

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4675.10—2016

出口葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of ochratoxin A in wine for export—LC-MS/MS method

2016-12-12 发布

2017-07-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

SN/T 4675《出口葡萄酒品质分析方法》共分为 30 个部分：

- SN/T 4675.1 出口葡萄酒中甘油的测定 酶法；
- SN/T 4675.2 出口葡萄酒中 2,3-丁二醇的测定 气相色谱法；
- SN/T 4675.3 出口葡萄酒中乙醇稳定碳同位素比值的测定；
- SN/T 4675.4 出口葡萄酒中乳酸的测定 酶法；
- SN/T 4675.5 出口葡萄酒中有机酸的测定 离子色谱法；
- SN/T 4675.6 出口葡萄酒中葡萄糖、果糖和蔗糖的测定；
- SN/T 4675.7 出口葡萄酒中乙醛的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.8 出口葡萄酒中 5-羟甲基糠醛的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.9 出口葡萄酒中二甘醇的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.10 出口葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.11 出口葡萄酒中 7 种花色苷的测定 超高效液相色谱法；
- SN/T 4675.12 出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.13 出口葡萄酒中 2,4,6-三氯苯甲醚残留量的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.14 出口葡萄酒中纳他霉素的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.15 出口葡萄酒中水杨酸、脱氢乙酸和对氯苯甲酸的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.16 出口葡萄酒中富马酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.17 出口葡萄酒中丁基锡含量的测定 气相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.18 出口葡萄酒中二硫代氨基甲酸酯残留量的测定 顶空气相色谱法；
- SN/T 4675.19 出口葡萄酒中钠、镁、钾、钙、铬、锰、铁、铜、锌、砷、硒、银、镉、铅的测定；
- SN/T 4675.20 出口葡萄酒中稀土元素的测定 电感耦合等离子体质谱法；
- SN/T 4675.21 出口葡萄酒中可溶性无机盐的测定 离子色谱法；
- SN/T 4675.22 出口葡萄酒中总二氧化硫的测定 比色法；
- SN/T 4675.23 出口葡萄酒及葡萄汁中氨氮的测定 连续流动分析仪法；
- SN/T 4675.24 出口葡萄酒福林-肖卡指数的测定 分光光度计法；
- SN/T 4675.25 出口葡萄酒颜色的测定 CIE 1976(L* a* b*) 色空间法；
- SN/T 4675.26 出口葡萄酒浊度的测定 散射光法；
- SN/T 4675.27 出口葡萄酒碱性灰分的测定；
- SN/T 4675.28 出口葡萄酒细菌、霉菌及酵母的计数；
- SN/T 4675.29 出口葡萄酒中酒香酵母检验 实时荧光 PCR 法；
- SN/T 4675.30 出口葡萄酒中拜氏接合酵母检验 实时荧光 PCR 法。

本部分为 SN/T 4675 的第 10 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局、中华人民共和国广东出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：江侃晨、陈章庭、刘晓茂、杨振宁、倪昕路、李响、宋青、秦宇雯、陈婷、王诚、郭德华、刘青、李志勇。

出口葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

SN/T 4675 的本部分规定了葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的液相色谱-质谱/质谱检测方法。

本部分适用于葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 方法提要

样品采用缓冲溶液稀释后,经氢氧化钠溶液调节试样至中性,再经免疫亲和柱净化,最后由液相色谱-串联质谱仪检测,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,所有试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 乙酸:色谱纯。

4.4 碳酸氢钠。

4.5 氯化钠。

4.6 氢氧化钠。

4.7 乙酸铵。

4.8 乙腈溶液(50%):移取乙腈(4.2)100 mL,用水稀释至 200 mL。

4.9 乙酸溶液(0.1%):移取乙酸(4.3)1.0 mL,用水稀释至 1 L。

4.10 缓冲溶液:准确称取 10 g 碳酸氢钠(4.4)和 75 g 氯化钠(4.5),用水溶解并定容至 500 mL。

4.11 氢氧化钠溶液(2%):准确称取 20 g 氢氧化钠(4.6),用水溶解并定容至 1 L。

4.12 乙酸铵溶液(0.2 mol/L):称取 15.4 g 乙酸铵固体(4.7),用水溶解并定容至 1 L。

4.13 乙酸甲醇溶液(2%):移取乙酸(4.3)2.0 mL,用甲醇(4.1)稀释至 100 mL。

4.14 标准物质:赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA CAS 编号:303-47-9):10.01 mg/L,存储条件及有效期参照标准物质证书。

4.15 标准中间液(200 μ g/L):移取适量体积的赭曲霉毒素 A(4.14)于 10 mL 容量瓶中,用乙腈(4.8)定容至刻度线。该溶液在 4 $^{\circ}$ C 下避光保存,有效期一个月。

4.16 标准工作溶液:分别准确移取适量标准中间液(4.15)于 10 mL 容量瓶中,并用乙腈溶液(4.9)稀

释并定容至刻度。标准工作系列浓度分别为 1 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、15 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 。标准工作溶液现配现用。

4.17 免疫亲和柱:填料体积(0.3 mL)。

4.18 滤膜:0.22 μm ,有机系。

5 仪器和设备

5.1 超高效液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源(ESI)。

5.2 天平:感量 0.1 g、0.1 mg。

5.3 pH 计。

5.4 漩涡振荡器。

5.5 离心机:8 000 r/min。

5.6 固相萃取装置。

5.7 固相萃取柱空柱管接头。

5.8 固相萃取柱空柱管(15 mL)。

5.9 氮吹仪。

5.10 超声波清洗器。

5.11 水平振荡器。

6 分析步骤

6.1 试样制备

起葡萄酒需预先脱气。将 100 mL 试样倒入带排气塞的瓶中,在室温下使用水平振荡器或超声波水浴脱气,直至无气体逸出。

6.2 提取

准确吸取 10 mL 试样于洁净的 50 mL 带刻度塑料离心管中,加入 2.5 mL 缓冲溶液(4.10)于漩涡混合器(5.4)上混匀,通过氢氧化钠溶液(4.11)调节试样 pH 至 6.9~7.1,待用。如有沉淀则用离心机以 8 000 r/min 离心 5 min。

6.3 净化

试样(6.1)和免疫亲和柱(4.17)置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 以上房间,放置室温。

将免疫亲和层析柱(4.17)通过接头(5.7)连接于空柱管(5.8)之下,再将免疫亲和层析柱(4.17)置于固相萃取装置(5.6)上,转移提取后的试样(6.2)到空柱管(5.8)中,使试样(6.2)以不超过 2 mL/min 的流速缓慢通过免疫亲和层析柱,待试样完全流尽后,用 20 mL 乙酸铵溶液(4.12)分两次淋洗免疫亲和柱,待淋洗液流尽后,将柱内残留液体吹干,弃去全部流出液。用乙酸甲醇溶液(4.13)1 mL 洗脱,收集洗脱液于玻璃刻度试管中,重复洗脱操作一次,如洗脱液体积超过 2 mL,可氮吹后用乙酸甲醇溶液(4.13)定容至 2.0 mL,过 0.22 μm 滤膜,供高效液相色谱测定。

6.4 测定条件

6.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: C_{18} 色谱柱:2.1 mm \times 50 mm,粒径 1.9 μm ,或相当者;
- b) 流动相:A,甲醇;B,0.1%乙酸水溶液(4.8);洗脱程序见表 1;

表 1 液相色谱的梯度洗脱程序

时间/min	A, 甲醇/%	B, 0.1% 乙酸水溶液/%
0	20	80
1.00	20	80
2.00	95	5
6.00	95	5
6.50	20	80
7.00	20	80

- c) 流速:200 $\mu\text{L}/\text{min}$;
- d) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 进样量:5 μL 。

6.4.2 质谱条件

- a) 离子化模式:电喷雾电离(ESI-)负离子模式;
- b) 质谱扫描方式:多反应监测(MRM);
- c) 其他参考质谱条件参见附录 A。

6.5 液相色谱-质谱/质谱测定

6.5.1 定性测试

被测组分选择 1 个母离子,2 个子离子,在相同的试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内;且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	$>50\%$	$>20\% \sim 50\%$	$>10\% \sim 20\%$	$\leq 10\%$
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

6.5.2 定量测试

依次测定标准系列工作液,绘制峰面积对标准溶液浓度的标准工作曲线,用标准曲线对样品进行定量,样品溶液中赭曲霉毒素 A 的响应值均应在仪器测定的线性范围内,超过线性范围的稀释后再进样。在上述色谱条件和质谱条件下,赭曲霉毒素 A 的参考保留时间及标准品多反应监测(MRM)色谱图参见图 B.1。

6.6 空白试验

除不加试样外,均按上述操作步骤进行。

7 结果的计算和表述

7.1 采用外标法定量,按式(1)计算被测物的含量:

SN/T 4675.10—2016

$$X = \frac{c \times V_1}{V_2}$$

.....(1)

- 式中：
- X —— 试样中被测组分残留量,单位为微克每升(μg/L)；
 - c —— 从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度,单位为微克每升(μg/L)；
 - V₁ —— 样液最终定容体积,单位为毫升(mL)；
 - V₂ —— 最终样液所代表的试样体积,单位为毫升(mL)。

7.2 结果需扣除空白值。

8 定量限和回收率

8.1 定量限

本方法中赭曲霉毒素 A 的定量限为 0.20 μg/L。

8.2 回收率与精密度

不同基质中赭曲霉毒素 A 在不同添加水平下的回收率与精密度试验数据见表 3。

表 3 不同基质在不同添加水平下的回收率与精密度试验数据表

样品名称	添加水平/(μg/L)	回收率范围/%	精密度/%
干红葡萄酒	0.20	87.4~99.3	5.30
	1.0	89.7~100.7	3.80
	2.0	87.9~93.1	4.20
	4.0	86.7~94.4	3.22
半甜桃红葡萄酒	0.20	87.8~103.4	5.60
	1.0	86.3~95.3	3.60
	2.0	81.3~101.6	7.80
	4.0	90.4~97.3	3.27
甜白葡萄酒	0.20	103.8~117.4	4.60
	1.0	88.7~102.1	5.10
	2.0	90.7~111.7	7.90
	4.0	93.7~95.8	0.95

附录 A
(资料性附录)
质谱参考参数¹⁾

质谱参考参数:

- a) ESI 负离子模式;多反应监测(MRM);
- b) 电喷雾电压:−3 500 V;
- c) 离子源温度:450 ℃;
- d) 雾化气压力:40 Arb;
- e) 辅助气压力:15 Arb;
- f) 碰撞气压力:1.5 Arb;
- g) 监测离子对、套管透镜、碰撞电压见表 A.1。

表 A.1 赭曲霉毒素 A 保留时间、定性定量离子对及套管透镜、碰撞能量

名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	套管透镜	碰撞能量 V	
赭曲霉毒素 A	4.13	402>211	402>358	111	−38	−21
					−28	

1) 非商业性声明:附录 A 所列参考质谱条件是在 Thermo Scientific 的 TSQ QuantumUltra 型液质联用仪上完成的,此处列出试验用仪器型号仅为提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的仪器。

SN/T 4675.10—2016

附录 B
(资料性附录)

赭曲霉毒素 A 标准物质的多反应监测(MRM)色谱图

赭曲霉毒素 A 标准物质的多反应监测(MRM)色谱图见图 B.1~图 B.3。

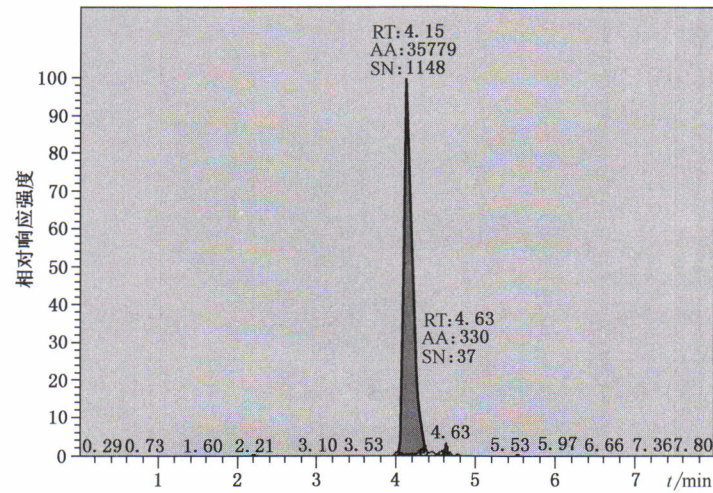


图 B.1 $m/z\ 402 > m/z\ 211$ 色谱图(1 $\mu\text{g/L}$)

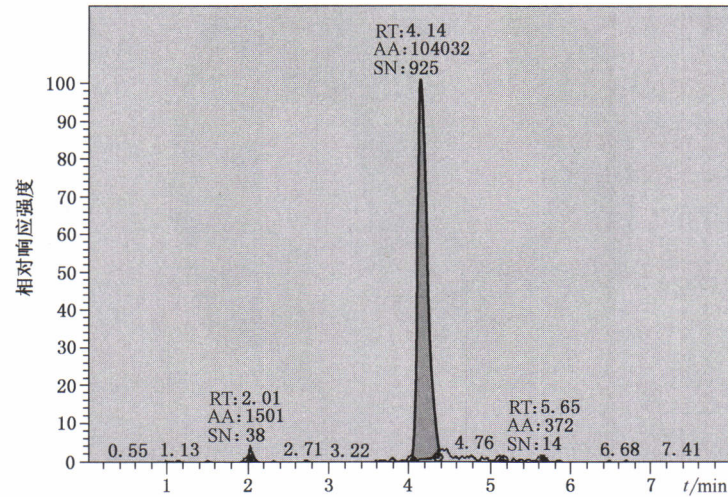


图 B.2 $m/z\ 402 > m/z\ 358$ 色谱图(1 $\mu\text{g/L}$)

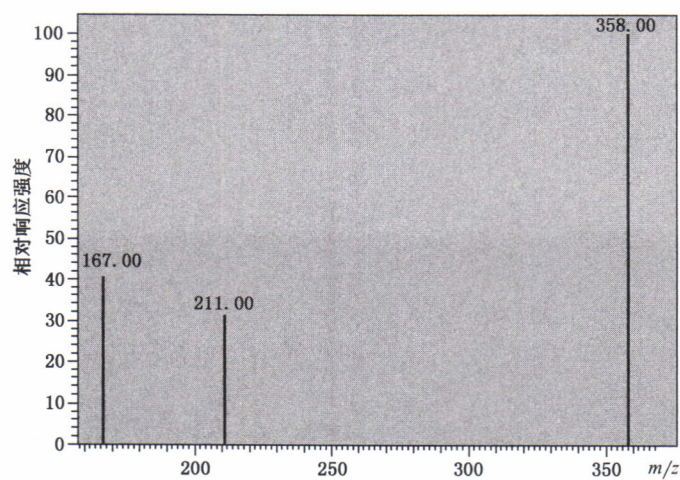


图 B.3 定性离子相对丰度图

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定
液相色谱-质谱/质谱法
SN/T 4675.10—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 18 千字
2017 年 12 月第一版 2017 年 12 月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-32360 定价 16.00 元



SN/T 4675.10-2016