



中华人民共和国国家标准

GB 5009.111—2016

食品安全国家标准

食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇 及其乙酰化衍生物的测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5009.111—2003《谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定》、GB/T 23503—2009《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法》、SN/T 1571—2005《进出口粮谷中呕吐毒素检验方法 液相色谱法》。

本标准与 GB/T 5009.111—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定”;
- 增加了方法的适用范围;
- 增加了食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇乙酰化衍生物的测定;
- 增加了同位素稀释液相色谱-串联质谱法;
- 增加了固相萃取柱净化的前处理方式;
- 增加了免疫亲和柱净化-高效液相色谱法;
- 增加了商业化免疫亲和柱评价技术参数要求。

食品安全国家标准

食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定

1 范围

本标准规定了食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定方法。

第一法为同位素稀释液相色谱-串联质谱法,适用于谷物及其制品、酒类、酱油、醋、酱及酱制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

第二法为免疫亲和层析净化高效液相色谱法,适用于谷物及其制品、酒类、酱油、醋、酱及酱制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

第三法为薄层色谱测定法,第四法为酶联免疫吸附筛查法,适用于谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

第一法 同位素稀释液相色谱-串联质谱法

2 原理

试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇用水和乙腈的混合溶液提取,提取上清液经固相萃取柱或免疫亲和柱净化,浓缩、定容和过滤后,超高压液相色谱分离,串联质谱检测,同位素内标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 3.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 3.1.3 正己烷(C_6H_{14})。
- 3.1.4 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.5 甲酸(HCOOH)。
- 3.1.6 氮气(N_2):纯度 $\geq 99.9\%$ 。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙腈-水溶液(84+16):量取 160 mL 水加入到 840 mL 乙腈中,混匀。
- 3.2.2 乙腈饱和的正己烷溶液:量取 200 mL 正己烷于 250 mL 分液漏斗中,加入少量乙腈,剧烈振摇数分钟,静置分层,弃去下层乙腈层即得。

- 3.2.3 甲醇-水溶液(5+95):量取 5 mL 甲醇加入到 95 mL 水中,混匀。
- 3.2.4 0.01%氨水溶液:取 100 μ L 氨水加入到 1 000 mL 水中,混匀(仅供离子源模式为 ESI-时使用)。
- 3.2.5 0.1%甲酸溶液:取 1 mL 甲酸加入到 1 000 mL 水中,混匀(仅供离子源模式为 ESI+时使用)。

3.3 标准品

- 3.3.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON, $C_{15}H_{20}O_6$, CAS 号:51481-10-8):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.2 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-ADON, $C_{17}H_{22}O_7$, CAS 号:50722-38-8):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.3 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-ADON, $C_{17}H_{22}O_7$, CAS 号:88337-96-6):纯度 $\geq 99\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.4 $^{13}C_{15}$ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素标准溶液(^{13}C -DON, $^{13}C_{15}H_{20}O_6$):25 μ g/mL,纯度 $\geq 99\%$ 。
- 3.3.5 $^{13}C_{17}$ -3-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素标准溶液(^{13}C -3-ADON, $^{13}C_{17}H_{22}O_7$):25 μ g/mL,纯度 $\geq 99\%$ 。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 标准储备溶液(100 μ g/mL):分别称取 DON、3-ADON 和 15-ADON 1 mg(准确至 0.01 mg),分别用乙腈溶解并定容至 10 mL。将溶液转移至试剂瓶中,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下密封保存,有效期 1 年。
- 3.4.2 混合标准工作溶液(10 μ g/mL):准确吸取 100 μ g/mL DON、3-ADON 和 15-ADON 标准储备液各 1.0 mL 于同一 10 mL 容量瓶中,加乙腈定容至刻度。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下密封保存,有效期半年。
- 3.4.3 混合同位素内标工作液(1 μ g/mL):准确吸取 $^{13}C_{15}$ -DON 和 $^{13}C_{17}$ -3-ADON 同位素内标(25 μ g/mL)各 1 mL 于同一 25 mL 容量瓶中,加乙腈定容至刻度。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下密封保存,有效期半年。
- 3.4.4 标准系列工作溶液:准确移取适量混合标准工作溶液和混合同位素内标工作液,用初始流动相配制成 10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL、320 ng/mL、640 ng/mL 的混合标准系列,其中同位素内标浓度为 100 ng/mL。标准系列溶液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7 d。

4 仪器和设备

- 4.1 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。
- 4.2 电子天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 4.3 高速粉碎机:转速 10 000 r/min。
- 4.4 匀浆机。
- 4.5 筛网:0.5 mm~1 mm 孔径。
- 4.6 超声波/涡旋振荡器或摇床。
- 4.7 氮吹仪。
- 4.8 高速离心机:转速不低于 12 000 r/min。
- 4.9 移液器:量程 10 μ L~100 μ L 和 100 μ L~1 000 μ L。
- 4.10 固相萃取装置。
- 4.11 通用型固相萃取柱:兼具亲水基团(吡咯烷酮基团)和疏水基团(二乙烯基苯)吸附剂填料的固相萃取小柱,200 mg,6 mL,或相当者。
- 4.12 DONs 专用型固相净化柱,或相当者。
- 4.13 脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱:柱容量 $\geq 1\ 000\ \text{ng}$ (柱容量和柱回收率验证方法参见 A.2)。

4.14 水相微孔滤膜:0.22 μm 。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 谷物及其制品:取至少 1 kg 样品,用高速粉碎机将其粉碎,过筛,使其粒径小于 0.5 mm~1 mm 孔径试验筛,混合均匀后缩分至 100 g,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

5.1.2 酒类:取散装酒至少 1 L,对于袋装、瓶装等包装样品至少取 3 个包装(同一批次或号),将所有液体试样在一个容器中用均质机混匀后,缩分至 100 g(mL)储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。含二氧化碳的酒类样品使用前应先置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷藏 30 min,过滤或超声脱气后方可使用。

5.1.3 酱油、醋、酱及酱制品:取至少 1 L 样品,对于袋装、瓶装等包装样品至少取 3 个包装(同一批次或号),将所有液体样品在一个容器中用匀浆机混匀后,缩分至 100 g(mL)储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

5.2 试样提取

5.2.1 谷物及其制品:称取 2 g(准确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中,加入 400 μL 混合同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min。加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84+16),置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20 min。10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液 A 于干净的容器中备用。

5.2.2 酒类:称取 5 g(准确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中,加入 200 μL 混合同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min,用乙腈定容至 10 mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20 min。10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液 B 于干净的容器中备用。

5.2.3 酱油、醋、酱及酱制品:称取 2 g(准确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中,加入 400 μL 混合同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min。加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84+16),置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20 min。10 000 r/min 离心 5 min,收集上清液 C 于干净的容器中备用。

5.3 试样净化

注:下述试样的净化方法,可根据实际情况,选择其中一种方法即可。

5.3.1 通用型固相萃取柱净化

取 5 mL 上清液 A 或上清液 B 或上清液 C 置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 乙腈饱和正己烷溶液,涡旋混合 2 min,5 000 r/min 离心 2 min,弃去正己烷层后,于 40 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,加入 4 mL 水充分溶解残渣,待净化。

将固相萃取柱连接到固相萃取装置,先后用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化平衡。将 4 mL 上述水复溶液上柱,控制流速为每秒 1 滴~2 滴。用 3 mL 水、1 mL 5% 甲醇-水溶液依次淋洗柱子后彻底抽干。用 4 mL 甲醇洗脱,收集全部洗脱液后在 40 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干。加入 1.0 mL 初始流动相溶解残留物,涡旋混匀 10 s,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤于进样瓶中,待进样。

5.3.2 DONs 专用型固相净化柱净化

取 8 mL 上清液 A 或上清液 B 或上清液 C 至 DONs 专用型固相净化柱的玻璃管内,将净化柱的填料管插入玻璃管中并缓慢推动填料管至净化液析出,移取 5 mL 净化液于 40 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干。加入 1.0 mL 初始流动相溶解残留物,涡旋混匀 10 s,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤于进样瓶中,待进样。

注:使用不同厂商的 DONs 专用型固相净化柱,在上样、净化等操作方面可能略有不同,可按照说明书要求进行操作。

5.3.3 免疫亲和柱净化

事先将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。

准确移取 5 mL 上清液 A 或上清液 B 或上清液 C, 于 40 °C ~ 50 °C 下氮气吹干, 加入 2 mL 水充分溶解残渣, 待免疫亲和柱内原有液体流尽后, 将上述样液移至玻璃注射器筒中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接, 调节下滴速度, 控制样液以每秒 1 滴的流速通过免疫亲和柱, 直至空气进入亲和柱中。用 5 mL PBS 缓冲盐溶液和 5 mL 水先后淋洗免疫亲和柱, 流速约为每秒 1 滴 ~ 2 滴, 直至空气进入亲和柱中, 弃去全部流出液, 抽干小柱。

准确加入 2 mL 甲醇洗脱亲和柱, 控制每秒 1 滴的下滴速度, 收集全部洗脱液至试管中, 在 50 °C 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干, 加入 1.0 mL 初始流动相, 涡旋 30 s 溶解残留物, 0.22 μm 滤膜过滤, 收集滤液于进样瓶中以备进样。

注: 使用不同厂商的免疫亲和柱, 在样品上样、淋洗和洗脱的操作方面可能略有不同, 应该按照说明书要求进行操作。

5.4 液相色谱-串联质谱参考条件(可根据实际情况参考其中一种方法即可)

5.4.1 离子源模式: ESI⁺

液相色谱-质谱参考条件列出如下:

- 液相色谱柱: C₁₈ 柱(柱长 100 mm, 柱内径 2.1 mm; 填料粒径 1.7 μm), 或相当者;
- 流动相: A 相: 0.1% 甲酸溶液; B 相: 0.1% 甲酸-乙腈;
- 梯度洗脱: 2% B (0 min ~ 0.8 min), 24% B (3.0 min ~ 4.0 min), 100% B (6.0 min ~ 6.9 min), 2% B (6.9 min ~ 7.0 min);
- 流速: 0.35 mL/min;
- 柱温: 40 °C;
- 进样体积: 10 μL;
- 毛细管电压: 3.5 kV; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气温度: 350 °C; 脱溶剂气流量: 900 L/h;
- 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物质谱条件参考表 1。

表 1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物质谱参考条件(ESI⁺)

化合物名称	母离子(m/z)	锥孔电压 eV	定量离子(m/z)	碰撞电压 eV	定性离子(m/z)	碰撞电压 eV
DON	297	20	249	10	203	16
3-ADON	339	17	231	13	203	13
15-ADON	339	18	137	9	321	7
¹³ C-DON	312	20	263	10	245	16
¹³ C-3-ADON	356	17	245	13	—	—

注: 3-ADON 和 15-ADON 为同分异构体, 15-ADON 可选用¹³C-3-ADON 作为同位素内标进行相应的定量计算。

5.4.2 离子源模式: ESI⁻

液相色谱-质谱参考条件列出如下:

- 液相色谱柱: C₁₈ 柱(柱长 100 mm, 柱内径 2.1 mm; 填料粒径 1.7 μm), 或相当者;
- 流动相: A 相: 0.01% 氨水溶液; B 相: 乙腈;

- c) 梯度洗脱:2% B (0 min~0.8 min),24% B (3.0 min~4.0 min),100% B (6.0 min~6.9 min),2% B (6.9 min~7.0 min);
- d) 流速:0.35 mL/min;
- e) 柱温:40 ℃;
- f) 进样体积:10 μL;
- g) 毛细管电压:2.5 kV;锥孔电压:45 V;脱溶剂气温度:500 ℃;脱溶剂气流量:900 L/h;
- h) 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物质谱条件参考表 2。

表 2 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物质谱参考条件(ESI⁻)

化合物名称	母离子(m/z)	锥孔电压 eV	定量离子(m/z)	碰撞电压 eV	定性离子(m/z)	碰撞电压 eV
DON	295	14	265	12	138	18
3-ADON	337	12	307	10	173	12
15-ADON	337	12	150	12	219	12
¹³ C-DON	310	16	279	12	145	14
¹³ C-3-ADON	354	18	323	14	230	18

注: 3-ADON 和 15-ADON 为同分异构体,15-ADON 可选用¹³C-3-ADON 作为同位素内标进行相应的定量计算。

各化合物的离子扫描图、多反应监测(MRM)离子通道图参见图 B.1~图 B.8。

5.5 定性测定

试样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。

每种化合物的质谱定性离子应出现,至少应包括一个母离子和两个子离子,而且同一检测批次,对同一化合物,样品中目标化合物的两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%

5.6 标准曲线的制作

在 5.4 液相色谱串联质谱仪分析条件下,将标准系列溶液由低到高浓度进样检测,以 DON、3-ADON 和 15-ADON 色谱峰与各对应内标色谱峰的峰面积比值-浓度作图,得到标准曲线回归方程,其线性相关系数应大于 0.99。

5.7 试样溶液的测定

取 5.2、5.3 处理得到的待测溶液进样,内标法计算待测液中目标物质的质量浓度,按 6 计算样品中待测物的含量。试液中待测物的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应适当减少取样量后重新测定。

5.8 空白试验

除不加试样外,按 5.3 和 5.4 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

6 分析结果的表述

试样中 DON、3-ADON 或 15-ADON 的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中 DON、3-ADON 或 15-ADON 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ —— 试样中 DON、3-ADON 或 15-ADON 按照内标法在标准曲线中对应的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_1 —— 试样提取液体积,单位为毫升(mL);
- V_3 —— 试样最终定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 —— 换算系数;
- V_2 —— 用于净化的分取体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

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 23%。

8 其他

当称取谷物及其制品、酒类、酱油、醋、酱及酱制品试样 2 g 时,方法中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

当称取酒类试样 5 g 时,方法中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

9 原理

试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇用水提取,经免疫亲和柱净化后,用高效液相色谱-紫外检测器测定,外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 试剂

- 10.1.1 甲醇(CH₃OH):色谱纯。
- 10.1.2 乙腈(CH₃CN):色谱纯。
- 10.1.3 聚乙二醇[相对分子质量为 8 000,HO(CH₂CH₂O)_nH]。
- 10.1.4 氯化钠(NaCl)。
- 10.1.5 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。
- 10.1.6 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。
- 10.1.7 氯化钾(KCl)。
- 10.1.8 盐酸(HCl)。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS):称取 8.00 g 氯化钠、1.20 g 磷酸氢二钠、0.20 g 磷酸二氢钾、0.20 g 氯化钾,用 900 mL 水溶解,用盐酸调节 pH 至 7.0,用水定容至 1 000 mL。
- 10.2.2 甲醇-水溶液(20+80):量取 200 mL 甲醇加入到 800 mL 水中,混匀。
- 10.2.3 乙腈-水溶液(10+90):量取 100 mL 乙腈加入到 900 mL 水中,混匀。

10.3 标准品

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(C₁₅H₂₀O₆,CAS 号:51481-10-8):纯度≥99%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 标准储备溶液(100 μg/mL):称取脱氧雪腐镰刀菌烯醇 1 mg(准确至 0.01 mg),用乙腈溶解并定容至 10 mL。将溶液转移至试剂瓶中,在-20℃下密封保存,有效期 1 年。
- 10.4.2 标准系列工作溶液:准确移取适量脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备溶液用初始流动相稀释,配制成 100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 000 ng/mL、2 000 ng/mL、5 000 ng/mL 的标准系列工作液,4℃保存,有效期 7 d。

11 仪器和设备

- 11.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 11.2 电子天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 11.3 高速粉碎机:转速 10 000 r/min。
- 11.4 筛网:1 mm~2 mm 孔径。
- 11.5 超声波/涡旋振荡器或摇床。
- 11.6 氮吹仪。
- 11.7 高速离心机:转速≥12 000 r/min。
- 11.8 移液器:量程 10 μL~100 μL 和 100 μL~1 000 μL。
- 11.9 脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱:柱容量≥1 000 ng(柱容量和柱回收率验证方法参见 A.2)。
注:对于不同批次的亲和柱在使用前需质量验证。
- 11.10 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm,孔径 1.5 μm。
- 11.11 水相微孔滤膜:0.45 μm。
- 11.12 聚丙烯刻度离心管:具塞,50 mL。
- 11.13 玻璃注射器:10 mL。

11.14 空气压力泵。

12 分析步骤

使用不同厂商的免疫亲和柱,在试样上样、淋洗和洗脱的操作方面可能略有不同,应该按照说明书要求进行操作。

12.1 试样制备

同 5.1。

12.2 试样提取

12.2.1 谷物及其制品:称取 25 g(准确到 0.1 g)磨碎的试样于 100 mL 具塞三角瓶中加入 5 g 聚乙二醇,加水 100 mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20 min。以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6 000 r/min 下离心 10 min),收集滤液 A 于干净的容器中。10 000 r/min 离心 5 min。

12.2.2 酒类:取酒样 20 g(准确到 0.1 g),加入 1 g 聚乙二醇,用水定容至 25.0 mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20 min。用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6 000 r/min 下离心 10 min),收集滤液 B 于干净的容器中。

12.2.3 酱油、醋、酱及酱制品:称取样品 25 g(准确到 0.1 g),加入 5 g 聚乙二醇,用水定容至 100 mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20 min。以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6 000 r/min 下离心 10 min),收集滤液 C 于干净的容器中。

12.3 净化

事先将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。待免疫亲和柱内原有液体流尽后,将上述样液移至玻璃注射器筒中,准确移取上述滤液 A 或滤液 B 或滤液 C 2.0 mL,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节下滴速度,控制样液以每秒 1 滴的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中。用 5 mL PBS 缓冲盐溶液和 5 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速约为每秒 1 滴~2 滴,直至空气进入亲和柱中,弃去全部流出液,抽干小柱。

12.4 洗脱

准确加入 2 mL 甲醇洗脱亲和柱,控制每秒 1 滴的下滴速度,收集全部洗脱液至试管中,在 50 °C 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干,加入 1.0 mL 初始流动相,涡旋 30 s 溶解残留物,0.45 μm 滤膜过滤,收集滤液于进样瓶中以备进样。

12.5 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 液相色谱柱:C₁₈柱(柱长 150 mm,柱内径 4.6 mm;填料粒径 5 μm),或相当者;
- b) 流动相:甲醇+水(20+80);
- c) 流速:0.8 mL/min;
- d) 柱温:35 °C;
- e) 进样量:50 μL;
- f) 检测波长:218 nm。

12.6 定量测定

12.6.1 标准曲线的制作

以脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液浓度为横坐标,以峰面积积分值纵坐标,将系列标准溶液由低到高浓度依次进样检测,得到标准曲线回归方程。

12.6.2 试样溶液的测定

试样液中待测物的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应适当减少称样量,重新按 12.2、12.3 和 12.4 进行处理后再进样分析。

12.7 空白试验

除不称取试样外,按 12.2、12.3 和 12.4 做空白试验。确认不含有干扰待测组分的物质。

13 分析结果的表述

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量按式(2)计算:

$$X = \frac{(\rho_1 - \rho_0) \times V \times f \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- X —— 试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ_1 —— 试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的质量浓度,单位纳克每毫升(ng/mL);
- ρ_0 —— 空白试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的质量浓度,单位纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 样品洗脱液的最终定容体积,单位毫升(mL);
- f —— 样液稀释因子;
- 1 000 —— 换算系数;
- m —— 试样的称样量,单位克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

14 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 23%。

15 其他

当称取谷物及其制品、酱油、醋、酱及酱制品试样 25 g 时,脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$;当称取酒类试样 20 g 时,脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第三法 薄层色谱测定法

16 原理

试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇经提取、净化、浓缩和硅胶 G 薄层展开后,加热薄层展开后,加热薄

层板。由于在制备薄层板时加入了三氯化铝,使脱氧雪腐镰刀菌烯醇在 365 nm 紫外光灯下显蓝色荧光,与标准比较。

17 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯。

17.1 试剂

- 17.1.1 三氯甲烷(CHCl_3)。
- 17.1.2 无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$)。
- 17.1.3 甲醇(CH_3OH)。
- 17.1.4 石油醚($\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$)。
- 17.1.5 乙酸乙酯($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$)。
- 17.1.6 乙腈(CH_3CN)。
- 17.1.7 丙酮(CH_3COCH_3)。
- 17.1.8 异丙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OHCH}_3$)。
- 17.1.9 乙醚($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$)。
- 17.1.10 氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$):化学纯。
- 17.1.11 中性氧化铝:经 300 °C 活化 4 h,置干燥器中备用。
- 17.1.12 活性炭:20 g 活性炭,用 3 mol/L 盐酸溶液浸泡过夜,抽滤后,用热蒸馏水洗至无氯离子,在 120 °C 烘干备用。
- 17.1.13 硅胶 G:薄层层析用。

17.2 标准品

脱氧雪腐镰刀菌烯醇($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$,CAS 号:51481-10-8):纯度 $\geq 99\%$ 。

17.3 标准溶液配制

标准储备溶液(25 $\mu\text{g}/\text{mL}$):称取脱氧雪腐镰刀菌烯醇 5.0 mg(准确到 0.1 mg),加乙酸乙酯-甲醇(19+1)溶解,转入 10 mL 容量瓶中,并定容至 10 mL。吸取此溶液 0.5 mL,用乙酸乙酯-甲醇(19+1)稀释至 10 mL。

18 仪器和设备

- 18.1 小型粉碎机。
- 18.2 电动振荡器。
- 18.3 玻璃蒸发皿:75 mL。
- 18.4 层析柱:内径 2 cm,长 10 cm,不具活塞。
- 18.5 具塞浓缩瓶:10 mL,底部具 0.2 mL 刻度尾管。
- 18.6 玻璃板:5 cm \times 20 cm。
- 18.7 薄层涂布器:0.3 mm。
- 18.8 展开槽:内长 26 cm,宽 6 cm,高 4 cm。
- 18.9 紫外光灯:365 nm。
- 18.10 微量注射器:10 μL ,50 μL 。

18.11 平底管:50 mL。

18.12 双波长薄层扫描仪:带数据处理机。

19 分析步骤

19.1 试样提取

称取 20 g 粉碎试样置于 200 mL 具塞锥形瓶中,加 8 mL 和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(8+2),密塞。在瓶塞上涂层水,盖严防漏,振荡 1 h,通过折叠快速定性滤纸过滤,取 25 mL 滤液于 75 mL 玻璃蒸发皿中,置 90 °C 水浴上通风挥干。

19.2 净化

19.2.1 液-液分配

19.2.1.1 谷物:用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中的残渣,洗入 100 mL 分液漏斗中,再用 20 mL(玉米试样用 30 mL)甲醇-水(4+1)分次洗涤蒸发皿,转入同一分液漏斗中。

19.2.1.2 谷物制品(蛋糕、饼干、面包等):用 100 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中的残渣,洗入 250 mL 分液漏斗中,再用 30 mL 甲醇-水(4+1)分次洗涤蒸发皿,转入同一分液漏斗中。振荡分液漏斗 1.5 min,静置约 15 min 使分层后,将下层甲醇-水提取液过柱净化,不要将两相交界处的白色絮状物放入柱内。

19.2.2 柱净化

19.2.2.1 小麦及其制品:在层析柱下端与小管连结处塞约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝,敲平表面,再加 0.4 g 活性炭,敲紧。将层析柱下端小管插入一橡皮塞,塞在抽滤瓶上,抽滤瓶中放一平底管接受过柱液,将抽滤瓶接上水泵或真空泵,稍稍开启泵,使活性炭压紧,将分液漏斗中的甲醇-水提取液小心地沿管壁加入柱内,控制流速为每 15 秒 18 滴~20 滴(3 mL/min),甲醇-水提取液过柱快完毕时,加入 10 mL 甲醇-水(4+1)淋洗柱,抽滤,直至柱内不再有液体流出。过柱速度控制在 2 mL/min~3 mL/min,速度太快净化效果不好,太慢耗时太长。

19.2.2.2 玉米:同 20.2.2.1,只是将活性炭的用量改为 0.3 g。

19.3 制备薄层层析用样液

将过柱后的洗脱液倒入 75 mL 玻璃蒸发皿中,用少量甲醇-水(4+1)洗涤平底管。将蒸发皿置沸水浴上浓缩至干:

- a) 小麦:趁热加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,在水浴锅上轻轻地反复转动蒸发皿数次,使充分沸腾将残渣中的 DON 溶出,并将乙酸乙酯挥发至干,再加入 3 mL 乙酸乙酯同样处理一次,将溶剂挥干,最后加 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,放冷至室温后转入浓缩瓶中,再用 3 份 1.5 mL 乙酸乙酯洗涤蒸发皿,并入浓缩瓶中。
- b) 小麦制品和玉米:趁热加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,在水浴锅上轻轻地反复转动蒸发皿数次,使充分沸腾,将残渣中 DON 溶出,放冷至室温后转入浓缩瓶中。加约 0.5 mL 甲醇-丙酮(1+2)于蒸发皿中,用玻璃搅动溶解残渣,将蒸发皿置水浴锅上挥干溶剂后,加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,转动蒸发皿,使充分沸腾,放冷至室温后转入同一浓缩瓶中,再用 0.5 mL 甲醇-丙酮(1+2)和 3 mL 乙酸乙酯同样处理一次,乙酸乙酯提取液并入浓缩瓶中。

将浓缩瓶置约 95 °C 水浴锅上,用蒸汽加热吹氮气浓缩至干,放冷至室温后加入 0.2 mL 三氯甲烷-乙腈(4+1)溶解残渣留作薄层层析用。

19.4 测定

19.4.1 薄层板的制备:4 g 硅胶 G 加约 9 mL 15%氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)水溶液,研磨约 2 min 至呈黏稠状,铺成 5 cm×20 cm 的薄层板三块,置室温干燥后,于 105 °C 活化 1 h,贮干燥器中备用。

19.4.2 点样:在每块薄层板上距下端 2.5 cm 的基线上点样。

第一块板:对每一个试样先点第一块薄层板,在距板左边缘 1.8 cm 处点 25 μL 试样液,在距板上端 1.5 cm 处的横线上并与基线试样点相对应的位置上点 2 μL DON 标准液(50 ng)。

第二块板:在第一块板上未显荧光的试样则需在第二块薄层板上距左边缘 0.8 cm~1 cm 处滴加样液点(根据情况估计滴加量,或稀释后定量),在距板左边缘 2 cm 处和在距右边缘 1.2 cm 处分别滴加两个标准点,DON 的量可为 50 ng、75 ng、100 ng。再在距板上端 1.5 cm 处的横线上点三个 DON 标准点(各 50 ng),使之与基线上的三个点相对应。

19.4.3 展开:

横展剂:乙醚、乙醚-丙酮(95+5)或无水乙醚。任选其中一种,使试样 DON 点偏离原点 0.7 cm~1 cm,刚好与杂质荧光分开。

纵展剂:三氯甲烷-丙酮-异丙醇(8+1+1);

三氯甲烷-丙酮-异丙醇-水(7.5+1+1.5+0.1)。

19.4.3.1 横展:在展开槽内倒入 10 mL 横展剂。将点好样的薄层板靠样液点的长边斜浸入溶剂,展至板端 1 min~2 min,取出通风挥干 3 min。对小麦制品还须再用 10 mL 石油醚(30°C~60°C)横展一次,展至板端过 1 min,取出通风挥干 5 min。

19.4.3.2 纵展:在展开槽内倒入 10 mL 纵展剂。将横展挥干后的薄层板置展开槽内纵展 15 cm,取出通风挥干 10 min,由于 DON 与杂质分离的效果受空气湿度影响较大,当板面分离效果不太好时即第一块薄层板的试样点附近有杂质荧光干扰时,可按极性大小依次换用以下几种展开方式:

- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇(8+1+1)。
- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇(8+1+1)并在展开槽盖内面贴上水饱和的滤纸。
- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇-水(7.5+1+1.5+0.1)。
- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇-水(7.5+1+1.5+0.1)并在展开槽内面贴上水饱和的滤纸。改换纵展方式,展开第二块薄层板。如展开槽内极性太大,会使 DON 点变偏。

19.4.4 显荧光:先观察未加热的薄层板可见到显蓝紫荧光的干扰点,这时 DON 不显荧光,加热薄层板后,杂质点仍显荧光,它在 DON 荧光点附近,但不干扰 DON。然后将此薄层板置 130 °C 烘箱中加热 7 min~10 min,取出放在冷的表面上 1 min~5 min 后于 365 nm 紫外光灯下观察。

19.4.5 观察与评定:薄层板经横展后,板上样液点的 DON 点移动 0.7 cm~1.0 cm,正是根据这一点在纵展后使样品 DON 点摆脱了杂质荧光的干扰。薄层板上端未经纵展的三个 DON 标准点可分别作为纵展后样品 DON 点和两个 DON 标准点的横向定位点。样品 DON 点又可与纵展后的 DON 标准点比较 R_f 值而定性。这样从横向和纵向两个方面确定样品 DON 的位置,达到定性的目的。在第一块薄层板上如样品 DON 点上有很浅的斜的荧光通过,这是过柱时没有掌握好速度,净化不够,也可能是空气湿度的变化,影响分离效果,但两个标准 DON 点的位置上均无杂质荧光干扰。

如在第一块薄层板上样液未显荧光点,而在第二块薄层板上样液 25 μL 加标准 25 ng 所显荧光强度与标准 25 ng 相等,则样品中 DON 含量为阴性或为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。阳性样品概略定量时,虽然薄层板上三个 DON 点在横展中都稍有移动,但对各点荧光强度无影响,两个标准点均可用于和样品 DON 点比较荧光强度。

19.4.6 薄层光密度计测定:激发光波长 340 nm、发射光波长 400 nm。在薄层板上标准 DON 荧光点至少在 100 ng、200 ng、400 ng 时,测得的响应与 DON 的量才呈线性关系。对 DON 含量在 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上的样品才用光密度计测定。当 DON 含量在 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,点样液 20 μL 使测得的 DON 的量落在

100 ng~200 ng 之间。用薄层扫描仪测定时,每块薄层板上滴加两个标准 DON 点,DON 的量为 100 ng、200 ng 或 200 ng、400 ng。在激发波长 340 nm,发射波长 400 nm 条件下进行测定,以测得的峰面积值为纵坐标,DON 量为横坐标,绘制标准曲线。

20 分析结果的表述

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量按式(3)计算:

$$X = \frac{C \times V_1 \times f \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

式中

- X ——试样中 DON 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- C ——薄层板上测得样品点上 DON 的量,单位为纳克(ng);
- V_1 ——加入三氯甲烷-乙腈混合液溶解残渣的体积,单位为毫升(mL);
- f ——样液的总稀释倍数;
- 1 000 ——换算系数;
- V_2 ——滴加样液的体积,单位为毫升(mL);
- m ——三氯甲烷-乙腈混合液溶解残渣相当样品的质量,单位为克(g)。

结果表示到测定值的整数位。

DON 含量超过 GB 2761 限量值的试样需用第一法作进一步确证。

21 精密度

每个试样称取两份进行平行测定,以其算术平均值为分析结果。
其分析结果的相对相差应不大于 60%。

22 其他

薄层板上脱氧雪腐镰刀菌烯醇的最低检出量为 100 ng,检出限为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第四法 酶联免疫吸附筛查法

23 原理

试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇经水提取、均质、涡旋、离心(或过滤)等前处理获取上清液。被酶标记的脱氧雪腐镰刀菌烯醇酶连偶合物,与试样上清液或标准品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇竞争性结合微孔中预包被的特异性抗体。在洗涤后加入相应显色剂显色,经无机酸终止反应,于 450 nm 或 630 nm 波长下检测。试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇与吸光度在一定浓度范围内呈反比。

24 试剂

配制溶液所需试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定二级水。
按照所选用的试剂盒说明书描述,配制所需溶液。

25 仪器和设备

- 25.1 微孔板酶标仪:带 450 nm 与 630 nm(可选)滤光片。
 25.2 研磨机。
 25.3 振荡器。
 25.4 电子天平:感量 0.01 g。
 25.5 离心机:转速 $\geq 6\ 000$ r/min。
 25.6 快速定量滤纸:孔径 11 μm 。
 25.7 筛网:1 mm~2 mm 试验筛孔径。
 25.8 试剂盒所要求的其他仪器。

26 分析步骤

26.1 提取

称取至少 100 g 样品,用研磨机进行粉碎,粉碎后的样品过 1 mm~2 mm 试验筛。取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管中,加入试剂盒所要求提取液,按照试纸盒说明书所述方法进行检测。

26.2 ELISA 检测

按照酶联免疫试剂盒所述操作步骤对待测试样(液)进行定量检测。

27 分析结果的表述

按照试剂盒说明书提供的计算方法或者计算机软件,根据标准品浓度与吸光度变化关系绘制标准工作曲线。

27.1 待测液浓度计算

按照试剂盒说明书提供的计算方法以及计算机软件,将待测液吸光度代入绘制得到的标准工作曲线,计算得待测液浓度(ρ_x)。

27.2 结果计算

食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量按式(4)计算:

$$X = \frac{\rho_x \times V \times f}{m} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- X ——食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 ρ_x ——待测液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);
 V ——提取液体积,单位为升(L);
 f ——在前处理过程中的稀释倍数;
 m ——样品取样量,单位为千克(kg)。

计算结果保留到小数点后一位。

DON 含量超过 GB 2761 限量值的试样需用第一法作进一步确证。

28 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 25%。

29 其他

当称取谷物及其制品样品 5 g 时,方法检出限为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附录 A

A.1 标准品基本信息

标准品基本信息见表 A.1。

表 A.1 标准品基本信息

中文名称	英文名称	英文缩写	CAS号	分子式	相对分子质量
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	DON	51481-10-8	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-acetyl-deoxynivalenol	3-ADON	50722-38-8	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-acetyl-deoxynivalenol	15-ADON	88337-96-6	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338

A.2 免疫亲和柱的柱容量质量验证方法

A.2.1 柱容量验证:在 5 mL 的水中加入 6 000 ng DON 标准储备溶液,充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱,每根柱的上样量为 1 mL。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干至 1 mL,用初始流动相定容至 1 mL,用液相色谱仪分离测定 DON 的含量。

结果判定:结果 DON \geq 1 000 ng(回收率 \geq 80%,RSD% \geq 15%),为可使用商品。

A.2.2 柱回收率验证方法:在 5 mL 的水中加入 6 000 ng DON 标准储备溶液,充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱,每根柱的上样量为 1 mL。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干至 1 mL,用初始流动相定容至 1 mL,用液相色谱仪分离测定 DON 的含量。

结果判定:结果柱回收率 \geq 80%(RSD% \geq 15%),为可使用商品。

附录 B
标准物质色谱-质谱图

B.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^-)离子扫描图见图 B.1。

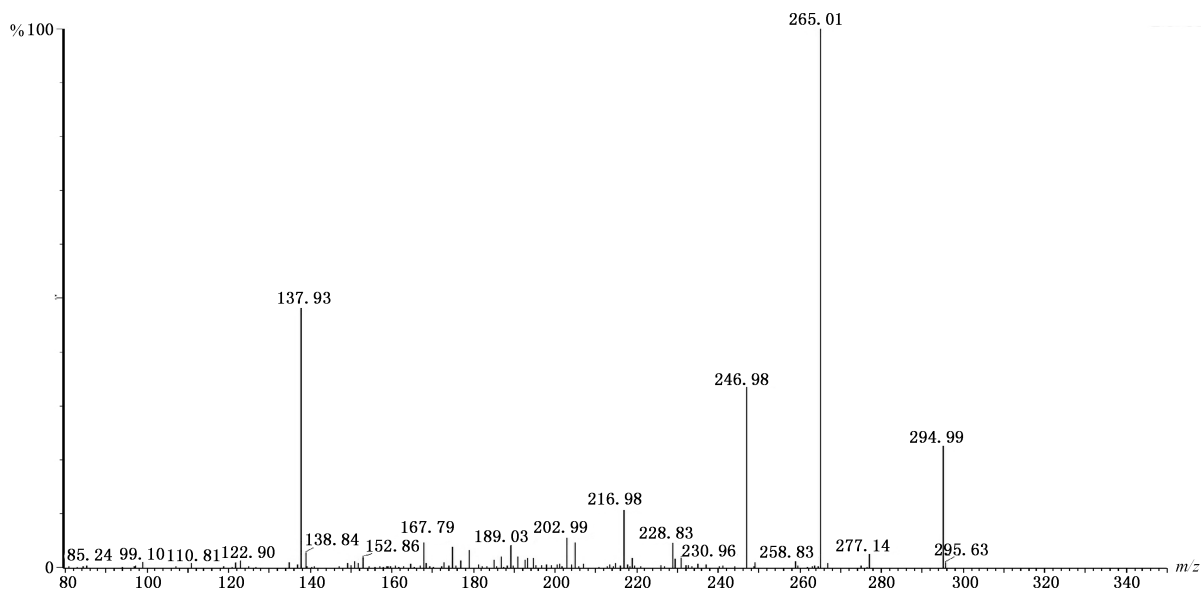


图 B.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^-)离子扫描图

B.2 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^-)离子扫描图见图 B.2。

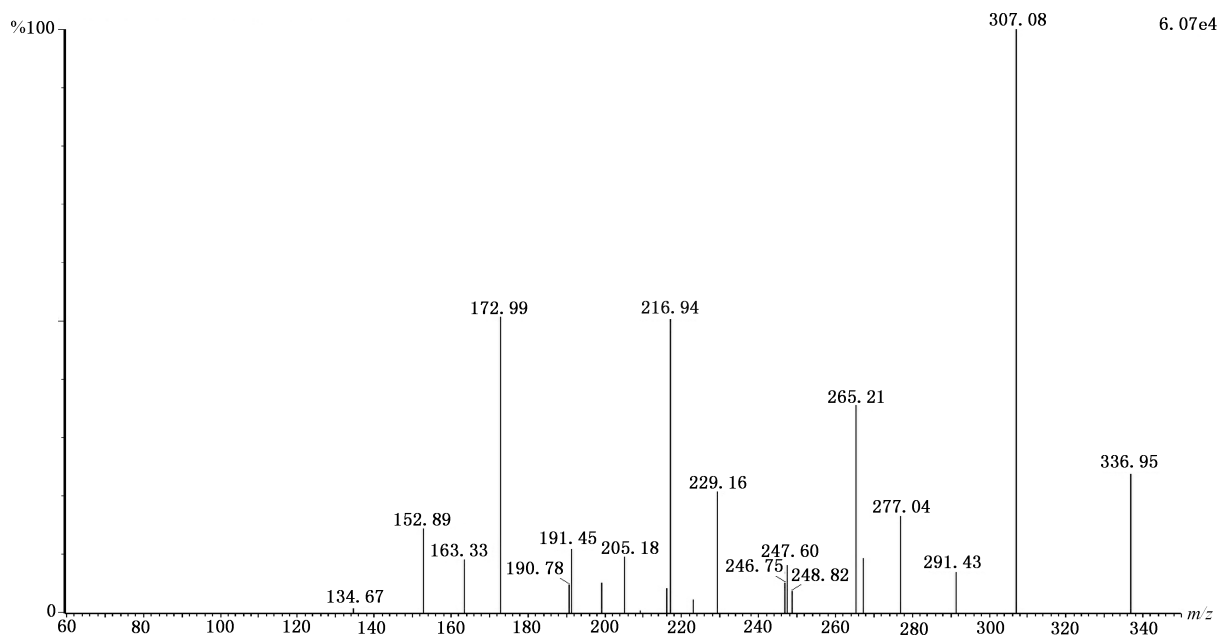
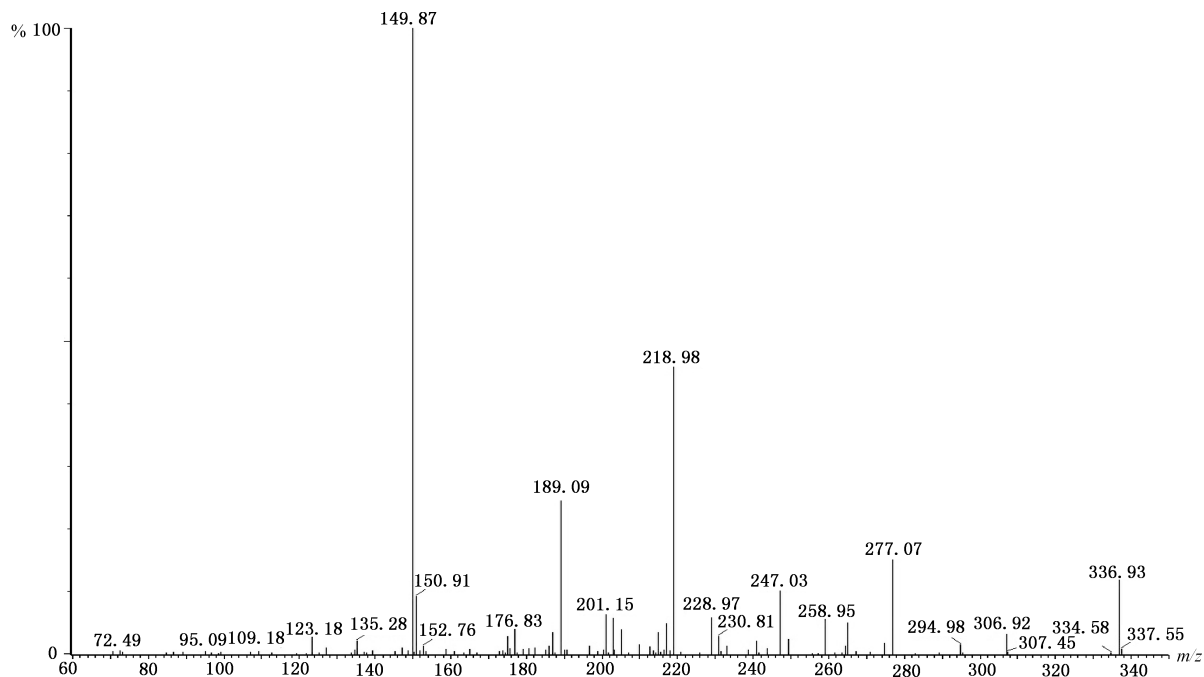


图 B.2 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^-)离子扫描图

B.3 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^-)离子扫描图见图 B.3。

图 B.3 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^-)离子扫描图

B.4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物多反应监测(MRM- ESI^-)色谱图见图 B.4。

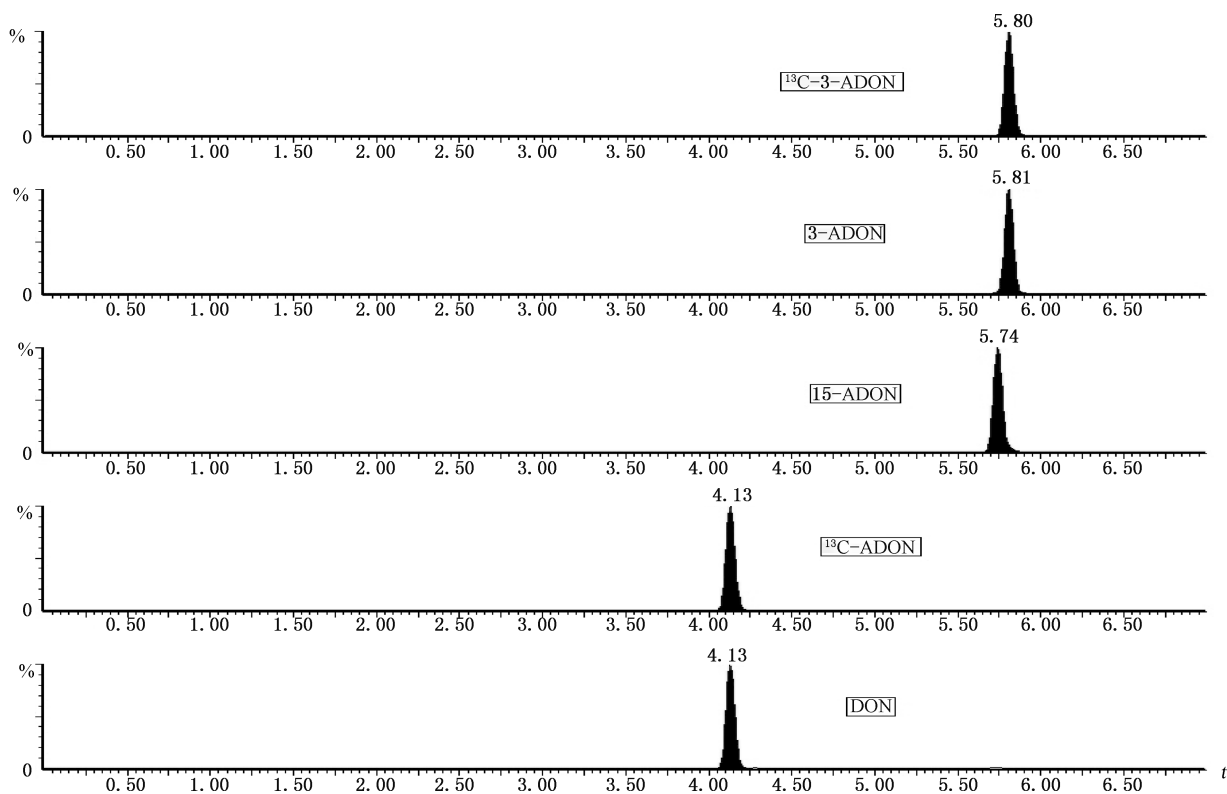


图 B.4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物
(DON/3-ADON/15-ADON)多反应监测(MRM- ESI^-)色谱图

B.5 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI^+)离子扫描图见图 B.5。

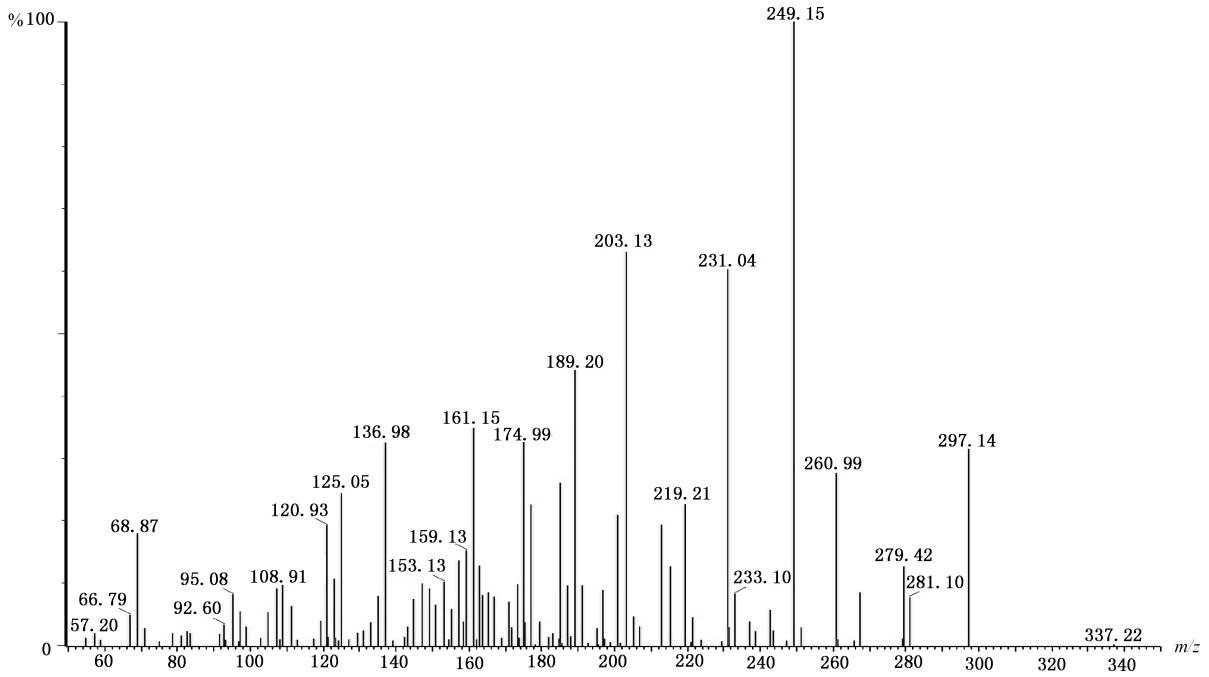


图 B.5 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI⁺)离子扫描图

B.6 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI⁺)离子扫描图见图 B.6。

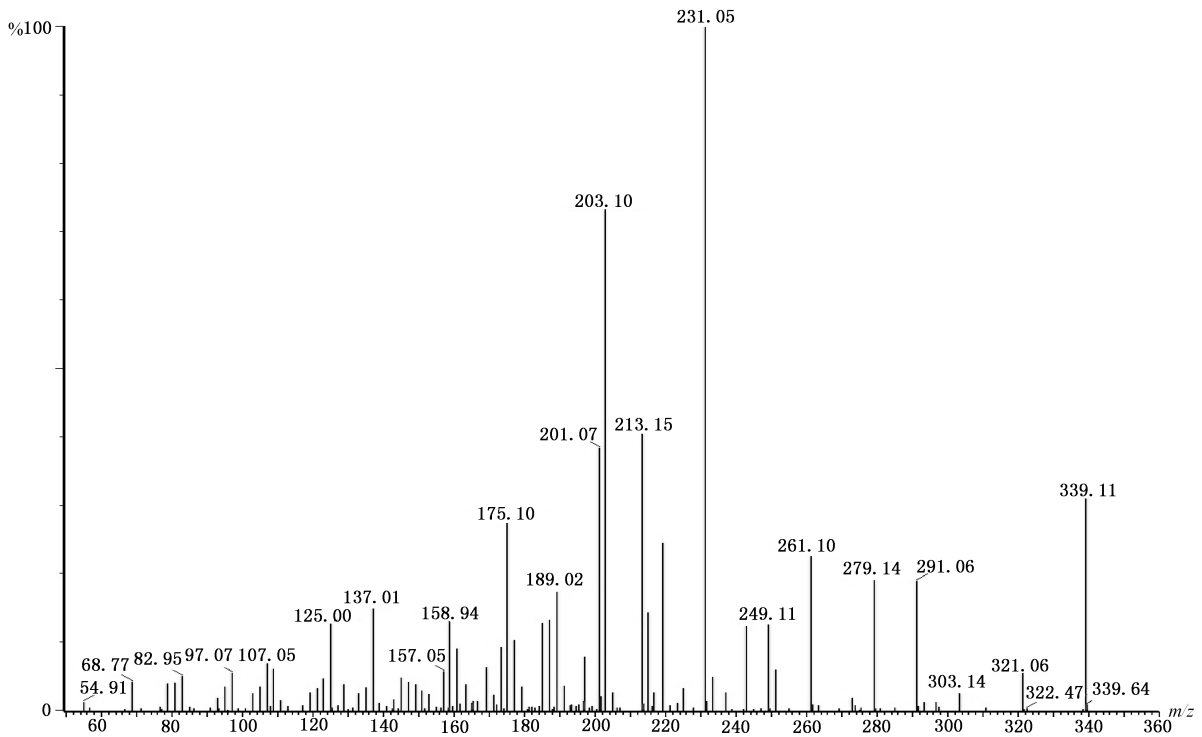
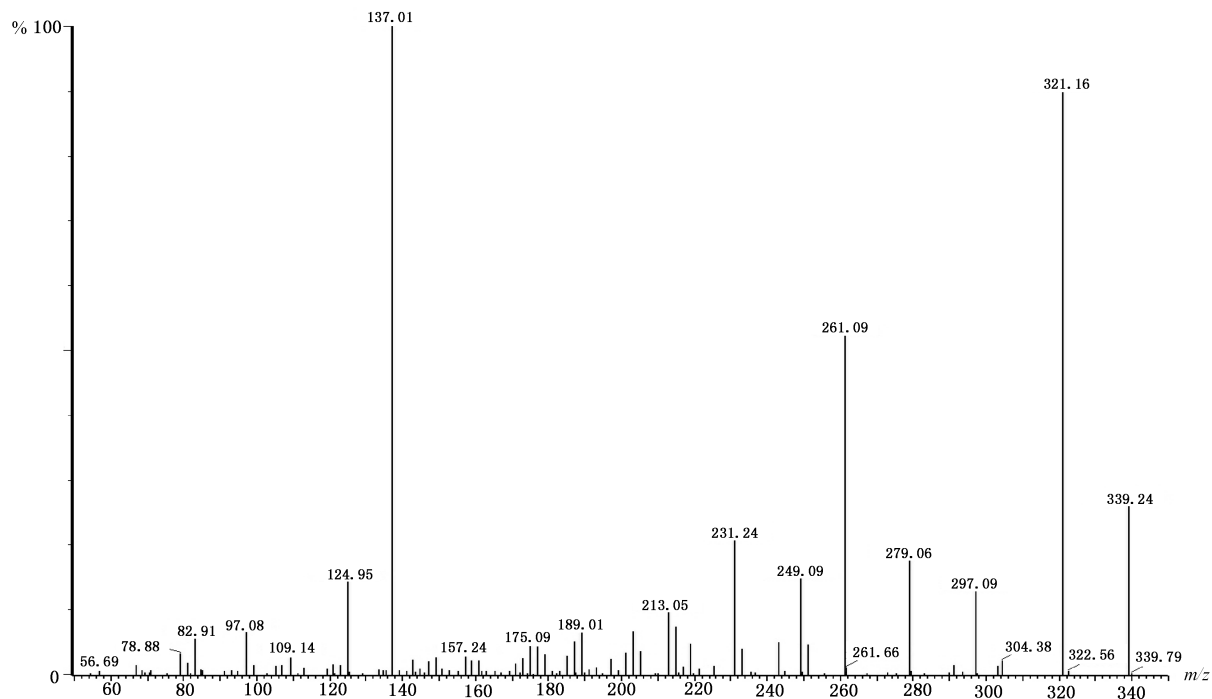
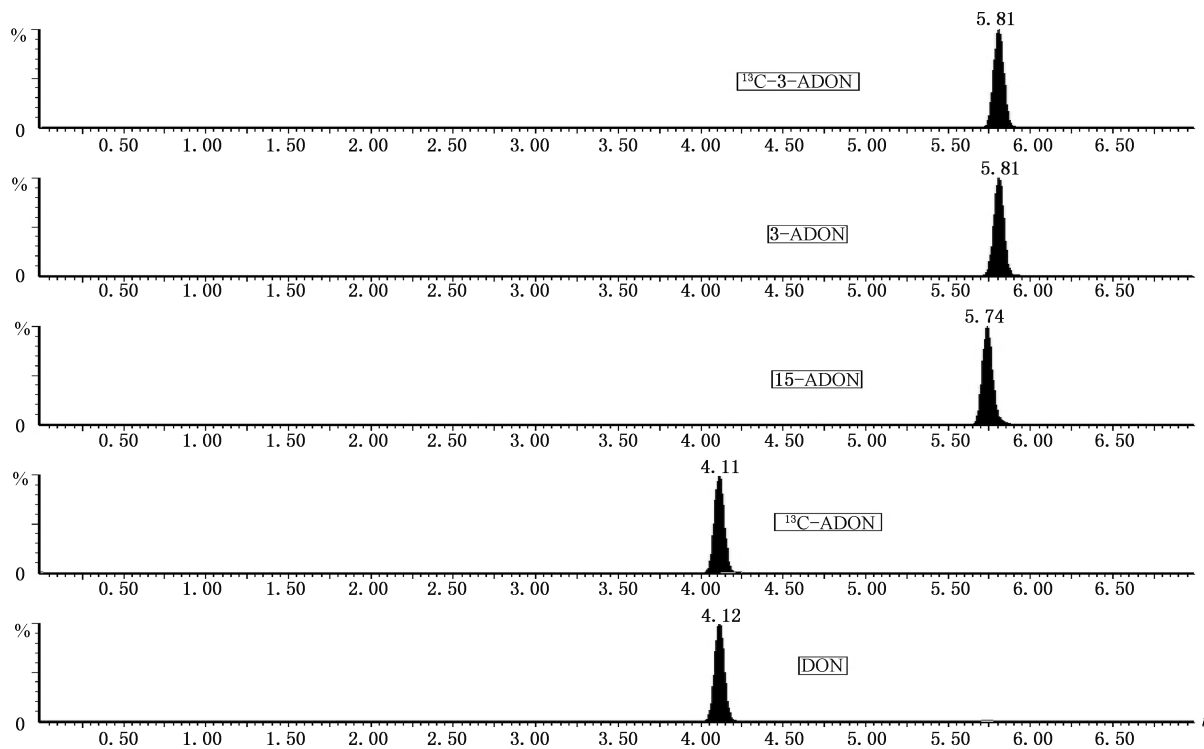


图 B.6 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI⁺)离子扫描图

B.7 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI⁺)离子扫描图见图 B.7。

图 B.7 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(ESI⁺)离子扫描图

B.8 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物多反应监测(MRM-ESI⁺)色谱图见图 B.8。

图 B.8 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物多反应监测(MRM-ESI⁺)色谱图

B.9 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液高效液相色谱图见图 B.9。

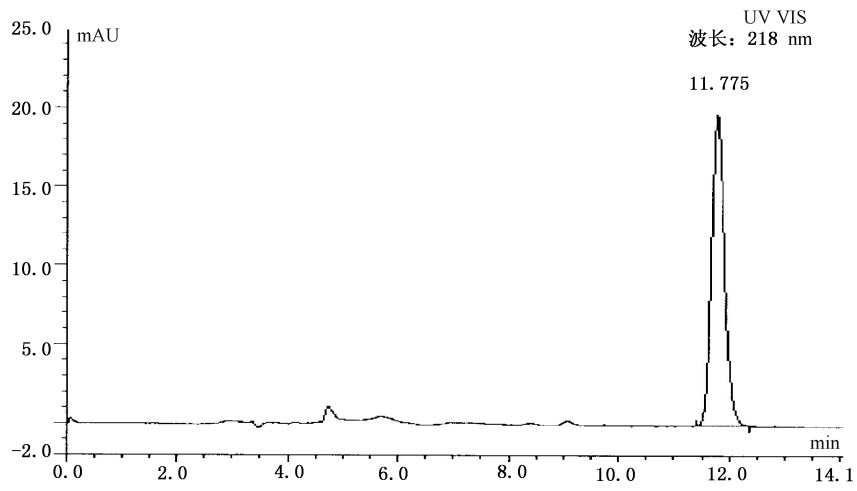


图 B.9 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液高效液相色谱图