中华人民共和国国家标准

GB 5009.24—2010

食品安全国家标准

食品中黄曲霉毒素 M_1 和 B_1 的测定

National food safety standard

Determination of aflatoxins M_1 and B_1 in foods

2010-03-26 发布　　2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部　发布

前　言

本标准代替 GB/T 5009.24-2003《食品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的测定》。

本标准所代替的历次版本发布情况为：

——GB/T 5009.24-1985、GB/T 5009.24-1996、GB/T 5009.24-2003。

食品安全国家标准

食品中黄曲霉毒素M_1和B_1的测定

1 范围

本标准规定了牛乳及其制品、奶油及新鲜猪组织（肝、肾、血及瘦肉）等食品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的测定方法。

本标准适用于牛乳及其制品、奶油及新鲜猪组织（肝、肾、血及瘦肉）等食品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的测定。

2 原理

样品经提取、浓缩、薄层分离后，黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 在紫外光（波长 365nm）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 试剂和材料

3.1 甲醇：分析纯。

3.2 石油醚：分析纯。

3.3 三氯甲烷：分析纯。

3.4 无水硫酸钠：分析纯。

3.5 异丙醇：分析纯。

3.6 硅胶 G：层析用。

3.7 氯化钠及氯化钠溶液（40 g/L）。

3.8 硫酸（1+3）。

3.9 玻璃砂：用酸处理后洗净干燥，约相当 20 目。

3.10 黄曲霉毒素 M_1 标准溶液：用三氯甲烷配制成每毫升相当于 10μg 的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。以三氯甲烷作空白试剂，黄曲霉毒素 M_1 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。

3.11 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 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 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1。避光，置于 4℃冰箱中保存。

4 仪器和设备

4.1 10 目圆孔筛。

4.2 小型粉碎机。

4.3 玻璃板：5 cm×20 cm。

4.4 展开槽：长 25 cm，宽 6 cm，高 4 cm。

4.5 紫外光灯：100 W～125 W，带 365 nm 滤光片。

4.6 微量注射器。

5 分析步骤

整个操作需在暗室条件下进行。

5.1 样品提取

5.1.1 样品提取制备表，见表 1。

表 1 试样制备

样品名称	称样量/（g）	加水量/（mL）	加甲醇量/（mL）	提取液量[α]/（mL）	加 40g/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
奶油	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

[α] 提取液量按式（1）计算：

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

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 30g，牛乳粉、乳酪的取样量为 15g）；

B——加水量，单位为毫升（mL）；

注：样品中的水分量参照《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 40g/L 的氯化钠溶液的体积等于甲醇和水的总体积（87mL）减去提取液的体积（mL）。

5.1.2 乳与炼乳：称取 30.00 g 混匀的样品，置于小烧杯中，再分别用 90 mL 甲醇移于 300mL 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 乳与 52 mL 炼乳（各相当于 16 g 样品）提取液。

5.1.3 乳粉：取 15.00 g 样品，置于具塞锥形瓶中，加入 20 mL 水，使样品湿润后再加入 90 mL 甲醇，以下按 5.1.3 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 样品）。

5.1.4 干酪：称取 15.00 g 切细、过 10 目圆孔筛混匀样品，置于具塞锥形瓶中，加 5 mL 水和 90 mL 甲醇，以下按 5.1.3 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 样品）。

5.1.5 奶油：称取 10.00 g 样品，置于小烧杯中，用 40 mL 石油醚将奶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，按上表收集 80 mL 提取液（相当于 8 g 样品）于具塞量筒中。

5.1.6 新鲜猪组织：取新鲜或冷冻保存的猪组织样品（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，将各样品置于 300 mL 具塞锥形瓶中，加入 90 mL 甲醇，以下按 5.1.3 自“振荡 30 min……”起依法操作。按上表收集 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 样品）。

5.2 净化

5.2.1 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。奶油样液总共用石油醚提取两次，每次 40 mL。

5.2.2 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。

5.2.3 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。

5.3 测定

5.3.1 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 1d～2d。

5.3.2 点板

取薄层板（5 cm×20 cm）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 M_1 与 B_1 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 2 点上再滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 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。

5.3.3 展开

5.3.3.1 横展：在槽内加入 15 mL 事先用无水硫酸钠脱水的无水乙醚（每 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。

5.3.3.2 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。

5.3.3.3 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 5.3.3.1。

5.3.4 观察与评定结果

5.3.4.1 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 M_1 与 B_1 标准点的相应处出现最低检出量（M_1 与 B_1 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，则样品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 含量在其所定的方法灵敏度以下（见表 1）。

5.3.4.2 如果第一板的相同位置上出现黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 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。

5.3.5 稀释定量

样液中的黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 荧光点的荧光强度与黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的最低检出量（0.0004 μg）的荧光强度一致，则乳、炼乳、乳粉、干酪与奶油样品中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 的含量依次为 0.1 μg/kg、0.2 μg/kg、0.5 μg/kg、0.5 μg/kg 及 0.5 μg/kg；新鲜猪组织（肝、肾、血、瘦肉）样品均为 0.2 μg/kg（见表 1）。如样液中黄曲霉毒素 M_1 与 B_1 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。

5.3.6 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 M_1 和 B_1 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 M_1 和 B_1 点与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 M_1 和 B_1。

6 分析结果的表述

黄曲霉毒素 M_1 或 B_1 的含量按式（2）进行计算。

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

式中：

X——黄曲霉毒素 M_1 或 B_1 含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

V_1——样液浓缩后体积，单位为毫升(mL)；

V_2——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 M_1 或 B_1 的最低检出量，单位为微克（μg）。