



中华人民共和国国家标准

GB 5009.96—2016

食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 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 23502—2009《食品中赭曲霉毒素 A 的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法》、GB/T 25220—2010《粮油检验 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定 高效液相色谱法和荧光光度法》、GB/T 5009.96—2003《谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定》、SN/T 1746—2006《进出口大豆、油菜籽和食用植物油中赭曲霉毒素 A 的检验方法》、SN/T 1940—2007《进出口食品中赭曲霉毒素 A 的测定方法》和 SN 0211—1993《出口粮谷中棕曲霉毒素 A 的检验方法》。

本标准与 GB/T 23502—2009 相比,主要变化如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定”;
- 增加了第三法免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法和第四法酶联免疫吸附测定法;
- 增加了适用范围并优化了提取方法;
- 删除了免疫亲和柱层析净化荧光光度法。

食品安全国家标准

食品中赭曲霉毒素 A 的测定

1 范围

本标准规定了食品中赭曲霉毒素 A 的测定方法。

本标准第一法适用于谷物、油料及其制品、酒类、酱油、醋、酱及酱制品、葡萄干、胡椒粒/粉中赭曲霉毒素 A 的测定,第二法适用于玉米、稻谷(糙米)、小麦、小麦粉、大豆、咖啡、葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定,第三法适用于玉米、小麦等粮食产品、辣椒及其制品等、啤酒等酒类、酱油等产品、生咖啡、熟咖啡中赭曲霉毒素 A 的测定,第四法适用于玉米、小麦、大麦、大米、大豆及其制品中赭曲霉毒素 A 的测定,第五法适用于小麦、玉米、大豆中赭曲霉毒素 A 的测定。

第一法 免疫亲和层析净化液相色谱法

2 原理

用提取液提取试样中的赭曲霉毒素 A,经免疫亲和柱净化后,采用高效液相色谱结合荧光检测器测定赭曲霉毒素 A 的含量,外标法定量。

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 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 3.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 3.1.3 冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$):色谱纯。
- 3.1.4 氯化钠(NaCl)。
- 3.1.5 聚乙二醇 $[\text{HOCH}_2(\text{CH}_2\text{O}\cdot\text{CH}_2)_n\text{CH}_2\text{OH}]$ 。
- 3.1.6 吐温 20($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)。
- 3.1.7 碳酸氢钠(NaHCO_3)。
- 3.1.8 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 3.1.9 浓盐酸(HCl)。
- 3.1.10 氮气(N_2):纯度 $\geq 99.9\%$ 。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 提取液 I:甲醇-水(80+20)。

- 3.2.2 提取液Ⅱ:称取 150.0 g 氯化钠、20.0 g 碳酸氢钠溶于约 950 mL 水中,加水定容至 1 L。
- 3.2.3 提取液Ⅲ:乙腈-水(60+40)。
- 3.2.4 冲洗液:称取 25.0 g 氯化钠、5.0 g 碳酸氢钠溶于约 950 mL 水中,加水定容至 1 L。
- 3.2.5 真菌毒素清洗缓冲液:称取 25.0 g 氯化钠、5.0 g 碳酸氢钠溶于水中,加入 0.1 mL 吐温 20,用水稀释至 1 L。
- 3.2.6 磷酸盐缓冲液:称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾溶解于约 990 mL 水中,用浓盐酸调节 pH 至 7.0,用水稀释至 1 L。
- 3.2.7 碳酸氢钠溶液(10 g/L):称取 1.0 g 碳酸氢钠,用水溶解并稀释到 100 mL。
- 3.2.8 淋洗缓冲液:在 1 000 mL 磷酸盐缓冲液中加入 1.0 mL 吐温 20。

3.3 标准品

赭曲霉毒素 A($C_{20}H_{18}ClNO_6$, CAS 号:303-47-9),纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 赭曲霉毒素 A 标准储备液:准确称取一定量的赭曲霉毒素 A 标准品,用甲醇-乙腈(50+50)溶解,配成 0.1 mg/mL 的标准储备液,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,可使用 3 个月。
- 3.4.2 赭曲霉毒素 A 标准工作液:根据需要使用,准确移取一定量的赭曲霉毒素 A 标准储备液(3.4.1),用流动相稀释,分别配成相当于 1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的标准工作液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,可使用 7 d。

3.5 材料

- 3.5.1 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱:柱规格 1 mL 或 3 mL,柱容量 $\geq 100\text{ ng}$,或等效柱。
- 3.5.2 定量滤纸。
- 3.5.3 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm,孔径 1.5 μm ,无荧光特性。

4 仪器和设备

- 4.1 分析天平:感量 0.001 g。
- 4.2 高效液相色谱仪,配荧光检测器。
- 4.3 高速均质器: $\geq 12\ 000\text{ r/min}$ 。
- 4.4 玻璃注射器:10 mL。
- 4.5 试验筛:孔径 1 mm。
- 4.6 空气压力泵。
- 4.7 超声波发生器:功率 $>180\text{ W}$ 。
- 4.8 氮吹仪。
- 4.9 离心机: $\geq 10\ 000\text{ r/min}$ 。
- 4.10 涡旋混合器。
- 4.11 往复式摇床: $\geq 250\text{ r/min}$ 。
- 4.12 pH 计:精度为 0.01。

5 分析步骤

5.1 试样制备与提取

5.1.1 谷物、油料及其制品

5.1.1.1 粮食和粮食制品

颗粒状样品需全部粉碎通过试验筛(孔径 1 mm),混匀后备用。

提取方法 1:称取试样 25.0 g(精确到 0.1 g),加入 100 mL 提取液Ⅲ,高速均质 3 min 或振荡 30 min,定量滤纸过滤,移取 4 mL 滤液加入 26 mL 磷酸盐缓冲液混合均匀,混匀后于 8 000 r/min 离心 5 min,上清作为滤液 A 备用。

提取方法 2:称取试样 25.0 g(精确到 0.1 g),加入 100 mL 提取液 I,高速均质 3 min 或振荡 30 min,定量滤纸过滤,移取 10 mL 滤液加入 40 mL 磷酸盐缓冲液稀释至 50 mL,混合均匀,经玻璃纤维滤纸过滤,滤液 B 收集于干净容器中,备用。

5.1.1.2 食用植物油

准确称取试样 5.0 g(精确到 0.1 g),加入 1 g 氯化钠及 25 mL 提取液 I,振荡 30 min,于 6 000 r/min 离心 10 min,移取 15 mL 上层提取液,加入 30 mL 磷酸盐缓冲液混合均匀,经玻璃纤维滤纸过滤,滤液 C 收集于干净容器中,备用。

5.1.1.3 大豆、油菜籽

准确称取试样 50.0 g(精确到 0.1 g)(大豆需要磨细且粒度 ≤ 2 mm)于均质器配置的搅拌杯中,加入 5 g 氯化钠及 100 mL 甲醇(适用于油菜籽)或 100 mL 提取液 I,以均质器高速均质提取 1 min。定量滤纸过滤,移取 10 mL 滤液并加入 40 mL 水稀释,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,滤液 D 收集于干净容器中,备用。

5.1.2 酒类

取脱气酒类试样(含二氧化碳的酒类样品使用前先置于 4 °C 冰箱冷藏 30 min,过滤或超声脱气)或其他不含二氧化碳的酒类试样 20.0 g(精确到 0.1 g),置于 25 mL 容量瓶中,加提取液 II 定容至刻度,混匀,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,滤液 E 收集于干净容器中,备用。

5.1.3 酱油、醋、酱及酱制品

称取 25.0 g(精确到 0.1 g)混匀的试样,加提取液 I 定容至 50 mL,超声提取 5 min。定量滤纸过滤,移取 10 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,滤液 F 收集于干净容器中,备用。

5.1.4 葡萄干

称取粉碎试样 50.0 g(精确到 0.1 g)于均质器配置的搅拌杯中,加入 100 mL 碳酸氢钠溶液,将搅拌杯置于均质器上,以 22 000 r/min 高速均质提取 1 min。定量滤纸过滤,准确移取 10 mL 滤液并加入 40 mL 淋洗缓冲液稀释,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,滤液 G 收集于干净容器中,备用。

5.1.5 胡椒粒/粉

称取粉碎试样 25.0 g(精确到 0.1 g)于均质器配置的搅拌杯中,加入 100 mL 碳酸氢钠溶液,将搅拌

杯置于均质器上,以 22 000 r/min 高速均质提取 1 min。将提取物置离心杯中以 4 000 r/min 离心 15 min。移取 20 mL 滤液并加入 30 mL 淋洗缓冲液稀释,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,滤液 H 收集于干净容器中,备用。

5.2 试样净化

5.2.1 谷物、油料及其制品

5.2.1.1 粮食和粮食制品

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取提取方法 1 中全部滤液 A 或提取方法 2 中 20 mL 滤液 B,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.2.1.2 食用植物油

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取 30 mL 滤液 C,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.2.1.3 大豆、油菜籽

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取 10 mL 滤液 D,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.2.2 酒类

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取 10 mL 滤液 E,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 冲洗液(3.2.4)、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.2.3 酱油、醋、酱及酱制品

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取 10 mL 滤液 F,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.2.4 葡萄干

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取 10 mL 滤液 G,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 淋洗缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.2.5 胡椒粒/粉

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下,准确移取 10 mL 滤液 H,注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,依次用 10 mL 淋洗缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

5.3 洗脱

准确加入 1.5 mL 甲醇或免疫亲和柱厂家推荐的洗脱液进行洗脱,流速约为 1 滴/s,收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中,45 °C 下氮气吹干。用流动相溶解残渣并定容到 500 μ L,供检测用。

5.4 试样测定

5.4.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件列出如下:

- 色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μ m,或等效柱;
- 流动相:乙腈-水-冰乙酸(96+102+2);
- 流速:1.0 mL/min;
- 柱温:35 °C;
- 进样量:50 μ L;
- 检测波长:激发波长 333 nm,发射波长 460 nm。

5.4.2 色谱测定

在 5.4.1 色谱条件下,将赭曲霉毒素 A 标准工作溶液按浓度从低到高依次注入高效液相色谱仪,待仪器条件稳定后,以目标物质的浓度为横坐标(x 轴),目标物质的峰面积为纵坐标(y 轴),对各个数据点进行最小二乘线性拟合,标准工作曲线按式(1)计算:

$$y = ax + b \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- y —— 目标物质的峰面积比;
- a —— 回归曲线的斜率;
- x —— 目标物质的浓度;
- b —— 回归曲线的截距。

标准工作溶液和样液中待测物的响应值均应在仪器线性响应范围内,如果样品含量超过标准曲线范围,需稀释后再测定。

5.4.3 空白试验

不称取试样按 5.1、5.2 和 5.3 的步骤做空白试验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

6 分析结果的表述

试样中赭曲霉毒素 A 的含量按式(2)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X ——试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

ρ ——试样测定液中赭曲霉毒素 A 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V ——试样测定液最终定容体积,单位为毫升(mL)；

1 000——单位换算常数；

m ——试样的质量,单位为克(g)；

f ——稀释倍数。

计算结果时需扣除空白值,检测结果以两次测定值的算数平均值表示,计算结果保留两位有效数字。

7 精密度

样品中赭曲霉毒素 A 含量在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

8 其他

粮食和粮食制品、食用植物油、大豆、油菜籽、葡萄干、胡椒粒/粉的检出限和定量限分别为 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。酒类的检出限和定量限分别为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。酱油、醋、酱及酱制品的检出限和定量限分别为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第二法 离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法

9 原理

用提取液提取试样中的赭曲霉毒素 A,经离子交换固相萃取柱净化后,采用高效液相色谱仪结合荧光检测器测定赭曲霉毒素 A 的含量,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 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

10.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

10.1.3 冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)。

10.1.4 石油醚:分析纯, $60\text{ }^\circ\text{C}\sim 90\text{ }^\circ\text{C}$ 。

10.1.5 甲酸(CH_2O_2)。

10.1.6 三氯甲烷(CHCl_3)。

10.1.7 碳酸氢钠(NaHCO_3)。

10.1.8 磷酸(H_3PO_4)。

10.1.9 氢氧化钾(KOH)。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 氢氧化钾溶液(0.1 mol/L):称取氢氧化钾 0.56 g,溶于 100 mL 水。
- 10.2.2 磷酸水溶液(0.1 mol/L):移取 0.68 mL 磷酸,溶于 100 mL 水。
- 10.2.3 碳酸氢钠溶液(30 g/L):称取碳酸氢钠 30.0 g,溶于 1 000 mL 水。
- 10.2.4 乙酸水溶液(2%):移取 20 mL 冰乙酸,溶于 980 mL 水。
- 10.2.5 提取液:氢氧化钾溶液(0.1 mol/L)-甲醇-水(2+60+38)。
- 10.2.6 淋洗液:氢氧化钾溶液(0.1 mol/L)-乙腈-水(3+50+47)。
- 10.2.7 洗脱液:甲醇-乙腈-甲酸-水(40+50+5+5)。
- 10.2.8 甲醇-碳酸氢钠溶液(30 g/L)(50+50)。
- 10.2.9 乙腈-2%乙酸水溶液(50+50)。

10.3 标准品

赭曲霉毒素 A($C_{20}H_{18}ClNO_6$,CAS 号:303-47-9),纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 赭曲霉毒素 A 标准储备液:准确称取一定量的赭曲霉毒素 A 标准品,用甲醇溶解配制成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。
- 10.4.2 赭曲霉毒素 A 标准工作液:准确移取一定量的赭曲霉毒素 A 标准储备液(10.4.1),用甲醇溶解配制成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存。
- 10.4.3 赭曲霉毒素 A 系列标准工作液:准确移取适量赭曲霉毒素 A 标准工作液(10.4.2),用甲醇稀释配制成 1 ng/mL、2.5 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 的系列标准工作液。

11 仪器和设备

- 11.1 高效液相色谱仪配荧光检测器。
- 11.2 分析天平:感量 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 11.3 固相萃取柱:高分子聚合物基质阴离子交换固相萃取柱,柱规格 3 mL,柱床重量 200 mg,或等效柱。
- 11.4 氮吹仪。
- 11.5 涡旋振荡器。
- 11.6 旋转蒸发器。
- 11.7 高速万能粉碎机: $\geq 12\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 。
- 11.8 20 目筛。
- 11.9 有机滤膜:孔径 0.45 μm 。
- 11.10 快速定性滤纸。

12 分析步骤

12.1 试样制备

玉米、稻谷(糙米)、小麦、小麦粉、大豆及咖啡豆等用高速万能粉碎机将样品粉碎,过 20 目筛后混匀

备用。

12.2 试样提取

12.2.1 玉米

称取试样 10.0 g(精确至 0.01 g),加入 50 mL 三氯甲烷和 5 mL 0.1 mol/L 的磷酸水溶液,于涡旋振荡器上振荡提取 3 min~5 min,提取液用定性滤纸过滤,取 10 mL 下层滤液至 100 mL 平底烧瓶中,于 40 °C 水浴中用旋转蒸发器旋转蒸发至近干,用 20 mL 石油醚溶解残渣后加入 10 mL 提取液,再用涡旋振荡器振荡提取 3 min~5 min,静置分层后取下层溶液,用滤纸过滤,取 5 mL 滤液进行固相萃取净化。

12.2.2 稻谷(糙米)、小麦、小麦粉、大豆

称取试样 10.0 g(精确至 0.01 g),加入 50 mL 提取液,于涡旋振荡器上振荡提取 3 min~5 min,用定性滤纸过滤,取 10 mL 滤液至 100 mL 平底烧瓶中,加入 20 mL 石油醚,涡旋振荡器振荡提取 3 min~5 min,静置分层后取下层溶液,用滤纸过滤,取 5 mL 滤液进行固相萃取净化。

12.2.3 咖啡

称取试样 2.5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚丙烯锥形试管(带盖)中,加入 25 mL 甲醇-碳酸氢钠溶液于涡旋振荡器振荡提取 3 min~5 min,4 000 r/min 离心 10 min 后上清液用滤纸过滤,取 10 mL 滤液进行固相萃取净化。

12.2.4 葡萄酒

移取试样 10.0 g(精确至 0.01 g)于烧杯中,加入 6 mL 提取液,混匀,再用氢氧化钾溶液调 pH 至 9.0~10.0 进行固相萃取净化。

12.3 试样净化

分别用 5 mL 甲醇、3 mL 提取液活化固相萃取柱,然后将 12.2 制备的样品提取液加入固相萃取柱,调节流速以 1 滴/s~2 滴/s 的速度通过柱子,分别依次用 3 mL 淋洗液、3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗柱,抽干,用 5 mL 洗脱液洗脱,收集洗脱液于玻璃试管中,于 45 °C 下氮气吹干,用 1 mL 乙腈-2%乙酸水溶液溶解,过滤后备用。

12.4 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件列出如下:

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或等效柱;
- b) 柱温: 30 °C;
- c) 进样量: 10 μL;
- d) 流速: 1 mL/min;
- e) 检测波长: 激发波长: 333 nm,发射波长: 460 nm;
- f) 流动相及洗脱条件:

流动相: A: 冰乙酸-水(2+100), B: 乙腈;

等度洗脱条件: A-B(50+50); 梯度洗脱条件: 见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	88	12
2	88	12
10	80	20
12	70	30
19	50	50
30	50	50
31	0	100
39	0	100
40	88	12
45	88	12

注：咖啡和葡萄酒样品测定采用梯度洗脱程序，其他样品采用等度洗脱程序。

12.5 色谱测定

在 12.4 的色谱条件下，将赭曲霉毒素 A 标准工作溶液按浓度从低到高依次注入高效液相色谱仪；待仪器条件稳定后，以目标物质的浓度为横坐标(x 轴)，目标物质的峰面积为纵坐标(y 轴)，对各个数据点进行最小二乘线性拟合，标准工作曲线按式(3)计算：

$$y = ax + b \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中：

y —— 目标物质的峰面积；

a —— 回归曲线的斜率；

x —— 目标物质的浓度；

b —— 回归曲线的截距。

注：咖啡和葡萄酒样品测定采用梯度洗脱程序，其他样品采用等度洗脱程序。

13 分析结果的表述

试样中赭曲霉毒素 A 的含量按式(4)计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(4)$$

式中：

X —— 试样中赭曲霉毒素 A 的含量，单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

ρ —— 待测试样液中赭曲霉毒素 A 的含量，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V —— 试样测定液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

1 000 —— 单位换算系数；

m —— 试样的质量，单位为克(g)；

f —— 稀释倍数。

计算结果(需扣除空白值)以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留两位有效数字。

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 15%。

15 其他

葡萄酒检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 0.33 $\mu\text{g/L}$; 其他样品检出限为 1.0 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 3.3 $\mu\text{g/kg}$ 。

第三法 免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法

16 原理

用提取液提取试样中的赭曲霉毒素 A, 经免疫亲和柱净化后, 采用液相色谱-串联质谱测定赭曲霉毒素 A 的含量, 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(CH_3OH): 色谱纯。
- 17.1.2 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。
- 17.1.3 甲酸(HCOOH): 色谱纯。
- 17.1.4 甲酸铵(HCOONH_4): 色谱纯。
- 17.1.5 氯化钠(NaCl)。
- 17.1.6 碳酸氢钠(NaHCO_3)。

17.2 试剂配制

- 17.2.1 提取液 I: 甲醇-水(80+20)。
- 17.2.2 提取液 II: 称取 150.0 g 氯化钠、20.0 g 碳酸氢钠溶于约 950 mL 水中, 加水定容至 1 L。
- 17.2.3 提取液 III: 甲醇-3%碳酸氢钠溶液(50+50)。
- 17.2.4 3%碳酸氢钠溶液: 称取 30.0 g 碳酸氢钠, 加水定容至 1 L。
- 17.2.5 苯基硅烷固相萃取柱淋洗液 1: 甲醇-3%碳酸氢钠溶液(25+75)。
- 17.2.6 苯基硅烷固相萃取柱淋洗液 2: 称取 10.0 g 碳酸氢钠, 加水定容至 1 L。
- 17.2.7 苯基硅烷固相萃取柱洗脱液: 甲醇-水(7+93)。
- 17.2.8 磷酸盐缓冲液(PBS): 称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾, 用水溶解, 调节 pH 至 7.0, 加水定容至 1 L。
- 17.2.9 定容溶液: 乙腈-水(35+65)。

17.3 标准品

赭曲霉毒素 A($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$, CAS 号: 303-47-9), 纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证

书的标准物质。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 赭曲霉毒素 A 标准储备液:准确称取一定量的赭曲霉毒素 A 标准品,用甲醇-乙腈(1+1)溶解后配成 0.1 mg/mL 的标准储备液,于-20 °C 避光保存,可使用 3 个月。

17.4.2 赭曲霉毒素 A 标准工作液:根据需要使用移取一定量的赭曲霉毒素 A 标准储备液(17.4.1),用空白样品提取液稀释,分别配成相当于 1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的基质标准工作溶液。基质标准工作溶液现用现配。

17.5 材料

17.5.1 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱:柱规格 1 mL,柱容量 \geq 100 ng,或等效柱。

17.5.2 苯基硅烷固相萃取柱:柱床重量 500 mg,柱规格 3 mL,或等效柱。

17.5.3 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm,孔径 1.5 μ m,无荧光特性。

17.5.4 定性滤纸。

17.5.5 微孔滤膜:直径 0.20 μ m。

18 仪器和设备

18.1 分析天平:感量 0.000 1 g 和 0.01 g。

18.2 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾电离源。

18.3 固相萃取装置。

18.4 涡旋混合器。

18.5 恒温振荡器。

18.6 氮吹仪。

18.7 高速均质器: \geq 12 000 r/min。

18.8 离心机: \geq 12 000 r/min。

18.9 样品粉碎机。

19 分析步骤

19.1 试样制备与提取

19.1.1 玉米、小麦等粮食产品

将样品充分粉碎混匀,称取试样 25.0 g,加入 5 g 氯化钠,用提取液 I 定容至 100 mL,混匀,高速均质提取 2 min。定性滤纸过滤,移取 10 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 A 于干净的容器中。

19.1.2 辣椒及其制品等

将样品充分粉碎混匀,称取试样 25.0 g,加入 5 g 氯化钠,用提取液 I 定容至 100 mL,混匀,高速均质提取 2 min。定性滤纸过滤,移取 10 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 B 于干净的容器中。

19.1.3 啤酒等酒类

取脱气酒类试样(含二氧化碳的酒类样品使用前先置于 4 °C 冰箱冷藏 30 min,过滤或超声脱气)或

其他不含二氧化碳的酒类试样 25.0 g,加 50 mL 提取液Ⅱ,混匀,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 C 于干净的容器中。

19.1.4 酱油等产品

称取 25.0 g 混匀试样,用提取液Ⅰ定容至 50 mL,超声提取 5 min。定性滤纸过滤,移取 10 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液 D 于干净的容器中。

19.1.5 生咖啡

将样品充分粉碎混匀,称取试样 25.0 g,加入 200 mL 提取液Ⅲ,均质提取 5 min。8 000 r/min 离心 5 min,上清液先后经定性滤纸和玻璃纤维滤纸过滤。移取 4 mL 滤液于 100 mL 容量瓶中,加 PBS 缓冲液定容至刻度,混匀,得提取液 E。

19.1.6 熟咖啡

将样品充分粉碎混匀,称取试样 15.0 g,加入 150 mL 提取液Ⅲ,轻摇 30 min。玻璃纤维滤纸过滤,移取约 50 mL 滤液,4 ℃下 4 500 r/min 离心 15 min。取 10 mL 上清液,加入 10 mL 3%碳酸氢钠溶液得提取液 F。

19.2 试样净化

19.2.1 玉米、小麦等粮食产品

准确移取 10 mL 滤液 A,注入玻璃注射器中,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,依次用 10 mL PBS 缓冲液、10 mL 水淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

19.2.2 辣椒及其制品等

准确移取 10 mL 滤液 B,注入玻璃注射器中,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,依次用 10 mL PBS 缓冲液、10 mL 水淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

19.2.3 啤酒等酒类

准确移取 10 mL 滤液 C,注入玻璃注射器中,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,依次用 10 mL PBS 缓冲液、10 mL 水淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

19.2.4 酱油等产品

准确移取 10 mL 滤液 D,注入玻璃注射器中,使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,依次用 10 mL PBS 缓冲液、10 mL 水淋洗免疫亲和柱,流速为 1 滴/s~2 滴/s,弃去全部流出液,抽干小柱。

19.2.5 生咖啡

分次将提取液 E 全部注入玻璃注射器中,使溶液以 2 mL/min~3 mL/min 的流速全部通过免疫亲和柱,保持柱体湿润,用 10 mL 水淋洗免疫亲和柱,流速 \leq 3 mL/min,弃去全部流出液,吹干小柱 30 s。

19.2.6 熟咖啡

19.2.6.1 苯基硅烷固相萃取柱净化:预先依次用 15 mL 甲醇、5 mL 3%碳酸氢钠溶液活化苯基硅烷固

相萃取柱,保持柱体湿润。将提取液 F 以 ≤ 5 mL/min 的流速通过苯基硅烷固相萃取柱,再依次用 10 mL 苯基硅烷固相萃取柱淋洗液 1 和 5 mL 苯基硅烷固相萃取柱淋洗液 2 淋洗,吹干萃取柱后用 10 mL 苯基硅烷固相萃取柱洗脱液进行洗脱,得洗脱液 G。

19.2.6.2 免疫亲和柱净化:用 30 mL PBS 缓冲液稀释洗脱液 G,以 ≤ 5 mL/min 的流速通过免疫亲和柱,保持柱体湿润,用 10 mL 水淋洗后吹干小柱。

19.3 洗脱

以 5 mL 甲醇分两次洗脱,流速为 2 mL/min~3 mL/min,收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中,于 40 °C 下氮气吹干,以 1 mL 乙腈-水溶液(35 : 65,体积比)复溶,微孔滤膜过滤后,玉米、小麦、辣椒及其制品等稀释 1 倍,啤酒等酒类浓缩 5 倍,酱油等产品等倍稀释后,供液相色谱-串联质谱测定。

19.4 仪器参考条件

19.4.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件列出如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 3 μ m,或等效柱;
- b) 柱温:30 °C;
- c) 进样量:20 μ L;
- d) 流速:0.2 mL/min;
- e) 流动相及梯度洗脱条件见表 2。

流动相 A 液:水溶液(含有 0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵);

流动相 B 液:95%乙腈水溶液(含有 0.1%甲酸,5 mmol/L 甲酸铵)。

表 2 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	65	35
2	5	95
7	5	95
7.1	65	35
15	65	35

19.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件列出如下:

- a) 离子化方式:电喷雾电离;
- b) 离子源喷雾电压:5 000 V;
- c) 离子源温度:600 °C;
- d) 雾化气、气帘气、碰撞气、辅助加热气均为高纯氮气,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- e) 扫描方式:负离子扫描;
- f) 检测方式:多反应监测,参数详见表 3。

表 3 多反应监测参数

毒素	母离子/ (<i>m/z</i>)	子离子/ (<i>m/z</i>)	采集时间/ ms	去簇电压/ V	碰撞能量/ V
赭曲霉毒素 A	402.1	358.1 ^a	200	-82	-28
		166.9	200	-68	-47
^a 为定量离子。					

19.5 液相色谱-串联质谱测定

试样中赭曲霉毒素 A 色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰保留时间相比较,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,对同一种化合物而言,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比,其允许偏差不超过表 4 规定的范围。

表 4 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%

目标化合物以保留时间和两对离子(特征离子对/定量离子对)所对应的色谱峰面积相对丰度进行定性,同时要求测试样品中目标化合物的两对离子对应的色谱峰面积比与标准溶液中目标化合物的面积比一致。

仪器最佳工作条件下,用系列基质标准工作溶液分别进样,以峰面积为纵坐标,以基质混合标准工作溶液浓度为横坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中赭曲霉毒素 A 的响应值均应在仪器测定的线性范围内。

19.6 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤同时完成空白试验。

20 分析结果的表述

赭曲霉毒素 A 的含量按式(5)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(5)$$

式中:

- X —— 试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- ρ —— 试样测定液中赭曲霉毒素 A 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 试样测定液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 —— 单位换算常数;
- m —— 试样的质量,单位为克(g);
- f —— 稀释倍数。

计算结果时需扣除空白值,计算结果保留两位有效数字。

21 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 15%。

22 其他

玉米、小麦等粮食产品、辣椒及其制品等检出限和定量限分别为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 啤酒等的检出限和定量限分别为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 熟咖啡、酱油等的检出限和定量限分别为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第四法 酶联免疫吸附测定法

23 原理

用甲醇-水提取试样中的赭曲霉毒素 A, 提取液经过滤、稀释后, 采用酶联免疫吸附法测定赭曲霉毒素 A 的含量, 外标法定量。

24 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。

24.1 试剂

- 24.1.1 氯化钠(NaCl)。
- 24.1.2 氯化钾(KCl)。
- 24.1.3 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 24.1.4 十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。
- 24.1.5 吐温 20($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)。
- 24.1.6 柠檬酸钠($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 24.1.7 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 24.1.8 3,3'',5,5''-四甲基联苯胺(TMB)。
- 24.1.9 过氧化氢(H_2O_2)。
- 24.1.10 浓硫酸(H_2SO_4): 纯度 98%。

24.2 试剂配制

- 24.2.1 提取液: 甲醇-水(70+30)。
- 24.2.2 标准溶液稀释液: 甲醇-水(5+95)。
- 24.2.3 洗涤液: 分别称取 40.0 g 氯化钠、1.0 g 氯化钾、1.0 g 磷酸二氢钾、14.5 g 十二水磷酸氢二钠, 加入 2.5 mL 吐温 20, 用水溶解后定容至 500 mL, 得到浓缩洗涤液, 使用前用水 10 倍稀释。
- 24.2.4 赭曲霉毒素 A 稀释缓冲液: 分别称取 8.0 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、0.2 g 磷酸二氢钾、2.9 g 十二水磷酸氢二钠, 用水溶解后定容至 1 000 mL。
- 24.2.5 柠檬酸缓冲溶液: 分别称取 10.15 g 柠檬酸钠、13.76 g 柠檬酸, 用水溶解后定容至 1 000 mL。
- 24.2.6 底物溶液甲: 称取 0.4 g TMB 用柠檬酸缓冲溶液溶解后定容至 1 000 mL。

24.2.7 底物溶液乙:移取 1.5 mL 30% H_2O_2 用柠檬酸缓冲溶液稀释后定容至 1 000 mL。

24.2.8 显色底物溶液:底物溶液甲-底物溶液乙(50+50)。

24.2.9 反应终止液:移取 22.2 mL 浓硫酸缓慢加入至 177.8 mL 水中。

24.3 标准品

赭曲霉毒素 A($\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClNO}_6$, CAS 号:303-47-9),纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

24.4 标准溶液配制

24.4.1 赭曲霉毒素 A 标准储备液:准确称取一定量的赭曲霉毒素 A 标准品,用甲醇溶解后配成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,在 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存,可使用 3 个月。

24.4.2 赭曲霉毒素 A 系列标准工作液:根据需要使用移取一定量的赭曲霉毒素 A 标准储备液(24.4.1),用 5% 甲醇溶液稀释,分别配成相当于 0 ng/mL 、0.2 ng/mL 、0.5 ng/mL 、1 ng/mL 、2 ng/mL 、5 ng/mL 的标准工作液,在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下避光保存,可使用 7 d。

24.5 材料

24.5.1 抗抗体:能与赭曲霉毒素 A 单克隆抗体特异性结合的抗体,例如羊抗鼠抗体或兔抗鼠抗体等。

24.5.2 包被有抗抗体的微孔板 96 孔或 48 孔。

24.5.3 赭曲霉毒素 A 抗体溶液:赭曲霉毒素 A 单克隆抗体。

24.5.4 赭曲霉毒素 A 酶标抗原:赭曲霉毒素 A 与辣根过氧化物酶(HRP)偶联物。

24.5.5 定性滤纸。

25 仪器和设备

25.1 酶标测定仪:配有 450 nm 和 630 nm 的检测波长和振荡功能。

25.2 小型粉碎机。

25.3 微量移液器:20 μL ~200 μL 单道移液器,100 μL ~1 000 μL 单道移液器,50 μL ~300 μL 八道移液器。

25.4 多功能旋转混合器或高速均质器或摇床。

25.5 酶标板振荡器。

25.6 涡旋混合器。

25.7 分析天平:感量 0.01 g。

25.8 试验筛:孔径 1 mm。

26 分析步骤

26.1 试样制备

称取玉米、小麦、大麦、大米、大豆及其制品 500.0 g,用粉碎机等粉碎并通过 1 mm 试验筛,混匀后备用。

26.2 试样提取

称取试样 5.0 g(精确至 0.1 g),加入 25 mL 提取液,在多功能旋转混合器上振荡提取 10 min 或高

速均质器均质提取 3 min 或摇床振荡 40 min。过滤提取液,移取 200 μL 滤液置 1.5 mL 离心管中,加入 200 μL 赭曲霉毒素 A 稀释缓冲液后涡旋混匀,作为提取试样,备用。

26.3 试样测定

26.3.1 将赭曲霉毒素 A 系列标准工作液和提取试样所用包被有抗抗体的微孔条插入酶标板架,标准品和样品均需做平行实验,记录标准溶液和试样的位置。

26.3.2 分别吸取 50 μL 赭曲霉毒素 A 系列标准工作液和提取试样加至相应的微孔中,然后各加入 50 μL 赭曲霉毒素 A 酶标抗原,再加入 50 μL 赭曲霉毒素 A 抗体溶液,加盖,室温反应 40 min。

26.3.3 弃掉孔中液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体,然后每孔加入 250 μL 洗涤液,置振荡器上振荡后弃掉孔中液体,拍干。重复操作四次,洗板时每次间隔 20 s,洗完后用力在吸水纸上排干。

26.3.4 每孔加入 150 μL 显色底物溶液,室温避光温育 15 min。

26.3.5 每孔加入 50 μL 反应终止液,混匀。

26.3.6 置酶标仪中,振荡混匀,测定 450 nm 处的吸光度值,参比波长设为 630 nm。

26.4 标准曲线的制作

在仪器最佳工作条件下,测定赭曲霉毒素 A 标准工作液的吸光度,以赭曲霉毒素 A 标准品浓度值 (ng/mL) 的对数值为横坐标,百分吸光度值为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,样品溶液中待测物的吸光度值均应在仪器测定的线性范围内。

27 分析结果的表述

提取试样中赭曲霉毒素 A 吸光度按式(6)计算。

$$A = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots(6)$$

式中:

A ——百分吸光度值;

B ——标准溶液或提取试样吸光度值的平均值;

B_0 ——空白的吸光度值。

试样中赭曲霉毒素 A 含量按式(7)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m} \quad \dots\dots\dots(7)$$

式中:

X ——试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ ——提取试样液中赭曲霉毒素 A 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——试样体积,单位为毫升(mL);

f ——试样稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g);

计算结果保留小数点后一位有效数字。

28 精密度

样品中赭曲霉毒素 A 含量在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平

均值的 15%。

29 其他

玉米、小麦、大麦、大米、大豆及其制品的检出限和定量限分别为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第五法 薄层色谱测定法

30 原理

用三氯甲烷-0.1 mol/L 磷酸或石油醚-甲醇-水提取试样中的赭曲霉毒素 A, 提取液经液-液分配后, 根据其在 365 nm 紫外光灯下产生黄绿色荧光, 在薄层色谱板上与标准比较测定赭曲霉毒素 A 的含量。

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 石油醚: 分析纯, 60 $^{\circ}\text{C}$ ~ 90 $^{\circ}\text{C}$ 或 30 $^{\circ}\text{C}$ ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

31.1.2 甲醇(CH_3OH)。

31.1.3 三氯甲烷(CHCl_3)。

31.1.4 甲苯($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$)。

31.1.5 乙酸乙酯($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$)。

31.1.6 甲酸(CH_2O_2)。

31.1.7 冰乙酸($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)。

31.1.8 乙醚($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$)。

31.1.9 乙腈(CH_3CN)。

31.1.10 苯(C_6H_6)。

31.1.11 磷酸(H_3PO_4): 纯度 85%。

31.1.12 盐酸(HCl)。

31.1.13 氯化钠(NaCl): 纯度 $\geq 98\%$ 。

31.1.14 碳酸氢钠(NaHCO_3)。

31.1.15 乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)。

31.2 试剂配制

31.2.1 苯-冰乙酸(99+1): 移取 99 mL 苯和 1 mL 冰乙酸并混匀。

31.2.2 苯-乙腈(98+2): 移取 98 mL 苯和 2 mL 乙腈并混匀。

31.2.3 磷酸溶液(0.1 mol/L): 称取 11.5 g 磷酸, 用水稀释至 1 000 mL。

31.2.4 盐酸溶液(2 mol/L): 移取 20 mL 盐酸, 用水稀释至 120 mL。

31.2.5 氯化钠溶液(40 g/L): 称取 40 g 氯化钠, 用水溶解后定容至 1 000 mL。

31.2.6 碳酸氢钠溶液(0.1 mol/L): 称取 8.4 g 碳酸氢钠, 用水溶解后定容至 1 000 mL。

31.2.7 碳酸氢钠-乙醇溶液: 称取 6.0 g 碳酸氢钠, 用水溶解后定容至 100 mL, 移取 20 mL 乙醇并混匀。

31.3 标准品

赭曲霉毒素 A ($C_{20}H_{18}ClNO_6$, CAS 号: 303-47-9), 纯度 $\geq 99\%$ 。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 赭曲霉毒素 A 标准储备液: 准确称取一定量的赭曲霉毒素 A 标准品, 用苯-冰乙酸(99+1)溶解后配成浓度为 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$, 用紫外分光光度计测定其浓度。浓度的测定参照 GB 5009.22 中 3.14 条(赭曲霉毒素 A 的最大吸收峰波长 333 nm , 分子量 403, 克分子消光系数值为 5 550)。于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存, 可使用 3 个月。

31.4.2 赭曲霉毒素 A 标准工作液: 准确移取赭曲霉毒素 A 标准储备液, 用苯稀释成 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的赭曲霉毒素 A 标准工作液, 于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存, 可使用 7 d。

31.5 材料

31.5.1 硅胶 G: 薄层层析用。

31.5.2 定性滤纸。

32 仪器和设备

所有玻璃仪器均需用稀盐酸浸泡, 用自来水、蒸馏水冲洗。

32.1 小型粉碎机。

32.2 电动振荡器。

32.3 玻璃板: $5 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 。

32.4 薄层涂布器。

32.5 展开槽: 内长 25 cm , 宽 6 cm , 高 4 cm 。

32.6 紫外光灯: 365 nm 。

32.7 微量注射器: $10 \mu\text{L}$, $50 \mu\text{L}$ 。

32.8 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶。

32.9 分析天平: 感量 0.001 g 。

33 分析步骤

33.1 试样制备

称取 250.0 g 试样经粉碎并通过 20 目筛后, 混匀后备用。

33.2 试样提取

33.2.1 甲法

称取试样 20.0 g (精确至 0.01 g) 于 200 mL 具塞锥形瓶中, 加入 100 mL 三氯甲烷和 10 mL 0.1 mol/L 磷酸, 在振荡器上振荡提取 30 min , 将提取液通过快速定性滤纸过滤; 取 20 mL 滤液置于 250 mL 分液漏斗中, 加 50 mL 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液振摇 2 min , 静置分层后, 将三氯甲烷层放入另一个 100 mL 分液漏斗中, 如有少量乳化层, 或即使三氯甲烷层全部乳化均可放入分液漏斗中, 加入 50 mL 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液重复提取三氯甲烷层, 静置分层后弃去三氯甲烷层, 如三氯甲烷层仍乳

化,弃去,不影响结果。碳酸氢钠水层并入第一个分液漏斗中,加约 5.5 mL 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 2~3,加入 25 mL 三氯甲烷振摇 2 min,静置分层后,放三氯甲烷层于另一个盛有 100 mL 水的 250 mL 分液漏斗中,酸水层再用 10 mL 三氯甲烷振摇、提取、静置,将三氯甲烷层并入同一分液漏斗中。振摇、静置分层,用脱脂棉擦干分液漏斗下端,放三氯甲烷层于一个 75 mL 蒸发皿中,将蒸发皿置蒸汽浴上通风挥干。用约 8 mL 三氯甲烷分次将蒸发皿中的残渣溶解,转入具尾管的 10 mL 浓缩瓶中,置 80 °C 水浴锅上用蒸汽加热吹氮气(N₂)浓缩至干,加入 0.2 mL 苯-乙腈(98+2)溶解残渣,摇匀,供薄层色谱点样用。

33.2.2 乙法

称取试样 20.0 g(精确至 0.01 g)于 200 mL 具塞锥形瓶中,加入 30 mL 石油醚和 100 mL 甲醇-水(55+45),在瓶塞上抹上一层水盖严防漏。在振荡器上振荡提取 30 min 后,通过快速定性滤纸滤入分液漏斗中,待下层甲醇水层分清后,取出 20 mL 滤液置于 100 mL 分液漏斗中,调节 pH 5~6。加入 25 mL 三氯甲烷振摇 2 min,静置分层后放出三氯甲烷层于另一分液漏斗中,再用 10 mL 三氯甲烷重复振摇提取甲醇水层,如发生乳化现象,可滴加甲醇促使其分层,将三氯甲烷层合并于同一分液漏斗中,加入 50 mL~100 mL 氯化钠溶液(加入量视品种不同而异,大豆加 100 mL,小麦、玉米则加 50 mL 左右),振摇放置(如为大豆试样提取液还须轻轻反复倒转分液漏斗,使乳化层逐渐上升。如乳化严重可加入少许甲醇),待三氯甲烷层澄清后,用脱脂棉擦干分液漏斗下端,放三氯甲烷层于 75 mL 蒸发皿中(如为大豆试样须再加入 10 mL 三氯甲烷振摇,三氯甲烷层合并于同一蒸发皿中),将蒸发皿置蒸汽浴上通风挥干。以下操作自“用约 8 mL 三氯甲烷分次将蒸发皿中的残渣溶解”起,按甲法操作。

33.3 试样测定

33.3.1 薄层板的制备

称取 4 g 硅胶 G,加约 10 mL 水于乳钵中研磨至糊状。立即倒入涂布器内制成 5 cm×20 cm、厚度 0.3 mm 的薄层板三块,在空气中干燥后,在 105 °C~110 °C 活化 1 h,取出放干燥器中保存。

33.3.2 点样

取两块薄层板,在距薄层板下端 2.5 cm 的基线上用微量注射器滴加两个点:在距板左边缘 1.7 cm 处滴加赭曲霉毒素 A 标准工作液 8 μL,在距板左边缘 2.5 cm 处滴加样液 25 μL,然后在第二块板的样液点上滴加赭曲霉毒素 A 标准工作液 8 μL,点样时,需边滴加边用电吹风吹干,交替使用冷热风。

33.3.3 展开

33.3.3.1 展开剂

横展剂:乙醚或乙醚-甲醇-水(94+5+1)。

纵展剂:

- a) 甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(6+3+1.2+0.06)或甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6+3+1.4);
- b) 苯-冰乙酸(9+1)。

33.3.3.2 展开

横向展开:在展开槽内倒入 10 mL 横展剂,先将薄层板纵展至离原点 2 cm~3 cm,取出通风挥发溶剂 1 min~2 min 后,再将该薄层板靠标准点的长边置于同一展开槽内的溶剂中横展,如横展剂不够,可添加适量,展至板端过 1 min,取出通风挥发溶剂 2 min~3 min。

纵向展开:在另一展开槽内倒入 10 mL 纵展剂,将经横展后的薄层板纵展至前沿距原点 13 cm~

15 cm。取出通风挥干至板面无酸味(5 min~10 min)。

33.3.3.3 观察与评定

将薄层色谱板置 365 nm 波长紫外光灯下观察:

- a) 在紫外光灯下将两板相互比较,若第二块板的样液点在赭曲霉毒素 A 标准点的相应处出现最低检出量,而在第一板相同位置上未出现荧光点,则试样中的赭曲霉毒素 A 含量在本测定方法的最低检测量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。
- b) 如果第一板样液点在与第二板样液点相同位置上出现荧光点,则看第二板样液的荧光点是否与滴加的标准荧光点重叠,再进行以下的定量与确证试验。

33.3.4 稀释定量

比较样液中赭曲霉毒素 A 与标准赭曲霉毒素 A 点的荧光强度,估计稀释倍数。

薄层板经双向展开后,当阳性样品中赭曲霉毒素 A 含量高时,赭曲霉毒素 A 的荧光点会被横向拉长、使点变扁,或分成两个黄绿色荧光点。这是因为在横展过程中原点上赭曲霉毒素 A 的量超过了硅胶的吸附能力,原点上的杂质和残留溶剂在横展中将赭曲霉毒素 A 点横向拉长了,这时可根据赭曲霉毒素 A 黄绿色荧光的总强度与标准荧光强度比较,估计需减少的滴加微升数或所需稀释倍数。经稀释后测定含量时可在样液点的左边基线上滴加二个标准点,赭曲霉毒素 A 的量可为 4 ng、8 ng。比较样液与两个标准赭曲霉毒素 A 荧光点的荧光强度,概略定量。

33.3.5 确证试验

用碳酸氢钠-乙醇溶液喷洒色谱板,在室温下干燥,于长波紫外光灯下观察,这时赭曲霉毒素 A 荧光点应由黄绿色变为蓝色,而且荧光强度有所增加,可使方法检出限达 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但概略定量仍按喷洒前所显黄绿色荧光计。

34 分析结果的表述

试样中赭曲霉毒素 A 含量按式(8)计算:

$$X = A \times \frac{V_1}{V_2} \times f \times \frac{1\ 000}{m} \dots\dots\dots(8)$$

式中:

X —— 试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

A —— 薄层板上测得样液点上赭曲霉毒素 A 赭曲霉毒素 A 的量,单位为微克(μg);

V_1 —— 苯-乙腈混合液的体积,单位为毫升(mL);

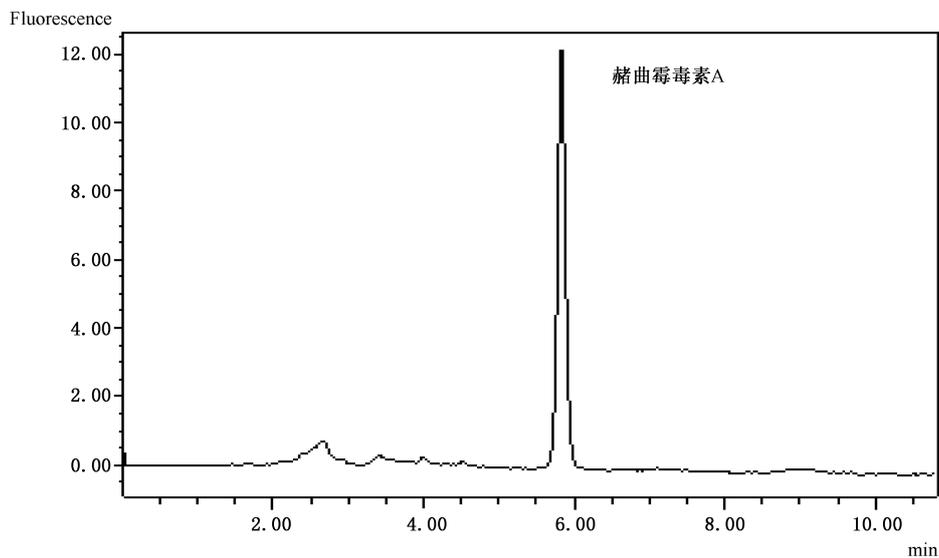
V_2 —— 出现最低荧光点时滴加样液的体积,单位为毫升(mL);

f —— 样液的总稀释倍数;

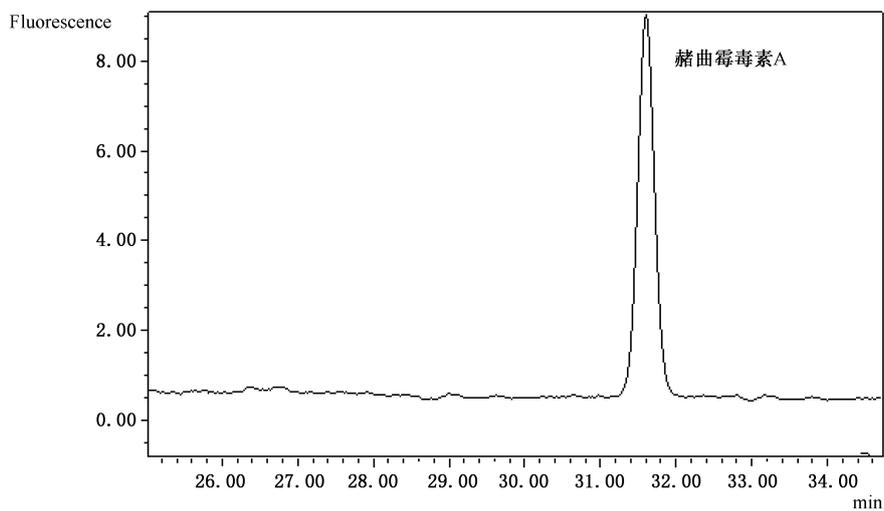
m —— 苯-乙腈溶解时相当样品的质量,单位为克(g)。

附录 A
赭曲霉毒素 A 标准品谱图

A.1 赭曲霉毒素 A 标准品高效液相色谱图见图 A.1。



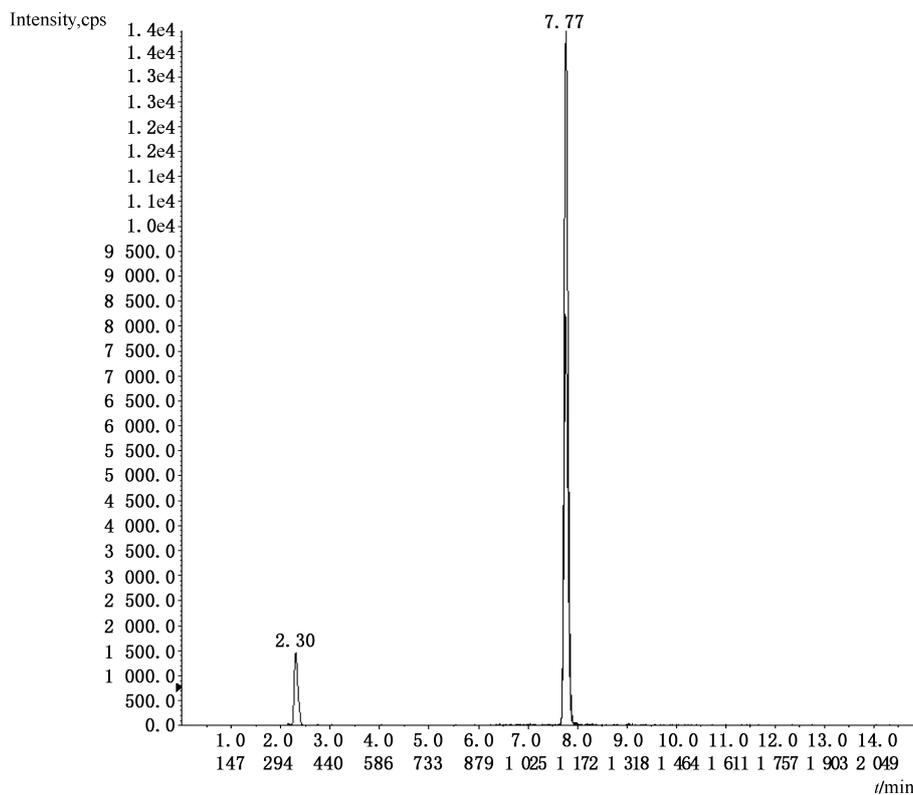
a) 第二法离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法中赭曲霉毒素 A 标准品的液相色谱图(等度洗脱)



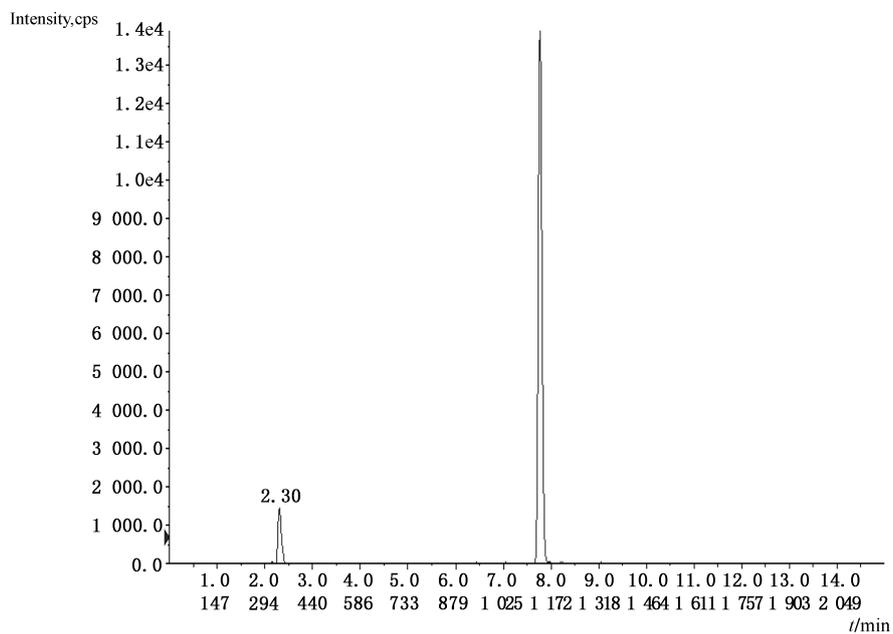
b) 第二法离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法中赭曲霉毒素 A 标准品的液相色谱图(梯度洗脱)

图 A.1 赭曲霉毒素 A 标准品高效液相色谱图

A.2 赭曲霉毒素 A 标准品总离子流图及选择离子流图见图 A.2。

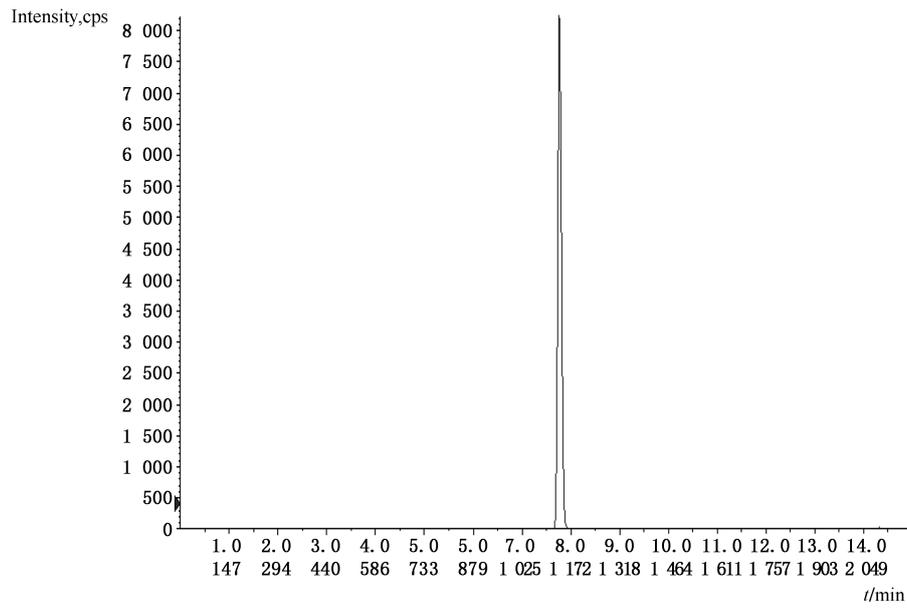


a) 第三法免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法中赭曲霉毒素 A 标准品总离子流图



b) 第三法免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法中赭曲霉毒素 A 标准品 402.1/358.1 选择离子流图

图 A.2 赭曲霉毒素 A 标准品总离子流图及选择离子流图



c) 第三法免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法中赭曲霉毒素 A 标准品 402.1/166.9 选择离子流图

图 A.2 (续)