



中华人民共和国国家标准

GB 5413.37—2010

食品安全国家标准

乳和乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的测定

National food safety standard

Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk products

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准第一法对应于ISO14501: 2007 Milk and milk powder-determination of aflatoxin M₁ content -clean-up by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography, 本标准第一法与ISO14501: 2007的一致性程度为非等效; 本标准第二法和第三法代替GB/T 18980-2003; 本标准第四法来自于NY/T 1664-2008《牛乳中黄曲霉毒素M₁的快速检测 双流向酶联免疫法》。

本标准附录A和附录B为资料性附录。

食品安全国家标准

乳和乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的测定

1 范围

本标准规定了乳和乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的测定方法。

标准第一法适用于乳和乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的测定；第二法适用于乳、乳粉，以及低脂乳、脱脂乳、低脂乳粉和脱脂乳粉中黄曲霉毒素 M₁ 的测定；第三法适用于乳和乳粉中黄曲霉毒素 M₁ 的测定；第四法适用于液态乳和乳粉中黄曲霉毒素 M₁ 的测定。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

第一法 免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法

3 原理

试样液体或固体试样提取液经均质、超声提取、离心，取上清液经免疫亲和柱净化，洗脱液经氮气吹干，定容，微孔滤膜过滤，经液相色谱分离，电喷雾离子源离子化，多反应离子监测（MRM）方式检测。基质加标外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲酸（HCOOH）。
- 4.2 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。
- 4.3 石油醚（C_nH_{2n+2}）：沸程为30℃～60℃。
- 4.4 三氯甲烷（CHCl₃）。
- 4.5 氮气：纯度≥99.9%。
- 4.6 黄曲霉毒素M₁标准样品：纯度≥98%。
- 4.7 乙腈-水溶液（1+4）：在400 mL水中加入100 mL乙腈。
- 4.8 乙腈-水溶液（1+9）：在450 mL水中加入50 mL乙腈。
- 4.9 0.1% 甲酸水溶液：吸取1 mL 甲酸（4.1），用水稀释至1000 mL。
- 4.10 乙腈-甲醇溶液（50+50）：在500 mL乙腈中加入500 mL甲醇。
- 4.11 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L）：称取2 g氢氧化钠溶解于100 mL水中。

4.12 空白基质溶液

分别称取与待测样品基质相同的、不含所测黄曲霉毒素的阴性试样8份于100 mL烧杯中。以下操作按6.1试液提取和6.2 净化步骤进行。合并所得8份试样的纯化液，用0.22 μm 微孔滤膜的一次性滤头（5.23）过滤。弃去前0.5 mL滤液，接取少量滤液供液相色谱—质谱联用仪检测。

获得色谱—质谱图后，对照附录 A 中的图 A.2，在相应的保留时间处，应不含黄曲霉毒素 M₁。剩余滤液转移至棕色瓶中，在-20 °C 电冰箱内保存，供配制标准系列溶液使用。

4.13 黄曲霉毒素M₁标准储备溶液：分别称取标准品黄曲霉毒素M₁ 0.10 mg（精确至0.01 mg），用三氯甲烷（4.4）溶解定容至10 mL。此标准溶液浓度为0.01 mg/mL。溶液转移至棕色玻璃瓶中后，在-20 °C 电冰箱内保存，备用。

4.14 黄曲霉毒素M₁标准系列溶液：吸取黄曲霉毒素M₁ 标准储备溶液（4.13）10 μL于10 mL容量瓶中，用氮气将三氯甲烷吹至近干，空白基质溶液（4.12）定容至刻度，所得浓度为10 ng/mL的M₁标准中间溶液。再用空白基质溶液（4.12）将黄曲霉毒素M₁标准中间溶液稀释为0.5 ng/mL、0.8 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、6.0 ng/mL、8.0 ng/mL的系列标准工作液。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-质谱联用仪，带电喷雾离子源。

5.2 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3¹，柱长100 mm，柱内径2.1 mm；填料粒径1.8 μm，或同等性能的色谱柱。

5.3 天平：感量为0.001 g和0.00001 g。

5.4 匀浆器。

5.5 超声波清洗器。

5.6 离心机：转速≥6000 转/分钟。

5.7 50 mL具塞PVC离心管。

5.8 水浴：温控30 °C±2 °C，50 °C±2 °C，温度范围25 °C~60 °C。

5.9 容量瓶：100 mL。

5.10 玻璃烧杯：250 mL，50 mL。

5.11 带刻度的磨口玻璃试管：5 mL，10 mL，20 mL。

5.12 移液管：1.0 mL，2.0 mL和50.0 mL。

5.13 玻璃棒。

5.14 10目圆孔筛。

5.15 250 mL分液漏斗。

5.16 100 mL圆底烧瓶。

5.17 旋转蒸发仪。

¹给出这一信息是为了方便本标准的使用者，并不表示对该产品的认可，如果其他等效产品具有相同的效果，则可使用这些等效的产品。

- 5.18 pH计：精度为0.01。
- 5.19 250 mL具塞锥形瓶。
- 5.20 免疫亲和柱：针筒式 3 mL。
- 5.21 10 mL和50 mL一次性注射器。
- 5.22 固相萃取装置（带真空系统）。
- 5.23 一次性微孔滤头：带0.22 μm微孔滤膜（水相系）。

6 分析步骤

6.1 试液提取

6.1.1 乳：称取50 g(精确至0.01 g)混匀的试样，置于50 mL具塞离心管(5.7)中，在水浴(5.8)中加热到35℃~37℃。在6000 转/分钟下离心15 min。收集全部上清液，供净化用。

6.1.2 发酵乳(包括固体状、半固体状和带果肉型)：称取50 g(精确至0.01 g)混匀的试样，用0.5 mol/L 的氢氧化钠溶液(4.11)在酸度计(5.18)指示下调pH至7.4，在 9500 转/分钟下匀浆(5.4)5 min，以下按 6.1.1 进行操作。

6.1.3 乳粉和粉状婴幼儿配方食品：称取 10 g(精确至0.01 g)试样，置于250 mL 烧杯中。将50 mL 已预热到50℃的水加入到乳粉中，用玻璃棒将其混合均匀。如果乳粉仍未完全溶解，将烧杯置于50℃的水浴(5.8)中放置30 min。溶解后冷却至20℃，移入100 mL 容量瓶中，用少量的水分次洗涤烧杯，洗涤液一并移入容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀后分别移至两个50 mL离心管(5.7)中，在6000转/分钟下离心15 min，混合上清液，用移液管移取50mL上清液供净化处理用。

6.1.4 干酪：称取经切细、过10目圆孔筛混匀的试样5g(精确至0.01 g)，置于50 mL离心管(5.7)中，加2 mL水和30 mL甲醇，在9500 转/分钟下匀浆5 min，超声提取30 min，在6000 转/分钟下离心15 min。收集上清液并移入250 mL分液漏斗中。在分液漏斗中加入30 mL石油醚(4.3)，振摇2 min，待分层后，将下层移于50 mL烧杯中，弃去石油醚层。重复用石油醚提取2次。将下层溶液移到100 mL圆底烧瓶中，减压浓缩至约2 mL，浓缩液倒入离心管中，烧瓶用乙腈-水溶液(1+4)(4.7) 5 mL分2次洗涤，洗涤液一并倒入50 mL离心管中，加水稀释至约50 mL，在6000 转/分钟下离心 5 min，上清液供净化处理。

6.1.5 奶油：称取5g(精确至0.01 g)试样，置于50 mL烧杯中，用20 mL石油醚(4.3)将其溶解并移于250mL具塞锥形瓶中。加20 mL水和30 mL甲醇，振荡30 min后，将全部液体移于分液漏斗中，待分层后，将下层溶液全部移到100 mL圆底烧瓶中，在旋转蒸发仪(5.17)中减压浓缩至约5 mL，加水稀释至约50 mL，供净化处理。

6.2 净化

6.2.1 免疫亲和柱的准备

将一次性的50 mL注射器筒与亲和柱(5.20)上顶部相串联，再将亲和柱与固相萃取装置连接起来。

注：根据免疫亲和柱的使用说明书要求，控制试液的pH值。

6.2.2 试样的纯化

将以上 6.1 试液提取液移至 50 mL 注射器筒(5.21)中，调节固相萃取装置的真空系统，控制试样以 2 mL/分钟~3 mL/分钟稳定的流速过柱。取下 50 mL 的注射器筒，装上 10 mL 注射器筒。注射器筒内加入水，以稳定的流速洗柱，然后，抽干亲和柱。脱开真空系统，在亲和柱下部放入 10 mL 刻度试管，上部装上另一个 10 mL 注射器筒，加入 4 mL 乙腈(4.2)，洗脱黄曲霉毒素 M₁，洗脱液收集在刻度试管中(5.11)中，洗脱时间不少于 60 秒。然后用氮气缓缓地在 30℃下将洗脱液蒸发至近干（如果蒸发至干，会损失黄曲霉毒素 M₁），用乙腈-水溶液(1+9)稀释至 1 mL。

6.3 液相色谱参考条件

流动相：A 液，0.1% 甲酸溶液；B 液，乙腈-甲醇溶液（1+1）。

梯度洗脱：参见附录A中的表A.1。

流动相流动速度：0.3 mL/min。

柱温：35 ℃。

试液温度：20 ℃。

进样量：10 μL。

6.4 质谱参考条件

检测方式：多离子反应监测（MRM），详见表1中母离子、子离子和碰撞能量。扫描图参见附录A中的图A.1。

表1 离子选择参数表

黄曲霉毒素	母离子	定量子离子	碰撞能量	定性子离子	碰撞能量	离子化方式
M ₁	329.0	273.5	22	259.5	22	ESI+

离子源控制条件：参见附录A中的表A.2。

6.5 定性

试样中黄曲霉毒素 M₁ 色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围应在±2.5%之内。

黄曲霉毒素 M₁ 的定性离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 3 (S/N≥3)，定量离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于 10 (S/N≥10)。

每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不得超过表 2 规定的范围。

表 2 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

各检测目标化合物以保留时间和两对离子（特征离子对/定量离子对）所对应的 LC-MS/MS 色谱峰面积相对丰度进行定性。要求被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物的保留时间一致（一致的条件是偏差小于 20%），同时要求被测试样中目标化合物的两对离子对应 LC-MS/MS 色谱峰面积比与标准溶液中目标化合物的面积比一致。

6.6 试样测定

按照 6.3 和 6.4 确立的条件，测定试液（6.2）和标准系列溶液（4.14）中黄曲霉毒素 M₁ 的离子强度，外标法定量。色谱图见附录 A 的图 A.2。

色谱参考保留时间：黄曲霉毒素 M₁ 3.23 min。

6.7 空白试验

不称取试样，按6.5的步骤做空白实验。应确认不含有干扰被测组分的物质。

6.8 标准曲线绘制

将标准系列溶液（4.14）由低到高浓度进样检测，以峰面积-浓度作图，得到标准曲线回归方程。

6.9 定量测定

待测样液中被测组分的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围时，则应将样液用空白基质溶液稀释后重新进样分析或减少取样量，重新按6.1进行处理后再进样分析。

7 分析结果的表述

外标法定量，按式（1）计算黄曲霉毒素M₁的残留量。

$$X = \frac{A \times V \times f \times 1}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中黄曲霉毒素 M₁ 的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

A——试样中黄曲霉毒素 M₁ 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V——样品定容体积，单位毫升（mL）；

f——样液稀释因子；

m——试样的称样量，单位克（g）。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

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 10 %。

第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

9 原理

亲和柱内含有的黄曲霉毒素 M₁ 特异性单克隆抗体交联在固体支持物上，当试样通过亲和柱时，抗体选择性的与黄曲霉毒素 M₁ (抗原) 键合，形成抗体—抗原复合体。用水洗柱除去柱内杂质，然后用洗脱剂洗脱吸附在柱上的黄曲霉毒素 M₁，收集洗脱液。用带有荧光检测器的高效液相色谱仪测定洗脱液中黄曲霉毒素 M₁ 含量。

10 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 免疫亲和柱：亲和柱的最大容量不小于100 ng黄曲霉毒素M₁ (相当于50 mL浓度为2 μg/L的试样)，当标准溶液含有4 ng黄曲霉毒素M₁ (相当于50 mL浓度为80 ng/L的试样)时回收率不低于80 %。应该定期检查亲和柱的柱效和回收率，对于每个批次的亲和柱至少检查一次(见10.1.1和10.1.2)。

10.1.1 柱效检查

用移液管(11.4)移取 1.0 mL 的黄曲霉毒素 M₁ 标准储备液(10.5.2)到 20 mL 的锥形试管中(11.9)。用恒流的氮气(10.3)将液体慢慢吹干，然后用 10 mL 10 %的乙腈水溶液(10.2.2)溶解残渣，用力摇荡。

将该溶液加入到 40 mL 的水中，充分混匀，全部通过免疫亲和柱(10.1)。按说明书要求使用免疫亲和柱。淋洗免疫亲和柱后，洗脱黄曲霉毒素 M₁。将洗脱液进行适当稀释后，用高效液相色谱仪测定免疫亲和柱键合的黄曲霉毒素 M₁ 含量。

计算黄曲霉毒素 M₁ 的回收率，将其结果与 10.1 中所要求的指标进行比较。

10.1.2 回收率检查

用移液管(11.4)移取 0.8 mL 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 的黄曲霉毒素 M_1 标准工作液(10.5.3)到 10 mL 的水中,充分混匀,全部通过免疫亲和柱。按说明书使用免疫亲和柱。淋洗免疫亲和柱,洗脱下黄曲霉毒素 M_1 。将洗脱液进行适当稀释后,用高效液相色谱仪测定免疫亲和柱键合的黄曲霉毒素 M_1 含量。计算黄曲霉毒素 M_1 的回收率,将其结果与 10.1 中所要求的指标进行对比。

10.2 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。

10.2.1 25%乙腈水溶液: 将250 mL的乙腈(10.2)与750 mL的水混溶(使用前需要脱气)。

10.2.2 10%乙腈水溶液: 将100 mL的乙腈(10.2)与900 mL的水混溶(使用前需要脱气)。

10.3 氮气(N_2)。

10.4 三氯甲烷: 加入0.5%~1.0%质量比(与三氯甲烷质量比)的乙醇进行稳定。

10.5 黄曲霉毒素 M_1 标准溶液, 纯度 $\geq 98\%$ 。

10.5.1 浓度的校正

黄曲霉毒素 M_1 三氯甲烷标准溶液浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。根据下面的方法,在最大吸收波段处测定溶液的吸光度,以确定黄曲霉毒素 M_1 的实际浓度。

用分光光度计(11.11)在 340 nm~370 nm 处测定,扣除三氯甲烷的空白本底,读取标准溶液的吸光度值。在接近 360 nm 最大吸收波段 λ_{max} 处,测得吸光度值为 A ,根据式(2)计算浓度值:

$$c_i = \frac{A \times M \times 100}{\varepsilon} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

c_i ——黄曲霉毒素 M_1 实际浓度,单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);

A ——在 λ_{max} 处测得的吸光度值;

M ——328 g/mol, 黄曲霉毒素 M_1 摩尔质量,单位为克每摩尔 (g/mol);

ε ——19950, 溶于三氯甲烷中的黄曲霉毒素 M_1 的吸光系数,单位为平方米每摩尔 (m^2/mol)。

10.5.2 标准储备液

确定黄曲霉毒素 M_1 标准溶液的实际浓度值后(10.5.1),继续用三氯甲烷将其稀释为浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的储备液。储备液密封后于冰箱中 5 $^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存。在此条件下,储备液可以稳定两个月。

10.5.3 黄曲霉毒素 M_1 标准工作液

从冰箱中取出标准储备液(10.5.2)放置至室温,移取一定量的储备液进行稀释制备成工作液。工作液临用前配制。

黄曲霉毒素 M_1 标准工作液配制: 用移液管(11.4)准确移取 1.0 mL 的储备液(10.5.2)到 20 mL 的锥形试管中(11.9),用和缓的氮气(10.3)将溶液吹干,然后用 20.0 mL 10% 的乙腈水溶液(10.2.2)将残渣重新溶解,30 min 内振摇,混匀,配成浓度为 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 的黄曲霉毒素 M_1 标准工作液。在用氮气对储备液吹干的过程中,一定要仔细操作,避免因温度降低太多而出现结露。

在作标准曲线时,黄曲霉毒素 M_1 的进样绝对含量分别是 0.05 ng、0.1 ng、0.2 ng、0.4 ng。根据高效液相色谱仪进样环的容积量,用工作液配置一系列适当浓度的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液,稀释液用 10% 乙腈水溶液(10.2.2)。

11 仪器和设备

11.1 一次性注射器: 10 mL和50 mL。

11.2 真空系统。

- 11.3 离心机：转速 ≥ 7000 转/分钟。
- 11.4 移液管：1.0 mL、2.0 mL和50.0 mL。
- 11.5 玻璃烧杯：250 mL。
- 11.6 容量瓶：100 mL。
- 11.7 水浴：温控 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ， $50\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，温度范围 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 11.8 滤纸：中速定性滤纸。
- 11.9 带刻度的磨口锥形玻璃试管：5 mL、10 mL、20 mL。
- 11.10 高效液相色谱仪
- 11.10.1 无脉冲泵：适合恒定体积流量约1 mL/min的泵。
- 11.10.2 进样系统：具有固定或可变容积的进样环，进样体积50 μL ~500 μL 。
- 11.10.3 反相色谱柱：填充3 μm 或者5 μm 的十八烷基硅胶，加有填充反相材料的保护柱。
- 11.10.4 荧光检测器：具有365 nm激发波长、435 nm发射波长，在适当的色谱条件下能够测定0.02 ng的黄曲霉毒素M₁（相当于5倍噪音）。
- 11.11 紫外分光光度计：波长范围为200 nm~400 nm。
- 11.12 天平：感量为0.01 g。

12 分析步骤

所有的操作分析均应在避光条件下进行。

12.1 试样制备

- 12.1.1 乳：将试样在水浴（11.7）中加热到 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。用滤纸（11.8）过滤（根据情况，可以使用多层滤纸进行过滤），或者在7000 转/分钟离心15 min。至少收集50 mL试样，按照12.4继续操作。
- 12.1.2 乳粉：称取10 g样品（精确到0.1 g），置于250 mL的烧杯（11.5）中。将50 mL已预热到 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水多次少量地加入到乳粉中，用搅拌棒将其混合均匀。如果乳粉不能完全溶解，将烧杯在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴（11.7）中放置至少30 min,仔细混匀。将溶解的乳粉冷却至 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后，移入100 mL容量瓶（11.6）中，用少量的水分次淋洗烧杯，淋洗液一并移入容量瓶中，再用水定容至刻度。用滤纸（11.8）过滤乳，或者在7000转/分钟下离心15 min。至少收集50 mL的乳试样，按照12.4继续进行分析。
- 12.1.3 发酵乳：按照“第一法”中6.1.2的前处理方法进行。
- 12.1.4 干酪：按照“第一法”中6.1.4的前处理方法进行。
- 12.1.5 奶油：按照“第一法”中6.1.5的前处理方法进行。

12.2 免疫亲和柱的准备

将一次性的50 mL注射器筒（11.1）与亲和柱（10.1）的顶部相连，再将亲和柱与真空系统（11.2）连接起来。

12.3 试样的提取与纯化

用移液管移取50 mL试样（12.1.1或12.1.2）到50 mL注射器（11.1）中，调节真空系统（11.2），控制试样以2 mL/min~3 mL/min稳定的流速过柱。

取下50 mL的注射器，装上10 mL注射器。注射器内加入10 mL水，以稳定的流速洗柱，然后，

抽干亲和柱。

脱开真空系统，装上另一个 10 mL 注射器，加入 4 mL 乙腈(10.2)。缓缓推动注射器栓塞，通过柱塞控制流速，洗脱黄曲霉毒素 M_1 ，洗脱液收集在锥形管(11.9)中，洗脱时间不少于 60 s。然后用和缓的氮气(10.3)在 30 °C 下将洗脱液蒸发至体积为 50 μL ~500 μL (如果蒸发至干，会损失黄曲霉毒素 M_1)。再用水稀释 10 倍至最终体积为 V_f (即 500 μL ~5000 μL)。

注：如果注入高效液相色谱仪含黄曲霉毒素 M_1 的样品，乙腈含量超过 10%，色谱峰变宽。如果水含量超过 90%，则对色谱峰的形状没有影响。

12.4 高效液相色谱分析

12.4.1 色谱条件

色谱柱： C_{18} ，长 25 cm，内径 4.6 mm；

流动相：25% 乙腈水溶液(10.2.1)；

流速：1 mL/min。

12.4.2 黄曲霉毒素 M_1 的标准曲线

根据高效液相色谱仪进样环容积，选择适当进样体积数 V_i ，分别注入含有 0.05 ng、0.1 ng、0.2 ng 和 0.4 ng 的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。绘制成峰面积或峰高对黄曲霉毒素 M_1 质量的标准曲线。

12.4.3 色谱分析

根据样品洗脱液色谱图中黄曲霉毒素 M_1 的峰高或峰面积值，从标准曲线上得出样品洗脱液中所含有的黄曲霉毒素 M_1 质量数(ng)。

如果样品洗脱液的黄曲霉毒素 M_1 的峰面积或峰高值高于标准曲线范围，用水定容稀释样品洗脱液后，重新进样分析。

13 分析结果的表述

13.1 乳

应用式(3)计算被测样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量 ω_m 。

$$\omega_m = \frac{m_A \times V_f \times 1}{V_i \times V} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ω_m ——黄曲霉毒素 M_1 的含量，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

m_A ——样品洗脱液黄曲霉毒素 M_1 的峰面积或峰高从标准曲线上得出的黄曲霉毒素 M_1 的质量，单位为纳克(ng)；

V_i ——样品洗脱液的进样体积，单位为微升 (μL)；

V_f ——样品洗脱液的最终体积，单位为微升 (μL)；

V ——通过免疫亲和柱被测样品的体积，单位为毫升 (mL)。

式(3)适用于未经稀释的试样，否则应该乘以稀释倍数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

13.2 乳粉

应用式(4)计算被测样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量 ω_p 。

$$\omega_p = \frac{m_A \times V_f \times 1}{V_i \times m} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

ω_p ——黄曲霉毒素 M_1 的含量, 单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$);

m ——50mL 样液(12.3)中所含乳粉质量, 单位为克(g)。

m_A 、 V_F 、 V_i 的含义与 13.1 中所定义的一样。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示, 结果保留三位有效数字。

14 精密度

各实验室试验结果的精密度总结于附录 B 中, 这些数据不适用于其他的污染水平和被测样。

第三法 免疫层析净化荧光分光光度法

15 原理

试样经过离心、脱脂、过滤, 滤液经含有黄曲霉毒素 M_1 特异性单克隆抗体的免疫亲和柱层析净化, 黄曲霉毒素 M_1 交联在层析介质中的抗体上。此抗体对黄曲霉毒素 M_1 具有专一性, 当样品通过亲和柱时, 抗体选择性的与所有存在的黄曲霉毒素 M_1 (抗原)键合。用甲醇-水(1+9)将免疫亲和柱上杂质除去, 以甲醇-水(8+2)通过免疫亲和柱洗脱, 将溴溶液衍生后的洗脱液置于荧光光度计中测定黄曲霉毒素 M_1 含量。

16 试剂和材料

除非另有规定, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

16.1 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。

16.2 氯化钠(NaCl)。

16.3 甲醇-水(1+9): 取10 mL甲醇加入90 mL水。

16.4 甲醇-水(8+2): 取80 mL甲醇加入20 mL水。

16.5 溴溶液储备液(0.01 %): 称取适量溴, 溶于水后, 配成0.01%的储备液, 避光保存。

16.6 溴溶液工作液(0.002 %): 取10 mL 0.01 %的溴溶液储备液加入40 mL水混匀, 于棕色瓶中保存备用。现用现配。

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

16.8 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1000 mL。

16.9 荧光光度计校准溶液: 称取0.340 g 二水硫酸奎宁, 用0.05 mol/L硫酸溶液(16.8)溶解并定容至100 mL, 此溶液荧光光度计读数相当于2.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。0.05 mol/L硫酸溶液(16.8)荧光光度计读数相当于0.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 黄曲霉毒素 M_1 。

17 仪器和设备

17.1 荧光光度计。

17.2 离心机: 转速 ≥ 7000 转/分钟。

17.3 玻璃纤维滤纸: 直径 11 cm, 孔径1.5 μm 。

- 17.4 黄曲霉毒素M₁免疫亲和柱。
- 17.5 空气压力泵。
- 17.6 玻璃试管:直径12 mm,长75 mm,无荧光特性。
- 17.7 玻璃注射器:10 mL。

18 分析步骤

18.1 试样提取

18.1.1 乳:取50.0 mL试样,加入1.0 g氯化钠(16.2),7000转/分钟下离心10 min,小心移取用于分析的乳底脱脂层,不要碰触顶部脂肪层,将脱脂的乳以玻璃纤维滤纸(17.3)过滤,滤液备用。

18.1.2 乳粉:称取5 g试样(精确至0.01 g),用30℃~60℃水将其慢慢溶解,定容至50 mL,加入1.0 g氯化钠(16.2),以下按18.2的步骤操作。

18.2 净化

将免疫亲和柱(17.4)连接于10 mL玻璃注射器(17.7)下。准确移取10.0 mL上述滤液(18.1)注入玻璃注射器中,将空气压力泵(17.5)与注射器连接,调节压力使溶液以约6 mL/min流速缓慢通过免疫亲和柱(17.4),直至2 mL~3 mL空气通过柱体。以10 mL甲醇-水(1+9)(16.3)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(V₁)甲醇-水(8+2)(16.4)洗脱液洗脱,流速为1 mL/min~2 mL/min,收集全部甲醇-水洗脱液于玻璃试管(17.6)中,备用。

18.3 测定

18.3.1 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的硫酸溶液(16.8)为空白,调节荧光光度计的读数值为0.0 μg/L;以荧光光度计校准溶液(16.9)调节荧光光度计的读数值2.0 μg/L。

18.3.2 样液测定

取上述洗脱液加入1.0 mL(V)0.002%溴溶液,1 min后立即于荧光光度计测定样液中黄曲霉毒素M₁含量c₁。

18.3.3 空白试验

用水代替试样,按18.1~18.3步骤做空白试验。

19 分析结果的表述

19.1 乳

乳检测结果按式(5)计算:

$$X_1 = \frac{(C_1 - C_0) \times V_1 \times 10}{V} \dots\dots\dots (5)$$

式中:

X₁——试样中黄曲霉毒素M₁含量,单位为微克每升(μg/L);

C₁——荧光光度计中读取的样液中黄曲霉毒素M₁的浓度,单位为微克每升(μg/L);

C₀——荧光光度计中读取的空白试验中黄曲霉毒素M₁的浓度,单位为微克每升(μg/L);

V_1 ——最终净化甲醇-水(8+2)洗脱液体积,单位为毫升(mL);

V ——通过亲和柱试样体积,单位为毫升(mL);

10——仪器的读数系数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留到小数点后一位。

19.2 乳粉

乳粉检测结果按式(6)计算:

$$X_2 = \frac{(C_2 - C_0) \times V_1 \times 10 \times V}{m} \dots\dots\dots (6)$$

式中:

X_2 ——试样中黄曲霉毒素 M_1 含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_2 ——荧光光度计中读取的样液中黄曲霉毒素 M_1 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

C_0 ——荧光光度计中读取的空白试验中黄曲霉毒素 M_1 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V_1 ——最终净化甲醇-水(8+2)洗脱液体积,单位为毫升(mL);

V ——通过亲和柱试样体积,单位为毫升(mL);

m ——50 mL试样中所含乳粉的质量,单位为克每毫升(g/mL);

10——仪器的读数系数。

以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留到小数点后一位。

第四法 双向酶联免疫法

20 原理

利用酶联免疫竞争原理,样品中残留的黄曲霉毒素 M_1 与定量特异性酶标抗体反应,多余的游离酶标抗体则与酶标板内的包被抗原结合,通过流动洗涤,加入酶显色底物显色后,与标准点比较定性。

21 试剂和材料

除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

21.1 黄曲霉毒素 M_1 双向酶联免疫试剂盒,2℃~7℃保存。

21.1.1 黄曲霉毒素 M_1 系列标准溶液。

21.1.2 酶联免疫试剂颗粒(含特异性酶标抗体)。

21.1.2.1 抗黄曲霉毒素 M_1 抗体。

警告:不应破损,否则立即销毁。

21.1.2.2 酶结合物。

21.1.3 酶显色底物。

22 仪器和设备

22.1 样品试管,带有密封盖,内置酶联免疫试剂颗粒(21.1.2)。

22.2 移液器（管），450 $\mu\text{L} \pm 50 \mu\text{L}$ 。

22.3 酶联免疫检测加热器，40 $^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。

22.4 双流向酶联免疫检测读数仪。

23 分析步骤

23.1 加热器（22.3）预热到45 $^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ，并至少保持15 min。

23.2 液体试样或乳粉试样复原后振摇混匀，移取450 μL 至样品试管（22.1）中，充分振摇，使其中的酶联免疫试剂颗粒（21.1.2）完全溶解。

23.3 将样品试管（22.1）和酶联免疫检测试剂盒（21.1）同时置于预热过的加热器内保温，保温时间5 min~6 min。使试样中的黄曲霉毒素 M_1 和酶联免疫试剂颗粒中的酶标记黄曲霉毒素 M_1 抗体结合。

23.4 将样品试管内的全部内容物倒入试剂盒（21.1）的样品池中，样品将流经“结果显示窗口”向绿色的激活环流去。

23.5 当激活环的绿色开始消失变为白色时，立即用力按下激活环按键。

23.6 试剂盒（21.1）继续放置在加热器（22.3）中保温保持4 min，使显色反应完成。

23.7 将试剂盒从加热器中取出水平放置，立即进行检测结果判读，结果判读应在1 min内完成。

24 分析结果的表述

24.1 目测判读结果

试样点的颜色深于质控点，或两者颜色相当，检测结果为阴性。

试样点的颜色浅于质控点，检测结果为阳性。

24.2 双流向酶联免疫检测读数仪判读结果

数值 ≤ 1.05 ，显示Negative，检测结果为阴性。

数值 > 1.05 ，显示Positive，检测结果为阳性。

注：阳性样品需用第一法定量检测方法进一步确认。

25 其他

本标准第一法的定量限为 0.01 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （以乳汁）；第二法乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的最低检测限为 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，乳中黄曲霉毒素 M_1 的最低检测限为 0.008 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；第三法乳中的黄曲霉毒素 M_1 的检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；第四法的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

附录A

(资料性附录)

黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法色谱图及参考条件A.1 黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法色谱图及参考条件

免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法黄曲霉毒素 M₁ 子离子扫描图见图 A.1。

免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法黄曲霉毒素 M₁ 色谱质谱图见图 A.2。

免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法液相色谱梯度洗脱条件见表 A.1。

免疫亲和层析净化 液相色谱—串联质谱法离子源控制条件见表 A.2。

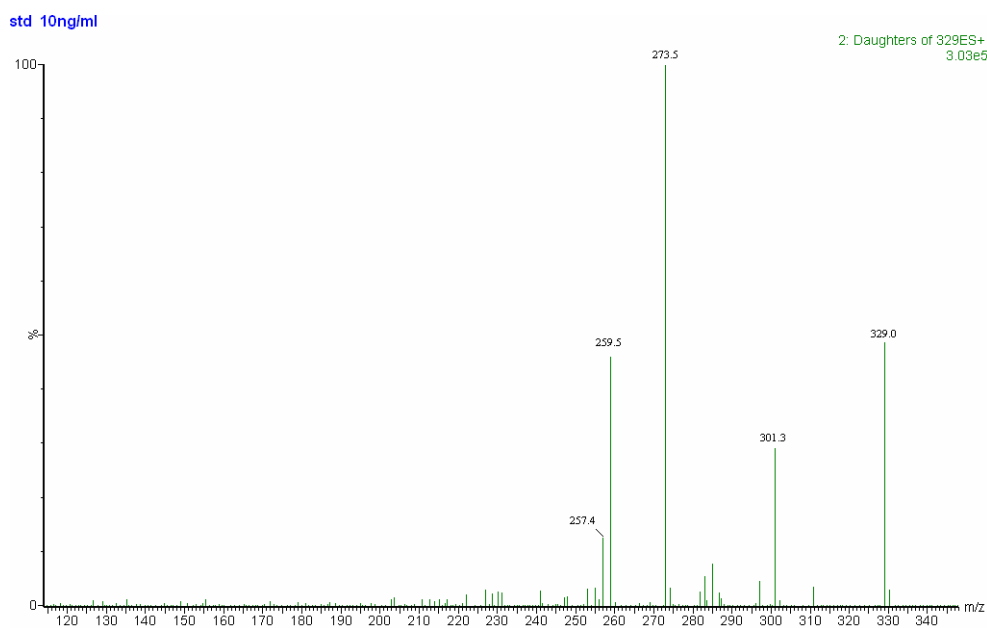
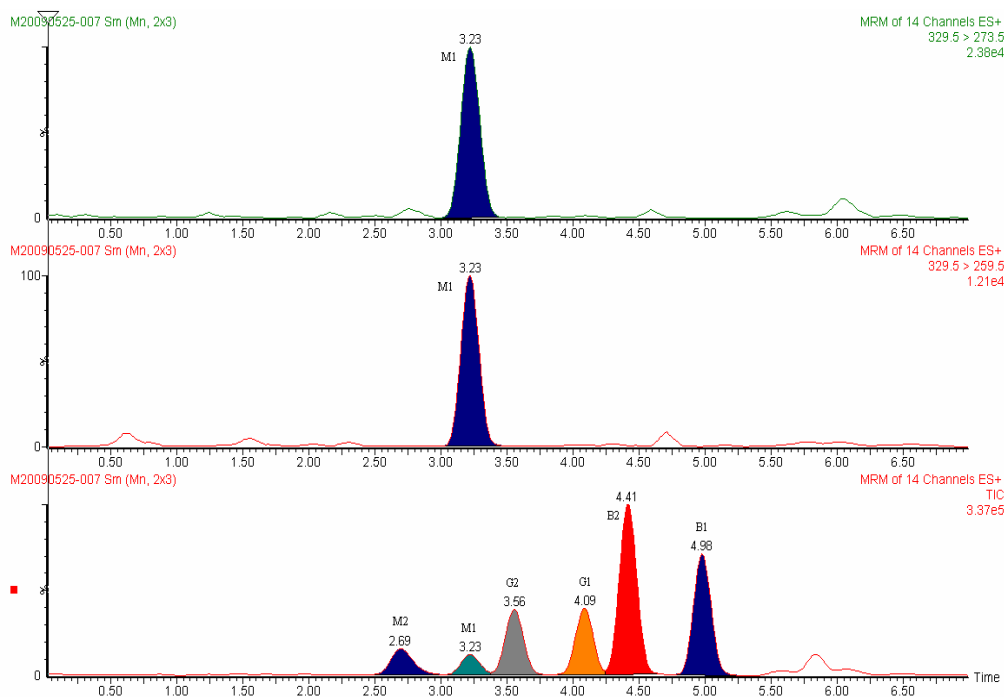
图 A.1 黄曲霉毒素 M₁ 子离子扫描图图 A.2 黄曲霉毒素 M₁ 色谱质谱图

表 A.1 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	梯度变化曲线
0	68.0	32.0	-
4.20	55.0	45.0	6
5.00	0.0	100.0	6
5.70	0.0	100.0	1
6.00	68.0	32.0	6

注:1为即时变化,6为线性变化。

表 A.2 离子源控制条件

电离方式	电喷雾电离, 负离子
毛细管电压 (kV)	3.5
锥孔电压 (V)	45
射频透镜1电压 (V)	12.5
射频透镜2电压 (V)	12.5
离子源温度 (°C)	120
锥孔反吹气流量 (L/h)	50
脱溶剂气温度 (°C)	350
脱溶剂气流量 (L/h)	500
电子倍增电压 (V)	650

附 录 B
(资料性附录)
多个不同实验室的试验结果

世界各地 16 个实验室参加了低脂肪(1%)和高脂肪(28%)乳粉样品的协同试验。高脂肪样品是用于制作参比物质的剩留物,所以黄曲霉毒素 M₁ 的含量是已知的。

对于乳粉,其污染水平为 0.08 μg/kg~0.6 μg/kg,即对于乳而言,污染水平为 8 ng/L~60 ng/L。试验结果根据 ISO 5725-1 和 ISO 5725-2 规定的统计方法获得,其精密度的数据列于表 B.1。

表 B.1 精密度数据

样品编号	1	2	3	4	5
实验室个数 ^a	12	4	13	11	14
平均值/(ng/kg)	81	150	80	202	580
重复性值 r/(ng/kg)	23	60.1	15	27	203
再现性值 R/(ng/kg)	52	98	41	61	310
重复性变异系数/(%)	9.9	14.0	6.8	4.7	12.5
复验性变异系数/(%)	23	22.7	18.3	10.8	19.1

^a 减少的实验室数是根据 Cochran 和 Grubbs 统计方法应该从样本中剔除的数据

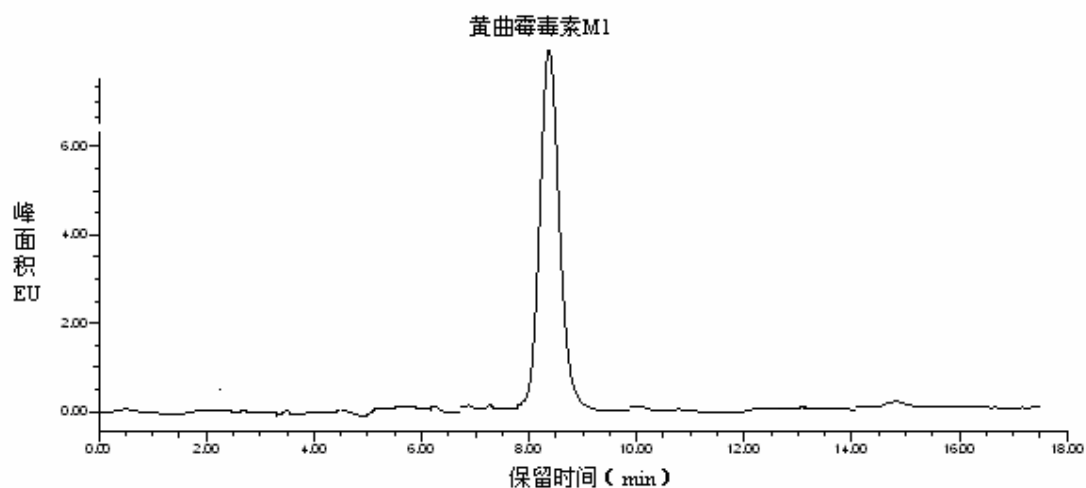


图 B.1 高效液相色谱分离黄曲霉毒素M₁的标准图