



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.23—2003
代替 GB/T 5009.23—1996

食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定

Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB/T 5009.23—1996《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.23—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、B₂、G₁、G₂ 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与食品卫生研究所、中华人民共和国青岛进出口商品检验局负责起草。

本标准第二法由北京市卫生防疫站、中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所、卫生部食品卫生监督检验所负责起草。

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、B₂、G₁、G₂ 的测定

1 范围

本标准规定了各种食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定方法。

本标准适用于各种食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定。

在薄层板上的最低检出量:黄曲霉毒素 B₁、G₁ 为 0.004 μg, B₂、G₂ 为 0.002 μg。本方法检出限:黄曲霉毒素 B₁、G₁ 为 5 μg/kg, B₂、G₂ 为 2.5 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 5009.22—2003 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

第一法 薄层色谱法

3 原理

试样经提取、浓缩、薄层分离后,在 365 nm 紫外光下,黄曲霉毒素 B₁、B₂ 产生蓝紫色荧光,黄曲霉毒素 G₁、G₂ 产生黄绿色荧光,根据其在薄层板上显示的荧光的最低检出量来定量。

4 试剂

4.1 同 GB/T 5009.22—2003 中 3.1~3.13。

4.2 次氯酸钠溶液(消毒用):配制方法见 GB/T 5009.22—2003 中 3.16。

4.3 苯-乙醇-水(46+35+19)展开剂:取此比例配制的溶液置于分液漏斗中,振摇 5 min,静置过夜。将上下层溶液分别置于具塞瓶中保存,上下层交界的溶液弃去不要。若溶液出现混浊,则在 80℃ 水浴上加热,待清晰后,即停止加热,取上层溶液作展开剂用。另取一定量的下层溶液置小皿中,再放于展开槽内。将薄层板放入展开槽内,预先饱和 10 min 后展开。

4.4 硫酸(1+3)。

4.5 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准溶液如下:

4.5.1 单一标准溶液(10 μg/mL):准确称取黄曲霉毒素 B₁、G₁ 标准品各 1 mg~1.2 mg,黄曲霉毒素 B₂、G₂ 标准品各 0.5 mg~0.6 mg,用苯-乙腈混合液作溶剂。配制方法、浓度及纯度的测定参照 GB/T 5009.22—2003 中 3.14。

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的分子量及用苯-乙腈作溶剂时的最大吸收峰的波长及摩尔消光系数见表 1。

表 1

黄曲霉毒素名称	最大吸收峰波长/nm	摩尔消光系数	分子量
B ₁	346	19 800	312
B ₂	348	20 900	314
G ₁	353	17 100	328
G ₂	354	18 200	330

4.5.2 各标准使用液:以下各标准液均用苯-乙腈混合液配制。

4.5.2.1 黄曲霉毒素混合标准使用液 I：每毫升相当于 0.2 μg 黄曲霉毒素 B_1 、 G_1 及 0.1 μg 黄曲霉毒素 B_2 、 G_2 ，作定位用。

4.5.2.2 黄曲霉毒素混合标准使用液 II：每毫升相当于 0.04 μg 黄曲霉毒素 B_1 、 G_1 及 0.02 μg 黄曲霉毒素 B_2 、 G_2 ，作最低检出量用。

5 仪器

同 GB/T 5009.22—2003 中 4.1~4.9。

6 分析步骤

6.1 取样

同 GB/T 5009.22—2003 中 5.1。

6.2 提取

同 GB/T 5009.22—2003 中 5.2。

6.3 测定

6.3.1 单向展开法

6.3.1.1 薄层板的制备

同 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.1.1。

6.3.1.2 点样

同 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.1.2。滴加式样如下：

第一点：10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 II。

第二点：20 μL 样液。

第三点：20 μL 样液 + 10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 II。

第四点：20 μL 样液 + 10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 I。

6.3.1.3 展开与观察

黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的比移值依次排列为 $B_1 > B_2 > G_1 > G_2$ 。

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。在紫外光灯下观察结果，方法如下。

6.3.1.3.1 由于样液点上加滴黄曲霉毒素混合标准使用液 I 或 II，可使黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 分别与样液中的黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 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 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 依次为 0.000 4、0.000 2、0.000 4、0.000 2 μg ，可用作检查在样液内黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的最低检出量是否正常出现。如为阳性，则起定位作用。薄层板上的第四点中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 依次为 0.002、0.001、0.002、0.001 μg ，主要起定位作用。

6.3.1.3.2 若第二点在与黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 的相应位置上无蓝紫色荧光点；或在与黄曲霉毒素 G_1 、 G_2 的相应位置上无黄绿色荧光点，表示试样中黄曲霉毒素 B_1 、 G_1 含量在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下； B_2 、 G_2 含量在 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下；如在相应位置上有以上荧光点，则需进行确证试验。

6.3.1.4 确证试验

6.3.1.4.1 黄曲霉毒素与三氟乙酸反应产生衍生物，只限于 B_1 和 G_1 ； B_2 和 G_2 与三氟乙酸不起反应。 B_1 和 G_1 的衍生物比移值为 $B_1 > G_1$ 。于薄层板左边依次滴加两个点。

第一点：10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 II。

第二点：20 μL 样液。

于以上两点各加三氟乙酸 1 小滴盖于其上，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 $^{\circ}\text{C}$ 。再于薄层板上滴加以下两个点。

第三点：10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 II。

第四点:20 μL 样液。

再展开(同 6.3.1.3),在紫外光灯下观察样液是否产生与黄曲霉毒素 B_1 或 G_1 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。

6.3.1.4.2 黄曲霉毒素 B_2 和 G_2 的确证试验,可用苯-乙醇-水(46+35+19)展开,若标准点与样液点出现重叠,即可确定。

6.3.1.4.3 在展开的薄层板上喷以硫酸(1+3),黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 都变为黄色荧光。

6.3.1.5 稀释定量

样液中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 荧光点的荧光强度如各与黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 标准点的最低检出量(B_1 、 G_1 为 0.000 4 μg , B_2 、 G_2 为 0.000 2 μg)的荧光强度一致,则试样中黄曲霉毒素 B_1 、 G_1 含量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; B_2 、 G_2 含量为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。如样液中任何一种黄曲霉毒素的荧光强度比其最低检出量强,则需逐一进行定量,直至样液点的荧光强度与最低检出量点的荧光强度一致为止。定量与计算方法参照 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.1.5 与 5.3.1.6。

6.3.2 双向展开法

6.3.2.1 滴加两点法

6.3.2.1.1 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 黄曲霉毒素混合标准使用液 II,在距左边缘 2.8 cm~3.0 cm 处各滴加 20 μL 样液,然后在第二板的样液点上加滴 10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 II;在第三板上的样液点上加滴 10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 I。

6.3.2.1.2 展开:同 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.2.1.2。

6.3.2.1.3 观察及评定结果如下:

6.3.2.1.3.1 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 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 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 B_1 、 G_1 含量在 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下; B_2 、 G_2 的含量在 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。

6.3.2.1.3.2 若第一板在与第二板的相同位置上各出现荧光点,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的荧光点是否各与其黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 标准点重叠,如果重叠,再按 6.3.2.1.3.3 进行所需的的确证试验。

6.3.2.1.3.3 黄曲霉毒素 B_1 、 G_1 的确证试验: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 黄曲霉毒素混合标准使用液 II 及 1 滴三氟乙酸,距左边缘 2.8 cm~3 cm 处,第四板滴加 20 μL 样液及 1 滴三氟乙酸;第五板滴加 20 μL 样液、10 μL 黄曲霉毒素混合标准使用液 II 及 1 滴三氟乙酸。产生衍生物的步骤及展开方法同 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.2.1,观察样液点是否各产生与其黄曲霉毒素 B_1 或 G_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 、 B_2 、 G_1 、 G_2 含量高时,则将样液稀释后按 6.3.1.4 作确证试验。

稀释定量与结果计算参照 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.2.1.5 与 5.3.2.1.6。

6.3.2.2 滴加一点法

同 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.2.2。所不同的地方是在薄层上滴加标准液时以黄曲霉毒素混合标准使用液 II 代替黄曲霉毒素 B_1 标准使用液(0.04 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。稀释定量与结果计算参照 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.2.2 与 5.3.1.6。

第二法 微柱筛选法

7 原理

试样提取液通过由氧化铝与硅镁吸附剂组成的微柱层析管,杂质被氧化铝吸附,黄曲霉毒素被硅镁吸附剂吸附,在 365 nm 紫外线下呈蓝紫色荧光,其荧光强度在一定范围内与黄曲霉毒素的含量成正

比,由于微柱不能分离 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 ,故结果为黄曲霉毒素的总量。

8 试剂

- 8.1 石油醚:沸程 $60^{\circ}\text{C}\sim 90^{\circ}\text{C}$ 或 $30^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$ 。
- 8.2 中性氧化铝:层析用 100 目~200 目。
- 8.3 酸性氧化铝:层析用 100 目~200 目。
- 8.4 无水硫酸钠:过 40 目~80 目筛或 80 目~100 目筛。
- 8.5 硅镁型吸附剂:层析用 100 目~200 目。
- 8.6 甲醇水溶液:(55+45)。
- 8.7 展开剂:丙酮-三氯甲烷(1+9)。
- 8.8 脱脂棉:用索氏提取器以二氯甲烷为溶剂提取 2 h 后,挥干后贮于瓶中保存。
- 8.9 黄曲霉毒素 B_1 标准液:用苯-乙腈(98+2)配成 $0.4\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的贮存液及 $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的使用液,避光冷藏。

注:层析用氧化铝、硅镁型吸附剂、无水硫酸钠应在 120°C 活化 2 h,密塞,贮干燥器内可保存一周。

9 仪器

- 9.1 紫外光灯:8 W~100 W,带有波长 365 nm 滤光片。
- 9.2 微柱管:内径 0.4 cm,长 12 cm 的玻璃管,为加液方便上加一段粗管。
- 9.3 微柱管架。
- 9.4 微量注射器:50 mL。

10 分析步骤

10.1 提取

10.1.1 粮食、花生及其制品:取粉碎过筛(20 目)试样 20.00 g 于具塞锥形瓶中,加 100 mL 甲醇水溶液,30 mL 石油醚,密塞振摇 30 min,静置片刻,过滤于 50 mL 具塞量筒中,收集 50 mL 甲醇水滤液(注意切勿将石油醚层带入滤液中),转入分液漏斗中,加 50 mL 硫酸钠溶液(20 g/L)稀释,加三氯甲烷 10 mL,轻摇 2 min~3 min,静置分层,三氯甲烷层通过装有 5 g 无水硫酸钠的小漏斗脱水(以少量脱脂棉球塞住漏斗颈口,并以少量三氯甲烷润湿),并滤入 10 mL 比色管中,再向分液漏斗中加 3 mL 三氯甲烷重提一次,脱水后滤入原比色管中,以少量三氯甲烷洗漏斗并定容至 10.0 mL,密塞,混匀,待测。此样液 1 mL 相当 1.0 g 试样。

10.1.2 植物油:称混匀油样 10.00 g 于 20 mL 的烧杯中,用 50 mL 石油醚分数次洗入分液漏斗中,加 50 mL 甲醇水轻摇 2 min~3 min,静置分层,将下层甲醇水转入另一分液漏斗中,加 50 mL 硫酸钠水溶液(20 g/L)稀释,加三氯甲烷 10 mL,以下按 10.1.1 自“轻摇 2 min~3 min……”起操作。此样液 1 mL 相当 1.0 g 试样。

10.1.3 发酵酒、酱油、醋等水溶性试样:啤酒等含二氧化碳的试样,需在烧杯中于水浴上加热、搅拌、除去气泡,否则易乳化。称混匀试样 20.00 g 于小烧杯中,以 80 mL 硫酸钠溶液(20 g/L)洗入分液漏斗中,加三氯甲烷 10 mL,此样液 1 mL 相当 2.0 g 试样。

10.1.4 腐乳、黄酱类:称取混匀试样 20.00 g 于具塞锥形瓶中,加甲醇水 100 mL,石油醚 20 mL。振荡 30 min,静置片刻,以折叠快速定性滤纸过滤于 50 mL 具塞量筒中,收集甲醇水滤液 50 mL(相当于 10 g 试样,因为 10 g 试样中约含有 5 mL 水),置于分液漏斗中,加入三氯甲烷 10 mL,以下按 10.1.1 自“轻摇 2 min~3 min……”起操作。此样液 1 mL 相当 1.0 g 试样。

10.2 测定

10.2.1 微柱管的制备:以少量脱脂棉做底用粗铁丝砸实,置于微柱管架上,依次加入高为 0.5 cm 无水

硫酸钠(80目~100目),0.5 cm 硅镁型吸附剂,0.5 cm 无水硫酸钠(80目~100目),1.5 cm 中性氧化铝,1.5 cm 酸性氧化铝,3 cm 无水硫酸钠(40目~80目),顶部以少量脱脂棉堵塞,装试剂时管要垂直,每装一种试剂要适当敲紧,两种试剂之间界面要平齐,柱管要随装随用,以免在空气中吸水活性下降。

10.2.2 微柱层析:在装好的微柱中,加入三氯甲烷提取液 1.0 mL,同时做标准管,另取三支微柱管,各加入三氯甲烷 1 mL,再分别加入黄曲霉毒素 B₁ 标准液(0.1 μg/mL)0、50、100 μL,相当于黄曲霉毒素 B₁ 标准 0、5、10 ng,待加液流至顶层时,即加入 1 mL 丙酮-三氯甲烷(1+9)展开剂,在加样或展开时,柱管均要保持垂直,待展开剂流完后,即可观察结果。

10.2.3 结果观察与评定:于波长 365 nm 紫外光灯下观察,将层析后的样品管依次与 0、5、10 ng 黄曲霉毒素 B₁ 标准管比较,若试样柱管内硅镁型吸附剂层与 0 管一致则为阴性(在 5 μg/kg 以下),如试样管中硅镁吸附剂层呈蓝紫色荧光环,则为阳性,并需进一步按薄层层析法进行确证测定,但不需重新提取试样。其操作如下:准确吸取原三氯甲烷提取液 4.0 mL(相当 4 g 或 8 g 试样)于小蒸发皿内挥干,以少量苯-乙腈混合液(98+2)分数次转入刻度小管中,定容至 1.0 mL,密塞,混匀,按薄层层析法确证,并测定黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的含量。
