

# 团 体 标 准

T/CBJ 2205—2023

## 白酒大曲和酒醅中黄曲霉毒素的检测方法

Quantification of aflatoxins in Daqu and fermented grains

2023-08-08 发布

2023-09-08 实施

中国酒业协会 发布  
中国标准出版社 出版



## 目 次

前言 .....	I
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 原理 .....	1
5 试剂和材料 .....	1
6 仪器和设备 .....	2
7 分析步骤 .....	2
8 分析结果的表述 .....	4
9 精密度 .....	5
附录 A (资料性) 串联质谱法图谱 .....	6

## 前 言

本文件按照 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》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国酒业协会提出。

本文件由中国酒业协会团体标准审查委员会归口。

本文件起草单位：江南大学、中国酒业协会、无锡市产品质量监督检验院、国家食品安全风险评估中心、国家市场监管重点实验室(白酒监管技术)。

本文件主要起草人：徐岩、宋书玉、韩业慧、陈双、王旭亮、杜静怡、丁云连、骆鹏杰、王紫菲、余晓琴。



# 白酒大曲和酒醅中黄曲霉毒素的检测方法

## 1 范围

本文件规定了白酒大曲和酒醅中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> (以下简称 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub>) 的测定方法。

本文件适用于白酒生产用大曲和酒醅中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 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,仅该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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

试样中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>,用乙腈-水溶液提取,提取液经过盐析后加入净化剂处理(必要时经黄曲霉毒素固相净化柱净化),净化液浓缩、定容和过滤后经液相色谱分离,串联质谱检测,外标法定量。

## 5 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

### 5.1 试剂

- 5.1.1 乙腈(CH<sub>3</sub>CN,CAS 号:75-05-8):色谱纯。
- 5.1.2 甲醇(CH<sub>3</sub>OH,CAS 号:67-56-1):色谱纯。
- 5.1.3 甲酸(HCOOH,CAS 号:64-18-6):色谱纯。
- 5.1.4 氯化钠(NaCl,CAS 号:7647-14-5)。
- 5.1.5 硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>,CAS 号:22189-08-8)。
- 5.1.6 N-丙基乙二胺(PSA)(C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>,CAS 号:111-39-7)。

### 5.2 试剂配制

- 5.2.1 乙腈-水溶液(60+40):取 600 mL 乙腈加入 400 mL 水,混匀。
- 5.2.2 0.01%甲酸溶液:取 0.1 mL 甲酸,用纯水稀释至 1 000 mL,混匀。

### 5.3 标准品及标准溶液配制

5.3.1 AFT B<sub>1</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>,CAS号:1162-65-8):1 μg/mL,纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 AFT B<sub>2</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>,CAS号:7220-81-7):0.3 μg/mL,纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.3 AFT G<sub>1</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub>,CAS号:1165-39-5):1 μg/mL,纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.4 AFT G<sub>2</sub> 标准品(C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>7</sub>,CAS号:7241-98-7):0.3 μg/mL,纯度≥98%,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.5 混合标准工作液(AFT B<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>1</sub> 浓度为 100 ng/mL,AFT B<sub>2</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 浓度为 30 ng/mL):准确移取混合标准溶液 1.00 mL 至 10 mL 容量瓶中,乙腈定容。此溶液密封后避光-20 °C 下保存。

## 6 仪器和设备

6.1 筛网:0.85 mm 试验筛孔径。

6.2 高速粉碎机。

6.3 超声波/涡旋振荡器或摇床。

6.4 涡旋混合器。

6.5 高速均质器:转速为 6 500 r/min~24 000 r/min。

6.6 电热恒温鼓风干燥箱。

6.7 天平:感量 0.01 g 和 0.000 01 g。

6.8 离心机:转速≥6 000 r/min。

6.9 固相萃取装置(带真空泵)。

6.10 氮吹仪。

6.11 液相色谱-串联质谱仪:带电喷雾离子源。

6.12 液相色谱柱。

6.13 黄曲霉毒素专用型固相萃取净化柱或功能相当的固相萃取柱(以下简称净化柱)。

6.14 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)。

## 7 分析步骤

使用不同厂商的净化柱,在样品上样、淋洗和洗脱的操作方面可能会略有不同,应按照供应商所提供的操作说明书要求进行操作。样品分析在温度为 25 °C ± 5 °C,相对湿度为 25%~75%的室内实验室开展。

**警示:**整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光(直射阳光)、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中,操作者应采取一定的保护措施。

### 7.1 样品制备

采样量需大于 1 kg,烘干至恒重,用高速粉碎机将其粉碎,过筛,使其粒径小于 0.85 mm 孔径试验筛,混合均匀后缩分至 100 g,储存于样品瓶中,密封保存,供检测用。

### 7.2 样品提取

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 25.0 mL 乙腈-水溶液(60+40),振荡混

匀,加入 1 g NaCl 和 4 g MgSO<sub>4</sub> 置涡旋振荡器振荡 1 min 混匀,在 8 000 r/min 下离心 10 min,取上清液备用。

### 7.3 样品净化和浓缩

#### 7.3.1 QuEChERS 净化

取 6 mL 上清液,加入 150 mg PSA 和 900 mg MgSO<sub>4</sub> 涡旋摇匀 30 s,8 000 r/min 转速下离心 10 min,收集所有上清液备用。

#### 7.3.2 浓缩

将净化后的所有上清液用氮气吹至近干,用甲醇:0.01%甲酸(1:1)溶液定容至 1 mL,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,收集滤液于进样瓶中。

#### 7.3.3 QuEChERS 和净化柱同时使用(针对构成复杂的基质)

移取 7.3.1 净化后的所有上清液,按净化柱操作说明进行净化,收集全部净化液。按 7.3.2 处理。

### 7.4 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下。

- a) 流动相:A 相:0.01%甲酸溶液;B 相:100%甲醇。
- b) 梯度洗脱:洗脱程序参见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

洗脱时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	95	5
7.00	40	60
9.00	0	100
11.00	0	100
11.10	95	5
14.00	95	5

- c) 色谱柱:C<sub>18</sub>柱(柱长 100 mm,柱内径 2.1 mm,填料粒径 1.7 μm;或柱长 150 mm、250 mm,柱内径 4.6 mm,填料粒径 5.0 μm),或相当者。
- d) 流速:0.5 mL/min。
- e) 柱温:35 ℃。
- f) 进样体积:5 μL。

### 7.5 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 检测方式:多离子反应监测(MRM);
- b) 离子源控制条件:电喷雾离子化源(ESI),喷雾电压为 3 000 V(+);离子源温度为 150 ℃,去溶剂温度 300 ℃;
- c) 离子选择参数见表 2;



- d) 子离子扫描图见附录 A 的图 A.1~图 A.4；  
e) 液相色谱-质谱图见图 A.5。

表 2 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 <sub>1</sub>	313	269	32	242	35	ESI <sup>+</sup>
AFT B <sub>2</sub>	315	287	25	259	35	ESI <sup>+</sup>
AFT G <sub>1</sub>	329	311	20	243	25	ESI <sup>+</sup>
AFT G <sub>2</sub>	331	313	24	246	35	ESI <sup>+</sup>

## 7.6 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。

## 7.7 标准曲线的制作

将标准系列溶液定量加入空白基质样本中,按 7.2 和 7.3 的步骤制备,在 7.4、7.5 的液相色谱串联质谱仪分析条件下由低到高浓度进样检测,以 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 色谱峰与各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。

## 7.8 试样溶液的测定

取 7.3 处理得到的待测溶液进样,按第 8 章计算样品中待测物的含量。待测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。

## 7.9 空白试验

不称取试样,按 7.2 和 7.3 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

## 8 分析结果的表述

试样中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 和 AFT G<sub>2</sub> 的含量按公式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{V_2 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X —— 试样中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 的含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );  
 $\rho$  —— 进样溶液中 AFT B<sub>1</sub>、AFT B<sub>2</sub>、AFT G<sub>1</sub> 或 AFT G<sub>2</sub> 按照外标法在标准曲线中对应的浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{mL}$ );  
 $V_1$  —— 试样加入的提取液体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );  
 $V_3$  —— 样品经净化浓缩后的最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );  
 1 000 —— 换算系数;  
 $V_2$  —— 用于净化分取的样品体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );  
 $m$  —— 试样的称样量,单位为克( $\text{g}$ )。

计算结果保留三位有效数字。

## 9 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应超过算术平均值的 20%。

附录 A  
(资料性)  
串联质谱法图谱

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 子离子扫描图见图 A.1。

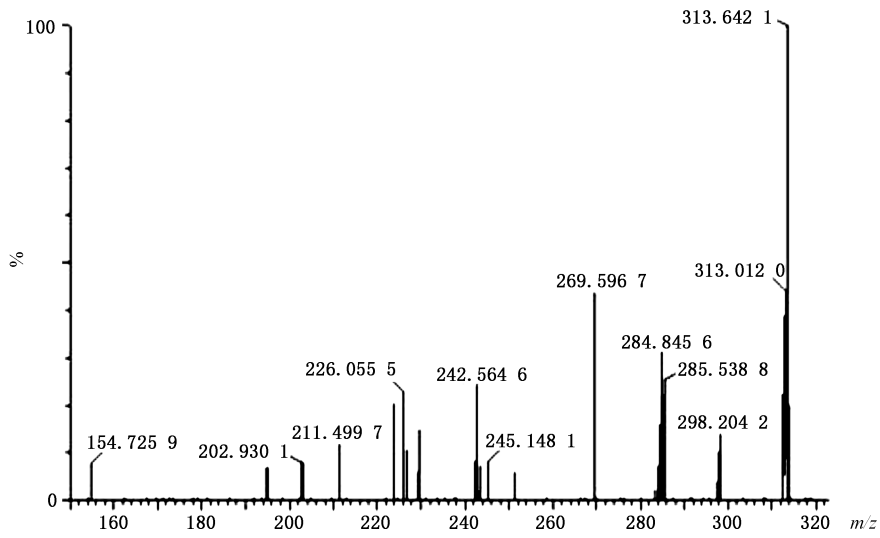


图 A.1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 子离子扫描图

黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 子离子扫描图见图 A.2。

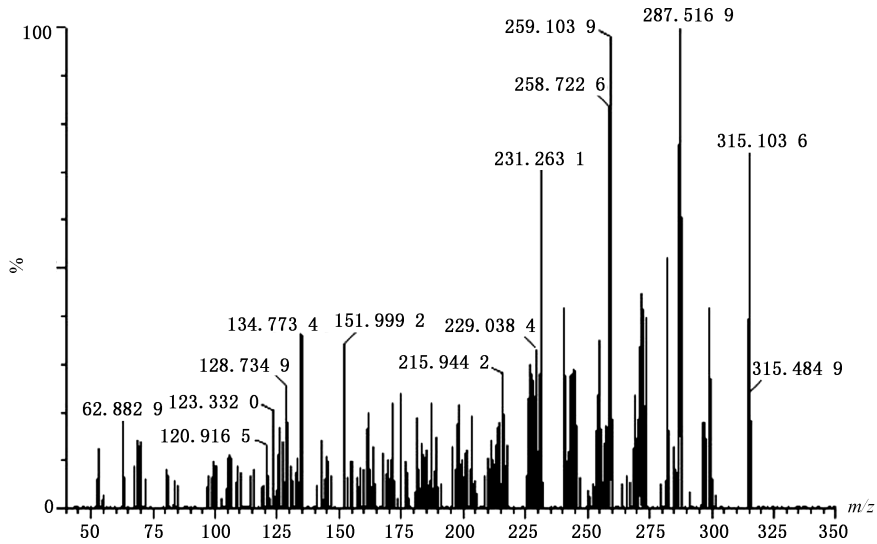


图 A.2 黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 子离子扫描图

黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 子离子扫描图见图 A.3。

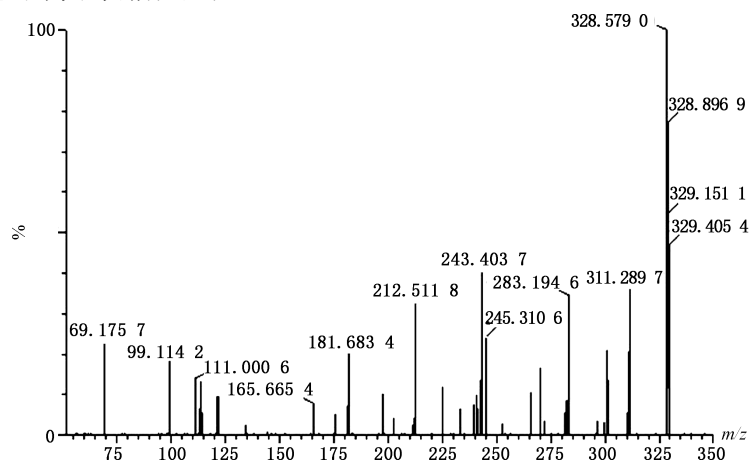


图 A.3 黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 子离子扫描图

黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 子离子扫描图见图 A.4。

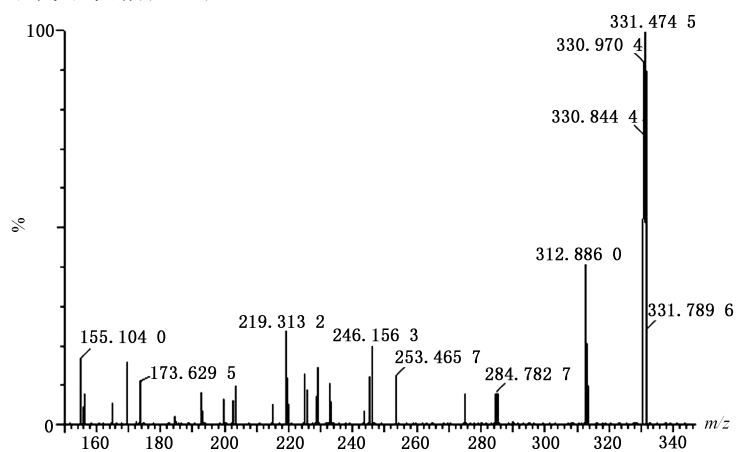


图 A.4 黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 子离子扫描图

四种黄曲霉毒素的液相色谱-质谱图见图 A.5。

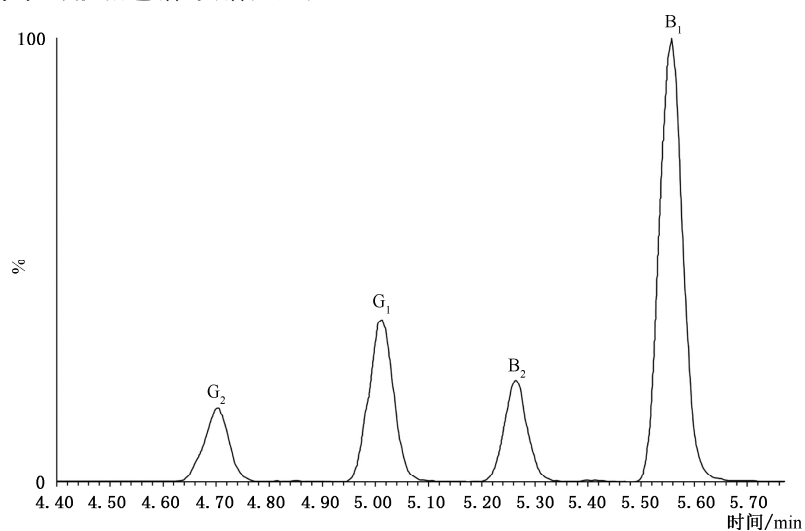


图 A.5 四种黄曲霉毒素的液相色谱-质谱图