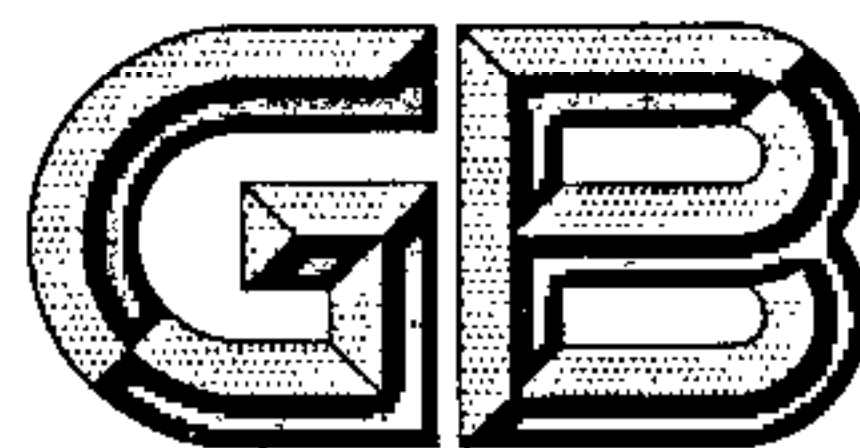




中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.189—2003
部分代替 GB 11675—1989

银耳中米酵菌酸的测定

Determination of bongkrekic acid in tremella
fuciformis berk

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准代替 GB 11675—1989《银耳卫生标准》中 5.1 米酵菌酸的测定。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由河南省食品卫生监督检验所、河南省南阳地区卫生防疫站负责起草。

本标准主要起草人：任中善、马军、赵国庆、张丁、韦喜亭。

引 言

米酵菌酸[bongkrekic acid(BA),即酵米面黄杆菌毒素 A(flavotoxin A)]是由椰毒假单胞菌(*pseudomonas cocovenenans*)产生的一种可以引起食物中毒的毒素。系统命名为:3-羧甲基-17-甲氧基-6,18,21-三甲基-廿二碳-2,4,8,12,14,18,20-七烯二酸。

银耳中米酵菌酸的测定

1 范围

本标准规定了银耳中米酵菌酸的测定方法。

本标准适用于银耳中米酵菌酸的测定。

薄层色谱测定法

2 原理

试样中的米酵菌酸经提取、净化及浓缩后,根据其在短波紫外光 GF₂₅₄ 硅胶薄层色谱上显示黑色点的最低检出量测定含量。

3 仪器

3.1 层析槽(内径长×宽×高,25 cm×6 cm×4 cm)。

3.2 GF₂₅₄ 硅胶薄层 50 mm×200 mm×0.3 mm),自制,经 110℃~115℃活化 2 h~3 h,置干燥器中可保存一周。

3.3 紫外线灯(波长 254 nm)。

3.4 紫外分光光度计。

4 试剂

本标准所用的试剂除特殊规定外,均为分析纯,水为蒸馏水或同等纯度的水,溶液为水溶液。

4.1 硅胶:GF₂₅₄ 层析用。

4.2 薄层色谱展开剂:石油醚-无水乙醚-冰乙酸[60+40+1.5]。

4.3 米酵菌酸标准溶液:称取米酵菌酸标准品,用甲醇配制成每毫升含有米酵菌酸 20 μg 供测定用,置于 4℃ 冰箱中避光保存。

4.4 甲醇。

4.5 冰乙酸。

4.6 石油醚,沸程 30℃~60℃。

4.7 无水乙醚。

4.8 三氯甲烷。

4.9 85 g/100 mL 磷酸。

4.10 40 g/L 碳酸氢钠水溶液。

4.11 6 mol/L 盐酸。

5 分析步骤

5.1 米酵菌酸的提取

干银耳试样经粉碎过 40 目筛后,称取 20 g,置具塞锥形瓶中,加入甲醇 20 mL,于室温中避光浸泡 1 h,然后再加入三氯甲烷 80 mL 和 85 g/100 mL 磷酸 0.2 mL,鲜银耳试样经剪碎、磨细及混匀后称取 10 g,加入甲醇 16 mL 于室温中避光浸泡 1 h,然后再加入三氯甲烷 64 mL 和 85 g/100 mL 的磷酸 0.16 mL;振荡 30 min,过滤,干银耳取滤液 50 mL,鲜银耳取滤液 40 mL。

将以上滤液移入分液漏斗中,加入与滤液体积相同的碳酸氢钠水溶液,振摇 2 min,静置分层,用带自动控制球吸管吸出上层于另一分液漏斗中,再用碳酸氢钠水溶液重复提取两次,每次 10 mL,轻摇,静置,将三次碳酸氢钠水层合并,加入三氯甲烷 25 mL,振摇 2 min,静置分层后弃去三氯甲烷层,于分液漏斗中慢慢滴入 6 mol/L 盐酸以调该溶液 pH 至 2~3,加入石油醚(沸程 30℃~60℃)50 mL(鲜银耳试样加 40 mL),振摇 3 min,静置分层,取出石油醚层于梨形瓶中,再重复用石油醚 30 mL 和 20 mL 各提取一次(鲜银耳试样两次均为 20 mL),将石油醚层并入同一瓶中,于 40℃水浴中减压吹气浓缩至干,用甲醇移至带 1 mL 刻度的浓缩管中,于 40℃用减压法浓缩至 0.2 mL 以下,并用少许甲醇洗管壁,继续浓缩至干,加甲醇 0.125 mL,将干物质溶解,混匀,作为样液以供薄层色谱测定用。

5.2 薄层色谱测定

以薄层板的短边为底边,距底边 3 cm 的基线上用微量注射器滴加 20 μg/mL 标准液 8 μL 与 10 μL 两个点,以及样液两个点,每点 10 μL(鲜银耳试样滴加 20 μL),在样液的一个点上再滴加 20 μg/mL 标准液 10 μL。用展开剂展开 16 cm,取出挥干。在 254 nm 紫外灯光下观察结果如下:

- a) 标准点应出现黑色点;
- b) 如样液点在标准点相应位置上未出现黑色点,则试样中米酵菌酸的含量在测定方法灵敏度 0.25 μg/g 以下;如在相应位置上有黑色点,而另一点中样液与标准液点重叠,则为阳性,根据样液黑点的强度估计减少滴加微升数,或经稀释后再滴入不同微升数,直至样液与标准色点的强度与面积一致为止。米酵菌酸的比移值为 0.22。

5.3 结果计算

见式(1)。

$$X = 0.2 \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1}{m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- X——米酵菌酸含量,单位为微克每克(μg/g);
 0.2——米酵菌酸的最低检出量,单位为微克(μg);
 V_1 ——加入甲醇溶解的体积,单位为毫升(mL);
 V_2 ——出现最低检出量时滴加样液的体积,单位为毫升(mL);
 D ——样液的总稀释倍数;
 m ——甲醇溶解时相当试样的质量,单位为克(g)。

5.4 确证试验

对含量高的试样可以进一步作确证试验;将剩余的阳性样液与空白甲醇液分别经薄层分离后,刮下并收集与米酵菌酸标准相应的色谱带与空白处硅胶。各加甲醇 4 mL,于室温中浸泡 1 h~2 h,混匀,离心,吸出上清液,以空白硅胶甲醇洗脱液作对照,用紫外分光光度计测定,应在 267 nm 和 236 nm 处有米酵菌酸的两个最高吸收峰。

高压液相色谱测定法

6 原理

试样中的米酵菌酸经提取、净化及浓缩后,根据在高压液相色谱上的出峰面积测定含量。

7 试剂

- 7.1 高压液相色谱洗脱剂:甲醇-水-冰乙酸[75+27+1.7],在配制前,所用试剂及水均需分别重蒸馏。
- 7.2 其他试剂同 4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、4.10、4.11。

8 仪器

- 8.1 高压液相色谱仪。
- 8.2 20 μL 试样环。
- 8.3 紫外检测器,调波长至 267 nm。
- 8.4 积分仪。
- 8.5 预柱 4.6 mm(ID)×5 cm,内装 C_{18} 硅胶,粒度直径为 10 μm 。
- 8.6 分析柱 Altex Ultrasphere TM-ODS,粒度直径为 5 μm ,4.6 mm(ID)×25 cm。

9 分析步骤

9.1 米酵菌酸的提取

同 5.1,但最后不用甲醇转移,直接于瓶内加入甲醇 0.5 mL,将干物质溶解,混匀,取出上清液经离心后,置小试管中,作为样液供高压液相色谱测定用。

9.2 高压液相色谱测定

高压液相色谱操作条件:流速 1.1 mL/min,纸速 0.5 cm/min,检定器灵敏度为将 10 $\mu\text{g/mL}$ 标准液 20 μL 调至满刻度的 70%~90%。在做高压液相色谱时,首先用洗脱液平衡分析柱,从进样口装置分别进入不同浓度的标准液与样液各 20 μL 。在米酵菌酸标准峰面积的直线范围内,将样液与标准的峰面积相比以求出试样中米酵菌酸的含量。米酵菌酸的保留时间为 17 min。

9.3 结果计算

见式(2)。

$$X = c \times \frac{A_1}{A_2} \times V \times D \times \frac{1}{m} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——米酵菌酸的含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$);

c ——米酵菌酸标准溶液的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

A_1 ——样液的峰面积;

A_2 ——米酵菌酸标准溶液的峰面积;

V ——加入甲醇溶解的体积,单位为毫升(mL);

D ——样液的总稀释倍数;

m ——甲醇溶解时相当试样的质量,单位为克(g)。

9.4 确证

如阳性试样还需用薄层色谱法中样液与标准液点重叠的方法确证。