



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××

乳和乳制品中黄曲霉毒素M₁的测定

Determination of aflatoxin M₁ in milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准参考了AOAC 997.12，一致性程度为非等效。

本标准与AOAC 997.12相比主要修改如下：

本标准附录A、附录B和附录C均为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

乳和乳制品中黄曲霉毒素M₁的测定

1 范围

本标准乳与乳制品中黄曲霉毒素M₁的测定方法。

本标准第一法适用于乳与乳制品中黄曲霉毒素M₁的测定；第二法适用于乳、乳粉，以及低脂乳、脱脂乳、低脂乳粉和脱脂乳粉中黄曲霉毒素M₁的测定；第三法适用于乳和乳粉中黄曲霉毒素M₁的测定；第四法适用于牛乳及其制品中黄曲霉毒素M₁的测定；第五法适用于生鲜乳、巴氏杀菌乳、UHT灭菌乳和乳粉中黄曲霉毒素M₁的测定。

本标准第一法的定量限为(以鲜奶记) 0.01 μg/kg；第二法乳粉中黄曲霉毒素M₁的最低检测限为0.08 μg/kg，乳中黄曲霉毒素M₁的最低检测限为0.008 μg/L；第三法乳中的黄曲霉毒素M₁0.1 μg/L，乳粉中黄曲霉毒素M₁的检出限为0.1 μg/kg；第五法的检出限为0.5 μg/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

第一法 免疫层析净化液相—质谱法

3 原理

试样用水和有机溶剂的混合溶液溶解，经超声提取、离心，取上清液经免疫亲和柱净化，洗脱液经N₂吹干、定容、微孔滤膜过滤，进液相色谱分离，电喷雾离子源离子化，多反应离子监测（MRM）方式检测。基质加标外标法定量。

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/T6682规定的一级水。

- 4.1 甲酸：色谱纯。
- 4.2 乙腈：色谱纯。
- 4.3 石油醚：分析纯。
- 4.4 三氯甲烷：分析纯。
- 4.5 氮气。
- 4.6 标准样品：M₁：纯度 ≥ 98%。
- 4.7 试验用溶液
- 4.8 20%乙腈水溶液：在400 mL水中加入100 mL乙腈。

- 4.9 10%乙腈水溶液：在 450 mL 水中加入 50 mL 乙腈。
- 4.10 0.1 % 甲酸溶液：吸取 1 mL 甲酸，用水稀释至 1000 mL。
- 4.11 乙腈/甲醇溶液（50+50）：在 500 mL 乙腈中加入 500 mL 甲醇。
- 4.12 0.5 mol.L⁻¹ 的氢氧化钠溶液：称取 2 g 氢氧化钠溶解于 1000 mL 水中。
- 4.13 待测试样空白基质溶液

称取与待测样品基质相同的、不含所测黄曲霉素素的试样 8 份于 100 mL 烧杯中。以下操作按 6.1 试液提取和 6.2 净化步骤进行。合并所得 8 份试样的纯化液，用 0.22 μm 微孔滤膜的一次性滤头（5.7）过滤。弃去前 0.5 mL 滤液，接取少量滤液供液相色谱—质谱联用仪检测。

获得色谱—质谱图后，对照附录 A 中的图 A.2，在相应的保留时间处，应不含黄曲霉毒素 M₁。余下滤液转移至棕色瓶中，在 -20℃ 电冰箱内保存，供配制标准系列溶液使用。

- 4.14 黄曲霉毒素标准储备溶液：分别称取标准品 M₁ 0.10 mg（准确至 0.01 mg），用三氯甲烷（4.4）溶解定容至 10 mL。此标准溶液浓度为 0.01 mg.mL⁻¹。溶液转移至塑料瓶中后，在 -20℃ 电冰箱内保存，备用。
- 4.15 标准系列溶液：

吸取 M₁ 标准储备溶液（4.14）100 μL 于 100 mL 容量瓶中，用氮气将三氯甲烷吹至近干，乙腈定容至刻度。再用待测试样空白基质溶液（4.13）将 M₁ 标准储备溶液（4.14）稀释为 0.5、0.8、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0 ng mL⁻¹ 的系列标准工作液，定容至 1 mL。

5 仪器和设备

- 5.1 液相色谱—质谱联用仪：带电喷雾离子源；质量范围：1 质荷比（m/z）—1500 质荷比（m/z）；分辨率：0.1 原子质量单位（AMU）。
- 5.2 色谱柱：ACQUIT UPLC HSST3，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm；填料粒径 1.8 μm，或相当者。
- 5.3 天平：感量 0.01 g 和 0.00001 g。
- 5.4 匀浆器。
- 5.5 超声波清洗器。
- 5.6 离心机：4000 g 离心力（离心力 $g=1.12 \times 10^{-5} \times \text{转/分} \times \text{旋转半径}$ ）。
- 5.7 具塞离心管：50 mL。
- 5.8 水浴：温控 30℃±2℃，50℃±2℃，温度范围 25℃—60℃。
- 5.9 容量瓶：100 mL。
- 5.10 玻璃烧杯：250 mL，50 mL。
- 5.11 带刻度的磨口玻璃试管：5 mL，10 mL，20 mL。
- 5.12 移液管：1.0 mL，2.0 mL 和 50.0 mL。
- 5.13 玻璃棒。
- 5.14 10 目圆孔筛。

- 5.15 分液漏斗250 mL。
- 5.16 圆地烧瓶 100 mL。
- 5.17 振荡器。
- 5.18 具塞锥形瓶250 mL。
- 5.19 免疫亲和柱。
- 5.20 一次性注射器:10 mL和50 mL。
- 5.21 真空系统。
- 5.22 一次性微孔滤头: 带0.22 μm 微孔滤膜(水相系)。

6 分析步骤

6.1 试液提取

6.1.1 乳

称取50.0 g混匀的试样,置于50 mL具塞离心管(5.7)中,,在水浴(5.8)中加热到35℃-37℃。在4 000 g离心力下离心15 min。收集全部上清液,供净化用。

6.1.2 酸奶(包括固体状、半固体状和带果肉型)

称取50.0 g混匀的试样,用0.5 mol.L⁻¹的氢氧化钠溶液(4.3.5)调pH至7.4,在9500 转/min下均质(5.4)5 min,以下操作按 6.1.1 进行。

6.1.3 乳粉和婴儿配方粉

称取 10.0 g试样,置于250 mL烧杯(5.10)中。将50 mL已预热到50 ℃的水多次少量地加人到乳粉中,用搅玻璃棒(5.14)将其混合均匀。如果乳粉仍未完全溶解,将烧杯(5.10)置于50℃的水浴(5.7)中放置30 min,待溶解后冷却至20 ℃,移入100 mL容量瓶(5.9)中,用少量的水分次洗涤烧杯,洗涤液一并移入容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀后分别移至两个50 mL离心管(5.7)中,经重量平衡在4000 g 离心力下离心15 min,用移液管(5.12)移取50 ml上清液,

6.1.4 奶酪

称取经切细、过10目圆孔筛(5.14)混匀的试样5.0 g,置于50 mL离心管(5.7)中,加2 mL水和30 mL甲醇,在9500 转/min下均质5 min,超声提取30 min,在4 000 g离心力下离心15 min。收集上清液,将以上收集的提取液移入250 mL分液漏斗(5.16)中,加入30 mL石油醚,振摇 2 min,待分层后,将下层移于50 mL烧杯(5.10)中,弃去石油醚层。重复用石油醚提取 2 次。将下层溶液移到100 mL圆底烧瓶(5.17)中,减压浓缩至约2 mL,浓缩液倒入离心管中,烧瓶用20%的乙腈水溶液(4.3.1) 5 mL分2次洗涤,洗涤液一并倒入50 mL离心管中,加水稀释至约50 mL,在4 000 g离心力下离心 5 min,上清液供净化用。

6.1.5 黄油

称取5.0 g 试样,置于50 mL烧杯(5.10)中,用20 mL石油醚(4.2.3)将黄油溶解并移于具塞锥形瓶(5.18)中。加20 mL水和30 mL甲醇,振荡30 min后,将全部液体移于分液漏斗中。以下操作按(6.1.4)进行。

6.2 净化

6.2.1 免疫亲和柱的准备

将一次性的50 mL注射器筒(5.20)与亲和柱(5.19)的顶部相连,再将亲和柱与真空系统(5.21)连接起来。

6.1.2 试样的纯化

将以上6.1试液提取液移至50 mL注射器筒(5.20)中,调节真空系统(5.21),控制试样以 $2\text{--}3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 稳定的流速过柱。取下50 mL的注射器筒,装上10 mL注射器筒。注射器筒内加入水,以稳定的流速洗柱,然后,抽干亲和柱。脱开真空系统,在亲和柱下部放入10 mL刻度试管,上部装上另一个10 mL注射器筒,加入4 mL乙腈(4.2.2),洗脱M1,洗脱液收集在刻度试管中(5.11)中,洗脱时间不少于60秒。然后用氮气缓缓地(4.2.5)在 30°C 下将洗脱液蒸发至体积 V_e 为 $50\ \mu\text{L}\text{--}500\ \mu\text{L}$ (警告:如果蒸发至干,会损失 M_1)。用10%的乙腈水溶液将 V_e 稀释10倍至最终体积为 V_f (即 $500\ \mu\text{L}\text{--}5\ 000\ \mu\text{L}$)。

6.2 液相色谱参考条件

流动相: A相, 0.1% 甲酸溶液(4.3.3); B相, 1:1乙腈/甲醇(体积比)。

梯度洗脱: 参见附录A中的A.3。

流动相流动速度: $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

色谱柱柱温: 40°C 。

试液温度: 20°C 。

进样体积(V_i): $10\ \mu\text{L}$ 。

6.3 质谱参考条件

检测方式: 多离子反应监测(MRM), 详见表1, 母离子、子离子扫描图参见附录A.1

表1 离子选择参数表

黄曲霉毒素	母离子	定量子离子	碰撞能量方式	定性子离子	碰撞能量	离子化
M1	329.0	273.5	22	259.5	22	ESI+

离子源控制条件: 参见附录A.4。

6.4 定性

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 $\pm 2.5\%$ 之内。

待测化合物的定性离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于3($S/N \geq 3$), 定量离子的重构离子色谱峰的信噪比应大于等于10($S/N \geq 10$)。

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2规定的范围。

表2 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

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

各检测目标化合物以保留时间和两对离子的（特征离子对/定量离子对）所对应的 LC-MS/MS 色谱峰面积相对丰度进行定性。要求被测试样中目标化合物的保留时间与标准溶液中目标化合物的保留时间一致（一致的条件是偏差小于 20%），同时要求被测试样中目标化合物的两对离子对应 LC-MS/MS 色谱峰面积比与标准溶液中目标化合物的面积比一致。

6.5 试样测定

按照 6.2 和 6.3 确立的条件，测定试液（6.1）和标准系列溶液（4.14）中 M_1 的离子强度，外标法定量试样中的 M_1 。色谱图见附录 A.2。

色谱参考保留时间： M_1 3.23 min。

6.6 空白试验

不称取试样，按 6.4 的步骤做空白实验。应确认不含有干扰待测组分的物质。

7 结果计算和表示

7.1 标准曲线绘制

将标准系列溶液（4.14）由低到高浓度进样检测，以峰面积-浓度作图，得到标准曲线回归方程。

7.2 定量测定

待测液中的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应重新按 6.1 进行处理后再进样分析。

7.3 计算

7.3.1 外标法定量，按式（1）计算黄曲霉毒素 M_1 的残留量。

$$X = A \times (V_f/V_i) \times (1/M) \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中黄曲霉毒素 M_1 的含量，单位为微克每千克， $\mu\text{g Kg}^{-1}$ ；

A ——试样黄曲霉毒素 M_1 的色谱峰峰面积对应的黄曲霉毒素 M_1 的质量，单位纳克，ng；

V_i ——进样体积，单位微升， μL ；

V_f ——样品洗脱液的最终定容体积，单位微升， μL ；

M ——试样的称样量，单位克，g；

计算结果保留三位有效数字

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 10 %。

第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

9 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

9.1

黄曲霉毒素 M_1 含量 aflatoxin M_1 , content

通过本标准所测定出的本物质的质量含量。

注：黄曲霉毒素 M_1 的含量以微克/升($\mu\text{g/L}$)或微克/千克($\mu\text{g/kg}$)表示。

10 原理

试样通过免疫亲和柱时，黄曲霉毒素 M_1 被提取。亲和柱内含有的黄曲霉毒素 M_1 特异性单克隆抗体交联在固体支持物上，当样品通过亲和柱时，抗体选择性的与黄曲霉毒素 M_1 (抗原)键合，形成抗体—抗原复合物。用水洗柱除去柱内杂质，然后用洗脱剂洗脱吸附在柱上的黄曲霉毒素 M_1 ，收集洗脱液。用带有荧光检测器的高效液相色谱仪测定洗脱液中黄曲霉毒素 M_1 含量。

11 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水、去离子水或其他相当纯度的水。

11.1 免疫亲和柱：应该含有黄曲霉毒素 M_1 的抗体。亲和柱的最大容量不小于 100 ng黄曲霉毒素 M_1 (相当于 50 mL浓度为 2 $\mu\text{g/L}$ 的试样)，当标准溶液含有 4 ng黄曲霉毒素 M_1 (相当于 50 mL浓度为 80 ng/L的试样)时回收率不低于 80%。应该定期检查亲和柱的柱效和回收率，对于每个批次的亲和柱至少检查一次 (见 11.1.1 和 11.1.2)。

11.1.1 柱效检查

用移液管 (13.4) 移取 1.0 mL的黄曲霉毒素 M_1 储备液 (11.5.2) 到 20 mL的锥形试管中 (13.9)。用恒流的氮气 (11.3) 将液体慢慢吹干，然后用 10 mL 10%的乙腈 (11.2.2) 溶解残渣，用力摇荡。

将该溶液加入到 40 mL的水中，充分混匀，全部通过免疫亲和柱。按说明书要求使用免疫亲和柱。淋洗免疫亲和柱后，洗脱下黄曲霉毒素 M_1 。将洗脱液进行适当稀释后，用高效液相色谱仪测定免疫亲和柱键合的黄曲霉毒素 M_1 含量。

计算黄曲霉毒素 M_1 的回收率，将其结果与 11.1 中所要求的指标进行比较。

11.1.2 回收率检查

用移液管 (13.4) 移取 0.8 mL 0.005 $\mu\text{g/mL}$ 的黄曲霉毒素 M_1 标准工作液 (11.5.3) 到 10mL的水中，充分混匀，全部通过免疫亲和柱。按说明书使用免疫亲和柱。淋洗免疫亲和柱，洗脱下黄曲霉毒素 M_1 。将洗脱液进行适当稀释后，用高效液相色谱仪测定免疫亲和柱键合的黄曲霉毒素 M_1 含量。计算黄曲霉毒素 M_1 的回收率，将其结果与 11.1 中所要求的指标进行对比。

11.2 乙腈：色谱级。

11.2.1 25%乙腈-水溶液：将 250 mL 的乙腈 (11.2) 与 750 mL 的水混溶 (使用前需要脱气)。

11.2.2 10%乙腈-水溶液：将 100 mL 的乙腈 (11.2) 与 900 mL 的水混溶 (使用前需要脱气)。

11.3 氮气。

11.4 三氯甲烷：加入 0.5%-1.0%质量比(与三氯甲烷质量比)的乙醇进行稳定。

11.5 黄曲霉毒素 M_1 标准溶液

11.5.1 校准溶液

黄曲霉毒素 M_1 三氯甲烷标准溶液浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。根据下面的方法，在最大吸收波段处测定溶液的吸光度，以确定黄曲霉毒素 M_1 的实际浓度。

用分光光度计(13.11)在 340 nm-370 nm处测定，扣除三氯甲烷的空白本底，读取标准溶液的吸光度值。在接近 360 nm最大吸收波段 λ_{max} 处，测得吸光度值为A，根据式(2)计算出浓度值 c_i ($\mu\text{g}/\text{mL}$)。

$$c_i = A \times M \times 100/\epsilon \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A——在 λ_{max} 处测得的吸光度值；

M——328 g/mol，黄曲霉毒素 M_1 摩尔质量，单位为克每摩尔 (g/mol)

ϵ ——1995，溶于三氯甲烷中的黄曲霉毒素 M_1 的吸光系数，单位为平方米每摩尔 (m^2/mol)。

11.5.2 标准储备液

确定黄曲霉毒素 M_1 标准溶液的实际浓度值后(11.5.1)，继续用三氯甲烷将其稀释至浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液。储备液密封后于冰箱中 5℃以下避光保存。在此条件下，储备液可以稳定两个月，两个月后，应该对储备液的稳定性进行核查。

11.5.3 黄曲霉毒素 M_1 标准工作液

从冰箱中取出储备液(11.5.2)放置至室温，移取一定量的储备液进行稀释制备成工作液。工作液当天使用当天制备。

黄曲霉毒素 M_1 标准工作液配制：用移液管(13.4)准确移取 1.0 mL的储备液(13.4.2)到 20mL的锥形试管中(13.9)，用和缓的氮气(11.3)将溶液吹干，然后用 20.0 mL10%的乙腈(11.2.2)将残渣重新溶解，30 min内振摇，混匀，配成浓度为 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄曲霉毒素 M_1 标准工作液。在用氮气对储备液吹干的过程中，一定要仔细操作，不能让温度降低太多而出现结露。

在作标准曲线时，黄曲霉毒素 M_1 的进样量分别是 0.05 ng、0.1 ng、0.2 ng、0.4 ng。根据高效液相色谱仪进样环的容积量，用工作液配置一系列适当浓度的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液，稀释液用 10%乙腈(11.2.2)

12 仪器及材料

12.1 一次性注射器：10 mL 和 50 mL。

12.2 真空系统。

12.3 离心机：4000 g离心力(离心力 $g=1.12 \times 10^{-5} \times \text{转} / \text{分} \times \text{旋转半径}$)。

12.4 移液管：1.0 mL、2.0 mL 和 50.0 mL。

12.5 玻璃烧杯：250 mL。

12.6 容量瓶：100 mL。

12.7 水浴：温控 30℃ \pm 2℃，50℃ \pm 2℃，温度范围 35℃~37℃。

12.8 滤纸。

12.9 带刻度的磨口锥形玻璃试管：5 mL、10 mL、20 mL。

12.10 高效液相色谱仪

12.10.1 无脉冲泵：适合恒定体积流量约 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的泵。

12.10.2 进样系统：具有固定或可变容积的进样环，进样体积 $50 \mu\text{L} \sim 500 \mu\text{L}$ 。

12.10.3 反相色谱柱：填充 $3 \mu\text{m}$ 或者 $5 \mu\text{m}$ 的十八烷基硅胶，加有填充反相材料的保护柱。

12.10.4 荧光检测器：具有 365 nm 激发波长、 435 nm 发射波长，在适当的色谱条件下能够测定 0.02 ng 的黄曲霉毒素 M_1 (相当于 5 倍噪音)。

12.10.5 记录仪：带打印机或绘图仪、电子积分仪或计算机数据处理系统。

12.11 分光光度计：波长范围为 $200 \text{ nm} \sim 400 \text{ nm}$ ，带光径长度为 1 cm 的石英比色池。

12.12 天平：准确至 0.1 g ，最小分度 0.01 g 。

13 采样

采样方法不属于本标准叙述的范围，推荐的采样方法请参见 ISO707[1]

实验室收到的样品应该具有真正的代表性，在运输和储藏的过程中没有被损坏和改变。

14 分析步骤

14.1 概述

所有的操作分析均应尽可能在避光条件下进行。

使用不同厂商的亲合柱，在乳粉的制作、洗涤和洗脱的操作方面可能略有不同，应该严格按照说明书要求进行操作。通常的分析步骤包括：用水或者盐水缓冲液将乳粉冲制成乳，离心分离后在一定压力过柱（可能需要预洗），用水冲柱，并用甲醇或乙腈洗脱吸附在柱上黄曲霉毒素 M_1 。严格按照规定的流速进行操作。

14.2 制备试样

14.2.1 乳

将乳样品在水浴（12.7）中加热到 $35^\circ\text{C} \sim 37^\circ\text{C}$ 。用滤纸（12.8）过滤（根据情况，也许需要用几张滤纸进行过滤），或者在 4000 g 离心力下离心 15 min 。至少收集 50 mL 乳试样，按照 1.7.4 继续进行分析。

14.2.2 乳粉

称取 10 g 样品（精确到 0.1 g ），置于 250 mL 的烧杯（12.5）中。将 50 mL 已预热到 50°C 的水多次少量地加入到乳粉中，用搅拌棒将其混合均匀。如果乳粉不能完全溶解，将烧杯在 50°C 的水浴（12.7）中放置至少 30 min ，仔细混匀。将溶解的乳粉冷却至 20°C 后，移入 100 mL 容量瓶（12.6）中，用少量的水分次淋洗烧杯，淋洗液一并移入容量瓶中，再用水定容至刻度。用滤纸（12.8）过滤乳，或者在 4000 g 离心力下离心 15 min 。至少收集 50 mL 的乳试样，按照 14.4 继续进行分析。

14.3 免疫亲和柱的准备

将一次性的 50 mL 注射器筒（12.1）与亲和柱（11.1）的顶部相连，再将亲和柱与真空系统（12.2）

连接起来。

14.4 样品的提取与纯化

用移液管移取 50 mL 试样 (14.2.1 或 14.2.2) 到 50 mL 注射器 (12.1) 中, 调节真空系统 (12.2), 控制试样以 2 mL/min~3 mL/min 稳定的流速过柱。

取下 50 mL 的注射器, 装上 10 mL 注射器。注射器内加入 10 mL 水, 以稳定的流速洗柱, 然后, 抽干亲和柱。

脱开真空系统, 装上另一个 10 mL 注射器, 加入 4 mL 乙腈 (11.2)。缓缓推动注射器栓塞, 通过柱塞控制流速, 洗脱黄曲霉毒素 M_1 , 洗脱液收集在锥形管 (12.9) 中, 洗脱时间不少于 60s。然后用和缓的氮气 (11.3) 在 30℃ 下将洗脱液蒸发至体积 V_e , 为 50 μ L-500 μ L (警告: 如果蒸发至干, 会损失黄曲霉毒素 M_1)。用水将 V_e 稀释 10 倍至最终体积为 V_f (即 500 μ L-5000 μ L)。

注: 如果注入高效液相色谱仪含黄曲霉毒素 M_1 的样品, 乙腈含量超过 10%, 色谱峰变宽。如果水含量超过 90%, 则对色谱峰的形状没有影响。

14.5 高效液相色谱分析仪

14.5.1 泵

以恒定流速将乙腈-水溶液 (11.2.1) 泵流通过高效液相色谱柱。如果需要 (根据所用色谱柱的型号), 调整乙腈-水的比例, 以保证使黄曲霉毒素 M_1 与其他成分的分离效果最佳。

乙腈-水溶液 (11.2.1) 的体积流速根据所用色谱柱 (12.10.3) 而定。对于普通色谱柱 (柱长约 25 cm、柱内径约 4.6 mm) 而言, 流速在 1 mL/min 左右, 效果最好; 柱内径为 3 mm 时, 流速在 0.5 mL/min 左右, 效果最好。

为了确定最佳的色谱条件, 最好先将不含黄曲霉毒素 M_1 的阴性样品提取液注入 HPLC, 然后再注入样品提取液与黄曲霉毒素 M_1 标准溶液的混合液。

14.5.2 色谱性能

标准曲线的线性度和色谱系统的稳定性需要经常检查, 多次反复地注入固定量的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液, 直至获得稳定的峰面积和峰高。相邻两次峰面积和峰高差异不得超过 5%。

黄曲霉毒素 M_1 的保留时间与温度有关, 所以对测定系统的漂移需要补偿。每隔一段时间测定固定量的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液, 这些标准溶液的测定结果可以根据漂移的情况进行校正。

14.5.3 黄曲霉毒素 M_1 的标准曲线

根据 HPLC 进样环容积, 选择适当体积数 V_i , 分别注入含有 0.05 ng、0.1 ng、0.2 ng 和 0.4 ng 的黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。绘制成峰面积或峰高对黄曲霉毒素 M_1 质量数的标准曲线。

14.5.4 样品洗脱液的色谱分析及进样方案

通过进样环将适量体积 V_i 洗脱液注入高效液相色谱仪。采用与标准溶液相同的色谱条件分离出洗脱液中的黄曲霉毒素 M_1 。标准溶液和样品洗脱液均按照规定的方案进样。当连续检测一系列样品时, 建议每隔五个样品, 加测一个黄曲霉毒素 M_1 标准溶液。

根据样品洗脱液色谱图中黄曲霉毒素 M_1 的峰高或峰面积值, 从标准曲线上得出样品洗脱液中所含有的黄曲霉毒素 M_1 质量数 (ng)。

如果样品洗脱液的黄曲霉毒素 M_1 的峰面积或峰高值高于标准溶液,用水定容稀释样品洗脱液后,重新进样分析。

15 结果计算和表示

15.1 乳

应用式(3)计算被测样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量 ω 。

$$\omega_m = m_A \times (V_f/V_i) \times (1/V) \dots\dots\dots(3)$$

式中:

ω_m ——黄曲霉毒素 M_1 的含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

m_A ——样品洗脱液黄曲霉毒素 M_1 的峰面积或峰高从标准曲线上得出的黄曲霉毒素 M_1 的质量数,单位为纳克(ng);

V_i ——样品洗脱液的体积数,单位为微升(μL);

V_f ——样品洗脱液的最终体积数,单位为微升(μL);

V ——通过免疫亲和柱被测样品的体积数,单位为毫升(mL);

计算结果表示到小数点后三位。

15.2 乳粉

应用式(4)计算被测样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量 ω_p 。

$$\omega_p = m_A \times (V_f/V_i) \times (1/m) \dots\dots\dots(4)$$

式中:

ω_p ——样品中的黄曲霉毒素 M_1 的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

m ——50mL 样液(14.4)中所含有的乳粉质量数,单位为克(g);

m_A 、 V_f 、 V_i 的含义与8.1中所定义的一样。

式(3)适用于未经稀释的试样,否则应该乘以稀释倍数。

计算结果表示到小数点后三位。

16 精密度

各实验室试验结果的精密度总结于附录B中,这些数据不适用于其他的浓度范围和材质。

17 测试报告

测试报告中应该含有:

- a) 描述样品完整特征所需要的所有信息;
- b) 采样方法,如果知道请写上;
- c) 根据该标准,所采用的试验方法;

- d) 该标准没有提出的其他操作细节，对测试结果可能产生影响的操作、现象以及采取的措施；
- e) 测试结果；
- f) 如果检查了重复性，最终的验证结果；

第三法 免疫层析净化荧光分光光度法

18 原理

试样经过离心、脱脂、过滤后，滤液经过含有黄曲霉毒素M₁特异性单克隆抗体的免疫亲和柱？层析净化，黄曲霉毒素M₁，交联在层析介质中的抗体上。此抗体对黄曲霉毒素M₁具有专一性，当样品通过亲和柱时，抗体选择性的与所有存在的黄曲霉毒素M₁（抗原）键合。用甲醇—水（10+90）将免疫亲和柱上杂质除去，以甲醇—水（80+20）通过免疫亲和柱洗脱，加入溴溶液衍生后的洗脱液于荧光光度计中测定黄曲霉毒素M₁含量。（此段文字，语句不够通顺）

19 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯试剂，水为重蒸馏水。

- 19.1 甲醇(CHOH):色谱纯。
- 19.2 氯化钠(NaCl)。
- 19.3 甲醇—水(10+90):取10 mL甲醇加入90 mL水。
- 19.4 甲醇—水(80+20):取80 mL甲醇加入20 mL水。
- 19.5 溴溶液储备液(0.01%):称取适量溴，溶于水后，配成0.01%的储备液，避光保存。
- 19.6 溴溶液工作液(0.002%):取10 mL 0.01%的溴溶液加入40 mL水混匀，于棕色瓶中保存备用。现用现配。
- 19.7 二水硫酸奎宁(C₂₀H₂₄N₂O₂·H₂S₀₄·2H₂O)。
- 19.8 硫酸溶液(0.05 mol/L):取2.8 mL浓硫酸，缓慢加入适量水中，冷却后定容至1000 mL。
- 19.9 荧光光度计校准溶液:称取0.340 g 硫酸奎宁(C₂₀H₂₄N₂O₂·H₂S₀₄·2H₂O)，用0.05 mol/L硫酸溶液溶解并定容至100 mL，此溶液荧光光度计读数相当于2.0 μg/L黄曲霉毒素M₁标准溶液。0.05 mol/L硫酸溶液荧光光度计读数相当于0.0 μg/L黄曲霉毒素M₁。

20 仪器和设备

- 20.1 荧光光度计
- 20.2 离心机:离心力不低于 4000 r/min
- 20.3 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm，孔径1.5 μm。
- 20.4黄曲霉毒素M₁免疫亲和柱。
- 20.5 空气压力泵。
- 20.6 玻璃试管:直径12 mm, 长75 mm，无荧光特性。
- 20.7 玻璃注射器。

21 分析步骤

21.1 样品提取

21.1.1 乳

取 50 mL 乳样品，加入 1.0 g 氯化钠，4000 r/min 离心力下离心 10 min，小心移取用于分析的乳底层脱脂部分，不要扰动顶部脂肪层，将脱脂的乳以玻璃纤维滤纸过滤，滤液备用。

21.1.2 乳粉

称取 5.0 g 乳粉，用 30℃ -60℃ 水将其慢慢溶解，定容为 50 mL，加入 1.0 g 氯化钠，以下按 21.1.1 的步骤操作。

21.2 净化

将免疫亲和柱连接于 10 mL 玻璃注射器下。准确移取 10.0 mL 上述滤液注入玻璃注射器中，将空气压力泵与注射器连接，调节压力使溶液以约 6 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱，直至 2 mL~3 mL 空气通过柱体。以 10 mL 甲醇-水 (10+90) 清洗柱子两次，弃去全部流出液，并使 2 mL~3 mL 空气通过柱体。准确加入 1.0 mL (V_1) 甲醇-水 (80+20) 洗脱液洗脱，流速为 1 mL/min ~ 2 mL/min，收集全部甲醇-水洗脱液于玻璃试管中，备用。

21.3 测定

21.3.1 荧光光度计校准

在激发波长 360 nm，发射波长 3.250 nm 条件下，以 0.05 mol/L 的硫酸溶液为空白，调节荧光光度计的读数值为 0.0 $\mu\text{g/L}$ ；以荧光光度计校准溶液调节荧光光度计的读数值 2.0 $\mu\text{g/L}$ 。

21.3.2 样液测定

取上述洗脱液加入 1.0 mL (V) 0.002% 溴溶液，1 min 后立即于荧光光度计测定样液中黄曲霉毒素 M1 含量 c 。

21.3.3 空白试验

用水代替试样，按 21.1~21.3 步骤做空白试验。

22 结果计算和表示

22.1 乳

乳检测结果按式 (5) 计算：

$$X_I = (c_I - C_0) \times V_I \times 10 / V \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：

X_I ——试样中黄曲霉毒素 M_1 含量，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

c_I ——荧光光度计中读取的样液中黄曲霉毒素 M: 的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

c_0 ——荧光光度计中读取的空白试验中黄曲霉毒素 M: 的浓度，单位为微克每升 ($\mu\text{g/L}$)；

V_I ——最终净化甲醇-水洗脱液体积，单位为毫升 (mL)；

V ——通过亲和柱试样体积，单位为毫升 (mL)；

I_0 ——仪器的读数系数。

计算结果表示到小数点后一位。

22.2 乳粉

乳粉检测结果按式(6)计算:

$$X_2=(c_2-c_0)\times V_1\times I_0/m\times V \quad \dots\dots\dots (6)$$

式中:

X_2 ——试样中黄曲霉毒素 M_1 含量, 单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

C_2 —— 荧光光度计中读取的样液中黄曲霉毒素 M_1 的浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$);

C_0 —— 荧光光度计中读取的空白试验中黄曲霉毒素 M_1 的浓度, 单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$);

V_1 —— 最终净化甲醇—水洗脱液体积, 单位为毫升(mL);

V —— 通过亲合柱试样体积, 单位为毫升(mL) ;

m ——50 mL试样中所含乳粉的质量数, 单位为克每毫升(g/mL) ;

I_0 ——仪器的读数系数。

计算结果表示到小数点后一位。

第四法 薄层层析法

23 原理

试样经提取、浓缩、薄层分离后, 黄曲霉毒素 M_1 在紫外光(波长 365 nm)下产生蓝紫色荧光, 根据其在薄层上显示荧光的最低检出量来测定含量。

24 试剂和材料

24.1 三氯甲烷。

24.2 正己烷或石油醚(沸程 30~60°C 或 60~90°C)。

24.3 甲醇。

24.4 苯。

24.5 乙腈。

24.6 无水乙醚或乙醚经无水硫酸钠脱水。

24.7 丙酮。

24.8 异丙醇。

以上试剂在试验时先进行一次试剂空白试验, 如不干扰测定即可使用, 否则需逐一进行重蒸。

24.9 硅胶G: 层析用。

24.10 氯化钠及氯化钠溶液(40 g/L)。

24.11 硫酸(1+3)。

24.12 玻璃砂：用酸处理后洗净干燥，约相当 20 目。

24.13 黄曲霉毒素M₁标准溶液：用三氯甲烷配制成每毫升相当于 10 μg 的黄曲霉毒素M₁标准溶液。以三氯甲烷作空白试剂，黄曲霉毒素M₁的紫外最大吸收峰的波长应接近 357 nm，摩尔消光系数为 19950。避光，置于 4℃冰箱中保存。

24.14 黄曲霉毒素M₁标准使用液：用三氯甲烷配制成每毫升相当于各含 0.04 μg 黄曲霉毒素M₁。避光，置于 4℃冰箱中保存。

25 仪器和设备

25.1 小型粉碎机。

25.2 样筛。

25.3 电动振荡器。

25.4 全玻璃浓缩器。

25.5 玻璃板。5 cm×20 cm。

25.6 薄层板涂布器。

25.7 展开槽：内长 25 cm，宽 6 cm，高 4 cm。

25.8 紫外灯：100 W—125 W，带有波长 365 nm 滤光片。

25.9 微量注射器或血色素吸管。

26 分析步骤

整个操作需在暗室条件下进行。

26.1 试样提取

26.1.1 试样提取制备表。见表 1

26.1.2 按式(7)计算提取液量。

$$X = 8/15 \times (90 + A + B) \dots\dots\dots (7)$$

式中：

X——提取液量，mL；

A——试样中的水分量，mL（牛乳、炼乳取样量为 30 g，牛乳粉、乳酪的取样量为 15 g）；

B——加水量，mL。

注：试样中的水分量参照中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编著的《食物成分表》。

表1 试样制备

试样名称	称样量 g	加水量 mL	加甲醇量 mL	提取液量 mL	加 40g/L 氯化钠溶液量 mL	浓缩体积 mL	滴加体积 μL	方法灵敏度 $\mu\text{g}/\text{kg}$
牛乳	30	0	90	62	25	0.4	100	0.1
炼乳	30	0	90	52	35	0.4	50	0.2
牛乳粉	15	20	90	59	28	0.4	40	0.5
乳酪	15	5	90	56	31	0.4	40	0.5
黄油	10	45	55	80	0	0.4	40	0.5

因各提取液中含 48mL 甲醇, 需 39 mL 水才能调到甲醇与水之体积比为 (55+45), 因此加入氯化钠溶液 (40g/L) 量等于 (87 mL) 减去提取液量 (mL)。

26.1.3 牛乳与炼乳: 称取 30.00 g 混匀的试样, 置于小烧杯中, 再分别用 90 mL 甲醇移于 300 mL 具塞锥形瓶中, 盖严防漏。振荡 30 min, 用折叠式快速滤纸滤于 100 mL 具塞量筒中。按上表收集 62 mL 牛乳与 52 mL 炼乳 (各相当于 16 g 试样) 提取液。

26.1.4 牛乳粉: 取 15.00 g 试样, 置于具塞锥形瓶中, 加入 20 mL 水, 使试样湿润后再加入 90 mL 甲醇, 以下按 6.1.2 自“振荡 30 min”起, 依法操作。按表 1 收集 59 mL 提取液 (相当于 8 g 试样)。

26.1.5 乳酪: 称取 15.00 g 切细、过 10 目圆孔筛混匀试样, 置于具塞锥形瓶中, 加 5 mL 水和 90 mL 甲醇, 以下按 6.1.2 自“振荡 30 min”起依法操作, 按上表收集 56 mL 提取液 (相当于 8 g 试样)。

26.1.6 黄油: 称取 10.00 g 试样, 置于小烧杯中, 用 40 mL 石油醚将黄油溶解并移于具塞锥形瓶中。加 45 mL 水和 55 mL 甲醇, 振荡 30 min 后, 将全部液体移于分液漏斗中。再加入 1.5 g 氯化钠摇动溶解, 待分层后, 按上表收集 80 mL 提取液 (相当于 8 g 试样) 于具塞量筒中。

26.2 净化

26.2.1.1 用石油醚分配净化: 将以上收集的提取液移入 250 mL 分液漏斗中, 再按各种食品加入一定体积的氯化钠溶液 (40 g/L) (见制备表)。再加入 40 mL 石油醚, 振摇 2 min, 待分层后, 将下层甲醇-氯化钠水层移于原量筒中, 将上层石油醚溶液从分液漏斗上口倒出, 弃去。再将量筒中溶液转移于原分液漏斗中。再重复用石油醚提取 2 次, 每次 40 mL, 最后将量筒中溶液仍移于分液漏斗中。黄油样液总共用石油醚提取 2 次, 每次 40 mL。

26.2.2 用三氯甲烷分配提取: 于原量筒中加入 20 mL 三氯甲烷, 摇匀后, 再倒入原分液漏斗中, 振摇 2 min。待分层后, 将下层三氯甲烷移于原量筒中, 再重复用三氯甲烷提取两次, 每次 10 mL 合并于原量筒中。弃去上层甲醇水溶液。

26.2.3 用水洗三氯甲烷层与浓缩制备: 将合并后的三氯甲烷层倒回原分液漏斗中, 加入 30 mL 氯化钠溶液 (40g/L), 振摇 30 s, 静置。待上层混浊液有部分澄清时, 即可将下层三氯甲烷层收集于原量筒中。加入 10 g 无水硫酸钠, 振摇放置澄清后, 将此液经装有少许无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于 100 mL 蒸发

皿中。氯化钠水层用 10 mL 三氯甲烷提取一次，并经过滤器一并滤于蒸发皿中。最后将无水硫酸钠也一起倒于滤纸上，用少量三氯甲烷洗量筒与无水硫酸钠，也一并滤于蒸发皿中。于 65℃ 水浴上通风挥干。用三氯甲烷将蒸发皿中残留物转移于浓缩管中。蒸发皿中残渣太多，则经滤纸滤入浓缩管中。于 65℃ 用减压吹气法将此液浓缩至 0.4 mL 以下，再用少量三氯甲烷洗管壁后，浓缩定量至 0.4 mL 备用。

26.3 测定

6.3.1 硅胶 G 薄层板的制备：薄层板厚度为 0.3 mm，105℃ 活化 2 h，在干燥器内可保存 1～2 天。

26.3.2 点板：取 5 cm×20 cm 的薄层板两块，距板下端 3 cm 的基线上各滴加两点，在距第一与第二板的左边缘 0.8～1 cm 处各滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M₁ 标准使用液，在距各板左边缘 2.8～3 cm 处各滴加同一液点（各种食品的滴加体积见 6.1.1 表），在第二板的第 2 点上再滴加 10 μL 黄曲霉毒素 M₁ 混合标准使用液。一般可将薄层板放在盛有干燥硅胶的层析槽内进行滴加，边加边用冷风机冷风吹干。

26.3.3 展开

26.3.3.1 横展：在槽内加入 15 mL 事先用无水硫酸钠脱水的无水乙醚（500 mL 无水乙醚中加 20 g 无水硫酸钠）。将薄层板靠近标准点的长边置于槽内，展至板端后，取出挥干，再同上继续展开一次。

26.3.3.2 纵展：将横展两次挥干后的薄层板再用异丙醇—丙酮—苯—正己烷—石油醚（沸程 60～90℃）—三氯甲烷（5+10+10+10+10+10）混合展开剂纵展至前沿距原点距离为 10～12 cm 取出挥干。

26.3.3.3 横展：将纵展挥干后的板再用乙醚横展 1～2 次，展开方法同 6.3.3.1。

26.3.4 观察与评定结果

26.3.4.1 在紫外光灯下将第一、二板相互比较观察，若第二板的第 2 点在黄曲霉毒素 M₁ 标准点的相应处出现最低检出量（M₁ 与 B₁ 的比移值依次为 0.25 和 0.43），而在第一板相同位置上未出现荧光点，则试样中黄曲霉毒素 M₁ 含量在其所定的方法灵敏度以下（见 6.1.1 表）。

26.3.4.2 如果第一板的相同位置上出现黄曲霉毒素 M₁ 的荧光点，则第二板第 2 点的样液点是否各与滴加的标准点重叠，如果重叠，再进行以下的定量与确证试验。

26.3.5 稀释定量：样液中的黄曲霉毒素 M₁ 荧光点的荧光强度与黄曲霉毒素 M₁ 的最低检出量（0.0004 μg）的荧光强度一致，则牛乳、炼乳、牛乳粉、乳酪与黄油试样中黄曲霉毒素 M₁ 的含量依次为 0.1、0.2、0.5、0.5 及 0.5 μg / kg。如样液中黄曲霉毒素 M₁ 的荧光强度比最低检出量强，则根据其强度逐一进行测定，估计减少滴加微升数或经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点的荧光强度一致为止。

26.3.6 确证试验：在做完定性或定量的薄层板上，将要确证的黄曲霉毒素 M₁ 的点用大头针圈出。喷以硫酸溶液（1+3），放置 5 min 后，在紫外光灯下观察，若样液中黄曲霉毒素 M₁ 点同标准点一样均变为黄色荧光，则进一步确证检出的荧光点是黄曲霉毒素 M₁。

27 结果计算和表示

$$X = 0.0004 \times V_1 / V_2 \times D \times 1000 / m \quad \dots\dots\dots (8)$$

式中：

X ——黄曲霉毒素 M_1 含量, $\mu\text{g} / \text{kg}$;

V_1 ——样液浓缩后体积, mL;

V_2 ——出现最低荧光样液的滴加体积, mL;

D ——浓缩样液的总稀释倍数;

m ——浓缩样液中所相当的试样质量, g;

0.0004——黄曲霉毒素 M_1 的最低检出量, μg 。

结果表示到测定值的整数位。

第五法 双向酶联免疫法

28 原理

利用酶联免疫竞争原理, 样品中残留的黄曲霉毒素 M_1 与定量特异性酶标抗体反应, 多余的游离酶标抗体则与酶标板内的包被抗原结合, 通过流动洗涤, 加入酶显色底物显色后, 与标准点比较定性。

29 试剂和材料

本方法水为 GB/T 6682 规定的二级水。

29.1 黄曲霉毒素 M_1 双向酶联免疫试剂盒, 2 °C~7 °C 保存。

29.1.1 黄曲霉毒素 M_1 系列标准溶液。

29.1.2 酶联免疫试剂颗粒 (含特异性酶标抗体)。

29.1.2.1 抗黄曲霉毒素 M_1 抗体。

警告—不应破损, 否则立即销毁。

29.1.2.2 酶酶结合物

29.1.3 酶显色底物

30 仪器和设备

30.1 样品试管, 带有密封盖, 内置酶联免疫试剂颗粒 (29.1.2)。

30.2 移液器 (管), 450 μL \pm 50 μL 。

30.3 酶联免疫检测加热器。

30.4 酶联免疫检测读数仪。

31 分析步骤

31.1 加热器 (30.3) 预热到 45 °C \pm 5 °C, 并至少保持 15 min。

31.2 液体试样或乳粉试样复原后振摇混匀, 移取 450 μL 至样品试管 (30.1) 中, 充分振摇, 使其中的酶联免疫试剂颗粒 (29.1.2) 完全溶解。

31.3 将样品试管 (30.1) 和酶联免疫检测试剂盒 (29.1) 同时置于预热过的加热器内保温, 保温时间 5 min~6 min。

31.4 将样品试管内的全部内容物倒入试剂盒 (29.1) 的样品池中, 样品将流经“结果显示窗口”向绿色的激活环流去。

31.5 当激活环的绿色开始消失变为白色时，立即用力按下激活环按键至底部。

31.6 试剂盒（29.1）继续放置在加热器（30.3）中保温保持 4 min，使呈色反应完成。

31.7 将试剂盒（29.1）取出，水平插入读数仪（30.4），按照触摸式屏幕的提示操作，立即执行检测结果判定程序。判定程序应在 10 min 内完成。

32 结果计算和表示

32.1 目测判读结果

试样点的颜色深于质控点，或两者颜色相当，检测结果为阴性。

试样点的颜色浅于质控点，检测结果为阳性。

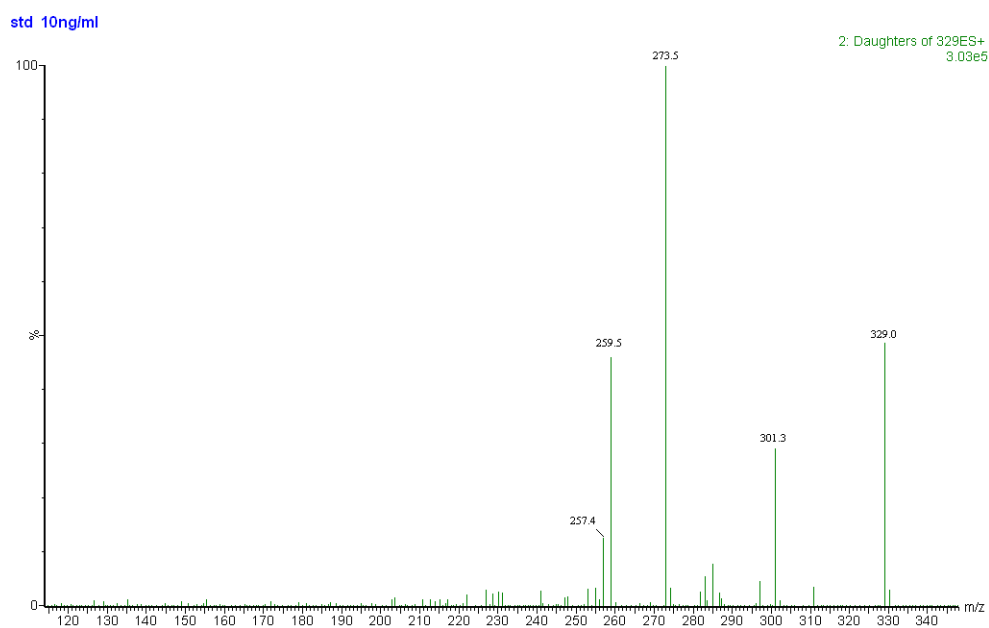
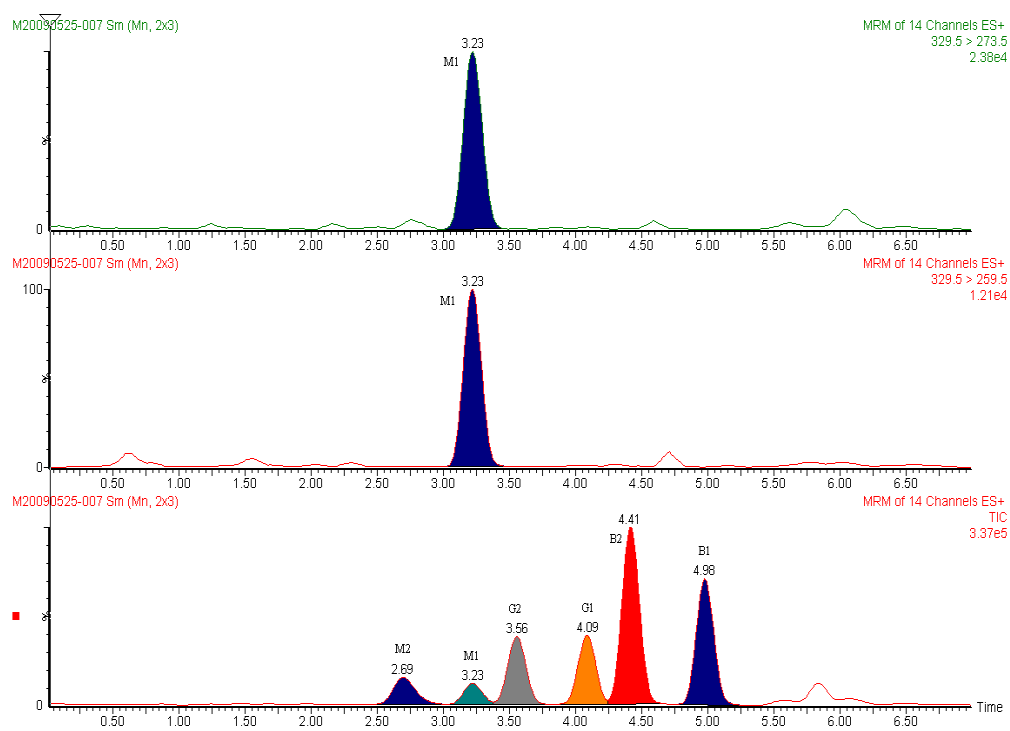
32.2 酶联免疫检测读数仪判读结果

数值 <1.05 ，显示Negative，检测结果为阴性。

数值 >1.05 ，显示Positive，检测结果为阳性¹⁾。

注：阳性样品需用第一法定量检测方法进一步确认。

(资料性附录)

A.1 M₁离子扫描图图 A.2 M₁ 色谱质谱图

A.3 液相色谱梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A%	流动相 B%	梯度变化曲线
0	68.0	32.0	-
4.20	55.0	45.0	6
5.00	0.0	100.0	6
5.70	0.0	100.0	1
6.00	68.0	32.0	6

注:1为即时变化,6为线性变化

A.4 离子源控制条件

电离方式	电喷雾电离, 负离子
毛细管电压 (kV)	3.5
锥孔电压 (V)	45
射频透镜1电压 (V)	12.5
射频透镜2电压 (V)	12.5
离子源温度 (°C)	120
锥孔反吹气流量 (L/h)	50
脱溶剂气温度 (°C)	350
脱溶剂气流量 (L/h)	500
电子倍增电压 (V)	650

附录 B

(资料性附录)

多个不同实验室的试验结果

世界各地 16 个实验室参加了低脂肪(1%)和高脂肪(28%)乳粉样品的协同试验。高脂肪样品是用于制作参比物质的残留物[4]，所以黄曲霉毒素M₁的含量是已知的。

对于乳粉，其污染水平为 0.08 μg / kg~0.6 μg / kg，即对于乳而言，污染水平为 8ng / L~60ng / L。

试验结果根据 ISO 5725-1 和 ISO 5725-2[2; 3]规定的统计方法获得，其精密度的数据列于表 B. 1

(注：试验数据来自于参考文献[1]和[2])。

表 B. 1 精密度数据

样品编号	1	2	3	4	5
实验室个数 ^a	12	4	13	11	14
平均值/(ng / kg)	81	150	80	202	580
重复性值 r/(ng / kg)	23	60.1	15	27	203
再现性值 R/(ng / kg)	52	98	41	61	310
重复性变异系数/(%)	9.9	14.0	6.8	4.7	12.5
复验性变异系数/(%)	23	22.7	18.3	10.8	19.1
^a 减少的实验室数是根据Cochran和Grubbs统计方法应该从样本中剔除的数据					