

中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6128—2017

粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁、B₂、 G₁、G₂ 的测定 超高效液相色谱法

Inspection of grain and oils—Determination of aflatoxin B₁, B₂,
G₁, G₂ in grains—Ultra-high performance liquid chromatography

2017-10-27 发布

2017-12-20 实施

国家粮食局 发布



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAT/TC 270)归口。

本标准起草单位：国家粮食局科学研究院、湖南国家粮食质量监测中心、吉林省粮油卫生检验监测站、黑龙江粮油卫生检验监测站、北京农业质量标准与检测技术研究中心。

本标准主要起草人：谢刚、王松雪、李丽、黎睿、叶金、王媛媛、吴宇、辛媛媛、倪小英、石家源、罗雁、陆安祥。

粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定 超高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了粮食及其制品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 超高效液相色谱法测定的原理、试剂与仪器设备、分析步骤、结果计算等内容。

本标准适用于粮食及其制品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定。

本标准方法黄曲霉毒素 B₁ 检出限为 0.2 μg/kg, 定量限为 0.4 μg/kg; 黄曲霉毒素 G₁ 检出限为 0.5 μg/kg, 定量限为 1.5 μg/kg; 黄曲霉毒素 B₂、G₂ 检出限为 0.1 μg/kg, 定量限为 0.3 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备

GB/T 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

用提取液提取试样中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 免疫亲和柱净化、富集后, 通过配有大流通池的超高效液相色谱仪进行测定, 外标法定量。

4 试剂与仪器设备

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 中一级用水要求。

4.1 试剂

4.1.1 甲醇(CH₃OH): 色谱纯。

4.1.2 乙腈(CH₃CN): 色谱纯。

4.1.3 氯化钠(NaCl): 分析纯。

4.1.4 甲醇水溶液: 量取 70 体积甲醇(4.1.1), 加入 30 体积水, 混匀。

其他试剂符合 GB/T 602 的要求。

4.2 标准品

4.2.1 黄曲霉毒素标准品(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂): 纯度 ≥ 99%; 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.2.2 标准储备液: 分别称取黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂(AFG₂) 标准品(4.2.1) 各 0.1 mg(精确至 0.01 mg), 用甲醇(4.1.1) 溶解并定容至 10 mL,

得到浓度约为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液。-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

4.2.3 混合标准液:准确移取适量的 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 标准储备液(4.2.2)于 100 mL 容量瓶中,甲醇(4.1.1)定容,得到混合标准液浓度分别为 AFB₁ 和 AFG₁:100 $\mu\text{g}/\text{L}$, AFB₂ 和 AFG₂:30 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

4.2.4 混合标准工作液:准确移取适量混合标准溶液(4.2.3)至 10 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1.1)定容,配制成 AFB₁ 和 AFG₁ 浓度为 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~50 $\mu\text{g}/\text{L}$, AFB₂ 和 AFG₂ 浓度为 0.03 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~15.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的系列标准工作液,备用。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光密封保存,有效期一周。

4.3 材料与仪器设备

4.3.1 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱。

4.3.2 定性滤纸: ϕ 12 cm Whatman 4 号,或性能相当者。

4.3.3 玻璃纤维滤纸: ϕ 9 cm Whatman GF/A,或性能相当者。

4.3.4 滤膜:0.22 μm 孔径,有机相(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)。

4.3.5 注射器:20 mL。

4.3.6 离心管:50 mL。

4.3.7 三角瓶:250 mL。

4.3.8 量筒。

4.3.9 天平:感量 0.1 g 和 0.01 mg。

4.3.10 高速粉碎机。

4.3.11 氮气吹干仪。

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

4.3.13 离心机:转速 \geq 5 000 r/min。

4.3.14 调速多用振荡器(振荡频率 \geq 150 次)。

4.3.15 空气压力泵。

4.3.16 试验筛:1 mm 孔径。

4.3.17 液相色谱柱:C18 柱(柱长 50 mm 或 100 mm,柱内径 2.1 mm,填料粒径 1.7 μm),或性能相当者。

4.3.18 超高效液相色谱仪:包括超高效液相色谱仪、超高压液相色谱仪和超高速液相色谱仪,配备荧光检测器和数据处理系统。

色谱参考条件:

色谱柱:C18 柱(4.3.17)。

荧光检测波长:激发波长 360 nm;发射波长 440 nm。

流动相:A:甲醇,B:水。等度洗脱,A:B=40:60。

流速:0.2 mL/min。

柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

进样量:2 μL 。

5 分析步骤

5.1 扦样与分样

按 GB/T 5491 执行,在采样过程中,注意防止样品污染。

5.2 样品制备

5.2.1 提取

样品用高速粉碎机(4.3.10)粉碎,过1 mm 孔径试验筛(4.3.16),混合均匀后,取有代表性样品不少于500 g,供检测用。准确称取25.0 g(m,精确到0.1 g)充分均匀的试样,置于均质杯或250 mL三角瓶中,加入5.0 g 氯化钠和100 mL(V_1)甲醇/水溶液(4.1.4),高速均质提取2 min,或者使用调速多用振荡器(4.3.14)振荡提取30 min,用定性滤纸(4.3.2)过滤或转移25 mL的提取液于50 mL的离心管中,于5 000 r/min离心5 min。取10 mL(V_2)滤液或离心管中上层液体,加入40 mL(V_3)水稀释,混匀后用玻璃微纤维滤纸(4.3.3)过滤或于7 000 r/min离心10 min,滤液或离心液备用。

5.2.2 免疫亲和柱净化

将免疫亲和柱(4.3.1)与20 mL注射器(4.3.5)下端连接,准确移取20 mL(V_4)上述滤液或离心管中上层液体于注射器中,将空气压力泵(4.3.15)与注射器另一端连接,调节压力使溶液以约1滴/s的流速缓慢通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,用10 mL水淋洗亲和柱2次,流速为1滴/s~2滴/s,弃掉全部流出液,抽干免疫亲和柱。准确加入1 mL(V)甲醇(4.1.1),流速为1滴/s,收集全部洗脱液于样品瓶中,准确加入0.4 mL水,涡旋混合30 s,过0.22 μm 滤膜(4.3.4),作为待测样液,供液相色谱测定。

注:由于不同厂商提供的亲和柱操作程序可能有所不同,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使用。

5.3 标准曲线的制作

黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 标准工作液由低到高准确移取1.0 mL,加入0.4 mL水,涡旋混合30 s,注入液相色谱检测分析。以黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 标准工作液浓度为横坐标,相对应色谱峰峰面积为纵坐标,建立标准工作曲线。

5.4 试样溶液的测定

待测样液(5.2)中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内,浓度超过线性范围的样品则应重新按5.2进行处理符合要求后再进样分析。待测样液中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的浓度为 c_1 。液相色谱图参见附录A。

5.5 空白试验

不称取试样,按5.2的步骤做空白实验,分析得到空白试样中待测物的浓度为 c_0 。

5.6 平行试样

按5.2所述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

6 结果计算

样品中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的含量按式(1)、式(2)计算:

$$X_1 = \frac{(c_1 - c_0) \times V}{W} \dots\dots\dots(1)$$

其中:

$$W = \frac{m}{V_1} \times \frac{V_2}{V_2 + V_3} \times V_4 \dots\dots\dots(2)$$

式中：

X_1 ——样品中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的含量，单位为微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

c_1 ——试样液中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的含量，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

c_0 ——空白试验黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的含量，单位为微克每升 ($\mu\text{g}/\text{L}$)；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升 (mL)；

W ——最终样液所代表的试样质量，单位为克 (g)；

m ——试样称取量，单位为克 (g)；

V_1 ——样品提取液总体积，单位为毫升 (mL)；

V_2 ——移取样品滤液的体积，单位为毫升 (mL)；

V_3 ——用于稀释滤液的稀释液体积，单位为毫升 (mL)；

V_4 ——通过免疫亲和柱的稀释后样品提取液体积，单位为毫升 (mL)。

计算结果表示到小数点后两位。

7 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 15%。

附录 A

(资料性附录)

黄曲霉毒素标准溶液超高效液相色谱图

黄曲霉毒素标准溶液超高效液相色谱图见图 A.1。

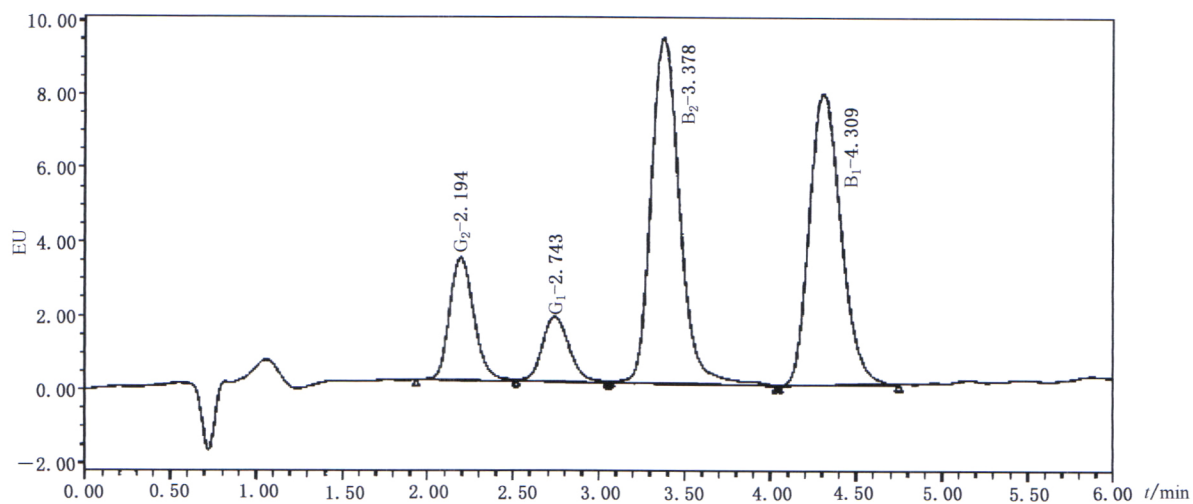


图 A.1 黄曲霉毒素(浓度比例 4 : 1 : 4 : 1)标准谱图

中华人民共和国粮食
行业标准
粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁、B₂、
G₁、G₂ 的测定 超高效液相色谱法
LS/T 6128—2017

*

中国标准出版社出版发行
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

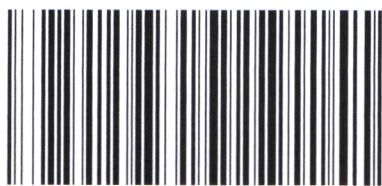
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 45 千字
2017 年 12 月第一版 2017 年 12 月第一次印刷

*

书号: 155066·2-32633 定价 16.00 元



LS/T 6128-2017

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