



# 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 B<sub>1</sub> 的测定》、GB/T 5009.23—2006《食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的测定》、GB 5009.24—2010《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 和 B<sub>1</sub> 的测定》、GB/T 23212—2008《牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 检验方法》、SN/T 1664—2005《牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> (以下简称 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub>) 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>,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(CH<sub>3</sub>CN):色谱纯。

3.1.2 甲醇(CH<sub>3</sub>OH):色谱纯。

3.1.3 乙酸铵(CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>):色谱纯。

3.1.4 氯化钠(NaCl)。

- 3.1.5 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )。
- 3.1.6 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )。
- 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  $7.4 \pm 0.1$ ,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 B<sub>1</sub>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 B<sub>2</sub>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 G<sub>1</sub>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 G<sub>2</sub>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 B<sub>1</sub>( $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$ , 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 B<sub>2</sub>( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$ , 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 G<sub>1</sub>( $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_7$ , 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 G<sub>2</sub>( $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_7$ , 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub>和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B<sub>2</sub>、 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G<sub>1</sub>和  $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G<sub>2</sub>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  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、500  $\mu\text{L}$ 、800  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$  至 10 mL 容量瓶中,加入 200  $\mu\text{L}$  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  $\mu$ 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 B<sub>1</sub>柱容量 $\geq$ 200 ng,AFT B<sub>1</sub>柱回收率 $\geq$ 80%,AFT G<sub>2</sub>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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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:C<sub>18</sub>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 <sup>+</sup>
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 <sub>1</sub>	313	285	22	241	38	ESI <sup>+</sup>
<sup>13</sup> C <sub>17</sub> -AFT B <sub>1</sub>	330	255	23	301	35	ESI <sup>+</sup>
AFT B <sub>2</sub>	315	287	25	259	28	ESI <sup>+</sup>
<sup>13</sup> C <sub>17</sub> -AFT B <sub>2</sub>	332	303	25	273	28	ESI <sup>+</sup>
AFT G <sub>1</sub>	329	243	25	283	25	ESI <sup>+</sup>
<sup>13</sup> C <sub>17</sub> -AFT G <sub>1</sub>	346	257	25	299	25	ESI <sup>+</sup>
AFT G <sub>2</sub>	331	245	30	285	27	ESI <sup>+</sup>
<sup>13</sup> C <sub>17</sub> -AFT G <sub>2</sub>	348	259	30	301	27	ESI <sup>+</sup>

## 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );
- $\rho$  —— 进样溶液中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 按照内标法在标准曲线中对应的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );
- V<sub>1</sub> —— 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( $\text{mL}$ );
- V<sub>3</sub> —— 样品经净化洗脱后的最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- 1 000 —— 换算系数;
- V<sub>2</sub> —— 用于净化分取的样品体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- m —— 试样的称样量,单位为克( $\text{g}$ )。

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 B<sub>1</sub> 的检出限为:0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,AFT B<sub>2</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,AFT G<sub>1</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,AFT G<sub>2</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;AFT B<sub>1</sub> 的定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,AFT B<sub>2</sub> 的定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,AFT G<sub>1</sub> 的定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>,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( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):色谱纯。

10.1.2 乙腈( $\text{CH}_3\text{CN}$ ):色谱纯。

10.1.3 正己烷( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ):色谱纯。

10.1.4 三氟乙酸( $\text{CF}_3\text{COOH}$ )。

## 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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>2</sub> 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 G<sub>1</sub> 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 G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>1</sub>:100 ng/mL, AFT B<sub>2</sub> 和 AFT G<sub>2</sub>:30 ng/mL):准确移取 AFT B<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>1</sub> 标准储备溶液各 1 mL, AFT B<sub>2</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 标准储备溶液各 300  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、500  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ 、2 000  $\mu\text{L}$ 、4 000  $\mu\text{L}$  至 10 mL 容量瓶中,用初始流动相定容至刻度(含 AFT B<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>1</sub> 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 B<sub>2</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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  $\mu$ m。
- 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  $\mu$ 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)。
- 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  $\mu$ L 正己烷和 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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: $C_{18}$ 柱(柱长 150 mm 或 250 mm,柱内径 4.6 mm,填料粒径 5.0  $\mu$ m),或相当者;
- d) 流速:1.0 mL/min;
- e) 柱温:40 °C;
- f) 进样体积:50  $\mu$ 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );
- $\rho$  —— 进样溶液中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 按照外标法在标准曲线中对应的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );
- V<sub>1</sub> —— 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( $\text{mL}$ );
- V<sub>3</sub> —— 净化液的最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- 1 000 —— 换算系数;
- V<sub>2</sub> —— 净化柱净化后的取样液体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- m —— 试样的称样量,单位为克( $\text{g}$ )。

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 B<sub>1</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , AFT B<sub>2</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , AFT G<sub>1</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , AFT G<sub>2</sub> 的检出限为 0.03  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;柱前衍生法的 AFT B<sub>1</sub> 的定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , AFT B<sub>2</sub> 的定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , AFT G<sub>1</sub> 的定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>,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(CH<sub>3</sub>OH):色谱纯。
- 17.1.2 乙腈(CH<sub>3</sub>CN):色谱纯。
- 17.1.3 氯化钠(NaCl)。
- 17.1.4 磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)。
- 17.1.5 磷酸二氢钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)。
- 17.1.6 氯化钾(KCl)。
- 17.1.7 盐酸(HCl)。
- 17.1.8 Triton X-100[C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>O(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>](或吐温-20,C<sub>58</sub>H<sub>114</sub>O<sub>26</sub>)。
- 17.1.9 碘衍生使用试剂:碘(I<sub>2</sub>)。
- 17.1.10 溴衍生使用试剂:三溴化吡啶(C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>3</sub>N<sub>2</sub>)。
- 17.1.11 电化学衍生使用试剂:溴化钾(KBr)、浓硝酸(HNO<sub>3</sub>)。

### 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 B<sub>1</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>,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 B<sub>2</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>,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 G<sub>1</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>,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 G<sub>2</sub> 标准品 C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>,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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub>和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>和 AFT G<sub>1</sub>:100 ng/mL,AFT B<sub>2</sub>和 AFT G<sub>2</sub>:30 ng/mL):准确移取 AFT B<sub>1</sub>和 AFT G<sub>1</sub>标准储备溶液各 1 mL,AFT B<sub>2</sub>和 AFT G<sub>2</sub>标准储备溶液各 300  $\mu\text{L}$ 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  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、500  $\mu\text{L}$ 、1 000  $\mu\text{L}$ 、2 000  $\mu\text{L}$ 、4 000  $\mu\text{L}$ 至 10 mL 容量瓶中,用初始流动相定容至刻度(含 AFT B<sub>1</sub>和 AFT G<sub>1</sub>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 B<sub>2</sub>和 AFT G<sub>2</sub>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  $\mu\text{m}$ 。

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 B<sub>1</sub>柱容量 $\geq$ 200 ng,AFT B<sub>1</sub>柱回收率 $\geq$ 80%,AFT G<sub>2</sub>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  $\mu\text{m}$  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)。

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: C<sub>18</sub>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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>), 463 nm(AFT G<sub>1</sub>、AFT G<sub>2</sub>);
- 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: C<sub>18</sub>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: C<sub>18</sub>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: C<sub>18</sub>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:C<sub>18</sub>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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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 B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- ρ —— 进样溶液中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 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);
- V<sub>1</sub> —— 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);

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/858100077075006107>