

团 体 标 准

T/GDFCA 107—2024
代替T/GDFCA 107—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

High-throughout determination of fourteen mycotoxins content in health foods by
liquid chromatography -tandem mass spectrometry

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2024-12-XX 发布

2024-12-XX 实施

广东省食品流通协会 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	2
7 试样的制备	2
8 测定步骤	2
9 结果计算和表述	5
10 灵敏度和精密度	6
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	7
附 录 B （资料性） 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。

本文件代替T/GDFCA 107—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》，与T/GDFCA 107—2023相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

a) “范围”中，增加了“，包括方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样的制备、分析步骤、结果计算、灵敏度、准确度和精密度等要求”。

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：无限极（中国）有限公司、广州数维科技有限公司、广州南沙明曦检测服务有限公司、广东省科学院生物与医学工程研究所、华谱（西安）生物科技有限公司、精益和泰质量检测股份有限公司、康正检测服务股份有限公司、广东壹健康健康产业集团股份有限公司、南京中科药业有限公司、广州市农产品质量安全监督所、西南大学、华南农业大学、东南大学、广东理工学院、广州食协技术服务有限公司、广州华生检测技术服务有限公司、广州绿洲科技技术有限公司、广州睿芯科技服务有限公司、广东省食品流通协会。

本文件主要起草人：陆智、李亚杰、刘凤松、李亚贤、武俊超、苏杰雄、罗珍、葛亚中、龙梦飞、杜冰、黎攀、刘贤钊、郑维东、黄美山、董华壮、高智、罗小凤、谢卓斌、陈慧冰、陈琳涵、陈文静、朱颖阳、杨维、陈忆宾、张影、冷晓晨、王蕾、黎汉远、朱达政、万璋妃、冼燕妹、陈鸳鸯、谢金龙、洪珍、高裕锋、王桂华、甄振鹏、覃长娜、李长成、刘泽槟、黄冬婷、文钰、庞无瑕、刘丽梅、徐日益、杨殿卿、师翠翠、李金莉、李正元、陈超明、杜柏豪、张华萍、王涛、郑彦丽、潘婉霞、冯鹏、周亚杰、洪振涛、潘达、张念、李文全、陈洪超、齐虹丽、韩燕、张彦霞、张孟飞、陈浩宇、余慧英、黄鉴雄、王麒伟、叶映朵、谢天恩。

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，包括方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样的制备、分析步骤、结果计算、灵敏度、准确度和精密度等要求。

本文件适用于口服液、片剂、胶囊、颗粒剂等保健食品中黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、伏马菌素 B₁、伏马菌素 B₂、伏马菌素 B₃、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、桔青霉素和展青霉素 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，用超高效液相色谱-串联质谱法（UPLC-MS/MS）测定，外标法定量。

5 试剂与材料

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 试剂

- 5.1.1 乙腈（C₂H₃N，CAS 号：75-05-8）：色谱纯。
- 5.1.2 甲酸（CH₂O₂，CAS 号：64-18-6）。
- 5.1.3 甲醇（CH₄O，CAS 号：67-56-1）：色谱纯。
- 5.1.4 乙酸（C₂H₄O₂，CAS 号：64-19-7）。
- 5.1.5 乙酸铵（C₂H₇NO₂，CAS 号：631-61-8）：色谱纯。
- 5.1.6 氯化钠（NaCl，CAS 号：7647-14-5）。
- 5.1.7 无水硫酸镁（MgSO₄，CAS 号：7487-88-9）。

5.2 溶液配制

5.2.1 甲酸乙腈溶液

准确吸取 20 mL 甲酸（5.1.2），用乙腈（5.1.1）定容至 1000 mL。

5.2.2 甲醇乙酸水溶液

准确吸取 4 mL 乙酸（5.1.4），用纯水定容至 100 mL。取其中 90 mL 溶液，加入 10 mL 甲醇（5.1.3），混匀。

5.3 标准品

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，纯度 \geq 95%。

5.4 标准溶液的制备

5.4.1 标准储备溶液

分别准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）真菌毒素标准品，用乙腈（5.1）溶解，分别转移至 10 mL 容量瓶中，以乙腈（5.1.1）定容至刻度。于-18 °C 下保存，有效期 1 年。

5.4.2 混合标准溶液

分别移取适量 5.4.1 中 14 种真菌毒素标准储备溶液，用乙腈稀释定容至 10 mL，配制成脱氧雪腐镰刀菌烯醇、展青霉素、桔青霉素浓度为 5000 ng/mL，伏马菌素 B₁、伏马菌素 B₂、伏马菌素 B₃、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、杂色曲霉毒素浓度为 500 ng/mL，黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 浓度为 50 ng/mL 的混合标准储备溶液。于-18 °C 下保存，有效期 1 年。

6 仪器和设备

6.1 超高效液相色谱-质谱串联仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量 0.001 g 和 0.01 mg。

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

取胶囊类固态试样，采样量应大于 100 g，将胶囊内容物连同胶囊壳一并粉碎，充分混合均匀，均分成 50 g 两份，用于两次独立试验，贮存于洁净盛样袋内，密闭并标识，于常温储存备用。

取固体饮料、片剂等非胶囊类固态试样，采样量应大于 100 g，研细，充分混合均匀，均分成 50 g 两份，用于两次独立试验，贮存于洁净盛样袋内，密闭并标识，于常温储存备用。

7.2 液体试样

取液体试样，采样量应大于 100 g，混合均匀后，均分成 50 g 两份，用于两次独立试验，分别装入洁净容器，密闭并标识，于常温储存备用。

7.3 空白试样

选取类型相同、均匀一致，且在待测保留时间处仪器响应值小于方法检出限 30% 的保健食品样品作为空白样品。

8 测定步骤

警示：整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光（直射阳光）、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中，操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

8.1 试样提取

8.1.1 固态试样

称取试样 2 g（精确到 0.01 g）于 50 mL 离心管中，加入 5 mL 水，涡旋 5 min。再加入 10 mL 含 2% 甲酸乙腈溶液（V₁），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，待净化。

8.1.2 液体试样

称取试样 2 g（精确到 0.01 g），置于 50 mL 离心管中，涡旋 5 min。再加入 10 mL 含 2% 甲酸乙腈溶液（V₁），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，待净化。

8.2 试样净化

准确移取 6.0 mL 上清液，置于内含 200 mg C₁₈ 填料和 1 g 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 2.5 mL 上清液（V₂），于 40 °C 氮气吹干，用 1 mL 甲醇乙酸溶液（5.2.2）（V₃）复溶，涡旋振荡 3 min，于 14000 r/min 条件下离心 30 min，上清液收集于进样瓶，待测。

8.3 混合基质匹配标准曲线的制备

精确称取试样 2.0 g（精确至 0.01 g）6 份，置 50 mL 离心管中，分别准确加入 14 种真菌毒素混合标准储备溶液（5.4.2）8 μL、20 μL、40 μL、80 μL、200 μL、400 μL，经 8.1 和 8.2 同法操作，配制成黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 浓度为 0.10 ng/mL、0.25 ng/mL、0.50 ng/mL、1.0 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL，伏马菌素 B₁、伏马菌素 B₂、伏马菌素 B₃、杂色曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素浓度为 1.0 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL，桔青霉素、展青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇浓度为 10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、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。

8.4 测定

8.4.1 仪器参考条件

8.4.1.1 液相色谱参考条件如下（适用于展青霉素外的其他毒素）：

- 色谱柱：五氟苯基色谱柱（2.1 mm×100 mm，2.6 μm），或性能相当者；
- 流动相：A 为 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵水溶液，B 为甲醇溶液。
- 流速：0.4 mL/min；
- 进样量：5 μL；
- 柱温：40 °C；
- 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序表

时间/min	A/%	B/%
0	95	5
6.0	80	20

时间/min	A/%	B/%
8.0	80	20
15.0	10	90

表 1 梯度洗脱程序表 (续)

时间/min	A/%	B/%
18.0	10	90
18.1	95	5
20.0	95	5

8.4.1.2 液相色谱参考条件如下 (适用于展青霉素):

- 色谱柱: C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 3 μm), 或性能相当者;
- 流动相: A 为水, B 为甲醇溶液。
- 流速: 0.3 mL/min;
- 进样量: 5 μL;
- 柱温: 40 °C;
- 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱程序表

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

8.4.1.3 质谱参考条件如下:

- 离子源: 电喷雾离子源 (ESI + /-);
- 扫描模式: 正离子、负离子扫描;
- 检测方式: 多反应离子监测 (MRM);
- 电喷雾电压: 5500 V;
- 离子源温度: 550 °C;
- 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;
- 雾化气: 50 psi;
- 气帘气: 40 psi;
- 辅助气: 50 psi;
- 碰撞气: Medium;
- 14 种真菌毒素母、子离子去簇电压、碰撞能量、保留时间参考值见表 3。

表 3 14 种真菌毒素母、子离子去簇电压、碰撞能量、保留时间

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 B ₁	313.1 (+H)	285.0 ^a /241.0	150	31/45	12.7
黄曲霉毒素 B ₂	315.1 (+H)	287.0 ^a /259.0	150	35/40	12.5

黄曲霉毒素 G ₁	329.0 (+H)	243.0 ^a /283.0	150	37/34	12.3
黄曲霉毒素 G ₂	331.0 (+H)	245.0 ^a /285.0	150	40/37	12.0
伏马菌素 B ₁	722.4 (+H)	334.3 ^a /352.3	110	59/54	13.4

表 3 14 种真菌毒素母、子离子去簇电压、碰撞能量、保留时间（续）

化合物	母离子	子离子	去簇电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min
伏马菌素 B ₂	706.4 (+H)	336.4 ^a /354.3	117	57/49	14.2
伏马菌素 B ₃	706.4 (+H)	336.2 ^a /354.4	115	54/47	13.9
T-2 毒素	489.2(+NH ₄ ⁺)	387.1/245.1 ^a	210	36/26	13.8
杂色曲霉毒素	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
黄曲霉毒素 G ₁	329.0 (+H)	243.0 ^a /283.0	150	37/34	12.3
赭曲霉毒素 A	402.0 (-H)	358.1 ^a /211.0	-150	-27/-37	14.1
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	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。

8.5 测定法

8.5.1 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，相对偏差不得超过表4规定的范围，则可判断样品中存在相应的被测物。

表 4 相对离子丰度的允许偏差范围

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

8.5.2 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应在仪器测定的线性范围内。基质匹配标准溶液中14种真菌毒素多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B。

8.6 空白试验

除不加试料外，按照8.1和8.2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：

$$X_i = \frac{(C - C_0) \times V_1 \times V_3}{V_2 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X_i ——待测样品中14种真菌毒素的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；
 - C ——根据标准曲线得到的待测组分溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；
 - C_0 ——空白试验测得真菌毒素的质量浓度，单位为单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；
 - 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 ——样品经净化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 ）。
- 计算结果保留三位有效数字。

10 灵敏度和精密度

10.1 灵敏度

黄曲霉毒素 B_1 、黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 的检出限为 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，伏马菌素 B_1 、伏马菌素 B_2 、伏马菌素 B_3 、T-2毒素、杂色曲霉素、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、脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限为 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

黄曲霉毒素 B_1 、黄曲霉毒素 B_2 、黄曲霉毒素 G_1 、黄曲霉毒素 G_2 的定量限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，伏马菌素 B_1 、伏马菌素 B_2 、伏马菌素 B_3 、T-2毒素、杂色曲霉素、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、脱氧雪腐镰刀菌烯醇的定量限为 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过算数平均值的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 B ₁	AflatoxinB ₁	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.27
2	黄曲霉毒素 B ₂	AflatoxinB ₂	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.29
3	黄曲霉毒素 G ₁	AflatoxinG ₁	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.27
4	黄曲霉毒素 G ₂	AflatoxinG ₂	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.29
5	伏马菌素 B ₁	Fumonisin B ₁	116355-83-0	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721.83
6	伏马菌素 B ₂	Fumonisin B ₂	116355-84-1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83
7	伏马菌素 B ₃	Fumonisin B ₃	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 ₇ H ₆ O ₄	154.12
13	桔青霉素	Citrinin	518-75-2	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	250.25
14	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	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

空白基质匹配标准溶液中, 14种真菌毒素的多反应监测 (MRM) 色谱图见图B.1。

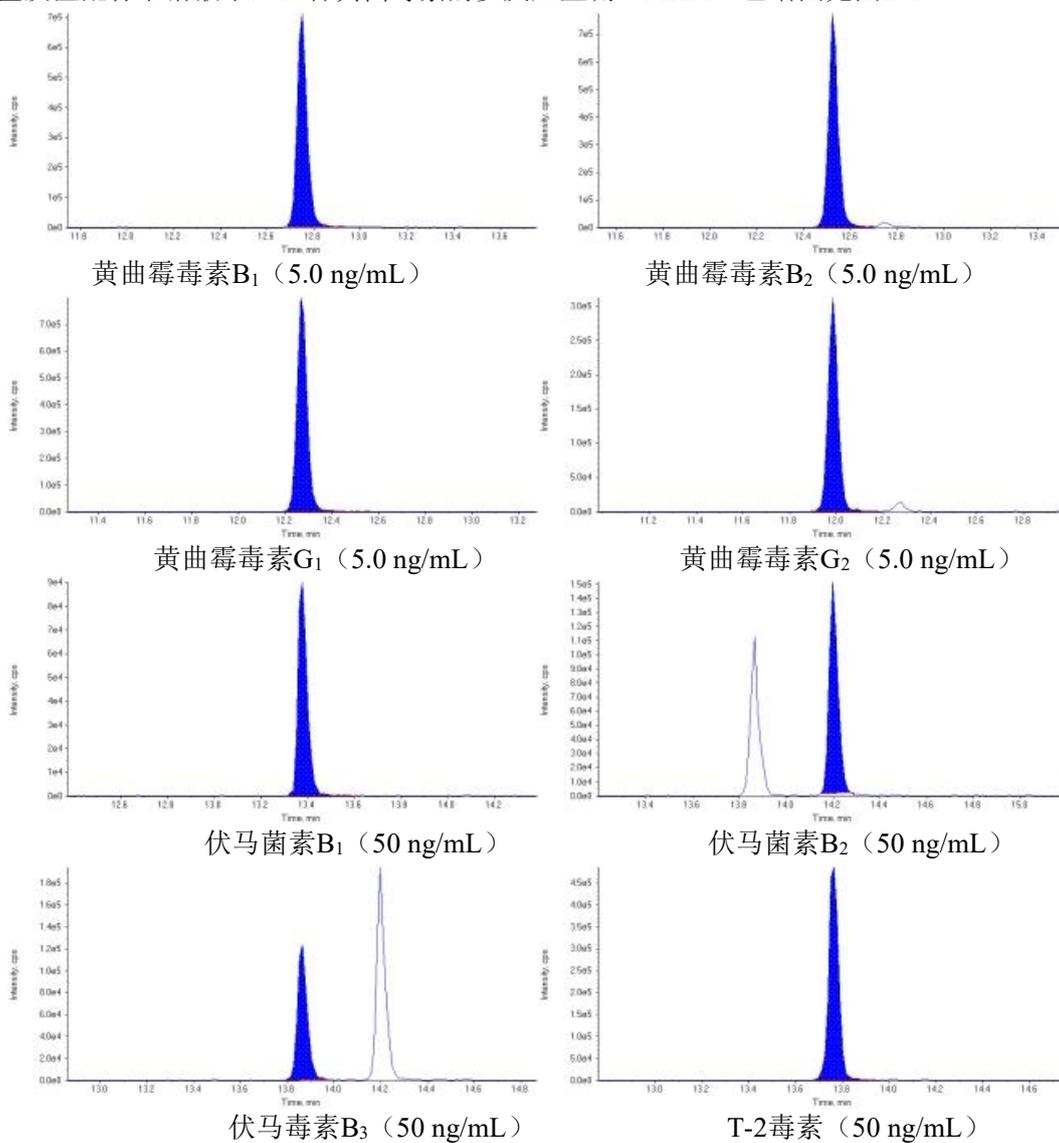
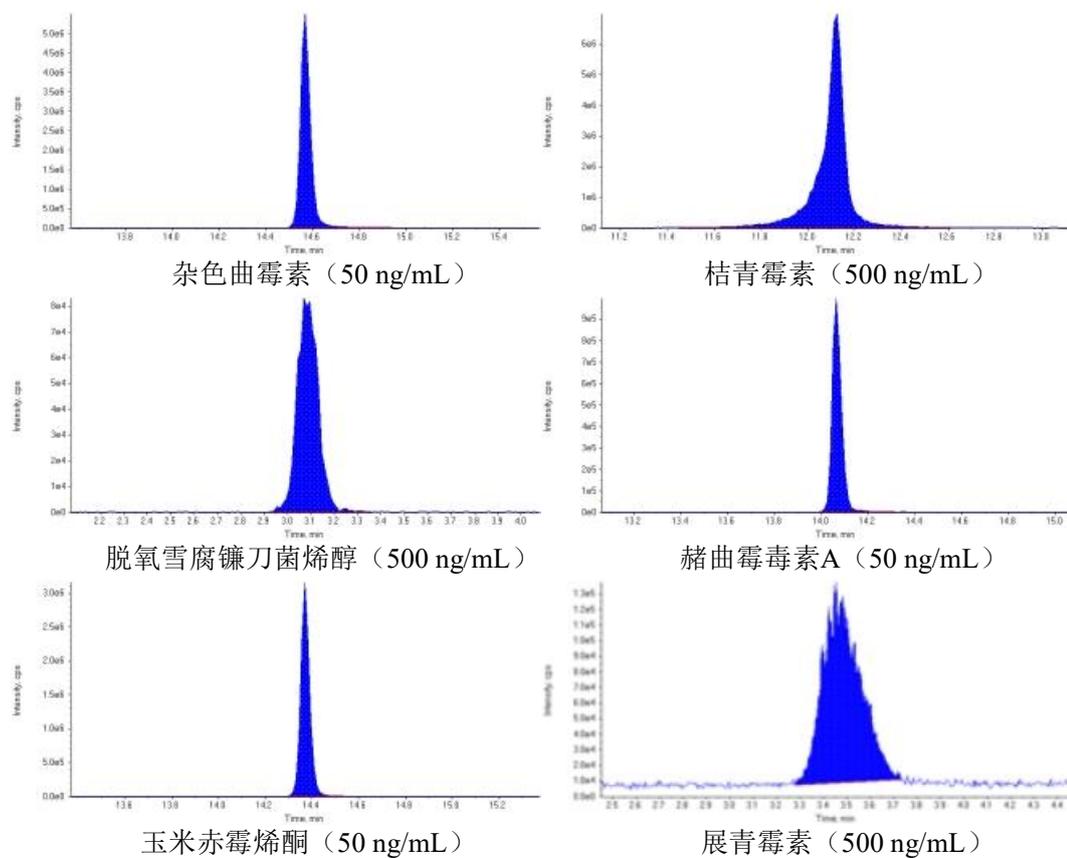


图 B.1 14种真菌毒素多反应监测 (MRM) 色谱图



图B.1 14种真菌毒素多反应监测 (MRM) 色谱图 (续)