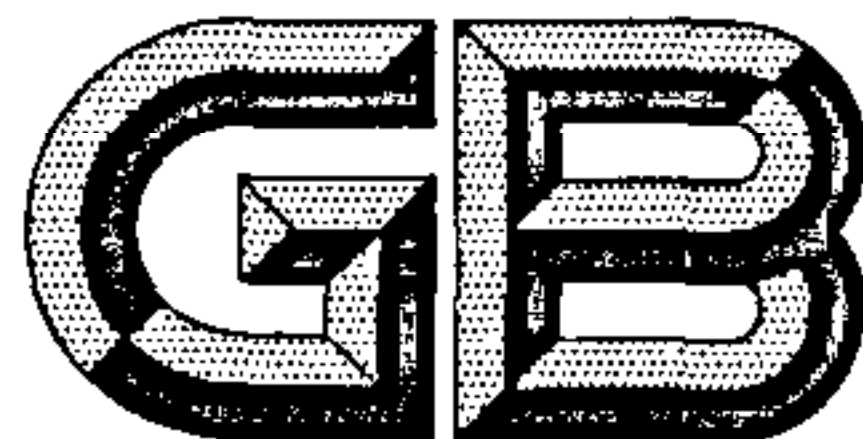


ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.24—2003
代替 GB/T 5009.24—1996

食品中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的测定

Determination of aflatoxins M₁ and 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

197

前 言

本标准代替 GB/T 5009.24—1996《食品中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.24—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 M₁ 与 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。

本标准由中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所负责起草。

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 M₁ 与 B₁ 的测定

1 范围

本标准规定了牛乳及其制品、黄油及新鲜猪组织(肝、肾、血及瘦肉)等食品中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的测定方法。

本标准适用于牛乳及其制品、黄油及新鲜猪组织(肝、肾、血及瘦肉)等食品中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的测定。

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

3 原理

试样经提取、浓缩、薄层分离后,黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 在紫外光(波长 365 nm)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。

4 试剂

4.1 同 GB/T 5009.22—2003 中第 3 章。

4.2 异丙醇。

4.3 硅胶 G:层析用。

4.4 氯化钠及氯化钠溶液(40 g/L)。

4.5 硫酸(1+3)。

4.6 玻璃砂:用酸处理后洗净、干燥,约相当于 20 目。

4.7 黄曲霉毒素 M₁ 标准溶液:用三氯甲烷配制成每毫升相当于 10 μg 的黄曲霉毒素 M₁ 标准溶液。以三氯甲烷作空白试剂,黄曲霉毒素 M₁ 的紫外最大吸收峰的波长应接近 357 nm,摩尔消光系数为 19 950。避光,置于 4℃ 冰箱中保存。

4.8 黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 混合标准使用液:用三氯甲烷配制成每毫升相当于各含 0.04 μg 的黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁。避光,置于 4℃ 冰箱中保存。

5 仪器

同 GB/T 5009.22—2003 中第 4 章。

6 分析步骤

整个操作需在暗室条件下进行。

6.1 试样提取

6.1.1 试样提取制备表,见表 1。

表 1 试样制备

试样名称	称样量/ g	加水量/ mL	加甲醇量/ mL	提取液量/ mL	加 40 g/L 氯化 钠溶液量/ mL	浓缩体积/ mL	滴加体积/ μL	方法灵敏度/ μg/kg
牛乳	30	0	90	62	25	0.4	100	0.1
炼乳	30	0	90	52	35	0.4	50	0.2
牛乳粉	15	20	90	59	28	0.4	40	0.5
乳酪	15	5	90	56	31	0.4	40	0.5
黄油	10	45	55	80	0	0.4	40	0.5
猪肝	30	0	90	59	28	0.4	50	0.2
猪肾	30	0	90	61	26	0.4	50	0.2
猪瘦肉	30	0	90	58	29	0.4	50	0.2
猪血	30	0	90	61	26	0.4	50	0.2

6.1.2 提取液量按式(1)进行计算。

$$X = \frac{8}{15} \times (90 + A + B) \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X——提取液量,单位为毫升(mL);

A——试样中的水分量,单位为毫升(mL)(牛乳、炼乳及猪组织的取样量为 30 g,牛乳粉、乳酪的取样量为 15 g);

B——加水量,单位为毫升(mL)。

注:试样中的水分量参照中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编著的《食物成分表》。

因各提取液中含 48 mL 甲醇,需 39 mL 水才能调到甲醇与水之体积比为(55+45),因此加入氯化钠溶液(40 g/L)量等于(87 mL)减去提取液量(mL)。

6.1.3 牛乳与炼乳:称取 30.00 g 混匀的试样,置于小烧杯中,再分别用 90 mL 甲醇移于 300 mL 具塞锥形瓶中,盖严防漏。振荡 30 min,用折叠式快速滤纸滤于 100 mL 具塞量筒中。按表 1 收集 62 mL 牛乳与 52 mL 炼乳(各相当于 16 g 试样)提取液。

6.1.4 牛乳粉:取 15.00 g 试样,置于具塞锥形瓶中,加入 20mL 水,使试样湿润后再加入 90 mL 甲醇,以下按 6.1.3 自“振荡 30 min……”起依法操作,按表 1 收集 59 mL 提取液(相当于 8 g 试样)。

6.1.5 乳酪:称取 15.00 g 切细、过 10 目圆孔筛的混匀试样,置于具塞锥形瓶中,加 5 mL 水和 90 mL 甲醇,以下按 6.1.3 自“振荡 30 min……”起依法操作,按表 1 收集 56 mL 提取液(相当于 8 g 试样)。

6.1.6 黄油:称取 10.00 g 试样,置于小烧杯中,用 40 mL 石油醚将黄油溶解并移于具塞锥形瓶中。加 45 mL 水和 55 mL 甲醇,振荡 30 min 后,将全部液体移于分液漏斗中。再加入 1.5 g 氯化钠摇动溶解,待分层后,按表 1 收集 80 mL 提取液(相当于 8 g 试样)于具塞量筒中。

6.1.7 新鲜猪组织:取新鲜或冷冻保存的猪组织试样(包括肝、肾、血、瘦肉),先切细,混匀后称取 30.00 g,置于小乳钵中,加玻璃砂少许磨细,新鲜全血用打碎机打匀,或用玻璃珠振摇抗凝。混匀后称取 30.00 g,将各试样置于 300 mL 具塞锥形瓶中,加入 90 mL 甲醇,以下按 6.1.3 自“振荡 30 min……”起依法操作。按表 1 收集 59 mL 猪肝,61 mL 猪肾,58 mL 猪瘦肉及 61 mL 猪血等提取液(各相当于 16 g 试样)。

6.2 净化

6.2.1 用石油醚分配净化:将以上收集的提取液移入 250 mL 分液漏斗中,再按各种食品加入一定体积的氯化钠溶液(40 g/L)(见表 1)。再加入 40 mL 石油醚,振摇 2 min,待分层后,将下层甲醇-氯化钠

水层移于原量筒中,将上层石油醚溶液从分液漏斗上口倒出,弃去。再将量筒中溶液转移于原分液漏斗中。再重复用石油醚提取两次,每次 30 mL,最后将量筒中溶液仍移于分液漏斗中。黄油样液总共用石油醚提取两次,每次 40 mL。

6.2.2 用三氯甲烷分配提取:于原量筒中加入 20 mL 三氯甲烷,摇匀后,再倒入原分液漏斗中,振摇 2 min。待分层后,将下层三氯甲烷移于原量筒中,再重复用三氯甲烷提取两次,每次 10 mL 合并于原量筒中。弃去上层甲醇水溶液。

6.2.3 用水洗三氯甲烷层与浓缩制备:将合并后的三氯甲烷层倒回原分液漏斗中,加入 30 mL 氯化钠溶液(40 g/L),振摇 30 s,静置。待上层混浊液有部分澄清时,即可将下层三氯甲烷层收集于原量筒中。加入 10 g 无水硫酸钠,振摇放置澄清后,将此液经装有少许无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于 100 mL 蒸发皿中。氯化钠水层用 10 mL 三氯甲烷提取一次,并经过滤器一并滤于蒸发皿中。最后将无水硫酸钠也一起倒于滤纸上,用少量三氯甲烷洗量筒与无水硫酸钠,也一并滤于蒸发皿中,于 65℃ 水浴上通风挥干,用三氯甲烷将蒸发皿中残留物转移于浓缩管中,蒸发皿中残渣太多,则经滤纸滤入浓缩管中。于 65℃ 用减压吹气法将此液浓缩至 0.4 mL 以下,再用少量三氯甲烷洗管壁后,浓缩定量至 0.4 mL 备用。

6.3 测定

6.3.1 硅胶 G 薄层板的制备

薄层板厚度为 0.3 mm,105℃ 活化 2 h,在干燥器内可保存 1 d~2 d。

6.3.2 点板

取 5 cm×20 cm 的薄层板两块,距板下端 3 cm 的基线上各滴加两点,在距第一与第二板的左边缘 0.8 cm~1 cm 处各滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 混合标准使用液,在距各板左边缘 2.8 cm~3 cm 处各滴加同一样液点(各种食品的滴加体积见表 1),在第二板的第二点上再滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 混合标准使用液。一般可将薄层板放在盛有干燥硅胶的层析槽内进行滴加,边加边用冷风机冷风吹干。

6.3.3 展开

6.3.3.1 横展:在槽内加入 15 mL 事先用无水硫酸钠脱水的无水乙醚(500 mL 无水乙醚中加 20 g 无水硫酸钠)。将薄层板靠近标准点的长边置于槽内,展至板端后,取出挥干,再同上继续展开一次。

6.3.3.2 纵展:将横展两次挥干后的薄层板再用异丙醇-丙酮-苯-正己烷-石油醚(沸程 60℃~90℃)-三氯甲烷(5+10+10+10+10+55)混合展开剂纵展至前沿距原点距离为 10 cm~12 cm 取出挥干。

6.3.3.3 横展:将纵展挥干后的板再用乙醚横展 1 次~2 次,展开方法同 6.3.3.1。

6.3.4 观察与评定结果

6.3.4.1 在紫外光灯下将第一、二板相互比较观察,若第二板的第二点在黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 标准点的相应处出现最低检出量(M₁ 与 B₁ 的比移值依次为 0.25 和 0.43),而在第一板相同位置上未出现荧光点,则试样中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 含量在其所定的方法灵敏度以下(见表 1)。

6.3.4.2 如果第一板的相同位置上出现黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的荧光点,则第二板第二点的样液点是否各与滴加的标准点重叠,如果重叠,再进行以下的定量与确证试验。

6.3.5 稀释定量

样液中的黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 荧光点的荧光强度与黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的最低检出量(0.000 4 μg)的荧光强度一致,则牛乳、炼乳、牛乳粉、乳酪与黄油试样中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的含量依次为 0.1、0.2、0.5、0.5 及 0.5 μg/kg;新鲜猪组织(肝、肾、血、瘦肉)试样均为 0.2 μg/kg(见表 1)。如样液中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的荧光强度比最低检出量强,则根据其强度逐一进行测定,估计减少滴加微升数或经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点的荧光强度一致为止。

6.3.6 确证试验

在做完定性或定量的薄层板上,将要确证的黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的点用大头针圈出。喷以硫酸溶

液 (1+3), 放置 5 min 后, 在紫外光灯下观察, 若样液中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 点同标准点一样均变为黄色荧光, 则进一步确证检出的荧光点是黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁。

6.3.7 结果计算

黄曲霉毒素 M₁ 或 B₁ 的含量按式(2)进行计算。

$$X = 0.0004 \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1000}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——黄曲霉毒素 M₁ 或 B₁ 含量, 单位为微克每千克(μg/kg);

V₁ ——样液浓缩后体积, 单位为毫升(mL);

V₂ ——出现最低荧光样液的滴加体积, 单位为毫升(mL);

D ——浓缩样液的总稀释倍数;

m ——浓缩样液中所相当的试样质量, 单位为克(g);

0.0004 ——黄曲霉毒素 M₁ 或 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。

