

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速检测发酵黑茶中黄曲霉毒素 B₁

姚婷*, 王丹, 李双, 刘玉娟, 孙秉康, 汪勇

(黄山学院 分析测试中心, 安徽 黄山 245041)

摘要: 以直接提取稀释结合黄曲霉毒素免疫亲和柱净化的方法, 利用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS), 建立了发酵黑茶中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的快速分析方法。样品采用甲醇-水溶液(7:3, 体积比)提取, 以 HSS T3 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm)进行色谱分离, 通过正离子扫描, Full ms-dd-MS/MS 模式进行分析。结果表明: 33 种发酵黑茶中的 AFB₁ 在一定范围内具有良好的线性关系, 相关系数(r^2)大于 0.999, 4 种样品的加标回收率($n=4$)为 86.4%~98.0%, 相对标准偏差(RSD)为 0.3%~1.7%, 检出限(LOD, $S/N \geq 3$)和定量下限(LOQ, $S/N \geq 10$)分别为 0.06 μg/kg 和 0.19 μg/kg。结果显示 33 种样品中的 AFB₁ 含量均在合理范围内。该方法准确、快速、简单, 适用于发酵黑茶中 AFB₁ 的检测。

关键词: 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱; 发酵黑茶; 黄曲霉毒素 B₁; 快速检测

中图分类号: O657.7; R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2017)11-1346-06

Rapid Detection of Aflatoxin B₁ in Fermented Dark Tea by Ultra Performance Liquid Chromatography-Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry

YAO Ting*, WANG Dan, LI Shuang, LIU Yu-juan, SUN Bing-kang, WANG Yong

(Analysis and Testing Center, Huangshan University, Huangshan 245041, China)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometric(UPLC-Q-TOF-MS) method with purification of aflatoxin immunoaffinity column was established for the determination of aflatoxin B₁(AFB₁) in fermented dark tea. The sample was extracted with methanol-water(7:3, by volume), and separated with an HSS T3 column(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), then scanned in positive ion scanning mode and analyzed in Full ms-dd-MS/MS mode. The results showed that there existed good linearities for aflatoxin B₁ in 33 kinds of fermented dark tea in corresponding concentration range, with their correlation coefficients all greater than 0.999. The recoveries were in the range of 86.4% - 98.0% with the relative standard deviations(RSDs) of 0.3% - 1.7%. The limits of detection(LODs, $S/N \geq 3$) and the limits of quantification(LOQs, $S/N \geq 10$) were 0.06 μg/kg and 0.19 μg/kg, respectively. This method was used to detect AFB₁ in 33 tea samples collected from the local markets, and negative results were obtained. The results showed that the contents of AFB₁ were within a reasonable range. This method was accurate, rapid and simple, and was suitable for the daily detection of AFB₁.

Key words: ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry; fermented dark tea; aflatoxin B₁; rapid detection

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF)是一组由黄曲霉、寄生曲霉等真菌次生代谢所产生的具有毒性的化合物。目前已发现的黄曲霉毒素有 20 余种, 常见的主要有黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 等, 其中以黄曲霉毒素 B₁(AFB₁, C₁₇H₁₂O₆) 毒性最强。AFB₁ 对人体健康危害最大且在食品中分布最为广泛^[1-3], 主要存在于土壤、动植物和各种坚果中, 花生和核桃中尤甚; 大豆、稻谷、玉米、通心粉、调味品、

收稿日期: 2017-07-11; 修回日期: 2017-07-25

基金项目: 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2017A400, KJ2013B270); 院科研启动项目(2016xkj006); 安徽省百万优秀青年人才支持计划重点项目(gxypzd2016305)

* 通讯作者: 姚婷, 讲师, 研究方向: 化合物的分离分析鉴定与应用, Tel: 0559-2546502, E-mail: yting@hus.edu.cn

牛奶、奶制品、食用油等制品中也经常发现 AFB₁。特别在热带和亚热带地区, 食品中黄曲霉毒素的检出率较高。由于 AFB₁ 对动物和人类具有极强的致突变、免疫抑制性、肝毒性和致癌性, 1993 年 AF 被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 I 类致癌物^[4-6]。因此, 世界各国对食品中 AFB₁ 限量作出了严格的规定, 欧盟 98/53/EC 指令中规定人类生活消费品中 AFB₁ 的限量为 2 μg/kg, 我国在 GB 2761-2011 中规定各类食品中 AFB₁ 的限量为 0.5~20 μg/kg^[7]。但茶叶中的 AFB₁ 未被列入日常检测项目, 目前世界各国尚未对茶叶中 AFB₁ 的限量作出标准。

茶和茶文化起源于中国, 黑茶是中国六大茶系之一, 是利用菌发酵(双歧杆菌、葡萄糖酸杆菌等)的方式制成的一种后发酵茶, 其制作原料一般较粗老。发酵中会产生一种俗名为“金花”的冠突散囊菌的有益菌, 加之制造过程中往往堆积发酵时间较长, 因而叶色油黑或黑褐, 故称黑茶。黑茶的制作工艺一般包括杀青、揉捻、渥堆和干燥 4 道工序^[8], 因产区和工艺上的差别, 又分为湖南黑茶、湖北老青茶、藏茶和滇桂黑茶。黑茶在发酵和仓储中存在高温、高湿等特殊特性, 所以制茶过程中的真菌毒素污染以及微生物的超标等问题备受关注。

目前黄曲霉毒素的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[9-10]、胶体金法^[11]、荧光检测法^[12-14]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[15-22]、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)^[23-24]等。HPLC-MS/MS 的优势在于灵敏度高、准确可靠且高效快速, 但检测中需使用荧光检测器, 样品前处理过程繁琐, 同时还需在柱前或柱后进行衍生, 操作过于复杂; 胶体金法属于快速检测方法, 虽然该方法简单、快速, 对实验人员与实验条件要求不高, 但重现性和准确性相对较差。基于此, 本文借助超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(UPLC-Q-TOF-MS)^[25-26]测定黑茶中 AFB₁ 的含量, 并进行方法学验证。UPLC-Q-TOF-MS 是分离科学中的一个全新类别, 它借助于 HPLC 的理论及原理, 涵盖了小颗粒填料、非常低系统体积及快速检测手段等全新技术, 增加了分析的通量、灵敏度及色谱峰容量。与传统的检测方法相比, 本方法样品前处理过程简单, 大大缩短了样品前处理时间, 减少了有机溶剂用量, 且目标分析物无需衍生即可直接测定, 能够显著提高结果准确性, 具有准确、高效、灵敏等优点, 为茶叶中 AFB₁ 的检测提供了新的技术选择。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂及材料

超高效液相色谱仪串联四极杆飞行时间质谱仪(UPLC H-CLASS + QTOF G2-XS 型, 美国 Waters 公司); 黄曲霉毒素免疫亲和柱(Pribolab 公司, 置于 -20 ℃ 下保存); 超声波清洗器(KH-500B 型, 昆山禾创超声仪器有限公司); 粉碎机(04A 型, 云南捷豹机械设备有限公司); 台式高速离心机(TG16-WS 型, 上海卢湘仪离心仪器有限公司); Milli-Q 全自动超纯水制水机(美国 Millipore 公司); 0.22、0.45 μm 有机相微孔滤膜(德国 Membrana 公司); 电子分析天平(感量 0.000 1 g, 上海实干实业有限公司); 恒温磁力搅拌器(85-2 型, 巩义市予华仪器有限责任公司); 氮吹仪(CM-24 型, 上海那艾精密仪器有限公司)。

甲醇(色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司, 纯度 ≥ 99.90%); AFB₁ 标准溶液(Pribolab 公司, 质量浓度为 1 μg/mL, 置于 -20 ℃ 下保存, 纯度 ≥ 98.00%); 氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 甲醇(A454-4 型质谱纯, 美国 Fisher Chemical 公司, 纯度 ≥ 99.99%); 实验用水为超纯水(18.2 MΩ·cm); 除 Q-TOF-MS 用醇为质谱纯, 其余所用醇均为色谱纯。

实验中所用茶叶共 33 个品种, 其中天尖茶 2016、茯砖茶 2016、千两茶 2016、茯砖茶 2013、天尖茶 2011、天尖茶 2015 购自湖南省安化某超市; 百两茶 2012、27、46、63、康砖 2012、茯砖 2012、金尖 2012、春尖 2012、雅细 2008、金尖 2015(1)、金尖 2015(2)购自四川省雅安市某超市; C-Q-0、41、51、61、青砖茶 2010、传承 2015、传承 2012、传承 2009、永巨川 2015、铁盒巧克力、3、14-2、大昌川 2014、洞庄茶号、壹号特制 2014、小金沱购自湖北省咸宁市某超市。

1.2 实验条件

1.2.1 超高效液相色谱条件 色谱柱: HSS T3 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm); 柱温: 25 ℃; 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 1 μL; 流动相: A 为水, B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, 5% B; 0.5~5

min, 5%~65% B; 5~7 min, 65% B; 7~7.5 min, 65%~5% B; 7.5~10 min, 5% B。

1.2.2 质谱条件 电喷雾离子源(ESI): 正离子模式; 离子源温度: 120 ℃; 脱溶剂气(N_2)温度: 500 ℃, 毛细管电压: 3.0 kV; 锥孔电压 40 V; 锥孔气(N_2)流量: 50 L/h, 脱溶剂气体(N_2)流量: 900 L/h; 氩气作为碰撞气, 碰撞压力: 0.05 MPa, 碰撞能量: 6 eV 和 30 eV; 母离子为 m/z 313, 子离子为 m/z 285; 保留时间: 6.16 min。

1.3 标准溶液配制

取 200 μ L 质量浓度为 1 μ g/mL 的 AFB₁ 标准溶液, 用甲醇定容至 1 mL, 配成 200 μ g/L 的标准溶液, 按照稀释原理, 将 200 μ g/L 的标准溶液作为母液, 分别配制 100、50、20 μ g/L 的黄曲霉毒素标准液, 再将 100 μ g/L 的标准溶液作为母液, 分别配制出 10、5 μ g/L 及未添加黄曲霉毒素的标准液, 现用现配。

1.4 样品处理

1.4.1 提取 先称取 5 g 经粉碎研细的茶叶样品于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 甲醇-水(7:3)和 1 g 氯化钠, 摇匀, 于磁力搅拌器中搅拌 1 h, 再用超声波清洗器超声 15 min, 取上层溶液于 1 200 r/min 离心 10 min, 定量滤纸过滤, 移取 5 mL 过滤液加 10 mL 水稀释, 于 1 200 r/min 离心 10 min, 取上清液经 0.45 μ m 有机滤膜过滤至澄清。

1.4.2 净化 将免疫亲和柱连接于 10 mL 塑料注射器下, 取 10 mL 样品提取液, 以 3 mL/min 的流速通过黄曲霉毒素免疫亲和柱, 再用 10 mL 水以 6 mL/min 的流速淋洗柱子 2 次, 弃去全部流出液, 并使 2~3 L 空气通过柱体, 加入 1 mL 甲醇洗脱, 流速为 1 mL/min, 收集全部洗脱液于尖底刻度试管中。

1.4.3 定容 将洗脱液于 50 ℃ 下 N_2 吹干, 待洗脱液充分混合后, 经 0.22 μ m 有机滤膜过滤至澄清, 供检测用。

1.5 基质效应实验

将不含 AFB₁ 的茶叶样品, 按“1.4”的前处理方法处理后得到的溶液作为基质空白溶液, 向其中加入一定浓度的 AFB₁ 标准溶液, 经 UPLC-MS 分析后, 比较其与相同浓度水平标准溶液(以甲醇溶液作为溶剂)的质谱响应情况。通过计算 AFB₁ 在基质溶液与标准溶液中峰面积的差异, 来评价各类发酵黑茶的基质效应。若两者的峰面积之比在 80%~120% 之间, 表明基质效应不明显, 反之, 基质效应明显。

2 结果与讨论

2.1 样品提取剂的优化

大量的实验研究表明, 真菌毒素的提取一般采用极性溶液, 乙腈-水是被广泛使用的一种提取溶剂。本实验分别考察了不同体积比的乙腈-水溶液和甲醇-水溶液的提取效果, 同时还比较了加入 0、1、3、5 g 氯化钠对 AFB₁ 提取的影响(图1)。结果表明, 随着甲醇浓度的提高, AFB₁ 的提取回收率也逐渐升高, 当甲醇的浓度为 70%, 添加 1 g 氯化钠时, AFB₁ 的提取回收率最高为 98.9%。因此, 本实验采用甲醇-水(7:3)作为提取剂, 且向其中加入 1 g 氯化钠作为电解质。

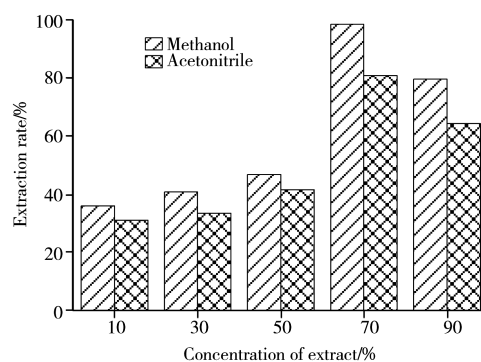


图1 不同浓度条件下 AFB₁ 的提取效果

Fig. 1 Extraction effect of AFB₁ in different elution conditions

2.2 检测条件优化

2.2.1 超高效液相色谱条件 对于液质联用的系统, 流动相的选择不仅要考虑系统的洗脱能力, 还需考虑各组分在质谱中的离子化效率, 由于黄曲霉毒素易溶于甲醇和乙腈, 本实验分别考察了甲醇-水(7:3)和乙腈-水(7:3)为流动相的分离效果。结果发现, 虽然乙腈在液相中的洗脱效果比甲醇

好,但其离子化程度明显受到抑制,离子丰度明显降低,导致灵敏度下降,说明乙腈的离子化效率低,故实验选择甲醇-水(7:3)为流动相,以获得较好的色谱峰形。

由于茶叶样品基质比较复杂,为有效分离杂质峰与目标峰,分别考察了不同的洗脱条件。结果显示,当甲醇的起始比例大于 30% 时,杂质峰与目标峰不能彻底分离,进而影响目标峰的定量积分,因此实验采用“1.2.1”所述洗脱梯度,可使保留组分较快洗脱,从而避免影响下一个样品的测定。

2.2.2 质谱条件 在“1.2”实验条件下,取 200 $\mu\text{g/L}$ 的 AFB₁ 标准溶液进样 1 μL ,以 Full ms-ddMS/MS 模式进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析,图 2 为 AFB₁ 的总离子流色谱图。由 AFB₁ 标准品的二级质谱图(图 3)可知,强度最高的离子为 m/z 313,此离子为母离子(M-H)。其信号强度最高的子离子为 m/z 285,所以本实验确定 AFB₁ 的监测离子对为 m/z 313 $\rightarrow$ 285。通过优化

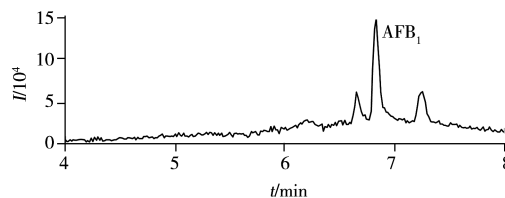


图 2 AFB₁ 标准溶液的总离子流色谱图

Fig. 2 Total ion chromatogram of AFB₁

MRM 离子对各参数,使子离子得到最大响应。当碰撞能为 6 eV,能使母离子的信号强度达到最大,当碰撞能为 30 eV 时,能使子离子的信号强度达到最大,而当毛细管电压为 1.5 kV,锥孔电压为 20 V,信号强度达到最大,因此本实验同时选择 6 eV 和 30 eV 的碰撞能,毛细管电压为 1.5 kV,锥孔电压为 20 V。

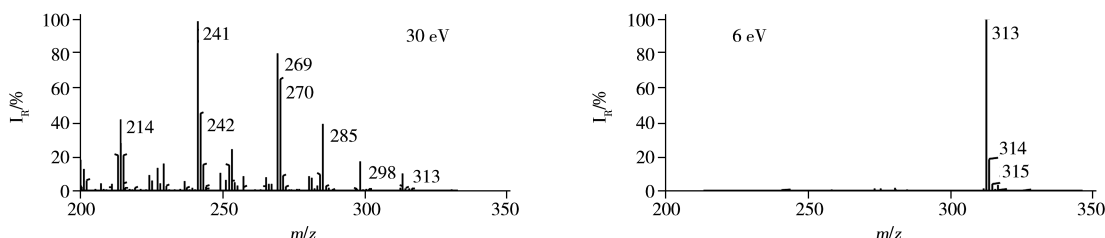


图 3 AFB₁ 标准品的质谱扫描图

Fig. 3 The mass spectra of AFB₁ standard solution

2.3 基质效应

由于本方法前处理采用直接提取稀释法,样品中会存在一定的基质效应干扰,减少基质效应对于获得准确的回收率尤为重要。本实验选取不含 AFB₁ 的 4 种茶叶作为空白基质,利用相同的前处理方法分别加入 1、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液,测定 AFB₁ 的峰面积(A)。再以甲醇为溶剂配制 1、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液,测定峰面积(B)。按照基质效应 $\text{ME}(\%) = B/A \times 100\%$,计算得 AFB₁ 的 ME 为 82.17%~107.28%,表明黄曲霉毒素受基质效应的影响不大,基质抑制不明显。

2.4 准确度与精密度

在制备好的 4 个空白基质样品中分别添加 10、20、50 μL 质量浓度为 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 的 AFB₁ 标液(添加量相当于 0.01、0.02、0.05 μg)。按照“1.4”方法进行处理,通过测定 3 个加标水平的 AFB₁ 加标样品计算回收率($n=4$),结果列于表 1。由表 1 可知,样品的加标回收率为 86.4%~98.0%,相对标准偏差(RSD)均不大于 4.7%,符合欧盟法规对于真菌毒素检测方法回收率和 RSD 的要求^[27]。

表 1 空白样品中 AFB₁ 的回收率及相对标准偏差

Table 1 Recoveries and relative standard deviations(RSD) for AFB₁ in blank samples

Sample	Amount fortified (μg)	Recovery (%)	RSD (%)	Sample	Amount fortified (μg)	Recovery (%)	RSD (%)
1	0.01	87.2	0.3	3	0.01	89.9	4.3
	0.02	96.3	1.7		0.02	95.8	3.7
	0.05	86.4	1.6		0.05	90.3	2.8
2	0.01	97.5	1.9	4	0.01	91.6	2.7
	0.02	98.0	0.6		0.02	96.9	1.8
	0.05	90.1	3.4		0.05	89.9	4.7

2.5 标准曲线、检出限及定量下限

将按“1.3”方法配制的标准溶液在优化条件下进行分析,以 AFB₁ 的质量浓度(x , $\mu\text{g/L}$)为横坐标,定量离子的峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线。结果表明, AFB₁ 在 0~200 $\mu\text{g/L}$ 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数(r^2)为 0.999 8,检出限(LOD, $S/N \geq 3$)和定量下限(LOQ, $S/N \geq 10$)分别为 0.06 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.19 $\mu\text{g/kg}$ 。 AFB₁ 的 LOQ 低于我国和欧盟规定的粮食中真菌毒素限量^[32],说明该方法具有良好的准确度和精密度,能满足日常监测需要。

2.6 实际茶叶样品中 AFB₁ 的检测

采用本文建立的方法,对市售的 33 种发酵黑茶中 AFB₁ 的含量进行检测,结果见表 2。从表 2 可知,不同品种茶叶中 AFB₁ 的含量不同,2012 年产的金尖、茯砖、春尖中 AFB₁ 含量分别为 0.71、1.00、0.80 $\mu\text{g/kg}$;因年份、仓储时间的差异,相同茶叶中 AFB₁ 含量也不同,原则上年份越久,仓储时间越长, AFB₁ 含量越高,如天尖 2011、2015 和 2016 中 AFB₁ 的含量分别为 1.28、1.22、0.72 $\mu\text{g/kg}$,传承 2009、2012 和 2015 中 AFB₁ 的含量分别为 1.05、0.75、0.64 $\mu\text{g/kg}$;相同年份不同厂家的茶叶中 AFB₁ 的含量也不同,如金尖 2015 中雅安茶厂(1)、蔡龙茶厂(2)中 AFB₁ 的含量分别为 0.62、0.71 $\mu\text{g/kg}$ 。

此次所检测的 33 种茶叶中均检出 AFB₁,其中有 6 种茶叶(如天尖 2011, 1.28 $\mu\text{g/kg}$)的 AFB₁ 含量超过 1.0 $\mu\text{g/kg}$,但所有茶叶样品均不超过欧盟在 98/53/EC 指令中规定人类生活消费品中 AFB₁ 的限量(2 $\mu\text{g/kg}$)。这批茶叶中的 AFB₁ 虽未超标,但测试结果表明,发酵黑茶在制作和储藏过程中会受到 AFB₁ 的污染,存在一定的食品安全隐患。

表 2 33 种茶叶中 AFB₁ 的含量($\mu\text{g/kg}$)
Table 2 Contents of AFB₁ in 33 kinds of tea($\mu\text{g/kg}$)

Sample	Content	Sample	Content	Sample	Content
Ironbox chocolate	0.66	Tianjian 2011	1.28	Bailiang 2012	0.93
61	0.74	Tianjian 2015	1.22	Qianliang 2016	0.86
C-Q-0	0.83	Tianjian 2016	0.72	Chuangchen 2009	1.05
41	0.74	Jinjian 2012	0.71	Chuangchen 2012	0.75
Dachangchuan 2014	1.06	Jinjian 2015(1)	0.62	Chuangchen 2015	0.64
51	0.74	Jinjian 2015(2)	0.71	Yaxi 2008	0.68
Yongjuchuan 2015	1.05	Chunjian 2012	0.80	46	0.74
14-2	0.74	Fuzhuan 2012	1.00	Special No. 1 2014	0.91
Dongzhuang Tea	0.78	Funzhuang 2013	0.64	27	0.74
3	0.74	Funzhuang 2016	0.83	Qingzhuang Tea 2010	0.75
Xiaojintuo	0.90	Kangzhuang 2012	0.93	63	0.74

3 结 论

基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术,通过优化样品提取条件、色谱以及质谱条件,建立了发酵黑茶中 AFB₁ 的快速分析方法。该方法具有快速、前处理方法简单和结果准确等优点,对于 AFB₁ 的检测具有很强的实用性,为快速筛查茶叶中 AFB₁ 含量以及推进我国茶叶中 AFB₁ 限量标准的制定提供了方法参考。

参考文献:

- [1] Li S H, Ren D D, Xie Y F, Liu J, Yang Y T. *J. Food Safety & Quality*(李少晖,任丹丹,谢云峰,刘佳,杨永坛.食品安全质量检测学报), **2015**, 6(4): 1107-1115.
- [2] Yang L, Ji J, Li G H, Li W J, Chen Z L, Wang H Y. *Trans. Tianjin Univ.*, **2014**, 20(6): 451-457.
- [3] Wu Q H. *Study on Components of Inhibiting Production of Aflatoxin in Tea and Related Characteristics*. Xianyang: North West Agriculture and Forestry University(吴清华.茶叶中抑制黄曲霉毒素产生的组分及相关特性研究.咸阳:西北农林科技大学), **2013**.
- [4] Hamidi A, Mirnejad R, Yahaghi E, Behnod V, Mirhosseini A, Amani S, Sattari S, Daian E K. *Asian Pac. J. Trop Biomed.*, **2013**, 3(9): 732-736.
- [5] Sheng Y J, Sergei E, Mi T J, Zhang S X, Shen J Z, Wang Z H. *Biomed. Environ. Sci.*, **2014**, 27(2): 126-129.

- [6] Yin Y N, Yan L Y, Jiang J H, Ma Z H. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **2008**, 9(10): 787–792.
- [7] GB 2761–2017. National Food Safety Standards Maximum Levels of Mycotoxins in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品中真菌毒素限量. 中华人民共和国国家标准).
- [8] Wang Y C, Yuan H B, Jiang Y W. *Chinese Agricultural Science Bulletin*(王银诚, 袁海波, 江用文. 中国农学通报), **2016**, 32(22): 1194–199.
- [9] Chen L, Wen J X, Lei Y, Zhang R. *J. Instrum. Anal.* (陈林, 温家欣, 雷毅, 张荣. 分析测试学报), **2015**, 34(9): 1008–1013.
- [10] SN/T 3868–2014. Determination of AFB₁, B₂, G₁, G₂ in Export Vegetable Oils by Immunoaffinity Column Cleanup HPLC. National Standards of the People's Republic of China(出口植物油中 AFB₁、B₂、G₁、G₂ 的检测——免疫亲和柱净化高效液相色谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [11] NY/T 2550–2014. Determination of AFB₁ in Feeds—Colloidal Gold Method. National Standards of the People's Republic of China(饲料中 AFB₁ 的测定 胶体金法. 中华人民共和国国家标准).
- [12] GB 5009.22–2016. Determination of Aflatoxin B and G Groups in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [13] NY/T 2549–2014. Determination of AFB₁ in Feeds—Immunoaffinity Fluorescence Method. National Standards of the People's Republic of China(饲料中 AFB₁ 的测定 免疫亲和荧光光度法. 中华人民共和国国家标准).
- [14] NY/T 2548–2014. Determination of AFB₁ in Feeds by Time Resolved Fluorescence Immunochromatography. National Standards of the People's Republic of China(饲料中 AFB₁ 的测定 时间分辨荧光免疫层析法. 中华人民共和国国家标准).
- [15] NY/T 2071–2011. Determination of Aflatoxins, Zearalenone and T–2 Toxins in Feeds by High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. National Standards of the People's Republic of China(饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T–2 毒素的测定 高效液相色谱-串联质谱法. 中华人民共和国国家标准).
- [16] Yang X L, Qiu F, Wei R W, Qin Y, Yang M H, Ouyang Z. *Chin. J. Pharm. Anal.* (杨小丽, 仇峰, 韦日伟, 覃禹, 杨美华, 欧阳臻. 药物分析杂志), **2012**, 32(4): 627–630.
- [17] Mi J B, Bi Y G, Zhao K X, Li S J, Xu H, He J, Zheng W J. *J. Instrum. Anal.* (宓捷波, 毕玉国, 赵孔祥, 李淑静, 许泓, 何佳, 郑文杰. 分析测试学报), **2015**, 34(11): 1227–1232.
- [18] Luo H T, Huang X L, Wu H Q, Zhong Q L, Zhu Z X, Huang F, Lin X S, Xie M T, Ouyang G F. *J. Instrum. Anal.* (罗辉泰, 黄晓兰, 吴慧勤, 钟巧莉, 朱志鑫, 黄芳, 林晓珊, 谢梦婷, 欧阳钢锋. 分析测试学报), **2015**, 34(9): 979–985.
- [19] Li Y, Sheng Y G, Yi X H, Shi Y Y, Zhao S Z, Bao M, Lu J L, Deng X J. *J. Instrum. Anal.* (李优, 盛永刚, 伊雄海, 时逸吟, 赵善贞, 包明, 陆吉林, 邓晓军. 分析测试学报), **2015**, 34(9): 993–998.
- [20] Xiao X F, Wang J L, Chen T, Liu T F, He J, Deng H Y, Yang J J. *J. Instrum. Anal.* (肖晓峰, 王建玲, 陈彤, 刘艇飞, 何军, 邓弘毅, 杨娟娟. 分析测试学报), **2015**, 34(9): 1021–1026.
- [21] Wang K, Wei Y J, He Y, Cao L L, Zuo S M. *Journal of Environment and Health*(王可, 魏永巨, 何叶, 曹丽玲, 左书梅. 环境与健康杂志), **2014**, 31(8): 718–720.
- [22] Zhao H J, Wang K, Yang W H, Yang C Y. *Journal of Tea Science*(赵浩军, 王坤, 杨卫花, 杨朝义. 茶业科学), **2013**, 33(3): 237–241.
- [23] Ye M L, Nie J Y, Xu G F, Yan Z, Zheng L J, Li Z X. *J. Instrum. Anal.* (叶孟亮, 聂继云, 徐国锋, 闫震, 郑丽静, 李志霞. 分析测试学报), **2015**, 34(11): 1276–1280.
- [24] Fu C H, Huang X X, Min S G. *Chin. J. Anal. Lab.* (付朝晖, 黄雪祥, 闵顺耕. 分析实验室), **2009**, 28(6): 112–115.
- [25] Xu L, Mu L H, Peng J, Liu W W, Tan X, Li Z L, Wang D X, Liu P. *J. Chromatogr. B*, **2016**, 1026(7): 36–42.
- [26] Abed S M, Zhou X Q, Ali A H, Jin Q Z, Wang X G. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2017**, 62(9): 245–253.
- [27] Commission Regulation(EU) No 519/2014 Amending(EC) No 401/2006 as Regards Methods of Sampling of Large Lots, Spices and Food Supplements, Performance Criteria for T–2, HT–2 Toxin and Citrinin and Screening Methods of Analysis.