



中华人民共和国国家标准

GB/T 25220—2010

粮油检验 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定 高效液相色谱法和荧光光度法

Inspection of grain and oils—Determination of ochratoxin A in grains by high
performance liquid chromatography and fluorometer

2010-09-26 发布

2011-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由国家粮食局提出。

本标准由全国粮油标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位：国家粮食局科学研究院。

本标准参加起草单位：上海国家粮食质量监测中心、北京中检维康技术有限公司、吉林省粮油卫生检验监测站。

本标准主要起草人：王松雪、王雄、何志军、刘焱、薛斌、张艳、孙长坡、马小妮、王岩、高晓春。

粮油检验 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定 高效液相色谱法和荧光光度法

1 范围

本标准规定了采用高效液相色谱法和荧光光度法测定粮食中赭曲霉毒素 A 的原理、试剂和材料、仪器和设备、操作步骤及结果表示。

本标准适用于小麦、玉米、稻谷中赭曲霉毒素 A 的测定。

免疫亲和柱净化高效液相色谱法和免疫亲和柱净化荧光光度法的检测限均为 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ，离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法检测限为 $0.8\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 免疫亲和柱净化高效液相色谱法

3.1 原理

试样中的赭曲霉毒素 A 用乙腈+水提取后，利用抗体与其相应抗原之间的专一性免疫亲和反应，以含有赭曲霉毒素 A 特异性抗体的免疫亲和层析柱净化提取液，用配有荧光检测器的高效液相色谱仪测定，外标法定量。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合 GB/T 6682 中二级用水要求。

3.2.1 乙腈：色谱纯。

3.2.2 甲醇：色谱纯。

3.2.3 氯化钠。

3.2.4 冰醋酸。

3.2.5 吐温-20(Tween-20)。

3.2.6 碳酸氢钠。

3.2.7 磷酸氢二钠。

3.2.8 磷酸二氢钾。

3.2.9 氯化钾。

3.2.10 浓盐酸。

3.2.11 赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A, OTA)标准品：纯度 $\geq 99\%$ 。

3.2.12 提取液：乙腈(3.2.1)+水=60+40。

3.2.13 磷酸盐缓冲溶液(PBS)：8.0 g 氯化钠(3.2.3)、1.2 g 磷酸氢二钠(3.2.7)、0.2 g 磷酸二氢钾(3.2.8)和 0.2 g 氯化钾(3.2.9)溶解于约 990 mL 水中，用浓盐酸(3.2.10)调节 pH 至 7.0，用水稀释至 1 L。

3.2.14 淋洗缓冲液：25 g 氯化钠(3.2.3)、5 g 碳酸氢钠(3.2.6)溶于水中，加入 0.1 mL 吐温-20(3.2.5)，用水稀释至 1 L。

3.2.15 流动相:96 mL 乙腈(3.2.1)、102 mL 水和 2 mL 冰醋酸(3.2.4)混合,用 0.2 μm 滤膜(3.3.5)过滤并脱气。

3.2.16 赭曲霉毒素 A 标准储备溶液:准确称取适量的赭曲霉毒素 A 标准品(3.2.11),用甲醇(3.2.2)配制成 0.100 mg/mL 的赭曲霉毒素 A 标准储备液,避光保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

3.2.17 赭曲霉毒素 A 标准工作溶液:准确移取适量的赭曲霉毒素 A 标准储备液(3.2.16),用甲醇(3.2.2)稀释成质量浓度分别为 1 $\mu\text{g/L}$ 、2.5 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作溶液。

3.3 仪器和设备

3.3.1 天平:感量 0.1 mg。

3.3.2 高速均质器:约 22 000 r/min,或相当的设备。

3.3.3 槽纹折叠滤纸。

3.3.4 玻璃纤维滤纸。

3.3.5 滤膜:0.2 μm 孔径,25 mm 直径的聚砜膜或相当者。

3.3.6 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱:对赭曲霉毒素 A 的最大吸附容量可达 100 ng,对于甲醇(3.2.2)+PBS(3.2.13)=1+10 溶液中含有 5 ng 赭曲霉毒素 A 的回收率不小于 85%。

3.3.7 玻璃注射器:10 mL。

3.3.8 空气压力泵。

3.3.9 高效液相色谱仪:带荧光检测器。

3.3.10 微量进样器:20 μL 。

3.3.11 氮吹仪。

3.4 操作步骤

3.4.1 提取

称取试样 50 g(m ,精确到 1 mg)于均质器(3.3.2)搅拌杯中,加入 5.0 g 氯化钠(3.2.3)和 100.0 mL 提取液(3.2.12)。将搅拌杯装于均质器上,于 22 000 r/min 高速搅拌提取 3 min。提取液经槽纹折叠滤纸(3.3.3)过滤于干净的烧杯中。准确移取 10.0 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加磷酸盐缓冲溶液(3.2.13)稀释至刻度,混合均匀,经玻璃纤维滤纸(3.3.4)过滤,备用。

3.4.2 净化

将免疫亲和柱(3.3.6)连接于 10 mL 玻璃注射器(3.3.7)下端。准确移取 10.0 mL 样品提取液(3.4.1)于玻璃注射器中,将空气压力泵(3.3.8)与玻璃注射器上端连接,调节压力使溶液以约 1 滴/s~2 滴/s 流速缓慢通过免疫亲和柱,至有空气通过免疫亲和柱时停止加压。用上述方法,以 10 mL 淋洗缓冲液(3.2.14)、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱,弃去全部流出液,再用 1.5 mL 甲醇(3.2.2)以上述方式洗脱 OTA,收集全部洗脱液于玻璃试管中,在 45 $^{\circ}\text{C}$ 下以氮吹仪(3.3.11)用氮气吹干。用液相流动相(3.2.15)溶解残渣并定容到 200 μL (V),即为试样提取净化液,供高效液相色谱测定时使用。

注:对于赭曲霉毒素 A 含量较高的样品,可将提取滤液进行适当稀释,以保证赭曲霉毒素 A 的含量不超过免疫亲和柱的吸附容量。由于不同厂商提供的亲和柱操作程序可能有所区别,实际操作时,请参照免疫亲和柱厂商提供的操作说明和程序操作。

3.4.3 色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱(柱长 150 mm,内径 4.6 mm,填料直径 5 μm)或性能相当者。

流动相:(3.2.15)。

流速:1.0 mL/min。

荧光检测器:激发波长 333 nm,发射波长 460 nm。

柱温:室温。

进样量:20 μL 。

3.4.4 测定

参考上述色谱条件,调节高效液相色谱仪工作参数,使 OTA 与杂质完全分离。用微量进样器(3.3.10)分别吸取等体积的赭曲霉毒素 A 标准工作溶液(3.2.17)和试样提取净化液(3.4.2)分别进样分析,测定响应值(峰高或峰面积),以标准工作液的浓度与相应的峰面积绘制标准曲线,以试样提取净化液 OTA 的峰面积在标准曲线上求得相应的 OTA 的浓度(c)。

3.4.5 空白试验

除不加试样外,按 3.4.1~3.4.4 步骤进行提取、净化、测定,求得空白试液中赭曲霉毒素 A 的浓度(c_0)。

3.5 结果计算与表示

3.5.1 试样中赭曲霉毒素 A 的含量按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{(c - c_0) \times V \times f}{m \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_1 ——试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

c ——最终定容试样提取净化液中赭曲霉毒素 A 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

c_0 ——空白试验中最终定容溶液中赭曲霉毒素 A 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——试样测定液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

f ——样品稀释倍数。

3.5.2 每个试样进行两次平行试验,两次测定重复性符合 3.6.2 要求,取两次测定的算术平均值作为测定结果。

3.6 精密度

3.6.1 实验室间测试

附录 B 中表 B.1 统计了本方法精密度的实验室间测试数据,这些结果适用于本分析浓度范围和基体之内的样品。

3.6.2 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测试对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值大于表 B.1 所示重复性限值(r)的情况不超过 5%。

3.6.3 再现性

在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值大于表 B.1 所示再现性限值(R)的情况不超过 5%。

4 免疫亲和柱层析净化荧光光度法

4.1 原理

试样中的赭曲霉毒素 A 用乙腈+水提取,利用抗体与其相应抗原之间的专一性免疫亲和反应,以含有赭曲霉毒素 A 特异性抗体的免疫亲和层析柱净化提取液,用荧光光度计进行测定。

4.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为重蒸水。

4.2.1 乙腈:色谱纯。

4.2.2 甲醇:色谱纯。

4.2.3 氯化钠。

4.2.4 吐温-20(Tween-20)。

4.2.5 碳酸氢钠。

4.2.6 硫酸奎宁。

4.2.7 浓硫酸。

4.2.8 氢氧化钠。

4.2.9 提取液:乙腈(4.2.1)+水=60+40。

4.2.10 淋洗缓冲液:称取 25 g 氯化钠(4.2.3)、5 g 碳酸氢钠(4.2.5)溶于适量水中,加入 0.1 mL 吐温-20(4.2.4),加水稀释至 1 L。

4.2.11 0.05 mol/L 硫酸溶液:量取 2.8 mL 浓硫酸(4.2.7),缓慢加入适量水中,冷却后定容至 1 000 mL。

4.2.12 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液:称取 0.40 g 氢氧化钠(4.2.8),缓慢加入适量水中,冷却后定容至 100 mL。

4.2.13 甲醇-氢氧化钠溶液:甲醇(4.2.2)+氢氧化钠(4.2.12)=50+50。

4.2.14 赭曲霉毒素 A 标准溶液:准确称量适量的赭曲霉毒素 A 标准品(3.2.11),用甲醇-氢氧化钠溶液(4.2.13)溶解并定容,配制成 5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 赭曲霉毒素 A 标准溶液。

4.2.15 荧光光度计标定溶液:准确称取一定量的硫酸奎宁(4.2.6),用硫酸溶液(4.2.11)溶解并稀释至 100 mL,分别用 5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 赭曲霉毒素 A 溶液(4.2.14)确定相当于该浓度荧光强度的硫酸奎宁溶液浓度,并用该浓度的硫酸奎宁溶液标定荧光光度计(配制时可参考:1.625 $\mu\text{g/L}$ 硫酸奎宁的荧光强度约相当于 1 $\mu\text{g/L}$ 赭曲霉毒素 A,具体根据实际情况定)。此标定溶液浓度一经确定,可在该荧光计上反复使用。

4.3 仪器设备

4.3.1 荧光光度计:激发波长 360 nm、发射波长 440 nm。

4.3.2 高速均质器:约 22 000 r/min,或性能相当的设备。

4.3.3 槽纹折叠滤纸:无荧光特性。

4.3.4 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm,孔径 1.5 μm ,无荧光特性。

4.3.5 玻璃试管:直径 12 mm,长 75 mm,无荧光特性。

4.3.6 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱:对赭曲霉毒素 A 的最大吸附容量可达 100 ng 以上,对于甲醇(4.2.2)+PBS(3.2.13)=1+10 溶液中含有 5 ng 赭曲霉毒素 A 的回收率不小于 85%。

4.3.7 玻璃注射器:10 mL。

4.3.8 空气压力泵。

4.4 操作步骤

4.4.1 提取

同 3.4.1。

4.4.2 净化

同 3.4.2 操作至淋洗步骤结束。准确吸取 1 mL 甲醇(4.2.2)以 1 滴/s~2 滴/s 的流速洗脱 OTA,收集全部洗脱液于玻璃试管(4.3.5)中。

4.4.3 荧光光度计标定

在激发波长 360 nm、发射波长 440 nm 条件下,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为空白,调节荧光光度计的读数值为零,再分别以不同浓度硫酸奎宁标定溶液(4.2.15)调节荧光光度计的读数值分别为 5 和 10。

4.4.4 测定

在甲醇洗脱液(4.4.2)中加入 1 mL 0.1 mol/L NaOH 溶液(4.2.12),总体积为 V' (2 mL),混匀后立即置于荧光光度计中,读取溶液的荧光强度,此读数即为试样测定液中赭曲霉毒素 A 的浓度(c)。

4.4.5 空白试验

除不加试样外,按 4.4.1~4.4.4 步骤进行提取、净化、测定,求得空白试液中赭曲霉毒素 A 的浓度(c_0)。

4.5 结果计算与表示

4.5.1 试样中赭曲霉毒素 A 的含量按式(2)计算:

$$X_2 = \frac{(c - c_0) \times V' \times f}{m} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

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

c ——试样提取净化液中赭曲霉毒素 A 浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

c_0 ——空白试液中赭曲霉毒素 A 浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V' ——甲醇洗脱液与 NaOH 溶液总体积(2 mL),单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

f ——试样溶液稀释倍数。

4.5.2 每个试样进行两次平行试验,两次测定重复性符合 4.6.2 要求,取两次测定的算术平均值作为测定结果。

4.6 精密度

4.6.1 实验室间测试

附录 B 中表 B.2 统计了本方法精密度的实验室间测试数据,这些结果适用于本分析浓度范围和基体之内的样品。

4.6.2 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测试对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值大于表 B.2 所示重复性限值(r)的情况不超过 5%。

4.6.3 再现性

在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值大于表 B.2 所示再现性限值(R)的情况不超过 5%。

5 离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的赭曲霉毒素 A 用碱性甲醇+水提取,提取液经离子交换固相萃取柱净化、洗脱后,用配有荧光检测器的液相色谱仪进行测定,标准曲线法定量。

5.2 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中二级水要求。

5.2.1 乙腈:色谱纯。

5.2.2 甲醇:色谱纯。

5.2.3 冰醋酸:色谱纯。

5.2.4 石油醚:沸程 60℃~90℃。

5.2.5 甲酸。

5.2.6 三氯甲烷。

5.2.7 赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A)标准品:纯度 $\geq 99\%$ 。

5.2.8 0.1 mol/L 氢氧化钾溶液。

5.2.9 0.1 mol/L 磷酸溶液。

5.2.10 提取液:氢氧化钾溶液(5.2.8)+甲醇(5.2.2)+水=2+60+38。

5.2.11 淋洗液:氢氧化钾溶液(5.2.8)+乙腈(5.2.1)+水=3+50+47。

5.2.12 洗脱液:甲醇(5.2.2)+乙腈(5.2.1)+甲酸(5.2.5)+水=40+50+5+5。

5.2.13 流动相:取 45 mL 乙腈(5.2.1)加 54 mL 水和 1 mL 冰醋酸(5.2.3)混合,过 0.45 μm 的滤膜(5.3.13)并脱气。

5.2.14 赭曲霉毒素 A 标准储备溶液:准确称取 1 mg 赭曲霉毒素 A 标准品(5.2.7),用甲醇溶解并定容至 25 mL,配制成 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液,避光保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

5.2.15 赭曲霉毒素 A 标准工作溶液:准确移取适量赭曲霉毒素 A 标准储备液(5.2.14),用甲醇(5.2.2)稀释配制成 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作液。

5.3 仪器和设备

5.3.1 旋风式谷物粉碎机。

5.3.2 振荡器。

5.3.3 高效液相色谱仪:带荧光检测器。

5.3.4 快速定性滤纸。

5.3.5 针头式过滤器:0.45 μm 孔径,13 mm 直径的醋酸纤维素膜或性能相当者。

5.3.6 固相萃取柱:PAX 阴离子交换混合反相固相萃取柱,120 mg/3 mL。

5.3.7 色谱柱:长 250 mm,内径 4.6 mm,填料直径 5 μm C₁₈ 柱或性能相当者。

5.3.8 保护柱:长 20 mm,内径 4.6 mm,填料直径 5 μm C₁₈ 柱或性能相当者。

5.3.9 一次性塑料注射器:5 mL。

5.3.10 氮吹仪。

5.3.11 旋转蒸发仪:带水浴。

5.3.12 20 目筛。

5.3.13 滤膜:0.45 μm 孔径,25 mm 直径的醋酸纤维素膜或性能相当者。

5.4 操作步骤

5.4.1 试样制备

玉米、稻谷(糙米)、小麦、小麦粉、大豆等粮食均用旋风式谷物粉碎机(5.3.1)将样品粉碎,用 20 目筛筛理,筛下物装瓶备用。

5.4.2 提取

5.4.2.1 玉米

称取试样 10 g(精确至 0.01 g),加入三氯甲烷 50 mL(V_3)(5.2.6)和 5 mL 0.1 mol/L 的磷酸溶液(5.2.9),于振荡器(5.3.2)上振荡提取 3 min~5 min,提取液用滤纸(5.3.4)过滤,取下层滤液 10 mL 放入 100 mL 平底烧瓶中,于水浴中 40 $^{\circ}\text{C}$ 用旋转蒸发仪(5.3.11)旋转蒸发至接近干涸,用 20 mL 石油醚(5.2.4)溶解残渣,加入 10 mL 提取液(5.2.10),再用振荡器振荡提取 3 min~5 min,静置分层后取下层溶液,用滤纸过滤,取滤液 5 mL(V_4)进行固相萃取。

5.4.2.2 稻谷(糙米)、小麦、小麦粉、大豆

称取试样 10 g(精确至 0.01 g),加入提取液 50 mL(V_3)(5.2.10),于振荡器(5.3.2)振荡提取 3 min~5 min,用滤纸(5.3.4)过滤,取滤液 10 mL 放入 100 mL 平底烧瓶中,加入 20 mL 石油醚(5.2.4),振荡器振荡提取 3 min~5 min,静置分层后取下层溶液,用滤纸过滤,取滤液 5 mL(V_4)进行固相萃取净化。

5.4.3 固相萃取净化

用 5 mL 甲醇(5.2.2)冲洗 PAX 固相萃取柱(5.3.6),再用 3 mL 提取液(5.2.10)润洗。然后将 5 mL 样品提取液(5.4.2)加入柱子中,调节流速以 1 滴/s~2 滴/s 的速度通过柱子,再以同样的流速用 3 mL 淋洗液(5.2.11)洗柱,然后用 1.2 mL 蒸馏水快速冲洗柱子,用空气或氮气吹尽柱子中的液体。最后用 4 mL~5 mL 洗脱液(5.2.12)快速洗脱赭曲霉毒素 A 并收集洗脱液于玻璃试管中,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 下在氮吹仪(5.3.10)上用氮气吹干溶剂。用流动相溶解残渣并定容到 1.0 mL(V_2)(或者洗脱液收集于一个 50 mL 的平底烧瓶中,于 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下水浴中,10 min 内旋转蒸发至干,用 1.0 mL 流动相溶解残留物),经针头式过滤器(5.3.5)过滤后备用。

5.4.4 高效液相色谱参考条件

色谱柱:见 5.3.7。

保护柱:见 5.3.8。

流动相:见 5.2.13。

注:如色谱仪本身带有在线脱气系统,可不进行脱气。

流速:1.0 mL/min。

荧光检测器:激发波长 333 nm,发射波长 460 nm。

柱温:30℃。

进样体积:25 μL。

5.4.5 测定

参考上述色谱条件,调节高效液相色谱仪工作参数,使 OTA 与杂质完全分离。用流动相将赭曲霉毒素 A 标准工作溶液配制浓度分别为 0.4 ng/mL、0.8 ng/mL、1.6 ng/mL、3.2 ng/mL、8 ng/mL、16 ng/mL、32 ng/mL 标准工作溶液系列,分别吸收 25 μL 不同浓度的标准工作液和试样提取净化液(V_1),进样分析。以各标准溶液中 OTA 的质量与相应的峰面积(或峰高)作标准曲线。以试样 OTA 峰面积在标准曲线上求得试样提取净化液中 OTA 的质量(m_x)。

5.4.6 空白试验

除不加试样外,按 5.4.2~5.4.5 步骤进行提取、净化、测定,求得空白试液中赭曲霉毒素 A 的质量(m_0)。

5.5 结果计算与表示

5.5.1 试样中赭曲霉毒素 A 的含量按式(3)计算:

$$X_3 = \frac{(m_x - m_0) \times V_2 \times V_3 \times 1\,000}{V_1 \times m \times V_4} \dots\dots\dots (3)$$

X_3 ——试样中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每千克(μg/kg);

m_x ——从标准曲线上获得的赭曲霉毒素 A 的质量,单位为纳克(ng);

m_0 ——空白溶液中赭曲霉毒素 A 的质量,单位为纳克(ng);

V_1 ——试样提取净化液的进样体积,单位为微升(μL);

V_2 ——试样提取净化液最终定容体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——试样总提取液体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——用于固相萃取的样品提取液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

5.5.2 每个试样进行两次平行试验,两次测定重复性符合 5.6.2 要求,取两次测定的算术平均值作为测定结果。

5.6 精密度

5.6.1 实验室间测试

附录 B 中表 B.3 统计了本方法精密度的实验室间测试数据,这些结果适用于本分析浓度范围和基体之内的样品。

5.6.2 重复性

在同一实验室,由同一操作者使用相同设备,按相同的测试方法,并在短时间内对同一被测试对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值大于表 B.3 所示重复性限值(r)的情况不超过 5%。

5.6.3 再现性

在不同的实验室,由不同的操作者使用不同的设备,按相同的测试方法,对同一被测对象相互独立进行测试获得的两次独立测试结果的绝对差值大于表 B.3 所示再现性限值(R)的情况不超过 5%。

附 录 A
(资料性附录)

赭曲霉毒素 A 标准品的色谱图

赭曲霉毒素 A 标准品的色谱图如图 A.1 和图 A.2 所示。

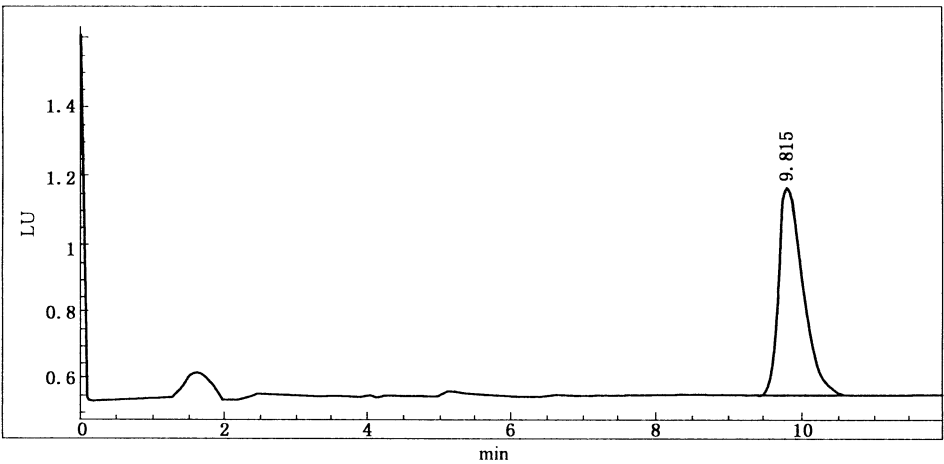


图 A.1 免疫亲和柱净化高效液相色谱法色谱条件下赭曲霉毒素 A 标准品的色谱图

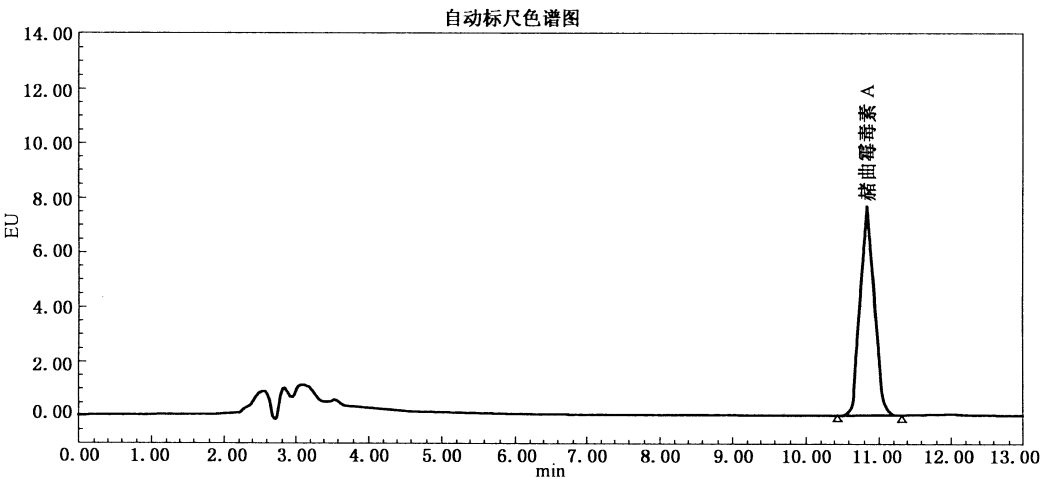


图 A.2 离子交换固相萃取柱净化高效液相法色谱条件下赭曲霉毒素 A 标准品的色谱图

附 录 B
(资料性附录)
实验室间测试结果

表 B.1 为 2008 年组织的有 5 个实验室参与的免疫亲和层析净化高效液相色谱法实验室间测试统计结果,样品为添加了赭曲霉毒素 A 标准品的小麦、稻谷和玉米。

表 B.1 免疫亲和层析净化高效液相色谱法测试结果的统计分析

项 目	玉米			小麦			稻谷		
参加实验室的数量	5	5	5	5	5	5	5	5	5
样品的数量	1	1	1	1	1	1	1	1	1
去除离群值后的测试实验室数量	5	5	5	5	5	5	5	5	5
所有可接受结果的数量	15	15	15	15	15	15	15	15	15
平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.850	4.408	8.843	0.773	3.995	8.108	0.813	4.353	8.885
重复性的标准偏差, S_r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.046	0.444	0.952	0.055	0.355	0.623	0.046	0.378	1.179
重复性的变异系数/%	5.4	10.1	10.8	7.2	8.9	7.7	5.6	8.7	13.3
重复性限值, r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.130	1.257	2.693	0.157	1.006	1.763	0.129	1.070	3.338
再现性标准偏差, S_R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.135	0.636	1.307	0.072	0.361	0.702	0.109	0.518	1.440
再现性的变异系数/%	15.9	14.4	14.8	9.3	9.0	8.7	13.4	11.9	16.2
再现性限值, R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.383	1.799	3.699	0.204	1.023	1.985	0.309	1.465	4.075
回收率/%	85.0	88.2	88.4	77.3	79.9	81.1	81.3	87.1	88.9

表 B.2 为 2008 年组织的有 6 个实验室参与的免疫亲和柱层析净化荧光光度法实验室间测试统计结果,样品为添加了赭曲霉毒素 A 标准品的小麦、稻谷和玉米。

表 B.2 免疫亲和柱层析净化荧光光度法测试结果的统计分析

项 目	玉米			小麦			稻谷		
参加实验室的数量	6	6	6	6	6	6	6	6	6
样品的数量	1	1	1	1	1	1	1	1	1
去除离群值后的测试实验室数量	6	6	6	6	6	6	6	6	6
所有可接受结果的数量	18	18	18	18	18	18	18	18	18
平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.763	4.022	7.733	0.799	3.917	7.694	0.769	4.194	8.111
重复性的标准偏差, S_r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.065	0.614	0.898	0.183	0.608	0.733	0.056	0.651	1.222
重复性的变异系数/%	8.5	15.3	11.6	22.9	15.5	9.5	7.2	15.5	15.1
重复性限值, r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.184	1.738	2.542	0.518	1.721	2.075	0.158	1.843	3.457
再现性标准偏差, S_R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.065	0.614	0.898	0.183	0.608	0.733	0.056	0.651	1.222
再现性的变异系数/%	8.5	15.3	11.6	22.9	15.5	9.5	7.2	15.5	15.1
再现性限值, R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.184	1.738	2.542	0.518	1.721	2.075	0.158	1.843	3.457
回收率/%	76.3	80.4	77.3	79.9	78.3	76.9	76.9	83.9	81.1

表 B.3 为 2008 年组织的有 5 个实验室参与的离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法实验室间测试统计结果,样品为添加了赭曲霉毒素 A 标准品的小麦、稻谷和玉米。

表 B.3 离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法测试结果的统计分析

项 目	玉米			小麦			稻谷		
参加实验室的数量	5	5	5	5	5	5	5	5	5
样品的数量	1	1	1	1	1	1	1	1	1
去除离群值后的测试实验室数量	4	5	5	4	5	5	4	5	5
所有可接受结果的数量	12	15	15	12	15	15	12	15	15
平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.909	4.206	8.678	0.861	4.679	9.224	0.926	4.680	9.177
重复性的标准偏差, S_r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.034	0.180	0.183	0.031	0.120	0.256	0.048	0.245	0.287
重复性的变异系数/%	3.8	4.3	2.1	3.6	2.6	2.8	5.2	5.2	3.1
重复性限值, r /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.097	0.509	0.517	0.089	0.340	0.725	0.135	0.693	0.813
再现性标准偏差, S_R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.143	0.693	0.873	0.133	0.418	1.021	0.095	0.400	1.403
再现性的变异系数/%	15.7	16.5	10.1	15.4	8.9	11.1	10.3	8.6	15.3
再现性限值, R /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.403	1.962	2.472	0.375	1.184	2.890	0.270	1.133	3.969
回收率/%	90.9	84.1	86.8	86.1	93.6	92.2	92.6	93.6	91.8