



# 中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6122—2017

---

## 粮油检验 粮油及制品中黄曲霉毒素含量 测定 柱后光化学衍生高效液相色谱法

Inspection of grain and oils—Determination aflatoxin content in grains and oils—  
Cleanup by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance  
liquid chromatography and post-column photochemical derivatization

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、北京市粮油食品检验所、湖北省粮油食品质量监测站、北京中检维康技术有限公司、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：王松雪、王雄、吴琴、熊宁、谢刚、黎睿、张艳、张蕊、周明慧、陆安祥。

# 粮油检验 粮油及制品中黄曲霉毒素含量测定 柱后光化学衍生高效液相色谱法

## 1 范围

本标准规定了柱后光化学衍生高效液相色谱法测定粮食和食用植物油中黄曲霉毒素含量的原理、试剂和材料、仪器和设备、扦样、试样制备、操作步骤、结果计算和精密度。

本标准适用于粮油及制品中黄曲霉毒素含量的测定(油料除外)。

本标准中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的定量检测限分别为 0.5 μg/kg、0.25 μg/kg、1.0 μg/kg 和 0.5 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 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 5524 动植物油脂 扦样

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 15687 动植物油脂 试样的制备

## 3 原理

试样由甲醇-水提取,提取液经过滤、稀释和免疫亲和层析柱净化后,用高效液相色谱进行分离,利用色谱柱后的光化学衍生器使分离物发生衍生反应,产生荧光信号,通过荧光检测器测定荧光强度,采用标准曲线法计算样品中黄曲霉毒素的含量。

## 4 试剂和材料

除另有说明外,所有试剂均为分析纯,水应符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 氯化钠(NaCl)。

4.4 甲醇+水(7+3):取 70 mL 甲醇(4.2)加 30 mL 水。

4.5 甲醇+乙腈+水(35+10+55):取 35 mL 甲醇(4.2)和 10 mL 乙腈(4.1)加 55 mL 水。

4.6 黄曲霉毒素标准品(黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>):纯度≥99%。

4.7 黄曲霉毒素标准储备溶液:准确称取适量黄曲霉毒素标准品(4.6),用乙腈(4.1)或甲醇(4.2)分别配制 2 μg/mL 的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准储备液,保存于 4 °C 备用,有效期 3 个月。

注:考虑到黄曲霉毒素具有致癌性,用粉末配制标准储备液在安全以及量值保障方面有很多不确定因素,建议直接购买商品化的黄曲霉毒素标准溶液。

4.8 黄曲霉毒素混合标准工作液:准确移取适量的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准储备溶液(4.7),用

甲醇+乙腈+水(4.5)定容为混合标准工作液。系列混合标准工作液中  $B_1$  浓度分别为 0.5  $\mu\text{g/L}$ 、1.0  $\mu\text{g/L}$ 、5.0  $\mu\text{g/L}$ 、10.0  $\mu\text{g/L}$ 、20.0  $\mu\text{g/L}$ 、50.0  $\mu\text{g/L}$ 。 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$  浓度以  $B_1$  浓度为基础,按 4 : 1 : 4 : 1 ( $B_1$  :  $B_2$  :  $G_1$  :  $G_2$ ) 比例配制。

## 5 仪器和设备

- 5.1 玻璃纤维滤纸:直径 11 cm,孔径 1.5  $\mu\text{m}$ 。
- 5.2 容量瓶:2 mL。
- 5.3 玻璃注射器:20 mL。
- 5.4 微量注射器:100  $\mu\text{L}$ 。
- 5.5 黄曲霉毒素免疫亲和柱:柱容量 $\geq$ 200 ng,回收率 $\geq$ 85%。
- 5.6 样品筛:20 目筛网,孔径 0.850 mm。
- 5.7 粉碎机。
- 5.8 高速均质器:18 000 r/min~22 000 r/min。
- 5.9 空气压力泵。
- 5.10 振荡器。
- 5.11 光化学衍生器:紫外灯,254 nm,连接于色谱柱后,出口端与荧光检测器相连。
- 5.12 分析天平:感量 0.01 g。
- 5.13 高效液相色谱仪:具有 360 nm 激发波长和 420 nm 发射波长的荧光检测器。

## 6 扦样

所取样品应具有代表性,并且在运输和贮存的过程中无损坏或变质。

扦样方法推荐采用 GB/T 5524 和 GB/T 5491。

## 7 试样制备

用粉碎机(5.7)粉碎谷物类样品使其全部通过 20 目样品筛(5.6),混匀,装入洁净容器内作为试样,密封备用。

植物油试样制备依据 GB/T 15687 执行。取样前充分混合样品。凝固的固体样品需完全熔化,以保证充分混合。

## 8 操作步骤

### 8.1 提取

谷物类样品:称取 25 g 试样(精确至 0.1 g)于 1 000 mL 均质杯(5.8)中,加入 5 g 氯化钠(4.3)及 125.0 mL( $V_1$ )甲醇+水(7+3)(4.4),以均质器高速搅拌提取 2 min。定量滤纸过滤,移取 15.0 mL( $V_2$ )滤液并加入 30 mL( $V_3$ )水稀释,用玻璃纤维滤纸(5.1)过滤 1 次~2 次,至滤液澄清,备用。

植物油样品:称取 5.0 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管,加 1.0 g 氯化钠(4.3)及 25.0 mL ( $V_1$ )甲醇+水(7+3)(4.4)。涡旋均匀后,以 35 r/min 振荡 30 min,在 7 000 r/min 转速下离心 5 min。吸取并弃去油层后过滤提取液,取 15 mL 滤液( $V_2$ ),加 30 mL( $V_3$ )水稀释混匀,用玻璃纤维滤纸(5.1)过滤 1 次~2 次,至滤液澄清,备用。

## 8.2 净化

将免疫亲和柱(5.5)连接于 20 mL 注射器(5.3)下端。移取 15.0 mL( $V_4$ )样品提取液(相当于 1.0 g 样品)注入注射器(5.3)中,将空气压力泵(5.9)与注射器(5.3)上端连接,调节压力使溶液以约 6 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱,直至液体全部流出,有空气通过。以水淋洗柱子 2 次,每次 10.0 mL,弃去全部流出液,直至空气通过柱体。加入 1.0 mL 甲醇(4.2)洗脱,流速为 1 mL/min~2 mL/min,收集全部洗脱液于 2.0 mL 容量瓶(5.2)中,用水稀释至刻度( $V$ ),混匀后供色谱测定。

## 8.3 测定

### 8.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: $C_{18}$ 柱(柱长 150 mm,内径 4.6 mm,填料粒径 5  $\mu$ m);
- b) 流动相:甲醇+乙腈+水(35+10+55)(4.5);
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:30  $^{\circ}$ C;
- e) 进样体积:20  $\mu$ L;
- f) 光化学衍生器:紫外灯,254 nm;
- g) 检测器:荧光检测器,激发波长 360 nm,发射波长 420 nm。

### 8.3.2 标准曲线制作

上述色谱条件下,基线平稳后制作工作标准曲线。

分别吸取不同浓度标准混合溶液(4.8)20  $\mu$ L 进样分析,以黄曲霉毒素  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$  的色谱峰峰面积对相应标准工作溶液浓度作图,分别制作黄曲霉毒素  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$  的工作标准曲线。黄曲霉毒素  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$  标准品的高效液相色谱图参见附录 A。

### 8.3.3 试样分析

取 20  $\mu$ L 试样溶液(8.2)进行液相色谱测定。外标法定量。

### 8.3.4 空白试验

除不加试样外,按 8.3.1~8.3.3 步骤做空白试验。

## 9 结果计算

### 9.1 黄曲霉毒素各组份含量

按式(1)计算试样中黄曲霉毒素各组份( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$  或  $G_2$ )的含量( $\mu$ g/kg),式(1)中  $W$  按式(2)计算。

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

式中:

$X_i$  ——试样中某一黄曲霉毒素( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ )的含量,单位为微克每千克( $\mu$ g/kg);

$c_1$  ——进样溶液中某一黄曲霉毒素( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ )的含量,单位为微克每升( $\mu$ g/L);

$c_0$  ——空白试验进样溶液某一黄曲霉毒素( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ )的含量,单位为微克每升( $\mu$ g/L);

$V$  ——最终定容体积,单位为毫升(mL);

$W$  ——最终净化洗脱液所含的试样质量,单位为克(g)。

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

式中:

$m$  ——试样称取量,单位为克(g);

$V_1$  ——提取液总体积,单位为毫升(mL);

$V_2$  ——稀释用样品滤液体积,单位为毫升(mL);

$V_3$  ——稀释液体积,单位为毫升(mL);

$V_4$  ——用于免疫亲和柱净化的稀释提取液体积,单位为毫升(mL)。

### 9.2 黄曲霉毒素总含量

试样黄曲霉毒素总含量为黄曲霉毒素  $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$  和  $G_2$  含量之和,按式(3)计算:

$$X = \sum X_i \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$X$  ——试样中总黄曲霉毒素( $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$  和  $G_2$ )含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )。

### 9.3 结果表示

以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

## 10 精密度

在重复性条件下获得的 2 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高效液相色谱图

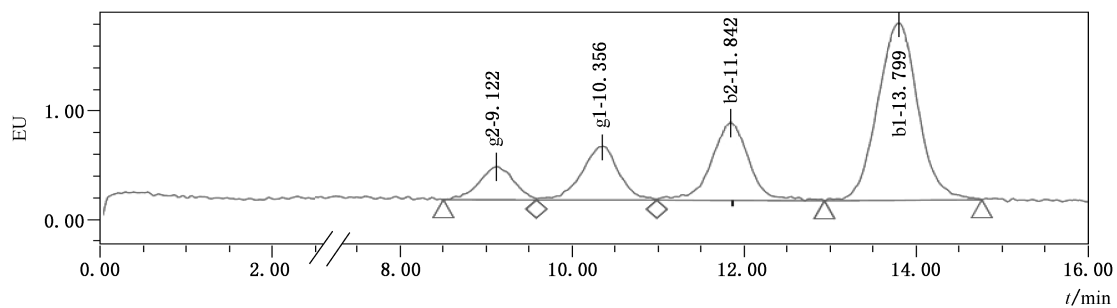


图 A.1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> (浓度比例 4 : 1 : 4 : 1) 的标准溶液高效液相色谱图