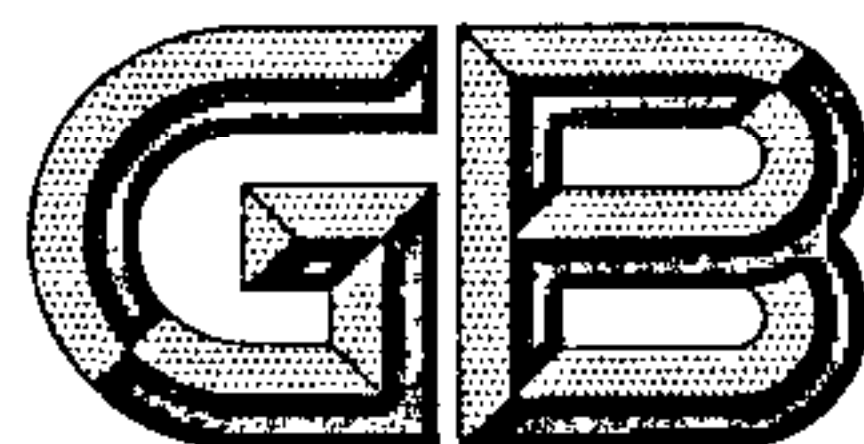


ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.22—2003
代替 GB/T 5009.22—1996

食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

Determination of aflatoxin B₁ in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5009.22—1996《食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.22—1996 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定》；

——按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由中国预防医学科学院营养及食品卫生研究所、中华人民共和国青岛进出口商品检验局负责起草。

本标准第二法由卫生部食品卫生监督检验所、北京市营养源研究所负责起草。

本标准第二法主要起草人：计融、路戈、罗雪云、张镝、王健伟。

本标准于 1985 年首次发布，于 1996 年第一次修订，本次为第二次修订。

食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

1 范围

本标准规定了粮食、花生及其制品、薯类、豆类、发酵食品及酒类等各种食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法。

本标准适用于粮食、花生及其制品、薯类、豆类、发酵食品及酒类等各种食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定。

在第一法中，薄层板上黄曲霉毒素 B₁ 的最低检出量为 0.000 4 μg，检出限为 5 μg/kg。第二法对黄曲霉毒素 B₁ 的检出限为 0.01 μg/kg。

第一法

2 原理

试样中黄曲霉毒素 B₁ 经提取、浓缩、薄层分离后，在波长 365 nm 紫外光下产生蓝紫色荧光，根据其在薄层上显示荧光的最低检出量来测定含量。

3 试剂

- 3.1 三氯甲烷。
- 3.2 正己烷或石油醚(沸程 30℃~60℃或 60℃~90℃)。
- 3.3 甲醇。
- 3.4 苯。
- 3.5 乙腈。
- 3.6 无水乙醚或乙醚经无水硫酸钠脱水。
- 3.7 丙酮。
- 3.8 硅胶 G:薄层色谱用。
- 3.9 三氟乙酸。
- 3.10 无水硫酸钠。
- 3.11 氯化钠。
- 3.12 苯-乙腈混合液:量取 98 mL 苯,加 2 mL 乙腈,混匀。
- 3.13 甲醇水溶液:55+45。
- 3.14 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液

3.14.1 仪器校正:测定重铬酸钾溶液的摩尔消光系数,以求出使用仪器的校正因素。准确称取 25 mg 经干燥的重铬酸钾(基准级),用硫酸(0.5+1 000)溶解后并准确稀释至 200 mL,相当于 $[c(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7)=0.000 4 \text{ mol/L}]$ 。再吸取 25 mL 此稀释液于 50 mL 容量瓶中,加硫酸(0.5+1 000)稀释至刻度,相当于 0.000 2 mol/L 溶液。再吸取 25 mL 此稀释液于 50 mL 容量瓶中,加硫酸(0.5+1 000)稀释至刻度,相当于 0.000 1 mol/L 溶液。用 1 cm 石英杯,在最大吸收峰的波长(接近 350 nm 处)用硫酸(0.5+1 000)作空白,测得以上三种不同浓度的摩尔溶液的吸光度,并按式(1)计算出以上三种浓度的摩尔消光系数的平均值。

$$E_1 = \frac{A}{c} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- E_1 ——重铬酸钾溶液的摩尔消光系数;
- A ——测得重铬酸钾溶液的吸光度;
- c ——重铬酸钾溶液的摩尔浓度。

再以此平均值与重铬酸钾的摩尔消光系数值 3 160 比较,即求出使用仪器的校正因素,按式(2)进行计算。

$$f = \frac{3\ 160}{E} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- f ——使用仪器的校正因素;
- E ——测得的重铬酸钾摩尔消光系数平均值。

若 f 大于 0.95 或小于 1.05,则使用仪器的校正因素可略而不计。

3.14.2 黄曲霉毒素 B_1 标准溶液的制备:准确称取 1 mg~1.2 mg 黄曲霉毒素 B_1 标准品,先加入 2 mL 乙腈溶解后,再用苯稀释至 100 mL,避光,置于 4℃ 冰箱保存。该标准溶液约为 10 μ g/mL。用紫外分光光度计测此标准溶液的最大吸收峰的波长及该波长的吸光度值。

结果计算:黄曲霉毒素 B_1 标准溶液的浓度按式(3)进行计算。

$$X = \frac{A \times M \times 1\ 000 \times f}{E_2} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- X ——黄曲霉毒素 B_1 标准溶液的浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);
- A ——测得的吸光度值;
- f ——使用仪器的校正因素;
- M ——黄曲霉毒素 B_1 的分子量 312;
- E_2 ——黄曲霉毒素 B_1 在苯-乙腈混合液中的摩尔消光系数 19 800。

根据计算,用苯-乙腈混合液调到标准溶液浓度恰为 10.0 μ g/mL,并用分光光度计核对其浓度。

3.14.3 纯度的测定:取 5 μ L 10 μ g/mL 黄曲霉毒素 B_1 标准溶液,滴加于涂层厚度 0.25 mm 的硅胶 G 薄层板上,用甲醇-三氯甲烷(4+96)与丙酮-三氯甲烷(8+92)展开剂展开,在紫外光灯下观察荧光的产生,应符合以下条件:

- 3.14.3.1 在展开后,只有单一的荧光点,无其他杂质荧光点。
- 3.14.3.2 原点上没有任何残留的荧光物质。

3.15 黄曲霉毒素 B_1 标准使用液:准确吸取 1 mL 标准溶液(10 μ g/mL)于 10 mL 容量瓶中,加苯-乙腈混合液至刻度,混匀。此溶液每毫升相当于 1.0 μ g 黄曲霉毒素 B_1 。吸取 1.0 mL 此稀释液,置于 5 mL 容量瓶中,加苯-乙腈混合液稀释至刻度,此溶液每毫升相当于 0.2 μ g 黄曲霉毒素 B_1 。再吸取黄曲霉毒素 B_1 标准溶液(0.2 μ g/mL)1.0 mL 置于 5 mL 容量瓶中,加苯-乙腈混合液稀释至刻度。此溶液每毫升相当于 0.04 μ g 黄曲霉毒素 B_1 。

3.16 次氯酸钠溶液(消毒用):取 100 g 漂白粉,加入 500 mL 水,搅拌均匀。另将 80 g 工业用碳酸钠($Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$)溶于 500 mL 温水中,再将两液混合、搅拌,澄清后过滤。此滤液含次氯酸浓度约为 25 g/L。若用漂粉精制备,则碳酸钠的量可以加倍。所得溶液的浓度约为 50 g/L。污染的玻璃仪器用 10 g/L 次氯酸钠溶液浸泡半天或用 50 g/L 次氯酸钠溶液浸泡片刻后,即可达到去毒效果。

4 仪器

4.1 小型粉碎机。

- 4.2 样筛。
- 4.3 电动振荡器。
- 4.4 全玻璃浓缩器。
- 4.5 玻璃板:5 cm×20 cm。
- 4.6 薄层板涂布器。
- 4.7 展开槽:内长 25 cm、宽 6 cm、高 4 cm。
- 4.8 紫外光灯:100 W~125 W,带有波长 365 nm 滤光片。
- 4.9 微量注射器或血色素吸管。

5 分析步骤

5.1 取样

试样中污染黄曲霉毒素高的霉粒一粒可以左右测定结果,而且有毒霉粒的比例小,同时分布不均匀。为避免取样带来的误差,应大量取样,并将该大量试样粉碎,混合均匀,才有可能得到确能代表一批试样的相对可靠的结果,因此采样应注意以下几点。

5.1.1 根据规定采取有代表性试样。

5.1.2 对局部发霉变质的试样检验时,应单独取样。

5.1.3 每份分析测定用的试样应从大样经粗碎与连续多次用四分法缩减至 0.5 kg~1 kg,然后全部粉碎。粮食试样全部通过 20 目筛,混匀。花生试样全部通过 10 目筛,混匀。或将好、坏分别测定,再计算其含量。花生油和花生酱等试样不需制备,但取样时应搅拌均匀。必要时,每批试样可采取 3 份大样作试样制备及分析测定用,以观察所采试样是否具有一定的代表性。

5.2 提取

5.2.1 玉米、大米、麦类、面粉、薯干、豆类、花生、花生酱等

5.2.1.1 甲法:称取 20.00 g 粉碎过筛试样(面粉、花生酱不需粉碎),置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加 30 mL 正己烷或石油醚和 100 mL 甲醇水溶液,在瓶塞上涂上一层水,盖严防漏。振荡 30 min,静置片刻,以叠成折叠式的快速定性滤纸过滤于分液漏斗中,待下层甲醇水溶液分清后,放出甲醇水溶液于另一具塞锥形瓶内。取 20.00 mL 甲醇水溶液(相当于 4 g 试样)置于另一 125 mL 分液漏斗中,加 20 mL 三氯甲烷,振摇 2 min,静置分层,如出现乳化现象可滴加甲醇促使分层。放出三氯甲烷层,经盛有约 10 g 预先用三氯甲烷湿润的无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于 50 mL 蒸发皿中,再加 5 mL 三氯甲烷于分液漏斗中,重复振摇提取,三氯甲烷层一并滤于蒸发皿中,最后用少量三氯甲烷洗过滤器,洗液并于蒸发皿中。将蒸发皿放在通风柜于 65℃ 水浴上通风挥干,然后放在冰盒上冷却 2 min~3 min 后,准确加入 1 mL 苯-乙腈混合液(或将三氯甲烷用浓缩蒸馏器减压吹气蒸干后,准确加入 1 mL 苯-乙腈混合液)。用带橡皮头的滴管的管尖将残渣充分混合,若有苯的结晶析出,将蒸发皿从冰盒上取出,继续溶解、混合,晶体即消失,再用此滴管吸取上清液转移于 2 mL 具塞试管中。

5.2.1.2 乙法(限于玉米、大米、小麦及其制品):称取 20.00 g 粉碎过筛试样于 250 mL 具塞锥形瓶中,用滴管滴加约 6 mL 水,使试样湿润,准确加入 60 mL 三氯甲烷,振荡 30 min,加 12 g 无水硫酸钠,振摇后,静置 30 min,用叠成折叠式的快速定性滤纸过滤于 100 mL 具塞锥形瓶中。取 12 mL 滤液(相当 4 g 试样)于蒸发皿中,在 65℃ 水浴上通风挥干,准确加入 1 mL 苯-乙腈混合液,以下按 5.2.1.1 自“用带橡皮头的滴管的管尖将残渣充分混合……”起依法操作。

5.2.2 花生油、香油、菜油等

称取 4.00 g 试样置于小烧杯中,用 20 mL 正己烷或石油醚将试样移于 125 mL 分液漏斗中。用 20 mL 甲醇水溶液分次洗烧杯,洗液一并移入分液漏斗中,振摇 2 min,静置分层后,将下层甲醇水溶液移入第二个分液漏斗中,再用 5 mL 甲醇水溶液重复振摇提取一次,提取液一并移入第二个分液漏斗中,在第二个分液漏斗中加入 20 mL 三氯甲烷,以下按 5.2.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法

操作。

5.2.3 酱油、醋

称取 10.00 g 试样于小烧杯中,为防止提取时乳化,加 0.4 g 氯化钠,移入分液漏斗中,用 15 mL 三氯甲烷分次洗涤烧杯,洗液并入分液漏斗中。以下按 5.2.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作,最后加入 2.5 mL 苯-乙腈混合液,此溶液每毫升相当于 4 g 试样。

或称取 10.00 g 试样,置于分液漏斗中,再加 12 mL 甲醇(以酱油体积代替水,故甲醇与水的体积比仍约为 55+45),用 20 mL 三氯甲烷提取,以下按 5.2.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作。最后加入 2.5 mL 苯-乙腈混合液。此溶液每毫升相当于 4 g 试样。

5.2.4 干酱类(包括豆豉、腐乳制品)

称取 20.00 g 研磨均匀的试样,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 mL 正己烷或石油醚与 50 mL 甲醇水溶液。振荡 30 min,静置片刻,以叠成折叠式快速定性滤纸过滤,滤液静置分层后,取 24 mL 甲醇水层(相当 8 g 试样,其中包括 8 g 干酱类本身约含有 4 mL 水的体积在内)置于分液漏斗中,加入 20 mL 三氯甲烷,以下按 5.2.1.1 自“振摇 2 min,静置分层……”起依法操作。最后加入 2 mL 苯-乙腈混合液。此溶液每毫升相当于 4 g 试样。

5.2.5 发酵酒类

同 5.2.3 处理方法,但不加氯化钠。

5.3 测定

5.3.1 单向展开法

5.3.1.1 薄层板的制备:称取约 3 g 硅胶 G,加相当于硅胶量 2 倍~3 倍左右的水,用力研磨 1 min~2 min 至成糊状后立即倒于涂布器内,推成 5 cm×20 cm,厚度约 0.25 mm 的薄层板三块。在空气中干燥约 15 min 后,在 100℃ 活化 2 h,取出,放干燥器中保存。一般可保存 2 天~3 天,若放置时间较长,可再活化后使用。

5.3.1.2 点样:将薄层板边缘附着的吸附剂刮净,在距薄层板下端 3 cm 的基线上用微量注射器或血色素吸管滴加样液。一块板可滴加 4 个点,点距边缘和点间距约为 1 cm,点直径约 3 mm。在同一块板上滴加点的大小应一致,滴加时可用吹风机用冷风边吹边加。滴加样式如下:

第一点:10 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液(0.04 μg/mL)。

第二点:20 μL 样液。

第三点:20 μL 样液+10 μL 0.04 μg/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液。

第四点:20 μL 样液+10 μL 0.2 μg/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液。

5.3.1.3 展开与观察:在展开槽内加 10 mL 无水乙醚,预展 12 cm,取出挥干。再于另一展开槽内加 10 mL 丙酮-三氯甲烷(8+92),展开 10 cm~12 cm,取出。在紫外光下观察结果,方法如下。

5.3.1.3.1 由于样液点上加滴黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液,可使黄曲霉毒素 B₁ 标准点与样液中的黄曲霉毒素 B₁ 荧光点重叠。如样液为阴性,薄层板上的第三点中黄曲霉毒素 B₁ 为 0.000 4 μg,可用作检查在样液内黄曲霉毒素 B₁ 最低检出量是否正常出现;如为阳性,则起定性作用。薄层板上的第四点中黄曲霉毒素 B₁ 为 0.002 μg,主要起定位作用。

5.3.1.3.2 若第二点在与黄曲霉毒素 B₁ 标准点的相应位置上无蓝紫色荧光点,表示试样中黄曲霉毒素 B₁ 含量在 5 μg/kg 以下;如在相应位置上有蓝紫色荧光点,则需进行确证试验。

5.3.1.4 确证试验:为了证实薄层板上样液荧光系由黄曲霉毒素 B₁ 产生的,加滴三氟乙酸,产生黄曲霉毒素 B₁ 的衍生物,展开后此衍生物的比移值约在 0.1 左右。于薄层板左边依次滴加两个点。

第一点:0.04 μg/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液 10 μL。

第二点:20 μL 样液。

于以上两点各加一小滴三氟乙酸盖于其上,反应 5 min 后,用吹风机吹热风 2 min 后,使热风吹到薄层板上的温度不高于 40℃,再于薄层板上滴加以下两个点。

第三点:0.04 μg/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液 10 μL。

第四点:20 μL 样液。

再展开(同 5.3.1.3),在紫外光灯下观察样液是否产生与黄曲霉毒素 B₁ 标准点相同的衍生物。未加三氟乙酸的三、四两点,可依次作为样液与标准的衍生物空白对照。

5.3.1.5 稀释定量:样液中的黄曲霉毒素 B₁ 荧光点的荧光强度如与黄曲霉毒素 B₁ 标准点的最低检出量(0.000 4 μg)的荧光强度一致,则试样中黄曲霉毒素 B₁ 含量即为 5 μg/kg。如样液中荧光强度比最低检出量强,则根据其强度估计减少滴加微升数或将样液稀释后再滴加不同微升数,直至样液点的荧光强度与最低检出量的荧光强度一致为止。滴加式样如下:

第一点:10 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液(0.04 μg/mL)。

第二点:根据情况滴加 10 μL 样液。

第三点:根据情况滴加 15 μL 样液。

第四点:根据情况滴加 20 μL 样液。

5.3.1.6 结果计算:试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量按式(4)进行计算。

$$X = 0.000\ 4 \times \frac{V_1 \times D}{V_2} \times \frac{1\ 000}{m} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

X——试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量,单位为微克每千克(μg/kg);

V₁——加入苯-乙腈混合液的体积,单位为毫升(mL);

V₂——出现最低荧光时滴加样液的体积,单位为毫升(mL);

D——样液的总稀释倍数;

m——加入苯-乙腈混合液溶解时相当试样的质量,单位为克(g);

0.000 4——黄曲霉毒素 B₁ 的最低检出量,单位为微克(μg)。

结果表示到测定值的整数位。

5.3.2 双向展开法

如用单向展开法展开后,薄层色谱由于杂质干扰掩盖了黄曲霉毒素 B₁ 的荧光强度,需采用双向展开法。薄层板先用无水乙醚作横向展开,将干扰的杂质展至样液点的一边而黄曲霉毒素 B₁ 不动,然后再用丙酮-三氯甲烷(8+92)作纵向展开,试样在黄曲霉毒素 B₁ 相应处的杂质底色大量减少,因而提高了方法灵敏度。如用双向展开中滴加两点法展开仍有杂质干扰时,则可改用滴加一点法。

5.3.2.1 滴加两点法

5.3.2.1.1 点样

取薄层板三块,在距下端 3 cm 基线上滴加黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液与样液。即在三块板的距左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 10 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液(0.04 μg/mL),在距左边缘 2.8 cm~3 cm 处各滴加 20 μL 样液,然后在第二块板的样液点上加滴 10 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液(0.04 μg/mL),在第三块板的样液点上加滴 10 μL 0.2 μg/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液。

5.3.2.1.2 展开

5.3.2.1.2.1 横向展开:在展开槽内的长边置一玻璃支架,加 10 mL 无水乙醇,将上述点好的薄层板靠标准点的长边置于展开槽内展开,展至板端后,取出挥干,或根据情况需要时可再重复展开 1 次~2 次。

5.3.2.1.2.2 纵向展开:挥干的薄层板以丙酮-三氯甲烷(8+92)展开至 10 cm~12 cm 为止。丙酮与三氯甲烷的比例根据不同条件自行调节。

5.3.2.1.3 观察及评定结果

5.3.2.1.3.1 在紫外光灯下观察第一、二板,若第二板的第二点在黄曲霉毒素 B₁ 标准点的相应处出现最低检出量,而第一板在与第二板的相同位置上未出现荧光点,则试样中黄曲霉毒素 B₁ 含量

在5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。

5.3.2.1.3.2 若第一板在与第二板的相同位置上出现荧光点,则将第一板与第三板比较,看第三板上第二点与第一板上第二点的相同位置上的荧光点是否与黄曲霉毒素 B_1 标准点重叠,如果重叠,再进行确证试验。在具体测定中,第一、二、三板可以同时做,也可按照顺序做。如按顺序做,当在第一板出现阴性时,第三板可以省略,如第一板为阳性,则第二板可以省略,直接作第三板。

5.3.2.1.4 确证试验

另取薄层板两块,于第四、第五两板距左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 10 μL 黄曲霉毒素 B_1 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 1 小滴三氟乙酸;在距左边缘 2.8 cm~3 cm 处,于第四板滴加 20 μL 样液及 1 小滴三氟乙酸;于第五板滴加 20 μL 样液、10 μL 黄曲霉毒素 B_1 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及 1 小滴三氟乙酸,反应 5 min 后,用吹风机吹热风 2 min,使热风吹到薄层板上的温度不高于 40 $^{\circ}\text{C}$ 。再用双向展开法展开后,观察样液是否产生与黄曲霉毒素 B_1 标准点重叠的衍生物。观察时,可将第一板作为样液的衍生物空白板。如样液黄曲霉毒素 B_1 含量高时,则将样液稀释后,按 5.3.1.4 做确证试验。

5.3.2.1.5 稀释定量

如样液黄曲霉毒素 B_1 含量高时,按 5.3.1.5 稀释定量操作。如黄曲霉毒素 B_1 含量低,稀释倍数小,在定量的纵向展开板上仍有杂质干扰,影响结果的判断,可将样液再做双向展开法测定,以确定含量。

5.3.2.1.6 结果计算

同 5.3.1.6。

5.3.2.2 滴加一点法

5.3.2.2.1 点样:取薄层板三块,在距下端 3cm 基线上滴加黄曲霉毒素 B_1 标准使用液与样液。即在三块板距左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 20 μL 样液,在第二板的点上加滴 10 μL 黄曲霉毒素 B_1 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$),在第三板的点上加滴 10 μL 黄曲霉毒素 B_1 标准溶液(0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

5.3.2.2.2 展开:同 5.3.2.1.2 的横向展开与纵向展开。

5.3.2.2.3 观察及评定结果:在紫外光灯下观察第一、二板,如第二板出现最低检出量的黄曲霉毒素 B_1 标准点,而第一板与其相同位置上未出现荧光点,试样中黄曲霉毒素 B_1 含量在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。如第一板在与第二板黄曲霉毒素 B_1 相同位置上出现荧光点,则将第一板与第三板比较,看第三板上与第一板相同位置的荧光点是否与黄曲霉毒素 B_1 标准点重叠,如果重叠再进行以下确证试验。

5.3.2.2.4 确证试验:另取两板,于距左边缘 0.8 cm~1 cm 处,第四板滴加 20 μL 样液、1 滴三氟乙酸;第五板滴加 20 μL 样液、10 μL 0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄曲霉毒素 B_1 标准使用液及 1 滴三氟乙酸。产生衍生物及展开方法同 5.3.2.1。再将以上二板在紫外光灯下观察,以确定样液点是否产生与黄曲霉毒素 B_1 标准点重叠的衍生物,观察时可将第一板作为样液的衍生物空白板。经过以上确证试验定为阳性后,再进行稀释定量,如含黄曲霉毒素 B_1 低,不需稀释或稀释倍数小,杂质荧光仍有严重干扰,可根据样液中黄曲霉毒素 B_1 荧光的强弱,直接用双向展开法定量。

5.3.2.2.5 结果计算:同 5.3.1.6。

第二法

6 原理

试样中的黄曲霉毒素 B_1 经提取、脱脂、浓缩后与定量特异性抗体反应,多余的游离抗体则与酶标板内的包被抗原结合,加入酶标记物和底物后显色,与标准比较测定含量。

7 试剂

7.1 抗黄曲霉毒素 B_1 单克隆抗体,由卫生部食品卫生监督检验所进行质量控制。

7.2 人工抗原: AFB₁-牛血清白蛋白结合物。

7.3 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液: 用甲醇将黄曲霉毒素 B₁ 配制成 1 mg/mL 溶液, 再用甲醇-PBS 溶液(20+80) 稀释至约 10 μg/mL, 紫外分光光度计测定此溶液最大吸收峰的光密度值, 代入式(5) 计算:

$$X = \frac{A \times M \times 1\,000 \times f}{E} \dots\dots\dots(5)$$

式中:

X ——该溶液中黄曲霉毒素 B₁ 的浓度, 单位为微克每毫升(μg/mL);

A ——测得的光密度值;

M ——黄曲霉毒素 B₁ 的分子量, 312;

E ——摩尔消光系数, 21 800;

f ——使用仪器的校正因素。

根据计算将该溶液配制成 10 μg/mL 标准溶液, 检测时, 用甲醇-PBS 溶液将该标准溶液稀释至所需浓度。

7.4 三氯甲烷。

7.5 甲醇。

7.6 石油醚。

7.7 牛血清白蛋白(BSA)。

7.8 邻苯二胺(OPD)。

7.9 辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠 IgG。

7.10 碳酸钠。

7.11 碳酸氢钠。

7.12 磷酸二氢钾。

7.13 磷酸氢二钠。

7.14 氯化钠。

7.15 氯化钾。

7.16 过氧化氢(H₂O₂)。

7.17 硫酸。

7.18 ELISA 缓冲液如下:

7.18.1 包被缓冲液(pH9.6 碳酸盐缓冲液)的制备:

Na₂CO₃ 1.59 g

NaHCO₃ 2.93 g

加蒸馏水至 1 000 mL。

7.18.2 磷酸盐缓冲液(pH7.4 PBS)的制备:

KH₂PO₄ 0.2 g

Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g

NaCl 8.0 g

KCl 0.2 g

加蒸馏水至 1 000 mL。

7.18.3 洗液(PBS-T)的制备: PBS 加体积分数为 0.05% 的吐温-20。

7.18.4 抗体稀释液的制备: BSA 1.0 g 加 PBS-T 至 1 000 mL。

7.18.5 底物缓冲液的制备如下:

7.18.5.1 A 液(0.1 mol/L 柠檬酸水溶液): 柠檬酸(C₆H₈O₇ · H₂O) 21.01 g, 加蒸馏水至 1 000 mL。

7.18.5.2 B 液(0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液): Na₂HPO₄ · 12H₂O 71.6 g, 加蒸馏水至 1 000 mL。

7.18.5.3 用前按 A 液+B 液+蒸馏水为 24.3+25.7+50 的比例(体积比)配制。

7.18.6 封闭液的制备:同抗体稀释液。

8 仪器

8.1 小型粉碎机。

8.2 电动振荡器。

8.3 酶标仪,内置 490 nm 滤光片。

8.4 恒温水浴锅。

8.5 恒温培养箱。

8.6 酶标微孔板。

8.7 微量加样器及配套吸头。

9 分析步骤

9.1 取样

同 5.1。

9.2 提取

9.2.1 大米和小米(脂肪含量<3.0%)的提取¹⁾

试样粉碎后过 20 目筛,称取 20.0 g,加入 250 mL 具塞锥形瓶中。准确加入 60 mL 三氯甲烷,盖塞后滴水封严。150 r/min 振荡 30 min。静置后,用快速定性滤纸过滤于 50 mL 烧杯中。立即取 12 mL 滤液(相当 4.0 g 试样)于 75 mL 蒸发皿中,65℃ 水浴通风挥干。用 2.0 mL 20% 甲醇-PBS 分三次(0.8 mL、0.7 mL、0.5 mL)溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物,移至小试管,加盖振荡后静置待测。此液每毫升相当 2.0 g 试样。

9.2.2 玉米的提取(脂肪含量 3.0%~5.0%)

试样粉碎后过 20 目筛,称取 20.0 g,加入 250 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 50.0 mL 甲醇-水(80+20)溶液和 15.0 mL 石油醚,盖塞后滴水封严。150 r/min 振荡 30 min。用快速定性滤纸过滤于 125 mL 分液漏斗中。待分层后,放出下层甲醇-水溶液于 50 mL 烧杯中,从中取 10.0 mL(相当于 4.0 g 试样)于 75 mL 蒸发皿中。以下按 9.2.1 自“65℃ 水浴通风挥干……”起依法操作。

9.2.3 花生的提取(脂肪含量 15.0%~45.0%)

试样去壳去皮粉碎后称取 20.0 g,加入 250 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 100.0 mL 甲醇-水(55+45)溶液和 30 mL 石油醚,盖塞后滴水封严。150 r/min 振荡 30 min。静置 15 min 后用快速定性滤纸过滤于 125 mL 分液漏斗中。待分层后,放出下层甲醇-水溶液于 100 mL 烧杯中,从中取 20.0 mL(相当于 4.0 g 试样)置于另一 125 mL 分液漏斗中,加入 20.0 mL 三氯甲烷,振摇 2 min,静置分层(如有乳化现象可滴加甲醇促使分层),放出三氯甲烷于 75 mL 蒸发皿中。再加 5.0 mL 三氯甲烷于分液漏斗中重复振摇提取后,放出三氯甲烷一并于蒸发皿中,以下按 9.2.1 自“65℃ 水浴通风挥干……”起依法操作。

9.2.4 植物油的提取

用小烧杯称取 4.0 g 试样,用 20.0 mL 石油醚,将试样移于 125 mL 分液漏斗中,用 20.0 mL 甲醇-水(55+45)溶液分次洗烧杯,溶液一并移于分液漏斗中(精炼油 4.0 g 样为 4.525 mL,直接用移液器加入分液漏斗,再加溶剂后振摇),振摇 2 min。静置分层后,放出下层甲醇-水溶液于 75 mL 蒸发皿中,再用 5.0 mL 甲醇-水溶液重复振摇提取一次,提取液一并加入蒸发皿中,以下按 9.2.1 自“65℃ 水浴通风挥干……”起依法操作。

¹⁾脂肪含量参照《食物成分表》,中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编著,1991年8月,第一版。

9.2.5 其他食品的提取

可按第一法 5.2.1.1, 5.2.3, 5.2.4 操作至“将蒸发皿放在通风橱内于 65℃ 水浴上通风挥干”, 以下接 9.2.1 自“用 2.0 mL 20% 甲醇-PBS 分三次……”起, 依法操作。

9.3 间接竞争性酶联免疫吸附测定(ELISA)

9.3.1 包被微孔板: 用 AFB₁-BSA 人工抗原包被酶标板, 150 μL/孔, 4℃ 过夜。

9.3.2 抗体抗原反应: 将黄曲霉毒素 B₁ 纯化单克隆抗体稀释后分别

a) 与等量不同浓度的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液用 2 mL 试管混合振荡后, 4℃ 静置。此液用于制作黄曲霉毒素 B₁ 标准抑制曲线。

b) 与等量试样提取液用 2 mL 试管混合振荡后, 4℃ 静置。此液用于测定试样中黄曲霉毒素 B₁ 含量。

9.3.3 封闭: 已包被的酶标板用洗液洗 3 次, 每次 3 min 后, 加封闭液封闭, 250 μL/孔, 置 37℃ 下 1 h。

9.3.4 测定: 酶标板洗 3×3 min 后, 加抗体抗原反应液(在酶标板的适当孔位加抗体稀释液或 Sp2/0 培养上清液作为阴性对照)130 μL/孔, 37℃, 2 h。酶标板洗 3×3 min, 加酶标二抗[1:200(体积分数)]100 μL/孔, 1 h。酶标板用洗液洗 5×3 min。加底物溶液(10 mg OPD)加 25 mL 底物缓冲液加 37 μL 30% H₂O₂, 100 μL/孔, 37℃, 15 min, 然后加 2 mol/L H₂SO₄, 40 μL/孔, 以终止显色反应, 酶标仪 490 nm 测出 OD 值。

9.4 结果计算

黄曲霉毒素 B₁ 的浓度按式(6)进行计算。

$$\text{黄曲霉毒素 B}_1 \text{ 浓度(ng/g)} = c \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1}{m} \dots\dots\dots(6)$$

式中:

c ——黄曲霉毒素 B₁ 含量, 单位为纳克(ng), 对应标准曲线按数值插入法求;

V_1 ——试样提取液的体积, 单位为毫升(mL);

V_2 ——滴加样液的体积, 单位为毫升(mL);

D ——稀释倍数;

m ——试样质量, 单位为克(g)。

由于按标准曲线直接求得的黄曲霉毒素 B₁ 浓度(c_1)的单位为纳克每毫升, 而测孔中加入的试样提取的体积为 0.065 mL, 所以式(6)中

$$c = 0.065 \text{ mL} \times c_1$$

而 $V_1 = 2 \text{ mL}$, $V_2 = 0.065 \text{ mL}$, $D = 2$, $m = 4 \text{ g}$ 代入式(6), 则

$$\text{黄曲霉毒素 B}_1 \text{ 浓度(ng/g)} = 0.065 \times c_1 \times \frac{2}{0.065} \times 2 \times \frac{1}{4} = c_1 \text{ (ng/g)}$$

所以, 在对试样提取完全按本方法进行时, 从标准曲线直接求得的数值 c_1 , 即为所测试样中黄曲霉毒素 B₁ 的浓度(ng/g)。