



中华人民共和国国家标准

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

Determination aflatoxins content in food—
Cleanup by immunoaffinity chromatography and determination by
high-performance liquid chromatography and fluorometer

2003-02-21 发布

2003-08-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准由北京市质量技术监督局提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：北京市产品质量监督检验所、青岛出入境检验检疫局、国家标准物质研究中心。

本标准主要起草人：王晶、张鹏、张艺兵、邵明武。

本标准首次发布。

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

1 范围

本标准规定了免疫亲和层析净化—高效液相色谱法和免疫亲和层析净化—荧光光度法测定食品中黄曲霉毒素的条件和详细分析步骤。

本标准适用于玉米、花生及其制品(花生酱、花生仁、花生米)、大米、小麦、植物油、酱油、食醋等食品中黄曲霉毒素的测定。

样品中黄曲霉毒素的检出限:免疫亲和层析净化—高效液相色谱法测定黄曲霉毒素 B₁ 以及黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 总量检出限为 1 μg/kg。免疫亲和层析净化—荧光光度法测定黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 总量检出限为 1 μg/kg, 酱油样品中检出限为 2.5 μg/kg。

2 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

2.1 方法提要

试样经过甲醇-水提取, 提取液经过滤、稀释后, 滤液经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和层析净化, 此抗体对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 具有专一性, 黄曲霉毒素交联在层析介质中的抗体上。用水或吐温-20/PBS 将免疫亲和柱上杂质除去, 以甲醇通过免疫亲和和层析柱洗脱, 洗脱液通过带荧光检测器的高效液相色谱仪柱后碘溶液衍生测定黄曲霉毒素的含量。

2.2 试剂和溶液

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂、重蒸馏水。

- 2.2.1 甲醇(CH₃OH); 色谱纯。
- 2.2.2 甲醇-水(7+3); 取 70 mL 甲醇加 30 mL 水。
- 2.2.3 甲醇-水(8+2); 取 80 mL 甲醇加 20 mL 水。
- 2.2.4 甲醇-水(45+55); 取 45 mL 甲醇加 55 mL 水。
- 2.2.5 苯; 色谱纯。
- 2.2.6 乙腈; 色谱纯。
- 2.2.7 苯-乙腈(98+2); 取 2 mL 乙腈加 98 mL 苯。
- 2.2.8 氯化钠(NaCl)。
- 2.2.9 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。
- 2.2.10 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。
- 2.2.11 氯化钾(KCl)。
- 2.2.12 PBS 缓冲溶液: 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 990 mL 纯水溶解, 然后用浓盐酸调节 pH 值至 7.0, 最后用纯水稀释至 1 000 mL。
- 2.2.13 吐温-20/PBS 溶液(0.1%); 取 1 mL 吐温-20, 加入 PBS 缓冲溶液并定容至 1 000 mL。
- 2.2.14 pH7.0 磷酸盐缓冲溶液: 取 25.0 mL 0.2 mol/L 的磷酸二氢钾溶液与 29.1 mL 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液混匀后, 稀释到 100 mL。

2.2.15 黄曲霉毒素标准品(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂):纯度≥99%。

2.2.16 黄曲霉毒素标准储备溶液:用苯-乙腈(98+2)溶液分别配制 0.100 mg/mL 的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准储备液,保存于 4℃ 备用。

2.2.17 黄曲霉毒素混合标准工作液:准确移取适量的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准储备液,用苯-乙腈(98+2)溶液稀释成混合标准工作液。

2.2.18 柱后衍生溶液(0.05%碘溶液):称取 0.1 g 碘,溶解于 20 mL 甲醇后,加纯水定容至 200 mL,以 0.45 μm 的尼龙滤膜过滤,4℃ 避光保存。

2.3 仪器和设备

实验室常规仪器、设备及下列各项。

2.3.1 高速均质器:18 000 r/min~22 000 r/min。

2.3.2 黄曲霉毒素免疫亲和柱。

2.3.3 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm,孔径 1.5 μm。

2.3.4 玻璃注射器:10 mL,20 mL。

2.3.5 玻璃试管:直径 12 mm,长 75 mm,无荧光特性。

2.3.6 高效液相色谱仪:具有 360 nm 激发波长和大于 420 nm 发射波长的荧光检测器。

2.3.7 空气压力泵。

2.3.8 微量注射器:100 μL。

2.3.9 色谱柱:C₁₈柱(柱长 150 mm,内径 4.6 mm,填料直径 5 μm)。

2.4 分析步骤

2.4.1 提取

2.4.1.1 大米、玉米、小麦、花生及其制品:准确称取经过磨细(粒度小于 2 mm)的试样 25.0 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 5.0 g 氯化钠及甲醇-水(7+3)至 125.0 mL(V₁),以均质器高速搅拌提取 2 min。定量滤纸过滤,准确移取 15.0 mL(V₂)滤液并加入 30.0 mL(V₃)水稀释,用玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,至滤液澄清,备用。

2.4.1.2 植物油脂:准确称取试样 25.0 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 5.0 g 氯化钠及加入甲醇-水(7+3)至 125.0 mL(V₁),以均质器高速搅拌提取 2 min。定量滤纸过滤,准确移取 15.0 mL(V₂)滤液并加入 30.0 mL(V₃)水稀释,用玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,至滤液澄清,备用。

2.4.1.3 酱油:准确称取试样 50.0 g 于 250.0 mL 具塞锥形瓶中,加入 2.5 g 氯化钠及加入甲醇-水(8+2)至 100.0 mL(V₁),以均质器高速搅拌提取 1 min。定量滤纸过滤,准确移取 10.0 mL(V₂)滤液并加入 40.0 mL(V₃)水稀释,用玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,至滤液澄清,备用。

2.4.1.4 食醋:准确称取 5.0 g 样品,加入 1.0 g 氯化钠,以 pH7.0 磷酸盐缓冲液稀释至 25.0 mL(V₁),混匀,定量滤纸过滤。取 10.0 mL(V₂)滤液加入 10.0 mL(V₃)缓冲液,混匀,以玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,至滤液澄清,备用。

2.4.2 净化

2.4.2.1 大米、玉米、小麦、花生及其制品、植物油脂:将免疫亲和柱连接于 20.0 mL 玻璃注射器下。准确移取 15.0 mL(V₄)样品提取液注入玻璃注射器中,将空气压力泵与玻璃注射器连接,调节压力使溶液以约 6 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱,直至 2 mL~3 mL 空气通过柱体。以 10 mL 水淋洗柱子两次,弃去全部流出液,并使 2 mL~3 mL 空气通过柱体。准确加入 1.0 mL(V)色谱级甲醇洗脱,流速为 1 mL/min~2 mL/min,收集全部洗脱液于玻璃试管中,供检测用。

2.4.2.2 酱油:将免疫亲和柱连接于 10.0 mL 玻璃注射器下。准确移取 10.0 mL(V₄)酱油样品提取液注入玻璃注射器中,将空气压力泵与玻璃注射器连接,调节压力使溶液以约 6 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱。用 10 mL 0.1%的吐温-20/PBS 清洗,再以 10 mL 水清洗柱子两次,弃去全部流出液,并使 2 mL~3 mL 空气通过柱体。准确加入 1.0 mL(V)色谱级甲醇洗脱,流速为 1 mL/min~2 mL/min,

收集全部洗脱液于玻璃试管中,供检测用。

2.4.2.3 食醋:将免疫亲和柱连接于10.0 mL玻璃注射器下。准确移取10.0 mL(V_1)食醋样品提取液注入玻璃注射器中,将空气压力泵与玻璃注射器连接,调节压力使溶液以约6 mL/min流速缓慢通过免疫亲和柱,用10 mL 0.1%的吐温-20/PBS溶液清洗,再以10 mL水清洗柱子两次,弃去全部流出液,并使2 mL~3 mL空气通过柱体。准确加入1.0 mL(V)色谱级甲醇洗脱,流速为1 mL/min~2 mL/min,收集全部洗脱液于玻璃试管中,供检测用。

2.4.3 测定

2.4.3.1 高效液相色谱条件

流动相:甲醇-水(45+55)

流速:0.8 mL/min

柱后衍生化系统

衍生溶液:0.05%碘溶液

衍生溶液流速:0.2 mL/min

反应管温度:70℃

反应时间:1 min

2.4.3.2 定量

用进样器吸取100 μ L 黄曲霉毒素混合标准工作液(2.2.17)注入高效液相色谱仪,在上述色谱条件下测定标准溶液的响应值(峰高或峰面积),得到黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 标准溶液高效液相色谱图。参考谱图见图1。

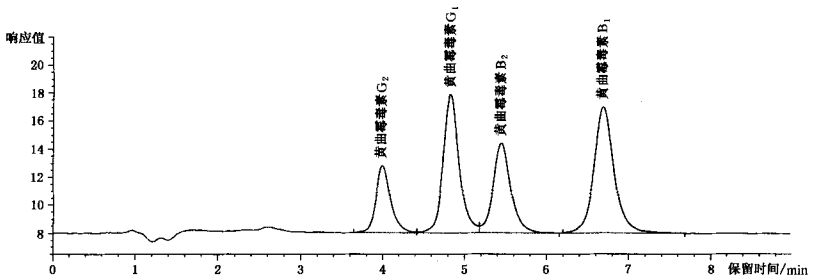


图1 黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的标准谱图

取样品洗脱液1.0 mL加入重蒸馏水定容至2.0 mL,用进样器吸取100 μ L注入高效液相色谱仪,在上述色谱条件下测定试样的响应值(峰高或峰面积)。经过与黄曲霉毒素标准溶液谱图比较响应值得到试样中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 和 G_2 的浓度 c 。

2.4.4 空白试验

用水代替试样,按2.4.1~2.4.3步骤做空白试验。

2.4.5 结果计算

样品中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 或 G_2 的含量(X_1)以微克每千克表示,按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{(c_1 - c_0) \cdot V}{W} \dots\dots\dots (1)$$

其中：

$$W = \frac{m}{V_1} \times \frac{V_2}{(V_2 + V_3)} \times V_4 \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X_1 ——样品中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 或 G_2 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

c_1 ——试样中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 或 G_2 的含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$)；

c_0 ——空白试验黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 或 G_2 的含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$)；

V ——最终甲醇洗脱液体积,单位为毫升(mL)；

W ——最终净化洗脱液所含的试样质量,单位为克(g)；

m ——试样称取的质量的数值,单位为克(g)；

V_1 ——样品和提取液总体积,单位为毫升(mL)；

V_2 ——稀释用样品滤液体积,单位为毫升(mL)；

V_3 ——稀释液体积,单位为毫升(mL)；

V_4 ——通过亲和柱的样品提取液体积,单位为毫升(mL)。

黄曲霉毒素总量为 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的浓度之和,即 $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ 。

计算结果表示到小数点后两位。

3 免疫亲和层析净化荧光光度法

3.1 方法提要

试样经过甲醇-水提取,提取液经过滤、稀释后,滤液经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和层析净化,此抗体对黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 具有专一性,黄曲霉毒素交联在层析介质中的抗体上。用水将免疫亲和柱上杂质除去,以甲醇通过免疫亲和层析柱洗脱,加入溴溶液衍生,以提高测定灵敏度。洗脱液通过荧光光度计测定黄曲霉毒素($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$)总量。

3.2 试剂和溶液

除非另有规定,仅使用分析纯试剂、重蒸馏水。

3.2.1 甲醇(CH_3OH)；色谱纯。

3.2.2 甲醇-水(7+3)；取 70 mL 甲醇加 30 mL 水。

3.2.3 甲醇-水(8+2)；取 80 mL 甲醇加 20 mL 水。

3.2.4 氯化钠(NaCl)。

3.2.5 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)。

3.2.6 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

3.2.7 氯化钾(KCl)。

3.2.8 溴溶液储备液(0.01%)；称取适量溴,溶于水,配成 0.01% 的储备液,4℃ 避光保存。

3.2.9 溴溶液工作液(0.002%)；取 10 mL 0.01% 的溴溶液加入 40 mL 水混匀,于棕色瓶中保存备用。需每次使用前配制。

3.2.10 二水硫酸奎宁($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

3.2.11 硫酸溶液(0.05 mol/L)；取 2.8 mL 浓硫酸,缓慢加入适量水中,冷却后定容至 1 000 mL。

3.2.12 荧光光度计校准溶液；称取 3.40 g 硫酸奎宁($\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)用 0.05 mol/L 硫酸溶液稀释至 100 mL,此溶液荧光光度计读数相当于 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 黄曲霉毒素标准溶液。

3.3 仪器和设备

实验室常规仪器、设备及下列各项。

3.3.1 荧光光度计。

3.3.2 高速均质器：18 000 r/min~22 000 r/min。

- 3.3.3 黄曲霉毒素免疫亲和柱。
 3.3.4 玻璃纤维滤纸;直径 11 cm,孔径 1.5 μm 。
 3.3.5 玻璃注射器;10 mL,20 mL。
 3.3.6 玻璃试管;直径 12 mm,长 75 mm,无荧光特性。
 3.3.7 空气压力泵。

3.4 分析步骤

- 3.4.1 提取
同 2.4.1。
 3.4.2 净化
同 2.4.2。
 3.4.3 测定

3.4.3.1 荧光光度计校准

在激发波长 360 nm,发射波长 450 nm 条件下,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为空白,调节荧光光度计的读数值为 0.0 $\mu\text{g/L}$;以荧光光度计校准溶液(3.2.12)调节荧光光度计的读数值为 20.0 $\mu\text{g/L}$ 。

3.4.3.2 样液测定

取上述净化后的甲醇洗脱液加入 1.0 mL 0.002% 溴溶液,混匀,静置 1 min,按 3.4.3.1 条件进行操作,于荧光光度计中读取样液中黄曲霉毒素($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$)的浓度 c ($\mu\text{g/L}$)。

3.4.4 空白试验

用水代替试样,按 3.4.1~3.4.3 步骤做空白试验。

3.4.5 结果计算

样品中黄曲霉毒素($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$)的含量(X_2)以微克每千克表示,按式(3)计算:

$$X_2 = \frac{(c_2 - c_0) \cdot V}{W} \dots\dots\dots (3)$$

其中:

$$W = \frac{m}{V_1} \times \frac{V_2}{(V_2 + V_3)} \times V_4 \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- X_2 ——样品中黄曲霉毒素($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$)含量,单位为微克每千克($\mu\text{g/kg}$);
 c_2 ——试样中黄曲霉毒素($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$)的含量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 c_0 ——空白试验黄曲霉毒素($B_1 + B_2 + G_1 + G_2$)的含量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 V ——最终甲醇洗脱液体积,单位为毫升(mL);
 W ——最终净化洗脱液所含的试样质量,单位为克(g);
 m ——试样称取的质量的数值,单位为克(g);
 V_1 ——样品和提取液总体积,单位为毫升(mL);
 V_2 ——稀释用样品滤液体积,单位为毫升(mL);
 V_3 ——稀释液体积,单位为毫升(mL);
 V_4 ——通过亲和柱的样品提取液体积,单位为毫升(mL)。
 计算结果表示到小数点后一位。