



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

农产品中生氰糖苷测定- 液相色谱串联质谱法

Determination of cyanogenic glycosides in agricultural products Liquid
chromatography with tandem-mass spectrometry method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2022-02-25)

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

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

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。

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。

本文件由中国标准化研究院提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

农产品中生氰糖苷测定— 液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了农产品中生氰糖苷的测定方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样制备、分析步骤、结果计算及精密度等内容。

本标准适用于木薯、亚麻籽、苦杏仁、竹笋、高粱等含氰化物农产品中8种生氰糖苷类化合物含量的测定。

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

试样中生氰糖苷，经80%甲醇水溶液提取，固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱测定，外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用的试剂，除另有说明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.1 甲醇（CH₃OH，67-56-1）：色谱纯。
- 5.2 乙腈（CH₃CN，75-05-8）：色谱纯。
- 5.3 甲酸（HCOOH，64-18-6）：色谱纯。
- 5.4 甲酸水溶液（0.1%）：准确吸取1.00 mL甲酸（4.3），用水定容至1 L。
- 5.5 甲醇水溶液（80 + 20）：量取80 mL甲醇（4.1），加20 mL水，混匀。
- 5.6 甲醇水溶液（10 + 90）：量取10 mL甲醇（4.1），加90 mL水，混匀。
- 5.7 甲醇乙腈溶液（30 + 70）：量取30 mL甲醇（4.1），加70 mL乙腈，混匀。
- 5.8 8种生氰糖苷标准品：纯度 ≥ 95%，见附录A。
- 5.9 固相萃取柱：N-乙烯吡咯烷酮和二乙烯基苯共聚物填料柱（200 mg/6 mL），或其它等效柱。使用前用2 mL甲醇和2 mL水活化。

5.10 微孔滤膜：13 mm × 0.22 μm。

5.11 标准储备溶液（100 mg/L）：准确称取生氰糖苷标准品 1 mg（精确至 0.01 mg），用甲醇（4.1）溶解，转移至 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（4.1）定容，配成浓度为 100 mg/L 标准储备溶液，于-18℃保存，保存期 2 个月。

5.12 标准中间工作溶液（1 mg/L）：分别移取 100 μL 的 8 种生氰糖苷标准储备溶液（4.11.1）于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（4.1）定容，得 1 mg/L 标准中间工作溶液，现配现用。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

6.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 分析研磨机。

6.4 涡旋振荡器。

6.5 离心机：带有 15 mL 转子，转速 ≥ 5000 r/min。

6.6 真空过柱装置。

6.7 超声波清洗器：功率 ≥ 500 W。

6.8 氮吹仪。

7 试样制备

新鲜样品用水洗净表面附着的杂物，用吸水纸水分擦干，取可食部，切碎，放入研磨杯中，加入液氮冷冻后用研磨机粉碎至颗粒均匀；固体干样品取可食部，粉碎后过 0.20 mm 筛。样品制备后连续完成 8.1 ~ 8.2 的全部过程。

8 分析步骤

8.1 提取

称取 1 g 试样（精确到 0.1 mg）于 15 mL 离心管中，加入 3 mL 甲醇水溶液（4.5），涡旋振荡 15 s，超声提取 15 min（500 W），立即于 4200 r/min 离心 10 min，取全部上清液；往残渣中再次加入 3 mL 甲醇水溶液，按上述条件提取、离心，合并两次提取液于 10 mL 容量瓶中，加水至刻度线，混匀，待净化。

8.2 净化

将活化好的固相萃取柱（4.9）连接到真空过柱装置（5.6），将 7.1 中制备的粗提液转移至萃取柱中，待样液全部流过柱子后，弃去流出液。用 2 mL 水淋洗柱子并彻底抽干，弃去淋洗液。用 3 mL 甲醇乙腈溶液（4.7）洗脱柱子，分次洗脱，每次 1 mL，流速 1 mL/min，收集全部洗脱液。洗脱液氮气吹干（40℃）后，用 1 mL 甲醇水溶液（4.6）复溶。过 0.22 μm 滤膜，供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 测定

8.3.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱：UPLC C₁₈ (50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱，或同等性能的色谱柱；
- b) 流动相及洗脱条件见表 1；
- c) 流速：0.2 mL/min；
- d) 柱温：30℃；
- e) 进样量：10 μL。

表1 流动相及梯度洗脱参考条件

时间/min	流动相A (0.1% 甲酸水溶液) /%	流动相B (乙腈) /%
0.0	98	2
0.5	98	2
3.0	93	7
7.5	60	40
8.0	10	90
10.0	10	90
13.0	98	2

8.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：正离子扫描模式；
- c) 干燥气温度：325℃；
- d) 干燥气流量：5 L/min；
- e) 鞘气温度：350℃；
- f) 鞘气流速：11 L/min；
- g) 雾化气压力：45 MPa；
- h) 毛细管电压：3500 V；
- i) 检测方式：多反应监测模式；
- j) 监测离子对、碰撞能量参见附录 B。

8.3.3 试样溶液的测定

用液相色谱-串联质谱联用仪测定样品和混合标准工作溶液。以色谱峰面积按外标法定量。在上述色谱条件下，8种生氰糖苷的多反应监测色谱图参见附录C。

8.3.4 定性确证

用液相色谱-串联质谱联用仪测定样品和混合标准工作溶液。在相同实验条件下，待测物在样品中的保留时间与在标准工作溶液中的保留时间偏差在± 2.5%以内，并且色谱图中各组分定性离子对的相

对丰度，与浓度接近的标准工作液中相应定性离子对的相对丰度相比，偏差不超过表2规定的范围，则可判断为样品中存在对应的待测物。

表2 定性测定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%

9 分析及结果计算

试样中生氰糖苷含量的测定结果按式（1）进行计算：

$$\omega = \frac{\rho \times v}{1000 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω —— 试样中生氰糖苷类化合物的含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）；

ρ u —— 由标准曲线求得试样溶液中生氰糖苷类化合物的浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g/L}$ ）；

u —— 样品溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m —— 试样质量，单位为克（ g ）；

f —— 稀释倍数。

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，结果保留小数点后两位。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立的测试结果的绝对差值不大于这两个测定值的算术平均值的20%。

11 其他

本方法木薯中亚麻苦苷、百脉根苷的检出限分别为5.0 $\mu\text{g/kg}$ 、1.0 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限分别为20.0 $\mu\text{g/kg}$ 、5.0 $\mu\text{g/kg}$ ，亚麻籽中 β -龙胆二糖丙酮氰醇和 β -龙胆二糖甲乙酮氰醇的检出限为5.0 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为20.0 $\mu\text{g/kg}$ ，竹笋中紫杉氰苷的检出限为5.0 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为20.0 $\mu\text{g/kg}$ ，高粱中蜀黍苷的检出限为2.5 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为10.0 $\mu\text{g/kg}$ ，苦杏仁中苦杏仁苷、黑野樱苷的检出限分别为2.0 $\mu\text{g/kg}$ 、25.0 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限分别为10.0 $\mu\text{g/kg}$ 、100.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

附录 A

(资料性)

8 种生氰糖苷中英文名称、CAS 号、分子式、分子量

8 种生氰糖苷中英文名称、CAS 号、分子式、分子量见表 A.1。

表 A.1 8 种生氰糖苷中英文名称、CAS 号、分子式、分子量

序号	中文名称	英文名称	CAS号	分子式	分子量
1	亚麻苦苷	Linamarin	554-35-8	$C_{10}H_{17}NO_6$	247.247
2	β -龙胆二糖丙酮氰醇	Linustatin	72229-40-4	$C_{16}H_{27}NO_{11}$	409.388
3	百脉根苷	Lotaustralin	534-67-8	$C_{11}H_{19}NO_6$	261.274
4	β -龙胆二糖甲乙酮氰醇	Neolinustatin	72229-42-6	$C_{17}H_{29}NO_{11}$	423.415
5	紫杉氰苷	Taxiphyllin	21401-21-8	$C_{14}H_{17}NO_7$	311.29
6	蜀黍苷	Dhurrin	499-20-7	$C_{14}H_{17}NO_7$	311.29
7	苦杏仁苷	Amygdalin	29883-15-6	$C_{20}H_{27}NO_{11}$	457.432
8	黑野樱苷	Prunasin	99-18-3	$C_{14}H_{17}NO_6$	295.291

附录 B

(资料性)

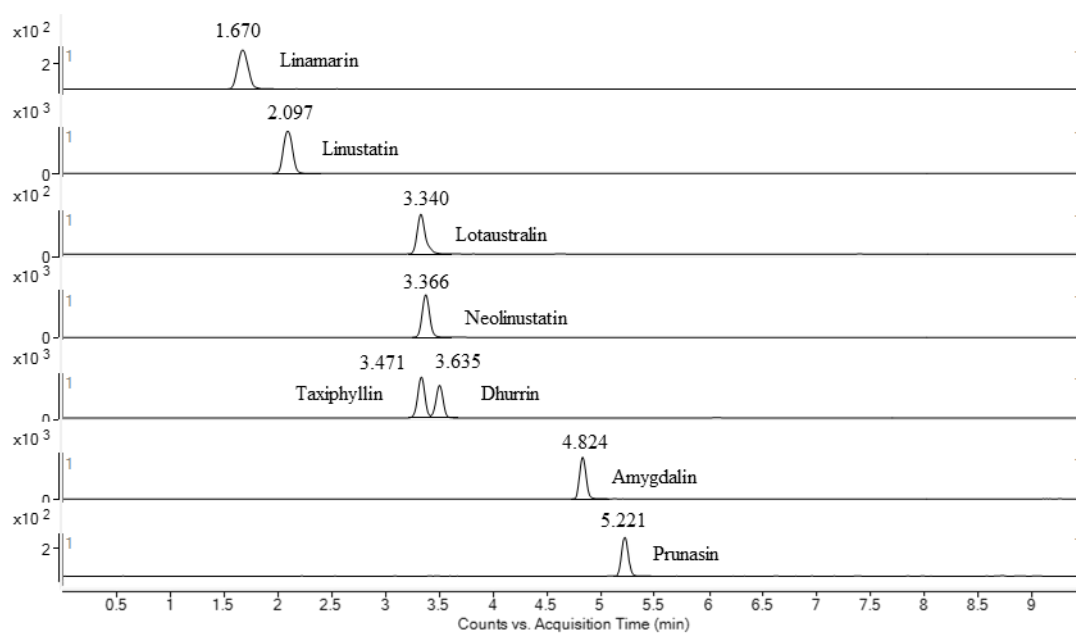
8 种生氰糖苷(100 $\mu\text{g/L}$)的保留时间、监测离子对、碰撞能量和裂解电压8种生氰糖苷(100 $\mu\text{g/L}$)的保留时间、监测离子对、碰撞能量和碎裂电压见表B. 1。表C.1 种生氰糖苷(100 $\mu\text{g/L}$)的保留时间、监测离子对、碰撞能量和裂解电压

序号	名称	保留时间 min	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	碰撞能量 eV	裂解电压 V
1	亚麻苦苷 (Linamarin)	1.670	270.0 / 243.2	270.0 / 185.1	13	100
				270.0 / 243.2	13	100
2	β -龙胆二糖丙酮氰醇 (Linustatin)	2.097	432.2 / 405.1	432.2 / 347.1	28	121
				432.2 / 405.1	28	121
3	百脉根苷 (Lotaustralin)	3.340	284.1 / 257.1	284.1 / 185.1	12	70
				284.1 / 257.1	12	101
4	β -龙胆二糖甲乙酮氰醇 (Neolinustatin)	3.366	446.2 / 419.1	446.2 / 347.1	28	116
				446.2 / 419.1	24	116
5	紫杉氰苷 (Taxiphyllin)	3.471	334.1 / 185.1	334.1 / 145.0	8	150
				334.1 / 185.1	10	150
6	蜀黍苷 (Dhurrin)	3.635	334.1 / 185.1	334.1 / 145.0	8	150
				334.1 / 185.1	10	150
7	苦杏仁苷 (Amygdalin)	4.824	480.2 / 347.1	480.2 / 374.1	24	126
				480.2 / 347.1	28	126
8	黑野樱苷 (Prunasin)	5.221	318.0 / 185.1	318.0 / 185.1	10	135
				318.0 / 79.0	30	135

附录 C

(资料性)

8 种生氰糖苷特征离子质量色谱图

8种生氰糖苷 (100 $\mu\text{g/L}$) 特征离子质量色谱图见图C. 1。

注:

- Linamarin——亚麻苦苷 (270.0 > 243.2) ;
 Linustatin—— β 龙胆二糖丙酮氰醇 (432.2 > 405.1) ;
 Lotaustralin——百脉根苷 (284.1 > 257.1) ;
 Neolinustatin—— β 龙胆二糖甲乙酮氰醇 (446.2 > 419.1) ;
 Taxiphyllin——紫杉氰苷 (334.1 > 185.1) ;
 Dhurrin——蜀黍苷 (334.1 > 185.1) ;
 Amygdalin——苦杏仁苷 (480.2 > 347.1) ;
 Prunasin——黑野樱苷 (318.0 > 185.1) 。

图C.1 8种生氰糖苷的特征离子质量色谱图