



中华人民共和国粮食行业标准

LS/T 6138—2020

粮油检验 粮食中黄曲霉毒素的测定 免疫磁珠净化超高效液相色谱法

Inspection of grain and oils—Determination of aflatoxins in grains and oils—
Ultra high liquid chromatography with immunomagnetic bead clean-up

行业标准信息服务平台

2020-01-21 发布

2020-07-21 实施

国家粮食和物资储备局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家粮食和物资储备局提出。

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：国家粮食和物资储备局科学研究院、国家粮食和物资储备局标准质量中心、北京东孚久恒仪器技术有限公司、中国储备粮管理集团有限公司、山东省粮油检测中心、广西壮族自治区粮油质量检验中心、四川省粮油中心监测站、河南口岸食品检测中心、遂宁市粮食质量监督检验站、安徽省粮油产品质量监督检测站、河南省粮油饲料产品质量监督检测中心、福建省粮油质量监测所、湖北省粮油食品质量监督检测中心、辽宁省粮油检验监测所、黑龙江省粮食质量安全监测中心、山西粮食质量监测中心、云南省粮油产品质量监督检验测试中心、内蒙古自治区粮油质量检测中心、昆明市粮油饲料产品质量检验中心、北京农业质量标准与检测技术研究中心、哈尔滨市粮食质量监测站、前郭尔罗斯蒙古族自治县粮油品质卫生检验监测站。

本标准主要起草人：王松雪、叶金、轩志宏、杨卫民、李国强、张志航、周明慧、王培、伍先绍、杨军、姬建生、李小明、胡斌、刘莹、谢婷婷、田国军、韩笑、徐春峰、李静、邵志凌、邱庆丰、李维香、陆安祥、赵宏伟、赵环宇。

行业标准信息服务平台

粮油检验 粮食中黄曲霉毒素的测定

免疫磁珠净化超高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了免疫磁珠净化超高效液相色谱测定粮食中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂) 的原理、试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、测定、结果计算和精密度等内容。

本标准适用于小麦、玉米、稻谷和植物油等粮油样品中 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 的测定。

本标准 AFB₁ 的检出限为 0.1 μg/kg, AFB₂ 的检出限为 0.03 μg/kg, AFG₁ 的检出限为 0.1 μg/kg, AFG₂ 的检出限为 0.03 μg/kg; AFB₁ 的定量限为 0.3 μg/kg, AFB₂ 的定量限为 0.1 μg/kg, AFG₁ 的定量限为 0.3 μg/kg, AFG₂ 的定量限为 0.1 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 5490 粮油检验 一般规则

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

样品中黄曲霉毒素经甲醇-水混合液提取、上清液经免疫磁珠净化、富集后,采用超高效液相色谱分析,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有说明外,本方法所用试剂均为分析纯,实验用水应符合 GB/T 6682 中规定的一级用水要求。

4.1 乙腈:色谱纯。

4.2 甲醇:色谱纯。

4.3 氯化钠。

4.4 磷酸氢二钠。

4.5 磷酸二氢钾。

4.6 氯化钾。

4.7 盐酸。

4.8 TritonX-100[C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n](或吐温-20, C₅₈H₁₁₄O₂₆)。

4.9 甲醇-水混合液 70:30,体积分数取 70 mL 甲醇加入 30 mL 水,混匀。

4.10 磷酸盐缓冲溶液(以下简称 PBS):称取 8.00 g 氯化钠、1.20 g 磷酸氢二钠(或 2.92 g 十二水磷酸氢二钠)、0.20 g 磷酸二氢钾、0.20 g 氯化钾,用 900 mL 水溶解,用盐酸调节 pH 至 7.4,用水定容至 1 000 mL。

4.11 0.1% TritonX-100(或吐温-20)的 PBS 溶液(以下简称 PBST):取 1 mL TritonX-100(或吐温-20),用 PBS 定容至 1 000 mL。

4.12 标准品

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的固体粉末(纯度≥99%)或经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

4.13 标准溶液配制

4.13.1 混合标准溶液

分别准确移取一定体积或质量的 4 种黄曲霉毒素标准品(4.12)于 10 mL 容量瓶中,配制黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂,浓度分别为 100 mg/L、30 mg/L、100 mg/L、30 mg/L,用甲醇定容至刻度,此溶液-20 °C 密封避光保存,有效期 6 个月。

4.13.2 标准系列工作溶液

分别准确移取 4 种黄曲霉毒素混合标准溶液(4.13.1)25 μL、50 μL、100 μL、250 μL、500 μL、1 000 μL 分别于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,配制标准曲线溶液浓度见表 1,此溶液 4 °C 避光密封保存,有效期 1 周。

表 1 标准曲线溶液浓度

单位:ng/mL

化合物名称	标曲点 1	标曲点 2	标曲点 3	标曲点 4	标曲点 5	标曲点 6
AFB ₁	0.25	0.5	1	2.5	5	10
AFB ₂	0.075	0.15	0.3	0.75	1.5	3
AFG ₁	0.25	0.5	1	2.5	5	10
AFG ₂	0.075	0.15	0.3	0.75	1.5	3

4.14 塑料离心管(2.0 mL、10 mL、50 mL)。

4.15 玻璃内插管(400 μL)。

4.16 色谱进样瓶(2 mL)。

4.17 容量瓶(10 mL)。

4.18 黄曲霉毒素免疫磁珠前处理试剂盒:回收率≥85%。

注:对于不同批次的试剂盒在使用前需进行质量验证。

5 仪器和设备

5.1 天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

5.2 粉碎机:电机转速≥1 000 r/min,可使试样粉碎后全部通过 20 目筛。

5.3 离心机:转速≥6 000 r/min。

5.4 涡旋混合器。

5.5 振荡器(振荡频率≥50 次)。

5.6 单通道移液枪一套(最大量程分别为 20 μL、100 μL、200 μL、1 000 μL)。

5.7 分液器(量程 10~100 mL)。

5.8 磁棒和磁棒套或含有磁棒和磁棒套的全自动净化仪。

5.9 超高效液相色谱-荧光检测器(带一般体积流动池或者大体积流通池)。

注:当带大体积流通池时不需要再使用任何型号或任何方式的柱后衍生器。

5.10 柱后衍生器。

6 分析步骤

6.1 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,取代表性样品至少 1 kg。

6.2 样品制备

6.2.1 液体样品(植物油)

将所有液体样品在一个容器中充分混合均匀,储存于样品瓶中备用。

6.2.2 固体样品(小麦、玉米、稻谷等)

用粉碎机(5.2)将样品粉碎至全部通过 20 目筛,充分混合均匀,储存于样品瓶中备用。

6.3 提取及净化

准确称取 5 g(精确到 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 提取液(4.9),涡旋提取 20 min,然后以 6 000 r/min 离心 5 min,吸取 0.5 mL 上清液于 10 mL 反应管中,加入 4.5 mL PBST(4.11)并混匀,加入 100 μ L 黄曲霉毒素免疫磁珠振荡反应 5 min,通过磁棒(5.8)磁吸分离 30 s 后将免疫磁珠转移至含 1 mL PBST(4.11)的 2 mL 反应管振荡 1 min,通过磁棒磁吸分离 30 s 后将免疫磁珠转移至含 1 mL PBS(4.10)的 2 mL 反应管振荡 1 min 后,通过磁棒磁吸分离 30 s 后将免疫磁珠转移至含 0.5 mL 甲醇(4.2)的 2 mL 反应管振荡 1 min,通过磁棒磁吸分离 30 s 后弃去免疫磁珠,收集甲醇于进样瓶中以备进样。

注 1: 使用不同厂商的免疫磁珠时在操作方面可能有所不同,应按照其使用说明要求进行操作。

注 2: 真菌毒素全自动净化仪可优化操作参数后使用。

7 测定

7.1 液相色谱参考条件

7.1.1 无衍生器法(大流通池直接检测)

色谱参考条件:

色谱柱: C_{18} 柱(柱长 50 mm 或 100 mm,柱内径 2.1 mm,填料粒径 1.7 μ m),或性能相当。

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 $^{\circ}$ C。

进样量:2 μ L。

7.1.2 柱后衍生法

色谱参考条件:

色谱柱: C_{18} 柱(柱长 50 mm 或 100 mm,柱内径 2.1 mm,填料粒径 1.7 μ m),或性能相当。

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 ℃。

进样量:2 μL。

柱后衍生器。

7.2 标准曲线的制作

黄曲霉毒素标准工作溶液(4.13.2)由低浓度到高浓度依次注入液相色谱检测分析。以黄曲霉毒素标准工作液浓度为横坐标,相对应色谱峰峰面积为纵坐标,得到标准线性回归方程。

7.3 试样溶液的测定

待测样液(6.3)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稀释后重新进样分析。

8 结果计算

样品中黄曲霉毒素的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{c \times V_1 \times (V_2 + V_3) \times V_4}{m \times V_2} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——样品中 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 或 AFG₂ 的含量,单位为微克每千克(μg/kg);

c ——由标准曲线测得试样中 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 或 AFG₂ 的含量,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_1 ——提取液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——用于稀释的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——用于稀释的稀释液体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——用于免疫磁珠的洗脱液体积,单位为毫升(mL);

m ——样品的称样量,单位为克(g)。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

测定结果不符合重复性要求时,应按 GB/T 5490 的规定重新测定,计算结果。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值小于或等于重复性限(r)的情况应大于 95%,黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 含量的重复性限值(r)参见附录 B。

9.2 再现性

在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值小于或等于再现性限(R)的情况应大于 95%,黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 含量的再现性限值(R)参见附录 B。

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。

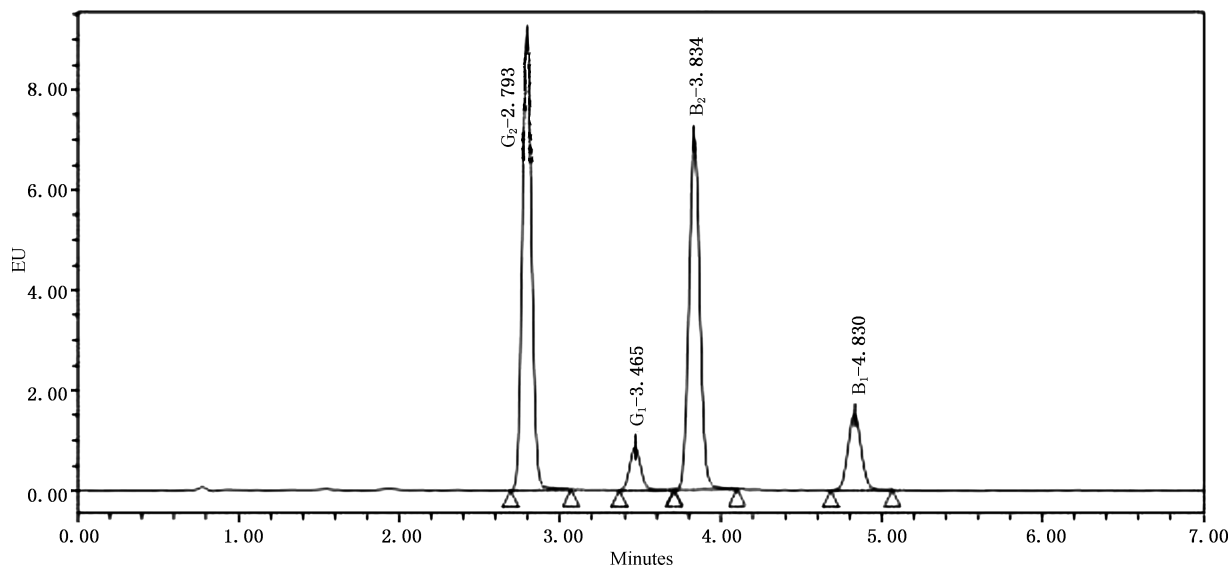


图 A.1 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ (浓度比例 10 : 3 : 10 : 3) 标准谱图

行业标准信息服务平台

附录 B

(资料性附录)

实验室间比对试验统计结果

组织 6 家实验室对 6 个不同样品进行实验室间比对试验,建立了本方法的精密度,结果按 GB/T 6379.1和 GB/T 6379.2 统计分析,统计结果见表 A.1 和表 A.2。

表 B.1 玉米加标实验室间黄曲霉毒素的测量结果

样品	玉米低浓度				玉米中浓度				玉米高浓度			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
参加实验室的数目	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
样品的数量	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
去除离群值后的 测试实验室数量	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
所有可接受结果的数量	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
平均值 μg/kg	10.58	2.68	10.22	2.55	20.73	5.23	20.39	4.94	41.65	10.52	40.07	9.66
重复性的标准偏差 <i>Sr</i> μg/kg	0.56	0.09	0.60	0.16	0.82	0.17	0.99	0.14	1.86	0.52	2.11	0.54
重复性的变异系数 %	5.3	3.5	5.9	6.4	4.0	3.2	4.9	2.9	4.5	5.0	5.3	5.6
重复性限值 <i>r</i> μg/kg	1.59	0.26	1.71	0.46	2.33	0.47	2.80	0.40	5.28	1.48	5.96	1.54
再现性标准偏差 <i>SR</i> μg/kg	0.79	0.19	0.78	0.23	1.55	0.41	1.17	0.36	2.72	0.81	2.49	0.85
再现性的变异系数 %	7.5	7.1	7.6	8.9	7.5	7.8	5.8	7.2	6.5	7.7	6.2	8.8
再现性限值 <i>R</i> μg/kg	2.23	0.54	2.20	0.64	4.39	1.16	3.32	1.01	7.70	2.30	7.04	2.40
HorRat 值	0.67	0.52	0.68	0.64	0.74	0.63	0.57	0.58	0.72	0.69	0.68	0.78
回收率 %	105.8	107.4	102.2	102.2	103.6	104.6	102.0	98.7	104.1	105.2	100.2	96.6

表 B.2 糙米加标实验室间黄曲霉毒素的测量结果

样品	糙米低浓度				糙米中浓度				糙米高浓度			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
参加实验室的数目	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
样品的数量	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18

表 B.2 (续)

样品 毒素	糙米低浓度				糙米中浓度				糙米高浓度			
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
去除离群值后的 测试实验室数量	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
所有可接受结果的数量	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
平均值 μg/kg	5.03	1.28	4.59	1.22	10.37	2.64	9.94	2.50	20.10	5.03	18.89	4.81
重复性的标准偏差 <i>Sr</i> μg/kg	0.26	0.09	0.31	0.09	0.51	0.16	0.60	0.17	0.50	0.15	0.66	0.17
重复性的变异系数 %	5.2	6.8	6.7	7.0	5.0	6.0	6.1	6.8	2.5	2.9	3.5	3.5
重复性限值 <i>r</i> μg/kg	0.75	0.25	0.88	0.24	1.45	0.45	1.70	0.48	1.41	0.41	1.88	0.47
再现性标准偏差 <i>SR</i> μg/kg	0.39	0.12	0.48	0.11	0.58	0.21	0.65	0.17	0.54	0.26	1.10	0.18
再现性的变异系数 %	7.7	9.6	10.6	8.8	5.6	7.8	6.5	6.8	2.7	5.2	5.8	3.7
再现性限值 <i>R</i> μg/kg	1.10	0.35	1.37	0.30	1.65	0.59	1.84	0.48	1.52	0.74	3.10	0.50
HorRat 值	0.62	0.63	0.83	0.57	0.50	0.57	0.58	0.49	0.26	0.41	0.57	0.29
回收率 %	100.5	102.5	91.9	97.5	103.7	105.7	99.4	100.0	100.5	100.7	94.4	96.3

行业标准信息服务平台