



中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6130—2017

粮油检验 粮食中伏马毒素 B_1 、 B_2 的测定 超高效液相色谱法

Inspection of grain and oils—Determination of fumonisins B_1 , B_2 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、安徽国家粮食质量监测中心、黑龙江粮油卫生检验监测站、湖南国家粮食质量监测中心、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、叶金、王松雪、吴宇、胡斌、徐春锋、许艳霞、李小明、李森、陆安祥。

粮油检验 粮食中伏马毒素 B₁、B₂ 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伏马毒素 B₁、B₂ 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相关制品中伏马毒素 B₁、B₂ 的测定。

本标准方法伏马毒素 B₁、B₂ 的检出限为 0.05 mg/kg,定量限为 0.25 mg/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伏马毒素 B₁、B₂,经免疫亲和柱净化、富集后,用邻苯二甲醛衍生,超高效液相色谱荧光检测器测定,外标法定量。

4 试剂和仪器设备

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 中一级水的要求。

4.1 试剂

4.1.1 甲醇(CH₃OH):色谱纯。

4.1.2 乙腈(CH₃CN):色谱纯。

4.1.3 四硼酸钠(Na₂B₄O₇·10H₂O):分析纯。

4.1.4 氯化钠(NaCl):分析纯。

4.1.5 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄):分析纯。

4.1.6 磷酸二氢钾(KH₂PO₄):分析纯。

4.1.7 氯化钾(KCl):分析纯。

4.1.8 浓盐酸(HCl):分析纯。

4.1.9 乙酸(CH₃COOH):色谱纯。

4.1.10 邻苯二甲醛(OPA,C₈H₆O₂):分析纯。

4.1.11 2-巯基乙醇(C₂H₆OS):分析纯。

4.1.12 0.1 mol/L 四硼酸钠溶液:称取 3.8 g 四硼酸钠(4.1.3),用水溶解并定容至 100 mL。

4.1.13 2 mol/L 盐酸溶液:将 1 体积浓盐酸(4.1.8)溶解在 5 体积水中。

4.1.14 乙腈水溶液(50+50):取 50 体积乙腈(4.1.2)加入 50 体积水。

4.1.15 磷酸盐缓冲液(PBS):将 8.0 g 氯化钠(4.1.4)、1.2 g 磷酸氢二钠(4.1.5)、0.2 g 磷酸二氢钾(4.1.6)、0.2 g 氯化钾(4.1.7)溶解于 990 mL 水中,用 2 mol/L 盐酸溶液(4.1.13)调节 pH 为 7.0,最后定容为 1 L。

4.1.16 1%乙酸水溶液:量取 99 体积水,加入 1 体积乙酸(4.1.9)。

4.1.17 衍生溶液:取 40 mg 邻苯二甲醛(4.1.10)加入 1 mL 甲醇(4.1.1)溶解,加入 0.1 mol/L 四硼酸钠溶液(4.2.1)5 mL 稀释,加入 2-巯基乙醇(4.1.11)80 μ L,混匀。过 0.22 μ m 滤膜后,存于具塞棕色瓶中,在室温避光处可储藏 1 周。

4.1.18 2%乙酸化甲醇:量取 98 体积甲醇(4.1.1),加入 2 体积乙酸(4.1.9)。

其他试剂应符合 GB/T 602 的要求。

4.2 标准品

4.2.1 伏马毒素 B₁ 和 B₂ 标准品:晶体,纯度 95%;或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.2.2 伏马毒素标准储备液:使用伏马毒素标准物质溶液;或准确称取适量伏马毒素 B₁ 和 B₂ 标准品(4.2.1),用乙腈水溶液(4.1.14)溶解,配成伏马毒素 B₁、B₂ 浓度均为 100 mg/L 的标准储备液。—20 $^{\circ}$ C 避光保存。

4.2.3 伏马毒素混合标准溶液:准确吸取适量伏马毒素 B₁、B₂ 标准储备液(4.2.2),用乙腈水溶液(4.1.14)定容,摇匀,配成伏马毒素 B₁、B₂ 浓度均为 10 mg/L 的混合标准溶液。

4.2.4 伏马毒素标准工作液:分别取适量伏马毒素混合标准溶液(4.2.3),用乙腈水溶液(4.1.14)稀释,配成伏马毒素 B₁、B₂ 浓度均为 0.1 mg/L、0.25 mg/L、0.50 mg/L、1.00 mg/L、2.00 mg/L、5.00 mg/L 的标准工作液。

4.3 材料与仪器设备

4.3.1 快速定性滤纸: ϕ 12 cm Whatman 4 号,或性能相当者。

4.3.2 滤膜:0.22 μ m,有机系。

4.3.3 玻璃微纤维滤纸: ϕ 9 cm Whatman GF/A,或性能相当者。

4.3.4 伏马毒素免疫亲和柱:对伏马毒素 B₁ 和 B₂ 均有 100% 的交叉反应性。

4.3.5 注射器:20 mL。

4.3.6 离心管:10 mL、50 mL。

4.3.7 三角瓶:250 mL。

4.3.8 量筒:100 mL、10 mL。

4.3.9 天平:感量 0.1 g 和 0.01 mg。

4.3.10 高速粉碎机。

4.3.11 空气压力泵。

4.3.12 氮气吹干仪。

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

4.3.14 离心机:转速 \geq 5 000 r/min。

4.3.15 调速多用振荡器(振荡频率 \geq 150 次)。

4.3.16 泵流操作架。

4.3.17 试验筛:1 mm 孔径。

4.3.18 样品瓶:2 mL。

4.3.19 玻璃内衬管:250 μ L。

4.3.20 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。

4.3.21 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(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。

柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

流动相:A 为 1%乙酸水溶液(4.1.16),B 为乙腈(4.1.2),等度洗脱,A : B=50 : 50。

流速:0.2 mL/min。

进样量:2 μL 。

荧光检测波长:激发波长 310 nm、发射波长 435 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(4.3.10)粉碎,过 1 mm 孔径试验筛(4.3.11),混合均匀后,取有代表性样品不少于 500 g,供检测用。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(4.1.14),高速均质提取 2 min,或者用调速多用振荡器(5.3.15)振荡提取 30 min,用定性滤纸(4.3.1)过滤或转移 25 mL 的提取液于 50 mL 的离心管中,于 5 000 r/min 离心 5 min。取 1.5 mL(V_2)滤液或离心管中上层液体,加入 35 mL(V_3)PBS 缓冲液(4.1.15)稀释,混匀,于 7 000 r/min 离心 10 min,离心液备用。

5.2.2 净化

将免疫亲和柱(4.3.4)与 20 mL 注射器(4.3.5)下端连接,将上述 36.5 mL 离心液(V_4)全部注入注射器内,将空气压力泵(4.3.11)与注射器连接,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 PBS 缓冲液(4.1.15)、10 mL 水淋洗亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃掉全部流出液,抽干免疫亲和柱。免疫亲和柱中注入 3 mL 酸化甲醇(4.1.18),流速以 1 滴/s 缓慢流出,收集全部洗脱液于 10 mL 离心管中,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,准确加入 0.5 mL(V)乙腈水溶液(4.2.3)溶解残留物,涡旋混合 30 s,过 0.22 μm 滤膜(4.3.2),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 衍生化反应

分别取上述净化液和标准工作液(4.2.4)各 100 μL ,置于装有内衬管(4.1.19)的样品瓶中,加入 100 μL OPA 衍生液(4.1.17),混合均匀后,静置 3 min,作为待测液,应立即进样分析。

5.4 标准曲线的制作

将衍生后伏马毒素标准系列溶液(4.2.4)由低到高浓度检测分析。以伏马毒素浓度为横坐标,相对

应的色谱峰面积为纵坐标,建立伏马毒素 B₁、B₂ 的标准曲线。

5.5 试样溶液的测定

待测样液(5.3)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 和 5.3 进行处理符合要求后再进样分析。待测样液中伏马毒素 B₁ 或 B₂ 的浓度为 c₁。液相色谱图参见附录 A。

5.6 空白试验

不称取试样,按 5.2 和 5.3 的步骤做空白实验,分析得到空白试样中待测物的浓度为 c₀。

5.7 平行试样

按 5.2、5.3 的操作步骤,对同一试样进行平行试验测定。

6 结果计算

样品中伏马毒素 B₁、B₂ 的含量,按式(1)、式(2)计算:

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

其中:

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

式中:

X₁——样品中伏马毒素 B₁、B₂ 的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c₁——试样液中伏马毒素 B₁、B₂ 的含量,单位为毫克每升(mg/L);

c₀——空白试验伏马毒素 B₁、B₂ 的含量,单位为毫克每升(mg/L);

V——最终定容体积,单位为毫升(mL);

W——最终样液所含的试样质量,单位为克(g);

m——试样称取的质量,单位为克(g);

V₁——样品提取液总体积,单位为毫升(mL);

V₂——移取样品滤液的体积,单位为毫升(mL);

V₃——用于稀释滤液的缓冲液体积,单位为毫升(mL);

V₄——通过免疫亲和柱的稀释后样品提取液体积,单位为毫升(mL);

f——稀释倍数。

计算结果表示到小数点后两位。

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 15%。

附录 A
(资料性附录)

伏马毒素 B₁、B₂ 标准溶液超高效液相色谱图

伏马毒素 B₁、B₂ 标准溶液超高效液相色谱图见图 A.1。

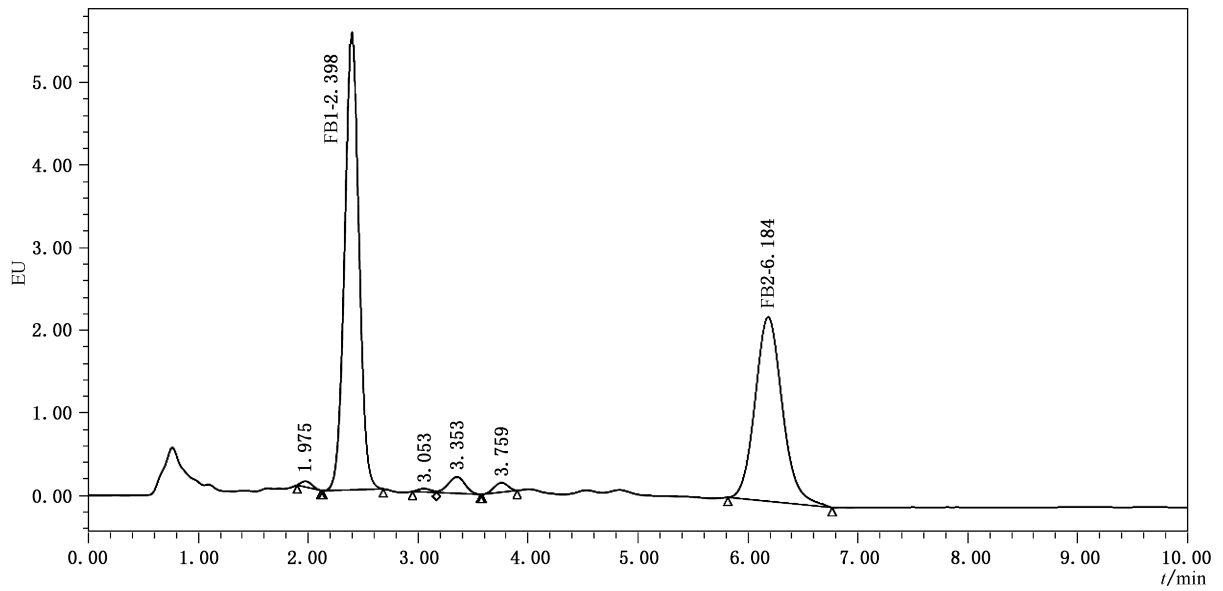


图 A.1 伏马毒素 B₁、B₂ (浓度比例 1 : 1) 谱图