

中华人民共和国国家标准

农业农村部公告第 323 号 — 28 — 2020

转基因生物及其产品食用安全检测 抗营养因子 马铃薯中龙葵碱检测方法 液相色谱质谱法

Food safety detection of genetically modified organisms and derived products—
Determination of anti-nutrient solanine in potato—
Liquid chromatography-mass spectrometry

2020-08-04 发布

2020-11-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业农村部科技发展中心、中国农业大学。

本标准主要起草人：黄昆仑、张秀杰、马丽艳、李夏莹、张春娇、贺晓云、罗云波。

转基因生物及其产品食用安全检测

抗营养因子 马铃薯中龙葵碱检测方法

液相色谱质谱法

1 范围

本标准规定了马铃薯及其制品中 α -茄碱和 α -卡茄碱液相色谱-串联质谱检测方法。
本标准适用于转基因及非转基因马铃薯及其制品中 α -茄碱和 α -卡茄碱含量的测定。

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 原理

马铃薯及其制品中的 α -茄碱和 α -卡茄碱,用乙酸水溶液匀浆提取,提取液经稀释或固相萃取柱净化后,用高效液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,仅使用分析纯试剂;水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 试剂

- 4.1.1 甲醇(CH_3OH ,CAS 号:67-56-1);色谱纯。
- 4.1.2 乙腈(CH_3CN ,CAS 号:75-05-8);色谱纯。
- 4.1.3 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$,CAS 号:64-17-5);色谱纯。
- 4.1.4 甲酸(CH_2O_2 ,CAS 号:64-18-6);色谱纯。
- 4.1.5 冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$,CAS 号:64-19-7);分析纯。
- 4.1.6 甲酸铵(CH_5NO_2 ,CAS 号:540-69-2);分析纯。

4.2 溶液配制

- 4.2.1 乙醇溶液(90%乙醇溶液):量取 100 mL 水,转入 1 000 mL 容量瓶中,用乙醇定容,混匀后备用。
- 4.2.2 提取溶剂(10%乙酸水溶液):量取 100 mL 冰乙酸,转入 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,混匀后备用。
- 4.2.3 淋洗液(15%甲醇溶液):量取 150 mL 甲醇,转入 1 000 mL 容量瓶中,用水定容,混匀后备用。
- 4.2.4 洗脱液:吸取 10 mL 甲酸,转入 1 000 mL 容量瓶中,用 90%乙醇溶液(4.2.1)定容,混匀后备用。
- 4.2.5 流动相 A:称取 0.315 g 甲酸铵,用少量水溶解后转入 1 000 mL 容量瓶中,加入 1 mL 甲酸,用水定容,混匀后过 0.22 μm 滤膜备用。

4.3 标准品

- 4.3.1 α -茄碱($\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{NO}_{15}$,CAS 号:20562-02-1);纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.3.2 α -卡茄碱($\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{NO}_{14}$,CAS 号:20562-03-2);纯度 $\geq 99\%$ 。

4.4 标准溶液配制

- 4.4.1 α -茄碱标准储备液(1.00 mg/mL):准确称取 α -茄碱标准品 10.0 mg,加甲醇溶解并定容至 10 mL,在 -18°C 以下密封保存,有效期 1 年。
- 4.4.2 α -卡茄碱标准储备液(1.00 mg/mL):准确称取 α -卡茄碱标准品 10.0 mg,加甲醇溶解并定容至

10 mL,在-18℃以下密封保存,有效期 1 年。

4.4.3 α -茄碱和 α -卡茄碱混合标准中间液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确吸取 1.00 mg/mL α -茄碱标准储备液、 α -卡茄碱标准储备液各 1.00 mL 于同一容量瓶中,加甲醇定容至 10 mL,配成混合标准中间液。在-18℃以下密封保存,有效期 6 个月。

4.5 材料

4.5.1 固相萃取柱: C_{18} 柱(500 mg/6 mL)或等效柱。

4.5.2 有机相微孔滤膜:孔径 0.22 μm 。

4.5.3 水相微孔滤膜:孔径 0.22 μm 。

5 主要仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

5.2 电子天平:感量 0.001 g 和 0.000 1 g。

5.3 高速匀浆机: $\geq 12\,000\text{ r/min}$ 。

5.4 离心机: $\geq 10\,000\text{ r/min}$ 。

5.5 组织捣碎机。

5.6 样品粉碎机。

5.7 旋转蒸发仪:带有温度控制。

5.8 固相萃取装置。

5.9 抽滤装置。

5.10 布氏漏斗。

6 试样制备

6.1 试样制备

新鲜的马铃薯样品沿纵轴剖开成两半,截成四等份,每份取出部分样品将其切碎,充分混匀,用四分法取样或直接放入组织捣碎机中捣碎成匀浆,装入洁净的容器内,密封并标明标记。马铃薯干样粉碎后过 40 目样品筛,混匀后装入洁净的容器内,密封并标明标记。

6.2 试样保存

试样应密封冷藏保存,如果不进行立即检测,需-18℃以下冷冻保存。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 马铃薯鲜样

称取 5 g 试样(精确至 0.001 g)于 200 mL 高脚烧杯中,加入 50 mL 提取溶剂(见 4.2.2),匀浆提取 3 min,将提取液抽滤,用 20 mL 提取溶剂(见 4.2.2)洗涤烧杯和布氏漏斗,提取液转移至 100 mL 容量瓶中,定容,混匀。吸取 2 mL 提取液于 10 mL 容量瓶中,用初始流动相定容至 10 mL,混匀,过 0.22 μm 水相微孔滤膜,待测定。

7.1.2 马铃薯粉

称取 1 g 试样(精确至 0.001 g)于 200 mL 高脚烧杯中,先加入 10 mL 提取溶剂(见 4.2.2)浸泡 30 min,再加入 40 mL 提取溶剂(见 4.2.2)匀浆提取 3 min,转移至 100 mL 容量瓶中,用 20 mL 提取溶剂(见 4.2.2)多次洗涤烧杯,合并提取液于容量瓶中,定容,混匀。量取 30 mL 提取液于 50 mL 离心管中,10 000 r/min 离心 5 min,上清液待净化。

7.2 净化

将固相萃取柱连接到固相萃取装置中,先用 5 mL 甲醇、5 mL 10%乙酸水溶液预活化,准确吸取上清

液 5 mL 加到活化后的固相萃取柱中,用 5 mL 淋洗液淋洗(见 4.2.3),抽干,用 5 mL 洗脱液(见 4.2.4)洗脱。吸取 1 mL 洗脱液于 10 mL 容量瓶中,用初始流动相定容,混匀,过 0.22 μm 有机微孔滤膜,待测定。

7.3 测定

7.3.1 高效液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} , 100 mm $\times$ 3.0 mm(内径),2.7 μm ,或相当者;
- 色谱柱温度:30 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样量:3 μL ;
- 流速:0.30 mL/min;
- 流动相及梯度洗脱条件,流动相 A 见 4.2.5,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间, min	流动相 A, %	流动相 B, %
0.0	72	28
2.0	72	28
5.0	65	35
7.0	65	35
7.1	72	28
18.0	72	28

7.3.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾离子源(ESI);
- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应监测(MRM);
- 毛细管电源:3.5 kV;喷嘴电源:500 V;脱溶剂气体温度:350 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气体流量:10 L/min;鞘气温度:300 $^{\circ}\text{C}$;鞘气流速:11 L/min;
- 监测离子对: α -茄碱和 α -卡茄碱的质谱参考条件见表 2。

表 2 α -茄碱和 α -卡茄碱的质谱参考条件

化合物名称	保留时间 min	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞电压 V	碰撞能量 eV
α -茄碱	5.65	868.5	706.3	180	80
			398.1*	180	85
α -卡茄碱	5.99	852.1	706.5	180	70
			398.4*	180	95

* 为定量离子。

7.3.3 标准工作曲线

准确吸取一定体积的混合标准中间液,逐级稀释,配制成浓度为 0.010 $\mu\text{g/mL}$ 、0.025 $\mu\text{g/mL}$ 、0.050 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 和 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液。仪器最佳工作条件下,用系列标准工作液由低到高浓度依次进行检测,以标准工作液浓度为横坐标、以定量离子的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线(参见附录 A)。

7.3.4 定性测定

在相同试验条件下,试样溶液中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在 2.5%之内,而且对同一化合物,样品中目标化合物的 2 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 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

单位为百分号

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

7.3.5 试样溶液的测定

取试样溶液和标准工作液上机分析,得到 α-茄碱和 α-卡茄碱色谱峰面积,由标准曲线得到试样溶液中 α-茄碱和 α-卡茄碱的浓度。试样溶液中待测物的响应值应在定量测定线性范围内。超过线性范围时,应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行分析。

8 结果计算

试样中 α-茄碱和 α-卡茄碱的含量按式(1)计算。

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \quad \text{..... (1)}$$

式中:

- X —— 样品中 α-茄碱或 α-卡茄碱的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
 c —— 待测试样液中 α-茄碱或 α-卡茄碱的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V —— 试样提取液的定容体积,单位为毫升(mL);
 m —— 样品的质量,单位为克(g);
 f —— 稀释倍数;
1 000 —— 单位换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留小数点后 2 位。

9 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

10 其他

本方法马铃薯鲜样中 α-茄碱的检出限为 0.007 mg/kg,定量限为 0.02 mg/kg; α-卡茄碱的检出限为 0.004 mg/kg,定量限为 0.01 mg/kg; 马铃薯粉中 α-茄碱的检出限为 0.09 mg/kg,定量限为 0.25 mg/kg; α-卡茄碱的检出限为 0.05 mg/kg,定量限为 0.14 mg/kg。

附 录 A
(资料性附录)
标准物质多反应监测(MRM)色谱图

标准物质多反应监测(MRM)色谱图见图 A. 1。

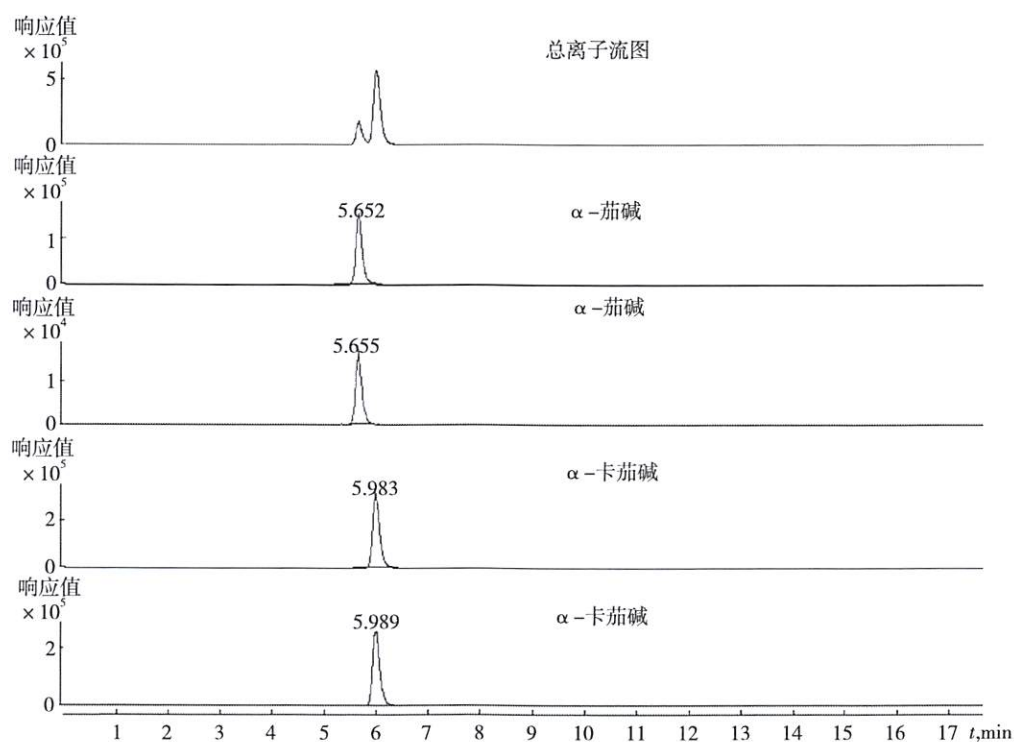


图 A. 1 0.10 µg/mL α-茄碱和 α-茄碱标准物质多反应监测(MRM)色谱图

中华人民共和国

国家标准

转基因生物及其产品食用安全检测 抗营养因子

马铃薯中龙葵碱检测方法 液相色谱质谱法

农业农村部公告第323号—28—2020

* * *

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区麦子店街18号楼)

(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字

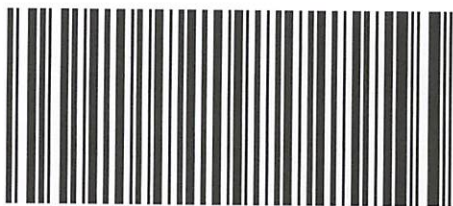
2020年10月第1版 2020年10月北京第1次印刷

书号: 16109·8251

定价: 18.00 元

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 59194261



农业农村部公告第323号—28—2020