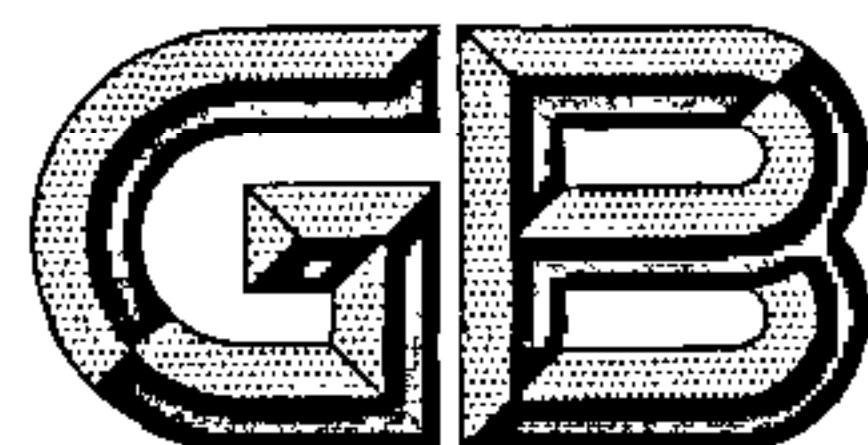


ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.25—2003
代替 GB/T 5009.25—1996

植物性食品中杂色曲霉素的测定

Determination of sterigmatocystin in vegetable foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

203

前 言

本标准代替 GB/T 5009.25—1996《食品中杂色曲霉素的测定方法》。

本标准与 GB/T 5009.25—1996 相比主要修改如下：

- 修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《植物性食品中杂色曲霉素的测定》；
- 按照 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由卫生部食品卫生监督检验所、天津市卫生防疫站负责起草。

本标准由中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所负责起草。

本标准于 1985 年首次发布，于 1996 年第一次修订，本次为第二次修订。

植物性食品中杂色曲霉素的测定

1 范围

本标准规定了大米、玉米、小麦、黄豆及花生等各种植物性食品中杂色曲霉素的测定方法。
本标准适用于大米、玉米、小麦、黄豆及花生等各种植物性食品中杂色曲霉素的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 5009.22—2003 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

3 原理

试样中的杂色曲霉素经提取、净化、浓缩、薄层展开后,用三氯化铝显色,再经加热产生一种在紫外光下显示黄色荧光的物质,根据其在薄层上显示的荧光最低检出量来测定试样中杂色曲霉素的含量。

4 试剂

4.1 同 GB/T 5009.22—2003 中 3.1~3.4。

4.2 冰乙酸。

4.3 甲酸。

4.4 乙醇(95%)。

4.5 氯化钠溶液(40 g/L)。

4.6 三氯化铝-乙醇溶液(200 g/L):称取 20 g 三氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)溶于 100 mL 乙醇中,过滤,室温保存。

4.7 杂色曲霉素标准溶液:用杂色曲霉素标准品配制成每毫升相当于 10 μg 的苯溶液。用紫外分光光度计标定其浓度(最大吸收峰的波长 325 nm,分子量 324,摩尔吸光系数 15 200),并作硅胶薄层色谱纯度鉴定,避光,放置于 4℃ 冰箱中保存。

4.8 杂色曲霉素标准使用液:用苯将 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的杂色曲霉素标准溶液稀释成每毫升相当于 1.0 和 0.40 μg 的杂色曲霉素标准溶液。避光,放置于 4℃ 冰箱中保存。

5 仪器

5.1 同 GB/T 5009.22—2003 中 4.1~4.4。

5.2 玻璃板:10 cm×10 cm 与 10 cm×18.5 cm 两种。

5.3 展开槽:内长 10 cm、宽 4.5 cm、高 17 cm 与内长 11.5 cm、宽 60 cm、高 19 cm。

5.4 玻璃喷雾器。

5.5 空气泵或油泵。

6 分析步骤

6.1 提取

大米、玉米、小麦、黄豆及花生:称取 20.00 g 过 20 目筛的大米、玉米、小麦及黄豆试样(花生试样过

10目筛孔),置于具塞锥形瓶中,加80 mL 甲醇-氯化钠溶液(90+10),振荡30 min,过滤。收集试样液40 mL(黄豆、花生试样则取20 mL,加入20 mL 提取剂),移入250 mL 分液漏斗中,再加入25 mL 氯化钠溶液(使甲醇与水之体积比为55+45)和25 mL 石油醚,振摇2 min,静置分层。上层石油醚溶液置锥形瓶中,下层溶液仍移入原分液漏斗中,再用25 mL 石油醚提取一次。最后将两次上层的石油醚溶液合并,加入25 mL 甲醇-氯化钠溶液(55+45),振摇30 s[黄豆、花生试样则加入25 mL 甲醇-氯化钠溶液(70+30),振摇30 s],将下层并于原甲醇水层中,重复用甲醇-氯化钠溶液(55+45)提取两次[黄豆、花生试样重复用甲醇-氯化钠溶液(70+30)提取一次],以提取该层的杂色曲霉素。下层溶液合并后加30 mL 三氯甲烷(黄豆、花生试样除加三氯甲烷外,再加13 mL 氯化钠溶液,使甲醇与水的体积比为55+45),振摇2 min,静置。待上层混浊液有部分澄清时,即可将下层溶液经放有约10 g 无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于蒸发皿中。于分液漏斗中再加10 mL 三氯甲烷,重复提取一次,将该下层溶液和用少量三氯甲烷洗滤器的洗液一并放入蒸发皿中。将蒸发皿放置于65℃水浴上挥干,然后再在冰浴上放置2 min~3 min,加1.0 mL 苯将残留物充分混匀,置入小试管中。或将以上蒸发皿中残留物用三氯甲烷移于浓缩管中,于65℃用减压吹气法浓缩至干,加入1.0 mL 苯,供色谱测定,此1 mL 大米、玉米及小麦样液各相当于10 g 试样,1 mL 黄豆与花生样液则各相当于5 g 试样。

6.2 测定

6.2.1 薄层板的制备

制备方法同 GB/T 5009.22—2003 中 5.3.1.1,一般用5 g 硅胶 G 可制成10 cm×10 cm,厚度0.3 mm的薄层板五块。

6.2.2 点样

取两块10 cm×10 cm 薄层板,在距板下端各0.8 cm~1 cm 基线上滴加标准使用液与样液如下:距左边缘0.8 cm~1 cm 处各滴加10 μL 标准使用液(0.4 μg/mL),在距左边缘4 cm 处各滴加80 μL 样液(黄豆、花生试样为40 μL),然后在第二块板的样液点上加滴10 μL 标准使用液(0.4 μg/mL),在滴加样液时可用吹风机冷风边吹边加。

6.2.3 展开

6.2.3.1 横向展开:展开剂是乙醚-正己烷-苯-三氯甲烷-甲酸(3+9+1.5+1.5+0.6)15.6 mL(由于此混合液不成一相,每一展开槽的用量应单独配制)。用前充分摇匀,一并倒入槽内使用。将靠近标准点的一边,放入槽内展至9 cm 左右取出挥干。

6.2.3.2 纵向展开:展开剂为苯-甲醇-冰乙酸(90+8+2 或 92.5+6+1.5)15 mL。将靠近标准点与样液点的一边放入槽内,展开9 cm 左右取出挥干。

6.2.4 显荧光

在薄层板上喷三氯化铝-乙醇溶液(200 g/L),置80℃加热10 min,立即在紫外光灯(波长365 nm)下观察结果,待薄层板冷却后再薄薄地喷第二次(不需加热),可直接观察结果。

6.2.5 观察与评定结果

在紫外光灯下观察,若第二板的第二点在标准点的相应处出现最低检出量,而在第一板的相同位置上未出现荧光点,则试样中杂色曲霉素含量在5 μg/kg 以下(黄豆、花生试样为20 μg/kg 以下);若出现荧光点的强度与标准点的最低检出量的荧光强度相等,而且此荧光点又同第二板样液的标准点相重叠,则试样中杂色曲霉素含量为5 μg/kg(黄豆、花生试样为20 μg/kg);若出现荧光强度比标准点的最低检出量强,则根据其荧光强度估计减少滴加微升数,或将样液稀释后再滴加不同微升数,直至样液点的荧光强度与最低检出量的荧光强度一致为止。在喷三氯化铝第一、二次后分别进行观察评定,两次结果应一致。若结果为阳性,则将薄层板放暗处10 min,再观察一次,如试样仍为阳性,进一步作确证试验即在距薄层板(10 cm×18.5 cm)下端3 cm 的基线上滴加一个点的10 μL 标准使用液(0.4 μg/mL)与3个点的样液,每点16 μL。在样液的一个点上再加滴10 μL 标准使用液(0.4 μg/mL),另一点上再加滴10 μL 标准使用液(1 μg/mL)。于各点上再加一小滴三氟乙酸,放暗处反应10 min,热风吹5 min,使薄

层板上的温度不高于 40℃,用冰乙酸-苯(10+90)展开 1 次~2 次,直至杂色曲霉毒素衍生物与杂质分开为止。展开时要避光,以下显荧光步骤同 6.2.4。最后将板在紫外光灯下观察,如样液为阳性应产生与杂色曲霉毒素标准重叠的衍生物。确证法的最低检出量:大米、玉米、小麦为 25 μg/kg(黄豆、花生试样为 50 μg/kg)。

6.3 结果计算

杂色曲霉毒素的含量按式(1)进行计算。

$$X = 0.004 \times \frac{V_1 \times D}{V_2} \times \frac{1\,000}{m} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X ——杂色曲霉毒素含量,单位为微克每千克(μg/kg);

V_1 ——样液浓缩后体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——出现最低荧光样液的滴加体积,单位为毫升(mL);

D ——浓缩样液的总稀释倍数;

m ——浓缩样液中所相当的试样质量,单位为克(g);

0.004 ——杂色曲霉毒素的最低检出量,单位为微克(μg)。

结果表示到测定值的整数位。