

Essentia 黄曲霉毒素分析系统测定玉米粉和奶粉中的黄曲霉毒素作业指导书 (SOP)

标准号：GB 5009.22-2016

■ 参考标准

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。

■ 方法概述

2.1 方法编制说明

2016 年 12 月 23 日，国家食品药品监督管理总局发布《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》，2017 年 6 月 23 日正式实施。本 SOP 参考该标准，利用岛津黄曲霉毒素分析系统建立食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族含量检测方法并进行方法学验证。

2.2 方法使用范围

本方法适用于高效液相色谱—柱后衍生法测定食品中的黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂。

2.3 方法技术指标

本方法的检出限：黄曲霉毒素 B₁、G₁ 应为 0.03 μg/kg；黄曲霉毒素 B₂、G₂ 应为 0.01 μg/kg。

本方法的定量限：黄曲霉毒素 B₁、G₁ 应为 0.1 μg/kg；黄曲霉毒素 B₂、G₂ 应为 0.03 μg/kg。

■ 方法原理

供试品中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂，用 70% 甲醇 - 水溶液提取，通过免疫亲和柱净化、定容和过滤后经液相色谱分离测定。根据保留时间定性，外标法定量。

■ 仪器设备及辅助设备

4.1 仪器设备

Essentia 黄曲霉毒素分析系统

4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AUW 220；

离心机：湘仪 H1650R；

涡旋仪：IKA LAB DANCER S25；

移液枪：1000 μL，200 μL，20 μL；

■ 标准品、试剂、耗材

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 混合标准品溶液（详细信息见附录）；

乙腈、甲醇：色谱级；

碘、氯化钠：分析纯级；

CNW 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱：规格 3 mL/20 pcs；于 4°C 冰箱保存，备用；

无针注射器：5 mL；

微孔过滤膜：有机相尼龙针式滤器，0.22 μm；

■ 操作步骤

6.1 标准工作曲线制作

准确吸取一定量的黄曲霉毒素混合对照品溶液 (AFTB₁、AFTB₂、AFTG₁、AFTG₂ 标识浓度分别为 1 µg/mL、0.3 µg/mL、1 µg/mL、0.3 µg/mL)，用流动相稀释，配制 (含 AFTB₁ 和 AFTG₁ 浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL，AFTB₂ 和 AFTG₂ 浓度为 0.03 ng/mL、0.15 ng/mL、0.6 ng/mL、1.5 ng/mL、3 ng/mL、6 ng/mL、12 ng/mL) 七个浓度的混合标准溶液，现用现配。

6.2 仪器条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 µm)

流动相：A 相—水，B 相—甲醇 - 乙腈 (50: 50)

流速：1.0 mL/min

洗脱方式：等度洗脱 (A:B=68:32)

进样体积：50 µL

柱温：40°C

检测波长：Ex=360 nm，Em=440 nm

衍生溶液：0.05% 碘溶液 (取 0.1 g 碘，加甲醇 20 mL，用纯净水定容至 200 mL，用 0.45 µm 的滤膜过滤，现用现配)

衍生液流速：0.2 mL/min

衍生化温度：70°C

6.3 样品前处理

1) 采样量需要大于 1 kg，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；

2) 取过筛后样品 20 g，加入 4 g 氯化钠，加入 100 mL 70% 甲醇 - 水溶液，振荡 30 min，4000 r/min 离心 5 min；

3) 从 2) 中取上清液 10 mL，加入 20 mL 水摇匀，4000 r/min 离心 5 min；

4) 从 3) 中取上清液过膜，取 15 mL 注入免疫亲和柱，弃去流出液，加 20 mL 水冲洗，弃去流出液，吹干；

5) 加 1 mL 甲醇洗脱，收集流出液，用微孔滤膜 (0.22 µm) 滤过，取续滤液，上机检测。

6.4 加标试样

取空白玉米粉样品和空白奶粉，添加 3 个不同浓度的混标，其中 AFTG₂ 和 AFTB₂ 的加标浓度分别为 0.03 µg/kg、0.6 µg/kg 和 3 µg/kg；AFTG₁ 和 AFTB₁ 的加标浓度分别为 0.1 µg/kg、2 µg/kg 和 10 µg/kg，然后按照“6.3 样品前处理”流程制备加标试样。

6.5 测定

按照“6.2 仪器分析”条件进行分析，进样量为 50 µL，若检测溶液中的浓度超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

6.6 计算和报告

精密吸取供试品溶液 50 µL，注入液相色谱仪，测定峰面积，外标法计算黄曲霉毒素的含量。

供试品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的量按下式计算：

$$X = C_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{V \times D}{m}$$

- X — 供试品中待测物的含量, mg/kg;
 Cs — 混合对照品溶液中被测物的浓度, $\mu\text{g/mL}$;
 A — 供试品溶液中被测物的色谱峰面积;
 As — 混合对照品溶液中被测物的色谱峰面积;
 V — 供试品最终定容体积, mL;
 m — 供试品的称样量, g;
 D — 稀释倍数

附录

表1 黄曲霉毒素化合物信息

No.	化合物名称	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	黄曲霉毒素 B ₁	Aflatoxin B ₁	1162-65-8	31.930
2	黄曲霉毒素 B ₂	Aflatoxin B ₂	7220-81-7	24.413
3	黄曲霉毒素 G ₁	Aflatoxin G ₁	1165-39-5	22.789
4	黄曲霉毒素 G ₂	Aflatoxin G ₂	7241-98-7	17.713

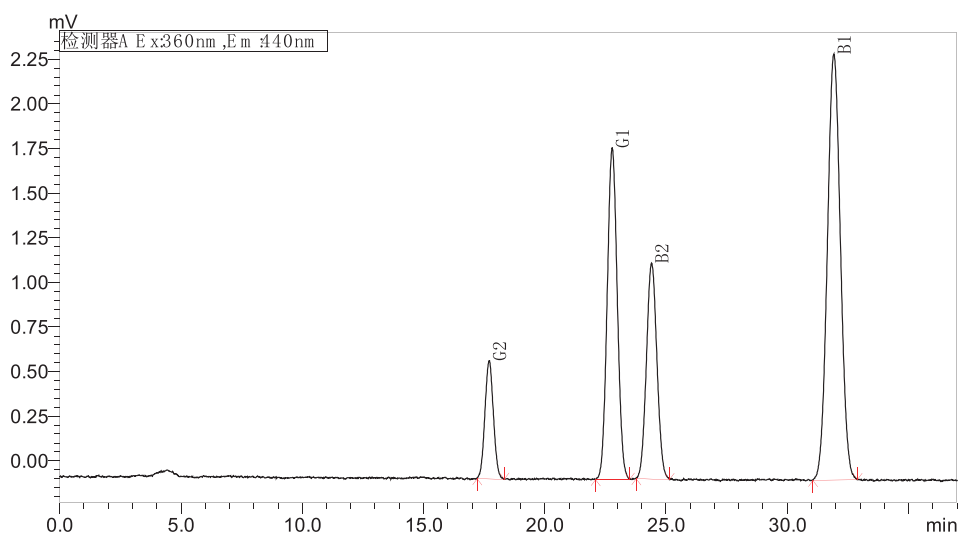


图1 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 混合对照品溶液色谱图
 (AFT B₁ 和 AFT G₁ 浓度 0.5 ng/mL; AFT B₂ 和 AFT G₂ 浓度 0.15 ng/mL)

岛津应用云

