

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1286—2007

花生黄曲霉毒素 B₁ 的测定 高效液相色谱法

Determination of Aflatoxin B₁ Content in Peanut-
High Performance Liquid Chromatography

2007-04-17 发布

2007-07-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：农业部油料及制品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人：李培武、张文、丁小霞、谢立华、陈小媚、李光明、陈洪。

花生黄曲霉毒素 B₁ 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了采用高效液相色谱法测定花生黄曲霉毒素 B₁ 含量的方法。

本标准适用于花生中黄曲霉毒素 B₁ 的测定。

本方法检出限为 1.0 μg/kg。

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 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB 6682 实验室用水规定(GB 6682—1992,eqv ISO 3696—1987)

3 原理

样品中黄曲霉毒素 B₁ 经提取、浓缩、衍生化,反相 C₁₈柱分离后,在激发波长 365 nm,荧光波长 440 nm 检测,外标法定量,计算样品黄曲霉毒素 B₁ 含量。

4 试剂

下列试剂除注明外均为分析纯,水为 GB 6682 规定的二级水。

4.1 甲醇,色谱纯。

4.2 乙腈,色谱纯。

4.3 甲醇溶液(含 4%氯化钠),称取 4 g 氯化钠(NaCl)溶于 70 mL 甲醇和 30 mL 水的混合溶液。

4.4 三氟乙酸。

4.5 石油醚(60℃~90℃)。

4.6 三氯甲烷。

4.7 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液,10 mg/L。

5 仪器设备

5.1 天平,感量 ±1 mg。

5.2 切片机。

5.3 粉碎机。

5.4 旋涡混合器。

5.5 超声波清洗器,功率不低于 50 W。

5.6 干热氮吹仪,控温精度 50℃ ±2℃。

5.7 中速定性滤纸。

5.8 烘箱,控温精度 50℃ ±2℃。

5.9 0.45 μm 有机相滤膜。

5.10 Nova-pak C₁₈色谱柱(3.9 mm×150 mm)。

5.11 液相色谱仪(带荧光检测器)。

6 取样

按 GB 5491 执行。

7 试样的制备

样品中的水分及挥发物含量超过 10% 时,在 45℃ 左右的条件下通风干燥。将干燥的花生样品在切片机中切片至 0.5 mm 左右,再经粉碎机粉碎,过 0.42 mm 筛。

8 分析步骤

8.1 提取

称取 20 g(精确至 10 mg)样品,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加 60 mL 甲醇溶液(4.3)。50℃ ± 2℃ 水浴超声提取 5 min(每隔 1 min 取出旋涡混合 1 次),过双层中速定性滤纸(5.7),收集滤液于小烧杯中,取滤液 10 mL 于试管 a 中,加入 5 mL 石油醚(4.5),旋涡混合 30 s,静置 2 min,待分层后,弃上层,取下层溶液 5 mL 于试管 b 中,加入 5 mL 三氯甲烷(4.6)至试管 b 中,旋涡混合 10 s,静置 2 min,取出上层于试管 c 中,再加入 5 mL 三氯甲烷(4.6)至试管 b 中,旋涡混合 10 s,静置 2 min,取上层。合并两次提取液于试管 c 中。

8.2 柱前衍生

将提取液置于干热氮吹仪(5.6)50℃ 恒温吹干,加入 200 μL 衍生试剂(4.4),盖好塞子,旋涡混合 30 s,50℃ 烘箱中衍生 5 min,置于干热氮吹仪(5.6)50℃ 恒温吹干,用 1 mL 流动相溶解,过有机相滤膜(5.9),滤液用液相色谱分析。

8.3 色谱分析

8.3.1 取黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液(4.7),用甲醇(4.1)稀释至 20 μg/L、40 μg/L、80 μg/L、160 μg/L、320 μg/L 标准使用液连同样品依次进样,进行液相色谱检测,建立工作曲线。

8.3.2 色谱条件:流动相:乙腈 + 甲醇 + 水 = 13 + 12 + 75,流速:0.8 mL/min,进样量 10 μL,柱温 30℃,检测器:EX:365 nm,EM:440 nm。

9 结果计算

试样中黄曲霉毒素 B₁ 含量以质量分数 W 计,单位以微克每千克表示(μg/kg),按公式(1)计算:

$$W = m_1 \times \frac{V_1 \times D}{V_2} \times \frac{1\,000 \times 1\,000}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

m_1 ——从工作曲线上计算出进样体积样品中黄曲霉毒素 B₁ 质量,单位为微克(μg);

V_1 ——加入流动相体积的数值,单位为毫升(mL);

V_2 ——进样体积,单位为微升(μL);

D ——样液的总稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

计算结果保留小数点后一位。

10 精密度

测定结果用算术平均值表示。两次平行测定结果的相对相差小于 10%。