

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS XXXX—XXXX

榴莲中碱性嫩黄 O 的测定 液相色谱-串联 质谱法

Determination of Auramine O in durian using liquid chromatography - 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。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广西标准化协会 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

 5.1 试剂 1

 5.2 标准品 1

 5.3 标准溶液配制 1

 5.4 材料 2

6 仪器和设备 2

7 分析步骤 2

 7.1 试样制备和保存 2

 7.2 样品前处理 2

 7.3 仪器参考条件 3

 7.4 标准工作曲线绘制 3

 7.5 定性确认 3

 7.6 定量测定 4

 7.7 空白试验 4

 7.8 平行试验 4

8 结果计算 4

9 回收率与精密度 4

前 言

本文件参照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。

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。

本文件由中国检验认证集团广西有限公司提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：中国检验认证集团广西有限公司、中国检验认证集团越南有限公司、南宁海关技术中心、广西中检检测技术服务有限公司、广西大学轻工与食品工程学院、广西环保产业发展研究院有限公司、东兴海关综合技术服务中心、防城港检验检测中心、钦州市检验检测中心、凭祥海关综合技术服务中心、广西标准化协会。

本文件主要起草人：兰淑惠、金其扬、刘欢群、吴雪英、任鹏炜、段保屹、谭灵、黄素萍、韦鑫、罗振静、陈军妃、王爱、白永庆、司露露、黄崇杏、覃浩杰、黄嵩。

榴莲中碱性嫩黄 O 的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本方法描述了液相色谱-质谱法测定榴莲皮和榴莲肉中碱性嫩黄O含量的方法。
本方法适用于榴莲皮和榴莲肉中碱性嫩黄的测定，检出限为0.5 μg/kg。

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 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中的碱性嫩黄经0.1%甲酸乙腈提取、离心，榴莲肉上清液经分散固相萃取净化后上高效液相色谱-串联质谱仪检测，榴莲皮的提取液直接上高效液相色谱-串联质谱仪检测，外标法定量。

5 试剂与材料

5.1 试剂

除另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

- 5.1.1 乙腈（HCN）：色谱纯。
- 5.1.2 乙酸铵（CH₃COONH₄）：色谱纯。
- 5.1.3 甲酸（HCOOH）：优级纯。
- 5.1.4 无水硫酸镁（MgSO₄）：分析纯。
- 5.1.5 十八烷基硅烷键合硅胶（C18）：40 μm~100 μm。
- 5.1.6 QuEChERS 净化粉末：每份含 C18（5.1.5）150 mg、MgSO₄（5.1.4）300 mg。
- 5.1.7 N-丙基乙二胺（PSA）：40 μm~100 μm。
- 5.1.8 5 mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.1%甲酸）：称取 0.385 g 乙酸铵（5.1.2），加入适量水溶解，再加入 1 mL 甲酸（5.1.3），用水定容至 1 000 mL。

5.2 标准品

碱性嫩黄O：（C₁₇H₂₂N₃Cl，CAS号：2465-27-2）：纯度≥90%，或具有标准物质证书的标准品。

5.3 标准溶液配制

- 5.3.1 标准品储备液（1 mg/mL）：准确称取标准品（5.2）10 mg（精准至 0.1 mg），用乙腈溶解定容至 10 mL，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的标准品储备液，0℃~4℃保存，有效期 3 个月。
- 5.3.2 标准中间液 I 的配制（100 μg/mL）：准确移取标准储备液（5.3.1）1 mL，置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（5.1.1）定容至刻度，定容并摇匀，配制成质量浓度为 100 μg/mL 的标准中间液，0℃~4℃保存，有效期 2 个月。
- 5.3.3 标准中间液 II 的配制（10 μg/mL）：准确移取标准储备液（5.3.2）1 mL，置于 10 mL 容量瓶中，

用乙腈（5.1.1）定容至刻度，混匀，0℃~4℃保存，有效期1个月。

5.3.4 标准中间液Ⅲ的配制（1 μg/mL）：准确移取标准储备液（5.3.3）1 mL，置于10 mL容量瓶中，用乙腈（5.1.1）定容至刻度，混匀，配制成质量浓度为1 μg/mL的标准中间液，0℃~4℃保存，有效期1周。

5.3.5 标准系列工作液的配制：吸取适量体积的标准中间液Ⅲ（5.3.4）用乙腈（5.1.1）稀释成浓度为0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL的标准工作溶液。

注：根据仪器的灵敏度及样品中目标物的实际含量适当调整标准系列溶液中目标物的质量浓度范围。

5.4 材料

5.4.1 聚丙烯离心管：15 mL，50 mL。

5.4.2 PTFE微孔滤膜：0.22 μm，疏水。

5.4.3 针筒注射器

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪，配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量分别为0.1 mg和1 mg。

6.3 组织研磨仪。

6.4 匀浆机。

6.5 离心机：转速≥4 000 r/min。

6.6 超声波发生器。

6.7 涡旋混合器。

7 分析步骤

7.1 试样制备和保存

7.1.1 将榴莲果肉与果皮分离后，分别制样。

7.1.2 榴莲果皮的制样：取代表性榴莲果皮样品，切去白色软质内果皮，留下刺状外壳和小于5 mm厚度的硬质皮，将其切成小块，用组织研磨机均质至样品完全均匀粉碎，放入聚乙烯瓶或袋中，置于-18℃冰箱中保存，待检。

7.1.3 榴莲果肉的制样：取代表性榴莲果肉，去核，用均浆机均匀均浆后，放入聚乙烯瓶或袋中，置于-18℃冰箱中保存，待检。

注：重点关注防止样品之间的交叉污染，防止果肉与果皮之间相互污染。在制样过程中，样与样之间要勤换手套，使用70℃以上的水清洗制样工具，必要时可对制样仪器进行空白测试。

7.2 样品前处理

7.2.1 榴莲果皮

7.2.1.1 准确称取2 g榴莲果皮（7.1.2）（精确至0.001 g），置于50 mL聚丙烯离心管（5.4.1）中，准确加入10 mL的0.1%甲酸乙腈（5.1.1），再加入2 g无水硫酸镁（5.1.4），涡旋混匀5 min，超声10 min，4 000 r/min离心5 min。

7.2.1.2 取上清液过PTFE膜（5.4.2），可根据实际浓度以含0.1%甲酸的乙腈（3.1.8）适当稀释至线性范围内，供液相色谱-质谱/质谱仪测定。

7.2.2 榴莲果肉

7.2.2.1 准确称取2 g榴莲果肉（7.1.3）（精确至0.001 g），置于50 mL聚丙烯离心管（5.4.1）中，准确加入10 mL的0.1%甲酸乙腈（5.1.1），再加入2 g无水硫酸镁（5.1.4），涡旋混匀5 min，超声10 min，4 000 r/min离心5 min。

7.2.2.2 取榴莲肉 5 mL 上清液，置于含有 QuEChERS 净化粉末（5.1.6）的 15 mL 聚丙烯离心管（5.4.1）中，涡旋振荡 5 min，4000 r/min 离心 5 min，取上清液过 PTFE 膜（5.4.2），可根据实际浓度以含 0.1% 甲酸的乙腈（5.1.1）适当稀释至线性范围内，供液相色谱-质谱/质谱仪测定

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件为：

- 色谱柱：Shim-pack GISS C18，2.1×100 mm，1.9 μm，或性能相当者；
- 柱温：40 ℃；
- 进样量：2 μL；
- 流速：0.3 mL/min；
- 流动相：A 相为 0.1% 甲酸水溶液（含 5 mmol/L 乙酸铵），B 相为乙腈，梯度洗脱详见表 1。

表 1 流动相组成及梯度洗脱程序

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	80	20
5.0	10	90
5.1	80	20
7.0	80	20

7.3.2 质谱参考条件为：

- 离子源：ESI；
- 扫描模式：MRM；
- 雾化气流量：3 L/min；
- 加热气流量：10 L/min；
- 接口温度：300 ℃；
- 脱溶剂温度：526 ℃；
- DL 温度：220 ℃；
- 加热块温度：400 ℃；
- 干燥气流量：10 L/min；
- 定性、定量离子对和质谱分析参数见表 2。

表 2 化合物的定性、定量离子对和质谱分析参数

化合物名称	电离方式	母离子（前体离子）(m/z)	子离子（产物离子）(m/z)	CE 电压
碱性嫩黄	ESI ⁺	267.70	147.15 ^a	-28.0
			252.25	-32.0
^a 为定量离子。				

7.4 标准工作曲线绘制

将标准系列工作液（5.3.5）分别注入液相色谱-串联质谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中目标化合物的浓度为横坐标，以定量离子色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.5 定性确认

在相同试验条件下，试样中被测组分的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内；且试样中被测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，偏差不超过表3规定的范围，则可判定为试样中存在对应的化合物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对丰度（基峰）	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.6 定量测定

将标准工作溶液（5.3.5）和试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中，用标准工作曲线（7.4）计算试样溶液中被测组分的浓度。被测物的响应值应在仪器检测的线性范围内，如果含量超过标准曲线范围，应当稀释到标准曲线范围内进行检测。

7.7 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

7.8 平行试验

平行做2份试验。

8 结果计算

试样中被测组分的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(\rho - \rho_0) \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X ——被测组分的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；
- ρ ——从标准工作曲线得到的目标化合物的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- ρ_0 ——从标准工作曲线得到空白试验的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；
- V ——最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；
- m ——最终定容体积试样溶液所代表试样的质量，单位为克（ g ）；
- f ——稀释倍数。

注：榴莲皮和榴莲肉的结果分别出具，结果按GB/T 8170的规定保留3位有效数字。

9 回收率与精密度

本实验方法对榴莲果皮、榴莲果肉进行添加回收率试验，不同基质中不同添加水平下的平均回收率范围为68.4%~109%，精密度范围为1.93%~8.21%。