



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1145—2014
代替 SN/T 1145—2002

苜蓿黄萎病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1145—2002《植物检疫苜蓿黄萎病菌检疫鉴定方法》，与 SN/T 1145—2002 相比，除编辑性修改外主要技术变化如下：

——增加了分子生物学及蛋白质谱检测内容；

——增加了附录 C、附录 D、附录 E、附录 F。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院、中国检验检疫科学研究院。

本标准起草人：章桂明、王颖、程颖慧、汪莹、王伍、吴品珊、杜洪忠。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

——SN/T 1145—2002。

苜蓿黄萎病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了苜蓿黄萎病菌的检疫鉴定方法。

本标准适用于苜蓿黄萎病菌的寄主携带苜蓿黄萎病菌的检疫鉴定。

2 定义和术语

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

轮状分生孢子梗 **verticillate conidiophore**

轮枝菌的分生孢子梗类型,在直立的分生孢子梗每节基部膨大处轮生若干个小梗,可以有1轮~5轮。

2.2

厚垣孢子 **chlamydospore**

由菌丝个别细胞膨大形成,具有厚壁和浓缩的原生质,可抵抗高温、低温、干旱、营养短缺等不良环境条件的一种休眠孢子。

2.3

微菌核 **microsclerotium**

暗褐色或黑色近球形坚硬的休眠体,由单一菌丝体不断芽殖聚集而来。

2.4

休眠菌丝体 **resting mycelium**

休眠体,暗褐色或黑色,分隔规则,隔膜间膨大,呈念珠状。

3 基本信息

中文名:苜蓿黄萎病菌

学名:*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold

分类地位:真菌界(Fungi),无性型真菌(Anamorphic fungi),丝孢纲(Hyphomycetes),丝孢目(Hyphomycetales),丛梗孢科(Moniliaceae),轮枝孢属(*Verticillium*)。

传播途径:苜蓿黄萎病菌主要由种子传播,也可经土壤、病残体、风、灌溉水和昆虫传病。

近似种:大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*、变黑轮枝菌 *V.nigrescens*、云状轮枝菌 *V.nubilum*、三体轮枝菌 *V.tricorpus*。

4 方法原理

该病菌的为害症状、形态学特征、分子生物学特征及蛋白质谱特征是鉴定该病菌的依据。

5 仪器及用具

5.1 仪器

烘箱、高压灭菌锅、显微镜、解剖镜、光照培养箱、天平(感量 1/100 g、1/10 000 g)、摇床、水浴锅、制冰机、纯水仪、涡旋振荡器、台式离心机、核酸蛋白分析仪、高速冷冻离心机、真空抽干仪、冰箱、超净工作台、普通 PCR 仪、凝胶成像仪、实时荧光 PCR 仪、基质辅助激光解析电离飞行时间质谱仪、超声波振荡仪。

5.2 用具

培养皿、载玻片、盖玻片、三角瓶、试管、烧杯、手术刀、手术剪、镊子、研钵、量筒、吸管、酒精灯、滤纸、微量移液器(0.5 μ L, 2 μ L, 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1 000 μ L)、PCR 反应管(0.2 mL, 0.5 mL)、Tip 头(0.1 μ L~10 μ L, 5 μ L~200 μ L, 100 μ L~1 000 μ L)、质谱分析样品靶。

6 试剂和培养基

6.1 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

2%~3%次氯酸钠溶液、无水乙醇、75%乙醇、无菌去离子水、2,4-D 钠盐、CTAB 提取缓冲液、Tris 饱和酚、三氯甲烷、异戊醇、异丙醇、RNase A、液氮、PCR 试剂(包括 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、缓冲液、 $MgCl_2$)、DNA Marker、溴化乙锭、琼脂糖、TAE 电泳缓冲液、*Taq* Man Master Mix、特异性引物和探针、乙腈、三氟乙酸(TFA)、甲醇、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、质谱校正标准液(肽标准品及蛋白标准品)。

6.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、梅干煎汁酵母琼脂培养基(PLYA)、马铃薯葡萄糖液体培养基,参见附录 A。

7 抽样与现场检查

7.1 苜蓿种子的抽样

按以下标准抽样:1.5 kg~10 kg 取 1 份;11 kg~100 kg 取 2 份;101 kg~500 kg 取 3 份;501 kg~1 000 kg 取 4 份。每份样品为 1.5 kg。1.5 kg 以下全部取样。

7.2 苜蓿种苗、植株的抽样

按以下标准抽样:50 株以下取 1 份;51 株~200 株取 2 份;201 株~1 000 株取 3 份;1 001 株~5 000 株取 4 份;5 001 株以上每增加 5 000 株增取 1 份,不足 5 000 株的按 5 000 株计。每份样品 5 株。

7.3 现场检查

苜蓿种子抽样时注意检查种子中有无可疑带病种子、苜蓿残体;植株抽样时注意检查有无可疑病株。如有可疑病种、病株应将其挑出来,送实验室作进一步检验鉴定。

8 制样

按 7.1 的要求抽取的每份样品应充分混匀,制成平均样品,从每份平均样品中取 25 g 做检验样品。

9 检疫鉴定

9.1 形态学方法

9.1.1 种子保湿培养

9.1.1.1 吸水纸培养皿的准备

用 0.2% 的 2,4-D 钠盐溶液浸渍无菌吸水纸(滤纸),再将吸水纸铺在 9 cm 直径的已灭菌的培养皿底部,每皿铺 3 层。

9.1.1.2 样品种子的放置

将抽取的检验样品不经表面消毒直接放置于培养皿中,每皿均匀放置 25 粒种子。

9.1.1.3 培养

将培养皿置于 21 ℃~23 ℃ 条件下培养,每昼夜用黑光灯照明 12 h,培养 10 d。

9.1.1.4 镜检

10 d 后取出培养皿,用体式显微镜逐粒检查种子,根据轮枝状分生孢子梗和分生孢子的着生情况,检出带菌种子,见附录 B。

9.1.1.5 选择性培养

从带菌种子上挑取孢子接种到梅干煎汁酵母琼脂培养基(PLYA)和马铃薯琼脂培养基(PDA)中进一步培养,20 d 后检查培养结果。

9.1.1.6 致病性测定

9.1.1.6.1 接种方法

采用浸根法接种,即从培养 2 周的病菌培养基上刮下分生孢子配制成 100 个孢子/mL 的悬浮液,取在无病条件下栽培 4 周龄长出 3 片~4 片真叶的苜蓿幼苗,清洗掉根部土壤并用刀片切去主根根尖 1 cm~2 cm 后,立即在孢子悬浮液中浸根 5 min,然后栽入营养钵中,在 22 ℃~25 ℃ 和每天光照 14 h~15 h 下培育。

9.1.1.6.2 症状检查

接种 1 周后,植株开始表现症状,进行症状检查。

9.1.1.6.3 病原菌再分离及鉴定

取小块病健交接处组织,用 2%~3% 次氯酸钠溶液消毒 3 min,用无菌水冲洗 3 次,置于 PDA 培养基上 22 ℃~24 ℃ 进行分离培养,10 d 后观察菌落性状和病原菌特征。

9.1.2 种苗、植株的检验

9.1.2.1 症状检查

用肉眼查看种苗、植株样品,根据苜蓿黄萎病的症状挑选出怀疑发病的植株,带入实验室作进一步检验。

9.1.2.2 保湿培养

取待检样品的茎或叶柄切成1 cm长的小段,用自来水冲洗掉表面的泥土杂物后,用含2%~3%次氯酸钠溶液消毒1 min~2 min,无菌水冲洗3次后,用灭菌解剖刀横切成1 mm~4 mm的小片,并放置在湿皿内滤纸上,每皿5片~10片,湿皿封闭在塑料袋中22℃下培养。

9.1.2.3 镜检

用实体显微镜观察有无产生病原菌子实体,观察分生孢子梗的基部颜色以及是否形成休眠结构。

9.1.2.4 分离培养和致病性测定

按照9.1.1.5和9.1.1.6所述步骤进行分离培养和致病性测定。

9.2 分子生物学鉴定

9.2.1 DNA提取

病菌基因组DNA提取方法见附录C。

9.2.2 PCR检测

定性PCR检测和实时荧光PCR检测方法分别见附录D和附录E。

9.3 蛋白质谱鉴定

9.3.1 样品制备

制备用于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析(MALDI TOF MS)的样品的方法见附录F中F.1。

9.3.2 质谱检测

MALDI TOF MS检测方法见F.2。

10 鉴定特征

10.1 症状

接种7 d后,植株开始发病,中叶自下而上变黄和萎蔫。下部小叶多呈斑块状黄色,上部黄化中叶叶脉仍可保持绿色,严重时叶片枯死脱落。重病植株矮化,茎秆细弱,倒伏,整株枯萎死亡。

10.2 病原菌形态特征

10.2.1 PDA上的培养性状

病原菌在PDA培养基上生长很快,最初形成的菌落无色,2周~3周后因产生了休眠菌丝而变成

灰褐色至黑褐色；不芽殖形成类似微菌核状的结构，不产生厚垣孢子和微菌核；产生的分生孢子梗多，直立，无色，分生孢子梗基部暗色、膨大，或无色、无明显膨大，上生有1层~5层瓶状小梗，每层的瓶体小梗数1个~5个，可轮生、对生或互生，常见分生孢子梗二次分枝，瓶状小梗大小为 $[20\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m}\ (50\ \mu\text{m})]\times(1.4\ \mu\text{m}\sim 3.2\ \mu\text{m})$ ；分生孢子着生于瓶状小梗的端部，椭圆形或圆桶形，透明，多为单胞，少数有一个隔，大小为 $[3.5\ \mu\text{m}\sim 10.5\ \mu\text{m}\ (12.5\ \mu\text{m})]\times(2\ \mu\text{m}\sim 4\ \mu\text{m})$ 。见附录B。病菌生长适温为 $20\ ^\circ\text{C}\sim 23\ ^\circ\text{C}$ 。

10.2.2 PLYA 上的培养性状

病原菌在 PLYA 上培养时，在 $24\ ^\circ\text{C}\sim 26\ ^\circ\text{C}$ 条件下，菌落呈辐射状扩展，培养 20 d 可产生休眠菌丝体。

10.3 苜蓿黄萎病菌与其近似种的形态学区别

苜蓿黄萎病的近似种主要有大丽轮枝菌 *V. dahliae*、变黑轮枝菌 *V. nigrescens*、云状轮枝菌 *V. nubilum*、三体轮枝菌 *V. tricornis* 等，苜蓿黄萎病菌与其近似种的形态学的主要区别为：

- 苜蓿黄萎病菌产生黑色的休眠菌丝，不产生微菌核和厚垣孢子。休眠菌丝多孢、隔膜间隔膨大，呈节结状，菌丝直径 $2.8\ \mu\text{m}\sim 6.7\ \mu\text{m}$ 。
- V. dahliae* 产生黑色微菌核，葡萄状或念珠状，由多数球形的膨大细胞构成。微菌核大小为： $(15\ \mu\text{m}\sim 178\ \mu\text{m})\times(18.9\ \mu\text{m}\sim 58\ \mu\text{m})$ 。
- V. nigrescens* 产生黑褐色厚垣孢子，球形、近球形，大多单生，少数间生，直径 $5.3\ \mu\text{m}\sim 8.1\ \mu\text{m}$ 。
- V. nubilum* 产生黑褐色厚垣孢子，单生或串生，直径 $8.4\ \mu\text{m}\sim 17.5\ \mu\text{m}$ 。
- V. tricornis* 产生休眠菌丝、微菌核或厚垣孢子。休眠菌丝黑褐色，各细胞膨大，呈念珠状，直径 $3.2\ \mu\text{m}\sim 7.1\ \mu\text{m}$ 。微菌核在休眠菌丝上产生，由膨大细胞构成，长形至近球形，直径 $34\ \mu\text{m}\sim 80\ \mu\text{m}$ 。

10.4 PCR 特异性

在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下，苜蓿黄萎病菌的定性 PCR 特异性扩增产物片段大小为 330 bp，实时荧光 PCR Ct 值小于或等于 36。

10.5 质谱检测

将获得的目标物的质谱分析图谱与已有的苜蓿黄萎病菌的标准图谱进行比对，通过 Biotype 软件计算得到相应的匹配分值。

11 结果判定

11.1 形态学结果

如果分离物的形态特征与 10.2 描述的病原菌形态特征相吻合，通过致病性测定所获得的症状特征也与 10.1 所描述的症状相吻合，再分离获得的培养物的形态特征也仍与 10.2 描述的病原菌形态特征相吻合，可确定为苜蓿黄萎病菌。

11.2 分子生物学检测结果

11.2.1 定性 PCR 检测

在阴性对照和空白对照没有产生预期大小条带、阳性对照产生约 330 bp 的预期大小条带的情

况下:

如果检测样品出现与阳性对照大小一致的条带,则为阳性;

如果检测样品没有出现与阳性对照大小一致的条带,则为阴性。

11.2.2 实时荧光 PCR 检测

在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,则:

——检测 Ct 值小于或等于 36,判定为苜蓿黄萎病菌;

——检测 Ct 值大于或等于 40,判定为非苜蓿黄萎病菌;

——检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR,再次扩增后,如 Ct 值小于或等于 36 或者 Ct 值大于或等于 40,判定同上;如果检测 Ct 值仍在 36~40 之间,则应按照形态学方法进行鉴定。

11.3 蛋白质谱检测

将获得的质谱分析图谱与已有的苜蓿黄萎病菌的标准图谱进行比对,通过 Biotype 软件计算得到匹配分值,分值的范围为 2.3~3.0 的,判定为苜蓿黄萎病菌;如果分值的范围为 2.0~2.3 的,则应按照形态学方法进行鉴定;分值 2.0 以下,判定为非苜蓿黄萎病菌。

12 样品保存与处理

保存样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如发现苜蓿黄萎病菌,该样品应保存 1 年,以备复验。保存期满后,应经灭菌处理。

13 菌种保存与处理

分离到的苜蓿黄萎病菌菌种,转入 PDA 斜面培养基上,置于 5℃ 黑暗条件下保存,并定期转管,标注分离物来源、寄主、分离时间、鉴定人。

14 实验记录保存

妥善保存检验报告包括症状、病菌等图文资料。检验报告应注明检验日期、方法、结果等,并有检验人签名。



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 0683—2014
代替 SN 0683—1997

出口粮谷中三环唑残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of tricyclazole in cereals for export—
HPLC-MS/MS method

2014-01-13 发布

2014-08-01 实施



中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口粮谷中三环唑残留量的测定
液相色谱-质谱/质谱法
SN/T 0683—2014

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 32 千字
2014 年 12 月第一版 2014 年 12 月第一次印刷
印数 1—1 300

*

书号: 155066 • 2-28081 定价 21.00 元

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN 0683—1997《出口粮谷中三环唑残留量检验方法》。

与 SN 0683—1997 相比,本标准技术变化如下:

——前处理方法由原先的人工填料层析柱净化改为固相萃取柱净化法;

——仪器方法由原先的气相色谱-氮磷检测器法和气相色谱-质谱方法确证,改为高效液相色谱-质谱/质谱法;

——检测基质范围由原来的稻谷扩充为玉米、大麦、糙米、大米、小麦。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国西藏出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:周瑶、王君、次仁拉珍、曹晨、曹晓钢、曲栗、郭德华、朱坚。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN 0683—1997。

出口粮谷中三环唑残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了出口粮谷中三环唑残留量的测定方法。

本标准适用于玉米、大麦、糙米、大米、小麦中三环唑残留量的测定和确证。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

SN/T 0800.1 进出口粮油、饲料检验抽样和制样方法

3 原理

试样中残留的三环唑用丙酮振荡提取,过中性氧化铝固相萃取柱净化后,供液相色谱-质谱/质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有规定外,试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 丙酮:色谱纯。

4.2 二氯甲烷:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 乙腈:色谱纯。

4.5 甲酸:色谱纯。

4.6 醋酸铵:色谱纯。

4.7 5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含有 0.1%甲酸):称取 0.385 g 醋酸铵,加入 1 L 水溶解后,加入 1 mL 甲酸混匀。

4.8 二氯甲烷-甲醇溶液(99+1,体积比)。

4.9 乙腈-水溶液(1+1,体积比)。

4.10 乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含有 0.1%甲酸)(1+1,体积比)。

4.11 标准品:三环唑(Tricyclazole, CAS No. 41814-78-2),纯度 $\geq 99\%$ 。

4.12 标准储备液:称取适量三环唑标准品,用乙腈配制成为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液,0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 12 个月。用乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含有 0.1%甲酸)(1+1,体积比)配置所需标准中间液和标准工作液。

4.13 中性氧化铝固相萃取柱:1 g/3 mL。

4.14 注射器和 0.22 μm 有机相针式过滤器。

5 仪器和设备

- 5.1 粉碎机或相当的设备。
- 5.2 液相色谱-串联质谱仪,配有电喷雾离子源。
- 5.3 均质器。
- 5.4 涡旋振荡器。
- 5.5 离心机:5 000 r/min。
- 5.6 分析天平:感量 0.1 mg,0.001 g。
- 5.7 固相萃取装置。
- 5.8 50 mL 离心管。
- 5.9 10 mL 容量瓶。

6 试样制备与保存

制样操作过程中应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。将样品按 SN/T 0800.1 的规定缩分至 1 kg,全部磨碎并通过 ϕ 1 mm 圆孔筛,均分成两份试样,装入洁净容器中,密封,并标明标记,于 -5°C 以下避光存放。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 1 g 样品(准确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 丙酮,用涡旋振荡器充分振荡提取 5 min,在 4 400 r/min 转速下离心 4 min 后,将上清液倒入小试管中。重复上述步骤残渣再用 5 mL 丙酮提取一次。合并两次提取的上清液于 10 mL 容量瓶中,用丙酮定容。视样品中三环唑含量高低,取 1 mL~10 mL 提取液于 35°C 水浴中氮吹至干,再准确加入 4 mL 二氯甲烷溶液充分振荡溶解、混匀。

7.2 净化

在重力流速下,用 6 mL 二氯甲烷活化中性氧化铝固相萃取柱,然后将 2.0 mL 上述提取液过柱,再用 6 mL 二氯甲烷溶液淋洗,最后用 8 mL 二氯甲烷-甲醇溶液(99+1,体积比)洗脱,将所收集的洗脱液于 35°C 水浴中氮吹至干,残余物用 2.0 mL 乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含有 0.1%甲酸)(1+1,体积比)定容,混匀后过 0.22 μm 有机相针式滤膜供液相色谱-串联质谱仪检测。

7.3 测定

7.3.1 高效液相质谱条件

高效液相质谱条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,长 50 mm,内径 2.1 mm,粒径 3.0 μm 或相当者;
- b) 流动相:A:5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含有 0.1%甲酸),B:乙腈溶液;流速:0.3 mL/min,梯度洗脱参数见附录 A 表 A.1;
- c) 柱温: 30°C ;
- d) 进样量:10 μL ;
- e) 质谱参数条件参见附录 A。

7.3.2 定量测定

根据试样中被测物的药物含量,选取响应值相近的标准工作液进行分析。标准工作液和待测液中药物的响应值均应在仪器线性响应范围内。如果含量超过标准曲线范围,应用 2.0 mL 乙腈-5 mmol/L 醋酸铵水溶液(含有 0.1%甲酸)(1+1,体积比)稀释到合适浓度后分析。在上述色谱条件下的三环唑的参考保留时间为 7.3 min,标准溶液的多反应监测色谱图参见附录 B 中图 B.1。

7.3.3 定性测定

按照液相色谱-质谱/质谱条件测定样品和标准工作溶液,如果检测的质量色谱峰保留时间与标准品一致,定性离子对的相对丰度,是用相对于最强离子丰度的强度百分比表示,应当与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致,相对丰度允许偏差不超过表 1 规定的范围,则可判断样品中存在对应的被测物。

表 1 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

8 空白试验

除不称取试样外,均按上述操作步骤进行。

9 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按式(1)计算样品中待测药物残留量,报告结果时以样品中可提取的三环唑残留量报告结果,计算结果需扣除空白值。

$$X = \frac{c \times A_s \times V}{A \times m \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——样品中待测组分残留量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
- c ——标准工作溶液中药物的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_s ——标准工作溶液中药物的峰面积;
- V ——样品溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- A ——样液中药物的峰面积;
- m ——最终样液代表的试样质量,单位为克(g)。

10 测定低限、回收率

10.1 测定低限

本方法测定低限为 20.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 回收率

添加回收率实验数据参见附录 C 中表 C.1。

附录 A (资料性附录)

Agilent 6410B 液相色谱-四级杆质谱/质谱仪参数¹⁾

A.1 梯度洗脱程序表

见表 A.1。

表 A.1 梯度洗脱程序表		
梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
1	98	2
4	1	99
13	1	99
13.1	98	2
15	98	2

A.2 质谱/质谱仪参数

质谱/质谱仪参数如下：

- a) 离子源:ESI,正离子;
- b) 雾化气:氮气;
- c) 气流速(Gas Flow):10 L/min;
- d) 干燥气温度:350 ℃;
- e) 雾化气(Nebulizer):275.8 kPa(40 psi);
- f) 电子倍增器电压(Delta EMV): 400 V;
- g) 扫描方式:正离子扫描;
- h) 毛细管电压:4 000 V;
- i) 检测方式:多反应监测(MRM)参数见表 A.2。

表 A.2 多反应监测参数表

组分名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	去簇电压/ V	碰撞能量/ V	色谱保留时间 t_r /min
三环唑	190→163	190→163	80	25	7.3
	190→136			30	

1) 非商业性声明:附录 A 所列参数是在 Agilent 6410B 质谱仪完成的,此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

附录 B
(资料性附录)
三环唑标准品多反应监测(MRM)色谱图

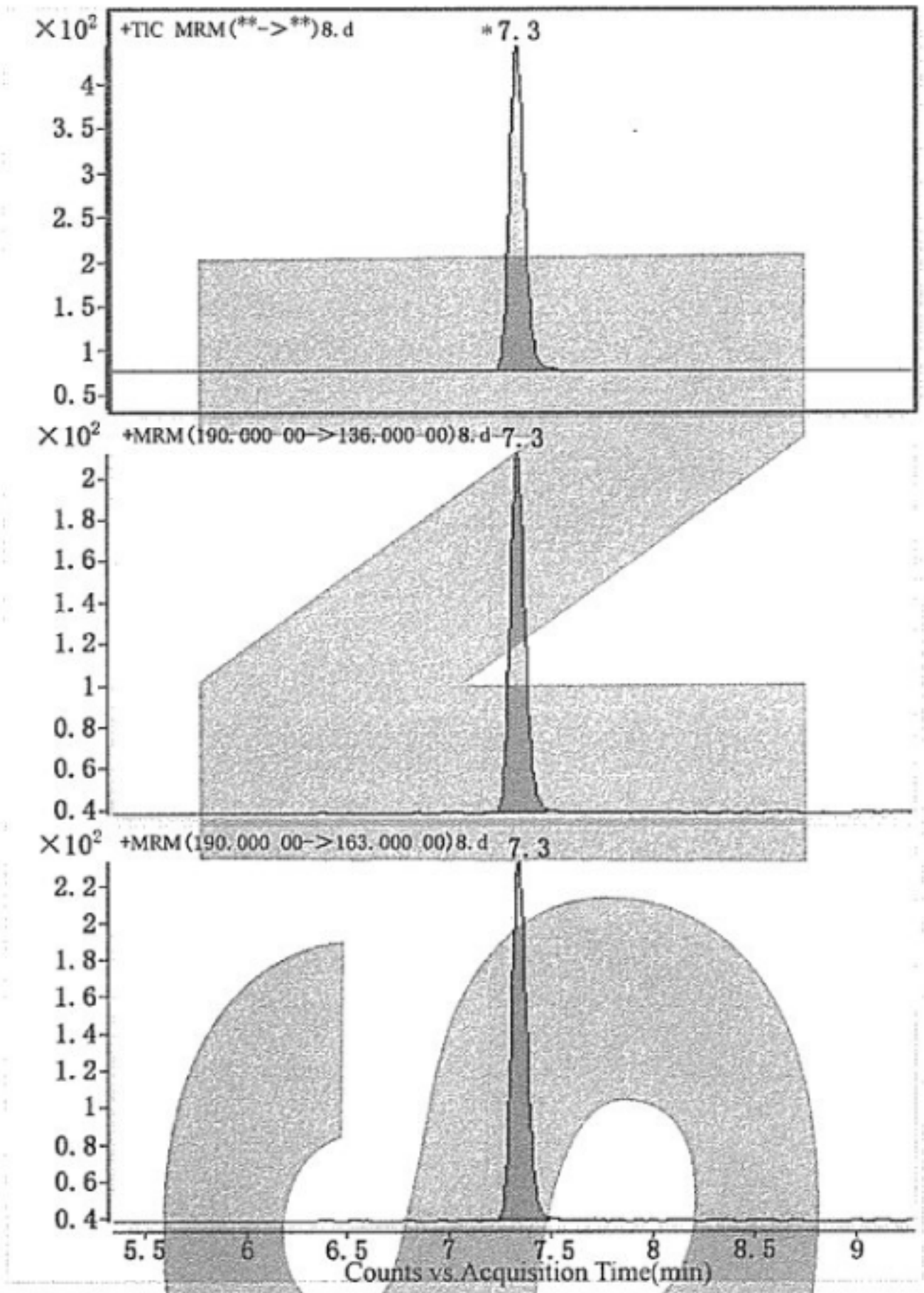


图 B.1 三环唑标准品多反应监测(MRM)色谱图

附 录 C

(资料性附录)

液相色谱-串联质谱法添加回收率实验数据

表 C.1 液相色谱-串联质谱法添加回收率实验数据

基质	添加水平/ (mg/kg)	回收率范围/%
玉米	0.02	78.1~93.7
	1.00	80.3~91.2
	3.00	79.6~90.0
大麦	0.02	80.8~95.6
	1.00	85.4~95.4
	3.00	85.7~94.1
糙米	0.02	80.6~94.1
	1.00	82.1~97.3
	3.00	84.3~96.6
大米	0.02	73.0~86.1
	1.00	80.2~91.3
	3.00	81.5~90.2
小麦	0.02	73.1~87.6
	1.00	80.5~90.4
	3.00	83.8~88.7

Foreword

The standard was drafted according to GB/T 1.1—2009.

The standard is replace of SN 0683—1997“Method for the determination of tricyclazole residue in cereals for export”.

The main improvement from SN 0683—1997:

- The sample pretreatment is changed to solid phase extraction (SPE), compared to the former edition, which adopted manually loaded chromatographic column.
- The instrument method is changed to HPLC-MS/MS compared to the former edition, which adopted GC-NPD and GC-MS.
- The matrix scope was enlarged to corn, barley, brown rice, rice and wheat.

Some parts of the standard may have relationship with some patents. The release department have no responsibility to recognize these patents.

This standard was proposed by and is under the charge of Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China.

This standard was drafted by Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China, Xizang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of the People's Republic of China.

The main drafters of this standard are Zhou Yao, Wang Jun, Ciren Lazhen, Cao Chen, Cao Xiaogang, Qu Li, Guo Dehua, Zhu Jian.

This standard replaced the previous version of the release of the standard as follows:

- SN 0683—1997.

Note: This English version, a translation from the Chinese text, is solely for guidance.

Determination of tricyclazole in cereals for export— HPLC-MS/MS method

1 Scope

The standard specifies the method of determination of tricyclazole in cereals for export.

This standard is applicable to determination of tricyclazole in corn, barley, brown rice, rice and wheat.

2 Normative references

The following documents is necessary for this standard. For dated references, only dated editions shall apply to this standard. For undated references, the latest edition of the normative document referred to applies.

GB/T 6682 Water for analytical laboratory use—Specification and test methods

SN/T 0800.1 Inspection of cereals, oils and feedstuffs for import and export—Methods of sampling and preparation of samples

3 Principles

The tricyclazole residue in samples is extracted by acetone, cleaned on N-Alumina SPE column, and eluted by dichloromethane-methanol mixture. The extract is determined by HPLC-MS/MS after condensation and reconstitution, and quantified by external standard method.

4 Reagents and materials

Unless otherwise specified, all reagent used should be analytical grade, water is the first grade water prescribed by GB/T 6682.

4.1 Acetone; HPLC grade.

4.2 Dichloromethane; HPLC grade.

4.3 Methanol; HPLC grade.

4.4 Acetonitrile:HPLC grade.

4.5 Formic acid:HPLC grade.

4.6 Ammonium acetate:HPLC grade.

4.7 5mmol/L ammonium acetate (containing 0.1% formic acid): Dissolve 0.385 g ammonium acetate in 1 L water, add 1 mL formic acid, mix thoroughly.

4.8 Dichloromethane-methanol (99+1, V/V).

4.9 Acetonitrile-water (1+1, V/V).

4.10 Acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate (containing 0.1% formic acid) (1+1, V/V).

4.11 Tricyclazole (CAS No.41814-78-2), purity $\geq 99\%$.

4.12 Stock standard solution: Accurately weigh appropriate standard 4.11, dissolve it in acetonitrile to 10 $\mu\text{g/mL}$. Store it refrigerated at 0 $^{\circ}\text{C}$ ~ 4 $^{\circ}\text{C}$, valid for 12 months. According to the requirement, prepare a standard working solution of appropriate concentration.

4.13 N-Alumina SPE column: 1 g/3 mL.

4.14 Syringe and 0.22 μm membrane filter.

5 Apparatus and equipment

5.1 Grinder or the equivalent instrument.

5.2 Liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry.

5.3 Homogenizer.

5.4 Vortex mixer.

5.5 Centrifuger: 5 000 r/min.

5.6 Balances: 0.1 mg, 0.001 g.

5.7 SPE device.

5.8 50 mL centrifuge tube.

5.9 10 mL volumetric flask.

6 Preparation and storage of test sample

In the course of sample preparation, precautions shall be taken to avoid contamination or any factors that may cause the change of residue content. According to SN/T 0800.1, take 1 kg representative portion from the whole primary sample, then grind thoroughly and let it pass through a $\phi 1$ mm sieve, and divide into 2 equal portions. Keep the sample into a clean vessel, seal and label. The test sample is stored below $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ and kept away from light.

7 Test procedures

7.1 Extraction

Weigh 1 g (0.001 g) sample in a 50 mL centrifuge tube, add 5 mL acetone (4.1), homogenize them by vortex mixer for 5 min. The mixture was centrifuged at 4 400 r/min for 4 min. Pour the supernatant into a tube. Repeat the procedures before. Combine the supernatant in the volumetric flask and dilute to the mark with acetone. According to the concentration level of tricyclazole in sample, take 1 mL~10 mL extract to be dried by N_2 in $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath. Dilute the residue with 4 mL dichloromethane and mix them thoroughly.

7.2 Clean up

Activate the N-Alumina SPE column with 6 mL dichloromethane, and then load 2.0 mL extract on the column. Wash the column with 6 mL dichloromethane, and then use 8 mL dichloromethane-methanol (99+1, V/V) to elute the analyte. Dry the eluate by N_2 in $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ water bath and reconstitute the analyte in 2.0 mL acetonitrile-5 mmol/L ammonium acetate (1+1, V/V). Mix them thoroughly for further HPLC-MS/MS analysis.

7.3 Determination

7.3.1 HPLC operating conditions

HPLC operating conditions are as following:

- a) Column: C_{18} , 50 mm \times 2.1 mm (i.d.), 3 μm , or the equivalent.
- b) Mobile phase: A: 5 mmol/L Ammonium Acetate-0.1% formic acid, B: Acetonitrile. Flow rate: 0.3 mL/min. The gradient program is listed in the Table A.1 of Annex A.
- c) Column temperature: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- d) Injection volume: 10 μ L.
- e) Mass parameters are listed in the Annex A.

7.3.2 Quantification of HPLC-MS/MS

According to the above HPLC-MS/MS operating condition, determine the sample solution and the standard working solution simultaneously. The responses of the analyte in the standard working solution and the sample solution shall be within the linear range of the instrument detection. Quantified by external standard. Under the above HPLC-MS/MS operating condition, the retention time of tricyclazole is 7.3 min. The MRM chromatograms of the standards are presented in the Annex B.

7.3.3 Confirmation of HPLC-MS/MS

Determine the sample under the established LC/MS-MS conditions, and calculate the intensity ratio of two selected ion pairs of the sample solution and the standard working solutions. If the retention time of sample chromatogram peak are consistent with that of working solution, and the relative abundance ratio tolerance meets the requirements listed in the Table 1, it can be concluded that this compound does exist in the sample.

Table 1 Maximum permitted tolerances for relative ion intensities while conformation

Relative ion intensities/%	>50	>20~50	>10~20	≤ 10
Permitted relative tolerances/%	± 20	± 25	± 30	± 50

8 Blank test

The operation of the blank test is the same as the described in the method of determination, but without addition of the sample.

9 Calculation and expression of result

Calculate the content of benzodiazepine residues in the test sample by HPLC-MS/MS data processor or according to the formula (1). The blank value should be subtracted from the above result of calculation.

$$X = \frac{c \times A_s \times V}{A \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

Where:

- X —the residue content in the test sample, $\mu\text{g}/\text{kg}$;
 c —the concentration in standard working solution, ng/mL ;
 A_s — the peak area of residue in standard working solution;
 V —the final volume of the sample solution, mL ;
 A —the peak area of residue in sample solution;
 m —mass of test sample of final sample solution, g .

10 Limit of quantitation and recovery

10.1 Limit of quantification

The limit of quantification for tricyclazole is $20.0 \mu\text{g}/\text{kg}$.

10.2 Recovery

According to the experimental data, the corresponding recovery of each fortifying level is listed in the Table C.1 of Annex C.

Annex A
(Informative annex)
Main Mass Parameters of Agilent 6410B¹⁾

A.1 Gradient program of mobile phase

See table A.1.

Table A.1 Gradient program of mobile phase

Time/min	Mobile-phase A/%	Mobile phase B/%
1	98	2
4	1	99
13	1	99
13.1	98	2
15	98	2

A.2 MS/MS parameters

MS/MS parameters see the followings as reference:

- a) Ion Source: ESI, Positive;
- b) Nebulizer gas: N₂;
- c) Gas Flow: 10 L/min;
- d) Ion source temperature: 350 °C;
- e) Nebulizer: 275.8 kPa(40 psi);
- f) Delta EMV: 400 V;
- g) Scan mode: Positive;
- h) Electro spray capillary voltage: 4 000 V;

1) Non-commercial statement: the equipments and their types involved in the standard method are not related to commercial aims, and it is encouraged to use equipments of different corporation or different type.

i) Monitor mode; Multiple reaction monitoring(MRM)(seeing table A.2).

Table A.2 Related parameters and qualifier and quantifier in MRM

Compound name	Transitions for qualification (<i>m/z</i>)	Transition for quantification (<i>m/z</i>)	Cone Voltage/ V	Collision energy/ V	Retention time/ min
Tricyclazole	190→163	190→163	80	25	7.3
	190→136			30	

Annex B
(Informative annex)
Selected ion chromatograms of tricyclazole (MRM)

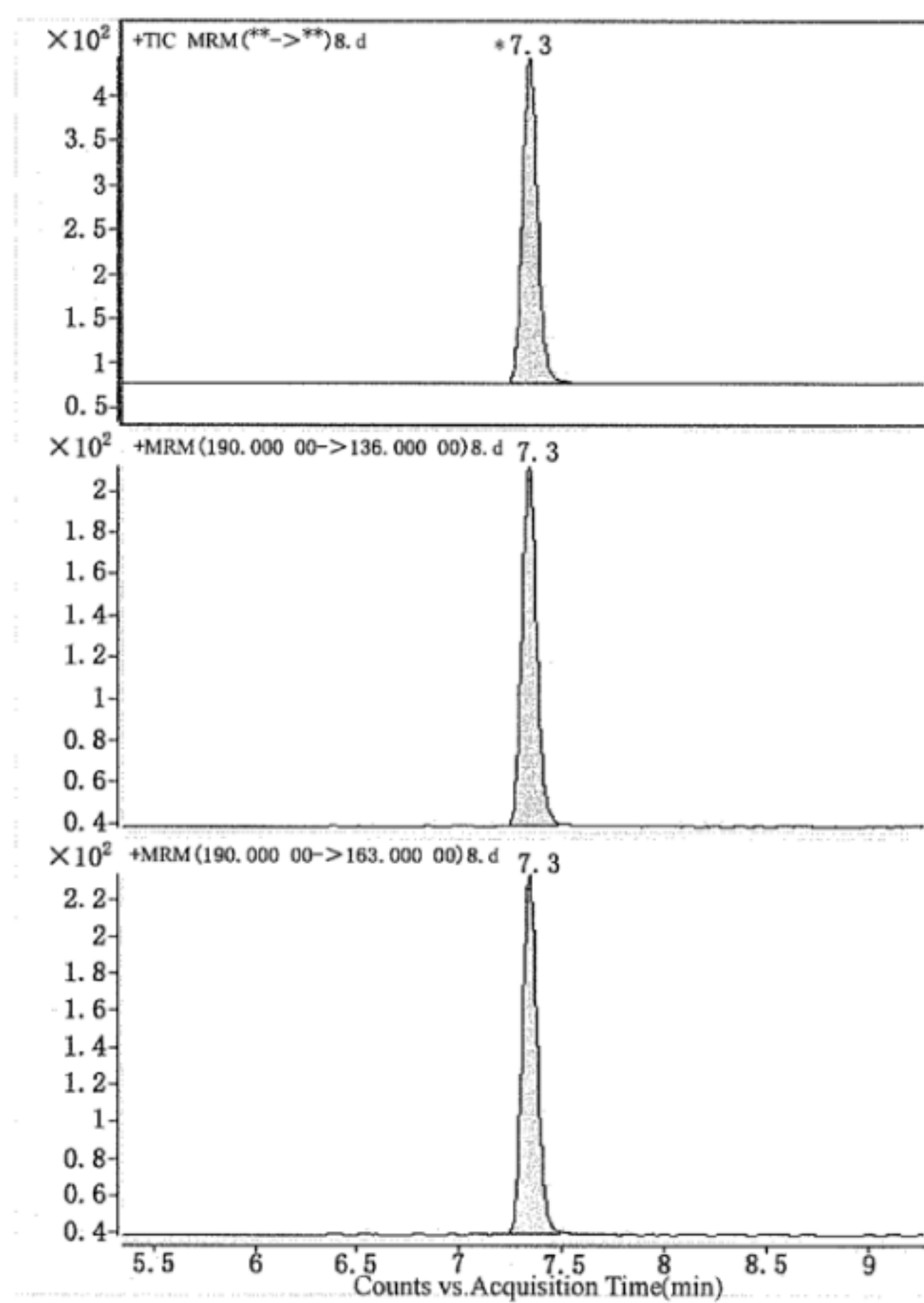


Figure B.1 Selected ion chromatograms of tricyclazole (MRM)

Annex C
(Informative annex)

Table C.1 The recovery ranges of tricyclazole residue

Matrix	Fortified level/(mg/kg)	Recovery range/%
Corn	0.02	78.1~93.7
	1.00	80.3~91.2
	3.00	79.6~90.0
Barley	0.02	80.8~95.6
	1.00	85.4~95.4
	3.00	85.7~94.1
Brown Rice	0.02	80.6~94.1
	1.00	82.1~97.3
	3.00	84.3~96.6
Wheat	0.02	73.0~86.1
	1.00	80.2~91.3
	3.00	81.5~90.2
Rice	0.02	73.1~87.6
	1.00	80.5~90.4
	3.00	83.8~88.7



SN/T 0683-2014

版权专有 侵权必究
*

书号:155066 • 2-28081

定价: 21.00 元

附录 A

(资料性附录)

分离培养轮枝菌的几种培养基的配制方法

A.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)

马铃薯 200 g,洗净去皮切碎,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,过滤去渣,加水补足 1 000 mL,再加 10 g~20 g 葡萄糖和 17 g~20 g 琼脂,加热使溶化,趁热过滤,分装灭菌。

A.2 梅干煎汁酵母琼脂培养基(PLYA)

取梅干 50 g 切成小片,在 100 mL 水中煮沸 30 min,将梅干榨汁后去渣,调节 pH 至 5.8~6.0,加 1 g 酵母浸膏,5 g 乳糖,30 g 琼脂,900 mL 蒸馏水,加热使溶化,趁热过滤,分装灭菌。

A.3 马铃薯葡萄糖液体培养基

马铃薯 200 g,洗净去皮切碎,加水 1 000 mL 煮沸 30 min,过滤去渣,加水补足 1 000 mL,再加 10 g~20 g 葡萄糖,加热使溶化,分装灭菌。

附录 B
(规范性附录)

苜蓿黄萎病菌形态特征图

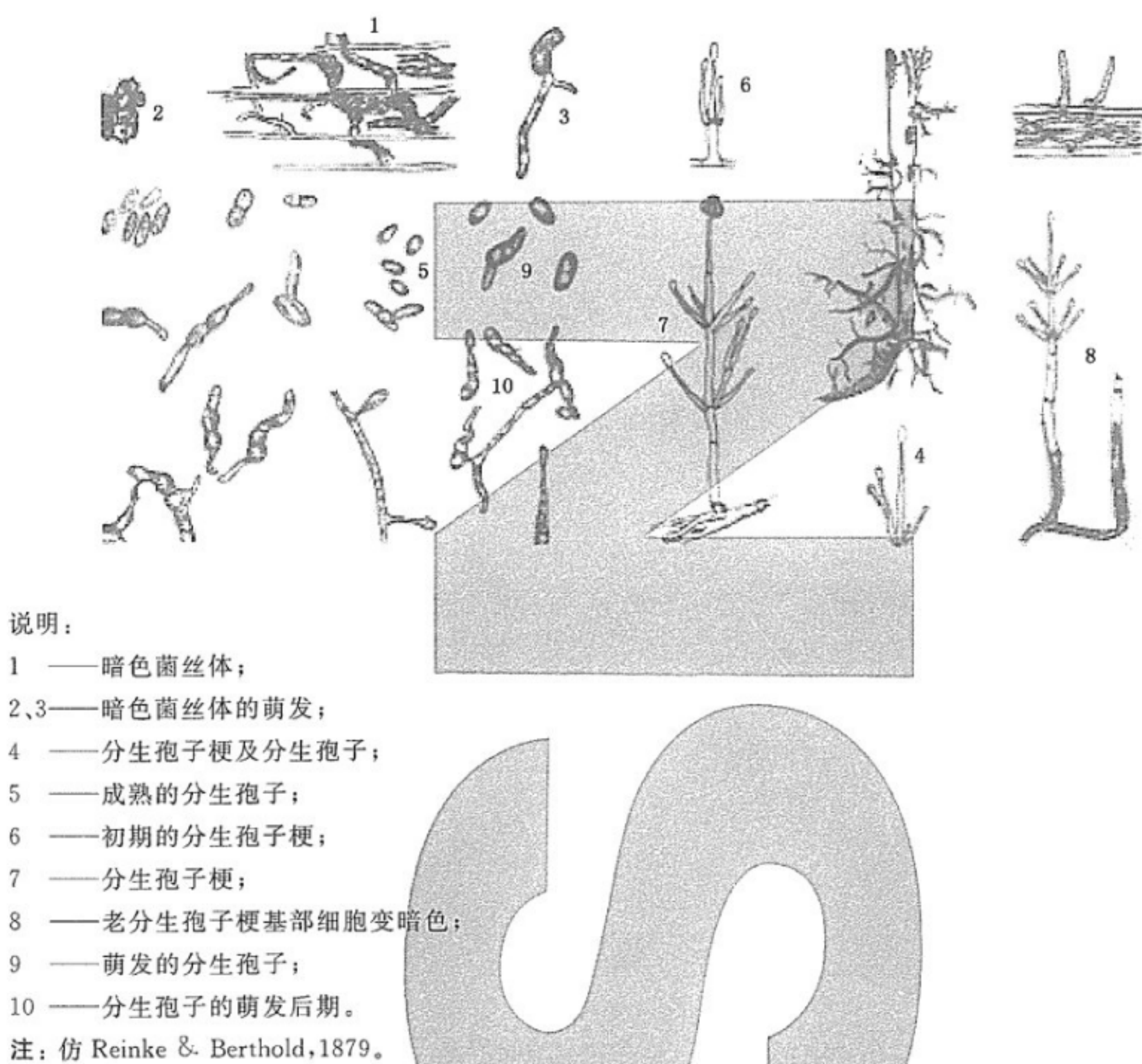


图 B.1 苜蓿黄萎病菌形态特征图

附 录 C
(规范性附录)
基因组 DNA 提取方法

C.1 培养物核酸的制备

收集分离培养得到的菌丝,于研钵中液氮冷冻后研磨,采用 CTAB 法提取病原菌总 DNA。具体方法如下:

- 称取液氮研磨处理过的菌丝粉末 0.1 g,移到 2 mL 的离心管中;
- 加入 65 °C 预热的 CTAB 提取液 700 μ L,置于水浴锅中 65 °C 水浴 30 min,期间不断混匀;
- 加入 5 μ L 10 mg/mL RNA 酶,充分混匀,在 37 °C 放置 30 min;
- 加入等体积的 Tris 饱和酚,充分摇匀,在 13 000g 下离心 15 min;
- 取上清液,加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1),在 13 000g 下离心 15 min;
- 再取上清液,加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1),在 13 000g 下离心 15 min;
- 加入等体积预冷异丙醇,轻轻摇晃,置于-20 °C 冰箱静置 30 min,在 13 000g 下离心 15 min;
- 弃上清液,加入 70%乙醇 500 μ L,13 000g 下离心 3 min,去上清液,重复 2 次,得到 DNA 沉淀,用冷冻干燥仪进行干燥,加入 30 μ L~50 μ L TE 或无菌去离子水,充分溶解后,置于-20 °C 冰箱中保存。

该核酸制备也可采用试剂盒法。

C.2 DNA 纯度与浓度的测定

用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,计算核酸的纯度和浓度,计算公式如下:

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

$$\text{DNA 浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} \text{ ng}/\mu\text{L}$$

PCR 级 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 比值应为 1.7~1.9。

附 录 D
(规范性附录)
定性 PCR 方法

D.1 引物序列

上游引物: Vaa1: 5'-CCGGTACATCAGTCTCTTTA-3'

下游引物: Vaa2: 5'-CTCCGATGCGAGCTGTAAT-3'

注: 引自 Zhang Zheng-guang et al, 2005。

D.2 PCR 反应体系

10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol dNTP 1 μL, 50 mmol/L MgCl₂ 1 μL, 10 μmol/L 上、下游引物 Vaa1/Vaa2 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.25 μL, 以灭菌超纯水补足总体积至 25 μL。阳性对照为苜蓿黄萎病菌的 DNA, 阴性对照为苜蓿黄萎病菌的近似种大丽轮枝菌等, 以灭菌去离子水作空白对照。每个样品重复 2 次。

D.3 扩增条件

94 °C 变性 5 min; 进入循环, 95 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

取 5 μL 扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶在 1×TAE 缓冲液中进行电泳, EB 染色后用凝胶成像系统分析。

附 录 E
(规范性附录)
实时荧光 PCR 方法

E.1 引物、探针序列

上游引物: Vaa1: 5'-CCGGTACATCAGTCTCTTTA-3'

下游引物: Vaa2: 5'-CTCCGATGCGAGCTGTAAT-3'

探针: Vaa-probe: 5'-FAM- ATGCCTGTCCGAGCGTCGTTTCA-TAMRA-3'

注: 引自杜洪忠等, 2011。

E.2 实时荧光 PCR 反应体系

反应体系总体积为 10 μL , 各成分分别为: 实时荧光反应混合液 *Taq* Man Master Mix 5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 1 对引物和探针等比例混匀后取 1 μL , 灭菌去离子水 3 μL , DNA 1 μL (10 ng~100 ng)。将反应体系混匀后置于实时荧光 PCR 仪中进行反应。

以灭菌去离子水作空白对照, 以苜蓿黄萎病菌的 DNA 作为阳性对照, 以苜蓿黄萎病菌的近似种大丽轮枝菌等的 DNA 作为阴性对照, 每个样品重复 2 次。

E.3 扩增条件

50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min; 然后进入 40 个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$, 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 1 min。

附录 F (规范性附录)

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱分析(MALDI TOF MS)方法

F.1 样品的制备

F.1.1 分离物的液体培养

将分离物转入 PDA 液体培养基中培养生长,培养条件为:26 ℃、光照、200 r/min 振荡培养,直至 7 d 后长出大量白色菌丝。

F.1.2 基质溶液的配制

将乙腈、三氟乙酸、无菌去离子水以 50% : 2.5% : 47.5% 的比例混合,配制基质溶剂;
取 500 μ L 基质溶剂,加入 HCCA 颗粒,超声溶解 10 min,配制饱和的 HCCA 溶液。

F.1.3 蛋白的提取

取 5 mg~10 mg 培养物,置于装有 500 μ L 灭菌去离子水的 1.5 mL 离心管中,振荡混匀,14 000g 离心 3 min,去除上清液。

加入 300 μ L 灭菌去离子水振荡,充分混匀,再加入 900 μ L 无水乙醇振荡,充分混匀,14 000g 离心 2 min,去除上清液,留沉淀菌丝体备用(乙醇和水应尽量去除)。

加入 25 μ L 70% 甲酸,混匀,再加入 25 μ L 乙腈,仔细混匀,在有冰袋控温的条件下超声处理 10 min,高速离心 2 min,获得上清液。

F.2 MALDI TOF MS 分析

F.2.1 点样

在质谱靶上点 1 μ L 上清液,待液滴干燥后再点 1 μ L 基质,自然干燥,每个样品点 4 个重复。
在另外的靶点上点 1 μ L 标准蛋白溶液作为对照,待液滴干燥后再点 1 μ L 基质,自然干燥。

F.2.2 上机

F.2.2.1 设置仪器参数

离子源 1:20.08 kV;
离子源 2:18.60 kV;
脉冲离子提取时间:340 ns (正离子检测方式);
质量范围(m/z 值):2 000 u~19 770 u;
激光能量:35%;
激光点击数:每图谱 10 次~15 次。

F.2.2.2 质量校正

检测前在采集数据的质量范围内(2 000 u~20 000 u)使用标准品溶液进行校准,确保错误率绝对值小于 100 u。

F.2.2.3 图谱采集

完成仪器校正步骤后,操作仪器软件按照设定好的参数对样品进行自动图谱采集和保存。

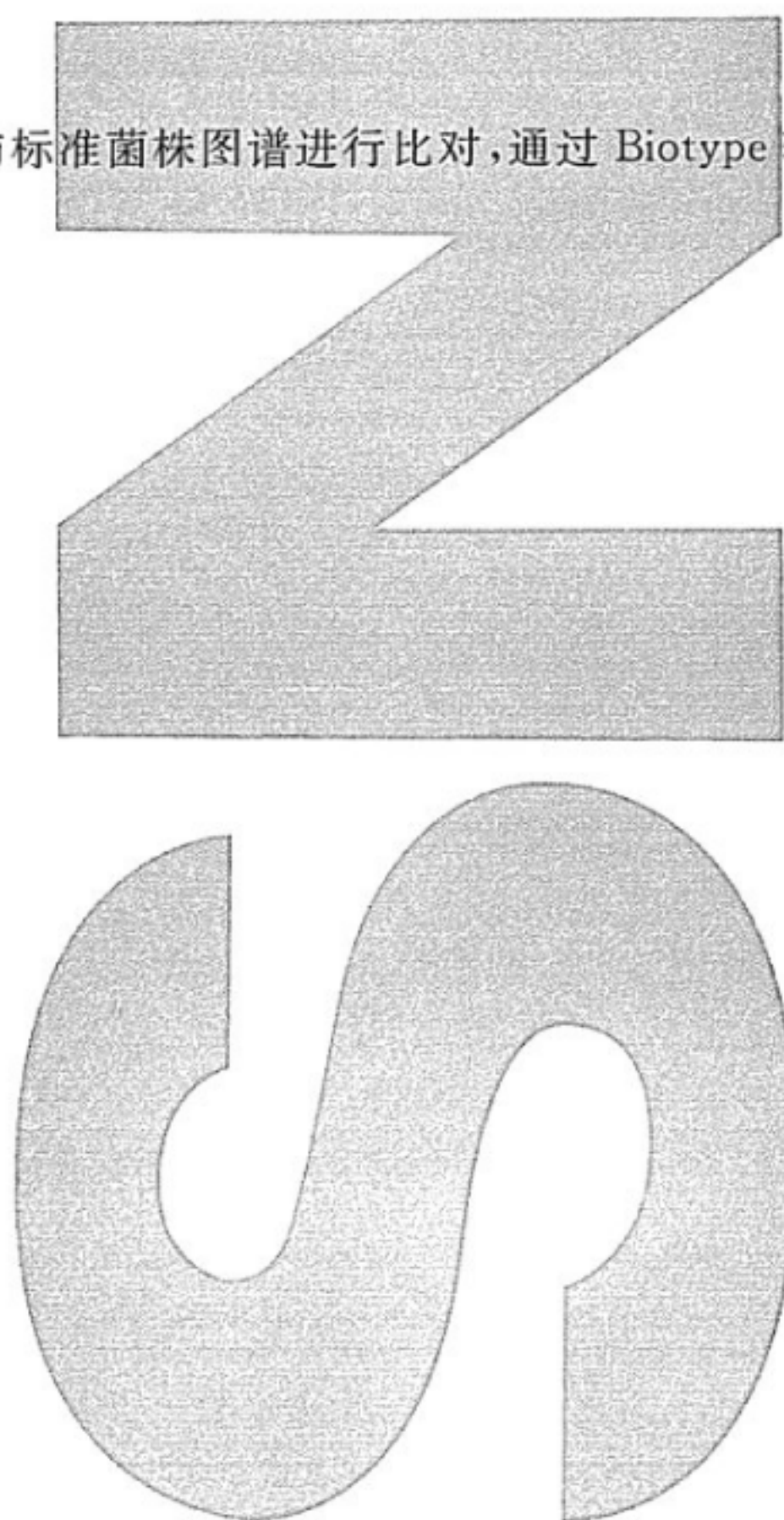
F.2.2.4 图谱分析

F.2.2.4.1 图谱矫正

应用相关软件,打开需要分析的图谱,进行调基和标峰,再通过标准样品图谱对需要分析的图谱进行矫正。

F.2.2.4.2 图谱鉴定

将获得的质谱分析图谱与标准菌株图谱进行比对,通过 Biotype 软件计算得到匹配值,根据分值的高低判断待测样品的种类。



参 考 文 献

- [1] Zhang Zheng-guang et al. Molecular Detection of *Verticillium albo-atrum* by PCR Based on Its Sequences. *Agricultural Sciences in China*. 2005, 4(10): 760-766.
- [2] 杜洪忠, 吴品珊, 严进. 苜蓿黄萎病菌实时荧光 PCR 检测方法. *植物检疫*, 2011, 2(25): 45-47.
- [3] Jie Tao, Guiming Zhang, Zide Jiang et al. Detection of pathogenic *Verticillium* spp. Using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 2009, 23: 3647-3654.
-

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
苜蓿黄萎病菌检疫鉴定方法
SN/T 1145—2014

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 27 千字
2014年12月第一版 2014年12月第一次印刷
印数 1—1 300

*

书号: 155066·2-27863 定价 21.00 元

