



中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6126—2017

粮油检验 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定 超高效液相色谱法

Inspection of grain and oils—Determination of ochratoxin A in grains—
Ultra-high performance liquid chromatography

2017-10-27 发布

2017-12-20 实施

国家粮食局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会(SAT/TC 270)归口。

本标准起草单位：国家粮食局科学研究院、吉林省粮油卫生检验监测站、遂宁市粮食质量监督检验站、北京农业质量标准与检测技术研究中心。

本标准主要起草人：谢刚、黎睿、李丽、王松雪、辛媛媛、叶金、徐振斌、李小明、王媛媛、陆安祥。

粮油检验 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定

超高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了粮食及其制品中赭曲霉毒素 A 的超高效液相色谱法测定的原理、试剂与仪器设备、分析步骤、结果计算等内容。

本标准适用于粮食及其制品中赭曲霉毒素 A 的测定。

本标准方法赭曲霉毒素 A 的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备

GB/T 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

用提取液提取试样中的赭曲霉毒素 A,免疫亲和柱净化、富集后,超高效液相色谱荧光检测器测定,外标法定量。

4 试剂与仪器设备

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中一级用水要求。

4.1 试剂

4.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

4.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

4.1.3 氯化钠(NaCl):分析纯。

4.1.4 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4):分析纯。

4.1.5 磷酸二氢钾(KH_2PO_4):分析纯。

4.1.6 氯化钾(KCl):分析纯。

4.1.7 浓盐酸(HCl):分析纯。

4.1.8 乙酸(CH_3COOH):色谱纯。

4.1.9 碳酸氢钠(NaHCO_3):分析纯。

4.1.10 吐温-20:分析纯。

4.1.11 乙腈+水(60+40):60 体积乙腈(4.1.2)和 40 体积水混合。

4.1.12 酸化甲醇:1 体积的色谱级乙酸(4.1.8)和 99 体积的甲醇(4.1.1)混合。

4.1.13 真菌毒素清洗缓冲液:称取 25.0 g 氯化钠(4.1.3)、5.0 g 碳酸氢钠(4.1.9)溶于水中,加入 0.1 mL 吐温-20(4.1.10),用水稀释至 1 L。

4.1.14 磷酸盐缓冲液:8.0 g 氯化钠(4.1.3)、1.2 g 磷酸氢钠(4.1.4)、0.2 g 磷酸二氢钾(4.1.5)、0.2 g 氯化钾(4.1.6)溶解于约 990 mL 水中,用浓盐酸(4.1.7)调节 pH 至 7.0,用水稀释至 1 L。

其他试剂应符合 GB/T 602 的要求。

4.2 标准品

4.2.1 赭曲霉毒素 A 标准品:纯度 $>99\%$;或经国家认证并授权标准物质证书的标准物质。

4.2.2 赭曲霉毒素 A 标准储备液:使用有证标准物质溶液;或准确称取适量的赭曲霉毒素 A 标准品(4.2.1),用甲醇溶解,配成浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

4.2.3 赭曲霉毒素 A 标准工作溶液:准确移取适量的赭曲霉毒素 A 标准储备液(4.2.2),用流动相稀释,配成浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。

4.3 材料与仪器设备

4.3.1 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱。

4.3.2 定性滤纸: Φ 12 cm Whatman 4 号,或性能相当者。

4.3.3 玻璃纤维滤纸: Φ 9 cm Whatman GF/A,或性能相当者。

4.3.4 滤膜:0.22 μm 孔径,有机相。

4.3.5 注射器:20 mL。

4.3.6 离心管:50 mL。

4.3.7 三角瓶:250 mL。

4.3.8 量筒。

4.3.9 高速粉碎机。

4.3.10 高速均质器:转速 6 500 r/min~24 000 r/min。

4.3.11 氮气吹干仪。

4.3.12 天平:感量 0.1 g 和 0.01 mg。

4.3.13 离心机:转速 $\geq 5\ 000$ r/min。

4.3.14 调速多用振荡器(振荡频率 ≥ 150 次)。

4.3.15 空气压力泵。

4.3.16 试验筛:1 mm 孔径试验筛。

4.3.17 液相色谱柱:C18 柱(柱长 50 mm 或 100 mm,柱内径 2.1 mm,填料粒径 1.7 μm),或性能相当者。

4.3.18 超高效液相色谱仪:包括超高效液相色谱仪、超高压液相色谱仪和超高速液相色谱仪,配备荧光检测器和数据处理系统。

色谱参考条件:

色谱柱:C18 柱(4.3.17)。

柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;

流动相:乙腈+水+冰乙酸(96+102+2)。

流速:0.3 mL/min。

进样量:10 μL 。

荧光检测器:激发波长 310 nm,发射波长 465 nm。

5 分析步骤

5.1 扦样与分样

按 GB/T 5491 执行,在采样过程中,注意防止样品污染。

5.2 样品制备

5.2.1 提取

样品用高速粉碎机(4.3.9)粉碎,过 1 mm 孔径试验筛(4.3.16),混合均匀后,取有代表性样品不少于 500 g,供检测用。准确称取 25.0 g(精确到 0.1 g)充分混匀的试样,置于均质杯或 250 mL 三角瓶中,加入 100 mL(V_1)乙腈水溶液(4.1.11),高速均质提取 2 min,或者使用调速多用振荡器(4.3.14)振荡提取 30 min,用定性滤纸过滤或转移 25 mL 的提取液于 50 mL 的离心管中,在 5 000 r/min 下离心 5 min。准确移取 4 mL(V_2)滤液或离心管上层液体加入 26 mL(V_3)磷酸盐缓冲液(4.1.14),混合均匀后,于 8 000 r/min 离心 10 min,上清液备用。

5.2.2 净化

将免疫亲和柱(4.3.1)与 20 mL 玻璃注射器(4.3.5)下端连接,将上述 30 mL(V_4)的上清液分两次全部注入注射器中,将空气压力泵(4.3.15)与玻璃注射器连接,调节压力使溶液以约 1 滴/s 的流速缓慢通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液(4.1.13)、10 mL 水淋洗亲和柱,弃掉全部流出液,抽干免疫亲和柱。

准确加入 1.5 mL 洗脱液(4.1.12)或免疫亲和柱厂家推荐的洗脱液进行洗脱,流速约为 1 滴/s,收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中,在 45 °C 下以氮吹仪用氮气吹至净干。准确加入 0.5 mL 流动相溶解残渣,涡旋混合 30 s,过 0.22 μm 滤膜(4.3.4),作为待测样液备用。

注:由于不同厂商提供的亲和柱操作程序可能有所不同,实际操作时,也可参照免疫亲和柱厂商提供的操作说明和程序使用。

5.3 标准曲线的制作

赭曲霉毒素 A 标准工作溶液(4.2.3)由低到高注入液相色谱检测分析。以赭曲霉毒素 A 标准工作液浓度为横坐标,相对应色谱峰峰面积为纵坐标,建立标准工作曲线。

5.4 试样溶液的测定

待测样液(5.2)中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,浓度超过线性范围的样品则应重新按 5.2 进行处理符合要求后再进样分析。待测样液中赭曲霉毒素 A 的浓度为 c_1 。液相色谱图详见附录 A。

5.5 空白试验

不称取试样,按 5.2 的步骤做空白实验,分析得到空白试样中待测物的浓度为 c_0 。

5.6 平行试验

按 5.2 步骤,对同一试样进行平行试验测定。

6 结果计算

样品中赭曲霉毒素 A 的含量按式(1)、式(2)计算:

$$X_1 = \frac{(c_1 - c_0) \times V}{W} \dots\dots\dots(1)$$

其中:

$$W = \frac{m}{V_1} \times \frac{V_2}{V_2 + V_3} \times V_4 \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X_1 ——样品中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c_1 ——试样液中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

c_0 ——空白试验赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——最终甲醇洗脱液体积,单位为毫升(mL);

W ——最终净化洗脱液所含的试样质量,单位为克(g);

m ——试样称取的质量,单位为克(g);

V_1 ——样品提取液总体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——移取样品滤液的体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——用于稀释滤液的缓冲液体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——通过免疫亲和柱的稀释后样品提取液体积,单位为毫升(mL)。

计算结果表示到小数点后一位。

7 精密度

在重复性条件下获得的两次独立实验结果的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

附录 A
(资料性附录)

赭曲霉毒素 A 标准溶液超高效液相色谱图

赭曲霉毒素 A 标准溶液超高效液相色谱图见图 A.1。

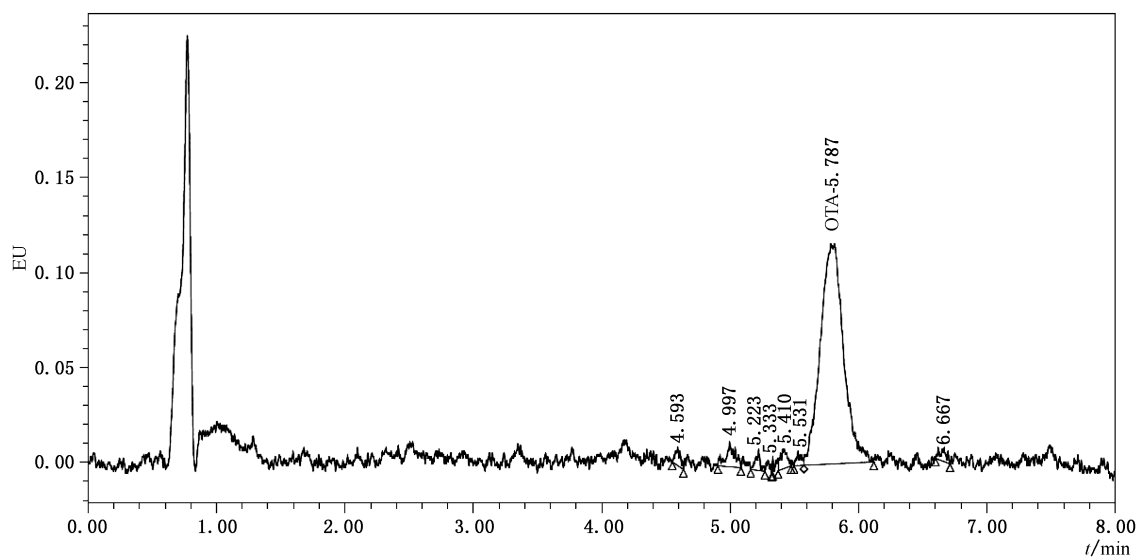


图 A.1 赭曲霉毒素 A 标准谱图