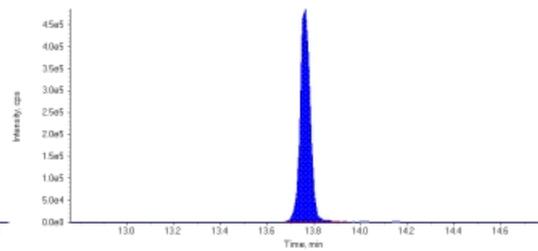
黄曲霉毒素 G2



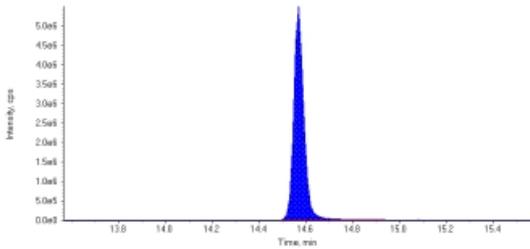
伏马毒素 B1



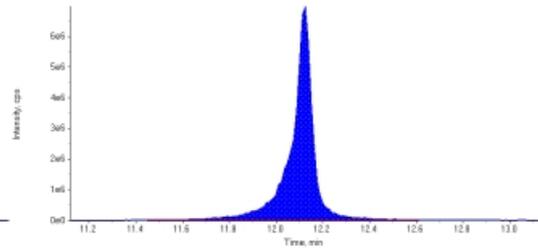
伏马毒素 B2



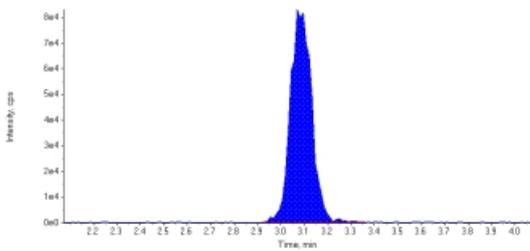
伏马毒素 B3



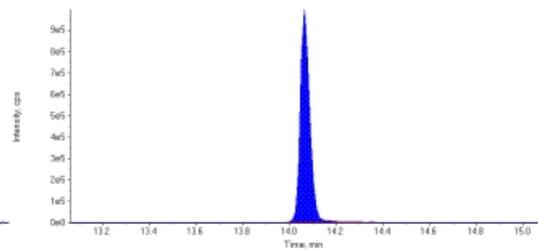
T-2 毒素



杂色曲霉毒素

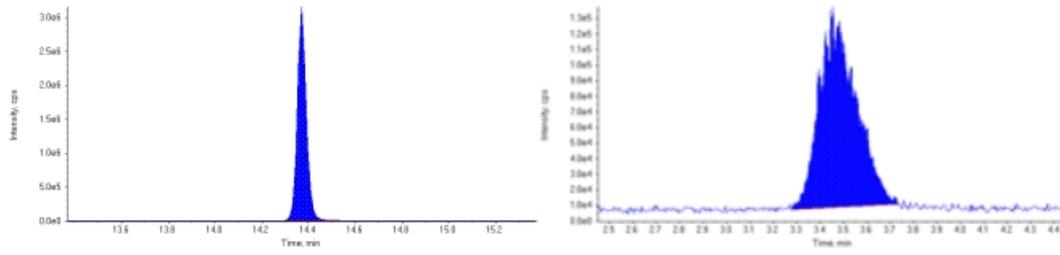


桔青霉素



呕吐毒素

赭曲霉毒素 A



玉米赤霉烯酮

展青霉素

图B.1 14种真菌毒素多反应监测（MRM）色谱图