

# 团 体 标 准

T/SATA 032—2022

食品中桔青霉素的测定

液相色谱-串联质谱法

Determination of citrinin in foods—LC-MS/MS method

2022 - 03 - 24 发布

2022 - 04 - 24 实施

深圳市分析测试协会 发布

## 目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理.....	1
5 试剂与材料.....	1
6 仪器和设备.....	3
7 分析步骤.....	3
8 结果计算.....	5
9 精密度.....	6
10 检出限及定量限.....	6
附录 A（资料性附录）桔青霉素和同位素的液相色谱仪-串联质谱图.....	7

## 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。

本文件由深圳市分析测试协会归口。

本文件起草单位：深圳市计量质量检测研究院、深圳市计量质量检测研究院（集团）有限责任公司。

本文件主要起草人：柏文良、罗尔伦、李芸、李媛、罗敏、邹幼成、林爽、陈玉浩、程禹铭、吴逸秋、梁汉旺、翁晓君、彭晓羽、张贵虹。

本文件为首次发布。

# 食品中桔青霉素的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件规定了食品中桔青霉素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于大米、玉米、辣椒、大麦、燕麦、小麦、腐乳、红曲类产品中桔青霉素的定性定量测定。

## 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 27404 实验室质量控制规范食品理化检测

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

试样中的桔青霉素用甲醇-水提取，提取液经过滤、稀释后，用免疫亲和柱净化，经液相色谱-串联质谱仪检测，保留时间和离子丰度比定性，同位素内标法定量。

## 5 试剂与材料

除另有规定外，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

### 5.1 试剂

5.1.1 甲醇（ $\text{CH}_3\text{OH}$ ）色谱纯。

5.1.2 氯化钠（ $\text{NaCl}$ ）。

5.1.3 磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ）。

5.1.4 磷酸二氢钾（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ）。

5.1.5 氯化钾（ $\text{KCl}$ ）。

5.1.6 吐温20（ $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$ ）。

5.1.7 盐酸 (HCl)

5.1.8 甲酸 (HCOOH) 色谱纯。

5.1.9 乙腈 (CH<sub>3</sub>CN) 色谱纯。

## 5.2 试剂配制

5.2.1 PBS 缓冲溶液: 称取 8.0 g 氯化钠 (5.1.2)、1.2 g 磷酸氢二钠 (5.1.3)、0.2 g 磷酸二氢钾 (5.1.4)、0.2 g 氯化钾 (5.1.5), 用水溶解, 用盐酸 (5.1.7) 调节 pH 至 7.0, 用水定容至 1000 mL。

5.2.2 0.1% 吐温 20-PBS 溶液: 准确移取 1 mL 吐温 20 (5.1.6) 以 PBS 缓冲溶液定容至 1000 mL。

5.2.3 甲醇-水(70+30)提取液: 移取 700 mL 甲醇 (5.1.1) 加入 300 mL 水, 混匀。

5.2.4 0.1% 甲酸水溶液: 取 1 mL 甲酸 (5.1.8), 用水稀释至 1000 mL, 混匀。

5.2.5 0.1% 甲酸乙腈: 取 1 mL 甲酸 (5.1.8), 用乙腈 (5.1.9) 稀释至 1000 mL, 混匀。

## 5.3 材料

5.3.1 桔青霉素免疫亲和柱: 柱体积 1 mL, 柱容量 100 ng, 或等效柱。

5.3.2 玻璃纤维滤纸: 直径 11 cm, 孔径 1.5 μm。

## 5.4 桔青霉素标准品

5.4.1 桔青霉素 (C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, CAS 号: 518-75-2): 纯度≥99.0%, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4.2 同位素内标 <sup>13</sup>C<sub>13</sub>-桔青霉素(<sup>13</sup>C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>): 纯度≥99.0%, 浓度为 10 μg/mL。

## 5.5 标准溶液配制

5.5.1 标准储备液 (100 mg/L): 称取桔青霉素标准品 10 mg (精确至 0.01 mg), 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 于 4 °C 下避光保存, 保存期 12 个月。

5.5.2 标准中间液 (1.00 mg/L): 准确移取 1.0 mL 桔青霉素标准储备液于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 浓度为 1.00 mg/L, 于 4 °C 下保存, 保存期 6 个月。

5.5.3 同位素内标工作液 (100 ng/mL): 准确移取同位素内标 <sup>13</sup>C<sub>13</sub>-桔青霉素标准品 1.00 mL, 用甲醇稀释并定容至 100 mL, 于 4 °C 下避光保存, 保存期 3 个月。

5.5.4 标准系列工作溶液：分别吸取桔青霉素标准中间液（5.5.2）和同位素内标工作液（5.5.3）用甲醇稀释定容，配制成桔青霉素浓度分别为 0.500  $\mu\text{g/L}$ 、1.00  $\mu\text{g/L}$ 、5.00  $\mu\text{g/L}$ 、10.0  $\mu\text{g/L}$ 、20.0  $\mu\text{g/L}$ ，内标浓度为 5.00  $\mu\text{g/L}$  的标准工作溶液。临用时配制。

## 6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-串联质谱仪，配有电喷雾（ESI）离子源。

6.2 微孔滤膜：0.22  $\mu\text{m}$ ，有机相型。

6.3 分析天平：感量为0.00001 g和0.001 g。

6.4 高速均质器： $\geq 12000$  r/min

6.5 离心机。

6.6 固相萃取装置。

6.7 混匀器。

6.8 高速粉碎机

## 7 分析步骤

### 7.1 提取

称取经充分粉碎均质后的大米、玉米、辣椒、大麦、燕麦、小麦试样5.0 g；腐乳、红曲及其制品试样称取1g（精确至0.001 g）于50 mL 离心管中，加入500  $\mu\text{L}$ 同位素内标工作液振荡混合后静置30 min。加入20.0 mL甲醇-水(70+30)提取液，以均质器高速均质2 min，在6000 r/min下离心10 min，取上清液备用。移取4.0 mL上清液，加入26 mL 0.1 % 吐温20-PBS溶液稀释、混匀。将稀释液通过玻璃纤维滤纸过滤，待净化。

### 7.2 净化

将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温，准确移取15.0 mL上述滤液过免疫亲和柱，以1滴/s流速全部通过亲和柱，加入10 mL PBS缓冲液以1滴/s~2滴/s的流速淋洗柱子，直至空气进入到亲和柱中，弃去全部流出液。准确加入1mL 甲醇进行洗脱，洗脱流速为1滴/s~2滴/s，收集全部洗脱液于玻璃管中，过滤至进样瓶中供检测用。

### 7.3 空白实验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

#### 7.4 仪器参考条件

##### 7.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: Hypersil GOLD C<sub>18</sub> 1.9 μm, 2.1mm×100 mm Column, 或性能相当者。
- b) 流动相: A 为0.1%甲酸水溶液, B 为0.1%甲酸乙腈, 梯度洗脱程序见表1。
- c) 流速: 0.3 mL/min。
- d) 柱温: 室温。
- e) 进样量: 4 μL。

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	70	30
3	5	95
8	5	95
8.1	70	30
9.1	70	30

##### 7.4.2 质谱条件

- a) 电离方式: 电喷雾正离子模式;
- b) 监测方式: 多反应监测 (MRM);
- c) 气帘气: 35.0 psi;
- d) 碰撞气: 9 psi;
- e) 离子喷雾电压: 5500 V;
- f) 离子源温度: 550 °C;
- g) 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能见表2。

表2 桔青霉素的定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能

中文名称	电离方式	定性离子对/(m/z) (母离子/子离子)	定量离子对/(m/z) (母离子/子离子)	去簇电压 /V	碰撞能 /eV
桔青霉素	电喷雾正离子模 式	251.1/233.0	251.1/233.0	84.0	23.0
		251.1/205.0		84.0	34.3
<sup>13</sup> C <sub>13</sub> -桔青霉 素	电喷雾正离子模 式	264.0/246.0	264.0/246.0	135.0	22.0

## 7.5 定性测定

按照仪器参考条件（7.4）测定试样溶液和标准工作溶液，如果试样中的桔青霉素质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致（变化范围在±2.5%之内）；且试样中桔青霉素的两个子离子的相对丰度比(k)与浓度相当标准工作溶液的桔青霉素的两个子离子的相对丰度比相比，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桔青霉素。

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

## 7.6 定量测定

### 7.6.1 标准曲线的制作

将桔青霉素标准系列工作溶液（5.5.4）按仪器参考条件（7.4）进行测定，得到相应的标准系列工作溶液的质量色谱峰面积。以标准系列工作溶液的浓度为横坐标，以桔青霉素与内标色谱峰的比值为纵坐标，绘制工作曲线，在浓度范围0.500~20.0 μg/L内，相关系数不低于0.99。

### 7.6.2 试样溶液的测定

将试样溶液（7.2）按仪器参考条件（7.4）进行测定，内标法计算待测液中桔青霉素的质量浓度。

## 8 结果计算

试样中桔青霉素含量按式计算：



$$X = \frac{c \times V}{m} \times K \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X — 试样中桔青霉素的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

c — 从标准曲线中读出的供试品溶液中桔青霉素的浓度，单位为纳克每毫升（ $\text{ng}/\text{mL}$ ）；

V — 样液最终定容体积，单位为毫升（ $\text{mL}$ ）；

m — 试样溶液所代表的质量，单位为克（ $\text{g}$ ）；

K — 稀释倍数；

计算结果需扣除空白值。计算结果保留三位有效数字。

## 9 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%。

## 10 检出限及定量限

大米、玉米、辣椒、大麦、燕麦、小麦等食品：方法检出限为  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

腐乳、红曲及其制品：方法检出限为  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 附录 A

(资料性附录)

## 桔青霉素和同位素的液相色谱仪-串联质谱图

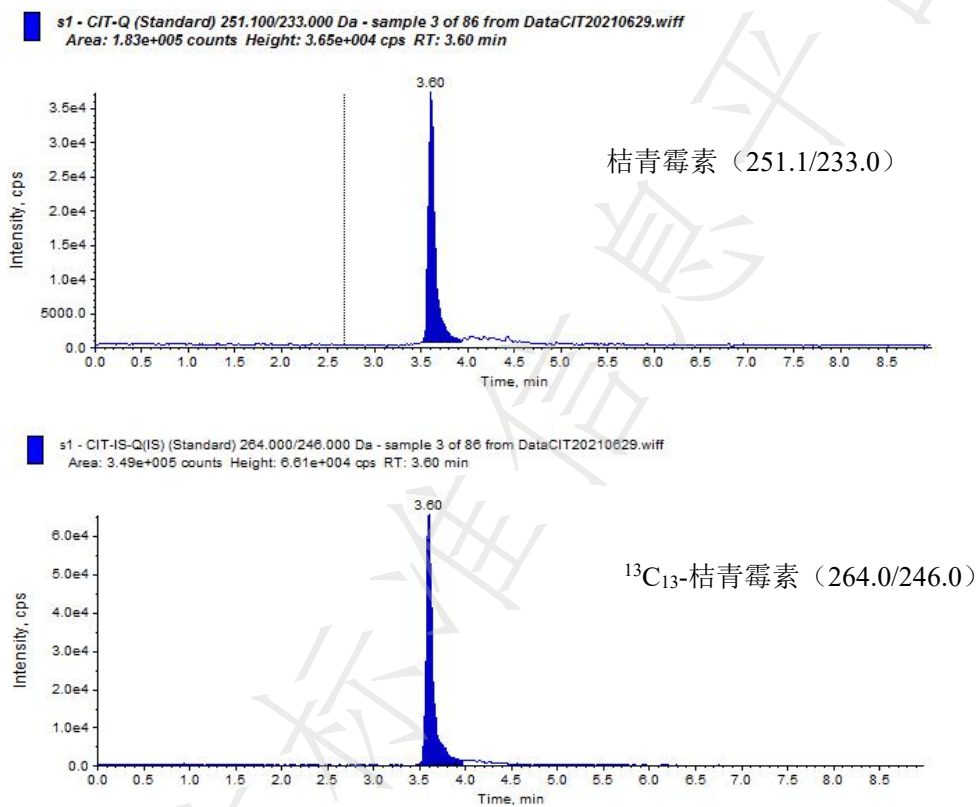


图 A.1 桔青霉素和同位素定量离子对质量色谱图