



中华人民共和国国家标准

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

Determination of deoxynivalenol in food—High performance
liquid chromatographic method with immunoaffinity column clean-up

2009-04-08 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会(SAC/TC 64)提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会食品通用检测技术分技术委员会(SAC/TC 64/SC 8)归口。

本标准起草单位:青岛市产品质量监督检验所、中华人民共和国山东出入境检验检疫局、中检维康技术有限公司、青岛啤酒股份有限公司。

本标准主要起草人:张辉珍、王晓滨、单连菊、吴振兴、林艳、李惠颖、王雄。

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

1 范围

本标准规定了食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的免疫亲和层析净化高效液相色谱测定方法。

本标准适用于粮食和粮食制品、酒类、酱油、醋、酱及酱制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的测定。

本标准的方法检出限：粮食和粮食制品的检出限为 0.5 mg/kg，酒类的检出限为 0.1 mg/kg，酱油、醋、酱及酱制品的检出限为 0.1 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682—2008，ISO 3696:1987，MOD）

3 方法提要

用提取液提取试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇，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。

4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为符合 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 聚乙二醇（相对分子质量 8 000）。

4.4 PBS 清洗缓冲液：称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，用 990 mL 水将上述试剂溶解，然后用浓盐酸调节 pH 至 7.0，再用水稀释至 1 L。

4.5 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品：纯度 \geq 98%。

4.6 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备液：准确称取一定量的脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品，用甲醇溶解，配成 0.1 mg/mL 的标准储备液，在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存，可使用 3 个月。

4.7 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液：根据需要使用，准确吸取一定量的脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备液，用流动相稀释，分别配成相当于 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存，可使用 7 d。

4.8 脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱。

4.9 玻璃纤维滤纸：直径 11 cm，孔径 1.5 μm 。

5 仪器和设备

5.1 天平：感量 0.001 g。

5.2 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

5.3 均质器：转速大于 10 000 r/min。

- 5.4 高速万能粉碎机:转速 10 000 r/min。
- 5.5 玻璃注射器:10 mL。
- 5.6 试验筛:1 mm 孔径。
- 5.7 空气压力泵。

6 分析步骤

6.1 试样制备与提取

6.1.1 粮食和粮食制品:将样品研磨,硬质的粮食等用高速万能粉碎机磨细并通过试验筛(5.6),不要磨成粉末。称取 25 g(精确到 0.01 g)磨碎的试样于 100 mL 容量瓶中加入 5 g 聚乙二醇(4.3),用水定容至刻度,混匀,转移至均质杯中,高速搅拌 2 min。定量滤纸过滤后以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 A 于干净的容器中。

6.1.2 酒类:取脱气酒类试样(含二氧化碳的酒类样品使用前先置于 4 °C 冰箱冷藏 30 min,过滤或超声脱气)或其他不含二氧化碳的酒类试样 20 g(精确到 0.01 g),加入 1 g 聚乙二醇(4.3),用水定容至 25.0 mL,混匀,用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 B 于干净的容器中。

6.1.3 酱油、醋、酱及酱制品:取样品 25 g(精确到 0.01 g),加入 5 g 聚乙二醇(4.3),用水定容至 100.0 mL,高速搅拌提取 2 min。定量滤纸过滤后,用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 C 于干净的容器中。

6.2 净化

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器(5.5)下,准确移取 6.1 中滤液 A 或 B 或 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,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中。用 5 mL PBS 清洗缓冲液(4.4)和 5 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速约为 1 滴/s~2 滴/s,直至空气进入亲和柱中,弃去全部流出液,抽干小柱。

6.3 洗脱

准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱,流速约为 1 滴/s,收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中,HPLC 测定。

6.4 高效液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,5 μ m,150 mm \times 4.6 mm 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 μ L;
- f) 检测波长:218 nm。

6.5 定量测定

以脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液浓度为横坐标,以峰面积积分为纵坐标,绘制标准工作曲线,用标准工作曲线对试样进行定量,标准工作溶液和试样溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的响应值均应在仪器检测线性范围内。在上述色谱条件下,脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品色谱图参见图 A.1。

6.6 空白试验

除不加试样外,空白试验应与测定平行进行,并采用相同的分析步骤。

6.7 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

7 结果计算

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{(c_1 - c_0) \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_1 ——试样溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

c_0 ——空白试样溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——甲醇洗脱液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的质量,单位为克(g);

f ——稀释倍数。

检测结果以两次测定值的算术平均值表示。计算结果表示到小数点后1位。

8 回收率

添加浓度在0.5 mg/kg~2.0 mg/kg时,回收率在70%~100%之间。

9 重复性

在重复性条件下,获得的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的10%。

附录 A
(资料性附录)
脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品的液相色谱图

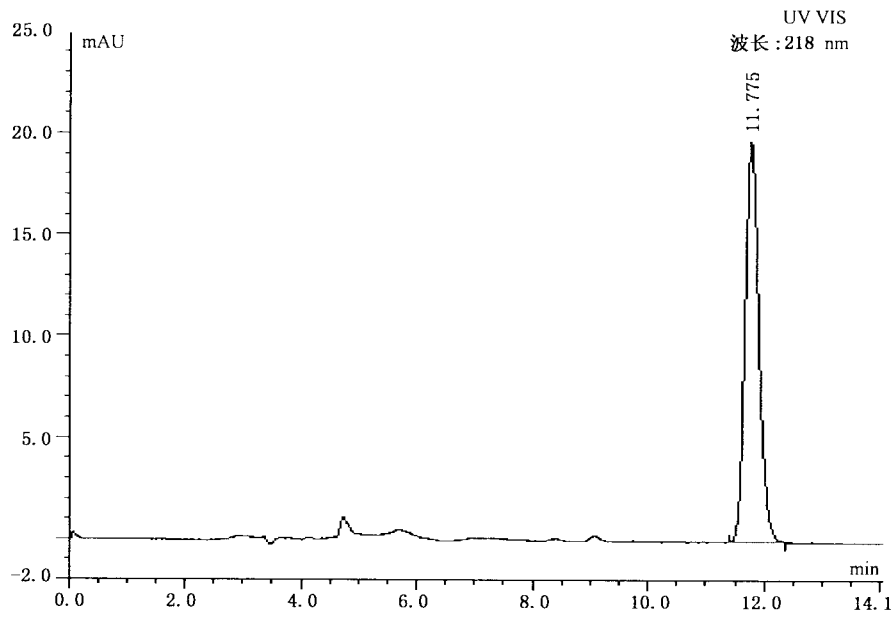


图 A.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品液相色谱图