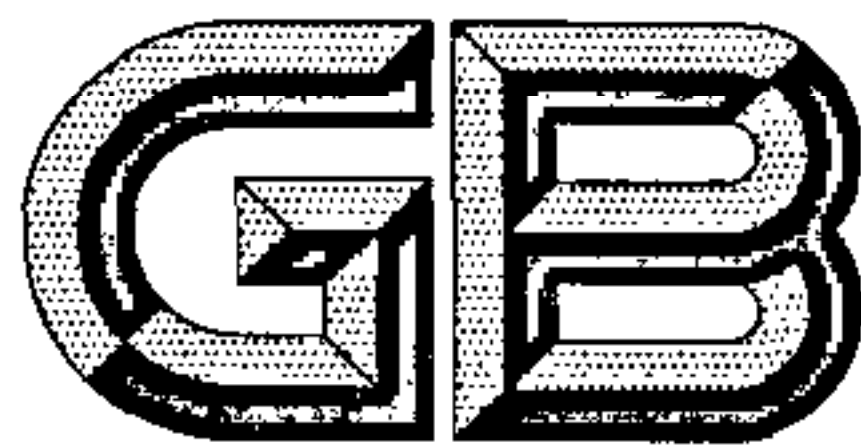


ICS 67.040  
C 53



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.96—2003  
代替 GB/T 13111—1991

## 谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定

Determination of ochratoxin A in cereals and soybeans

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

681

## 前 言

本标准代替 GB/T 13111—1991《谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定方法》。

本标准与 GB/T 13111—1991 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《谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定》;
- 按 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。

本标准起草单位:卫生部食品卫生监督检验所、辽宁省食品卫生监督检验所、黑龙江省食品卫生监督检验所、北京市卫生防疫站、山西省卫生防疫站。

本标准主要起草人:魏润蕴、鲍风珍、方晓明、杨貌端、高晓岚。

原标准于 1991 年首次发布,本次为第一次修订。

## 谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定

### 1 范围

本标准规定了谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的薄层色谱测定方法。

本标准适用于小麦、玉米和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定。

本方法的检出限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 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 B<sub>1</sub> 的测定

### 3 原理

用三氯甲烷-0.1 mol/L 磷酸或石油醚-甲醇/水提取试样中的赭曲霉毒素 A,试样提取液经液-液分配后,根据其在 365 nm 紫外光灯下产生黄绿色荧光,在薄层色谱板上与标准比较测定含量。

### 4 试剂

4.1 石油醚(60°C~90°C或 30°C~60°C)。

4.2 甲醇。

4.3 三氯甲烷。

4.4 甲苯。

4.5 乙酸乙酯。

4.6 甲酸。

4.7 冰乙酸。

4.8 乙醚。

4.9 苯-乙腈(98+2)。

4.10 0.1 mol/L 磷酸[ $c(\text{H}_3\text{PO}_4)=0.1 \text{ mol/L}$ ]:称取 11.5 g 磷酸(85%)加水稀释至 1 000 mL。

4.11 2 mol/L 盐酸溶液[ $c(\text{HCl})=2 \text{ mol/L}$ ]:量取 20 mL 盐酸,加水稀释至 120 mL。

4.12 氯化钠溶液(40 g/L)。

4.13 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液[ $c(\text{NaHCO}_3)=0.1 \text{ mol/L}$ ]:称取 8.4 g 碳酸氢钠,加适量水溶解,并用水稀释至 1 000 mL。

4.14 硅胶 G;薄层层析用。

4.15 赭曲霉毒素 A 标准品(以下简称 OA)。

4.16 赭曲霉毒素 A 标准溶液:

4.16.1 赭曲霉毒素 A 标准贮备液:用苯-冰乙酸(99+1)配成 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  赭曲霉毒素 A 标准贮备液,并用紫外分光光度计测定其浓度。浓度的测定按照 GB/T 5009.22—2003 中 3.14(赭曲霉毒素 A 的最大吸收峰波长 333 nm,分子量 403,克分子消光系数值为 5550)。置冰箱中避光保存。

4.16.2 赭曲霉毒素 A 标准使用液:精密吸取贮备液,用苯稀释成每毫升含赭曲霉毒素 A 0.5  $\mu\text{g}$ ,置冰箱中避光保存。

## 5 仪器

所有玻璃仪器均需用稀盐酸浸泡,用自来水、蒸馏水冲洗。

- 5.1 小型粉碎机。
- 5.2 电动振荡器。
- 5.3 玻璃板:5 cm×20 cm。
- 5.4 薄层涂布器。
- 5.5 展开槽:内长 25 cm、宽 6 cm、高 4 cm。
- 5.6 紫外光灯:365 nm。
- 5.7 微量注射器:10  $\mu$ L,50  $\mu$ L。
- 5.8 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶。

## 6 分析步骤

### 6.1 试样的制备

称取 250 g 试样经粉碎并通过 20 目筛后备用。

### 6.2 提取

#### 6.2.1 甲法

称取约 20 g 试样,精确至 0.001 g,置于 200 mL 具塞锥形瓶中,加入 100 mL 三氯甲烷和 10 mL 0.1 mol/L 磷酸,振荡 30 min 后通过快速定性滤纸过滤;取 20 mL 滤液置于 250 mL 分液漏斗中,加 50 mL 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液振摇 2 min,静置分层后,将三氯甲烷层放入另一个 100 mL 分液漏斗中(少量乳化层,或即使三氯甲烷层全部乳化都可放入分液漏斗中),加入 50 mL 0.1 mol/L 碳酸氢钠溶液重复提取三氯甲烷层,静置分层后弃去三氯甲烷层(如三氯甲烷层仍乳化,弃去,不影响结果)。碳酸氢钠水层并入第一个分液漏斗中,加约 5.5 mL 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH2~3(用 pH 试纸测试),加入 25 mL 三氯甲烷振摇 2 min,静置分层后,放三氯甲烷层于另一盛有 100 mL 水的 250 mL 分液漏斗中,酸水层再用 10 mL 三氯甲烷振摇、提取、静置,将三氯甲烷层并入同一分液漏斗中。振摇、静置分层,用脱脂棉擦干分液漏斗下端,放三氯甲烷层于一 75 mL 蒸发皿中,将蒸发皿置蒸汽浴上通风挥干。用约 8 mL 三氯甲烷分次将蒸发皿中的残渣溶解,转入具尾管的 10 mL 浓缩瓶中,置 80℃ 水浴锅上用蒸汽加热吹氮气(N<sub>2</sub>)浓缩至干,加入 0.2 mL 苯-乙腈(98+2)溶解残渣,摇匀,供薄层色谱点样用。

#### 6.2.2 乙法

称取 20 g 粉碎并通过 20 目筛的试样加于 200 mL 具塞锥形瓶中,加 30 mL 石油醚和 100 mL 甲醇-水(55+45),在瓶塞上抹上一层水盖严防漏。振荡 30 min 后,通过快速定性滤纸滤入分液漏斗中,待下层甲醇-水层分清后,取出 20 mL 滤液置于 100 mL 分液漏斗中,用 pH 试纸测试,一般为 pH5~6。加入 25 mL 三氯甲烷振摇 2 min,静置分层后放出三氯甲烷层于另一分液漏斗中,再用 10 mL 三氯甲烷重复振摇提取甲醇-水层(在用三氯甲烷振摇提取时,如发生乳化现象,可滴加甲醇促使其分层),将三氯甲烷层合并于同一分液漏斗中,加入 50 mL~100 mL 氯化钠溶液(4.12)(加入量视品种不同而异,大豆加 100 mL,小麦、玉米则加 50 mL 左右),振摇放置(如为大豆试样提取液还须轻轻反复倒转分液漏斗,使乳化层逐渐上升。如乳化严重可加入少许甲醇),待三氯甲烷层澄清后,用脱脂棉擦干分液漏斗下端,放三氯甲烷层于 75 mL 蒸发皿中(如为大豆试样须再加入 10 mL 三氯甲烷振摇,三氯甲烷层合并于同一蒸发皿中),将蒸发皿置蒸汽浴上通风挥干。以下操作自“用约 8 mL 三氯甲烷分次将蒸发皿中的残渣溶解”起,按甲法操作。

### 6.3 测定

#### 6.3.1 薄层板的制备

称取 4 g 硅胶 G,加约 10 mL 水于乳钵中研磨至糊状。立即倒入涂布器内制成 5 cm×20 cm,厚度



0.3 mm 的薄层板三块,在空气中干燥后,在 105℃~110℃活化 1 h,取出放干燥器中保存。

### 6.3.2 点样

取两块薄层板,在距薄层板下端 2.5 cm 的基线上用微量注射器滴加两个点:在距板左边缘 1.7 cm 处滴加 OA 标准溶液 8 μL(浓度 0.5 μg/mL),在距板左边缘 2.5 cm 处滴加样液 25 μL,然后在第二块板的样液点上加滴 OA 标准溶液 8 μL(浓度 0.5 μg/mL)。点样时,需边滴加边用电风吹干,交替使用冷热风。

### 6.3.3 展开

#### 6.3.3.1 展开剂

横展剂:乙醚或乙醚-甲醇-水(94+5+1)。

纵展剂:

a) 甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(6+3+1.2+0.06)或甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6+3+1.4);

b) 苯-冰乙酸(9+1)。

#### 6.3.3.2 展开

横向展开:在展开槽内倒入 10 mL 横展剂,先将薄层板纵展至离原点 2 cm~3 cm,取出通风挥发溶剂 1 min~2 min 后,再将该薄层板靠标准点的长边置于同一展开槽内的溶剂中横展,如横展剂不够,可添加适量,展至板端过 1 min,取出通风挥发溶剂 2 min~3 min。

纵向展开:在另一展开槽内倒入 10 mL 纵展剂,将经横展后的薄层板纵展至前沿距原点 13 cm~15 cm,取出通风挥干至板面无酸味(约 5 min~10 min)。

### 6.3.4 观察与评定

将薄层色谱板置 365 nm 波长紫外光灯下观察。

a) 在紫外光灯下将两板相互比较,若第二块板的样液点在 OA 标准点的相应处出现最低检出量,而在第一板相同位置上未出现荧光点,则试样中的 OA 含量在本测定方法的最低检测量 10 μg/kg 以下。

b) 如果第一板样液点在与第二板样液点相同位置上出现荧光点则看第二板样液的荧光点是否与滴加的标准荧光点重叠,再进行以下的定量与确证试验。

### 6.3.5 稀释定量

比较样液中 OA 与标准 OA 点的荧光强度,估计稀释倍数。

薄层板经双向展开后,当阳性样品中 OA 含量高时,OA 的荧光点会被横向拉长,使点变扁,或分成两个黄绿色荧光点。这是因为在横展过程中原点上 OA 的量超过了硅胶的吸附能力,原点上的杂质和残留溶剂在横展中将 OA 点横向拉长了,这时可根据 OA 黄绿色荧光的总强度与标准荧光强度比较,估计需减少的滴加微升数或所需稀释倍数。经稀释后测定含量时可在样液点的左边基线上滴加两个标准点,OA 的量可为 4 ng、8 ng。比较样液与两个标准 OA 荧光点的荧光强度,概略定量。

### 6.3.6 确证试验

用碳酸氢钠乙醇溶液(在 100 mL 水中溶解 6.0 g 碳酸氢钠,加 20 mL 乙醇)喷洒色谱板,在室温下干燥,于长波紫外光灯下观察,这时 OA 荧光点应由黄绿色变为蓝色,而且荧光强度有所增加,可使方法检出限达 5 μg/kg,但概略定量仍按喷洒前所显黄绿色荧光计。

## 7 结果计算

$$X = m_1 \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1\,000}{m}$$

式中:

X——试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克(μg/kg);

$m_1$ ——薄层板上测得样液点上 OA 的量,单位为微克(μg);

$D$ ——样液的总稀释倍数；

$V_1$ ——苯-乙腈混合液的体积,单位为毫升(mL)；

$V_2$ ——出现最低荧光点时滴加样液的体积,单位为毫升(mL)；

$m$ ——苯-乙腈溶解时相当样品的质量,单位为克(g)。

## 8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

---