

中华人民共和国国家标准

GB ××××—××××

食品安全国家标准

食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的测定

(征求意见稿)

食品安全国家标准
征求意见稿

××××-××-××发布

××××-××-××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

食品安全国家标准

食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的测定

1 范围

本标准规定了食品中白僵菌素（BEA）和恩镰孢菌素A（EN A）、恩镰孢菌素A₁（EN A₁）、恩镰孢菌素B（EN B）、恩镰孢菌素B₁（EN B₁）的液相色谱-质谱/质谱法。

本标准适用于谷物及其制品、焙烤食品、特殊膳食用食品中BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁的测定。

2 原理

试样中的白僵菌素（BEA）和恩镰孢菌素A（EN A）、恩镰孢菌素A₁（EN A₁）、恩镰孢菌素B（EN B）、恩镰孢菌素B₁（EN B₁）用酸性乙腈溶液提取，提取液经稀释、苯基固相萃取柱净化、浓缩、定容和过滤后，用液相色谱-质谱/质谱测定，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 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。
- 3.1.2 乙酸（CH₃COOH）：色谱纯。
- 3.1.3 乙酸铵（CH₃COONH₄）：色谱纯。
- 3.1.4 乙腈（CH₃CN）。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙腈-乙酸-水（84+1+15）：量取 840 mL 乙腈和 10 mL 乙酸，加入 150 mL 水，混匀。
- 3.2.2 乙酸铵溶液（5 mmol/L）：称取 0.39 g 乙酸铵，用水溶解并定容至 1 000 mL，混匀。
- 3.2.3 乙腈-水（40+60）：量取 400 mL 乙腈，加入 600 mL 水，混匀。

3.3 标准品

- 3.3.1 白僵菌素（C₄₅H₅₇N₃O₉，CAS 号：26048-05-5）标准溶液：100 μg/mL，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 3.3.2 恩镰孢菌素 A（C₃₆H₆₃N₃O₉，CAS 号：2503-13-1）标准溶液：100 μg/mL，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 3.3.3 恩镰孢菌素 A₁（C₃₅H₆₁N₃O₉，CAS 号：4530-21-6）标准溶液：100 μg/mL，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 3.3.4 恩镰孢菌素 B（C₃₃H₅₇N₃O₉，CAS 号：917-13-5）标准溶液：100 μg/mL，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。
- 3.3.5 恩镰孢菌素 B₁（C₃₄H₅₉N₃O₉，CAS 号：19914-20-6）标准溶液：100 μg/mL，或经国家

认证并授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 混合标准储备液（1.00 μg/mL）：分别准确移取 100 μg/mL 标准品溶液 BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁ 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释并定容至刻度，混匀。溶液转移至试剂瓶中后，-18 °C 及以下温度避光保存，有效期 2 个月。

3.4.2 混合标准工作液（100 ng/mL）：准确移取 1.00 μg/mL 标准储备液 10.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用乙腈稀释并定容至刻度，混匀。溶液转移至试剂瓶中后，-18 °C 及以下温度避光保存，有效期 2 个月。

3.4.3 标准系列工作液：分别准确移取 100 ng/mL 混合标准工作液 0 μL、12.5 μL、50.0 μL、100 μL、500 μL、4 000 μL 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混匀。标准系列工作液的浓度分别为 0 ng/mL、0.125 ng/mL、0.500 ng/mL、1.00 ng/mL、5.00 ng/mL、40.0 ng/mL 的系列标准溶液。临用现配。

注：应根据样品中白僵菌素和恩镰孢菌素的含量配制适当浓度范围的标准系列工作溶液，至少包含 5 个浓度点。

3.5 材料

3.5.1 有机滤膜：孔径 0.22 μm。

注：所选用的滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象，方可使用。

3.5.2 苯基固相萃取柱（200 mg/6 mL）：填料为脲基极性改性的 N-乙基吡咯烷酮-二甲基苯聚合物。或相当者。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源。

4.2 高速粉碎机。

4.3 天平：感量 0.01 g。

4.4 涡旋振荡器：转速 \geq 1 000 r/min。

4.5 高速离心机：转速 \geq 8 000 r/min。

4.6 固相萃取装置。

4.7 氮吹仪。

5 分析步骤

5.1 试样制备与保存

5.1.1 试样制备

检测用的样品量应大于 1 kg；当样品量不足 1 kg 时，至少取同一批次的 3 个包装；缩分后取不低于 0.5 kg。其中，固体样品用高速粉碎机粉碎，半固体样品用组织捣碎机捣碎，液体样品用匀浆机匀浆。

注：对于高油脂含量颗粒样品、柔韧性样品、高黏度样品、高糖样品等特殊样品可以采取冷冻或加水

等措施进行制样；对于含气液体样品，可采取超声、搅拌或抽真空等措施脱气后混匀。

5.1.2 试样保存

制备后混合均匀的样品缩分至约 100 g 的多个包装，储存于洁净的容器内，密封后置于 4 °C 或 -18 °C 下避光保存。

5.2 试样提取

称取 5 g（精确至 0.01 g）试样于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 乙腈-乙酸-水（84+1+15），涡旋混匀，置于涡旋振荡器上振荡 30 min，结束后在 8 000 r/min 下离心 5 min。取 5 mL 离心后的上清液加入 10 mL 水进行稀释，混匀，得到样品稀释液，待净化。

5.3 试样净化

将固相萃取柱连接至固相萃取装置，先后用 5 mL 乙腈和 5 mL 水活化平衡固相萃取柱，准确移取 5 mL 稀释液（5.2）上柱，控制流速为每秒 1 滴~2 滴。用 5 mL 乙腈-水（40+60）淋洗固相萃取柱，弃去全部流出液，抽干小柱。准确加入 1.0 mL 乙腈洗脱小柱，重复洗脱一次，合并两次洗脱液，在 30 °C~40 °C 水浴下用氮气吹至近干。加入 1.0 mL 乙腈涡旋混匀 30 s 溶解残留物，0.22 μm 滤膜过滤，收集滤液于进样瓶中，供测定。

5.4 仪器参考条件

5.4.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱（柱长 50 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.7 μm），或等效柱；
- b) 柱温：30 °C；
- c) 进样量：3 μL；
- d) 流速：0.3 mL/min；
- e) 流动相：A 相：乙酸铵溶液（5 mmol/L）；B 相：乙腈；
- f) 梯度洗脱程序参见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱程序

时间 min	流动相A %	流动相B %
0.0	45	55
1.0	45	55
6.0	0	100
8.5	0	100
9.5	45	55

5.4.2 质谱参考条件

质谱条件列出如下：

- a) 监测方式：多离子反应监测（MRM）；
- b) 电离方式：ESI⁺；
- c) 毛细管电压：1.0 kV；
- d) 离子传输电压：30 V；
- e) 离子导入接口温度：150 °C；
- f) 锥孔反吹气流量：150 L/h；
- g) 雾化温度：450 °C；

- h) 雾化流量: 1 000 L/h;
 i) 离子选择参数条件: 参见表 2;
 j) 液相色谱-质谱/质谱图: 参见附录 A 图 A.1。

表2 白僵菌素和恩镰孢菌素监测离子

化合物	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量 eV
BEA	801.8	244.2*	33
		262.2	33
EN A	699.8	210.2*	35
		228.2	30
EN A ₁	685.8	210.2*	30
		228.2	35
EN B	657.7	196.2*	30
		214.2	30
EN B ₁	671.7	196.2*	30
		210.2	30
注: *定量离子			

5.5 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱-质谱/质谱仪中, 测定相应的色谱峰峰面积, 以标准系列工作液中BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁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。

5.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱-质谱/质谱仪中, 得到相应目标物的峰面积, 根据标准曲线得到待测液中BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁的浓度。待测液中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稀释后重新测定。

5.7 定性判定

在同样测试条件下, 试样溶液与标准溶液中目标化合物的保留时间相比, 偏差在±2.5%以内, 且检测到的定性离子对/定量离子对的相对离子比率, 应当与浓度相近的标准工作液中离子对相对离子比率一致, 其离子比率偏差应符合表3要求。

表3 相对离子比率的最大允许偏差

相对离子比率 (%)	>50	20~50	10~20	≤10
允许相对偏差 (%)	±20	±25	±30	±50

5.8 空白实验

除不加试样外, 其他操作与试样的操作一致。

6 分析结果的表述

试样中 BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁的含量按公式 (1) 计算:

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

式中：

X ——试样中 BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁ 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 BEA、EN A、EN A₁、EN B、EN B₁ 的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

V_1 ——提取溶剂的体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——试样复溶定容的体积，单位为毫升 (mL)；

f ——上样液稀释因子；

V_3 ——提取液净化分取的体积，单位为毫升 (mL)；

m ——试样的取样量，单位为克 (g)；

1 000——单位换算系数。

注：对于制样过程中加水试样，试样的质量 (m) 需折算加水量。

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20%。

8 其他

当取样量为5 g时，BEA检出限为0.3 μg/kg，定量限为1.0 μg/kg；EN A、EN A₁、EN B、EN B₁检出限均为0.1 μg/kg，定量限均为0.3 μg/kg。

食品安全国家标准公开征求意见稿

附录 A

标准物质色谱-质谱图

A.1 白僵菌素和恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B₁ 标准溶液（1.00 ng/mL）的液相色谱-质谱/质谱图见图 A.1。

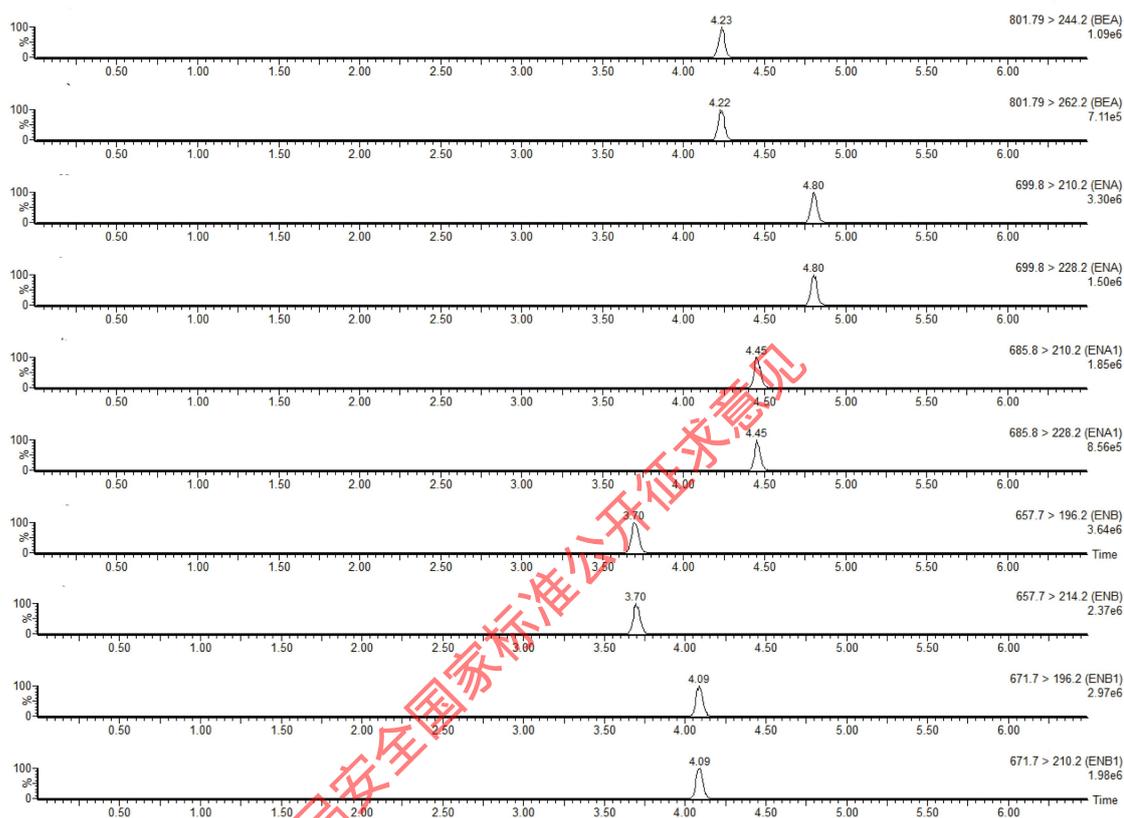


图 A.1 白僵菌素和恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B₁ 标准溶液（1.00 ng/mL）的液相色谱-质谱/质谱图