

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T1103.3—2006

转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养素第 3 部分：硫代葡萄糖苷的测定

Safety assessment of genetically modified plant and derived products

Part 3: assay of anti-nutrients glycosinolate

2006-07-10 发布

2006-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 为资料性附录，附录 B 为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：中国农业科学院油料作物研究所、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所、农业部科技发展中心、中国农业大学、天津市卫生防病中心。

本标准主要起草人：李培武、杨月欣、丁小霞、韩军花、张文、李宁、汪其怀、黄昆仑、刘克明、刘培磊、连庆。

本标准首次发布。

转基因植物及其产品食用安全检测

抗营养素第3部分：硫代葡萄糖苷的测定

1 范围

本标准规定了转基因油菜籽及其产品中硫代葡萄糖苷的高效液相色谱测定方法。
本标准适用于转基因油菜籽及其产品中硫代葡萄糖苷的高效液相色谱测定。

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，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 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 14488.1 油料种籽含油量测定法

GB/T 14489.1 油料水分及挥发物含量测定法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

转基因油菜籽 **genetically modified rapeseed**

指利用基因工程技术改变基因组构成，用于农业生产或者农产品加工的油菜籽。

3.2

转基因油菜籽产品 **products derived from genetically modified rapeseed**

指转基因油菜籽的直接加工产品和含有转基因油菜籽的产品。

3.3

相对校正系数 **response factors**

待测硫代葡萄糖苷的摩尔吸光系数与内标的摩尔吸光系数的相对比值。

4 原理

NY/T1103.3—2006

用 70% 甲醇水溶液提取硫代葡萄糖苷，然后在阴离子交换树脂上纯化，并酶解脱去硫酸根，反相色谱柱分离，紫外检测器检测硫代葡萄糖苷。

5 试验材料

转基因油菜籽及其产品、受体油菜籽及其产品。如果对转基因油菜籽产品中的硫代葡萄糖苷进行测定，转基因油菜籽产品和受体油菜籽产品的处理条件应相同。

上述材料的水分含量和种植环境应基本一致。

6 试剂

除非另有说明，仅使用分析纯试剂；水为蒸馏水。

6.1 硫酸酯酶溶液：*Helix pomatia* H1 型（EC 3.1.6.1），每毫升硫酸酯酶溶液的活性单位不低于 0.5，硫酸酯酶溶液应即配即用。

6.2 葡聚糖凝胶悬浮液：称取 10 g DEAE Sephadex A 25 葡聚糖凝胶，浸泡在过量的 2 mol/L 醋酸溶液中，静置沉淀，再加入 2 mol/L 醋酸溶液，直到液体体积是沉淀体积的 2 倍，于 4℃ 冰箱中存放，待用。

6.3 70% 甲醇溶液：取 70 mL 甲醇，加水定容至 100 mL。

6.4 0.02 mol/L 醋酸钠溶液：称取 0.272 g 醋酸钠（ $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ），加入 800 mL 水溶解，用醋酸调节溶液的 pH 值至 4.0，加水定容至 1 L。

6.5 6 mol/L 甲酸咪唑溶液：称取 204 g 咪唑，溶解于 113 mL 甲酸中，待溶液冷却后加水定容至 500 mL。

6.6 内标：用丙烯基硫代葡萄糖苷（ $M_r=415.49$ ）作内标，当样品中含有丙烯基硫代葡萄糖苷时，用苯甲基硫代葡萄糖苷（ $M_r=447.52$ ）作内标。对硫代葡萄糖苷含量低于 20.0 $\mu\text{mol/g}$ 的样品，可将下述 6.6.1 至 6.6.4 中的内标溶液浓度降为 1 mmol/L 至 3 mmol/L。内标溶液在 4℃ 的冰箱中可存放三周，在 -18℃ 条件下可保存更长时间，内标溶液的纯度检定见附录 A。

6.6.1 5 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液：称取 207.7 mg 丙烯基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。

6.6.2 20 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液：称取 831.0 mg 丙烯基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。

6.6.3 5 mmol/L 苯甲基硫代葡萄糖苷溶液：称取 223.7 mg 苯甲基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。

6.6.4 20 mmol/L 苯甲基硫代葡萄糖苷溶液：称取 895.0 mg 苯甲基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。

6.7 流动相 A: 超声波脱气 30s 的水。

6.8 流动相 B: 取 200 mL 色谱级乙腈, 加入 800 mL 水, 浑匀, 超声波脱气 30s。

7 仪器和设备

7.1 通常实验室仪器设备。

7.2 研钵或微型研磨机。

7.3 聚丙烯离子交换微柱: 底部筛板为 100 目。

7.4 离心机: 带有 10 mL 转头, 并能获得 5000 g 的相对离心力。

7.5 0.45 μm 水溶性微孔滤膜。

7.6 色谱柱: 填料颗粒小于或等于 10 μm 的反相 C_{18} 或 C_8 柱, 例如: Novapak C_{18} 柱, 5 μm (150 mm \times 3.9 mm); Lichrosorb Rp18 柱, 5 μm (150 mm \times 4.6 mm); Spherisorb C_{18} 柱, 10 μm (150 mm \times 4 mm); Lichrospher Rp8 柱, 5 μm (125 mm \times 4 mm)。

7.7 高效液相色谱仪: 具备梯度洗脱, 柱温可控制在 30 $^{\circ}\text{C}$, 带紫外检测器。

8 试样的制备

按照 GB 5491 的规定对试验材料进行缩分, 将缩分后的试验材料分成三等份。第一份按 GB/T 14489.1 的规定测定水分及挥发物含量, 第二份按 GB/T 14488.1 的规定测定含油量, 第三份为硫代葡萄糖苷待测试样。

如果试验材料的水分及挥发物含量超过 10%, 应在 45 $^{\circ}\text{C}$ 条件下通风干燥, 并将干燥后的待测试样在微型粉碎机中粉碎, 过 40 目筛, 然后立即连续完成 9.1 和 9.2。

9 操作步骤

9.1 称样

分别称取 200.0 mg 待测试样至 A、B 两支离心管中。

9.2 硫代葡萄糖苷的提取

9.2.1 将离心管 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 min, 加入 2 mL 70% 沸甲醇溶液后, 立即加入 200 μL 5 mmol/L 内标溶液至 A 管中, 200 μL 20 mmol/L 内标溶液至 B 管中。

9.2.2 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 其间每隔 2 min 取出离心管在旋涡混合器上旋涡混合, 然后取出离心管冷却至室温, 5000 g 离心 3 min, 分别转移上清液至 10 mL 刻度试管 A'、B' 中。

9.2.3 分别向 A、B 管中再加入 2 mL 70% 沸甲醇溶液, 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴约 30 s, 旋涡混匀后, 75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, 其间每隔 2 min 取出离心管旋涡混合, 然后取出离心管冷却至室温, 5000 g

离心 3 min, 分别转移上清液至原刻度试管 A'、B' 中。

9.2.4 用水调节 A'、B' 管中的提取液至 5 mL, 混匀。此提取液在-18 °C 暗处可保存 2 周。

9.3 离子交换微柱的制备

每一个试样提取液准备一支聚丙烯离子交换微柱, 垂直置于试管架上。取 0.5 mL 充分混匀的葡聚糖凝胶悬浮液至每一离子交换微柱中, 注意不要使悬浮液粘附在柱壁。静置待液体排干后, 取 2 mL 6 mol/L 甲酸咪唑溶液冲洗树脂, 排干后, 再用 1 mL 水冲洗树脂两次, 每次均让水排干。

9.4 纯化、脱硫酸根

9.4.1 取 1 mL 提取液缓缓加入已制备好的离子交换微柱中, 注意不能搅动树脂表面, 待液体排干后, 分别加入 1 mL 0.02 mol/L 醋酸钠溶液两次, 每次加入后均让液体排干。

9.4.2 加入 100 μ L 硫酸酯酶溶液至离子交换微柱, 35 °C 条件下反应 16 h。

9.4.3 分别用 1 mL 水冲洗离子交换微柱 2 次, 洗脱液收集于试管中。

9.4.4 用水将洗脱液定容至 5 mL, 充分混匀后, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 待进样。洗脱液在-18°C 暗处可存放 1 周。

9.5 空白试验

用相同的样品进行相同的前处理, 但不加内标物质, 以检定样品中内标物质是否存在。

9.6 色谱条件

9.6.1 仪器条件: 流动相流速为 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 紫外检测器检测波长 229 nm。

9.6.2 洗脱梯度

9.6.2.1 对 Spherisorb C₁₈ 柱, 10 μ m (150 mm×4 mm) 和 Novapak C₁₈ 柱, 5 μ m (150 mm×3.9 mm), 洗脱梯度见表 1。

表 1 Spherisorb C₁₈ 柱和 Novapak C₁₈ 柱洗脱梯度

时间	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 min	15	85
10 min	100	0
12 min	100	0
15 min	15	85
20 min	15	85

9.6.2.2 对 Lichrosorb RP18 柱, 5 μ m (150 mm×4.6 mm), 洗脱梯度见表 2。

表2 Lichrosorb RP18 柱洗脱梯度

时间	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 min	100	0
1 min	100	0
20 min	0	100
25 min	100	0
30 min	100	0

9.6.2.3 对Lichrospher RP8 柱, 5 μm (125 mm×4 mm), 洗脱梯度见表3。

表3 Lichrospher RP8 柱洗脱梯度

时间	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0 min	100	0
2.5 min	100	0
20 min	0	100
25 min	0	100
27 min	100	0
32 min	100	0

9.7 色谱测定

进样量 10 μL, 记录峰面积。

10 结果表示

10.1 单组分硫代葡萄糖苷含量的计算

10.1.1 以每克干基脱脂油菜籽中所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示, 按式(1)计算:

$$DI = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-w} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

DI — 干基脱脂油菜籽中硫代葡萄糖苷含量, 单位为微摩尔每克 (μmol/g);

Ag — 脱硫硫代葡萄糖苷峰面积;

As — 内标峰面积;

Kg — 脱硫硫代葡萄糖苷相对校正系数, 见附录 B;

NY/T1103.3—2006

m — 试样质量，单位为克 (g)；

n — 试样中加入内标的量，单位为微摩尔 (μmol)；

w — 试样中水分、挥发物和含油量之和，以质量百分数表示 (%)。

计算结果表示到小数点后两位。

10.1.2 以每克脱脂油菜籽含标准水分及挥发物时所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示，按式

(2) 计算：

$$D2 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-w} \times (1-Ws) \dots\dots\dots (2)$$

式中：

Ag 、 As 、 n 、 m 、 Kg 、 w 同式 (1)；

$D2$ — 脱脂油菜籽含标准水分及挥发物时硫代葡萄糖苷的含量，单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$)；

Ws — 标准水分及挥发物含量，以质量百分数表示，数值为 8.5% 或 9%。

计算结果表示到小数点后两位。

10.1.3 以每克干基油菜籽中所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示，按式 (3) 计算：

$$D3 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-wt} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

Ag 、 As 、 n 、 m 、 Kg 同式 (1)；

$D3$ — 干基油菜籽中硫代葡萄糖苷含量，单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$)；

wt — 试样中水分及挥发物含量，以质量百分数表示 (%)。

计算结果表示到小数点后两位。

10.1.4 以每克油菜籽含标准水分及挥发物时所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示，按式 (4)

计算：

$$D4 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-wt} \times (1-Ws) \dots\dots\dots (4)$$

式中：

Ag 、 As 、 n 、 m 、 Kg 、 wt 、 Ws 同式 (1)、(2) 和 (3)；

$D4$ — 油菜籽含标准水分及挥发物时硫代葡萄糖苷的含量，单位为微摩尔每克 ($\mu\text{mol/g}$)。

计算结果表示到小数点后两位。

10.2 硫代葡萄糖苷含量的计算

硫代葡萄糖苷含量等于单组分硫代葡萄糖苷（单组分峰面积应大于峰面积总和的 1%）含量的总和，以每克样品中所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示。如果 A、B 两管硫代葡萄糖苷含量的测定值满足 11 中允许差的要求，硫代葡萄糖苷的含量为两测定值的算术平均值。计算结果表示到小数点后两位。

11 允许差

11.1 同一试样、同一方法、同一操作者、同一仪器、同一实验室短期内两次测定值允许差：如果硫代葡萄糖苷含量低于 20.00 $\mu\text{mol/g}$ ，允许差不大于 2.00 $\mu\text{mol/g}$ ；如果硫代葡萄糖苷含量在 20.00 $\mu\text{mol/g}$ —35.00 $\mu\text{mol/g}$ 范围内，允许差不大于 4.00 $\mu\text{mol/g}$ ；如果硫代葡萄糖苷含量大于 35.00 $\mu\text{mol/g}$ ，允许差不大于 6.00 $\mu\text{mol/g}$ 。

11.2 同一试样、同一方法、不同操作者、不同仪器、不同实验室两次测定值允许差：如果硫代葡萄糖苷含量低于 20.00 $\mu\text{mol/g}$ ，允许差不大于 4.00 $\mu\text{mol/g}$ ；如果硫代葡萄糖苷含量在 20.00 $\mu\text{mol/g}$ —35.00 $\mu\text{mol/g}$ 范围内，允许差不大于 8.00 $\mu\text{mol/g}$ ；如果硫代葡萄糖苷含量大于 35.00 $\mu\text{mol/g}$ ，允许差不大于 12.00 $\mu\text{mol/g}$ 。

附录 A
(资料性附录)
内标纯度的检定

A.1 检定方法

内标纯度的检定方法主要包括：

- 用本标准规定的方法进行高效液相色谱分析。
- 用高效液相色谱的离子对技术分析完整的内标（不脱硫酸根的内标）。
- 用气相色谱分析脱硫酸盐和硅烷化的内标。
- 用芥子酶（EC 3.2.3.2）水解内标，根据水解产物葡萄糖的浓度检定内标的纯度。

A.2 结果分析

如果用色谱方法检定内标纯度，当色谱图中主峰面积不小于总峰面积的 98% 时，表明内标纯度符合本标准要求。

如果用酶水解方法检定内标纯度，当水解产物葡萄糖的摩尔浓度不小于内标摩尔浓度的 98% 时，表明内标纯度符合本标准要求。

附录 B
(规范性附录)
相对校正系数

表 B.1 脱硫硫代葡萄糖苷的相对校正系数

序号	硫代葡萄糖苷名称		相对校正系数 (Kg)
	中文	英文	
1	2-羟基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoprogoitrin	1.09
2	反式 2-羟基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoepi-progoitrin	1.09
3	丙烯基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfosinigrin	1.00
4	4-甲亚砷丁基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoglucoraphanin	1.07
5	2-羟基-4-戊烯基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfogluconapoleiferin	1.00
6	5-甲亚砷戊基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoglucoalyssin	1.07
7	3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfogluconapin	1.11
8	4-羟基-3-吲哚甲基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfo-4-hydroxyglucobrassicin	0.28
9	4-戊烯基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoglucobrassicinapin	1.15
10	苯甲基(苄基)脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoglucotropaeolin	0.95
11	3-吲哚甲基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoglucobrassicin	0.29
12	苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfogluconasturtiin	0.95
13	4-甲氧基-3-吲哚甲基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfo-4-methoxyglucobrassicin	0.25
14	1-甲氧基-3-吲哚甲基脱硫硫代葡萄糖苷	Desulfoneoglucobrassicin	0.20
15	其它	Other desulfoglucosinolates	1.00