# 出口油籽、坚果及坚果制品中 黄曲霉毒素的检测方法薄层色谱法

Method for the determination of aflatoxins in oil seeds, nuts and nut products for export—Liquid chromatographic method

SN 0637—1997

**前言**

本标准是根据GB/T 1.1—1993《标准化工作导则 第1单元：标准的起草和表述规则 第1部分：标准编写的基本规则》及GB/T 0001—1995《出口商品分类法，编码体系及协调编码法，编码体系的基本规则》的要求进行编写的。其中测定方法是参考国内外有关文献，经研究、防疫和验证后制定的。本标准同时制定了抽样和制样方法。

测定项目是根据国际上对油籽、坚果及坚果制品中黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$最高限量和测定方法的灵敏度而制定的。

本标准的制定从方提示的同步。

本标准由中华人民共和国国家进出口商品检验局提出并归口。

本标准由中华人民共和国河北进出口商品检验局负责起草。

本标准主要起草人：任世国、段文仲、郝冬生、白玉良。

本标准系首次发布的行业标准。

## 1 范围

本标准规定了出口油籽、坚果及坚果制品中黄曲霉毒素检验的抽样、制样和薄层色谱测定方法。

本标准适用于出口花生仁和苦仁中黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$的检验。

## 2抽样和制样

2.1 检验批

花生仁以不超过200t（2400袋）为一检验批；苦仁以不超过50t（625袋）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、规格和等级等。

2.2 抽样数量

按式(1)计算抽样袋数：

$$a=\sqrt{N} \qquad \text{———————(1)}$$

式中：N—全批袋数；

a—抽样袋数。

注：a取整数，小数部分向前进位为整数。

2.3 抽样工具

2.3.1 取样铲或取样勺。

2.3.2 盛样袋：可密封。

2.3.3 分样板。

2.3.4 分样带。

2.4 抽样方法

2.4.1 倒包抽样：从堆较的各部位随机抽取2.2规定的应抽样袋数的100%（每批一般不少于5袋），将袋口缝线全部拆开，平置于分样带上，双手紧握袋两角，提起的或4°倾角，倾倒出样品，使袋内原物全部倒出，重看袋内取袋品是否是一致。确认情况正常后，用取样铲随机在各部位抽取样品，立即装入盛样袋中。每袋抽取的样品数量应基本一致。

2.4.2 袋内取样：按2.2规定的应抽样袋数的100%，在堆垛四周上、中、下各层以曲线形走向随机抽取样袋。将所抽各袋拆开袋口缝线3~5针，用取样勺从开口处抽取样品，立即缝好袋口，并将所取样品倒入盛样袋中，每袋抽取样品数量应相2.4.1基本一致。

每批所抽取的样品总量应不少于4kg。

2.4.3 大样缩分：合并倒包取袋内取样所取全部样品，倒于分样带上，用分样板按四分法分出样品不少于2kg，倒入样品袋中，加封后标明标记，并及时送交实验室。

2.5 试样制备

2.5.1 制样工具

2.5.1.1 切碎机或粉碎机。

2.5.1.2 筛子：2.0 mm圆孔筛。

2.5.1.3 分样板。

2.5.1.4 盛样器：具塞广口瓶。

2.5.2 制样方法

将所取样品，用四分法缩分出约200 g，用切碎机或粉碎机将缩分出的样品全部切碎或粉碎成尺寸不大于1mm并通过2.0 mm圆孔筛网粒，充分混匀，均分成两份作为试样，分装于洁净的盛样瓶中，密封，标明标记。

2.6 试样保存

将试样于-5℃以下避光保存。

注：在抽样及制样的操作过程中，必须防止样品受到污染或发生性状物含量的变化。

## 3 测定方法

3.1 方法提要

试样中的黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$用三氯甲烷提取，提取液经弗罗里硅土柱净化，浓缩，定容。溶液用柱后衍生一溴柠色谱荧光检测器法测定，外标法定量。

3.2 试剂和材料

除另有规定外，所用试剂均为分析纯，水为蒸馏水。

3.2.1 三氯甲烷。

3.2.2 丙酮。

3.2.3 苯。

3.2.4 乙酸。

3.2.5 甲醇：紫外光谱纯。

3.2.6 无水硫酸钠：600℃灼烧4h，贮于干燥器中备用。

3.2.7 硅藻土：Celit 545。

3.2.8 弗罗里硅土：60~100目，600℃灼烧4h，使用前于130℃活化3h，贮于干燥器中备用。

3.2.9 过碘化溴化吡啶(pyridinium bromide perbromide)。

3.2.10 黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$标准品：纯度均≥99%。

3.2.11 标准储备液：分别称取适量的黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$标准品，分别用少量苯溶解并用乙腈或纯度为0.100 mg/mL的标准储备液。

3.2.12 混合标准工作液：根据需要准确移取适量的黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$和$G_2$的标准储备液，用乙腈稀释成适当浓度的混合标准工作液。

3.3 仪器和设备

3.3.1 溴柠色谱仪并配有荧光检测器和柱后衍生装置。

3.3.2 微量进样器。

3.3.3 抽滤器。

3.3.4 真空泵。

3.3.5 螺杆瓶发器。

3.3.6 净化柱：玻璃柱，30 cm×20 mm（内径），用三氯甲烷湿法淋次装入1.0 g无水硫酸钠，0.7 g弗罗里硅土，5.0 g无水硫酸钠。

3.4 测定步骤

3.4.1 提取

称取约20 g试样（精确至0.1g）于250 mL具塞锥形瓶中，加入10 mL水使试样充分湿润。加入5.0 g硅藻土，并搅动加入100 mL三氯甲烷，于微量滤布器上快速抽滤50min。提取液经抽滤后过无水硫酸钠柱，收集50 mL。

3.4.2 净化

准确移取50.0mL上述提取液，注入弗罗里硅土净化柱中，用2×10mL三氯甲烷洗涤容器及玻璃柱，调节流速为2mL/min。待溶液全部流出后，用20mL三氯甲烷—甲醇（9+1）洗柱子，并去全部流出液。用50 mL丙酮—水（99+1）洗脱，收集洗脱液于螺旋瓶中。用螺杆瓶发器于40℃水浴中减压蒸发至近干，再用氮气吹干。准确加入2.0 mL甲醇以溶解残渣，溶液供柱后衍生一溴柠色谱法测定。

3.4.3 测定

3.4.3.1 色谱条件

a) 色谱柱：15cm×4.6mm（内径）5μm，Nucleosil $C_{18}$柱，或相当者；

b) 流动相：甲醇—水（45+55），流速1.2mL/min；

c) 检测波长：激发波长365nm，发射波长450 nm；

d) 柱后衍生剂：过碘化溴化吡啶水溶液（0.05g/mL），流速0.48mL/min；

e) 反应管：30 cm×0.25mm（内径），不锈钢管；

f) 柱温及反应管温度：35℃；

g) 进样量20 μL。

3.4.3.2 色谱测定

根据样品中黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$的含量情况，选定峰高相近的混合标准工作液，混合标准工作液和样品中黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$的生物的响应值均应在极检测的线性范围内，对混合标准工作液和样品等体积参插进样测定。在上述色谱条件下，黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$的生物的保留时间分别的为11.4min、9.3min、7.6min、6.4min。标准品的溴柠色谱图见附录A中图A1。

3.4.4 空白试验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

3.5 结果计算与表述

用色谱处理机或按式(2)分别计算试样中黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$的含量：

$$X=\frac{h_s c V}{h_m m} \qquad \text{———————(2)}$$

式中：X—试样中黄曲霉毒素的含量，μg/kg；

$h_m$—样品中黄曲霉毒素的生物的峰高，mm；

$h_s$—混合标准工作液中黄曲霉毒素的生物的峰高，mm；

c—混合标准工作液中黄曲霉毒素的浓度，ng/mL；

V—样品最终定容体积，mL；

m—最终样品所代表的试样量，g。

注：计算结果需特定白值扣除。

## 4 测定低限、回收率

4.1 测定低限

本方法测定低限：黄曲霉毒素$B_1$为0.75μg/kg；$B_2$为0.90μg/kg；$G_1$为1.0μg/kg；$G_2$为1.0μg/kg。

4.2 回收率

苦仁和花生仁中黄曲霉毒素添加浓度及其回收率实验数据如下。

4.2.1 苦仁中的回收率

| 黄曲霉毒素 | 添加浓度（μg/kg） | 回收率 |
|---|---|---|
| $B_1$ | 0.75 | 86.7% |
| $B_1$ | 1.5 | 85.3% |
| $B_1$ | 3.0 | 95.7% |
| $B_2$ | 0.9 | 104% |
| $B_2$ | 1.8 | 80.0% |
| $B_2$ | 3.6 | 99.6% |
| $G_1$ | 1.0 | 69.5% |
| $G_1$ | 2.0 | 78.0% |
| $G_1$ | 4.0 | 68.3% |
| $G_2$ | 1.0 | 75.0% |
| $G_2$ | 2.0 | 78.5% |
| $G_2$ | 4.0 | 76.3% |

4.2.2 花生中的回收率

| 黄曲霉毒素 | 添加浓度（μg/kg） | 回收率 |
|---|---|---|
| $B_1$ | 0.75 | 84.0% |
| $B_1$ | 1.5 | 80.7% |
| $B_1$ | 3.0 | 82.6% |
| $B_2$ | 0.9 | 88.9% |
| $B_2$ | 1.8 | 85.0% |
| $B_2$ | 3.6 | 96.0% |
| $G_1$ | 1.0 | 71.5% |
| $G_1$ | 2.0 | 81.5% |
| $G_1$ | 4.0 | 74.8% |
| $G_2$ | 1.0 | 71.5% |
| $G_2$ | 2.0 | 81.0% |
| $G_2$ | 4.0 | 75.9% |

**附 录 A**

（提示的附录）

**标准品色谱图**

注：色谱峰号1，2，3，4分别为黄曲霉毒素$G_2$、$G_1$、$B_2$、$B_1$的生物，保留时间分别为6.4min、7.6min、9.3min、11.4min。

图A1 黄曲霉毒素$B_1$、$B_2$、$G_1$、$G_2$标准品的生物的溴柠色谱图