



中华人民共和国国家标准

GB 5009.22—2016

食品安全国家标准

食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定

2016-12-23 发布

2017-06-23 实施

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会
国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5009.22—2003《食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定》、GB/T 5009.23—2006《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定》、GB 5009.24—2010《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素 M₁ 和 B₁ 的测定》、GB/T 23212—2008《牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 的测定 液相色谱-荧光检测法》、GB/T 18979—2003《食品中黄曲霉毒素的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法》、SN 0339—1995《出口茶叶中黄曲霉毒素 B₁ 检验方法》、SN/T 1664—2005《牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 M₁、B₁、B₂、G₁、G₂ 含量的测定》、SN/T 1101—2002《进出口油籽及粮谷中黄曲霉毒素的检验方法》、SN 0637—1997《出口油籽、坚果及坚果制品中黄曲霉毒素的检验方法 液相色谱法》、SN/T 1736—2006《进出口蜂蜜中黄曲霉毒素的检验方法 高效液相色谱法》、NY/T 1286—2007《花生黄曲霉毒素 B₁ 的测定 高效液相色谱法》。

本标准与 GB/T 5009.22—2003 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定”;
- 根据 GB 2761—2011 的要求,增加了方法的适用范围;
- 增加了同位素稀释液相色谱-串联质谱法为第一法;
- 增加了高效液相色谱-柱前衍生法为第二法;
- 增加了高效液相色谱-柱后衍生法为第三法;
- 修改了酶联免疫法,并将方法名称更改为酶联免疫吸附筛查法;
- 增加了免疫亲和柱以及酶联免疫试剂盒质量判定要求与方法;
- 修改了测定组分为黄曲霉毒素 B 族和 G 族化合物。

食品安全国家标准

食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定

1 范围

本标准规定了食品中黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ (以下简称 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂) 的测定方法。

本标准第一法为同位素稀释液相色谱-串联质谱法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 的测定。

本标准第二法为高效液相色谱-柱前衍生法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 的测定。

本标准第三法为高效液相色谱-柱后衍生法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 的测定。

本标准第四法为酶联免疫吸附筛查法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品、婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品中 AFT B₁ 的测定。

本标准第五法为薄层色谱法,适用于谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、油脂及其制品、调味品中 AFT B₁ 的测定。

第一法 同位素稀释液相色谱-串联质谱法

2 原理

试样中的黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂,用乙腈-水溶液或甲醇-水溶液提取,提取液用含 1% Triton X-100(或吐温-20)的磷酸盐缓冲溶液稀释后(必要时经黄曲霉毒素固相净化柱初步净化),通过免疫亲和柱净化和富集,净化液浓缩、定容和过滤后经液相色谱分离,串联质谱检测,同位素内标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 乙腈(CH₃CN):色谱纯。

3.1.2 甲醇(CH₃OH):色谱纯。

3.1.3 乙酸铵(CH₃COONH₄):色谱纯。

3.1.4 氯化钠(NaCl)。

- 3.1.5 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 3.1.6 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.7 氯化钾(KCl)。
- 3.1.8 盐酸(HCl)。
- 3.1.9 Triton X-100[$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$](或吐温-20, $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 乙酸铵溶液(5 mmol/L):称取 0.39 g 乙酸铵,用水溶解后稀释至 1 000 mL,混匀。
- 3.2.2 乙腈-水溶液(84+16):取 840 mL 乙腈加入 160 mL 水,混匀。
- 3.2.3 甲醇-水溶液(70+30):取 700 mL 甲醇加入 300 mL 水,混匀。
- 3.2.4 乙腈-水溶液(50+50):取 50 mL 乙腈加入 50 mL 水,混匀。
- 3.2.5 乙腈-甲醇溶液(50+50):取 50 mL 乙腈加入 50 mL 甲醇,混匀。
- 3.2.6 10%盐酸溶液:取 1 mL 盐酸,用纯水稀释至 10 mL,混匀。
- 3.2.7 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS):称取 8.00 g 氯化钠、1.20 g 磷酸氢二钠(或 2.92 g 十二水磷酸氢二钠)、0.20 g 磷酸二氢钾、0.20 g 氯化钾,用 900 mL 水溶解,用盐酸调节 pH 至 7.4 ± 0.1 ,加水稀释至 1 000 mL。
- 3.2.8 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS:取 10 mL Triton X-100(或吐温-20),用 PBS 稀释至 1 000 mL。

3.3 标准品

- 3.3.1 AFT B₁标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$, CAS:1162-65-8):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.2 AFT B₂标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, CAS:7220-81-7):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.3 AFT G₁标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$, CAS:1165-39-5):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.4 AFT G₂标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$, CAS:7241-98-7):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 3.3.5 同位素内标 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₁($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$, CAS:157449-45-0):纯度 $\geq 98\%$,浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 3.3.6 同位素内标 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₂($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, CAS:157470-98-8):纯度 $\geq 98\%$,浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 3.3.7 同位素内标 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₁($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$, CAS:157444-07-9):纯度 $\geq 98\%$,浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 3.3.8 同位素内标 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₂($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$, CAS:157462-49-7):纯度 $\geq 98\%$,浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

注:标准物质可以使用满足溯源要求的商品化标准溶液。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 标准储备溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别称取 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂ 1 mg(精确至 0.01 mg),用乙腈溶解并定容至 100 mL。此溶液浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溶液转移至试剂瓶中后,在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存,备用。临用前进行浓度校准(校准方法参见附录 A)。
- 3.4.2 混合标准工作液(100 ng/mL):准确移取混合标准储备溶液(1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1.00 mL 至 100 mL 容量瓶中,乙腈定容。此溶液密封后避光 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存,三个月有效。
- 3.4.3 混合同位素内标工作液(100 ng/mL):准确移取 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₁、 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₂、 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₁和 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₂各 2.00 mL,用乙腈定容至 10 mL。在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存,备用。
- 3.4.4 标准系列工作溶液:准确移取混合标准工作液(100 ng/mL)10 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 、500 μL 、800 μL 、1 000 μL 至 10 mL 容量瓶中,加入 200 μL 100 ng/mL 的同位素内标工作液,用初始流动相定容至刻度,配制浓度点为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、8.0 ng/mL、

10.0 ng/mL 的系列标准溶液。

4 仪器和设备

- 4.1 匀浆机。
- 4.2 高速粉碎机。
- 4.3 组织捣碎机。
- 4.4 超声波/涡旋振荡器或摇床。
- 4.5 天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 4.6 涡旋混合器。
- 4.7 高速均质器:转速 6 500 r/min~24 000 r/min。
- 4.8 离心机:转速 \geq 6 000 r/min。
- 4.9 玻璃纤维滤纸:快速、高载量、液体中颗粒保留 1.6 μ m。
- 4.10 固相萃取装置(带真空泵)。
- 4.11 氮吹仪。
- 4.12 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。
- 4.13 液相色谱柱。
- 4.14 免疫亲和柱:AFT B₁柱容量 \geq 200 ng,AFT B₁柱回收率 \geq 80%,AFT G₂的交叉反应率 \geq 80%(验证方法参见附录 B)。

注:对于不同批次的亲和柱在使用前需进行质量验证。

- 4.15 黄曲霉毒素专用型固相萃取净化柱或功能相当的固相萃取柱(以下简称净化柱):对复杂基质样品测定时使用。
- 4.16 微孔滤头:带 0.22 μ m 微孔滤膜(所选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象,方可使用)。
- 4.17 筛网:1 mm~2 mm 试验筛孔径。
- 4.18 pH 计。

5 分析步骤

使用不同厂商的免疫亲和柱,在样品上样、淋洗和洗脱的操作方面可能会略有不同,应该按照供应商所提供的操作说明书要求进行操作。

警示:整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中,操作者应严格按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

5.1 样品制备

5.1.1 液体样品(植物油、酱油、醋等)

采样量需大于 1 L,对于袋装、瓶装等包装样品需至少采集 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,其中任意的 100 g(mL)样品进行检测。

5.1.2 固体样品(谷物及其制品、坚果及籽类、婴幼儿谷类辅助食品等)

采样量需大于 1 kg,用高速粉碎机将其粉碎,过筛,使其粒径小于 2 mm 孔径试验筛,混合均匀后缩分至 100 g,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

5.1.3 半流体(腐乳、豆豉等)

采样量需大于 1 kg(L),对于袋装、瓶装等包装样品需至少采集 3 个包装(同一批次或号),用组织

捣碎机捣碎混匀后,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

5.2 样品提取

5.2.1 液体样品

5.2.1.1 植物油脂

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 100 μ L 同位素内标工作液(3.4.3)振荡混合后静置 30 min。加入 20 mL 乙腈-水溶液(84+16)或甲醇-水溶液(70+30),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min,取上清液备用。

5.2.1.2 酱油、醋

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 125 μ L 同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min。用乙腈或甲醇定容至 25 mL(精确至 0.1 mL),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

5.2.2 固体样品

5.2.2.1 一般固体样品

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 100 μ L 同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min。加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84+16)或甲醇-水溶液(70+30),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

5.2.2.2 婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 100 μ L 同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min。加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(50+50)或甲醇-水溶液(70+30),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

5.2.3 半流体样品

称取 5 g 试样(精确至 0.01g)于 50 mL 离心管中,加入 100 μ L 同位素内标工作液振荡混合后静置 30 min。加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84+16)或甲醇-水溶液(70+30),置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

5.3 样品净化

5.3.1 免疫亲和柱净化

5.3.1.1 上样液的准备

准确移取 4 mL 上清液,加入 46 mL 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS(使用甲醇-水溶液提取时可减半加入),混匀。

5.3.1.2 免疫亲和柱的准备

将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。

5.3.1.3 试样的净化

待免疫亲和柱内原有液体流尽后,将上述样液移至 50 mL 注射器筒中,调节下滴速度,控制样液以 1 mL/min~3 mL/min 的速度稳定下滴。待样液滴完后,往注射器筒内加入 2×10 mL 水,以稳定流速淋洗免疫亲和柱。待水滴完后,用真空泵抽干亲和柱。脱离真空系统,在亲和柱下部放置 10 mL 刻度试管,取下 50 mL 的注射器筒,加入 2×1 mL 甲醇洗脱亲和柱,控制 1 mL/min~3 mL/min 的速度下滴,再用真空泵抽干亲和柱,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 1.0 mL 初始流动相,涡旋 30 s 溶解残留物,0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液于进样瓶中以备进样。

5.3.2 黄曲霉毒素固相净化柱和免疫亲和柱同时使用(对花椒、胡椒和辣椒等复杂基质)

5.3.2.1 净化柱净化

移取适量上清液,按净化柱操作说明进行净化,收集全部净化液。

5.3.2.2 免疫亲和柱净化

用刻度移液管准确吸取上述净化液 4 mL,加入 46 mL 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS[使用甲醇-水溶液提取时,加入 23 mL 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS],混匀。按 5.3.1.2 和 5.3.1.3 处理。

注:全自动(在线)或半自动(离线)的固相萃取仪器可优化操作参数后使用。

5.4 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件列出如下:

- 流动相:A相:5 mmol/L 乙酸铵溶液;B相:乙腈-甲醇溶液(50+50);
- 梯度洗脱:32% B(0 min~0.5 min),45% B(3 min~4 min),100% B(4.2 min~4.8 min),32% B(5.0 min~7.0 min);
- 色谱柱:C₁₈柱(柱长 100 mm,柱内径 2.1 mm;填料粒径 1.7 μm),或相当者;
- 流速:0.3 mL/min;
- 柱温:40 °C;
- 进样体积:10 μL。

5.5 质谱参考条件

质谱参考条件列出如下:

- 检测方式:多离子反应监测(MRM);
- 离子源控制条件:参见表 1;
- 离子选择参数:参见表 2;
- 子离子扫描图:参见图 C.1~图 C.8;
- 液相色谱-质谱图:见图 C.9。

表 1 离子源控制条件

电离方式	ESI ⁺
毛细管电压/kV	3.5
锥孔电压/V	30
射频透镜 1 电压/V	14.9
射频透镜 2 电压/V	15.1

表 1 (续)

离子源温度/°C	150
锥孔反吹气流量/(L/h)	50
脱溶剂气温度/°C	500
脱溶剂气流量/(L/h)	800
电子倍增电压/V	650

表 2 离子选择参数表

化合物名称	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	碰撞能量 eV	定性离子 (m/z)	碰撞能量 eV	离子化方式
AFT B ₁	313	285	22	241	38	ESI ⁺
¹³ C ₁₇ -AFT B ₁	330	255	23	301	35	ESI ⁺
AFT B ₂	315	287	25	259	28	ESI ⁺
¹³ C ₁₇ -AFT B ₂	332	303	25	273	28	ESI ⁺
AFT G ₁	329	243	25	283	25	ESI ⁺
¹³ C ₁₇ -AFT G ₁	346	257	25	299	25	ESI ⁺
AFT G ₂	331	245	30	285	27	ESI ⁺
¹³ C ₁₇ -AFT G ₂	348	259	30	301	27	ESI ⁺

5.6 定性测定

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较,变化范围应在±2.5%之内。

每种化合物的质谱定性离子必须出现,至少应包括一个母离子和两个子离子,而且同一检测批次,对同一化合物,样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比,其允许偏差不得超过表 3 规定的范围。

表 3 定性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
允许相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

5.7 标准曲线的制作

在 5.4、5.5 的液相色谱串联质谱仪分析条件下,将标准系列溶液由低到高浓度进样检测,以 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 色谱峰与各对应内标色谱峰的峰面积比值-浓度作图,得到标准曲线回归方程,其线性相关系数应大于 0.99。

5.8 试样溶液的测定

取 5.3 处理得到的待测溶液进样,内标法计算待测液中目标物质的质量浓度,按第 6 章计算样品中待测物的含量。待测液中的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围则应适当减少取样量重新测定。

5.9 空白试验

不称取试样,按 5.2 和 5.3 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

6 分析结果的表述

试样中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 的残留量按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 或 AFT G₂ 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ —— 进样溶液中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 或 AFT G₂ 按照内标法在标准曲线中对应的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V₁ —— 试样提取液体积(植物油脂、固体、半固体按加入的提取液体积;酱油、醋按定容总体积),单位为毫升(mL);
- V₃ —— 样品经净化洗脱后的最终定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 —— 换算系数;
- V₂ —— 用于净化分取的样品体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

7 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 20%。

8 其他

当称取样品 5 g 时,AFT B₁ 的检出限为:0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFT B₂ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFT G₁ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFT G₂ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$;AFT B₁ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFT B₂ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFT G₁ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFT G₂ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第二法 高效液相色谱-柱前衍生法

9 原理

试样中的黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂,用乙腈-水溶液或甲醇-水溶液的混合溶液提取,提取液经黄曲霉毒素固相净化柱净化去除脂肪、蛋白质、色素及碳水化合物等干扰物质,净化液用三氟乙酸柱前衍生,液相色谱分离,荧光检测器检测,外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 试剂

- 10.1.1 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。
 10.1.2 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。
 10.1.3 正己烷(C_6H_{14}): 色谱纯。
 10.1.4 三氟乙酸(CF_3COOH)。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 乙腈-水溶液(84+16): 取 840 mL 乙腈加入 160 mL 水。
 10.2.2 甲醇-水溶液(70+30): 取 700 mL 甲醇加入 300 mL 水。
 10.2.3 乙腈-水溶液(50+50): 取 500 mL 乙腈加入 500 mL 水。
 10.2.4 乙腈-甲醇溶液(50+50): 取 500 mL 乙腈加入 500 mL 甲醇。

10.3 标准品

- 10.3.1 AFT B₁ 标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$, CAS 号: 1162-65-8): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
 10.3.2 AFT B₂ 标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, CAS 号: 7220-81-7): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
 10.3.3 AFT G₁ 标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$, CAS 号: 1165-39-5): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
 10.3.4 AFT G₂ 标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$, CAS 号: 7241-98-7): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

注: 标准物质可以使用满足溯源要求的商品化标准溶液。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 标准储备溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 分别称取 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 1 mg(精确至 0.01 mg), 用乙腈溶解并定容至 100 mL。此溶液浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溶液转移至试剂瓶中后, 在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存, 备用。临用前进行浓度校准(校准方法参见附录 A)。
 10.4.2 混合标准工作液(AFT B₁ 和 AFT G₁: 100 ng/mL, AFT B₂ 和 AFT G₂: 30 ng/mL): 准确移取 AFT B₁ 和 AFT G₁ 标准储备溶液各 1 mL, AFT B₂ 和 AFT G₂ 标准储备溶液各 300 μL 至 100 mL 容量瓶中, 乙腈定容。密封后避光 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存, 三个月内有效。
 10.4.3 标准系列工作溶液: 分别准确移取混合标准工作液 10 μL 、50 μL 、200 μL 、500 μL 、1 000 μL 、2 000 μL 、4 000 μL 至 10 mL 容量瓶中, 用初始流动相定容至刻度(含 AFT B₁ 和 AFT G₁ 浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL, AFT B₂ 和 AFT G₂ 浓度为 0.03 ng/mL、0.15 ng/mL、0.6 ng/mL、1.5 ng/mL、3.0 ng/mL、6.0 ng/mL、12 ng/mL 的系列标准溶液)。

11 仪器和设备

- 11.1 匀浆机。
 11.2 高速粉碎机。
 11.3 组织捣碎机。
 11.4 超声波/涡旋振荡器或摇床。

- 11.5 天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 11.6 涡旋混合器。
- 11.7 高速均质器:转速 6 500 r/min~24 000 r/min。
- 11.8 离心机:转速 \geq 6 000 r/min。
- 11.9 玻璃纤维滤纸:快速、高载量、液体中颗粒保留 1.6 μm 。
- 11.10 氮吹仪。
- 11.11 液相色谱仪:配荧光检测器。
- 11.12 色谱分离柱。
- 11.13 黄曲霉毒素专用型固相萃取净化柱(以下简称净化柱),或相当者。
- 11.14 一次性微孔滤头:带 0.22 μm 微孔滤膜(所选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象,方可使用)。
- 11.15 筛网:1 mm~2 mm 试验筛孔径。
- 11.16 恒温箱。
- 11.17 pH 计。

12 分析步骤

12.1 样品制备

12.1.1 液体样品(植物油、酱油、醋等)

采样量需大于 1 L,对于袋装、瓶装等包装样品需至少采集 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,其中任意的 100 g(mL)样品进行检测。

12.1.2 固体样品(谷物及其制品、坚果及籽类、婴幼儿谷类辅助食品等)

采样量需大于 1 kg,用高速粉碎机将其粉碎,过筛,使其粒径小于 2 mm 孔径试验筛,混合均匀后缩分至 100 g,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

12.1.3 半流体(腐乳、豆豉等)

采样量需大于 1 kg(L),对于袋装、瓶装等包装样品需至少采集 3 个包装(同一批次或号),用组织捣碎机捣碎混匀后,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

12.2 样品提取

12.2.1 液体样品

12.2.1.1 植物油脂

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-水溶液(84+16)或甲醇-水溶液(70+30),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min,取上清液备用。

12.2.1.2 酱油、醋

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,用乙腈或甲醇定容至 25 mL(精确至 0.1 mL),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

12.2.2 固体样品

12.2.2.1 一般固体样品

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84+16)或甲醇-水溶液(70+30),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

12.2.2.2 婴幼儿配方食品和婴幼儿辅助食品

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(50+50)或甲醇-水溶液(70+30),涡旋混匀,置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

12.2.3 半流体样品

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84+16)或甲醇-水溶液(70+30),置于超声波/涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min(或用均质器均质 3 min),在 6 000 r/min 下离心 10 min(或均质后玻璃纤维滤纸过滤),取上清液备用。

12.3 样品黄曲霉毒素固相净化柱净化

移取适量上清液,按净化柱操作说明进行净化,收集全部净化液。

12.4 衍生

用移液管准确吸取 4.0 mL 净化液于 10 mL 离心管后在 50 °C 下用氮气缓缓地吹至近干,分别加入 200 μ L 正己烷和 100 μ L 三氟乙酸,涡旋 30 s,在 40 °C \pm 1 °C 的恒温箱中衍生 15 min,衍生结束后,在 50 °C 下用氮气缓缓地将衍生液吹至近干,用初始流动相定容至 1.0 mL,涡旋 30 s 溶解残留物,过 0.22 μ m 滤膜,收集滤液于进样瓶中以备进样。

12.5 色谱参考条件

色谱参考条件列出如下:

- a) 流动相:A 相:水,B 相:乙腈-甲醇溶液(50+50);
- b) 梯度洗脱:24% B(0 min~6 min),35% B(8.0 min~10.0 min),100% B(10.2 min~11.2 min),24% B(11.5 min~13.0 min);
- c) 色谱柱:C₁₈柱(柱长 150 mm 或 250 mm,柱内径 4.6 mm,填料粒径 5.0 μ m),或相当者;
- d) 流速:1.0 mL/min;
- e) 柱温:40 °C;
- f) 进样体积:50 μ L;
- g) 检测波长:激发波长 360 nm;发射波长 440 nm;
- h) 液相色谱图:参见图 D.1。

12.6 样品测定

12.6.1 标准曲线的制作

系列标准工作溶液由低到高浓度依次进样检测,以峰面积为纵坐标-浓度为横坐标作图,得到标准曲线回归方程。

12.6.2 试样溶液的测定

待测样液中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,浓度超过线性范围的样品则应稀释后重新进样分析。

12.6.3 空白试验

不称取试样,按 12.2、12.3 和 12.4 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

13 分析结果的表述

试样中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 的残留量按式(2)计算:

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- X —— 试样中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 或 AFT G₂ 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ —— 进样溶液中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 或 AFT G₂ 按照外标法在标准曲线中对应的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V₁ —— 试样提取液体积(植物油脂、固体、半固体按加入的提取液体积;酱油、醋按定容总体积),单位为毫升(mL);
- V₃ —— 净化液的最终定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 —— 换算系数;
- V₂ —— 净化柱净化后的取样液体积,单位为毫升(mL);
- m —— 试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

14 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 20%。

15 其他

当称取样品 5 g 时,柱前衍生法的 AFT B₁ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFT B₂ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFT G₁ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFT G₂ 的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$;柱前衍生法的 AFT B₁ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFT B₂ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFT G₁ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFT G₂ 的定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第三法 高效液相色谱-柱后衍生法

导语:下述方法的仪器检测部分,包括碘或溴试剂衍生、光化学衍生、电化学衍生等柱后衍生方法,可根据实际情况,选择其中一种方法即可。

16 原理

试样中的黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂,用乙腈-水溶液或甲醇-水

溶液的混合溶液提取,提取液经免疫亲和柱净化和富集,净化液浓缩、定容和过滤后经液相色谱分离,柱后衍生(碘或溴试剂衍生、光化学衍生、电化学衍生等),经荧光检测器检测,外标法定量。

17 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

17.1 试剂

- 17.1.1 甲醇(CH₃OH):色谱纯。
- 17.1.2 乙腈(CH₃CN):色谱纯。
- 17.1.3 氯化钠(NaCl)。
- 17.1.4 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。
- 17.1.5 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。
- 17.1.6 氯化钾(KCl)。
- 17.1.7 盐酸(HCl)。
- 17.1.8 Triton X-100[C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n](或吐温-20,C₅₈H₁₁₄O₂₆)。
- 17.1.9 碘衍生使用试剂:碘(I₂)。
- 17.1.10 溴衍生使用试剂:三溴化吡啶(C₅H₆Br₃N₂)。
- 17.1.11 电化学衍生使用试剂:溴化钾(KBr)、浓硝酸(HNO₃)。

17.2 试剂配制

- 17.2.1 乙腈-水溶液(84+16):取 840 mL 乙腈加入 160 mL 水。
- 17.2.2 甲醇-水溶液(70+30):取 700 mL 甲醇加入 300 mL 水。
- 17.2.3 乙腈-水溶液(50+50):取 500 mL 乙腈加入 500 mL 水。
- 17.2.4 乙腈-水溶液(10+90):取 100 mL 乙腈加入 900 mL 水。
- 17.2.5 乙腈-甲醇溶液(50+50):取 500 mL 乙腈加入 500 mL 甲醇。
- 17.2.6 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS):称取 8.00 g 氯化钠、1.20 g 磷酸氢二钠(或 2.92 g 十二水磷酸氢二钠)、0.20 g 磷酸二氢钾、0.20 g 氯化钾,用 900 mL 水溶解,用盐酸调节 pH 至 7.4,用水定容至 1 000 mL。
- 17.2.7 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS:取 10 mL Triton X-100,用 PBS 定容至 1 000 mL。
- 17.2.8 0.05% 碘溶液:称取 0.1 g 碘,用 20 mL 甲醇溶解,加水定容至 200 mL,用 0.45 μm 的滤膜过滤,现配现用(仅碘柱后衍生法使用)。
- 17.2.9 5 mg/L 三溴化吡啶水溶液:称取 5 mg 三溴化吡啶溶于 1 L 水中,用 0.45 μm 的滤膜过滤,现配现用(仅溴柱后衍生法使用)。

17.3 标准品

- 17.3.1 AFT B₁ 标准品(C₁₇H₁₂O₆,CAS 号:1162-65-8):纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 17.3.2 AFT B₂ 标准品(C₁₇H₁₄O₆,CAS 号:7220-81-7):纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 17.3.3 AFT G₁ 标准品(C₁₇H₁₂O₇,CAS 号:1165-39-5):纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。
- 17.3.4 AFT G₂ 标准品 C₁₇H₁₄O₇,CAS 号:7241-98-7):纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

注:标准物质可以使用满足溯源要求的商品化标准溶液。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 标准储备溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):分别称取 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂ 1 mg(精确至 0.01 mg),用乙腈溶解并定容至 100 mL。此溶液浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。溶液转移至试剂瓶中后,在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存,备用。临用前进行浓度校准(校准方法参见附录 A)。

17.4.2 混合标准工作液(AFT B₁和 AFT G₁:100 ng/mL,AFT B₂和 AFT G₂:30 ng/mL):准确移取 AFT B₁和 AFT G₁标准储备溶液各 1 mL,AFT B₂和 AFT G₂标准储备溶液各 300 μL 至 100 mL 容量瓶中,乙腈定容。密封后避光-20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存,三个月内有效。

17.4.3 标准系列工作溶液:分别准确移取混合标准工作液 10 μL 、50 μL 、200 μL 、500 μL 、1 000 μL 、2 000 μL 、4 000 μL 至 10 mL 容量瓶中,用初始流动相定容至刻度(含 AFT B₁和 AFT G₁浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL,AFT B₂和 AFT G₂浓度为 0.03 ng/mL、0.15 ng/mL、0.6 ng/mL、1.5 ng/mL、3.0 ng/mL、6.0 ng/mL、12 ng/mL 的系列标准溶液)。

18 仪器和设备

18.1 匀浆机。

18.2 高速粉碎机。

18.3 组织捣碎机。

18.4 超声波/涡旋振荡器或摇床。

18.5 天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

18.6 涡旋混合器。

18.7 高速均质器:转速 6 500 r/min~24 000 r/min。

18.8 离心机:转速 \geq 6 000 r/min。

18.9 玻璃纤维滤纸:快速、高载量、液体中颗粒保留 1.6 μm 。

18.10 固相萃取装置(带真空泵)。

18.11 氮吹仪。

18.12 液相色谱仪:配荧光检测器(带一般体积流动池或者大体积流通池)。

注:当带大体积流通池时不需要再使用任何型号或任何方式的柱后衍生器。

18.13 液相色谱柱。

18.14 光化学柱后衍生器(适用于光化学柱后衍生法)。

18.15 溶剂柱后衍生装置(适用于碘或溴试剂衍生法)。

18.16 电化学柱后衍生器(适用于电化学柱后衍生法)。

18.17 免疫亲和柱:AFT B₁柱容量 \geq 200 ng,AFT B₁柱回收率 \geq 80%,AFT G₂的交叉反应率 \geq 80%(验证方法参见附录 B)。

注:对于每个批次的亲和柱使用前需质量验证。

18.18 黄曲霉毒素固相净化柱或功能相当的固相萃取柱(以下简称净化柱):对复杂基质样品测定时使用。

18.19 一次性微孔滤头:带 0.22 μm 微孔滤膜(所选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象,方可使用)。

18.20 筛网:1 mm~2 mm 试验筛孔径。

19 分析步骤

使用不同厂商的免疫亲和柱,在样品的上样、淋洗和洗脱的操作方面可能略有不同,应该按照供应

商所提供的操作说明书要求进行操作。

警示:整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中,操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

19.1 样品制备

同 12.1。

19.2 样品提取

同 12.2。

19.3 样品净化

19.3.1 免疫亲和柱净化

19.3.1.1 上样液的准备

准确移取 4 mL 上述上清液,加入 46 mL 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS(使用甲醇-水溶液提取时可减半加入),混匀。

19.3.1.2 免疫亲和柱的准备

将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。

19.3.1.3 试样的净化

免疫亲和柱内的液体放弃后,将上述样液移至 50 mL 注射器筒中,调节下滴速度,控制样液以 1 mL/min~3 mL/min 的速度稳定下滴。待样液滴完后,往注射器筒内加入 2×10 mL 水,以稳定流速淋洗免疫亲和柱。待水滴完后,用真空泵抽干亲和柱。脱离真空系统,在亲和柱下部放置 10 mL 刻度试管,取下 50 mL 的注射器筒,2×1 mL 甲醇洗脱亲和柱,控制 1 mL/min~3 mL/min 的速度下滴,再用真空泵抽干亲和柱,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,用初始流动相定容至 1.0 mL,涡旋 30 s 溶解残留物,0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液于进样瓶中以备进样。

19.3.2 黄曲霉毒素固相净化柱和免疫亲和柱同时使用(对花椒、胡椒和辣椒等复杂基质)

19.3.2.1 净化柱净化

移取适量上清液,按净化柱操作说明进行净化,收集全部净化液。

19.3.2.2 免疫亲和柱净化

用刻度移液管准确吸取上部净化液 4 mL,加入 46 mL 1% Triton X-100(或吐温-20)的 PBS(使用甲醇-水溶液提取时可减半加入),混匀。按 19.4.1.3 处理。

注:全自动(在线)或半自动(离线)的固相萃取仪器可优化操作参数后使用。

19.4 液相色谱参考条件

19.4.1 无衍生器法(大流通池直接检测)

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 流动相:A 相,水;B 相,乙腈-甲醇(50+50);
- b) 等梯度洗脱条件:A,65%;B,35%;

- c) 色谱柱: C₁₈柱(柱长 100 mm, 柱内径 2.1 mm, 填料粒径 1.7 μm), 或相当者;
- d) 流速: 0.3 mL/min;
- e) 柱温: 40 °C;
- f) 进样量: 10 μL;
- g) 激发波长: 365 nm; 发射波长: 436 nm(AFT B₁、AFT B₂), 463 nm(AFT G₁、AFT G₂);
- h) 液相色谱图见图 D.2。

19.4.2 柱后光化学衍生法

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 流动相: A相, 水; B相, 乙腈-甲醇(50+50);
- b) 等梯度洗脱条件: A, 68%; B, 32%;
- c) 色谱柱: C₁₈柱(柱长 150 mm 或 250 mm, 柱内径 4.6 mm, 填料粒径 5 μm), 或相当者;
- d) 流速: 1.0 mL/min;
- e) 柱温: 40 °C;
- f) 进样量: 50 μL;
- g) 光化学柱后衍生器;
- h) 激发波长: 360 nm; 发射波长: 440 nm;
- i) 液相色谱图见图 D.3。

19.4.3 柱后碘或溴试剂衍生法

19.4.3.1 柱后碘衍生法

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 流动相: A相, 水; B相, 乙腈-甲醇(50+50);
- b) 等梯度洗脱条件: A, 68%; B, 32%;
- c) 色谱柱: C₁₈柱(柱长 150 mm 或 250 mm, 柱内径 4.6 mm, 填料粒径 5 μm), 或相当者;
- d) 流速: 1.0 mL/min;
- e) 柱温: 40 °C;
- f) 进样量: 50 μL;
- g) 柱后衍生化系统;
- h) 衍生溶液: 0.05%碘溶液;
- i) 衍生溶液流速: 0.2 mL/min;
- j) 衍生反应管温度: 70 °C;
- k) 激发波长: 360 nm; 发射波长: 440 nm;
- l) 液相色谱图见图 D.4。

19.4.3.2 柱后溴衍生法

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 流动相: A相, 水; B相, 乙腈-甲醇(50+50);
- b) 等梯度洗脱条件: A, 68%; B, 32%;
- c) 色谱柱: C₁₈柱(柱长 150 mm 或 250 mm, 柱内径 4.6 mm, 填料粒径 5 μm), 或相当者;
- d) 流速: 1.0 mL/min;
- e) 色谱柱柱温: 40 °C;
- f) 进样量: 50 μL;

- g) 柱后衍生系统;
- h) 衍生溶液:5 mg/L 三溴化吡啶水溶液;
- i) 衍生溶液流速:0.2 mL/min;
- j) 衍生反应管温度:70 °C;
- k) 激发波长:360 nm;发射波长:440 nm;
- l) 液相色谱图见图 D.5。

19.4.4 柱后电化学衍生法

液相色谱参考条件列出如下:

- a) 流动相:A相,水(1 L 水中含 119 mg 溴化钾,350 μL 4 mol/L 硝酸);B相,甲醇;
- b) 等梯度洗脱条件:A,60%;B,40%;
- c) 色谱柱:C₁₈柱(柱长 150 mm 或 250 mm,柱内径 4.6 mm,填料粒径 5 μm),或相当者;
- d) 柱温:40 °C;
- e) 流速:1.0 mL/min;
- f) 进样量:50 μL;
- g) 电化学柱后衍生器:反应池工作电流 100 μA;1 根 PEEK 反应管路(长度 50 cm,内径 0.5 mm);
- h) 激发波长:360 nm;发射波长:440 nm;
- i) 液相色谱图见图 D.6。

19.5 样品测定

19.5.1 标准曲线的制作

系列标准工作溶液由低到高浓度依次进样检测,以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标作图,得到标准曲线回归方程。

19.5.2 试样溶液的测定

待测液中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,浓度超过线性范围的样品则应稀释后重新进样分析。

19.5.3 空白试验

不称取试样,按 19.3、19.4 和 19.5 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

20 分析结果的表述

试样中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 和 AFT G₂ 的残留量按式(3)计算:

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- X —— 试样中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 或 AFT G₂ 的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- ρ —— 进样溶液中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁ 或 AFT G₂ 按照外标法在标准曲线中对应的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V₁ —— 试样提取液体积(植物油脂、固体、半固体按加入的提取液体积;酱油、醋按定容总体积),单位为毫升(mL);

V_3 ——样品经免疫亲和柱净化洗脱后的最终定容体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——用于免疫亲和柱的分取样品体积,单位为毫升(mL);

1 000——换算系数;

m ——试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

21 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 20%。

22 其他

当称取样品 5 g 时,柱后光化学衍生法、柱后溴衍生法、柱后碘衍生法、柱后电化学衍生法的 AFT B₁ 的检出限为 0.03 μg/kg, AFT B₂ 的检出限为 0.01 μg/kg, AFT G₁ 的检出限为 0.03 μg/kg, AFT G₂ 的检出限为 0.01 μg/kg; 无衍生器法的 AFT B₁ 的检出限为 0.02 μg/kg, AFT B₂ 的检出限为 0.003 μg/kg, AFT G₁ 的检出限为 0.02 μg/kg, AFT G₂ 的检出限为 0.003 μg/kg;

柱后光化学衍生法、柱后溴衍生法、柱后碘衍生法、柱后电化学衍生法: AFT B₁ 的定量限为 0.1 μg/kg, AFT B₂ 的定量限为 0.03 μg/kg, AFT G₁ 的定量限为 0.1 μg/kg, AFT G₂ 的定量限为 0.03 μg/kg; 无衍生器法: AFT B₁ 的定量限为 0.05 μg/kg, AFT B₂ 的定量限为 0.01 μg/kg, AFT G₁ 的定量限为 0.05 μg/kg, AFT G₂ 的定量限为 0.01 μg/kg。

第四法 酶联免疫吸附筛查法

23 原理

试样中的黄曲霉毒素 B₁ 用甲醇水溶液提取,经均质、涡旋、离心(过滤)等处理获取上清液。被辣根过氧化物酶标记或固定在反应孔中的黄曲霉毒素 B₁,与试样上清液或标准品中的黄曲霉毒素 B₁ 竞争性结合特异性抗体。在洗涤后加入相应显色剂显色,经无机酸终止反应,于 450 nm 或 630 nm 波长下检测。样品中的黄曲霉毒素 B₁ 与吸光度在一定浓度范围内呈反比。

24 试剂和材料

配制溶液所需试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定二级水。

按照试剂盒说明书所述,配制所需溶液。

所用商品化的试剂盒需按照 E 中所述方法验证合格后方可使用。

25 仪器和设备

25.1 微孔板酶标仪:带 450 nm 与 630 nm(可选)滤光片。

25.2 研磨机。

25.3 振荡器。

25.4 电子天平:感量 0.01 g。

25.5 离心机:转速 $\geq 6\ 000$ r/min。

25.6 快速定量滤纸:孔径 $11\ \mu\text{m}$ 。

25.7 筛网:1 mm~2 mm 孔径。

25.8 试剂盒所要求的仪器。

26 分析步骤

26.1 样品前处理

26.1.1 液态样品(油脂和调味品)

取 100 g 待测样品摇匀,称取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管中,加入试剂盒所要求提取液,按照试纸盒说明书所述方法进行检测。

26.1.2 固态样品(谷物、坚果和特殊膳食用食品)

称取至少 100 g 样品,用研磨机进行粉碎,粉碎后的样品过 1 mm~2 mm 孔径试验筛。取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管中,加入试剂盒所要求提取液,按照试纸盒说明书所述方法进行检测。

26.2 样品检测

按照酶联免疫试剂盒所述操作步骤对待测试样(液)进行定量检测。

27 分析结果的表述

27.1 酶联免疫试剂盒定量检测的标准工作曲线绘制

按照试剂盒说明书提供的计算方法或者计算机软件,根据标准品浓度与吸光度变化关系绘制标准工作曲线。

27.2 待测液浓度计算

按照试剂盒说明书提供的计算方法以及计算机软件,将待测液吸光度代入 27.1 所获得公式,计算得待测液浓度(ρ)。

27.3 结果计算

食品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量按式(4)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

X ——试样中 AFT B₁ 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ ——待测液中黄曲霉毒素 B₁ 的浓度,单位为纳克每毫升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——提取液体积(固态样品为加入提取液体积,液态样品为样品和提取液总体积),单位为升(L);

f ——在前处理过程中的稀释倍数;

m ——试样的称样量,单位为千克(kg)。

计算结果保留小数点后两位。

阳性样品需用第一法、第二法或第三法进一步确认。

28 精密度

每个试样称取两份进行平行测定,以其算术平均值为分析结果。
其分析结果的相对相差应不大于 20%。

29 其他

当称取谷物、坚果、油脂、调味品等样品 5 g 时,方法检出限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。
当称取特殊膳食用食品样品 5 g 时,方法检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第五法 薄层色谱法

30 原理

样品经提取、浓缩、薄层分离后,黄曲霉毒素 B₁在紫外光(波长 365 nm)下产生蓝紫色荧光,根据其在薄层上显示荧光的最低检出量来测定含量。

31 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

31.1 试剂

- 31.1.1 甲醇(CH_3OH)。
- 31.1.2 正己烷(C_6H_{14})。
- 31.1.3 石油醚(沸程 30 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 或 60 $^{\circ}\text{C}$ ~90 $^{\circ}\text{C}$)。
- 31.1.4 三氯甲烷(CHCl_3)。
- 31.1.5 苯(C_6H_6)。
- 31.1.6 乙腈(CH_3CN)。
- 31.1.7 无水乙醚($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)。
- 31.1.8 丙酮($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$)。

注:以上试剂在试验时先进行一次试剂空白试验,如不干扰测定即可使用,否则需逐一进行重蒸。

- 31.1.9 硅胶 G:薄层层析用。
- 31.1.10 三氟乙酸(CF_3COOH)。
- 31.1.11 无水硫酸钠(Na_2SO_4)。
- 31.1.12 氯化钠(NaCl)。

31.2 试剂配制

- 31.2.1 苯-乙腈溶液(98+2):取 2 mL 乙腈加入 98 mL 苯中混匀。
- 31.2.2 甲醇-水溶液(55+45):取 550 mL 甲醇加入 450 mL 水中混匀。
- 31.2.3 甲醇-三氯甲烷(4+96):取 4 mL 甲醇加入 96 mL 三氯甲烷中混匀。
- 31.2.4 丙酮-三氯甲烷(8+92):取 8 mL 丙酮加入 92 mL 三氯甲烷中混匀。
- 31.2.5 次氯酸钠溶液(消毒用):取 100 g 漂白粉,加入 500 mL 水,搅拌均匀。另将 80 g 工业用碳酸钠

($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)溶于 500 mL 温水中,再将两液混合、搅拌,澄清后过滤。此滤液含次氯酸浓度约为 25 g/L。若用漂粉精制备,则碳酸钠的量可以加倍。所得溶液的浓度约为 50 g/L。污染的玻璃仪器用 10 g/L 氯酸钠溶液浸泡半天或用 50 g/L 次氯酸钠溶液浸泡片刻后,即可达到去毒效果。

31.3 标准品

AFT B₁标准品($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$,CAS号:1162-65-8):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

31.4 标准溶液配制

31.4.1 AFT B₁标准储备溶液(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$):准确称取 1 mg~1.2 mg AFT B₁标准品,先加入 2 mL 乙腈溶解后,再用苯稀释至 100 mL,避光,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,此溶液浓度约 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

纯度的测定:取 5 μL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFT B₁标准溶液,滴加于涂层厚度 0.25 mm 的硅胶 G 薄层板上,用甲醇-三氯甲烷与丙酮-三氯甲烷展开剂展开,在紫外光灯下观察荧光的产生,应符合以下条件:

- a) 在展开后,只有单一的荧光点,无其他杂质荧光点;
- b) 原点上没有任何残留的荧光物质。

31.4.2 AFT B₁标准工作液:准确吸取 1 mL 标准溶液储备液于 10 mL 容量瓶中,加苯-乙腈混合液至刻度,混匀。此溶液每毫升相当于 1.0 μg AFT B₁。吸取 1.0 mL 此稀释液,置于 5 mL 容量瓶中,加苯-乙腈混合液稀释至刻度,此溶液每毫升相当于 0.2 μg AFT B₁。再吸取 AFT B₁标准溶液(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 1.0 mL 置于 5 mL 容量瓶中,加苯-乙腈混合液稀释至刻度。此溶液每毫升相当于 0.04 μg AFT B₁。

32 仪器和设备

32.1 圆孔筛:2.0 mm 筛孔孔径。

32.2 小型粉碎机。

32.3 电动振荡器。

32.4 全玻璃浓缩器。

32.5 玻璃板:5 cm \times 20 cm。

32.6 薄层板涂布器。

注:可选购适用黄曲霉毒素检测的商品化薄层板。

32.7 展开槽:长 25 cm,宽 6 cm,高 4 cm。

32.8 紫外光灯:100 W~125 W,带 365 nm 滤光片。

32.9 微量注射器或血色素吸管。

33 分析步骤

警示:整个操作需在暗室条件下进行。

33.1 样品提取

33.1.1 玉米、大米、小麦、面粉、薯干、豆类、花生、花生酱等

33.1.1.1 甲法:称取 20.00 g 粉碎过筛试样(面粉、花生酱不需粉碎),置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加 30 mL 正己烷或石油醚和 100 mL 甲醇水溶液,在瓶塞上涂上一层水,盖严防漏。振荡 30 min,静置片刻,以叠成折叠式的快速定性滤纸过滤于分液漏斗中,待下层甲醇水带被分清后,放出甲醇水溶液于另

一具塞锥形瓶内。取 20.00 mL 甲醇水溶液(相当于 4g 试样)置于另一 125 mL 分液漏斗中,加 20 mL 三氯甲烷,振摇 2 min,静置分层,如出现乳化现象可滴加甲醇促使分层。放出三氯甲烷层,经盛有约 10 g 预先用三氯甲烷湿润的无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于 50 mL 蒸发皿中,再加 5 mL 三氯甲烷于分液漏斗中,重复振摇提取,三氯甲烷层一并滤于蒸发皿中,最后用少量三氯甲烷洗过滤器,洗液并于蒸发皿中。将蒸发皿放在通风柜于 65 °C 水浴上通风挥干,然后放在冰盒上冷却 2 min~3 min 后,准确加入 1 mL 苯-乙腈混合液(或将三氯甲烷用浓缩蒸馏器减压吹气蒸干后,准确加入 1 mL 苯-乙腈混合液)。用带橡皮头的滴管的管尖将残渣充分混合,若有苯的结晶析出,将蒸发皿从冰盒上取出,继续溶解、混合,晶体即消失,再用此滴管吸取上清液转移于 2 mL 具塞试管中。

33.1.1.2 乙法(限于玉米、大米、小麦及其制品):称取 20.00 g 粉碎过筛试样于 250 mL 具塞锥形瓶中,用滴管滴加约 6 mL 水,使试样湿润,准确加入 60 mL 三氯甲烷,振荡 30 min,加 12 g 无水硫酸钠,振摇后,静置 30 min,用叠成折叠式的快速定性滤纸过滤于 100 mL 具塞锥形瓶中。取 12 mL 滤液(相当于 4 g 试样)于蒸发皿中,在 65 °C 水浴锅上通风挥干,准确加入 1 mL 苯-乙腈混合液,以下按 33.1.1.1 自“用带橡皮头的滴管的管尖将残渣充分混合……”起依法操作。

33.1.2 花生油、香油、菜油等

称取 4.00 g 试样置于小烧杯中,用 20 mL 正己烷或石油醚将试样移于 125 mL 分液漏斗中。用 20 mL 甲醇水溶液分次洗烧杯,洗液一并移入分液漏斗中,振摇 2 min,静置分层后,将下层甲醇水溶液移入第二个分液漏斗中,再用 5 mL 甲醇水溶液重复振摇提取一次,提取液一并移入第二个分液漏斗中,在第二个分液漏斗中加入 20 mL 三氯甲烷,以下按 33.1.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作。

33.1.3 酱油、醋

称取 10.00 g 试样于小烧杯中,为防止提取时乳化,加 0.4 g 氯化钠,移入分液漏斗中,用 15 mL 三氯甲烷分次洗涤烧杯,洗液一并移入分液漏斗中。以下按 33.1.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作,最后加入 2.5 mL 苯-乙腈混合液,此溶液每毫升相当于 4 g 试样。

或称取 10.00 g 试样,置于分液漏斗中,再加 12 mL 甲醇(以酱油体积代替水,故甲醇与水的体积比仍约为 55 : 45),用 20 mL 三氯甲烷提取,以下按 33.1.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作。最后加入 2.5 mL 苯-乙腈混合液。此溶液每毫升相当于 4 g 试样。

33.1.4 干酱类(包括豆豉、腐乳制品)

称取 20.00 g 研磨均匀的试样,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 mL 正己烷或石油醚与 50 mL 甲醇水溶液。振荡 30 min,静置片刻,以叠成折叠式快速定性滤纸过滤,滤液静置分层后,取 24 mL 甲醇水层(相当 8 g 试样,其中包括 8 g 干酱类本身约含有 4 mL 水的体积在内)置于分液漏斗中,加入 20 mL 三氯甲烷,以下按 33.1.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作。最后加入 2 mL 苯-乙腈混合液。此溶液每毫升相当于 4 g 试样。

33.2 测定

33.2.1 单向展开法

33.2.1.1 薄层板的制备

称取约 3 g 硅胶 G,加相当于硅胶量 2 倍~3 倍的水,用力研磨 1 min~2 min 至成糊状后立即倒于涂布器内,推成 5 cm×20 cm,厚度约 0.25 mm 的薄层板三块。在空气中干燥约 15 min 后,在 100 °C 活化 2 h,取出,放干燥器中保存。一般可保存 2 d~3 d,若放置时间较长,可再活化后使用。

33.2.1.2 点样

将薄层板边缘附着的吸附剂刮净,在距薄层板下端 3 cm 的基线上用微量注射器或血色素吸管滴加样液。一块板可滴加 4 个点,点距边缘和点间距约为 1 cm,点直径约 3 mm。在同一块板上滴加点的大小应一致,滴加时可用吹风机用冷风边吹边加。滴加样式如下:

第一点:0 μL AFT B₁ 标准工作液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

第二点:20 μL 样液。

第三点:20 μL 样液+10 μL 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFT B₁ 标准工作液。

第四点:20 μL 样液+10 μL 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFT B₁ 标准工作液。

33.2.1.3 展开与观察

在展开槽内加 10 mL 无水乙醚,预展 12 cm,取出挥干。再于另一展开槽内加 10 mL 丙酮-三氯甲烷(8+92),展开 10 cm~12 cm,取出。在紫外光下观察结果,方法如下。

由于样液点上加滴 AFT B₁ 标准工作液,可使 AFT B₁ 标准点与样液中的 AFT B₁ 荧光点重叠。如样液为阴性,薄层板上的第三点中 AFT B₁ 为 0.000 4 μg ,可用作检查在样液内 AFT B₁ 最低检出量是否正常出现;如为阳性,则起定性作用。薄层板上的第四点中 AFT B₁ 为 0.002 μg ,主要起定位作用。

若第二点在与 AFT B₁ 标准点的相应位置上无蓝紫色荧光点,表示试样中 AFT B₁ 含量在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下,如在相应位置上有蓝紫色荧光点,则需进行确证试验。

33.2.1.4 确证试验

为了证实薄层板上样液荧光系由 AFT B₁ 产生的,加滴三氟乙酸,产生 AFT B₁ 的衍生物,展开后此衍生物的比移值在 0.1 左右。于薄层板左边依次滴加两个点。

第一点:0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFT B₁ 标准工作液 10 μL 。

第二点:20 μL 样液。于以上两点各加一小滴三氟乙酸盖于其上,反应 5 min 后,用吹风机吹热风 2 min 后,使热风吹到薄层板上的温度不高于 40 $^{\circ}\text{C}$,再于薄层板上滴加以下两个点。

第三点:0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFT B₁ 标准工作液 10 μL 。

第四点:20 μL 样液。

再展开(同 16.2.1.3),在紫外光灯下观察样液是否产生与 AFT B₁ 标准点相同的衍生物。未加三氟乙酸的三、四两点,可依次作为样液与标准的衍生物空白对照。

33.2.1.5 稀释定量

样液中的 AFT B₁ 荧光点的荧光强度如与 AFT B₁ 标准点的最低检出量(0.000 4 μg)的荧光强度一致,则试样中 AFT B₁ 含量即为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。如样液中荧光强度比最低检出量强,则根据其强度估计减少滴加微升数或将样液稀释后再滴加不同微升数,直至样液点的荧光强度与最低检出量的荧光强度一致为止。滴加式样如下:

第一点:10 μL AFT B₁ 标准工作液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

第二点:根据情况滴加 10 μL 样液。

第三点:根据情况滴加 15 μL 样液。

第四点:根据情况滴加 20 μL 样液。

33.2.1.6 结果计算

试样中 AFT B₁ 的含量按式(5)计算:

$$X = 0.0004 \times \frac{V_1 \times f}{V_2 \times m} \times 1000 \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- X ——试样中 AFT B₁ 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
 0.0004 ——AFT B₁ 的最低检出量,单位为微克(μg);
 V_1 ——加入苯-乙腈混合液的体积,单位为毫升(mL);
 f ——样液的总稀释倍数;
 V_2 ——出现最低荧光时滴加样液的体积,单位为毫升(mL);
 m ——加入苯-乙腈混合液溶解时相当试样的质量,单位为克(g);
 1000 ——换算系数。

结果表示到测定值的整数位。

33.2.2 双向展开法

如用单向展开法展开后,薄层色谱由于杂质干扰掩盖了 AFT B₁ 的荧光强度,需采用双向展开法。薄层板先用无水乙醚作横向展开,将干扰的杂质展至样液点的一边而 AFT B₁ 不动,然后再用丙酮-三氯甲烷(8+92)作纵向展开,试样在 AFT B₁ 相应处的杂质底色大量减少,因而提高了方法灵敏度。如用双向展开中滴加两点法展开仍有杂质干扰时,则可改用滴加一点法。

33.2.2.1 滴如两点法

33.2.2.1.1 点样

取薄层板三块,在距下端 3 cm 基线上滴加 AFT B₁ 标准使用液与样液。即在三块板的距左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 10 μL AFT B₁ 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在距左边缘 2.8 cm~3 cm 处各滴加 20 μL 样液,然后在第二块板的样液点上加滴 10 μL AFT B₁ 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在第三块板的样液点上加滴 10 μL 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AFT B₁ 标准使用液。

33.2.2.1.2 展开

33.2.2.1.2.1 横向展开:在展开槽内的长边置一玻璃支架,加 10 mL 无水乙醇,将上述点好的薄层板靠标准点的长边置于展开槽内展开,展至板端后,取出挥干,或根据情况需要时可再重复展开 1 次~2 次。

33.2.2.1.2.2 纵向展开:挥干的薄层板以丙酮-三氯甲烷(8+92)展开至 10 cm~12 cm 为止。丙酮与三氯甲烷的比例根据不同条件自行调节。

33.2.2.1.3 观察及评定结果

在紫外光灯下观察第一、二板,若第二板的第二点在 AFT B₁ 标准点的相应处出现最低检出量,而第一板在与第二板的相同位置上未出现荧光点,则试样中 AFT B₁ 含量在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。

若第一板在与第二板的相同位置上出现荧光点,则将第一板与第三板比较,看第三板上第二点与第一板上第二点的相同位置上的荧光点是否与 AFT B₁ 标准点重叠,如果重叠,再进行确证试验。在具体测定中,第一、二、三板可以同时做,也可按照顺序做。如按顺序做,当在第一板出现阴性时,第三板可以省略,如第一板为阳性,则第二板可以省略,直接作第三板。

33.2.2.1.4 确证试验

另取薄层板两块,于第四、第五两板距左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 10 μL AFT B₁ 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 1 小滴三氟乙酸;在距左边缘 2.8 cm~3 cm 处,于第四板滴加 20 μL 样液及 1 小滴三氟乙酸,于第五板滴加 20 μL 样液、10 μL AFT B₁ 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 1 小滴三氟乙酸。反应 5 min 后,用吹风机吹热风 2 min,使热风吹到薄层板上的温度不高于 40 $^{\circ}\text{C}$ 。再用双向展开法展开后,

观察样液是否产生与 AFT B₁ 标准点重叠的衍生物。观察时,可将第一板作为样液的衍生物空白板。如样液 AFT B₁ 含量高时,则将样液稀释后,按 33.2.1.4 做确证试验。

33.2.2.1.5 稀释定量

如样液 AFT B₁ 含量高时,按 16.3.1.5 稀释定量操作。如 AFT B₁ 含量低,稀释倍数小,在定量的纵向展开板上仍有杂质干扰,影响结果的判断,可将样液再做双向展开法测定,以确定含量。

33.2.2.1.6 结果计算

同 33.2.1.6。

33.2.2.2 滴加一点法

33.2.2.2.1 点样

取薄层板三块,在距下端 3 cm 基线上滴加 AFT B₁ 标准使用液与样液。即在三块板左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 20 μL 样液,在第二板的点上加 10 μL AFT B₁ 标准使用液(0.04 μg/mL)。在第三板的点上加滴 10 μL AFT B₁ 标准溶液(0.2 μg/mL)。

33.2.2.2.2 展开

同 33.2.2.1.2 的横向展开与纵向展开。

33.2.2.2.3 观察及评定结果

在紫外光灯下观察第一、二板,如第二板出现最低检出量的黄曲霉毒素 B₁ 标准点,而第一板与其相同位置上未出现荧光点,试样中 AFT B₁ 含量在 5 μg/kg 以下。如第一板在与第二板 AFT B₁ 相同位置上出现荧光点,则将第一板与第三板比较,看第三板上与第一板相同位置的荧光点是否与 AFT B₁ 标准点重叠,如果重叠再进行以下确证试验。

33.2.2.2.4 确证试验

另取两板,于距左边缘 0.8 cm~1 cm 处,第四板滴加 20 μL 样液、1 滴三氟乙酸;第五板滴加 20 μL 样液、10 μL 0.04 μg/mL AFT B₁ 标准使用液及 1 滴三氟乙酸。产生衍生物及展开方法同 33.2.2.1。再将以上二板在紫外光灯下观察,以确定样液点是否产生与 AFT B₁ 标准点重叠的衍生物,观察时可将第一板作为样液的衍生物空白板。经过以上确证试验定为阳性后,再进行稀释定量,如含 AFT B₁ 低,不需稀释或稀释倍数小,杂质荧光仍有严重干扰,可根据样液中黄曲霉毒素 B₁ 荧光的强弱,直接用双向展开法定量。

33.2.2.2.5 结果计算

同 33.2.1.6。

34 精密度

每个试样称取两份进行平行测定,以其算术平均值为分析结果。其分析结果的相对相差应不大于 60%。

35 其他

薄层板上黄曲霉毒素 B₁ 的最低检出量为 0.000 4 μg,检出限为 5 μg/kg。

附录 A

AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的标准浓度校准方法

用苯-乙腈(98+2)或甲苯-乙腈(9+1)或甲醇或乙腈溶液分别配制 8 μg/mL~10 μg/mL 的 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的标准溶液。根据下面的方法,在最大吸收波段处测定溶液的吸光度,分别确定 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的实际浓度。

用分光光度计在 340 nm~370 nm 处测定,经扣除溶剂的空白试剂本底,校正比色皿系统误差后,读取标准溶液的最大吸收波长(λ_{\max})处吸光度值 A 。校准溶液实际浓度 ρ 按式(A.1)计算:

$$\rho = A \times M \times \frac{1\ 000}{\epsilon} \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

ρ ——校准测定的 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的实际浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A ——在 λ_{\max} 处测得的吸光度值;

M ——AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂摩尔质量,单位为克每摩尔(g/mol);

ϵ ——溶液中的 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的吸光系数,单位为平方米每摩尔(m^2/mol)。

AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的摩尔质量及摩尔吸光系数见表 A.1。

表 A.1 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁和 AFT G₂的摩尔质量及摩尔吸光系数

黄曲霉毒素名称	摩尔质量/(g/mol)	溶剂	摩尔吸光系数
AFT B ₁	312	苯-乙腈(98+2)	19 800
		甲苯-乙腈(9+1)	19 300
		甲醇	21 500
		乙腈	20 700
AFT B ₂	314	苯-乙腈(98+2)	20 900
		甲苯-乙腈(9+1)	21 000
		甲醇	21 400
		乙腈	22 100
AFT G ₁	328	苯-乙腈(98+2)	17 100
		甲苯-乙腈(9+1)	16 400
		甲醇	17 700
		乙腈	17 600
AFT G ₂	330	苯-乙腈(98+2)	18 200
		甲苯-乙腈(9+1)	18 300
		甲醇	19 200
		乙腈	18 900

附 录 B

免疫亲和柱验证方法

B.1 柱容量验证

在 30 mL 的 1% Triton X-100(或吐温-20)-PBS 中加入 600 ng AFT B₁ 标准储备溶液,充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱,每根柱的上样量为 10 mL。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干至 1 mL,用初始流动相定容至 10 mL,用液相色谱仪分离测定 AFT B₁ 的含量。

结果判定:结果 AFT B₁ ≥ 160 ng,为可使用商品。

B.2 柱回收率验证

在 30 mL 的 1% Triton X-100(或吐温-20)-PBS 中加入 600 ng AFT B₁ 标准储备溶液,充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱,每根柱的上样量为 10 mL。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干至 1 mL,用初始流动相定容至 10 mL,用液相色谱仪分离测定 AFT B₁ 的含量。

结果判定:结果 AFT B₁ ≥ 160 ng,即回收率 ≥ 80%,为可使用商品。

B.3 交叉反应率验证

在 30 mL 的 1% Triton X-100(或吐温-20)-PBS 中加入 300 ng AFT G₂ 标准储备溶液,充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱,每根柱的上样量为 10 mL。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干至 1 mL,用初始流动相定容至 10 mL,用液相色谱仪分离测定 AFT G₂ 的含量。

结果判定:结果 AFT G₂ ≥ 80 ng,为可同时测定 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂ 时使用的商品。

附录 C 串联质谱法图谱

C.1 黄曲霉毒素 B₁ 离子扫描图见图 C.1。

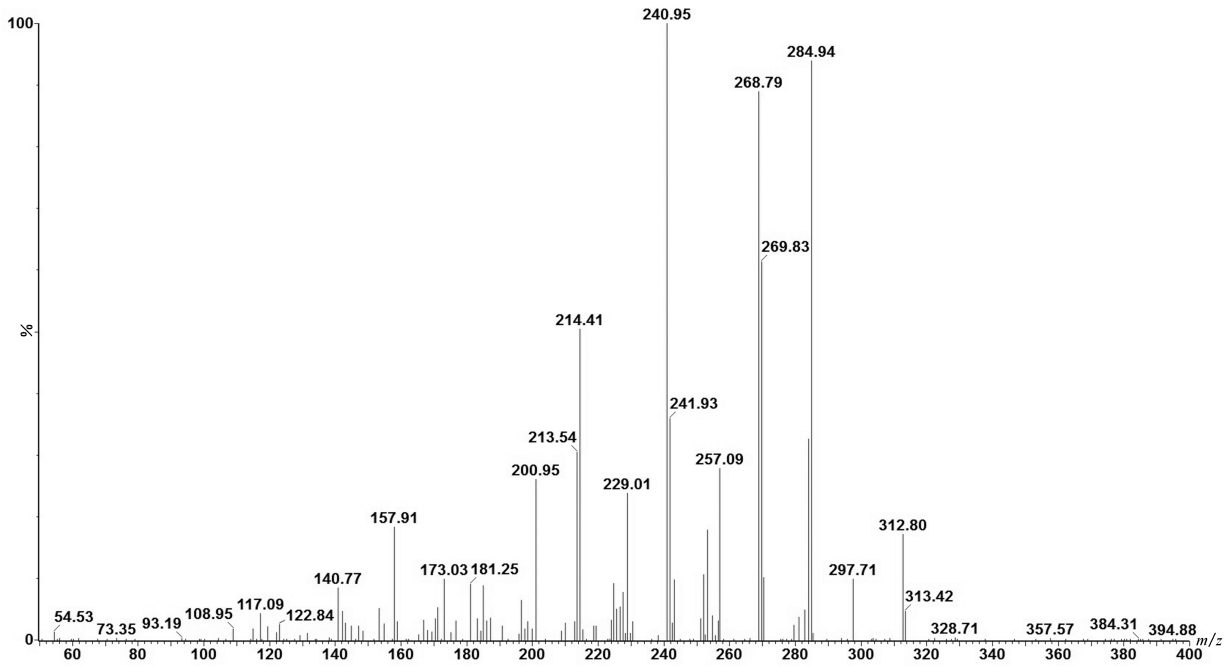


图 C.1 黄曲霉毒素 B₁ 离子扫描图

C.2 黄曲霉毒素 B₂ 离子扫描图见图 C.2。

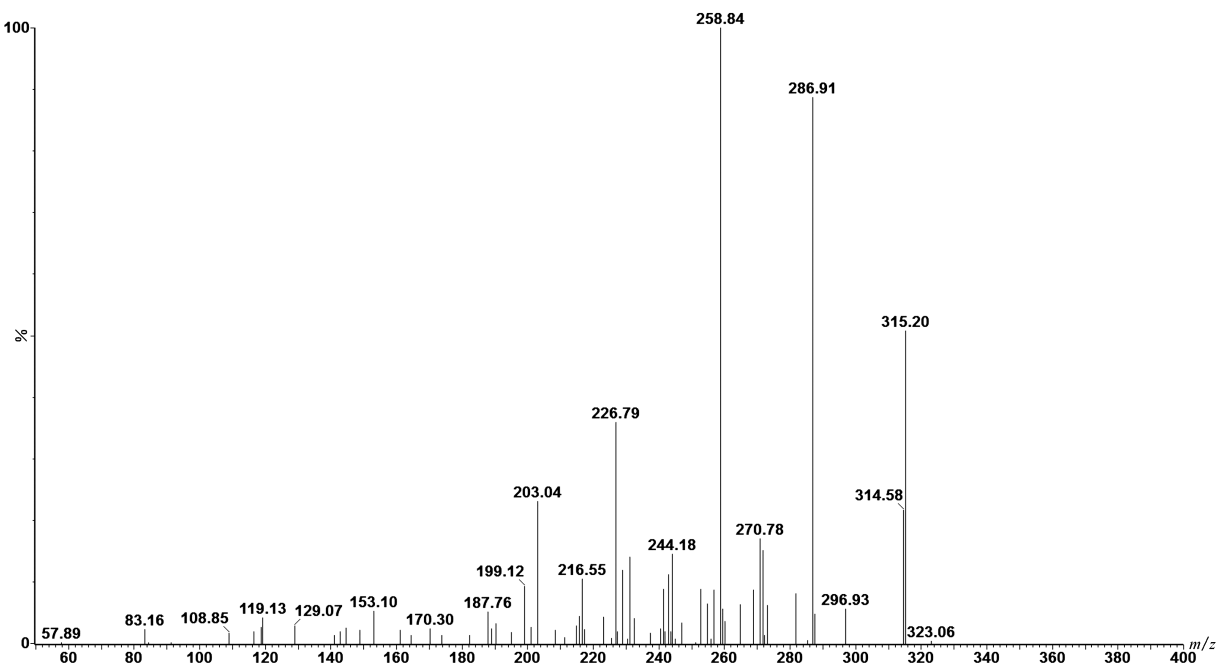


图 C.2 黄曲霉毒素 B₂ 离子扫描图

C.3 黄曲霉毒素 G₁ 离子扫描图见图 C.3。

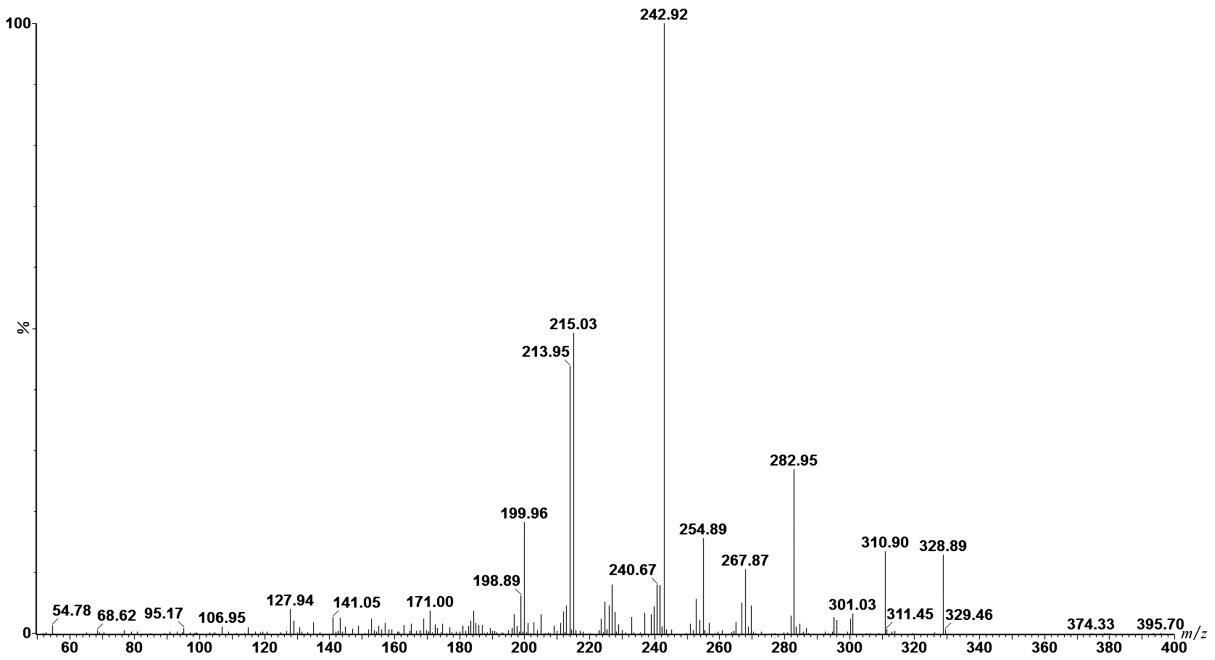


图 C.3 黄曲霉毒素 G₁ 离子扫描图

C.4 黄曲霉毒素 G₂ 离子扫描图见图 C.4。

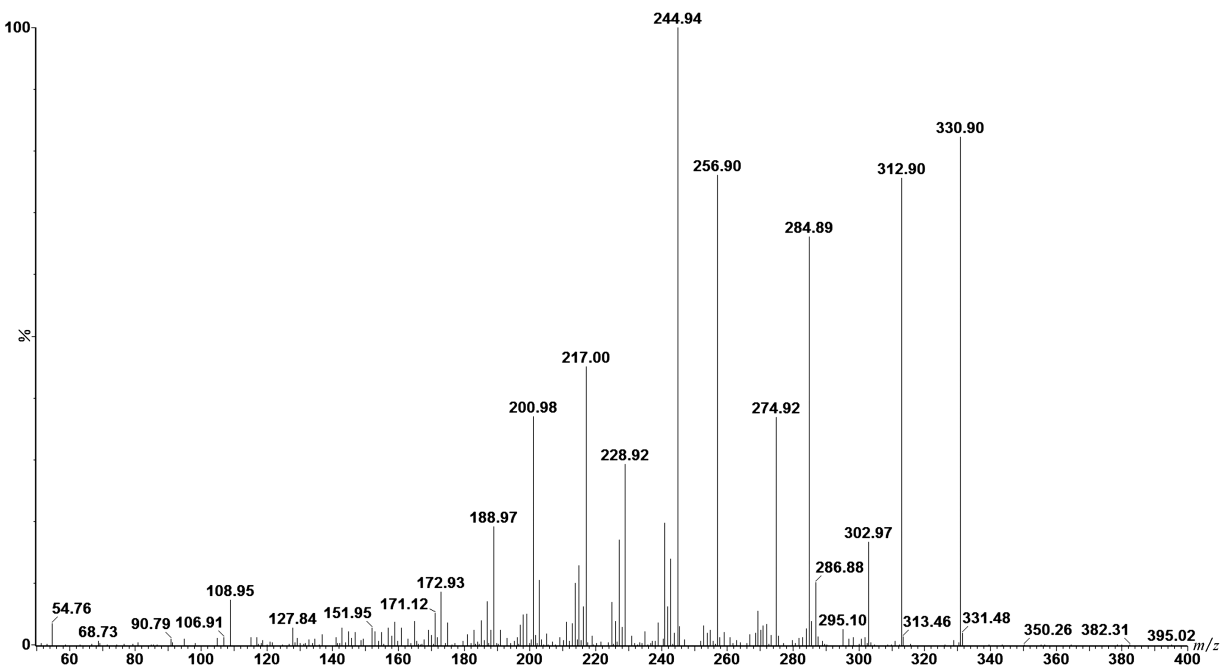


图 C.4 黄曲霉毒素 G₂ 离子扫描图

C.5 ¹³C-黄曲霉毒素 B₁ 离子扫描图见图 C.5。

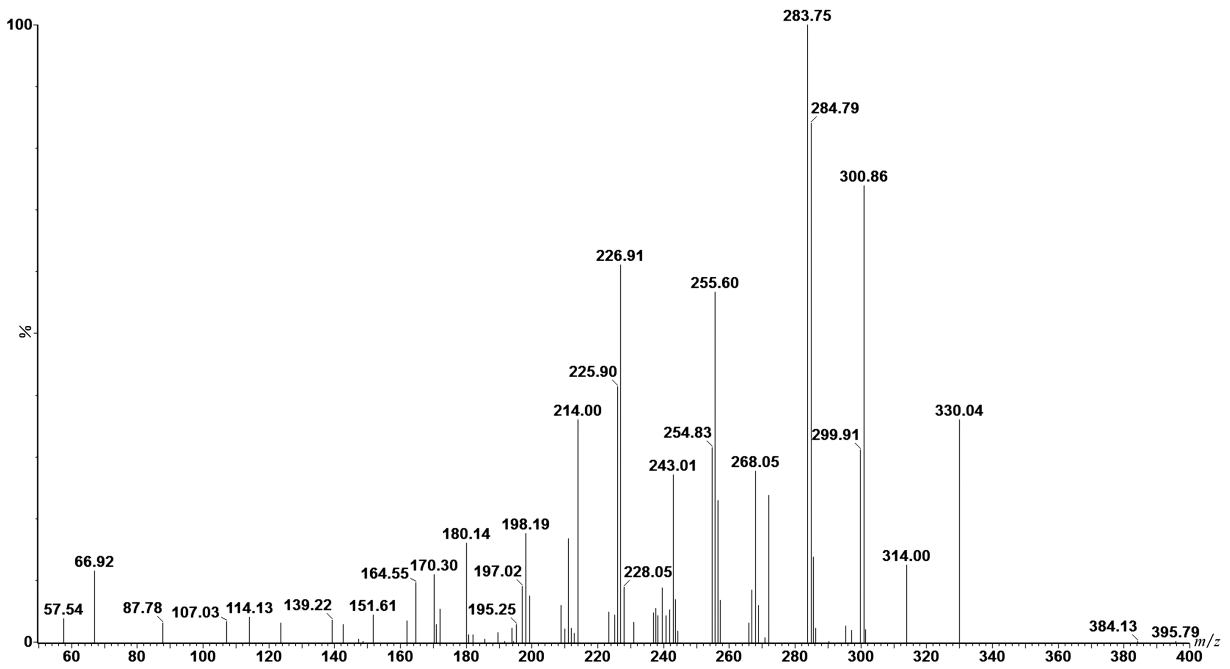


图 C.5 ¹³C-黄曲霉毒素 B₁ 离子扫描图

C.6 ¹³C-黄曲霉毒素 B₂ 离子扫描图见图 C.6。

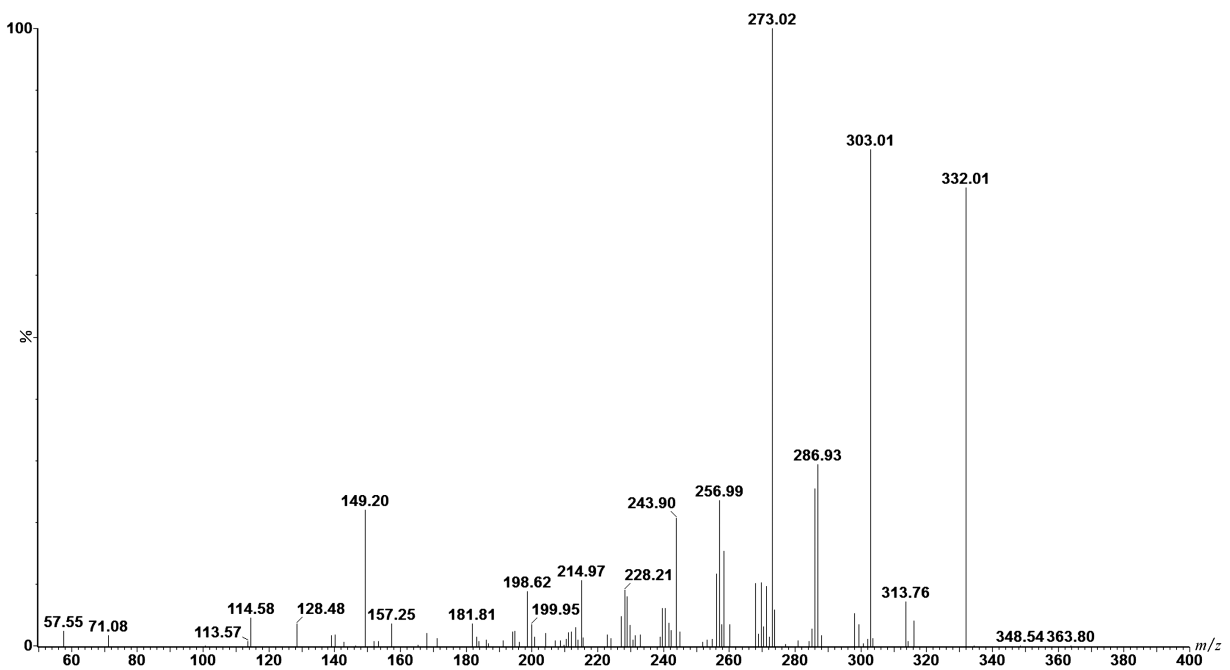


图 C.6 ¹³C-黄曲霉毒素 B₂ 离子扫描图

C.7 ¹³C-黄曲霉毒素 G₁ 离子扫描图见图 C.7。

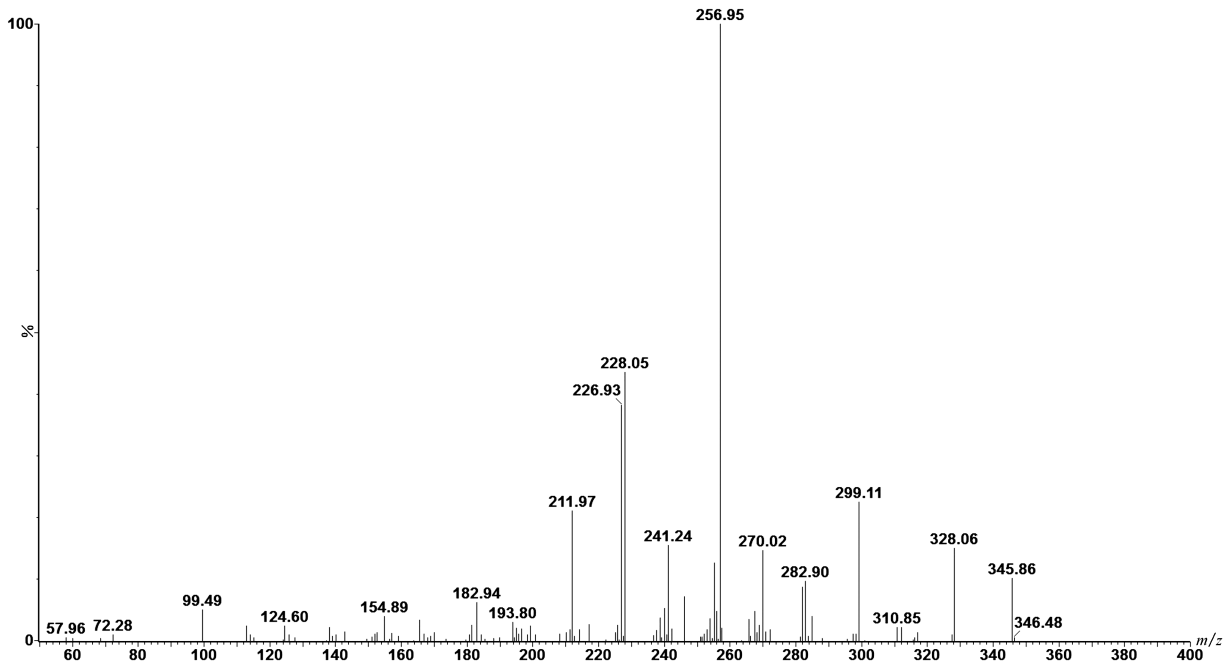


图 C.7 ¹³C-黄曲霉毒素 G₁ 离子扫描图

C.8 ¹³C-黄曲霉毒素 G₂ 离子扫描图见图 C.8。

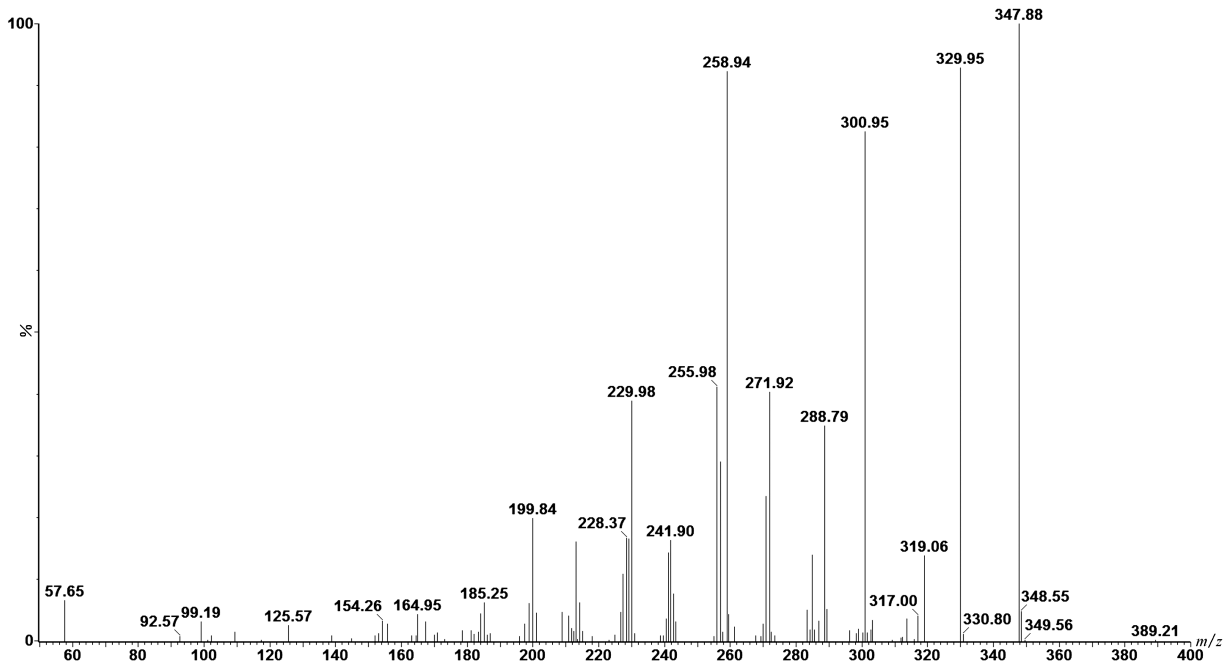


图 C.8 ¹³C-黄曲霉毒素 G₂ 离子扫描图

C.9 四种黄曲霉毒素和同位素的串联质谱图见图 C.9。

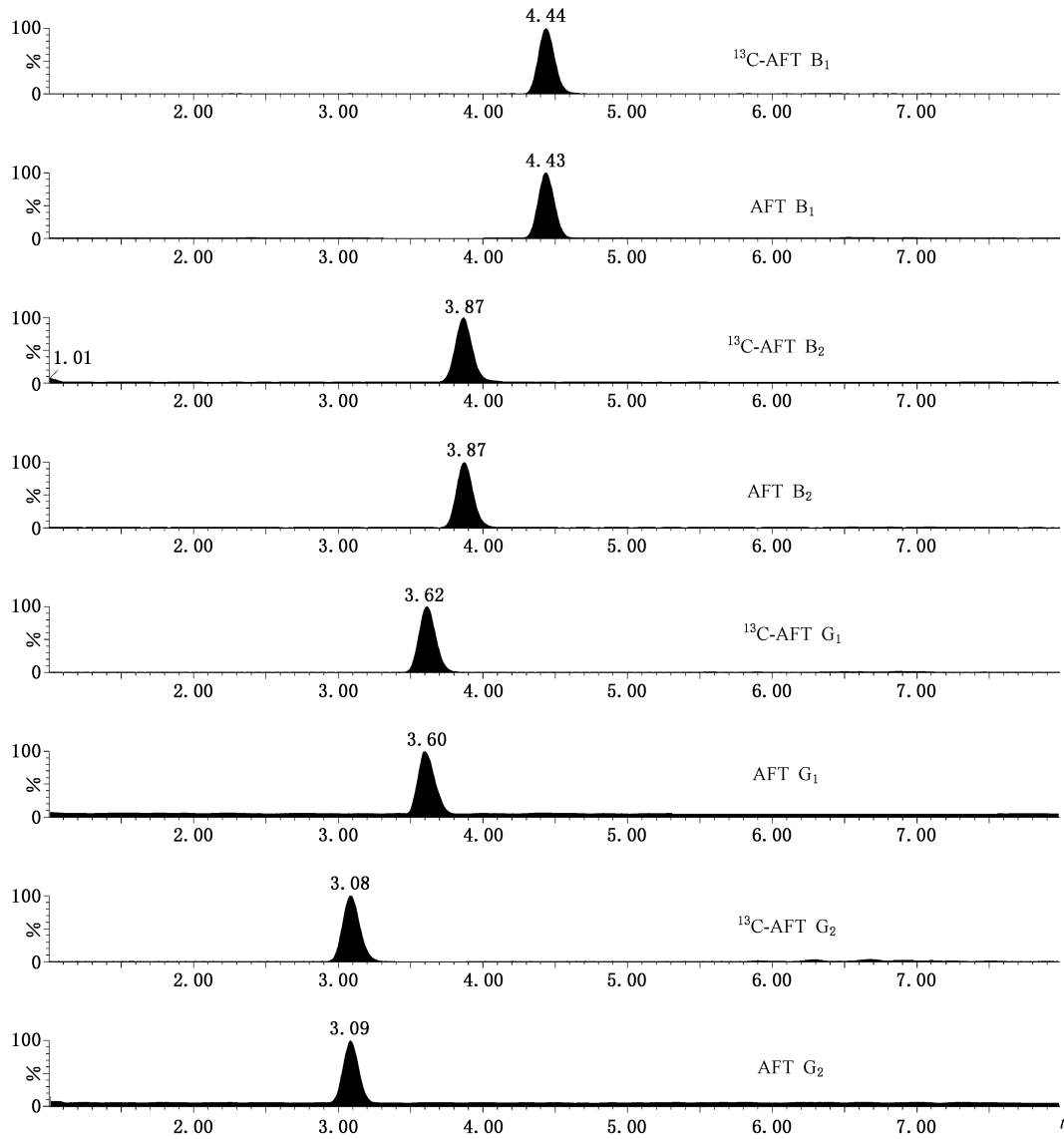


图 C.9 四种黄曲霉毒素及其同位素内标化合物的串联质谱图

附录 D
液相色谱图

D.1 四种黄曲霉毒素 TFA 柱前衍生液相色谱图见图 D.1。

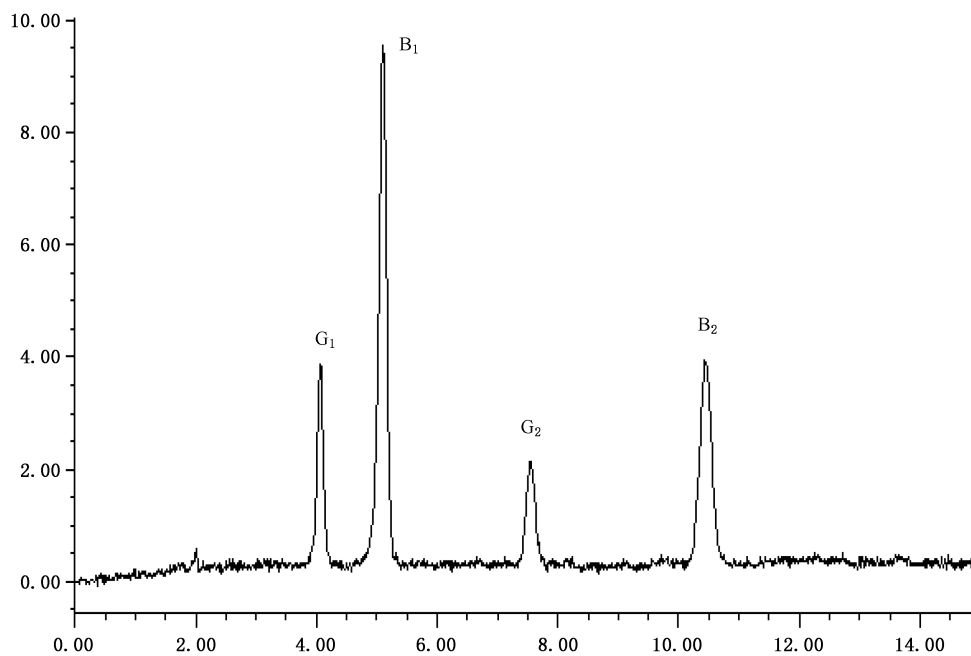


图 D.1 四种黄曲霉毒素 TFA 柱前衍生液相色谱图(0.5 ng/mL 标准溶液)

D.2 四种黄曲霉毒素大流通池检测色谱图见图 D.2。

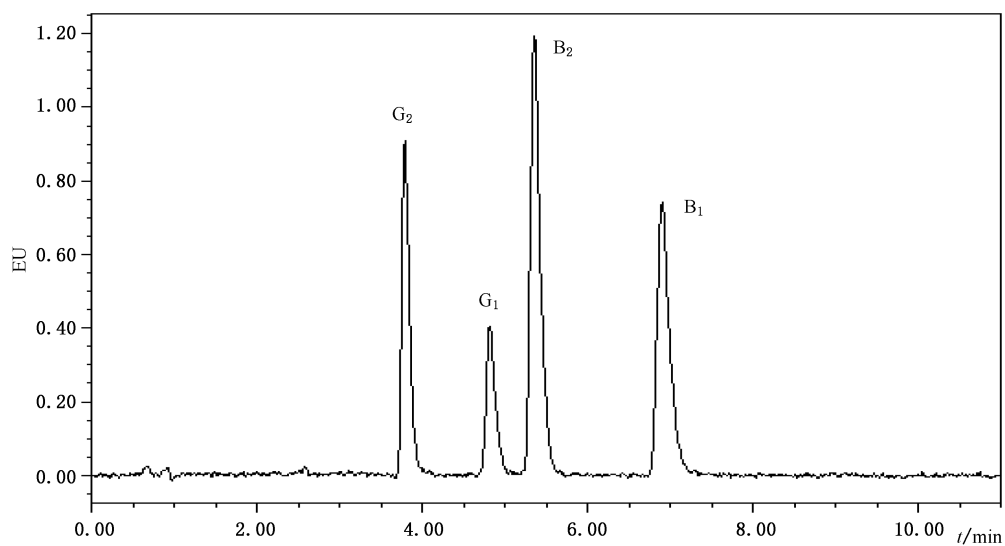


图 D.2 四种黄曲霉毒素大流通池检测色谱图(双波长检测)(2 ng/mL 标准溶液)

D.3 四种黄曲霉毒素柱后光化学衍生法检测色谱图见图 D.3。

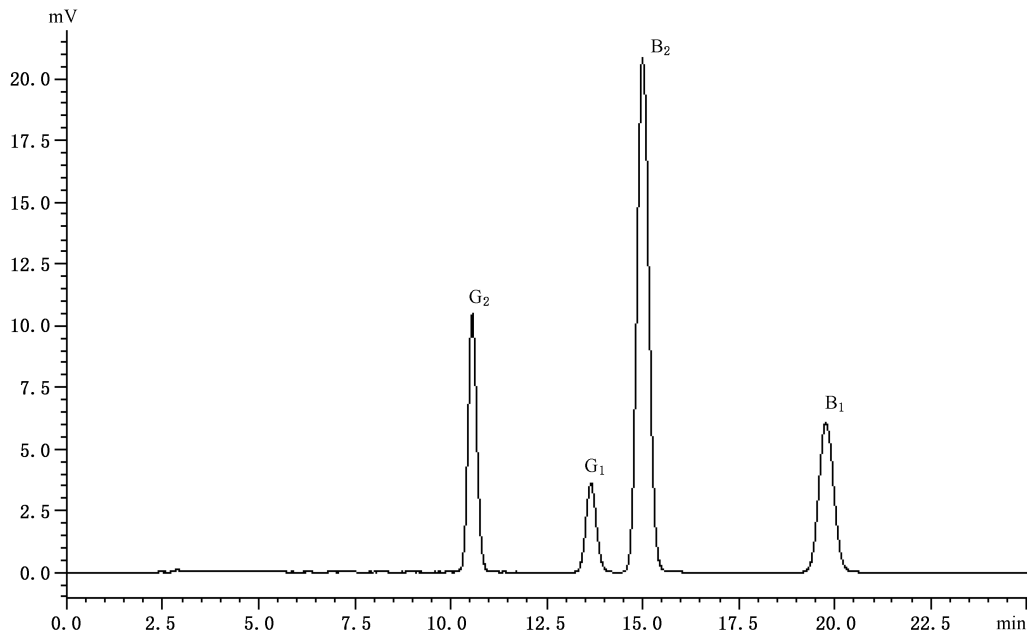


图 D.3 四种黄曲霉毒素柱后光化学衍生法色谱图(5 ng/mL 标准溶液)

D.4 四种黄曲霉毒素柱后碘衍生法检测色谱图见图 D.4。

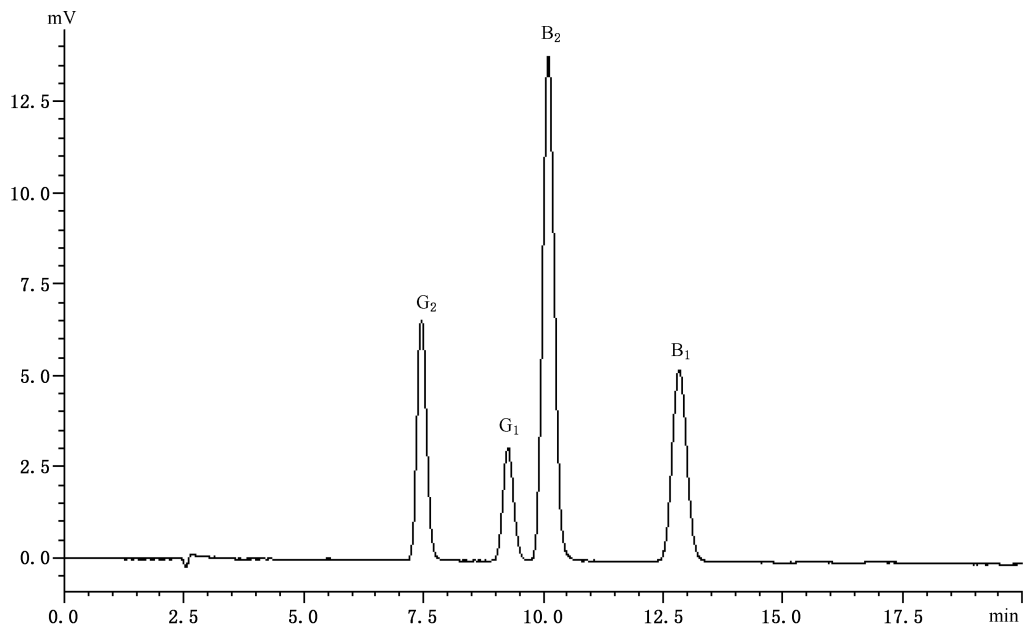


图 D.4 四种黄曲霉毒素柱后碘衍生法色谱图(5 ng/mL 标准溶液)

D.5 四种黄曲霉毒素柱后溴衍生法检测色谱图见图 D.5。

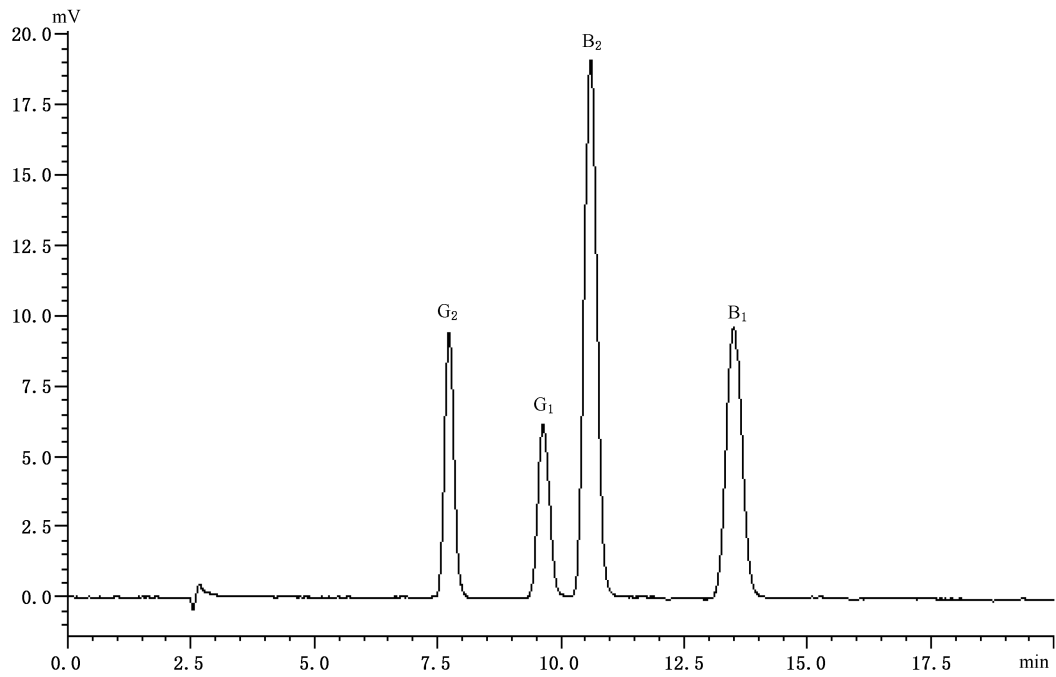


图 D.5 四种黄曲霉毒素柱后溴衍生色谱图(5 ng/mL 标准溶液)

D.6 四种黄曲霉毒素柱后电化学衍生法检测色谱图见图 D.6。

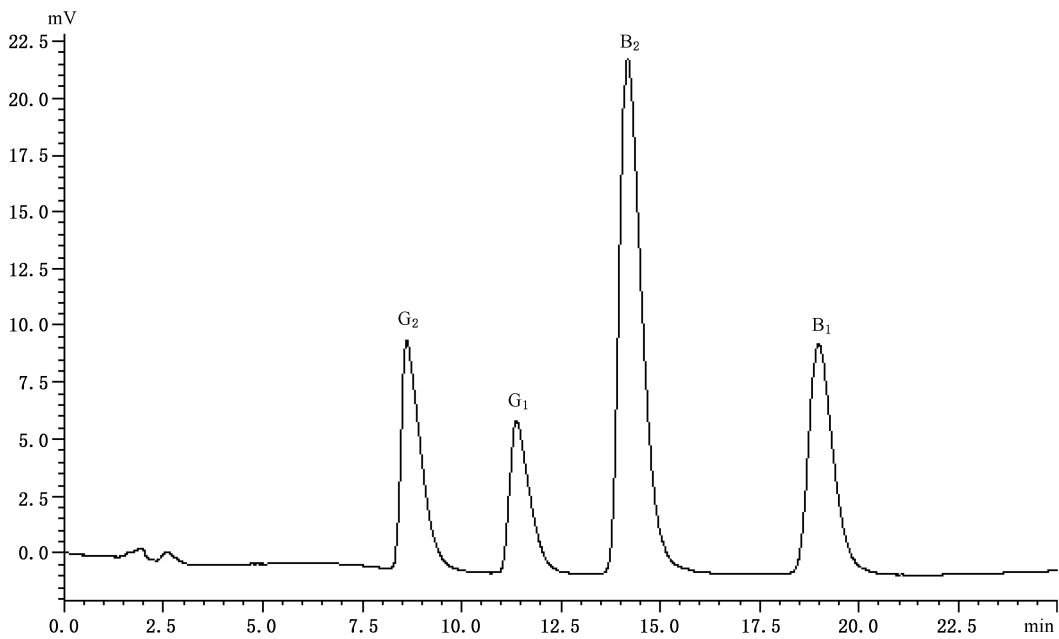


图 D.6 四种黄曲霉毒素柱后电化学衍生色谱图(5 ng/mL 标准溶液)

附 录 E
酶联免疫试剂盒的质量判定方法

选取小麦粉或其他阴性样品,根据所购酶联免疫试剂盒的检出限,在阴性基质中添加3个浓度水平的AFT B₁标准溶液(2 μg/kg、5 μg/kg、10 μg/kg)。按照说明书操作方法,用读数仪读数,做三次平行实验。针对每个加标浓度,回收率在50%~120%容许范围内的该批次产品方可使用。

注:当试剂盒用于特殊膳食用食品基质检测时,需根据其限量,考察添加浓度水平为0.2 μg/kg AFT B₁标准溶液的回收率。
