



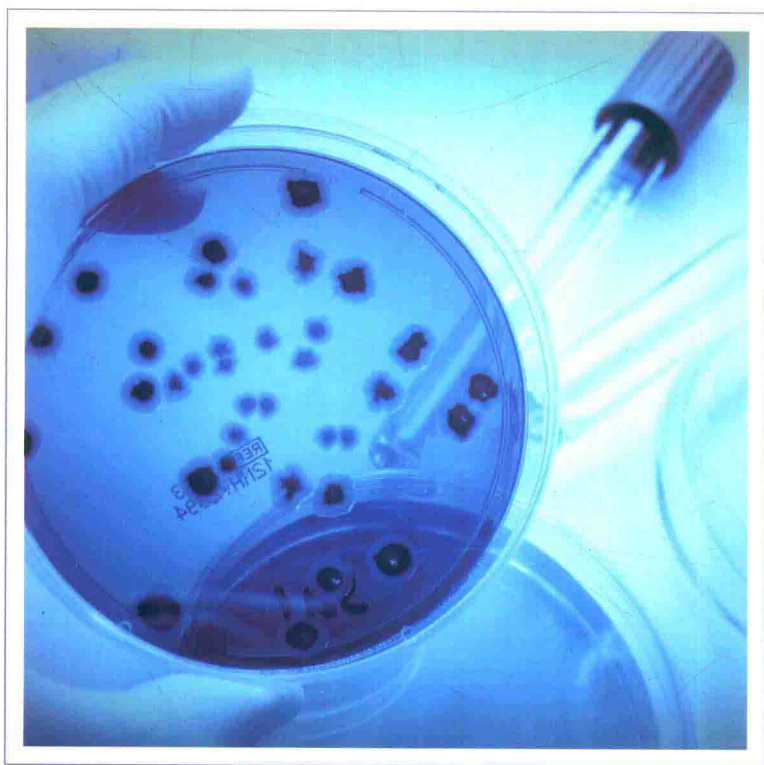
《食品安全关键技术研发》重点专项项目
国家食品安全风险评估中心高层次人才队伍建设 523 项目
食品安全检测方法标准操作程序丛书

食品中真菌毒素 检测方法标准操作程序

Standard Operating Procedures of
Analytical Methods for Mycotoxins in Food

吴永宁◎主编

周爽 任一平 张磊 赵云峰◎执行主编



中国质检出版社
中国标准出版社

《食品安全关键技术研发》重点专项项目

国家食品安全风险评估中心高层次人才队伍建设 523 项目

食品安全检测方法标准操作程序丛书

食品中真菌毒素检测方法 标准操作程序

主 编 吴永宁

执行主编 周 爽 任一平

张 磊 赵云峰

中国质检出版社

中国标准出版社

北 京

图书在版编目(CIP)数据

食品中真菌毒素检测方法标准操作程序/吴永宁等主编.

—北京:中国标准出版社,2018.10

(食品安全检测方法标准操作程序丛书)

ISBN 978-7-5066-9016-4

I. ①食… II. ①吴… III. ①真菌霉素—食品检验—
技术操作规程—中国 IV. ①TS207.5-65

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 265500 号

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

网址:www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 787×1092 1/16 印张 21.75 字数 433 千字

2018 年 10 月第一版 2018 年 10 月第一次印刷

*

定价 88.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107

编 委 会

主 编：吴永宁

执行主编：周 爽 任一平 张 磊 赵云峰

编 委：(按姓氏笔画排序)

丁 颢	王兴龙	任一平	许娇娇
李国辉	杨蕴嘉	吴永宁	邱楠楠
张大伟	张京顺	张 烁	张 晶
张 磊	陈达炜	邵 兵	苗宏健
周 爽	周 旌	郑熠斌	项瑜芝
赵云峰	钟其顶	骆鹏杰	郭巧珍
黄百芬	程 军	谢继安	蔡增轩

序

“民以食为天”，食品是人类生存和发展的物质基础。“食以安为先”，食品安全事关广大人民群众身体健康和生命安全。我国党和政府高度重视食品安全工作，要求严防严管严控食品安全风险，以确保人民群众“舌尖上的安全”。

真菌毒素是真菌的次级代谢产物，是食用农产品和食品中的主要污染物。摄入真菌毒素污染的食品后，可导致急性和慢性中毒。由真菌毒素引起的食源性疾病和贸易争端一直是全球关注的热点。

国际食品法典委员会和有关国家制定了食品中真菌毒素限量标准。我国早在 1981 年开始制定食品中真菌毒素的限量标准 (GB 2761) 及其配套检测方法，开展真菌毒素风险监测和风险评估等。各个时期的 GB 2761 标准对我国食品中真菌毒素的安全管理发挥了重要作用。GB 2761—2017 提出了黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 M₁、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、展青霉素、赭曲霉毒素 A 及玉米赤霉烯酮的限量指标，修订完善的食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定、食品中黄曲霉毒素 M 族的测定、食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定等检测方法标准有力提升了我国食品安全检测方法标准体系。

为增强真菌毒素检测人员对相关检测方法的理解和应用，国家食品安全风险评估中心组织相关检测方法修订和研发人员，编写了食品中真菌毒素标准操作程序。书中简要介绍了有关真菌毒素的化学性质和风险来源，着重介绍了测定的标准操作程序和操作注意事项，概述性介绍了国内外限量标准和检测方法进展。这将有助于食品检验技术机构的从业人员更为系统全面地认识和掌握食品真菌毒素的检验技术，更好地服务于食品安全监督抽检、风险监测以及相关的检验技术活动。

本书编写人员均为多年从事真菌毒素检测技术研发的技术骨干,实践能力强,技术基础扎实,并具有一定的理论造诣。当然,随着检验技术的创新性发展和信息网络技术的进步,新的检测技术层出不穷,因此,本书存在的不当之处,遗漏甚至错误之处,敬请读者批评指正!



中国科学院院士
2018年5月于北京

前

言



真菌毒素是由真菌在适宜的环境条件下产生的具有生物毒性的次生代谢产物。对真菌毒素的认知,最早记载是 11 世纪欧洲的麦角中毒。目前已知的真菌毒素有 400 多种,对人类危害大的真菌毒素有十几种,一般同时具有毒性强和污染严重的特点,主要包括黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、杂色曲霉毒素、展青霉素、玉米赤霉烯酮、伏马菌素、3-硝基丙酸、T-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、二乙酸镰刀菌烯醇等。据联合国粮农组织(FAO)统计,全球每年有 25% 的农产品受到真菌毒素污染,造成严重的损失。我国地域广阔,跨越多个温度带,是世界上受真菌毒素污染最严重的国家之一。

我国政府十分重视真菌毒素防控工作。1981 年制定了黄曲霉毒素 B₁ 的限量标准《食品中黄曲霉毒素 B₁ 允许量标准》(GB 2761),以及 GB 16329—1996《小麦、面粉、玉米及玉米粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇限量标准》、GB 9676—2003《乳及乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 限量》、GB 14974—2003《苹果和山楂制品中展青霉素限量》等真菌毒素限量标准。2000 年我国根据加入 WTO 的需要,按照国际惯例,遵循健康保护、危险性评估和标准符合国情的原则,全面审查了我国食品中真菌毒素限量标准,并与国际食品法典委员会(CAC)标准进行对照比较分析,整合为《食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2005),提出了我国食品中黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 M₁、脱氧雪腐镰刀菌烯醇和展青霉素限量标准。随着我国《食品安全法》的颁布实施以及 CAC 和相应国

家在食品中真菌毒素限量标准的发展,2009年我国对食品中真菌毒素限量指标进行全面评估。在GB 2761—2005基础上,进一步完善了我国食品中真菌毒素限量标准及相应检验方法,提出了《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2011),规定了食品中黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素M₁、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、展青霉素、赭曲霉毒素A及玉米赤霉烯酮的限量指标。2017年对GB 2761—2011进行修订,增加了葡萄酒和咖啡中赭曲霉毒素A限量及特殊医学用途配方食品、辅食营养补充品、运动营养食品、孕妇及乳母营养补充食品中真菌毒素限量,同时发布了一系列配套的真菌毒素检测标准方法。

2016年以来,我国先后颁布实施了食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定(GB 5009.22—2016)、食品中黄曲霉毒素M族的测定(GB 5009.24—2016)、食品中赭曲霉毒素A的测定(GB 5009.96—2016)、食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定(GB 5009.111—2016)、食品中玉米赤霉烯酮的测定(GB 5009.209—2016)、食品中伏马毒素的测定(GB 5009.240—2016)、食品中T-2毒素的测定(GB 5009.118—2016)、食品中桔青霉素的测定(GB 5009.222—2016)、食品中展青霉素的测定(GB 5009.185—2016)、食品中杂色曲霉素的测定(GB 5009.25—2016)和食品中米酵菌酸的测定(GB 5009.189—2016)等真菌毒素检测方法标准,形成了我国较为系统和完善的真菌毒素检测方法体系,有力推动了真菌毒素限量标准的使用和执行,支撑了食品中真菌毒素的监测和评估工作。

为进一步加强食品中真菌毒素相关检测方法的认识,了解方法研制和验证过程中关键点、影响因素以及操作中的注意事项,国家食品安全风险评估中心牵头组织相关标准方法制修订负责人和技术骨干,共同编写了《食品中真菌毒素检测方法标准操作程序》。本书既包括已颁布的理化检验方法标准中真菌毒素检测项目,也涵盖了近年来引起关注的一些真菌毒素,如交链孢霉毒素、3-硝基丙酸、麦角碱类等,还增加了多种真菌毒素同时检测的方法。同时,本书还以实例介绍了快速检测在食品中真菌毒素检测中的应用以及食品中真菌毒素标准物质研制的典型实例。

本书共分十九章,各章节及撰稿人分别为:第一章《食品中真菌毒素检测技术进展》(周爽、任一平、陈达炜、丁颢),第二章《样品的采样

与制备》(周旌、任一平、苗宏健、张大伟),第三章《食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定标准操作程序》(任一平、王兴龙、许娇娇),第四章《食品中黄曲霉毒素M族的测定标准操作程序》(王兴龙、任一平),第五章《食品中赭曲霉毒素的测定标准操作程序》(李国辉、钟其顶),第六章《食品中雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的测定标准操作程序》(许娇娇、周爽),第七章《食品中玉米赤霉烯酮及其类似物的测定标准操作程序》(许娇娇),第八章《食品中伏马毒素的测定标准操作程序》(蔡增轩),第九章《食品中T-2和HT-2毒素的测定标准操作程序》(张京顺、张烁、谢继安),第十章《食品中桔青霉素的测定标准操作程序》(蔡增轩),第十一章《食品中展青霉毒素的测定》(任一平、项瑜芝),第十二章《食品中杂色曲霉毒素的测定》(黄百芬、项瑜芝),第十三章《食品中米酵菌酸的测定》(黄百芬、郑熠斌),第十四章《甘蔗中3-硝基丙酸的测定标准操作程序》(蔡增轩),第十五章《食品中交链孢霉毒素的测定标准操作程序》(谢继安、王兴龙),第十六章《谷物类食品中麦角碱的测定标准操作程序》(郭巧珍、张晶、邵兵、杨蕴嘉),第十七章《食品中真菌毒素多组分的测定标准操作程序》(蔡增轩、邱楠楠、任一平),第十八章《食品中真菌毒素的快速筛查技术》(骆鹏杰、周旌),第十九章《真菌毒素标准物质的研制》(黄百芬、张磊、周旌、张大伟)。

真菌毒素检测通常包括样品采集制备、样品前处理和毒素测定三个分析过程。由于真菌毒素污染的不均匀性,样品采集应有代表性,采集后应充分粉碎混匀,使待分析样品中毒素水平尽可能与原始样品中毒素水平一致。真菌毒素经过不同方法提取净化后,可采用色谱法、色谱质谱联用法、免疫分析法、生物传感器法等多种方法进行检测。在检测方法的选择上,早期主要采用薄层色谱法进行食品中黄曲霉毒素及其他真菌毒素的检测。随着仪器分析的快速发展,真菌毒素的检测技术不断提高。色谱与紫外、荧光等传统检测器相结合,已成为一种成熟的技术,而色谱质谱联用技术为真菌毒素分析提供了有力手段。由于真菌毒素污染的广泛性,在检测方法的选择上,由单个毒素或单一种类毒素的检测发展为多毒素乃至多类型的同时检测。在隐蔽型真菌毒素和新兴毒素的发现及定性定量检测中,高分辨质谱技术运用日益增加。

本书注重实际应用,旨在帮助读者更好地理解 and 掌握相关检测方法的背景和操作要点。本书的编者实践经验丰富,多年从事食品中真菌毒素检验技术工作,具有较扎实的理论基础。在着重介绍检测方法标准操作程序和操作注意事项的同时,作者还简要介绍了各类真菌毒素的概况,从化学性质、风险来源到国内外限量及检测方法等,各章附有参考文献。

本书可供出入境检验检疫、疾病预防控制(食品安全与营养)、农产品安全检测、产品质量监督检验政府实验室和食品企业品管部、第三方实验室的技术人员参考,也可供与食品安全检测相关的学校专业、培训机构、科研人员作为参考。

由于编者水平所限,再加上时间仓促,本书遗漏和不足之处在所难免,恳请同行和广大读者予以指正。

在本书的编写过程中得到了中国科学院生态环境研究中心江桂斌院士的鼓励和鞭策,谨此表示衷心的感谢。

本书的出版得到了“十三五”国家重点研发计划《食品安全关键技术研发》重点专项“食品中化学污染物监测检测及风险评估数据一致性评价的参考物质共性技术研究”项目(2017YFC1601300)和国家食品安全风险评估中心高层次人才队伍建设 523 项目的资助,谨此一并致谢。

吴永宁

2018 年 4 月

目

录



第一章 食品中真菌毒素检测技术进展	1
第一节 概 述	1
第二节 样品的采集与制备	2
第三节 检测技术进展	3
第四节 展 望	9
参考文献	10
第二章 样品的采样与制备	25
第一节 真菌毒素检测的采样	25
第二节 样品制备	46
参考文献	48
第三章 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定标准操作程序	49
第一节 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法	50
第二节 高效液相色谱-柱前衍生法	56
第三节 高效液相色谱-柱后衍生法	60
参考文献	71
第四章 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定标准操作程序	72
第一节 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法	72
第二节 高效液相色谱法	80
参考文献	87
第五章 食品中赭曲霉毒素的测定标准操作程序	88
第一节 免疫亲和层析净化液相色谱法	89
第二节 离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法	97

第三节 免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法	101
参考文献	108
第六章 食品中雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的测定标准操作程序 ...	110
第一节 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物-液相色谱 串联质谱法测定	110
第二节 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物-高效液相 色谱-紫外检测器测定	120
第三节 食品中雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的测定	124
参考文献	131
第七章 食品中玉米赤霉烯酮及其类似物的测定标准操作程序	132
第一节 食品中玉米赤霉烯酮及其类似物测定	133
第二节 食品中玉米赤霉烯酮-液相色谱串联质谱法测定	141
第三节 食品中玉米赤霉烯酮-高效液相色谱法测定	146
参考文献	150
第八章 食品中伏马毒素的测定标准操作程序	152
第一节 液相色谱-串联质谱法	152
第二节 免疫亲和层析净化-柱后衍生高效液相色谱法	161
第三节 免疫亲和层析净化-柱前衍生高效液相色谱法	166
参考文献	171
第九章 食品中 T-2 毒素和 HT-2 毒素的测定标准操作程序	173
第一节 免疫亲和层析净化液相色谱法	174
第二节 高效液相色谱-串联质谱法	179
参考文献	183
第十章 食品中桔青霉素的测定标准操作程序	185
第一节 液相色谱-串联质谱法	185
第二节 高效液相色谱法	191
参考文献	195
第十一章 食品中展青霉素的测定标准操作程序	196
第一节 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法	196
第二节 液相色谱法	204
参考文献	208
第十二章 食品中杂色曲霉素的测定标准操作程序	209
第一节 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法	209
第二节 液相色谱法	215

参考文献	218
第十三章 食品中米酵菌酸的测定标准操作程序	219
第一节 高效液相色谱法	219
第二节 高效液相色谱-串联质谱法	223
参考文献	227
第十四章 甘蔗中 3-硝基丙酸的测定标准操作程序	228
第一节 液相色谱-串联质谱法	228
第二节 高效液相色谱法	233
参考文献	236
第十五章 食品中交链孢霉毒素的测定标准操作程序	237
参考文献	248
第十六章 谷物类食品中麦角碱的测定标准操作程序	249
参考文献	259
第十七章 食品中真菌毒素多组分的测定标准操作程序	260
第一节 固相萃取柱净化-液相色谱-串联质谱法	260
第二节 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法	272
第三节 免疫亲和层析净化-液相色谱-串联质谱法	284
参考文献	292
第十八章 真菌毒素快速筛查技术	294
参考文献	317
第十九章 真菌毒素标准物质的研制	318
第一节 真菌毒素标准物质	318
第二节 真菌毒素标准物质的研制	318
第三节 真菌毒素标准物质的应用	331
第四节 选择和使用真菌毒素标准物质	332
参考文献	333

第一章



食品中真菌毒素检测技术进展

第一节 概 述

真菌毒素是真菌的次级代谢产物。真菌毒素是农产品的主要污染物之一,摄入后可导致急、慢性中毒,主要表现为致癌性、致突变性、肝毒性、肾毒性、免疫毒性、神经毒性、致畸性及类雌激素样作用等。目前已知的真菌毒素有 400 余种,其中最受关注的是由曲霉菌属、镰刀菌属、青霉菌属、链格孢属等产生的黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、单端孢霉烯毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮、展青霉素等。国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)对主要真菌毒素的致癌性进行了分类(见表 1-1)。真菌毒素可通过多种途径污染食品:产毒真菌可直接感染谷类等农作物,从而造成真菌毒素污染;使用污染原料进行生产可导致咖啡、果汁等加工食品被真菌毒素污染;此外,污染饲料中毒素的迁移也会造成肉、蛋、奶等动物源性食品的污染。由真菌毒素引起的食源性疾病和贸易争端一直是全球关注的热点。联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)、世界卫生组织(World Health Organization, WHO)、食品添加剂联合专家委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)、欧盟食品科学委员会(Scientific Committee of Food, SCF)、欧盟食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)等对真菌毒素的污染及健康影响开展了持续跟踪研究,现已发布大量具体研究报告,并制定了部分毒素的健康指导值(Health based guidance value, HBGV),见表 1-1。以健康指导值为依据,结合居民的食物消费量数据,一些国际组织和国家制定或等效采纳了真菌毒素最高限量标准,并通过良好的种植、储存和加工规范,尽可能地降低真菌毒素水平,以保护消费者健康。

表 1-1 真菌毒素健康指导值(HBGVs)

真菌毒素	IARC 分类	健康指导值	参考文献
黄曲霉毒素(AFT B ₁ 、AFT B ₂ 、AFG ₁ 、AFG ₂)	Group 1	具有遗传毒性和致癌性,其摄入应遵循尽可能低(as low as reasonably achievable, ALARA)的原则,不设定健康指导值	JECFA
黄曲霉毒素 M ₁	Group 2		

表 1-1(续)

真菌毒素	IARC 分类	健康指导值	参考文献
脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)及其衍生物(3-Ac-DON, 15-Ac-DON)	Group 3	TDI=1μg/(kg 体重·d)	SCF,2002
		PMTDI(DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON 总量)=1μg/(kg 体重·d); ARfD(DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON 总量)=8μg/kg 体重	JECFA,2010
T-2, HT-2	Group 3	PMTDI(T-2 和 HT-2 总量)=0.06μg/(kg 体重·d)	JECFA,2002
		TDI(T-2 和 HT-2 总量)=0.1μg/(kg 体重·d)	EFSA,2011
雪腐镰刀菌烯醇	Group 3	TDI=1.2μg/(kg 体重·d)	EFSA,2013
赭曲霉毒素	Group 2B	TWI=120ng/g(kg 体重·w)	EFSA,2006
		PTWI=100ng/g(kg 体重·w)	JECFA,2008
玉米赤霉烯酮	Group 3	PMTDI=0.5μg/(kg 体重·d)	JECFA,2000
		TDI=0.25μg/(kg 体重·d)	EFSA,2011
伏马毒素(FB1, FB2, FB3)	Group 2B	PMTDI(FB1, FB2, FB3 总量)=2μg/(kg 体重·d)	JECFA,2002
		TDI(FB1, FB2, FB3 总量)=2μg/(kg 体重·d)	SCF,2003
展青霉素	Group 3	PMTDI=0.4μg/(kg 体重·d)	JECFA,1995
桔青霉素	Group 3	没有足够数据,暂无 HBGV	EFSA,2012
注:Group 1,对人类是致癌物;Group 2,对人类可能或很可能是致癌物;Group 2B,对人类很可能(possible)是致癌物,但证据有限;Group 3,现有证据不能对人类致癌性进行分类;TDI(tolerable daily intake),每日耐受摄入量;PMTDI(provisional maximum tolerable daily intake),临时每日最大耐受摄入量;ARfD(acute reference dose),急性参考剂量。			

第二节 样品的采集与制备

采样和制样的目的是从一批货物中抽取并制备测试样品,使测试样品中目标化合物的含量与整批货物相同。与大多数化合物不同,真菌毒素的污染呈不均匀分布,这为样品的采集与制备提出了更大的挑战。通常在于评估真菌毒素整体水平的所有步骤中,采样步骤是误差的最主要来源(见图 1-1)。国际食品法典委员会(CAC)、欧盟(EU)、美国食品药品监督管理局(USFDA)、美国农业部(USDA)等均发布了详细的用于真菌毒素测定的样品采集与制备操作指南。最近 FAO 设计了一种有效的真菌毒素采样工具(Myco-

toxin Sampling Tool, Version 1.1), 为食品样品中真菌毒素检测的抽样方案制定提供了支持, 帮助建立能够满足用户自定义目标的最合适的采样计划, 并可以评估不同抽样方案设计参数(如样本大小)对抽样计划代表性的影响。

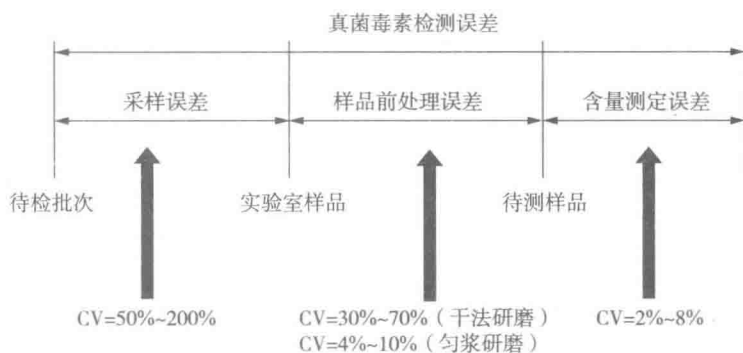


图 1-1 真菌毒素检测过程误差来源分析^[16]

第三节 检测技术进展

食品中真菌毒素的检测通常包括样品前处理(提取、净化)和测定, 某些情况下, 萃取或净化不是必需的。由于食品样品基质复杂, 真菌毒素结构性质差异较大, 且多为痕量污染, 因此快速高效的样品前处理方法和灵敏精准的测定方法成为真菌毒素检测技术的研究热点。

一、样品前处理

真菌毒素前处理方法通常包括提取和净化两个步骤。

(一) 提取

将目标毒素从样品基质中提取出来是分析实验的第一步。在综合考虑目标毒素理化性质、后续净化步骤、溶剂毒性、成本等多因素的基础上, 选用合适的提取溶剂, 以助于真菌毒素充分、高效地从基质中溶出。目前在提取食品中真菌毒素过程中较常使用的溶剂为水、甲醇、乙腈、三氯甲烷、乙酸乙酯、异丙醇等溶剂及其混合溶剂。提取过程可以采用涡旋震荡、高速均质以及超声等方式辅助加速提取。

(二) 净化

为了减少对目标化合物的干扰、延长仪器使用寿命, 样品提取液在分析前通常需要进行净化, 将提取液中的大量存在的干扰物质, 如脂肪、蛋白质、色素以及矿物质、纤维素等除去。目前常用的净化手段包括以下几种:

1. 液液萃取法(Liquid-liquid extraction, LLE)

液液萃取法主要原理是利用待测物和杂质在不同溶剂中溶解度的差异来完成萃取

净化。如使用一些弱极性溶剂如正己烷、石油醚等去除提取液中的油脂、胆固醇等弱极性杂质,而极性目标物则被保留在极性溶剂中;或使用弱极性溶剂提取水相中的弱极性目标物等。液液萃取法方法简单,对设备要求低,但耗时长、效率低、溶剂用量较大。

2. 固相萃取法(solid phase extraction, SPE)

SPE 是食品中真菌毒素检测的常用前处理方法。根据毒素的结构和性质选择合适填料的 SPE 柱,可有效保留目标化合物,除去杂质,达到分离纯化的目的。SPE 柱常用填料为硅胶或带有一OH、—CN、—C₁₈、—C₆H₅ 或阴阳离子的化学键和填料。SPE 的一般步骤包括:活化,使用适当溶剂对 SPE 柱进行淋洗,去除柱子中可能存在的杂质并使填料表面溶剂化;上样,使提取液缓慢通过 SPE 柱,达到一个充分接触、分配平衡的过程;淋洗,使用中等强度溶剂将保留在柱上的干扰物质洗脱,而目标物继续保留;洗脱,将待测物完全洗脱并收集。SPE 具有试剂用量少、操作过程快、净化效果好、方法重现性好、易实现自动化、洗脱液便于浓缩富集等有点,但对上样液洁净度要求较高,且填料选择范围有限。

近年来,一些新的 SPE 填料,如石墨烯、碳纳米管、分子印迹聚合物等材料已逐步应用于真菌毒素的检测,可增强目标物的保留,改善 SPE 选择性。此外,SPE 易与液相色谱在线联用,可显著简化实验操作并提高方法灵敏度,特别适用与液体样品中真菌毒素的检测。

3. 免疫亲和层析法(immunoaffinity chromatography, IAC)

IAC 利用生物分子(抗体、受体、核酸适配体等)与目标化合物间高度特异性结合作用保留目标毒素,去除杂质,而后通过使生物分子变性进行真菌毒素的洗脱,实现分离和富集。目前,大多数主要真菌毒素(黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、伏马毒素、T-2 和 HT-2 毒素等)的免疫亲和柱均已商品化。免疫亲和柱非常适合于食品、饲料等复杂基质中真菌毒素的检测,并已成功应用于多项国家标准。与常规固相萃取相比,IAC 亲和力强、特异性高、净化效果好,但机械强度低、成本高且大多不能重复使用。因此,免疫亲和柱的进一步研究主要包括两个方面:一是能同时检测多种真菌毒素的多合一亲和柱的开发,二是可重复使用的免疫亲和柱的研制。

4. 多功能柱净化法

多功能柱以物理吸附为主,由不同的吸附材料(极性、非极性或离子交换等)混合填充,能够选择性地保留去除提取液中的蛋白、脂类等杂质,而目标毒素不被保留。多功能柱在操作上比传统 SPE 法更加快速,不需要活化、淋洗及洗脱等过程,适用于多种毒素的同时测定;与免疫亲和柱相比,检测成本较低,适合大批量样品的测定。但多功能柱对于复杂基质的净化效果有限,部分目标物绝对回收率较差。

5. QuEChERS 法

分散固相萃取法(dispersion-solid phase extraction, d-SPE)是由美国农业部农业研究中心的 Anastassiades 等人于 2003 年提出的一种快速样品前处理方法,利用吸附剂填料与样品中杂质相互作用而达到除杂净化的目的。因具有快速(quick)、简单(easy)、廉价(cheap)、高效(effective)、稳定(rugged)、安全(safe)等特点,因而又被称为 QuEChERS