

1 主题内容与适用范围

本标准规定了出口粮谷中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂检验的抽样、制样和液相色谱测定方法。

本标准适用于出口玉米中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的检验。大米、小麦等粮谷中黄曲霉毒素的检验，可参照采用本标准。

2抽样和制样

2.1 检验批

以不超过200t为一检验批。

同一检验批的商品应具有相同的特征，如包装、标记、产地、规格、等级等。

2.2 抽样数量

2.2.1 袋装商品：按式(1)计算抽样袋数。

$$a=\sqrt{N}$$

式中：a-抽样袋数；

N-全批袋数。

注：a值取整数，小数部分向前进位为整数。

2.2.2 散积商品：粮堆高度不超过2m。按粮堆面积划区设点。以50m²为一个取样区，每区设中心及四角(距边线1 m处)5个点。每增加一个取样区，增设3个点。

2.3 抽样工具

2.3.1 单管取样器：不锈钢管。全长55cm(包括手柄)，直径1.5~2.5cm，沟槽长度应超过袋对角线长度的一半，见图1。



图1

2.3.2 双套管取样器：两根不锈钢管构成。全长150cm(包括手柄)，外管分成多个空腔，内管上有狭缝，内管直径2.0~2.5cm，见图2。

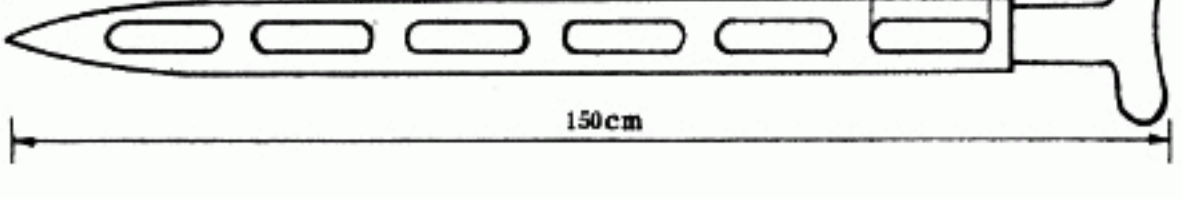


图2

2.3.3 取样铲：见图3。

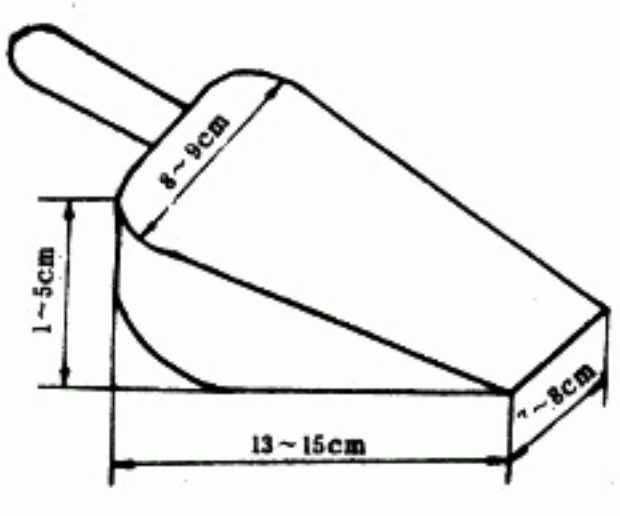


图3

2.3.4 分样板：见图4。

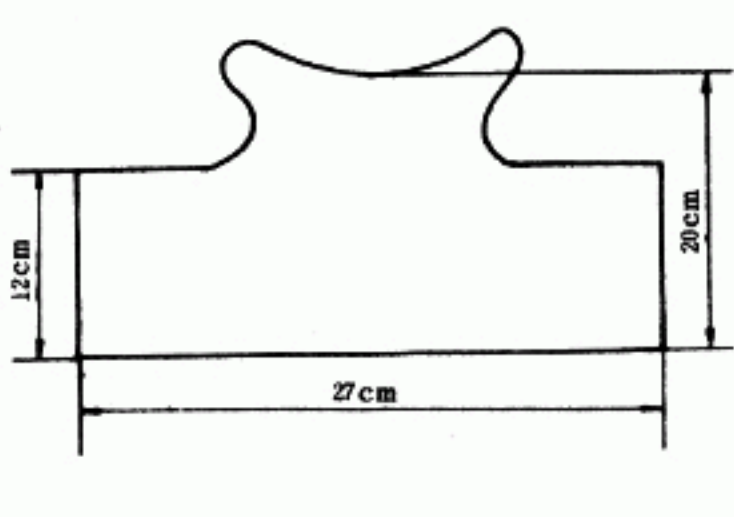


图4

2.3.5 样品筒(袋)：可密封。

2.3.6 分样布或适用铺垫物。

2.4 抽样方法

2.4.1 袋装抽样

2.4.1.1 倒包抽样：从堆垛的各部位随机抽取2.2.1规定的应抽样件数的10%(每批一般不少于3包)，将袋口缝线全部拆开，平置于分样布或其他洁净的铺垫物上，双手紧握袋底角，提起约成45°倾角，倒拖1m以上，使袋内货物全部倒出。检查货物的外观、气味、有无发霉、变质等，并查看袋内和袋间品质是否均匀。确认情况正常后，用取样铲随机在各部位抽取样品，立即将样品倒入盛样器内。每袋抽取的样品量应基本一致。

2.4.1.2 袋内抽样：按2.2.1规定的应抽样件数的90%，在垛堆四周上，中、下各层以曲线形走向，随机抽取。将取样器(2.3.1)管槽朝下，从每袋一角依斜对角方向插入袋内，然后将管槽旋转朝上，抽取出样器，立即将样品倒入盛样容器内。每袋抽取的样品量应与2.4.1.1基本一致。

每批样品总量应不少于4kg。

2.4.2 散积抽样

按2.2.2规定的取样点，逐点取样。取样时将取样器(2.3.2)垂直(略带倾斜)插入取样点的粮堆内，旋转外套管，抽取出样管，立即将取出的样品倒入盛样器内。从各点中抽取的样品量应基本一致，每批样品总量应不少于4kg。

2.4.3 大样缩分

袋装样品：集中袋内和倒包抽样所取全部样品，倒于分样布上，用分样板按四分法缩分出样品不少于2kg，置于盛样器内，加封后标明标记并及时送交实验室。

散积样品：将抽取的全部样品，倒于分样布上，以下按上述袋装样品方法进行。

2.5 试样制备

将样品按四分法缩分至1kg，全部磨碎并通过20目筛，混匀，均分成两份，装入洁净的容器内，密封，标明标记。

2.6 试样保存

将试样于5℃以下避光保存。

注，在抽样和制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生黄曲霉毒素含量的变化。

3 测定方法

3.1 方法提要

试样中黄曲霉毒素用二氯甲烷提取，提取液经氧化铝和硅胶柱净化以除去脂肪、色素及杂质，用液相色谱法荧光检测器测定，外标法定量。

3.2试剂和材料

所用试剂除注明外均为分析纯，水为蒸馏水。

3.2.1 二氯甲烷。

3.2.2 苯。

3.2.3 乙腈。

3.2.4 正己烷。

3.2.5 无水乙醚。

3.2.6 丙酮。

3.2.7 乙酸。

3.2.8 无水甲酸。

3.2.9 无水甲醇。

3.2.10 乙酸乙酯。

3.2.11 甲苯。

3.2.12 无水硫酸钠：经650℃灼烧4h，置于干燥器内备用。

3.2.13 中性氧化铝：层析用，粒度100~200目，经135℃活化2h，置于干燥器内备用。

3.2.14 硅胶：层析用，粒度60~325目，经110℃活化2h，并加1%(m/m)水减活。

3.2.15 黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂标准品：含量均在99%以上。

3.2.16 黄曲霉毒素标准溶液：称取黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂各1.0mg，分别以苯-乙腈(98+2)混合溶剂定容于100mL棕色容量瓶中，配成标准储备溶液，浓度均为10μg/mL。将上述四种标准储备溶液按B₁：B₂：G₁：G₂(4：3：2：1)的体积比充分混合于10mL棕色容量瓶中，浓度依次为B₁：4.0μg/mL，B₂：3.0μg/mL，G₁：2.0μg/mL，G₂：1.0μg/mL。此溶液为混合标准储备溶液。根据需要再配成适用浓度的标准工作溶液。

3.3仪器和设备

3.3.1 液相色谱仪，配有荧光检测器。

3.3.2 粉碎机。

3.3.3 振荡器。

3.3.4 旋转蒸发器并配有150mL、250mL圆底烧瓶。

3.3.5玻璃抽滤器。

3.3.6 滤膜：有机系用，0.45μm。

3.3.7 微孔滤膜过滤装置：有机系用，0.5μm。

3.3.8 层析柱：300mm×20mm(i.d)玻璃柱，下具活塞。在柱底塞入少量玻璃棉，按5g无水硫酸钠、10g硅胶、5g中性氧化铝、10g，无水硫酸钠的顺序依次用正己烷湿法装柱。

3.3.9 进样瓶，2mL玻璃瓶，具密封塞。

3.4 测定步骤

3.4.1 提取

称取粉碎混匀的试样30g(精确到0.1g)于250mL具塞锥形瓶中，准确加入二氯甲烷100mL，在振荡器上振荡提取30min。以快速定性滤纸滤取清液50mL于150mL圆底烧瓶中(过滤时漏斗上加盖表玻璃，以防止溶剂挥发)，用旋转蒸发器在50℃水浴中将溶剂蒸发至干。

3.4.2 净化

上述残渣以5mL二氯甲烷-正己烷(1+1)混合溶剂溶解并移入层析柱。圆底烧瓶再以5mL同样溶剂洗涤一次，洗涤液并入层析柱。打开柱下活塞，使之自然流下，待液面接近层析柱上层无水硫酸钠表面时，再依次以80mL苯-乙酸(9+1)(流速2~3mL/min)、150mL无水乙醚；正己烷(3+1)(流速4~5mL/min)分别淋洗层析柱，弃去流出液。最后以200mL二氯甲烷-丙酮(9+1)(流速5~6mL/min)洗脱层析柱，以250mL圆底烧瓶承接洗脱液。

用旋转蒸发器在50℃水浴中将上述洗脱液蒸发至干，用10mL甲苯-无水甲醇-乙酸乙酯(90+2+8)混合溶剂溶解残渣，并使其通过微孔滤膜过滤装置收集于进样瓶中供液相色谱测定。

3.4.3 测定

3.4.3.1 色谱条件

- a. 色谱柱：硅胶，5μm，250mm×4.6mm(i.d)；
- b. 流动相：甲苯，无水甲醇-乙酸乙酯-无水甲酸(88+2+8+2)。配制后，经0.45μm滤膜抽滤、脱气(使用当天配制)；
- c. 流速：1.0mL/min，
- d. 激发波长365nm、激发狭缝10nm；发射波长425nm、发射狭缝10nm。

3.4.3.2 色谱测定

根据样液中黄曲霉毒素含量情况，选定峰高相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样液中黄曲霉毒素响应值均应在仪器检测线性范围内，对标准工作溶液和样液等体积参插进行测定。在上述色谱条件下，黄曲霉毒素的出峰顺序按保留时间依次约为B₁：9min、B₂：11min、G₁：13min、G₂：16min。

3.4.4 空白试验

除不加试样外，按上述测定步骤进行。

3.5 结果计算和表述

用积分仪按外标法相关程序分别计算黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂含量，或按式(2)进行计算：

$$X=\frac{h\cdot c\cdot V}{h_s\cdot m}\times 1000$$

式中：X—分别为试样中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的含量，μg/kg；

h—分别为样液中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的峰高，mm；

h_s—分别为标准工作溶液中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的峰高，mm；

c—分别为标准工作溶液中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的浓度，μg/mL；

V—样液最终定容体积，mL；

m—最终样液所相当的样品量，g。

注：计算结果需扣除空白值。

4 测定下限、回收率

4.1 测定下限

本方法的测定下限为：

B₁：0。50μg/kg；

B₂：0.38μg/kg；

G₁：0.25μg/kg；

G₂：0.12μg/kg。

4.2 回收率

回收率实验数据：

黄曲霉毒素	添加浓度，μg/kg	回收率，%
B ₁	0.50~5.0	76.7~99.2
B ₂	0.38~3.8	68.8~99.3
G ₁	0.25~2.5	66.7~100.9
G ₂	0.12~1.2	65.0~101.6

附加说明：

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出。

本标准由中华人民共和国天津进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人郑洪生、张洪卫、唐刚。