

## FSPBKGD009 糕点 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定 薄层层析法

### F\_SP\_BK\_GD\_009

#### 糕点 - 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定 - 薄层层析法

##### 1 范围

本方法采用薄层层析法测定糕点中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的含量。

本方法适用于糕点中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量的测定, 结果表示为 μg/Kg, 测定值报告为整数位的数值。最低检出量为 0.0004 μg, 检出限为 5 μg/Kg。

##### 2 原理

试样中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 经提取、浓缩、薄层分离后, 在波长为 365nm 的紫外光下产生蓝色荧光, 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

###### 3.1 三氯甲烷

###### 3.2 乙腈

###### 3.3 苯 - 乙腈混合液, 98 + 2

取 98mL 苯与 2mL 乙腈混合。

###### 3.4 无水乙醚

###### 3.5 丙酮 - 三氯甲烷混合液, 8 + 92

取 8mL 丙酮与 92mL 三氯甲烷混合。

###### 3.6 硅胶 G 薄层层析板

###### 3.7 三氟乙酸

###### 3.8 黄曲霉毒素标准溶液, 10 μg/mL

准确称取 1 ~ 1.2mg 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准品, 先加入 2mL 乙腈溶解, 再用苯稀释定容至 100mL, 其浓度约为 10 μg/mL, 此标准溶液应通过紫外分光光度法测定其纯度, 并以溶剂调整其浓度为 10 μg/mL, 避光, 置于 4℃ 冰箱中保存。

###### 3.9 黄曲霉毒素标准使用液, 0.04 μg/mL

准确吸取 10 μg/mL 黄曲霉毒素标准溶液 (10 μg/mL) 0.40mL 于 100mL 容量瓶中, 加苯 - 乙腈混合液 (98 + 2) 至刻度, 混匀。此溶液相当于黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 0.04 μg/mL, 避光, 置于 4℃ 冰箱中保存。

##### 4 仪器

###### 4.1 薄层层析展开槽, 内长 25cm, 宽 6cm, 高 4cm, 或与薄层层析板尺寸配套者。

###### 4.2 紫外光灯, 100 ~ 125W, 带有波长 365nm 滤光片。

##### 5 试样制备

###### 5.1 取样

试样中污染黄曲霉毒素高的霉素一粒可以左右测度结果, 而且有毒霉素的比例小, 同时分部不均匀。为避免取样带来的误差, 应大量取样, 并将该大量试样粉碎, 混合均匀, 才有可能得到确能代表一批试样的相对可靠的结果, 因此采样应注意以下几点。

5.1.1 根据规定采取有代表性试样。

5.1.2 对局部发霉变质的试样检验时，应单独取样。

5.1.3 每份分析测定用的试样应从大样经粗碎与连续多次用四分法缩减至 0.5Kg~ 1Kg, 然后全部粉碎。必要时，每批试样可采用三份大样作试样制备及分析测定用，以观察所采试样是否具有-定的代表性。

## 5.2 提取

准确称取 20.00g 粉碎过筛试样（精确至 0.01g）置于 250mL 具塞锥形瓶中，加 30mL 正己烷或石油醚和 100mL 甲醇水溶液，在瓶塞上涂上一层水，盖严防漏。震荡 30min，静置片刻，以叠成折叠式的快速定性滤纸过滤于分液漏斗中，待下层甲醇水溶液分清后，放出甲醇水溶液于另一具塞锥形瓶内。取 20.00mL 甲醇水溶液（相当于 4g 试样）置于另一 125mL 分液漏斗中加 20mL 三氯甲烷，振摇 2min，静置分层，如出现乳化，则可滴加甲醇促使分层。放出三氯甲烷层，经盛有约 10g 预先用三氯甲烷润湿的无水硫酸钠的慢速滤纸，过滤于 50mL 蒸发皿中，再加 5mL 三氯甲烷于分液漏斗中，重复振摇提取，三氯甲烷层一并滤于蒸发皿中，最后用少量三氯甲烷洗过滤层，洗液并于蒸发皿中。将蒸发皿置于 65℃ 水浴上通风挥干，然后放在冰盒上冷却 2~3min 后，准确加入 1mL 苯 - 乙腈混合液（98+2）。用带橡皮头的滴管管尖将残渣充分混合，再用此滴管吸取上清液转移于 2mL 具塞试管中。

## 6 操作步骤

### 6.1 薄层板的制备

称取约 3g 硅胶 G，加相当于硅胶量 2~3 倍左右的水，用力研磨 1~2min 至成糊状后立即倒入涂布器内，推成 5cm × 20cm，厚度约 0.25mm 的薄层板三块。在空气中干燥约 15min 后，在 100℃ 活化 2h，取出，放干燥器中保存。一般可保存 2~3d，若放置时间较长，可再活化后使用。

### 6.2 样品的测定

#### 6.2.1 点样

将薄层板边缘附着的吸附剂刮净，在距薄层板下端 3cm 的基线上用微量注射器或血色素吸管滴加样液。一块板可滴加 4 个点，点距边缘和间距约为 1cm，点直径约为 3mm。在同一板上滴加点的大小应一致，滴加时可用吹风机用冷风边吹边加。滴加样式如下：

第一点：10 μL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液(0.04 μg/mL)。

第二点：20 μL 样液。

第三点：20 μL 样液 + 10 μL 0.04 μg/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液。

第四点：20 μL 样液 + 10 μL 0.2 μg/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液。

#### 6.2.2 展开与观察

在展开槽内加 10mL 无水乙醚，预展 12cm，取出挥干。再于另一展开槽内加 10mL 丙酮 - 三氯甲烷混合液（8+92），展开 10~12cm，取出。在紫外光下观察结果，方法如下。

由于样液点上加滴黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液，可使黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准点与样液中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 为 0.0004 μg，可用作检查在样液内黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 最低检出量是否正常出现；如为阳性，则起定性作用。薄层板上的第四点中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 为 0.002 μg，主要起定位作用。

若第二点在与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准点的相应位置上无蓝紫色荧光点，表示样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量在 5 $\mu$ g/Kg 以下；如在相应位置上有蓝紫色荧光点，则需进行确证试验。

### 6.2.3 确证试验

为了证实薄层板上样液荧光系由黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 产生的，加滴三氟乙酸，产生黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的衍生物，展开后此衍生物的比移植约在 0.1 左右。于薄层板左边依次滴加两个点。

第一点：10  $\mu$ L 0.04 $\mu$ g/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液。

第二点：20  $\mu$ L 样液。

于以上两点各加一小滴三氟乙酸盖于其上，反应 5min 后，用吹风机吹热风 2min 后，使热风吹到薄层板上的温度不高于 40 $^{\circ}$ C。再于薄层板上滴加以下两个点。

第三点：10  $\mu$ L 0.04 $\mu$ g/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液。

第四点：20  $\mu$ L 样液。

再展开 (6.2.2)，在紫外光灯下观察样液是否产生与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 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。

### 6.2.4 稀释定量

样液中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 荧光点的荧光强度如与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准点的最低检出量 (0.0004 $\mu$ g) 的荧光强度一致，则样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量即为 5 $\mu$ g/Kg。如样液中荧光强度比最低检出量强，则根据其强度估计减少滴加微升数或将样液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的荧光强度一致为止。滴加式样如下：

第一点：10  $\mu$ L 0.04 $\mu$ g/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准使用液。

第二点：根据情况滴加 10  $\mu$ L 样液。

第三点：根据情况滴加 15  $\mu$ L 样液。

第四点：根据情况滴加 20  $\mu$ L 样液。

## 7 结果计算

按下式计算样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的含量：

$$X = 0.0004 \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{1000}{m}$$

式中：X 样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的含量， $\mu$ g/Kg；

V<sub>1</sub> 加入苯 - 乙腈混合液的体积，mL；

V<sub>2</sub> 与标准点最低检出量 (0.0004 $\mu$ g) 荧光强度一致时，滴加样液的体积，mL；

m 样品的质量，g；

0.0004 — 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的最低检出量， $\mu$ g。

结果表示到测定值的整数位。

## 8 参考文献

GB/T 5009.22 - 1996 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的测定方法 内 第一法 薄层层析法。