

BJS

食品补充检验方法

BJS 202008

蘑菇中 α -鹅膏毒肽等 6 种蘑菇毒素的测定

2020-11-19 发布

国家市场监督管理总局 发布

蘑菇中 α -鹅膏毒肽等 6 种蘑菇毒素的测定

1 范围

本方法规定了蘑菇中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟基鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽和二羟基鬼笔毒肽 6 种蘑菇毒素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于蘑菇中 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟基鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽和二羟基鬼笔毒肽 6 种蘑菇毒素的测定。

2 原理

试样经甲醇提取,提取液经氮吹后以水复溶,正己烷脱脂,水溶液经 HLB 固相萃取柱净化后,采用液相色谱-串联质谱仪检测,外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有规定,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 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 3.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 3.1.3 正己烷(C_6H_{14})。
- 3.1.4 甲酸铵(HCOONH_4):色谱纯。
- 3.1.5 固相萃取小柱(60 mg/3 mL):HLB 柱或相当者,使用前依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水活化。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 甲醇水溶液(5+95,体积比):量取 5 mL 甲醇(3.1.1),用水稀释至 100 mL。
- 3.2.2 乙腈甲醇溶液(30+70,体积比):量取 30 mL 乙腈(3.1.2)和 70 mL 甲醇(3.1.1),混匀。
- 3.2.3 甲酸铵溶液(5 mmol/L):称取甲酸铵(3.1.4)0.315 g,用水溶解后定容至 1 000 mL,滤膜过滤后备用。

3.3 标准品

α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟基鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽和二羟基鬼笔毒肽标准品的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量参见附录 A,各标准品纯度 $\geq 95\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 标准储备液(1 000 mg/L):准确称取 α -鹅膏毒肽、 β -鹅膏毒肽、 γ -鹅膏毒肽、羧基二羟基鬼笔毒肽、羧基三羟基鬼笔毒肽和二羟基鬼笔毒肽标准品(3.3)各 10 mg(精确至 0.1 mg),分别置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇(3.1.1)溶解并稀释至刻度,摇匀,制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备液,—18 ℃保

存。有效期 3 个月。

3.4.2 混合标准中间液(10.0 mg/L):分别准确吸取上述 6 种标准品的标准储备液(3.4.1)各 1 mL,置于同一容量瓶中,用甲醇(3.1.1)稀释至 100 mL,摇匀,制成混合标准中间液,0℃~4℃保存。有效期 1 个月。

3.4.3 混合标准工作液:分别准确吸取混合标准中间液(3.4.2)适量,用初始流动相稀释,摇匀,作为系列混合标准工作溶液,质量浓度依次为各化合物 5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL,临用新制或依仪器响应情况配制适当浓度的混合标准工作溶液。

3.5 材料

3.5.1 微孔滤膜:有机系,微孔孔径 0.22 μm。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

4.2 分析天平:感量分别为 0.1 mg 和 0.001 g。

4.3 固体样品粉碎机。

4.4 超声波清洗器。

4.5 涡漩振荡器。

4.6 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

4.7 固相萃取装置。

4.8 氮吹仪。

4.9 恒温干燥箱。

5 分析步骤

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。

5.1 试样制备

选取适量具有代表性试样,尽可能切碎,置于 85℃恒温干燥箱中干燥 4 h,经粉碎机粉碎,充分混匀后置于洁净容器中密封保存。

5.2 试样前处理

5.2.1 提取:准确称取 0.4 g(精确至 0.001 g)试样置于 15 mL 具塞塑料离心管中,加入 6.0 mL 甲醇(3.1.1),混匀,于涡漩振荡器上涡漩 1 min,超声提取 20 min 后,冷却至室温,于 8 000 r/min 离心 5 min,准确吸取上清液 4.0 mL 置于另一离心管中,45℃下氮吹至近干,用 4.0 mL 水溶解残渣,加入 1.0 mL 正己烷,涡漩 1 min 后,8 000 r/min 下离心 3 min,弃去上层正己烷,水相待净化。

5.2.2 净化:准确移取上述水相待净化液 3.0 mL(相当于 0.2 g 试样量)至固相萃取柱(3.1.5)中,以约 1 mL/min 的流速全部通过小柱后,用 3 mL 甲醇水溶液(3.2.1)淋洗,抽干,加入 2 mL 乙腈甲醇溶液(3.2.2)洗脱,洗脱液在 45℃下氮吹至干,准确加入 1.00 mL 初始比例流动相,涡漩 1 min 溶解残渣,过滤膜后待测。

5.3 仪器测定

5.3.1 液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,2.1 mm×100 mm,粒径 1.7 μm,或性能相当者。
- b) 流动相:A 为 5 mmol/L 甲酸铵溶液(3.2.3),B 为甲醇(3.1.1),梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速:0.3 mL/min。
- d) 柱温:40 ℃。
- e) 进样量:5 μL。

表 1
 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	85	15
1.5	85	15
8.0	55	45
8.1	5	95
10.0	5	95
10.1	85	15
15.0	85	15
梯度洗脱条件应保证 α-鹅膏毒肽与 β-鹅膏毒肽实现基线分离。		

5.3.2
 质谱参考条件如下：

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI 源)。
- b) 检测方式:多反应监测(MRM)。
- c) 扫描方式:正离子模式。
- d) 离子源参数参考条件：
 毛细管电压 3.3 kV；离子源温度 150 ℃；脱溶剂气温度 380 ℃；脱溶剂气流速 600 L/h；锥孔气流速 150 L/h。
- e) 定性离子对、定量离子对、锥孔电压及碰撞能量参见表 2。

表 2
 质谱参数

编号	中文名称	母离子	子离子	锥孔电压 V	碰撞能量 eV	保留时间 min
1	β-鹅膏毒肽	920.5	85.8 ^a	10.0	72	3.22
			259.2	10.0	40	
2	α-鹅膏毒肽	919.5	85.8 ^a	10.0	75	3.87
			259.2	10.0	40	
3	γ-鹅膏毒肽	903.5	85.8 ^a	10.0	70	4.95
			243.0	10.0	40	
4	羧基三羟基鬼笔毒肽	863.5	157.0 ^a	10.0	60	5.82
			85.8	10.0	75	

表 2（续）

编号	中文名称	母离子	子离子	锥孔电压 V	碰撞能量 eV	保留时间 min
5	羧基二羟基鬼笔毒肽	847.5	157.0 ^a	10.0	65	6.62
			85.8	10.0	70	
6	二羟基鬼笔毒肽	789.5	157.0 ^a	10.0	60	7.65
			85.8	10.0	75	
^a 定量离子。						

注 1：方法提供的质谱条件仅供参考,当采用不同质谱仪器时,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。

注 2：为提高检测灵敏度,可根据保留时间分段监测各化合物。

5.4 定性测定

按照高效液相色谱-串联质谱条件测定试样待测液(5.2.2)和系列混合标准工作溶液(3.4.3),当试样中检出与 6 种化合物中某标准品色谱峰保留时间一致的色谱峰(变化范围在±2.5%之内),并且相对离子丰度不超过表 3 规定的允许偏差范围,可以确定试样中检出相应化合物。

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/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

5.5 定量测定

5.5.1 标准曲线的制作

将系列混合标准工作溶液(3.4.3)分别按仪器参考条件(5.3)进行测定,得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作溶液的质量浓度为横坐标,以定量离子的色谱峰的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内,若超出线性范围则应对水相待净化液(5.2.1)用水按比例稀释后按 5.2.2 步骤净化重新检测。

标准品总离子流(TIC)图及多反应监测(MRM)色谱图参见附录 B。

5.5.2 试样溶液的测定

将试样溶液(5.2.2)按仪器参考条件(5.3)进行测定,得到试样溶液中对应组分的色谱峰面积。根据标准曲线得到试样溶液中待测组分的浓度。

5.6 空白试验

除不加试样外,均按试样同法处理。应确认不含有干扰待测组分的物质。

6 结果计算

试样中各待测物的含量(以干样品计)按式(1)进行计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X ——试样中各待测物的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$)；
 - ρ ——从标准工作曲线中得到的被测组分溶液质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL)；
 - V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL)；
 - m ——最终样液所代表的试样量,单位为克(g)。
- 计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留两位有效数字。

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 15%。

8 其他

当称样量为 0.4 g 时,本方法中 6 种蘑菇毒素的检出限均为 10 $\mu\text{g/kg}$,定量限均为 30 $\mu\text{g/kg}$ 。

附 录 A
(资料性)
标准品信息

标准品中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量见表 A.1。

表 A.1 标准品中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

序号	化合物名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	α -鹅膏毒肽	α -Amanitin	23109-05-9	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₄ S	919.0
2	β -鹅膏毒肽	β -Amanitin	21150-22-1	C ₃₉ H ₅₃ N ₉ O ₁₅ S	920.0
3	γ -鹅膏毒肽	γ -Amanitin	21150-23-2	C ₃₉ H ₅₄ N ₁₀ O ₁₃ S	903.0
4	羧基三羟基鬼笔毒肽	Phallisacin	58286-46-7	C ₃₇ H ₅₀ N ₈ O ₁₄ S	862.9
5	羧基二羟基鬼笔毒肽	Phallacidin	26645-35-2	C ₃₇ H ₅₀ N ₈ O ₁₃ S	846.9
6	二羟基鬼笔毒肽	Phalloidin	17466-45-4	C ₃₅ H ₄₈ N ₈ O ₁₁ S	788.9

附录 B
(资料性)

标准品总离子流(TIC)色谱图及多反应监测(MRM)色谱图

6 种鹅膏肽类毒素的总离子流(TIC)色谱图见图 B.1。

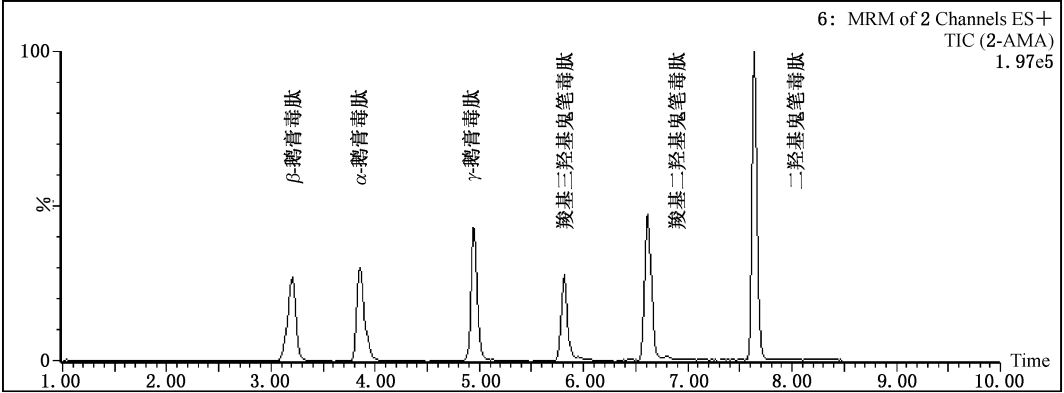


图 B.1 6 种鹅膏肽类毒素的总离子流(TIC)色谱图

6 种鹅膏肽类毒素的多反应监测(MRM)色谱图见图 B.2。

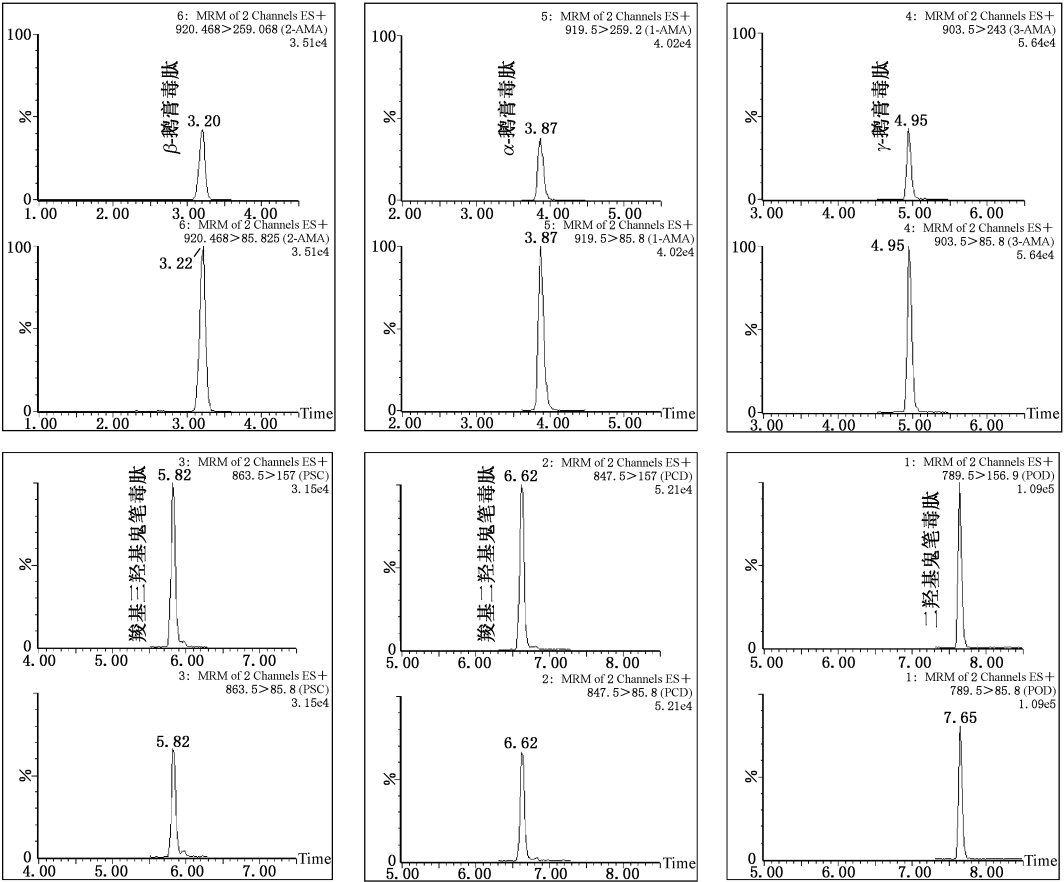


图 B.2 6 种鹅膏肽类毒素的多反应监测(MRM)色谱图

本方法负责起草单位：吉林省食品检验所。

本方法验证单位：湖北省食品质量与安全监督检验研究院、陕西省食品药品监督管理局检验研究院、农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心（长春）、中国肉类食品综合研究中心、中国检验检疫科学研究院、辽宁省食品检验检测院。

本方法主要起草人：郎乐、华蕾、王庆峰、史延通、包懿、刘斌、石金娥、吕卓。