



中华人民共和国国家标准

GB/T 5099.111—2003
代替 GB/T 14929.5—1994

谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇 的测定

Determination of deoxynivalenol in cereal
and cereal products

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB/T 14929.5—1994《谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定方法》。

本标准与 GB/T 14929.5—1994 相比主要修改如下：

- 修改了标准的中文名称，标准中文名称改为：《谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定》；
- 按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准起草单位：卫生部食品卫生监督检验所。

本标准第一法主要起草人：魏润蕴。

本标准第二法主要起草人：阳传和、罗雪云、计融。

原标准于1994年首次发布，本次为第一次修订。

谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定

1 范围

本标准规定了谷物及其制品(蛋糕、饼干、面包等)中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON、呕吐毒素)的薄层色谱测定方法及免疫测定方法(ELISA)。

本标准适用于谷物(小米、玉米、大麦等)及其制品(蛋糕、饼干、面包等)中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON、呕吐毒素)的测定。

本标准第一法检出限 0.1 mg/kg,第二法检出限为 0.1 ng/kg。

第一法 薄层色谱测定法

2 原理

谷物及其制品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇经提取、净化、浓缩和硅胶 G 薄层展开后,加热薄层板。由于在制备薄层板时加入了三氯化铝,使脱氧雪腐镰刀菌烯醇在 365 nm 紫外光灯下显蓝色荧光,与标准比较。

3 试剂

- 3.1 三氯甲烷。
- 3.2 无水乙醇。
- 3.3 甲醇。
- 3.4 石油醚 60℃~90℃或 30℃~60℃。
- 3.5 乙酸乙酯。
- 3.6 乙腈。
- 3.7 丙酮。
- 3.8 异丙醇。
- 3.9 乙醚。
- 3.10 无水乙醚。
- 3.11 氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$):化学纯。
- 3.12 中性氧化铝:层析用,经 300℃活化 4 h,置于干燥器中备用。
- 3.13 活性炭,20 g 活性炭,用 3 mol/L 盐酸溶液浸泡过夜、抽滤后,用热蒸馏水洗至无氯离子,在 120℃烘干备用。
- 3.14 硅胶 G:薄层层析用。
- 3.15 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(以下简称 DON)标准溶液,精密称取,5.0 mg DON,加乙酸乙酯-甲醇(19+1)溶解。转入 10 mL 容量瓶中,用乙酸乙酯-甲醇(19+1)稀释至刻度,此标准溶液含 DON 0.5 mg/mL。吸取此标准溶液 0.5 mL,用乙酸乙酯-甲醇(19+1)稀释至 10 mL,此溶液每毫升含 DON 25 μg 。

4 仪器

- 4.1 小型粉碎机。
- 4.2 电动振荡器。
- 4.3 75 mL 玻璃蒸发皿。

- 4.4 层析柱;内径 2 cm,长 10 cm,不具活塞。
- 4.5 10 mL 具塞浓缩瓶;底部具 0.2 mL 刻度尾管。
- 4.6 玻璃板;5 cm×20 cm。
- 4.7 薄层涂布器;0.3 mm。
- 4.8 展开槽;内长 25 cm,宽 6 cm,高 4 cm。
- 4.9 紫外光灯;365 nm。
- 4.10 微量注射器;10 μ L,50 μ L。
- 4.11 50 mL 平底管。
- 4.12 双波长薄层扫描仪;带数据处理机。

5 分析步骤

5.1 提取

称取 20 g 粉碎试样置于 200 mL 具塞锥形瓶中,加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(8+2),密塞。在瓶塞上涂层水,盖严防漏,振荡 1 h,通过折叠快速定性滤纸过滤,取 25 mL 滤液于 75 mL 玻璃蒸发皿中,置 90℃ 水浴上通风挥干。

5.2 净化

5.2.1 液-液分配

5.2.1.1 谷物:用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中的残渣,洗入 100 mL 分液漏斗中,再用 20 mL(玉米试样用 30 mL)甲醇-水(4+1)分次洗涤蒸发皿,转入同一分液漏斗中。

5.2.1.2 谷物制品(蛋糕、饼干、面包等):用 100 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中的残渣,洗入 250 mL 分液漏斗中,再用 30 mL 甲醇-水(4+1)分次洗涤蒸发皿,转入同一分液漏斗中。

振摇分液漏斗 1.5 min,静置约 15 min 使分层后,将下层甲醇-水提取液过柱净化,不要将两相交界面的白色絮状物放入柱内。

5.2.2 柱净化

5.2.2.1 小麦及其制品:在层析柱下端与小管连接处塞约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝,敲平表面,再加 0.4 g 活性炭,敲紧。将层析柱下端小管插入一橡皮塞,塞在抽滤瓶上,抽滤瓶中放一平底管接受过柱液,将抽滤瓶接上水泵或真空泵,稍稍开启泵,使活性炭压紧,将分液漏斗中的甲醇-水提取液小心地沿管壁加入柱内,控制流速为每 15 s 18 滴~20 滴(3 mL/min),甲醇-水提取液过柱快完毕时,加入 10 mL 甲醇-水(4+1)淋洗柱,抽滤,直至柱内不再有液体流出。过柱速度控制在 2 mL/min~3 mL/min,速度太快净化效果不好,太慢耗时太长。

5.2.2.2 玉米:同 5.2.2.1,只是将活性炭的用量改为 0.3 g。

5.3 制备薄层层析用样液

将过柱后的洗脱液倒入 75 mL 玻璃蒸发皿中,用少量甲醇-水(4+1)洗涤平底管。将蒸发皿置沸水浴上浓缩至干。

5.3.1 小麦:趁热加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,在水浴锅上轻轻地反复转动蒸发皿数次,使充分沸腾将残渣中的 DON 溶出,并将乙酸乙酯挥发至干,再加入 3 mL 乙酸乙酯同样处理一次,将溶剂挥干,最后加 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,放冷至室温后转入浓缩瓶中,再用三份 1.5 mL 乙酸乙酯洗涤蒸发皿,并入浓缩瓶中。

5.3.2 小麦制品、玉米:趁热加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,在水浴锅上轻轻地反复转动蒸发皿数次,使充分沸腾,将残渣中 DON 溶出,放冷至室温后转入浓缩瓶中。加约 0.5 mL 甲醇-丙酮(1+2)于蒸发皿中,用玻璃棒搅动溶解残渣,将蒸发皿置水浴锅上挥干溶剂后,加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,转动蒸发皿,使充分沸腾,放冷至室温后转入同一浓缩瓶中,再用 0.5 mL 甲醇-丙酮(1+2)和 3 mL 乙酸乙酯同样处理一次,乙酸乙酯提取液并入浓缩瓶中。

将浓缩瓶置约 95℃ 水浴锅中,用蒸汽加热吹氮气浓缩至干,放冷至室温后加入 0.2 mL 三氯甲烷-乙腈(4+1)溶解残渣留作薄层层析用。

5.4 测定

5.4.1 薄层板的制备:4 g 硅胶 G 加约 9 mL 15% 氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)水溶液,研磨约 2 min 呈粘稠状,铺成 5 cm×20 cm 的薄层板三块,置室温干燥后,于 105℃ 活化 1 h,贮于干燥器中备用。

5.4.2 点样:在每块薄层板上距下端 2.5 cm 的基线上点样。

第一块板:对每一个试样先点第一块薄层板。在距板左边缘 1.8 cm 处点 25 μL 样液,在距板上端 1.5 cm 处的横线上并与基线试样点相对应的位置上点 2 μL DON 标准液(50 ng)。按 5.4.3.1 条下横展薄层板,挥干溶剂后再在薄层板上距左边缘 1 cm 处的基线上点 2 μL DON 标准液(50 ng)。

第二块板:在第一块板上未显荧光的试样则需在第二块薄层板上距左边缘 0.8 cm~1 cm 处滴加 25 μL 样液,加 1 μL 标准液(25 ng),在距左边缘 2 cm 处滴加 1 μL 标准液(25 ng),在距右边缘 1.2 cm 处滴加 2 μL 标准液。对阳性试样则进行粗略定量:在薄层板上距左边缘 0.8 cm~1 cm 处滴加样液点(根据情况估计滴加量,或稀释后定量),在距板左边缘 2 cm 处和在距右边缘 1.2 cm 处分别滴加二个标准点,DON 的量可为 50 ng、75 ng、100 ng。再在距板上端 1.5 cm 处的横线上点三个 DON 标准点(各约 50 ng),使之与基线上的三个点相对应。

5.4.3 展开

横展剂:乙醚、乙醚-丙酮(95+5)或无水乙醚。任选其中一种,使试样 DON 点偏离原点 0.7 cm~1 cm,刚好与杂质荧光分开。

纵展剂:三氯甲烷-丙酮-异丙醇(8+1+1);

三氯甲烷-丙酮-异丙醇-水(7.5+1+1.5+0.1)。

5.4.3.1 横展:在展开槽内倒入 10 mL 横展剂。将点好样的薄层板靠液点的长边斜浸入溶剂,展至板端过 1 min~2 min,取出通风挥干 3 min。对小麦制品还须再用 10 mL 石油醚(30℃~60℃)横展一次,展至板端过 1 min,取出通风挥干 5 min。

5.4.3.2 纵展:在展开槽内倒入 10 mL 纵展剂。将横展挥干后的薄层板置展开槽内纵展 15 cm,取出通风挥干 10 min,由于 DON 与杂质分离的效果受空气湿度影响较大,当板面分离效果不太好时即第一块薄层板的试样点附近有杂质荧光干扰时,可按极性大小依次换用以下几种展开方式:

- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇(8+1+1)。
- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇(8+1+1)并在展开槽盖内面贴上水饱和的滤纸。
- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇-水(7.5+1+1.5+0.1)。
- 三氯甲烷-丙酮-异丙醇-水(7.5+1+1.5+0.1)并在展开槽内面贴上水饱和的滤纸。改换纵展方式,展开第二块薄层板。如展开槽内极性太大,会使 DON 点变偏。

5.4.4 显荧光:先观察未加热的薄层板可见到显蓝紫荧光的干扰点,这时 DON 不显荧光,加热薄层板后,杂质点仍显荧光,它在 DON 荧光点附近,但不干扰 DON。然后将此薄层板置 130℃ 烘箱中加热 7 min~10 min,取出放在冷的表面上 1 min~5 min 后于 365 nm 紫外光灯下观察。

5.4.5 观察与评定:薄层板经横展后,板上样液点的 DON 移动约 0.7 cm~1 cm,正是根据这一点在纵展后使试样 DON 点摆脱了杂质荧光的干扰。薄层板上端未经纵展的三个 DON 标准点可分别作为横展后试样 DON 点和二个标准 DON 点的横向定位点,试样 DON 点又可与纵展后的 DON 标准点比较 R_f 值而定性,这样从横向和纵向两个方面确定试样 DON 点的位置,达到定性的目的。二个标准 DON 点的位置上均无杂质荧光干扰。

如在第一块薄层板上样液未显荧光,而在第二块薄层板上 25 μL 样液+25 ng 标准所显荧光强度与 25 ng 标准 DON 相等,则试样中 DON 含量为阴性或 0.05 mg/kg 以下。阳性试样粗略定量时,虽然薄层板上三个 DON 点在横展中都稍有移动,但对各点荧光强度无影响,两个标准点均可用于和试样 DON 点比较荧光强度。

5.4.6 薄层光密度计测定:激发光波长 340 nm、发射光波长 400 nm。在薄层板上标准 DON 荧光点至少在 100 ng、200 ng、400 ng 时,测得的响应与 DON 的量才呈线性关系。对 DON 含量在 0.3 mg/kg 以上的试样才用光密度计测定。当 DON 含量在 0.3 mg/kg 时点 20 μL 样液使测得的 DON 量落在 100 ng~200 ng 之间。用薄层光密度计测定时每块板上滴加二个标准 DON 点,DON 标准点的量为 100 ng,200 ng 或 200 ng,400 ng,以测得的峰面积值为纵坐标,DON 的量为横坐标,绘制标准曲线。

5.4.7 结果计算

按式(1)计算:

$$X = A \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1\ 000}{m \times 1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——试样中 DON 的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- A——薄层板上测得样液点上 DON 的量,单位为微克(μg);
- V₁——加入三氯甲烷-乙腈混合液溶解残渣的体积,单位为毫升(mL);
- V₂——滴加样液的体积,单位为毫升(mL);
- D——样液的总稀释倍数;
- m——三氯甲烷-乙腈混合液溶解残渣相当试样的质量,单位为克(g)。

5.4.8 精密度:当空白小麦中加入 DON 量为 0.3、0.5、1 mg/kg,每个水平 n=4 时,目视比较测定结果分别为 0.237 g±0.025 g,0.5 g±0.081 g、0.097 g±0.112 g,用薄层光密度计测定结果分别为 0.290 g±0.053 g、0.456 g±0.077 g、1 g±0.15 g(小麦制品的 DON 回收率为 80%~100%)。空白玉米中加入 DON 量为 0.3、0.5、1 mg/kg,每个水平 n=4 时,目视比较测定结果为 0.234 g±0.05 g、0.415±0.800±0。以上数据为 X±SD。

第二法 免疫测定法(ELISA)

6 原理

将已知抗原吸附在固相载体表面,洗除未吸附抗原,加入一定量抗体与待检试样(含有抗原)提取液的混合液,竞争温育后,在固相载体表面形成抗原抗体复合物。洗除多余抗体成分,然后加入酶标记的抗免疫球蛋白的第二抗体结合物,与吸附在固体表面的抗原抗体复合物结合,加入酶底物。在酶的催化作用下,底物发生降解反应,产生有色产物,通过酶标检测仪,测出酶底物的降解量,根据标准曲线计算被测试样中的抗原量。

7 试剂

- 7.1 抗体:杂交瘤细胞系 3D7 产生的抗呕吐毒素的特异性单克隆抗体。
- 7.2 抗原:呕吐毒素与载体蛋白-牛血清白蛋白(BSA)的结合物(DON-BSA)。
- 7.3 牛血清白蛋白(BSA),四甲基联苯胺,兔抗鼠免疫球蛋白与辣根过氧化物酶的结合物。
- 7.4 吐温-20,30%过氧化氢(H₂O₂),甲醇,三氯甲烷,石油醚,无水乙醇,乙酸乙酯,中性氧化铝和活性炭。

所有其他化学药品,均为分析纯试剂,水为蒸馏水或同等纯度的水。

7.5 包被缓冲液为 pH9.6 的碳酸盐缓冲液,配制方法为称取 1.59 g 碳酸钠(Na₂CO₃),2.93 g 碳酸氢钠(NaHCO₃)加水稀释至 1 000 mL。

7.6 洗涤液为含 0.05%吐温-20 的 pH7.4 的碳酸盐缓冲液(简称 PBS-T)。

配制方法为:

称取磷酸二氢钾(KH_2PO_4)0.2 g,磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)2.9 g,氯化钠(NaCl)8.0 g,氯化钾(KCl)0.2 g,吐温-20 0.5 mL,加水至1 000 mL。

7.7 底物缓冲液为 pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液,配制方法为:0.1 mol/L 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),即称取柠檬酸 21.0 g,加水至 1 000 mL 为甲液;

0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4);即称取磷酸氢二钠 28.4 g,加水至 1 000 mL,为乙液;取甲液 24.3 mL,乙液 25.7 mL,加水至 100 mL,即可。

7.8 呕吐毒素标准溶液

用甲醇配成 1 mg/mL 呕吐毒素贮备液, -20℃ 冰箱贮存。于检测当天,精密吸取贮备液,用 20% 甲醇的 PBS(配制方法同 PBS-T,不加吐温-20 即可)稀释成制备标准曲线的所需浓度。

8 仪器

所用玻璃器皿均用硫酸洗液浸泡,用自来水洗,蒸馏水冲洗。

- 8.1 酶标检测仪;
- 8.2 酶标微孔板(40 孔或 96 孔);
- 8.3 电动振荡器;
- 8.4 电热恒温水浴锅;
- 8.5 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶;
- 8.6 250 mL 分液漏斗。

9 分析步骤

9.1 提取

称 20 g 粉碎并通过 20 目筛的试样,置 200 mL 具塞三角烧瓶中。加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(4+1),在瓶塞上抹一层水盖严防漏。振荡 1 h 后,通过快速定性滤纸过滤,取 25 mL 滤液于蒸发皿中,置 90℃ 水浴上通风挥干。用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中残渣,倒入 250 mL 分液漏斗中,再用 20 mL 甲醇-水(4+1)分次洗涤,转入同一分液漏斗中,振荡 1.5 min,收下层甲醇-水提取液过层析柱净化(层析柱的装备:在层析柱下端于小管相连接处塞入约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝,敲平表面,再加入 0.4 g 活性炭,敲紧)。

将过柱后的洗脱液倒入蒸发皿中,将蒸发皿置于水浴锅上浓缩至干,趁热加 3 mL 乙酸乙酯,加热至挥干,再重复一次,最后加 3 mL 乙酸乙酯,冷至室温后转入具尾管的 10 mL 浓缩瓶中。用适量乙酸乙酯洗涤蒸发皿,并入浓缩瓶中。将浓缩瓶置 95℃ 水浴锅上用蒸汽加热,挥干,冷却后用 0.2 mL 含 20% 甲醇的 PBS 定容,供 ELISA 检测用。

9.2 ELISA 检测

9.2.1 用 DON-BSA(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)包被酶标微孔板,每孔 100 μL ,4℃ 过夜。

9.2.2 酶标板用 PBS-T 洗 3 次,每次 3 min 后,加入不同浓度的 DON 标准溶液(制作标准曲线)或试样提取液(检测试样中的毒素含量)与抗体溶液的混合液(1+1),每孔 100 μL ,该混合液应于使用的前一天配好,4℃ 过夜,备用,置 37℃ 1 h。

9.2.3 酶标板洗 3 次,每次 3 min 后,加入酶标二抗,每孔 100 μL ,37℃ 1.5 h。

9.2.4 同上述洗涤后,加入酶底物溶液[即取 5 μL TMB(10 mg TMB 溶于 1 mL 二甲基酰胺中)溶液加 10 mL 底物缓冲液加 10 μL 30%过氧化氢,混匀],每孔 100 μL ,37℃ 30 min。

9.2.5 用 2 mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 50 μL ,于 450 nm 处测定吸光度值。

10 结果计算

按式(2)计算:

$$X = c \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X——呕吐毒素浓度,单位为纳克每克(ng/g);

c——酶标微孔板上所测得的呕吐毒素的含量(根据标准曲线求得),单位为纳克(ng);

*V*₁——试样提取液的体积,单位为毫升(mL);

*V*₂——加入样液的体积,单位为毫升(mL);

D——样液的总稀释倍数;

m——试样质量,单位为克(g)。

11 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%。
