

中华人民共和国国家标准

GB 5009.240—2016

食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定

2016-08-31 发布

2017-03-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 25228—2010《粮油检验 玉米及其制品中伏马毒素含量测定 免疫亲和柱净化高效液相色谱法和荧光光度法》、SN/T 1958—2007《进出口食品中伏马毒素 B₁ 残留量检测方法 酶联免疫吸附法》、SN/T 1572—2005《进出口粮谷中伏马毒素检验方法 高效液相色谱法》。

本标准将以上标准进行了整合,主要修订如下:

- 标准名称修改为“食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定”;
- 伏马毒素种类增加为伏马毒素 B₁、B₂、B₃ 三种;
- 增加了免疫亲和柱净化-柱后衍生高效液相色谱法作为第一法;
- 增加了高效液相色谱-串联质谱联用法作为第二法;
- 取消荧光光度法;
- 改变了样品提取溶液;
- 改变了免疫亲和柱净化-柱前衍生高效液相色谱法流动相的组成。

食品安全国家标准

食品中伏马毒素的测定

1 范围

本标准规定了玉米及其制品中伏马毒素 B₁、伏马毒素 B₂、伏马毒素 B₃ (以下简称为 FB₁、FB₂、FB₃) 的测定方法。

本标准第一法为免疫亲和柱净化-柱后衍生高效液相色谱法,第二法为高效液相色谱-串联质谱联用法,第三法为免疫亲和柱净化-柱前衍生高效液相色谱法,适用于玉米及其制品中伏马毒素的测定。

第一法 免疫亲和柱净化-柱后衍生高效液相色谱法

2 原理

样品用乙腈-水溶液提取,经稀释后过免疫亲和柱净化,去除脂肪、蛋白质、色素及碳水化合物等干扰物质。经高效液相色谱分离后柱后邻苯二甲醛衍生,荧光检测,外标法定量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法使用的试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲醇(CH₃OH):色谱纯。

3.1.2 乙腈(CH₃CN):色谱纯。

3.1.3 乙酸(CH₃COOH)。

3.1.4 氢氧化钠(NaOH)。

3.1.5 氯化钠(NaCl)。

3.1.6 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。

3.1.7 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。

3.1.8 氯化钾(KCl)。

3.1.9 硼砂(Na₂B₄O₇·10H₂O)。

3.1.10 2-巯基乙醇(C₂H₆OS)。

3.1.11 邻苯二甲醛(OPA,C₈H₆O₂)。

3.1.12 吐温-20(C₅₈H₁₁₄O₂₆)。

3.2 溶液配制

3.2.1 甲酸水溶液(0.1%):吸取 1 mL 甲酸,加入到 999 mL 水中,混合均匀。

3.2.2 乙腈-水溶液(50+50):分别量取 500 mL 乙腈和 500 mL 水,混合均匀。

3.2.3 乙腈-水溶液(20+80):分别量取 200 mL 乙腈和 800 mL 水,混合均匀。

- 3.2.4 甲醇-乙酸溶液(98+2):吸取 2 mL 乙酸,加入到 98 mL 甲醇中,混合均匀。
- 3.2.5 氢氧化钠溶液(1 mol/L):准确称取氢氧化钠 4.0 g,溶于 100 mL 水,混合均匀。
- 3.2.6 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 980 mL 水溶解,用盐酸调整 pH 至 7.4,用水稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 3.2.7 吐温-20/PBS 溶液(0.1%):吸取 1 mL 吐温-20,加入磷酸盐缓冲液(3.2.6)并稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 3.2.8 硼砂溶液(0.05 mol/L,pH 10.5):称取硼砂 19.1 g,溶于 980 mL 水中,用氢氧化钠溶液调 pH 至 10.5,用水稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 3.2.9 衍生溶液:称取 2.0 g 邻苯二甲醛,溶于 20 mL 甲醇中,用硼砂溶液(0.05 mol/L,pH 10.5)(3.2.8)稀释至 500 mL,加入 2-巯基乙醇 500 μ L,混匀,装入棕色瓶中,现用现配。

3.3 标准品

- 3.3.1 伏马毒素 B₁(FB₁,C₃₄H₅₉NO₁₅),纯度 \geq 95%,或有证标准溶液。
- 3.3.2 伏马毒素 B₂(FB₂,C₃₄H₅₉NO₁₄),纯度 \geq 95%,或有证标准溶液。
- 3.3.3 伏马毒素 B₃(FB₃,C₃₄H₅₉NO₁₄),纯度 \geq 95%,或有证标准溶液。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 标准储备溶液(0.1 mg/mL):分别准确称取 FB₁、FB₂、FB₃ 各 0.01 g(精确至 0.000 1 g)至小烧杯中,用乙腈-水溶液(3.2.2)溶解,并转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液密封后避光-20 $^{\circ}$ C 保存。有效期 6 个月。
- 3.4.2 混合标准溶液:准确吸取 FB₁ 标准储备液 1 mL、FB₂ 和 FB₃ 标准储备液 0.5 mL 至同一 10 mL 容量瓶中,加乙腈-水溶液(3.2.2)稀释至刻度,得到 FB₁ 浓度为 10 μ g/mL、FB₂ 和 FB₃ 浓度为 5 μ g/mL 的混合标准溶液。再稀释 10 倍,得到 FB₁ 浓度为 1 μ g/mL、FB₂ 和 FB₃ 浓度为 0.5 μ g/mL 的混合标准溶液。此溶液密封后避光 4 $^{\circ}$ C 保存,有效期 6 个月。
- 3.4.3 混合标准工作溶液:准确吸取混合标准溶液,用乙腈-水溶液(3.2.3)稀释,配制成 FB₁ 浓度依次为 20 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL、240 ng/mL、320 ng/mL、400 ng/mL,FB₂ 和 FB₃ 浓度依次为 10 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、120 ng/mL、160 ng/mL、200 ng/mL 的系列混合标准工作溶液。

4 仪器和设备

- 4.1 高效液相色谱仪,带荧光检测器。
- 4.2 柱后衍生系统。
- 4.3 天平:感量 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 4.4 均质器。
- 4.5 振荡器。
- 4.6 氮吹仪。
- 4.7 离心机:转速 \geq 4 000 r/min。
- 4.8 免疫亲和柱(柱容量 \geq 5 000 ng,FB₁ 柱回收率 \geq 80%)(柱容量及柱回收率验证方法参见附录 B)。
注:对于每个批次的亲和柱在使用前需进行质量检验。
- 4.9 微孔滤膜:0.45 μ m,有机型。

5 分析步骤

5.1 样品制备

将固体样品按四分法缩分至 1 kg,全部用谷物粉碎机磨碎并细至粒度小于 1 mm,混匀分成 2 份作

为试样,分别装入洁净的容器内,密封,标识后置于4℃下避光保存。

玉米油样品直接取2份作为试样,分别装入洁净的容器内,密封,标识后置于4℃下避光保存。

在制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

5.2 试样提取

准确称取固体样品5g(精确至0.01g)样品于50mL离心管中,加入20mL乙腈-水溶液(3.2.2),涡旋或振荡提取20min,取出后,在4000r/min下离心5min,将上清液转移至另一离心管中。

玉米油样品操作同固体样品,提取液在下层。

5.3 试样净化

取2mL提取液,加入47mL吐温-20/PBS溶液(3.2.7),混合均匀后过免疫亲和柱,流速控制在1mL/min~3mL/min,用10mL PBS缓冲液淋洗免疫亲和柱,分别用1mL甲醇-乙酸溶液(3.2.4)洗脱免疫亲和柱三次,收集洗脱液,55℃下氮吹至干,加入1mL乙腈-水溶液(3.2.3)溶解残渣。涡旋30s,过0.45μm微孔滤膜后,收集于进样瓶中,待测。

注:由于不同厂商提供的免疫亲和柱操作程序可能不同,实际操作时,请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

5.4 仪器参考条件

色谱柱:C₁₈色谱柱:250mm×4.6mm,5μm,或相当者。

检测波长:激发波长335nm;发射波长440nm。

流动相:A:甲酸水溶液(3.2.1);B:甲醇。梯度洗脱,洗脱程序见表1。

流动相流速:0.8mL/min。

衍生液流速:0.4mL/min。

柱温:40℃。

反应器温度:40℃。

进样量:50μL。

表1 流动相洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	45.0	55.0
2.00	45.0	55.0
9.00	30.0	70.0
14.00	10.0	90.0
14.50	10.0	90.0
15.00	45.0	55.0
22.00	45.0	55.0

5.5 试样溶液的测定

在5.4项色谱条件下,将50.0μL系列伏马毒素混合标准工作溶液(3.4.3)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。

5.6 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

待测样品中 FB₁、FB₂、FB₃ 的含量按式(2)计算：

$$X = \frac{c_i \times V \times f}{m} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X ——待测样品中 FB₁、FB₂、FB₃ 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

c_i ——待测物进样液中 FB₁、FB₂、FB₃ 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL)；

V ——定容体积,单位为毫升(mL)；

f ——试液稀释倍数；

m ——样品的称样量,单位为克(g)。

注：计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留两位有效数字。

7 精密度

样品中伏马毒素含量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

当称样量为 5 g 时,FB₁、FB₂、FB₃ 的检出限分别为 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；定量限分别为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第二法 高效液相色谱-串联质谱联用法

9 原理

样品加入同位素内标,乙腈-水溶液提取,经稀释后过免疫亲和柱或强阴离子交换固相萃取柱净化,去除脂肪、蛋白质、色素及碳水化合物等干扰物质。净化液中的伏马毒素经过高效液相色谱分离,串联质谱检测,同位素内标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明,本方法使用的试剂均为分析纯,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 乙酸(CH_3COOH)。
- 10.1.4 氯化钠(NaCl)。
- 10.1.5 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 10.1.6 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 10.1.7 氯化钾(KCl)。
- 10.1.8 吐温-20($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)。

10.2 溶液配制

- 10.2.1 甲酸水溶液(0.1%):吸取 1 mL 甲酸,加入到 999 mL 水中,混合均匀。
- 10.2.2 乙腈-甲醇溶液(50+50):分别量取 500 mL 甲醇和 500 mL 乙腈,混合均匀。
- 10.2.3 乙腈-水溶液(50+50):分别量取 500 mL 乙腈和 500 mL 水,混合均匀。
- 10.2.4 乙腈-水溶液(20+80):分别量取 200 mL 乙腈和 800 mL 水,混合均匀。
- 10.2.5 甲醇-水溶液(60+20):分别量取 600 mL 甲醇和 200 mL 水,混合均匀。
- 10.2.6 甲醇-乙酸溶液(99+1):吸取 1 mL 乙酸,加入到 99 mL 甲醇中,混合均匀。
- 10.2.7 甲醇-乙酸溶液(98+2):吸取 2 mL 乙酸,加入到 98 mL 甲醇中,混合均匀。
- 10.2.8 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 980 mL 水溶解,用盐酸调整 pH 至 7.4,用水稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 10.2.9 吐温-20/PBS 溶液(0.1%):吸取 1 mL 吐温-20,加入磷酸盐缓冲液(10.2.8)并稀释至 1 000 mL,混合均匀。

10.3 标准品

10.3.1 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 标准品

伏马毒素 B_1 (FB_1 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$), 纯度 $\geq 95\%$, 或有证标准溶液。

伏马毒素 B_2 (FB_2 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$), 纯度 $\geq 95\%$, 或有证标准溶液。

伏马毒素 B_3 (FB_3 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$), 纯度 $\geq 95\%$, 或有证标准溶液。

10.3.2 $^{13}\text{C}_{34}$ -伏马毒素 B_1 、 B_2 、 B_3 同位素内标

$^{13}\text{C}_{34}$ -伏马毒素 B_1 ($^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{15}$), 纯度 $\geq 95\%$, 或有证标准溶液。

$^{13}\text{C}_{34}$ -伏马毒素 B_2 ($^{13}\text{C}_{34}$ - FB_2 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$), 纯度 $\geq 95\%$, 或有证标准溶液。

$^{13}\text{C}_{34}$ -伏马毒素 B_3 ($^{13}\text{C}_{34}$ - FB_3 , $\text{C}_{34}\text{H}_{59}\text{NO}_{14}$), 纯度 $\geq 95\%$, 或有证标准溶液。

注: 在检测中可以只使用 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1 一种同位素内标, 但需要对被测定试样基质进行加标实验, 评估和确定 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1 与其他被测伏马毒素的基质效应。或使用基质匹配校正曲线。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 标准储备溶液(0.1 mg/mL): 分别准确称取 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 各 0.01 g (精确至 0.000 1 g) 至小烧

杯中,用乙腈-水溶液(10.2.3)溶解,并转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液密封后避光-20 ℃ 保存。有效期 6 个月。

10.4.2 混合标准溶液:准确吸取 FB₁ 标准储备液 1 mL、FB₂ 和 FB₃ 标准储备液 0.5 mL 至同一 10 mL 容量瓶中,加乙腈-水溶液(10.2.3)稀释至刻度,得到 FB₁ 浓度为 10 μg/mL、FB₂ 和 FB₃ 浓度分别为 5 μg/mL 的混合标准溶液。再稀释 10 倍,得到 FB₁ 浓度为 1 μg/mL、FB₂ 和 FB₃ 浓度分别为 0.5 μg/mL 的混合标准溶液。此溶液密封后避光 4 ℃ 保存。有效期 6 个月。

10.4.3 混合同位素标准溶液:准确吸取¹³C₃₄-FB₁ (25 μg/mL)、¹³C₃₄-FB₂ (10 μg/mL)、¹³C₃₄-FB₃ (10 μg/mL)各 1 mL 至同一 10 mL 容量瓶中,加乙腈-水溶液(10.2.3)稀释至刻度,得到含¹³C₃₄-FB₁ 2.5 μg/mL、¹³C₃₄-FB₂ 和¹³C₃₄-FB₃ 1 μg/mL 的混合同位素标准溶液。再稀释 10 倍,得到含¹³C₃₄-FB₁ 250 ng/mL、¹³C₃₄-FB₂ 和¹³C₃₄-FB₃ 100 ng/mL 的混合同位素标准工作溶液。有效期 6 个月。

10.4.4 混合标准工作溶液:准确吸取混合标准溶液,用乙腈-水溶液(10.2.4)稀释,加入混合同位素标准工作溶液(10.4.3),配制成 FB₁ 浓度依次为 20 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL、240 ng/mL、320 ng/mL、400 ng/mL,FB₂ 和 FB₃ 浓度依次为 10 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、120 ng/mL、160 ng/mL、200 ng/mL 的系列混合标准工作溶液,每个标准工作溶液中含有¹³C₃₄-FB₁ 25 ng/mL、¹³C₃₄-FB₂ 和¹³C₃₄-FB₃ 10 ng/mL。

11 仪器和设备

11.1 高效液相色谱-串联质谱联用仪:配有电喷雾离子源。

11.2 天平:感量 0.01 g 和 0.000 1 g。

11.3 均质器。

11.4 振荡器。

11.5 氮吹仪。

11.6 离心机:转速≥4 000 r/min。

11.7 强阴离子交换固相萃取柱(硅胶基,6 mL,500 mg)。

11.8 免疫亲和柱(柱容量≥5 000 ng,FB₁ 柱回收率≥80%)。(柱容量及柱回收率验证方法参见附录 B)

注:对于每个批次的亲和柱在使用前需进行质量检验。

11.9 微孔滤膜:0.22 μm,有机型。

12 分析步骤

12.1 样品制备

将固体样品按四分法缩分至 1 kg,全部用谷物粉碎机磨碎并细至粒度小于 1 mm,混匀分成 2 份作为试样,分别装入洁净的容器内,密封,标识后置于 4 ℃ 下避光保存。

玉米油样品直接取 2 份作为试样,分别装入洁净的容器内,密封,标识后置于 4 ℃ 下避光保存。

在制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

12.2 试样提取

准确称取固体样品 5 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中,加入混合同位素标准工作溶液(10.4.3)400 μL,加入 20 mL 乙腈-水溶液(10.2.3),涡旋或振荡提取 20 min,取出后,在 4 000 r/min 下离心 5 min,将上清液转移至另一离心管中。

玉米油样品操作同固体样品,提取液在下层。

12.3 试样净化

12.3.1 免疫亲和柱净化

取 2 mL 提取液,加入 47 mL 吐温-20/PBS 溶液(10.2.9),混合均匀后过免疫亲和柱,流速控制在 1 mL/min~3 mL/min,用 10 mL PBS 缓冲液(10.2.8)淋洗免疫亲和柱,分别用 1 mL 甲醇-乙酸溶液(10.2.7)洗脱免疫亲和柱三次,收集洗脱液,55 °C 下氮吹至干,加入 1 mL 乙腈-水溶液(10.2.4)溶解残渣。涡旋 30 s,过 0.22 μm 微孔滤膜后,收集于进样瓶中,待测。

注:由于不同厂商提供的免疫亲和柱操作程序可能不同,实际操作时,请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

12.3.2 强阴离子交换固相萃取柱净化

取 3 mL 提取液,加入 8 mL 甲醇-水溶液(10.2.5),混合均匀后过强阴离子交换固相萃取柱(使用前按要求活化),分别用 8 mL 甲醇-水溶液(10.2.5)和 3 mL 甲醇淋洗,用 10 mL 甲醇-乙酸溶液(10.2.6)洗脱,55 °C 下氮吹至干,加入 1 mL 乙腈-水溶液(10.2.4)溶解残渣。涡旋 30 s,过 0.22 μm 微孔滤膜后,收集于进样瓶中,待测。

12.4 仪器参考条件

12.4.1 液相色谱条件

色谱柱:C₁₈柱,100 mm×2.1 mm,1.7 μm,或相当者。

流动相:A:甲酸水溶液(0.1%);B:乙腈-甲醇溶液(50+50)。梯度洗脱,梯度见表 2。

流速:0.35 mL/min。

柱温:30 °C。

进样量:10 μL。

表 2 流动相梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	70.0	30.0
2.30	30.0	70.0
4.00	30.0	70.0
4.20	0	100
4.80	0	100
5.00	70.0	30.0

12.4.2 质谱参数

离子化模式:电喷雾电离正离子模式(ESI+)。

质谱扫描方式:多反应监测(MRM)。

监测离子对信息见表 3,其他仪器参考条件见附录 C。

表 3 质谱参数

毒素名称	母离子	定量子离子	碰撞能量 eV	定性子离子	碰撞能量 eV
FB ₁	722	352	25	334	35
FB ₂	706	336	35	354	30
FB ₃	706	336	35	354	30
¹³ C ₃₄ -FB ₁	756	374	35	356	40
¹³ C ₃₄ -FB ₂	740	358	35	376	30
¹³ C ₃₄ -FB ₃	740	358	35	376	30

12.5 定性判定

用高效液相色谱-串联质谱联用法对样品进行定性判定,在相同试验条件下,样品中应呈现定量离子对和定性离子对的色谱峰,被测物质的质量色谱峰保留时间与标准溶液中对应物质的质量色谱峰保留时间一致;样品色谱图所选选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比的偏差不超过表 4 规定范围,则可以判断样品中存在对应的目标物质。

表 4 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度(k)	$k \geq 50\%$	$50\% > k \geq 20\%$	$20\% > k \geq 10\%$	$k \leq 10\%$
允许的最大偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

12.6 定量测定

在 5.4 高效液相色谱-串联质谱联用分析条件下,将 10.0 μL 系列伏马毒素混合标准溶液(10.4.4)按浓度从低到高依次注入高效液相色谱-串联质谱联用仪;待仪器条件稳定后,以目标物质和内标的浓度比为横坐标(x 轴),目标物质和内标的峰面积比为纵坐标(y 轴),对各个数值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/内标的峰面积比;

a —— 回归曲线的斜率;

x —— 目标物质/内标的浓度比;

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,如果含量超过标准曲线范围,则重新取样,增加相应内标添加量,使内标浓度与待测液浓度相匹配,然后稀释到适当浓度后分析。

12.7 空白试验

不称取试样,按 12.2 和 12.3 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

本方法采用内标法定量。

含量按式(4)计算:

$$X = \frac{c \times c_i \times A \times A_{si} \times V}{c_{si} \times A_i \times A_s \times m} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

- X ——样品中待测组分的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);
- c ——标准溶液中待测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- c_i ——测定液中待测组分的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A ——测定液中待测组分的峰面积;
- A_{si} ——标准溶液中内标物质的峰面积;
- V ——定容体积,单位为毫升(mL);
- c_{si} ——标准溶液中内标物质的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_i ——测定液中内标物质的峰面积;
- A_s ——标准溶液中待测组分的峰面积;
- m ——样品称样量,单位为克(g)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留两位有效数字。

14 精密度

样品中伏马毒素含量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

当称样量为5 g时,FB₁、FB₂、FB₃的检出限分别为7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{kg}$;定量限分别为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第三法 免疫亲和层析净化-柱前衍生高效液相色谱法

16 原理

样品用乙腈-水溶液提取,经稀释后过免疫亲和柱净化,去除脂肪、蛋白质、色素及碳水化合物等干扰物质。净化液中的伏马毒素经过OPA衍生后进高效液相色谱分离,荧光检测,外标法定量。

17 试剂和材料

除非另有说明,本方法使用的试剂均为分析纯,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 乙酸(CH_3COOH)。
- 17.1.4 氢氧化钠(NaOH)。
- 17.1.5 氯化钠(NaCl)。
- 17.1.6 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。
- 17.1.7 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。
- 17.1.8 氯化钾(KCl)。
- 17.1.9 硼砂($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$)。
- 17.1.10 2-巯基乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)。
- 17.1.11 邻苯二甲醛($\text{OPA}, \text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$)。
- 17.1.12 吐温-20($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)。

17.2 溶液配制

- 17.2.1 甲酸铵-甲酸水溶液(0.1 mol/L, pH:3.3):称取 6.3 g 甲酸铵,溶于 980 mL 水中,用甲酸调 pH 至 3.3,用水稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 17.2.2 乙腈-水溶液(50+50):分别量取 500 mL 乙腈和 500 mL 水,混合均匀。
- 17.2.3 乙腈-水溶液(20+80):分别量取 200 mL 乙腈和 800 mL 水,混合均匀。
- 17.2.4 甲醇-乙酸溶液(98+2):吸取 2 mL 乙酸,加入到 98 mL 甲醇中,混合均匀。
- 17.2.5 氢氧化钠(1 mol/L)溶液:准确称取氢氧化钠 4.0 g,溶于 100 mL 水,混合均匀。
- 17.2.6 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 980 mL 水溶解,然后用盐酸调整 pH 至 7.4,最后用水稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 17.2.7 吐温-20/PBS 溶液(0.1%):吸取 1 mL 吐温-20,加入磷酸盐缓冲液(17.2.6)并稀释至 1 000 mL,混合均匀。
- 17.2.8 硼砂溶液(0.1 mol/L):称取硼砂 3.8 g,用水溶解并稀释至 100 mL,混合均匀。
- 17.2.9 衍生溶液:准确称取 40 mg 邻苯二甲醛,溶于 1 mL 甲醇中,用硼砂溶液(0.1 mol/L)(17.2.8) 5 mL 稀释,加入 2-巯基乙醇 50 μL ,混合均匀,装入棕色瓶中,现用现配。

17.3 标准品

FB₁、FB₂、FB₃ 标准品:

伏马毒素 B₁(FB₁, C₃₄H₅₉NO₁₅),纯度 $\geq 95\%$,或有证标准溶液。

伏马毒素 B₂(FB₂, C₃₄H₅₉NO₁₄),纯度 $\geq 95\%$,或有证标准溶液。

伏马毒素 B₃(FB₃, C₃₄H₅₉NO₁₄),纯度 $\geq 95\%$,或有证标准溶液。

17.4 标准溶液配制

- 17.4.1 标准储备溶液(0.1 mg/mL):分别准确称取 FB₁、FB₂、FB₃ 各 0.01 g(精确至 0.000 1 g)至小烧杯中,用乙腈-水溶液(17.2.2)溶解,并转移至 100 mL 容量瓶中,定容至刻度。此溶液密封后避光-20 °C 保存。有效期 6 个月。
- 17.4.2 混合标准溶液:准确吸取 FB₁ 标准储备液 1 mL、FB₂ 和 FB₃ 标准储备液各 0.5 mL 至同一 10 mL 容量瓶中,加乙腈-水溶液(17.2.2)稀释至刻度,得到 FB₁ 浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FB₂ 和 FB₃ 浓度分别为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液。再稀释 10 倍,得到 FB₁ 浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、FB₂ 和 FB₃ 浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液。此溶液密封后避光 4 °C 保存,有效期 6 个月。

17.4.3 混合标准工作液:准确吸取混合标准溶液,用乙腈-水溶液(17.2.3)稀释,配制成 FB_1 浓度依次为 20 ng/mL、80 ng/mL、160 ng/mL、240 ng/mL、320 ng/mL、400 ng/mL, FB_2 和 FB_3 浓度依次为 10 ng/mL、40 ng/mL、80 ng/mL、120 ng/mL、160 ng/mL、200 ng/mL 的系列混合标准工作溶液。

18 仪器和设备

18.1 高效液相色谱仪,带荧光检测器。

18.2 天平:感量 0.01 g 和 0.000 1 g。

18.3 均质器。

18.4 振荡器。

18.5 氮吹仪。

18.6 离心机:转速 $\geq 4\ 000$ r/min。

18.7 免疫亲和柱(柱容量 $\geq 5\ 000$ ng, FB_1 柱回收率 $\geq 80\%$)(柱容量及柱回收率验证方法参见附录 A.2)。

注:对于每个批次的亲和柱在使用前需进行质量验证。

18.8 微孔滤膜:0.45 μm ,有机型。

18.9 秒表。

19 分析步骤

19.1 样品制备

将固体样品按四分法缩分至 1 kg,全部用谷物粉碎机磨碎并细至粒度小于 1 mm,混匀分成 2 份作为试样,分别装入洁净的容器内,密封,标识后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。

玉米油样品直接取 2 份作为试样,分别装入洁净的容器内,密封,标识后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。

在制样的操作过程中,应防止样品受到污染或发生残留物含量的变化。

19.2 试样提取

准确称取固体样品 5 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-水(17.2.2),涡旋或震荡提取 20 min,取出后,在 4 000 r/min 下离心 5 min,将上清液转移至另一离心管中。

玉米油样品操作同固体样品,提取液在下层。

19.3 试样净化

取 2 mL 提取液,加入 47 mL 吐温-20/PBS 溶液(17.2.7),混合均匀后过免疫亲和柱,流速控制在 1 mL/min~3 mL/min,用 10 mL PBS 缓冲液淋洗免疫亲和柱,分别用 1 mL 甲醇-乙酸溶液(17.2.4)洗脱免疫亲和柱三次,收集洗脱液,55 $^{\circ}\text{C}$ 下氮吹至干,加入 500 μL 乙腈-水溶液(17.2.2)溶解残渣。涡旋 30 s,过 0.45 μm 微孔滤膜后,收集于进样瓶中,待测。

注:由于不同厂商提供的免疫亲和柱操作程序可能不同,实际操作时,请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

19.4 衍生

取 100 μL 标准溶液或样品溶液于进样瓶中,加入 100 μL 衍生溶液(17.2.9),涡旋混合 30 s,在 2 min 内进样分析。

19.5 仪器参考条件

色谱柱: C₁₈柱, 150 mm×4.6 mm, 5 μm 或相当者。

检测波长: 激发波长 335 nm; 发射波长 440 nm。

流动相: A: 甲酸铵-甲酸水溶液(17.2.1); B: 甲醇。梯度洗脱, 洗脱程序见表 5。

流速: 1.0 mL/min。

柱温: 40 ℃。

进样量: 50 μL。

表 5 流动相洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0.00	30.0	70.0
5.00	28.0	72.0
6.00	25.0	75.0
11.00	22.0	78.0
11.10	30.0	70.0
16.00	30.0	70.0

19.6 试样溶液的测定

在 12.4 色谱条件下, 将 50.0 μL 伏马毒素系列混合标准工作溶液(17.4.3)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:

$$y = ax + b \quad \dots\dots\dots (5)$$

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。

19.7 空白试验

不称取试样, 按 19.2 和 19.3 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

$$X = \frac{c_i \times V \times f}{m} \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中:

X —— 待测样品中 FB₁、FB₂、FB₃ 的含量, 单位为微克每千克(μg/kg);

c_i ——待测物进样液中 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 的浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试液稀释倍数;

m ——样品的称样量,单位为克(g)。

注:计算结果需扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留两位有效数字。

21 精密度

样品中伏马毒素含量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

当称样量为 5 g 时, FB_1 、 FB_2 、 FB_3 的检出限分别为 17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$;定量限分别为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附 录 A
伏马毒素标准品信息

伏马毒素标准品信息见表 A.1。

表 A.1 伏马毒素标准品信息

中文名称	英文名称	CAS	分子式	相对分子质量
伏马毒素 B ₁	Fumonisin B ₁	116355-83-0	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721.83
伏马毒素 B ₂	Fumonisin B ₂	116355-84-1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83
伏马毒素 B ₃	Fumonisin B ₃	136379-59-4	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83

附 录 B

免疫亲和柱柱容量及柱回收率验证方法

B.1 柱容量验证方法

在 30 mL 的吐温-20/PBS 溶液(0.1%)中加入 15 μg FB_1 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($5 \mu\text{g}$ FB_1)。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹至约 1 mL,用乙腈-水溶液(20+80)定容至 10 mL,用液相色谱仪分离测定 FB_1 的含量。

结果判定:结果 $\text{FB}_1 \geq 4.5 \mu\text{g}$,为柱容量满意。

B.2 柱回收率验证方法

取 2 mL 空白样品提取液,加入 47 mL 吐温-20/PBS 溶液(0.1%),加入 15 μg FB_1 标准储备溶液,用吐温-20/PBS 溶液(0.1%)定容至 50 mL,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($3 \mu\text{g}$ FB_1)。经上样、淋洗、洗脱,收集洗脱液,用氮气吹干至 1 mL,用乙腈-水溶液(20+80)定容至 10 mL,用液相色谱仪分离测定 FB_1 的含量。

结果判定:结果 $\text{FB}_1 \geq 2.4 \mu\text{g}$,则回收率 $\geq 80\%$,为柱回收率满意。

附 录 C
仪器参考条件

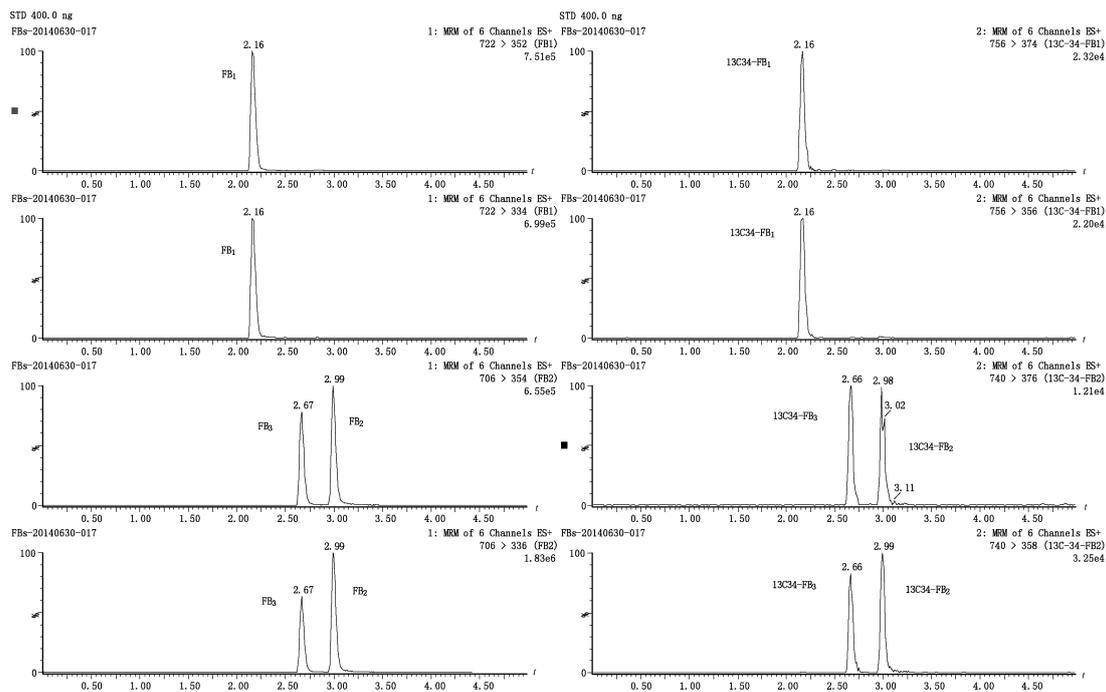
串联质谱参考条件:

- a) 毛细管电压:3.0 kV;
- b) 离子源温度:120 °C;
- c) 锥孔反吹气流量:50 L/h;
- d) 锥孔电压:45 V;
- e) 脱溶剂气温度:350 °C;
- f) 脱溶剂气流量:800 L/h;
- g) 碰撞池压力: 3.0×10^{-5} MPa。

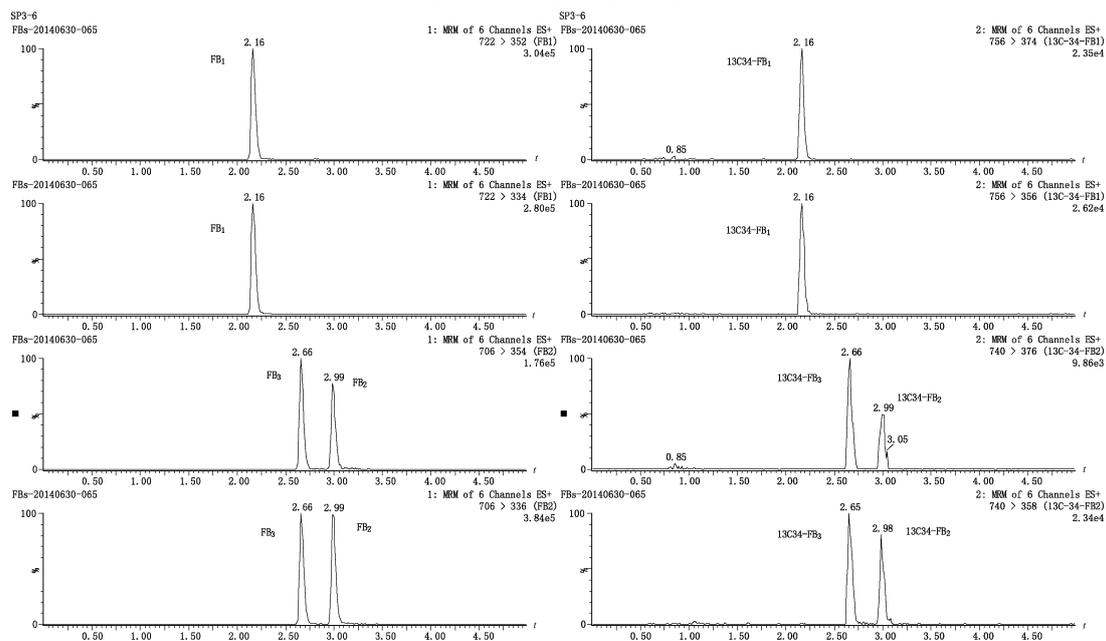
附录 D 谱图

D.1 液相色谱-串联质谱联用法谱图

液相色谱-串联质谱联用法谱图见图 D.1。



a) 伏马毒素及其同位素内标的标准谱图

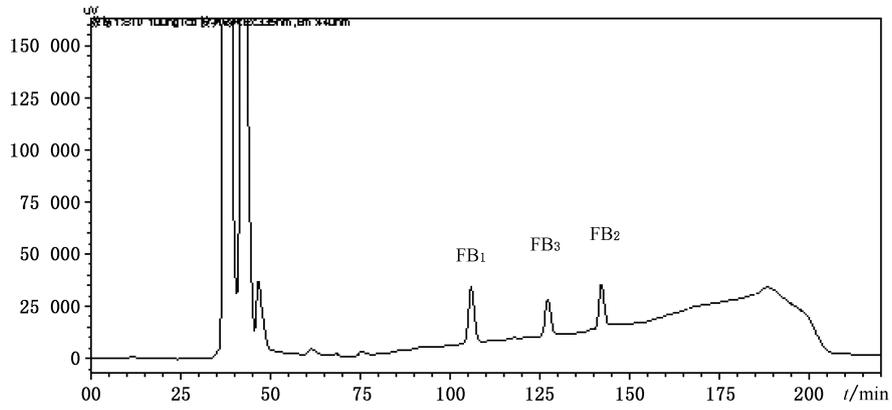


b) 伏马毒素及其同位素内标的玉米样品谱图

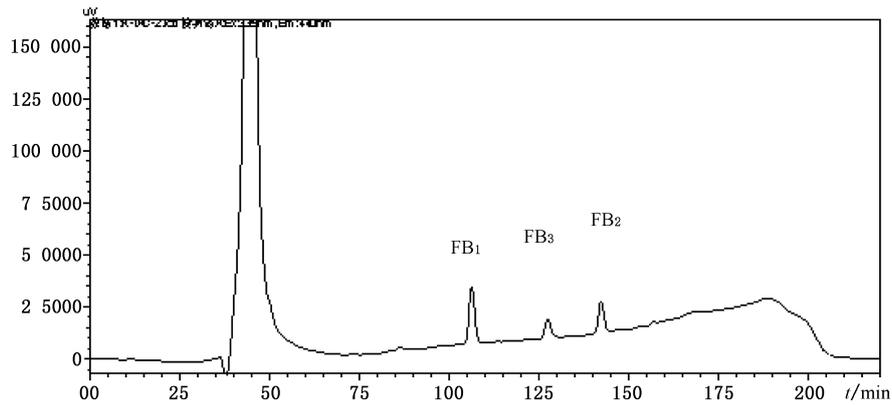
图 D.1 液相色谱-串联质谱联用法谱图

D.2 免疫亲和层析净化-柱后衍生高效液相色谱法谱图

免疫亲和层析净化-柱后衍生高效液相色谱法谱图见图 D.2。



a) 伏马毒素 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 的标准谱图

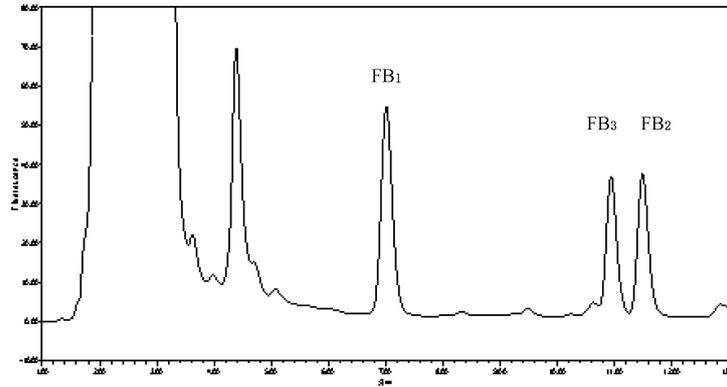


b) 伏马毒素 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 的玉米样品谱图

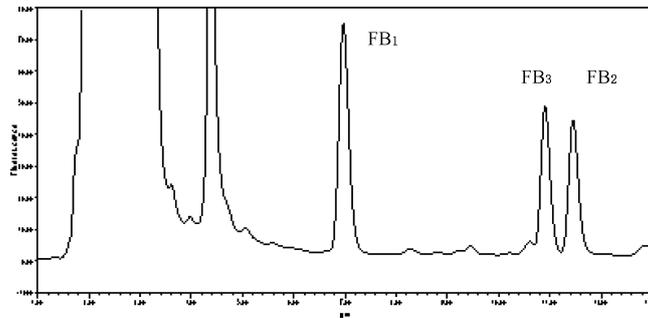
图 D.2 免疫亲和层析净化-柱后衍生高效液相色谱法谱图

D.3 免疫亲和层析净化-柱前衍生高效液相色谱法谱图

免疫亲和层析净化-柱前衍生高效液相色谱法谱图见图 D.3。



a) 伏马毒素 FB₁、FB₂、FB₃ 的标准谱图



b) 伏马毒素 FB₁、FB₂、FB₃ 的玉米样品谱图

图 D.3 免疫亲和层析净化-柱前衍生高效液相色谱法谱图