

中华人民共和国粮食行业标准

LS/T XXXXX—20XX

粮油检验 粮食中交链孢菌毒素的测定
超高效液相色谱-串联质谱法

XXXXXXXX

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

国家粮食和物资储备局 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》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。

本文件由国家粮食和物资储备局提出。

本文件由全国粮油标准化技术委员会（SAC/TC 270）归口。

本文件起草单位：江南大学、江苏省食品药品监督检验研究院、江苏省产品质量监督检验研究院、苏州市产品质量监督检验院、江苏权正检验检测有限公司、苏州市食品检验检测中心、江阴市食品安全检测中心。

本文件主要起草人：姚卫蓉、郭亚辉、成玉梁、于航、张爽、谢云飞、何迎迎、薛瑾、倪永标、陈海峰、李培、张淑琴、李晓芹、张荣荣、曹玉朋、汪仕韬、夏宝林。

粮油检验 粮食中交链孢菌毒素的测定 超高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了主要粮食中四种交链孢菌毒素的超高效液相色谱-串联质谱法测定方法。

本文件适用于小麦、玉米和大米中交链孢酚（AOH, Alternariol）、交链孢酚单甲醚（AME, Alternariol monomethyl ether）、交链孢菌酮酸（TeA, Tenuazonic acid）、腾毒素（TEN, Tentoxin）含量的测定。

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 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

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

采用酸化乙腈水溶液提取试样中交链孢菌毒素，振荡，离心，经 HLB 固相萃取柱净化后，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法使用的试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.1.3 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

5.1.4 氨水（NH₄OH）：色谱纯，浓度为 25%~28%。5.1.5 乙酸铵（CH₃COONH₄）。

5.2 溶液配制

5.2.1 提取液

乙腈-水-甲酸混合液（850+ 140+ 10）：分别量取 850mL 乙腈、140mL 水和 10 mL 甲酸，混合

均匀。

5.2.2 稀释液

乙酸铵溶液(0.05mol/L, pH 3):称取乙酸铵 3.85g,溶于 970 mL 水中,用甲酸调整 pH 至 3.0~3.2,用水稀释至 1000 mL,混合均匀。

5.2.3 淋洗液

甲醇水溶液 (5%): 吸取 5 mL 甲醇,加入到 95 mL 水中,混合均匀。

5.2.4 洗脱液

甲醇-乙腈-氨水混合液 (495+495+10): 分别量取 495 mL 甲醇、495 mL 乙腈和 10 mL 氨水,混合均匀。

5.2.5 标准曲线溶剂

乙腈-水-甲酸混合液 (49.7+49.7+0.6): 分别量取 49.7 mL 乙腈、49.7mL 水和 0.6 mL 甲酸,混合均匀。

5.2.6 流动相 A

氨水水溶液 (0.55 mmol/L): 准确移取 40 μ L 氨水,用超纯水定容至 1L。

5.3 标准品

5.3.1 交链孢菌酮酸 (TeA, $C_{10}H_{15}NO_3$, CAS 号: 610-88-8), 纯度 \geq 99%, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 交链孢酚 (AOH, $C_{14}H_{10}O_5$, CAS 号: 641-38-3), 纯度 \geq 98%, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3 交链孢酚单甲醚 (AME, $C_{15}H_{12}O_5$, CAS 号: 26894-49-5), 纯度 \geq 98%, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.4 腾毒素 (TEN, $C_{22}H_{30}N_4O_4$, CAS 号: 28540-82-1), 纯度 \geq 99%, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液的配制

5.4.1 标准储备液 (100 μ g/mL): 分别准确称取 TeA、AOH、AME、TEN 标准品各 5 mg (精确至 0.01 mg), 用甲醇 (4.1.2) 溶解,再用纯水定容至 50 mL, 分别制成 100 μ g/mL 的标准储备溶液,避光 -18 $^{\circ}$ C 保存,有效期 6 个月。

5.4.2 标准中间溶液 (1 μ g/mL): 分别精密量取 100 μ g/mL 标准储备液 100 μ L, 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇 (4.1.2) 稀释至刻度,配制成浓度为 1 μ g/mL 的标准中间溶液,避光 4 $^{\circ}$ C 保存,有效期为 1 个月。

5.4.3 混合系列标准工作溶液: 分别准确量取适量的四种交链孢菌毒素标准中间溶液于容量瓶中,用标准曲线溶剂 (4.2.4) 稀释成相应质量浓度的混合系列标准工作溶液 (见附录 A), 现用现配。

5.5 材料

HLB 固相萃取柱（6 mL，200 mg），或性能相当者。

6 仪器设备

6.1 超高效液相色谱串联质谱仪（UPLC-MS/MS）：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和感量 0.01 mg。

6.3 涡旋振荡器。

6.4 冷冻离心机：转速 ≥ 12000 r/min，可设 4℃。

6.5 氮吹仪。

6.6 粉碎机：电机转速 ≥ 1000 r/min。

6.7 筛网：500 μm 孔径试验筛。

6.8 pH 计。

6.9 固相萃取仪。

6.10 移液器。

7 试样的制备

按 GB/T 5491 执行，在采样过程中，注意防止样品污染。样品经粉碎机粉碎，过 500 μm 孔径试验筛，混匀，待测。

8 测定步骤

8.1 提取

称取 5 g 试样（精确至 0.01 g）于 50 mL 塑料离心管中，准确加入 20 mL 提取液（4.2.1），振荡提取 45 min，然后在 4℃ 下以 10000 r/min 离心 10 min，准确吸取 2 mL 上清液于 50 mL 离心管中，加入 6 mL 稀释液（4.2.2）并涡旋混匀，在 4℃ 下以 10000 r/min 离心 10 min，待净化。

8.2 净化

HLB 固相萃取柱预先用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化，将样品稀释液全部过柱，用 5 mL 5% 甲醇水溶液淋洗，抽干后用 6 mL 洗脱液（4.2.3）洗脱小柱，收集全部洗脱液于 10 mL 玻璃具塞离心管中，在 40℃ 水浴中氮吹至近干，残渣用 1 mL 标准曲线溶剂（4.2.4）复溶，涡旋 30s 后，把溶液转移至 2 mL 离心管，在 4℃ 下以 12000 r/min 离心 10 min，上清液供超高效液相色谱-串联质谱仪测定。

8.3 基质匹配标准曲线的制备

将不含上述四种交链孢菌毒素的代表性试样，按照试样提取步骤进行操作，于经提取、净化、氮气吹至近干后的空白试样残余物中，加入 1 mL 相应质量浓度的混合系列标准工作溶液（4.4.3）复溶，根据仪器性能和检测需要选择不少于 5 个浓度点，在 4℃ 下以 12000 r/min 离心 10 min 后取上清液供超高效

液相色谱-串联质谱仪测定。基质混合系列标准工作溶液应现用现配。以定量离子质量色谱峰面积为纵坐标，基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制基质匹配标准曲线。求回归方程和相关系数。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：BEH C18 柱，2.1 mm×100 mm×1.7 μm，或等效色谱柱；

流动相：A-0.55 mmol/L 氨水水溶液，B-乙腈；

进样体积：5 μL；

柱温：45℃；

流速：0.3 mL/min；

流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.0	98	2
1	98	2
2.4	45	55
4.0	35	65
5	5	95
7	5	95
8	98	2
11	98	2

8.4.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源（ESI）。

扫描方式：负离子扫描。

检测方式：多反应监测模式（MRM），母离子、子离子和碰撞能量参考值见表 2。

离子源温度：150 °C。

脱溶剂温度：600 °C。

毛细管电压：2500 V。

脱溶剂气流速：1000 L/Hr。

锥孔气流速：150 L/Hr。

表 2 MRM 参数

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
TeA	196.1	139*	20	18
		112.1	20	23
AOH	257	213.1*	23	24
		147	23	32

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
AME	271.1	256*	40	21
		228	40	28
TEN	413.2	141*	24	23
		271.1	24	17

*为定量离子对。

8.4.3 定性测定

通过对比试样与标准品色谱图的保留时间、色谱峰的特征离子进行定性。试样中待测物质的保留时间与标准品的保留时间偏差在±2.5%以内，每种化合物的质谱定性离子应出现，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，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过表3中规定的范围。

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，%	允许的相对偏差，%
≥50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

8.4.4 定量测定

取试样溶液、溶剂标准溶液或基质匹配标准溶液，作单点或多点校准，按外标法计算。基质匹配标准溶液及试样溶液中交链孢菌毒素的响应值均应在仪器检测的线性范围之内，以定量离子色谱峰面积为纵坐标、基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制工作曲线，得到回归方程和相关系数，相关系数应≥0.99。相关液相色谱-串联质谱选择性离子流图参见附录B。

8.5 空白试验

取空白试样，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

9 结果计算和表述

试样中交链孢菌毒素的残留量按式（1）计算：

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times V_1}{A_s \times m \times V_2} \dots \dots \dots (1)$$

X——供试试样中交链孢菌毒素的残留量，单位为微克每千克（μg/kg）；

A——试样溶液中交链孢菌毒素的峰面积；

C_s——基质匹配标准溶液的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样溶液最终复溶体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——基质匹配标准溶液中交链孢菌毒素的峰面积；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

V_2 ——净化时所分取试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

10 检测方法灵敏度、准确度、精密度

10.1 灵敏度

本文件的方法检出限是0.4 $\mu\text{g/kg}$ ~4.0 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限是1.0 $\mu\text{g/kg}$ ~10.0 $\mu\text{g/kg}$ （见附录A）。

10.2 准确度

本方法在定量限的1-10倍添加浓度水平上的回收率为60%~120%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 20\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(规范性)

四种交链孢菌毒素的方法检出限和定量限见表 A.1 和表 A.2。

表 A.1 四种交链孢菌毒素的方法检出限($\mu\text{g/kg}$)

样品基质	TeA	AOH	AME	TEN
大米	0.7	0.4	0.4	0.4
玉米	0.4	4.0	0.4	0.4
小麦	0.4	0.4	0.4	0.4

表 A.2 四种交链孢菌毒素的方法定量限($\mu\text{g/kg}$)

样品基质	TeA	AOH	AME	TEN
大米	2.0	1.0	1.0	1.0
玉米	1.0	10.0	1.0	1.0
小麦	1.0	1.0	1.0	1.0

混合系列标准工作溶液浓度加标点见表 A.3 和 A.4。

表 A.3 大米、小麦的混合系列标准工作溶液浓度 ($\mu\text{g/L}$)

交链孢菌毒素	标曲点 1	标曲点 2	标曲点 3	标曲点 4	标曲点 5	标曲点 6	标曲点 7
TeA	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	10.0	15.0
AOH	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	10.0	15.0
AME	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	10.0	15.0
TEN	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	10.0	15.0

表 A.3 玉米的混合系列标准工作溶液浓度 ($\mu\text{g/L}$)

交链孢菌毒素	标曲点 1	标曲点 2	标曲点 3	标曲点 4	标曲点 5	标曲点 6	标曲点 7
TeA	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	6.0	10.0
AOH	2.0	4.0	10.0	20.0	40.0	60.0	100.0
AME	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	6.0	10.0
TEN	0.20	0.40	1.0	2.0	4.0	6.0	10.0

附录 B

(资料性)

四种交链孢菌毒素标准品超高效液相色谱-串联质谱选择性离子流图见图 B.1。

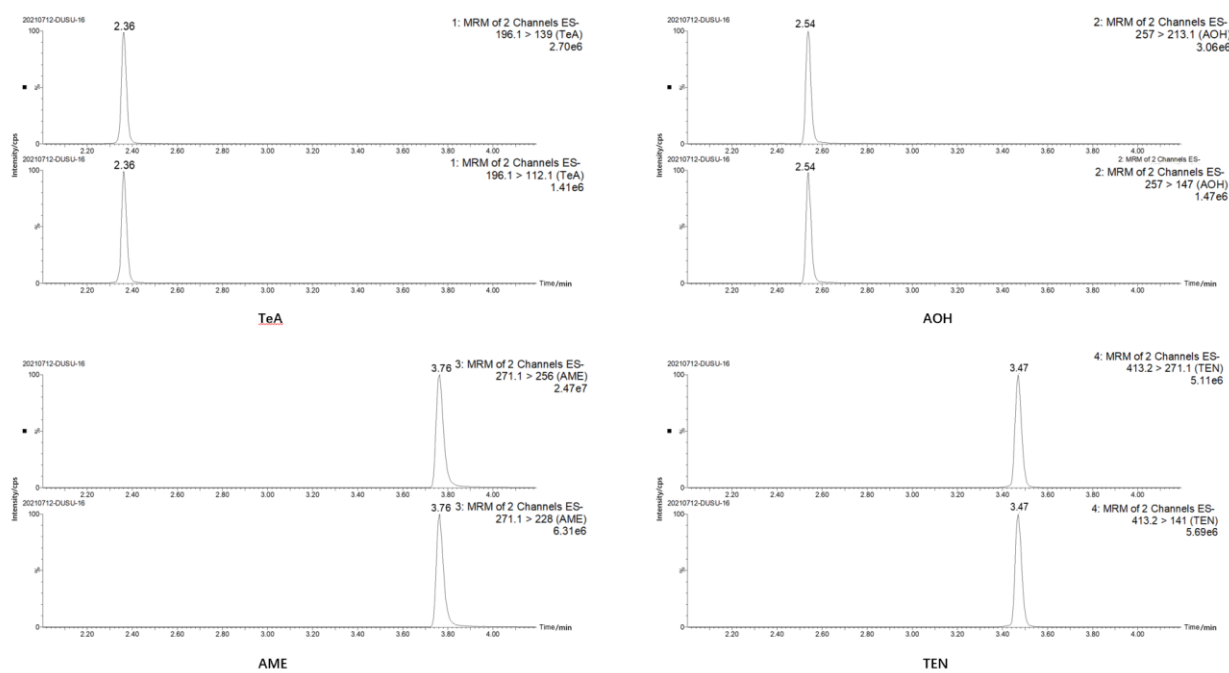


图 B.1 四种交链孢菌毒素标准品液相色谱-串联质谱选择性离子流图 (10 ng/mL)