

附件 1

ICS

X

团 体 标 准

T/CAQI XX—20XX

茶叶及茶制品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

Detection of aflatoxin B₁ in tea and tea products

征求意见稿

2022-xx-xx 发布

2022-xx-xx 实施

中 国 质 量 检 验 协 会 发布

前 言

本文件参照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容有可能涉及专利，本文件的发布机构不应承担识别这些专利的责任。

本文件由云南农业大学提出，由中国质量检验协会归口。

本文件主要起草单位：云南农业大学、吉林省产品质量监督检验院、云南省茶叶流通协会、湖南省茶叶流通协会、四川省茶叶流通协会、勐腊易武福元昌茶业有限公司、昆明七彩云南庆沣祥茶叶股份有限公司。

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

茶叶及茶制品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

1 范围

本文件提供了茶叶及茶制品中黄曲霉毒素 B₁（以下简称 AFT B₁）的测定方法。

本文件第一法为同位素稀释液相色谱-串联质谱法，第二法为高效液相色谱法，适用于绿茶、红茶、黄茶、黑茶、白茶、乌龙茶、再加工茶、固态速溶茶、茶多酚以及茶黄素中 AFT B₁ 的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅注日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 5009.22 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

第一法 同位素稀释液相色谱-串联质谱法

3 原理

试样中的黄曲霉毒素 B₁，用乙腈提取，固相萃取柱和免疫亲和柱净化，液相色谱分离，串联质谱检测，同位素内标法定量。

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 试剂

4.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

4.1.2 甲酸（CH₂O₂）：色谱纯。

4.1.3 氯化钠（NaCl）。

4.1.4 磷酸氢二钠（Na₂HPO₄）。

4.1.5 磷酸二氢钾（KH₂PO₄）。

4.1.6 氯化钾（KCl）。

4.1.7 盐酸 (HCl)。

4.1.8 吐温-20, (C₅₈H₁₁₄O₂₆)。

4.2 试剂配制

4.2.1 85%乙腈水：85 mL乙腈（4.1.1）中加入15 mL水。

4.2.2 0.1%甲酸水：取1 mL甲酸（4.1.2），加水定容至1 L。

4.2.3 磷酸盐缓冲溶液（以下简称PBS）：称取8.00 g 氯化钠、1.20 g 磷酸氢二钠、0.20 g 磷酸二氢钾、0.20 g 氯化钾，用900 mL水溶解，用盐酸调节pH至7.4±0.1，加水稀释至1000 mL。

4.2.4 吐温-20的PBS：取10 mL吐温-20，用PBS稀释至1000 mL。

4.3 标准品

4.3.1 AFT B₁ 标准品 (C₁₇H₁₂O₆, CAS: 1162-65-8)：纯度≥98%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.3.2 同位素内标 ¹³C₁₇-AFT B₁(C₁₇H₁₂O₆, CAS: 1217449-45-0)：纯度≥98%，浓度为 0.5 µg/mL。

注：标准物质可以满足溯源要求的商品化标准溶液。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备溶液（10 µg/mL）：准确称取 AFT B₁（4.3）1 mg（精确至 0.01 mg），置于 100 mL 容量瓶，用乙腈（4.1.1）溶解并稀释至刻度，摇匀，制成质量浓度为 10 µg/mL 的标准储备液。溶液转移至试剂瓶中后，在-20℃下避光保存，备用。

4.4.2 标准中间液（100 ng/mL）：准确移取 AFT B₁ 标准储备溶液 1.00 mL 至 100 mL 容量瓶中，乙腈（4.1.1）定容。此溶液密封后避光-20℃下保存，有效期三个月。

4.4.3 同位素内标工作液（100 ng/mL）：准确移取 0.5 µg/mL ¹³C₁₇-AFT B₁ 2.0 mL，用乙腈定（4.1.1）容至 10 mL。在-20℃下避光保存，备用，有效期三个月。

4.4.4 标准工作溶液：准确移取 AFT B₁（100 ng/mL）标准溶液 10 µL、50 µL、100 µL、200 µL、500 µL、800 µL、1000 µL 于 10 mL 容量瓶中，加入 200 µL 100 ng/mL 的同位素内标工作液，用初始流动相定容至刻度，配制标准曲线溶液浓度点为：0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、8.0 ng/mL、10.0 ng/mL 的系列标准溶液。

4.5 材料

4.5.1 免疫亲和柱：AFT B₁ 柱容量≥200 ng，回收率≥85%（验证方法参见附录 B）。

注：对于不同批次的试剂盒在使用前需进行质量验证。

4.5.2 固相萃取柱：6 mL，1000 mg，适用于茶叶样品基质黄曲霉毒素专用型的固相萃取柱。

4.5.3 玻璃纤维滤纸：快速、高载量、液体中颗粒保留 1.6 μm 。

4.5.4 微孔滤头：带 0.22 μm 微孔滤膜（所选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象，方可使用）。

4.5.5 筛网：1 mm~2 mm 试验筛孔径。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量分别为 0.01 mg 和 0.01 g。

5.3 涡旋混合器。

5.4 高速粉碎机。

5.5 氮吹仪。

5.6 高速均质器：转速 6500 r/min ~24000 r/min。

5.7 离心机：转速 $\geq$ 6000 r/min。

5.8 pH 计。

5.9 固相萃取装置。

6 试验步骤

警示：整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在实验过程中，操作者在配制 AFT B₁ 标准溶液时应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

6.1 试样制备

试样用高速粉碎机将其粉碎，过筛，使其粒径小于 2 mm 孔径试验筛。

6.2 试样前处理

6.2.1 提取

准确称取 5.0 g（精确到 0.01 g）样品于 50 mL 具塞离心管中，加入 400 μL 同位素内标工作液（4.4.3），加入 20 mL 乙腈，涡旋混匀，高速均质器均质提取 3 min，6000 r/min 下离心 5 min，上清液用玻璃纤维滤纸过滤，滤液待净化。

6.2.2 净化

6.2.2.1 固相萃取柱净化

固相萃取柱（4.5.2）用 5 mL 85% 乙腈水溶液活化，取 4 mL 滤液通过固相萃取柱中，收

集净化液，再用 5 mL 85%乙腈水分两次洗脱，流速控制在 1 mL/min~3 mL/min，合并净化液。氮吹浓缩至 4 mL，用吐温-20 的 PBS 缓冲液定容至 50 mL，混匀，待免疫亲和柱净化。

6.2.2.3 免疫亲和柱净化

6.2.2.3.1 免疫亲和柱的准备

将低温下保存的免疫亲和柱（4.5.1）恢复至室温。

6.2.2.3.2 试样的净化

待免疫亲和柱内原有液体流尽后，将上述样液移至 50 mL 注射器筒内，调节下滴速度，控制样液以 1 mL/min~3 mL/min 的速度稳定下滴。待样液滴完后，往注射器筒内加入 2×10 mL 水，以稳定流速淋洗免疫亲和柱。待水滴完后，用真空泵抽干亲和柱。脱离真空系统，在免疫亲和柱下部放置 10 mL 刻度试管，取下 50 mL 注射器筒，加入 4×0.5 mL 乙腈（4.1.1）洗脱亲和柱，控制流速在 1 mL/min~3 mL/min 的范围内下滴，再用真空泵抽干亲和柱，收集全部洗脱液至试管中，在 50℃ 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干，加入 1.0 mL 初始流动相，涡旋 30 s 溶解残留物，0.22 μm 滤膜过滤，收集滤液于进样瓶中以备进样。

6.3 仪器测定

6.3.1 液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，3.0 mm×100 mm，粒径 5.0 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A 为乙腈（4.1.1），B 为 0.1% 甲酸水溶液，梯度洗脱（见表 1）；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：40 ℃；
- e) 进样量：10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	10	90
4.5	90	10
6.5	10	90
10.0	10	90

6.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件列出如下：

- a) 检测方式：多离子反应检测（MRM）；
- b) 离子源控制条件：参见表 2；

c) 离子选择参数：参见表 3。

表 2 离子源控制条件

电离方式	ESI ⁺
毛细管电压/kV	3.5
锥孔电压/V	30
射频透镜 1 电压/V	14.9
射频透镜 2 电压/V	15.1
离子源温度/°C	150
锥孔反吹气流量/(L/h)	50
脱溶剂气温度/°C	500
脱溶剂气流量/(L/h)	800
电子倍增电压/V	650

表 3 离子选择参数表

化合物名称	母离子 (m/z)	定量离子 (m/z)	碰撞能量 eV	定性离子 (m/z)	碰撞能量 eV	离子化方式
AFT B ₁	313	285	22	241	38	ESI ⁺
¹³ C ₁₇ -AFT B ₁	330	255	23	301	35	ESI ⁺

6.3.3 定性测定

试样中目标化合物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。

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，其允许偏差不超过表4规定的范围。

表 4 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

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

6.3.4 标准曲线的制作

在 6.3.1、6.3.2 的液相色谱串联质谱仪分析条件下，将标准系列溶液由低到高浓度进样检测，以 AFT B₁ 色谱峰与对应内标色谱峰的峰面积比值-浓度作图，得到标准曲线回归方程，其线性相关系数应大于 0.99。

6.3.5 试样溶液的测定

取 6.2 处理得到的待测溶液进样，内标法计算待测液中目标物质的质量浓度，计算样品中待测物的含量。待测样液中的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应适当减少取样量重新测定。

6.3.6 空白试验

不称取试样，按6的试验步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

7 试验数据处理

试样中AFT B₁的残留量按式（1）计算。

计算公式：

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X — 试样中 AFT B₁ 的含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）；

ρ — 进样溶液中 AFT B₁ 按照内标法在标准曲线中对应的浓度，单位为纳克每毫升（ ng/mL ）；

V_1 — 试样提取液体积，单位为毫升（ mL ）；

V_3 — 样品经净化洗脱后的最终定容体积，单位为毫升（ mL ）；

1000— 换算系数；

V_2 — 用于净化分取的样品体积，单位为毫升（ mL ）；

m — 试样的称样量，单位为克（ g ）。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算数平均值表示,保留至小数点后两位。

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%。

9 其他

当称取样品 5 g 时, AFT B₁ 的检出限为: 0.03 µg/kg; AFT B₁ 的定量限为 0.1 µg/kg。

第二法 高效液相色谱法

导语: 下述方法的仪器检测部分, 包括三氟乙酸柱前衍生、碘或溴试剂柱后衍生、光化学柱后衍生等衍生方法, 可根据实际情况, 选择其中一种方法即可。

10 原理

试样中的黄曲霉毒素 B₁, 用乙腈提取, 固相萃取柱和免疫亲和柱净化, 液相色谱分离, 柱前或柱后衍生(三氟乙酸柱前衍生、碘或溴试剂柱后衍生和光化学柱后衍生), 荧光检测器检测, 外标法定量。

11 试剂或材料

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。

11.1 试剂

11.1.1 乙腈(CH₃CN): 色谱纯。

11.1.2 甲醇(CH₃OH): 色谱纯。

11.1.3 甲苯(C₇H₈): 色谱纯。

11.1.4 正己烷(C₆H₁₄): 色谱纯。

11.1.5 三氟乙酸(CF₃COOH)。

11.1.6 碘衍生使用试剂: 碘(I₂)。

11.1.7 溴衍生使用试剂: 三溴化吡啶(C₅H₆Br₃N₂)。

11.1.8 氯化钠(NaCl)。

11.1.9 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。

11.1.10 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)。

11.1.11 氯化钾 (KCl)。

11.1.12 盐酸 (HCl)。

11.1.13 吐温-20, ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)。

11.2 试剂配制

11.2.1 0.05%碘溶液: 称取 0.1 g 碘, 用 20 mL 甲醇(11.1.2)溶解, 加水定容至 200 mL, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 现配现用(仅碘柱后衍生法使用)。

11.2.2 5 mg/L 三溴化吡啶水溶液: 称取 5 mg 三溴化吡啶(11.1.7)溶于 1 L 水中, 用 0.45 μm 的滤膜过滤, 现配现用(仅溴柱后衍生法使用)。

11.2.3 10%甲苯-乙腈: 90 mL 乙腈(11.1.1)中加入 10 mL 甲苯(11.1.3)。

11.2.4 磷酸盐缓冲溶液(以下简称PBS): 称取8.00 g氯化钠、1.20 g磷酸氢二钠(或2.92 g十二水磷酸氢二钠)、0.20 g磷酸二氢钾、0.20 g氯化钾, 用900 mL水溶解, 用盐酸调节pH至 7.4 ± 0.1 , 加水稀释至1000 mL。

11.2.5 吐温-20的PBS: 取10 mL吐温-20, 用PBS稀释至1000 mL。

11.3 标准品

AFT B₁ 标准品 ($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{O}_6$, CAS: 1162-65-8): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

注: 标准物质可以满足溯源要求的商品化标准溶液。

11.4 标准溶液配制

11.4.1 标准储备溶液 (10 $\mu\text{g/mL}$): 准确称取 AFT B₁ (11.3) 1 mg 精确至 (0.01 mg), 置于 100 mL 容量瓶, 用乙腈(11.1.1)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。溶液转移至试剂瓶中后, 在 -20°C 下避光保存, 备用。

11.4.2 标准中间液 (100 ng/mL): 准确移取 AFT B₁ 标准储备溶液(11.4.1) 1.00 mL 至 100 mL 容量瓶中, 乙腈(11.1.1)定容。此溶液密封后避光 -20°C 下保存, 有效期三个月。

11.4.3 标准工作溶液: 准确移取 AFT B₁ (100 ng/mL) 标准溶液 10 μL 、50 μL 、200 μL 、500 μL 、1000 μL 、2000 μL 、4000 μL 分别于 10 mL 容量瓶中, 用初始流动相定容至刻度, 配制标准曲线溶液浓度分别为: 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL、10 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL。

11.5 材料

11.5.1 免疫亲和柱: AFT B₁ 柱容量 ≥ 200 ng, 回收率 $\geq 85\%$ (验证方法参见 GB 5009.22

附录 B)。

注：对于不同批次的免疫亲和柱试在使用前需进行质量验证。

11.5.2 固相萃取柱：6 mL，1000 mg，适用于茶叶样品基质黄曲霉毒素专用型的固相萃取柱。

11.5.3 玻璃纤维滤纸：快速、高载量、液体中颗粒保留 1.6 μm 。

11.5.4 微孔滤头：带 0.22 μm 微孔滤膜（所选用滤膜应采用标准溶液检验确认无吸附现象，方可使用）。

11.5.5 筛网：1 mm~2 mm 试验筛孔径。

12 仪器设备

12.1 液相色谱仪：液相色谱仪（配备荧光检测器）。

12.2 溶剂柱后剂衍装置（适用于碘或溴试剂柱后衍生法）。

12.3 光化学柱后剂衍器（适用于光化学柱后衍生法）。

12.4 分析天平：感量分别为 0.01 mg 和 0.01 g。

12.5 涡旋混合器。

12.6 高速粉碎机。

12.7 氮吹仪。

12.8 高速均质器：转速 6500 r/min ~24000 r/min

12.9 离心机：转速 $\geq$ 6000 r/min。

12.10 pH 计。

12.11 恒温箱。

12.12 固相萃取装置（带真空泵）。

13 试验步骤

警示：整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在实验过程中，操作者在配制 AFT B₁ 标准溶液时应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

13.1 试样制备

同 6.1。

13.2 试样前处理

13.2.1 提取

准确称取 5.0 g（精确到 0.01 g）样品于 50 mL 具塞离心管中，加入 20 mL 乙腈，涡旋混匀，高速均质器均质提取 3 min，6000 r/min 下离心 5 min，上清液用玻璃纤维滤纸过滤，滤液待净化。

13.2.2 净化

同 6.2.2。

13.3 衍生及仪器测定

13.3.1 三氟乙酸柱前衍生

用移液管准确吸取 4.0 mL 净化液于 10 mL 离心管后在 50 °C 下用氮气缓缓地吹至近干，分别加入 200 μ L 正己烷和 100 μ L 三氟乙酸，涡旋 30 s，在 40 °C $\pm$ 1 °C 的恒温箱中衍生 15 min，衍生结束后，在 50 °C 下用氮气缓缓地将衍生液吹至近干，用初始流动相定容至 1.0 mL，涡旋 30 s 溶解残留物，过 0.22 μ m 滤膜，收集滤液于进样瓶中以备进样。

液相色谱参考条件列出如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，4.6 mm $\times$ 150 mm，粒径 5.0 μ m，或性能相当者；
- b) 流动相：A 为乙腈（11.1.1），B 为水，A:B=30:70；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：40 °C；
- e) 进样量：50 μ L；
- f) 激发波长 360 nm；发射波长 440 nm。

13.3.2 柱后光化学衍生法

液相色谱参考条件列出如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，4.6 mm $\times$ 150 mm，粒径 5.0 μ m，或性能相当者；
- b) 流动相：A 为乙腈（11.1.1），B 为水，A:B=30:70；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：40 °C；
- e) 进样量：50 μ L；
- f) 光化学柱后衍生器；
- g) 激发波长 360 nm；发射波长 440 nm。

13.3.3 柱后碘或溴试剂衍生法

液相色谱参考条件列出如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，4.6 mm $\times$ 150 mm，粒径 5.0 μ m，或性能相当者；

- b) 流动相：A 为乙腈（11.1.1），B 为水，A:B=30:70；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 柱温：40 ℃；
- e) 进样量：50 μL；
- f) 柱后衍生化系统；
- g) 衍生溶液：0.05%碘溶液（碘试剂柱后衍生法）或 5 mg/L 三溴化吡啶水溶液（溴试剂柱后衍生法）；
- h) 衍生溶液流速：0.2 mL/min；
- i) 衍生反应管温度：70℃；
- j) 激发波长 360 nm；发射波长 440 nm。

13.4 标准溶液测定

将标准工作液（11.4.3）进样测定。

13.5 试样溶液的测定

将待测试样净化液溶液进样测定。

13.6 空白试验

不称取试样，按13的试验步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

14 试验数据处理

试样中AFT B₁的残留量按式（2）计算。

计算公式：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X— 试样中 AFT B₁ 的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

c— 进样溶液中 AFT B₁ 的浓度，按照标准溶液浓度乘于进样溶液与标准溶液峰面积比计算，或仪器软件自动计算，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V— 试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

m — 试样的称样量，单位为克（g）。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算数平均值表示，保留至小数点后两位。

15 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%。

16 其他

当称取样品 5 g 时，AFT B₁ 的检出限为 0.03 μg/kg，定量限为 0.1 μg/kg。

附录 A（资料性附录）

串联质谱法图谱

A.1 黄曲霉毒素 B₁ 离子扫描图见图 A.1。

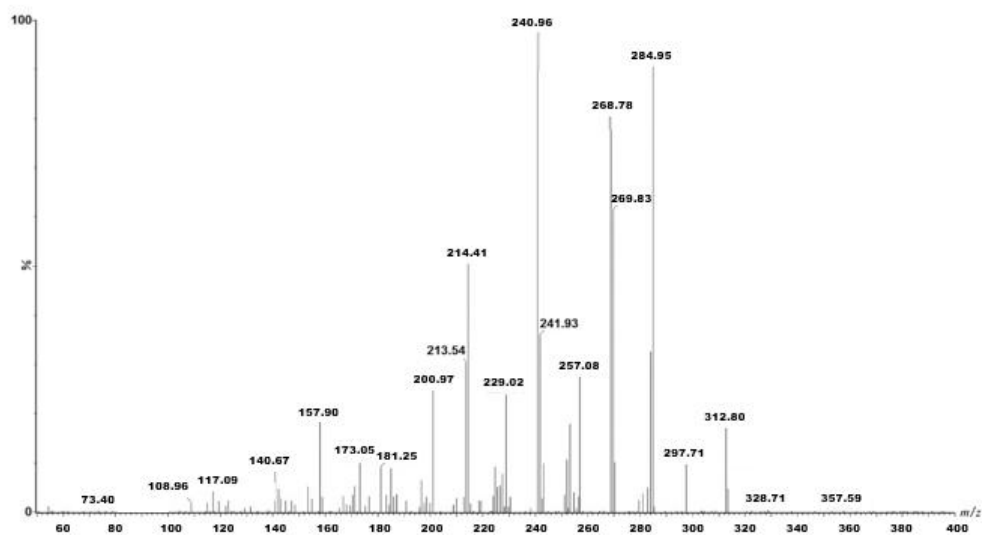


图 A.1 黄曲霉毒素 B₁ 离子扫描图

A.2 黄曲霉毒素B₁液相串联质谱图见图A.2。

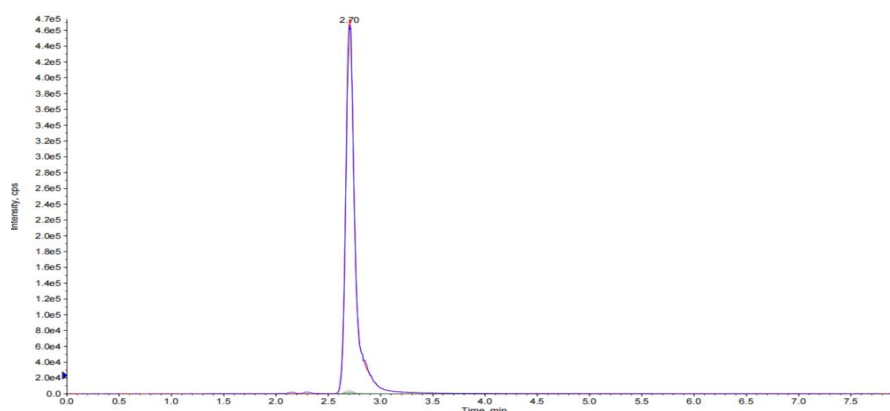


图 A.2 黄曲霉毒素 B₁ 液相串联质谱图（1.0 ng/mL 标准溶液）

附录 B（资料性附录）

液相色谱图

B.1 黄曲霉毒素 B₁ 液相色谱图

B.1 黄曲霉毒素 B₁ TFA 柱前衍生液相色谱图见图 B.1。

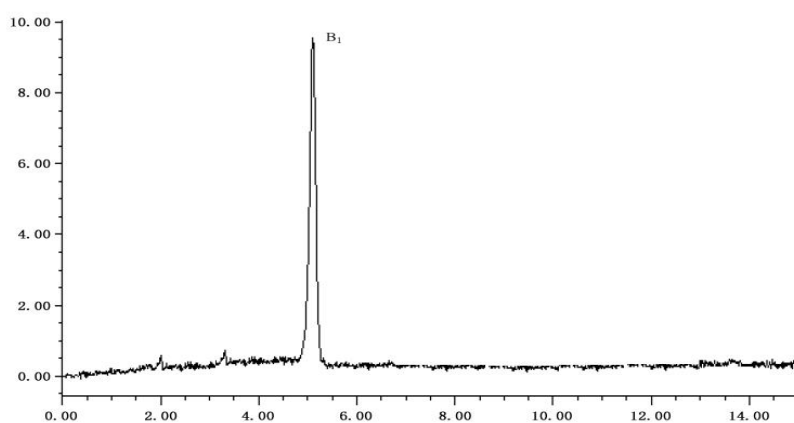


图 B.2 黄曲霉毒素 B₁ TFA 柱前衍生液相色谱图（0.5 ng/mL 标准溶液）

B.2 黄曲霉毒素 B₁ 柱后光化学衍生液相色谱图见图 B.2。

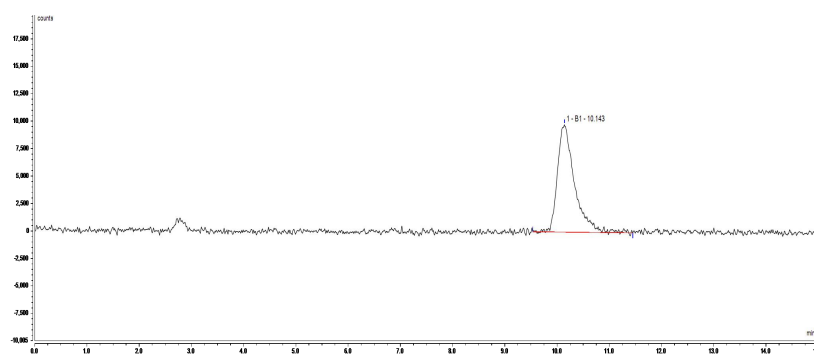


图 B.2 黄曲霉毒素 B₁ 柱后光化学衍生液相色谱图（1 ng/mL 标准溶液）

B.3 黄曲霉毒素 B₁ 柱后碘衍生液相色谱图见图 B.3。

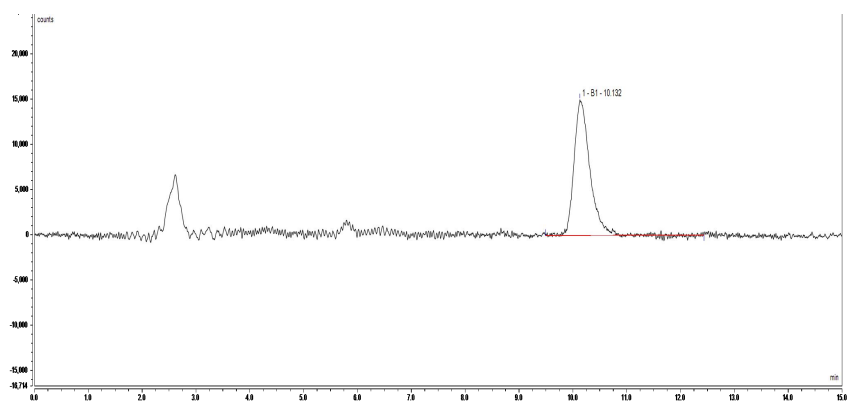


图 B.3 黄曲霉毒素 B₁ 柱后碘衍生液相色谱图 (1 ng/mL 标准溶液)

B.4 黄曲霉毒素 B₁ 柱后溴衍生液相色谱图见图 B.4。

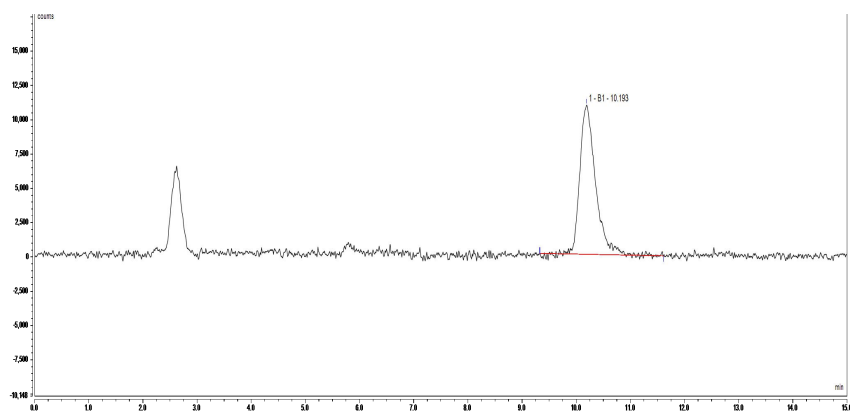


图 B.4 黄曲霉毒素 B₁ 柱后溴衍生液相色谱图 (1 ng/mL 标准溶液)

B.5 黄曲霉毒素 B₁ 柱后电化学衍生液相色谱图见图 B.5。

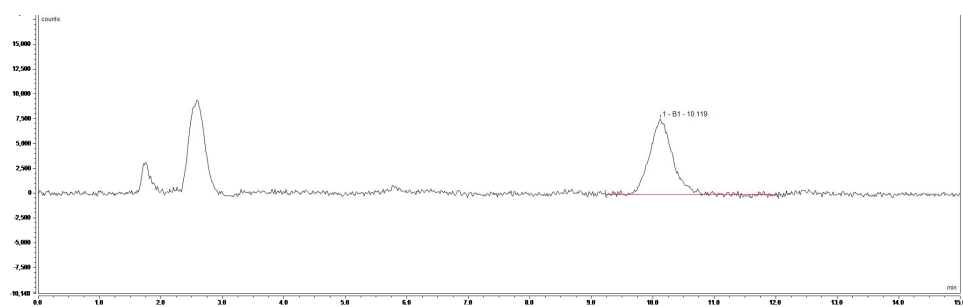


图 B.5 黄曲霉毒素 B₁ 柱后电化学衍生法液相色谱图（1 ng/mL 标准溶液）