

ICS 67.050
B 04
备案号: 26153-2009

DB32

江 苏 省 地 方 标 准

DB32/T 1481—2009

藻类产品中微囊藻毒素测定 —高效液相色谱法

Determination of microcystins in spirulina products
—High performance liquid chromatography

2009-09-16 发布

2009-12-16 实施

江苏省质量技术监督局 发布

前 言

微囊藻毒素(Microcystin,MC)是由蓝藻中的微囊藻属(Microcystis)、鱼腥藻属(Anabaena)、颤藻属(Oscillatoria)及念珠藻属(Nostoc)的某些种类或品系产生的次生代谢产物。

本标准的编写格式按GB/T1.1-2000《标准化工作导则 第1部分,标准的结构和编写规则》编制。其中测定方法是参考国内外有关文献,经研究、改进和验证后制定的。

本标准由江苏省农业科学院提出。

本标准主要起草单位:江苏省农业科学院。

本标准主要起草人:李优琴、石志琦、周威、杨静东、尹玉芬。

藻类产品中微囊藻毒素测定

1 范围

本标准规定了藻类产品中微囊藻毒素含量的液相色谱测定方法。

本标准适用于藻类产品中微囊藻毒素含量的测定。

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，其随后所有的修改单（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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

藻类产品中微囊藻毒素以甲醇溶液超声提取，经分离净化后用反相 C_{18} 液相色谱柱分离测定，紫外检测器 238nm 处检测，外标法定量分析。

4 试剂和溶液

本标准所用试剂，除特别注明外，均为分析纯。实验用水符合 GB6682 一级用水规定。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 75% (V/V) 甲醇溶液：75mL 甲醇与 25mL 水混合。

4.3 20% (V/V) 甲醇溶液：20mL 甲醇与 80mL 水混合。

4.4 三氟乙酸：色谱纯。

4.5 淋洗溶液：10mL 水；10mL 20% (V/V) 甲醇溶液。

4.6 洗脱溶液（酸化甲醇溶液）：用甲醇（色谱纯）将 0.05mL 三氟乙酸（色谱纯）定容至 100mL。

4.7 微囊藻毒素标准品：微囊藻毒素-LR (MC-LR)；微囊藻毒素-RR (MC-RR)，纯度>95.0%。

4.8 微囊藻毒素标准储备液：分别称取微囊藻毒素标准品 MC-LR、MC-RR 各 0.5mg（按实际含量折算），用 500 μ L 甲醇（色谱纯）溶解，再用水定容至 50mL，-20 $^{\circ}$ C 保存。此标准储备液的浓度为 10 μ g/mL，保存期一年。

4.9 标准系列溶液：用 20%(V/V)甲醇将微囊藻毒素标准储备液分别稀释配制成 0.00 μ g/mL、0.10 μ g/mL、0.20 μ g/mL、0.50 μ g/mL、1.00 μ g/mL、2.00 μ g/mL、5.00 μ g/mL。（临用时配制）

5 仪器和设备

5.1 分析天平：感量 0.001g、0.0001g。

5.2 超声波清洗器。

5.3 高速离心机：12000r/min。

5.4 杯式滤器：500mL。

5.5 真空泵。

5.6 C_{18} 固相萃取小柱：500mg/6mL。

5.7 SPE 固相萃取装置。

5.8 旋转蒸发器。

5.9 高效液相色谱仪，配有紫外可见光度检测器。

6 分析步骤

6.1 试样制备

液体样品：量取 200mL 于烧杯中，将烧杯置超声波清洗器中超声 30 min，用杯式过滤器过 0.45 μm 微孔滤膜，收集滤液。

固体样品：选取有代表性的样品，用四分法缩分至约 100g，将样品粉碎混合均匀，称取 1.0g 样品于 50mL 离心管中，加入 30 mL75%甲醇，超声提取 30 min，再以 12000 r/min 的转速离心 10 min，取上清液于旋转蒸发瓶中，残渣加入 30 mL75%甲醇重复提取 2 次，合并上清液，于旋转蒸发器上 40℃蒸至近干，适量水溶解。

6.2 试样净化

6.2.1 C₁₈固相萃取小柱活化

吸取 10mL 甲醇（色谱纯）注入 C₁₈固相萃取小柱，让其自然滴下，当甲醇液面接近小柱上层筛面时加 10mL-15mL 水活化，活化过程不应使 C₁₈固相萃取小柱变干，萃取小柱中应始终充满液体。

6.2.2 微囊藻毒素富集、洗脱

将 6.1 制备的溶液流经已活化的 C₁₈固相萃取小柱进行富集（控制流速 8mL/min-10mL/min）。富集完毕，依次用淋洗液淋洗 C₁₈固相萃取小柱，再用 10mL 洗脱液洗脱微囊藻毒素，收集洗脱液，于旋转蒸发器上 40℃浓缩至近干，用 1mL 甲醇溶解残渣，转入刻度管，小股氮气流吹干，用甲醇定容至 0.5mL，过 0.45 μm 微孔滤膜，转入进样瓶。

6.3 测定

6.3.1 色谱条件

6.3.1.1 色谱柱：C₁₈（4.6mm×250mm，5 μm）。

6.3.1.2 柱温：40℃。

6.3.1.3 流动相：甲醇/0.05% 三氟乙酸水溶液（55/45V/V）。

6.3.1.4 检测器波长：238nm。

6.3.1.5 样品进样量：20μL。

6.3.2 色谱测定

用进样器分别吸取标准系列溶液注入高效液相色谱仪中，进样量 20μL，在上述色谱条件下测定标准系列溶液的响应峰面积，以响应峰面积为纵坐标，标准系列溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线或计算回归方程。

吸取制备好的样品溶液注入高效液相色谱仪中，进样量 20μL，在上述色谱条件下测定响应峰面积（应在仪器检测的线性范围内）。依据标准曲线，计算样品中微囊藻毒素的含量。

在上述色谱条件下，MC-RR、MC-LR 的保留时间分别约为 6.6min、16.2min

在上述色谱条件下测得的色谱图参见图 1。

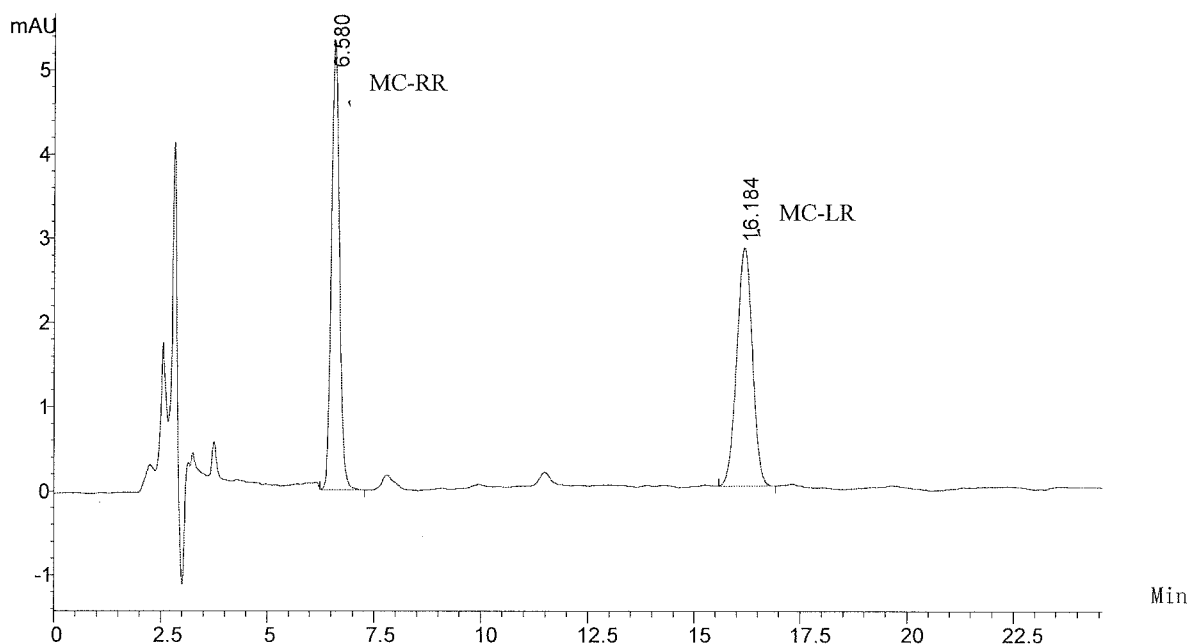


图1 微囊藻毒素 (MC-RR、MC-LR) 标样色谱图

7 结果计算和表述

按式 (1) 计算试样中微囊藻毒素含量:

$$C_x = \frac{A_x \times C_s \times Q_s \times V_x}{A_s \times m \times Q_x} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_x — 试样中微囊藻毒素 LR 或 RR 含量, $\mu\text{g/g}$;

A_x — 样液中微囊藻毒素 LR 或 RR 的峰面积 ;

A_s — 标准工作溶液中微囊藻毒素 LR 或 RR 的峰面积 ;

C_s — 标准工作溶液中微囊藻毒素 LR 或 RR 的浓度, $\mu\text{g/mL}$;

Q_s — 标准工作溶液进样体积, μL ;

Q_x — 样品溶液进样体积, μL ;

V_x — 样液最终浓缩定容体积, mL ;

m — 样品称样量, g 。

8 最低检测限

本方法的最低检测限微囊藻毒素 MC-LR 为 0.03mg/kg , 微囊藻毒素 MC-RR 为 0.02mg/kg 。

9 重复性

同一样品两次平行测定结果相对偏差不超过10%。