

脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物 分析报告

一、检测方法:

依据国家标准: 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定
(GB5009.111-2016)

二、客户要求:

食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定

三、方法原理

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。

四、试剂和材料

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 聚乙二醇 [相对分子质量为 8000, HO(CH₂CH₂O)_nH]
- 4.1.4 氯化钠 (NaCl)
- 4.1.5 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)
- 4.1.6 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄)
- 4.1.7 氯化钾 (KCl)
- 4.1.8 盐酸 (HCl)

4.2 试剂配制

4.2.1 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS): 称取 8.00g 氯化钠、1.20g 磷酸氢二钠、0.20g 磷酸二氢钾、0.20g 氯化钾, 用 900mL 水溶解, 用盐酸调节 pH 至 7.0, 用水定容至 1000mL。

4.2.2 甲醇-水溶液(20+80): 量取 200mL 甲醇加入到 800mL 水中, 混匀。

4.2.3 乙腈-水溶液(10+90): 量取 100mL 乙腈加入到 900mL 水中, 混匀。

4.3 材料与仪器

4.3.1 高效液相色谱仪: 带柱温箱和紫外检测器

- 4.3.2 色谱柱: C18 柱, 4.60 mm * 150 mm, 粒径为 5.0 μm 。
- 4.3.3 电子天平:感量 0.01g 和 0.00001g
- 4.3.4 高速粉碎机:转速 10000r/min
- 4.3.5 筛网: 1mm~2mm 孔径
- 4.3.6 超声波/涡旋振荡器或摇床
- 4.3.7 氮吹仪
- 4.3.8 高速离心机:转速 \geq 12000r/min
- 4.3.9 移液器:量程 10 μL ~100 μL 和 100 μL ~1000 μL
- 4.3.10 脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱:柱容量 \geq 1000ng(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。
- 4.3.11 玻璃纤维滤纸:直径 11cm, 孔径 1.5 μm
- 4.3.12 水相微孔滤膜:0.45 μm
- 4.3.13 聚丙烯刻度离心管:具塞 50mL
- 4.3.14 玻璃注射器:10mL
- 4.3.15 空气压力泵

五、标准系列配置

5.1 标准储备溶液(100 $\mu\text{g/mL}$):称取脱氧雪腐镰刀菌烯醇 1mg(准确至 0.01mg),用乙腈溶解并定容至 10mL。将溶液转移至试剂瓶中,在-20 $^{\circ}\text{C}$ 下密封保存,有效期 1 年。

5.2 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 100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL、2000ng/mL、5000ng/mL 的标准系列工作液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7d。

六、样品前处理

6.1 试样制备

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

6.1.2 酒类:取散装酒至少 1L,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 100g(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°C 冰箱冷藏 30min,过滤或超声脱气后方可使用。

6.1.3 酱油、醋、酱及酱制品:取至少 1L 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 100g(mL)储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

6.2 试样提取

6.2.1 谷物及其制品:称取 25g(准确到 0.1g)磨碎的试样于 100mL 具塞三角瓶中加入 5g 聚乙二醇,加水 100mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20min。以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6000r/min 下离心 10min),收集滤液 A 于干净的容器中。10000r/min 离心 5min。

6.2.2 酒类:取酒样 20g(准确到 0.1g),加入 1g 聚乙二醇,用水定容至 25.0mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20min。用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6000r/min 下离心 10min),收集滤液 B 于干净的容器中。

6.2.3 酱油、醋、酱及酱制品:称取样品 25g(准确到 0.1g),加入 5g 聚乙二醇,用水定容至 100mL,混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中超声或振荡 20min。以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清(或 6000r/min 下离心 10min),收集滤液 C 于干净的容器中。

6.3 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 2.0mL,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 5mLPBS 缓冲盐溶液和 5mL 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。

6.4 洗脱

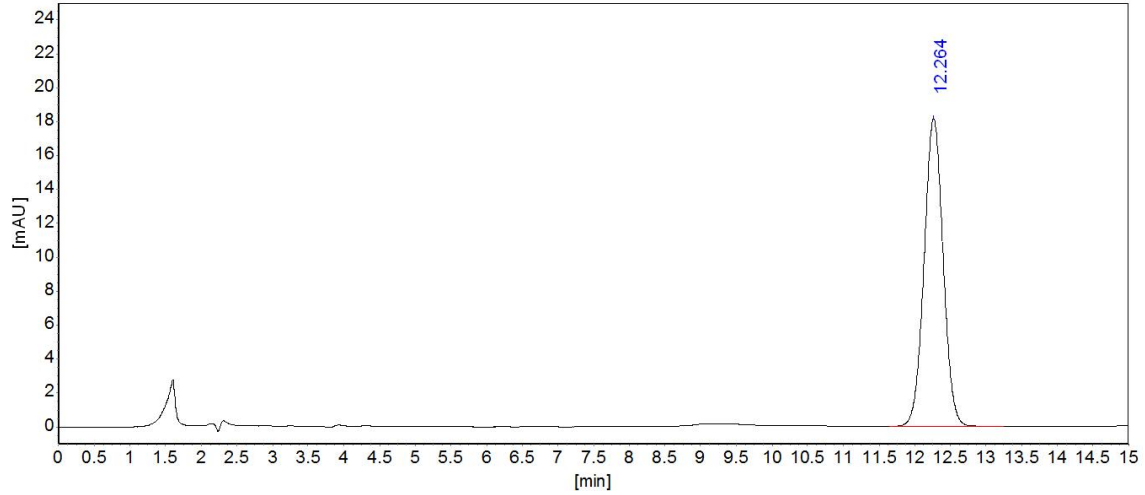
准确加入 2mL 甲醇洗脱亲和柱，控制每秒 1 滴的下滴速度，收集全部洗脱液至试管中，在 50°C 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干，加入 1.0mL 初始流动相，涡旋 30s 溶解残留物，0.45 μ m 滤膜过滤，收集滤液于进样瓶中以备进样。

七、仪器条件

八、分析结果

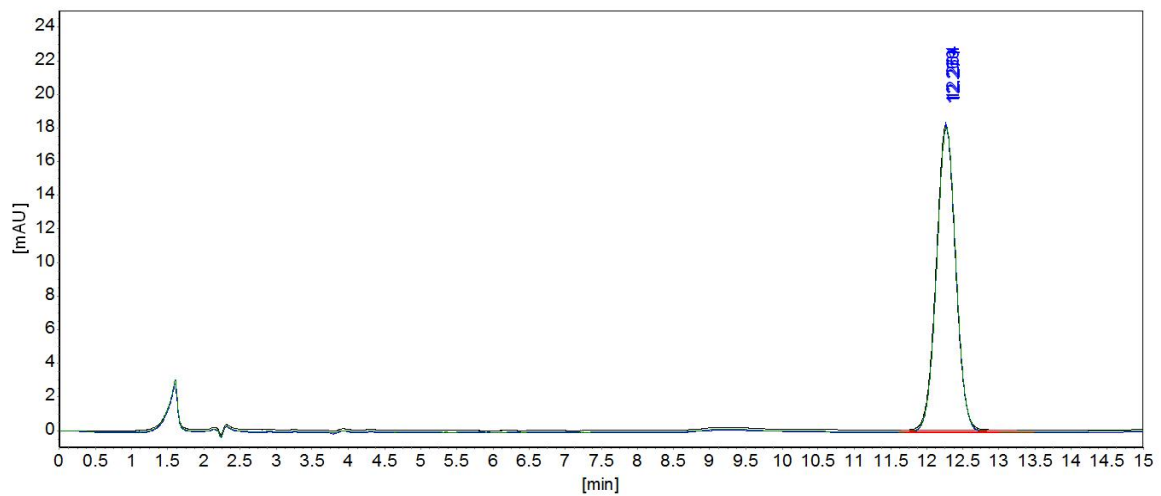
8.1 液相色谱图及结果

a) 标样谱图及结果(5ppm)



名称	t/min	峰面积/ $\mu\text{Au}\cdot\text{s}$	峰高/ μAu	理论塔板	拖尾因子
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	12.264	337200.5	18170.9	10203	1.020

b) 标样重复性谱图及结果(10ppm)



序号	脱氧雪腐镰刀菌烯醇		
	t/min	峰面积/ $\mu\text{Au}\cdot\text{s}$	峰高/ μAu
1	12.264	337200.5	18170.9
2	12.269	337189.4	18113.4
3	12.271	336868.7	18117.7
平均值	12.268	337086.2	18134.0
RSD/%	0.027	0.056	0.177

联系电话：0576-89965381

地址：浙江温岭经济开发区百丈南路95号

分析员：陈卿卿

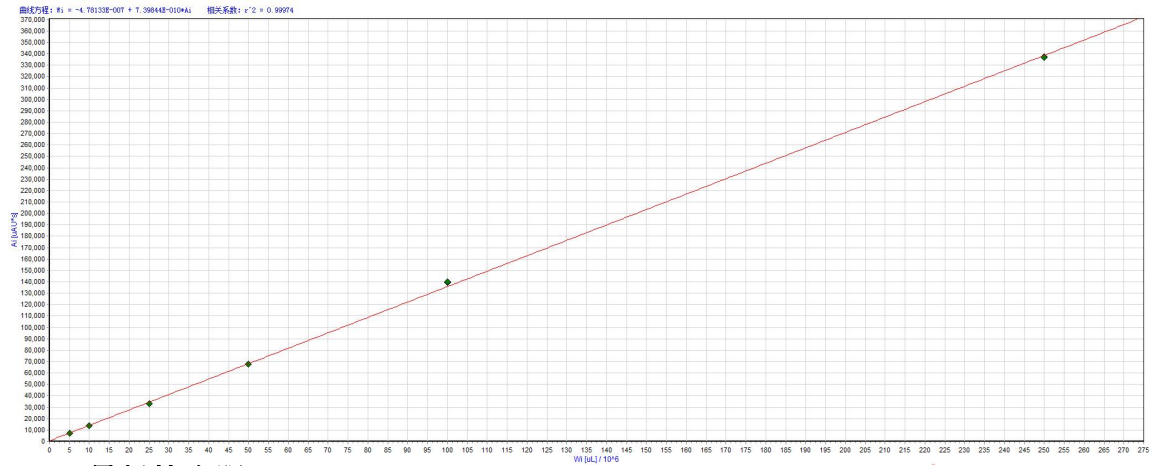
邮编：317500

审核：刘健

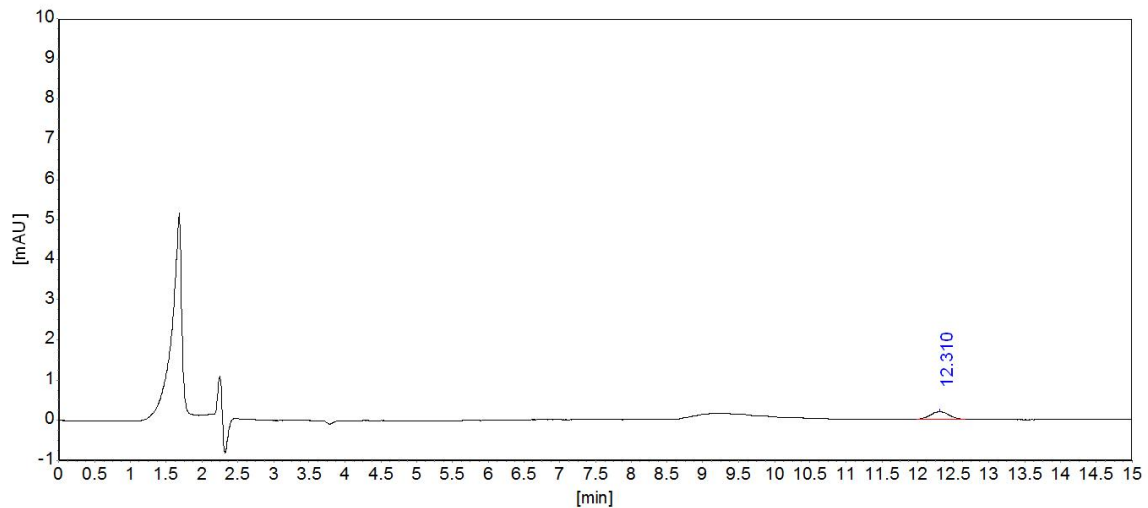
8.2 标准曲线

标准曲线的绘制：0.1ppm、0.2ppm、0.5ppm、1ppm、2ppm、5ppm 各取 3 针重复性数据计算得到。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇：相关系数为 0.99974



8.3 最低检出限 (0.05ppm)



名称	t/min	峰面积/μAu*s	峰高/μAu	理论塔板	拖尾因子
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	12.310	3450.9	192.0	10504	1.038

计算得到样品的检出限：（谷物、酱油类的称样量按 25g 计算，最终样品定容到 50mL。酒类的称样量按 20g 计算，最终定容到 12.5mL。）

谷物、酱油类： $0.05 \times 50 \div 25 = 100(\mu g / kg)$

酒类： $0.05 \times 12.5 \div 20 = 31.25(\mu g / kg)$

满足标准中谷物、酱油类检出限 100μg/kg、酒类 50μg/kg 的要求。

联系电话：0576-89965381

地址：浙江温岭经济开发区百丈南路95号

分析员：陈卿卿

邮编：317500

审核：刘健

8.4 实验结果

方法验证结论：各测试水平的检出限、测定下限、精密度、准确度结果汇总：

方法验证汇总表

化合物	检出限 ($\mu\text{g/Kg}$)	测定下限 ($\mu\text{g/Kg}$)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)	标准曲线线性 相关系数
脱氧雪腐镰 刀菌烯醇	100	200	0.027	0.056	0.99974

由以上实验结果可知，本方法完全可以达到国标方法要求。