

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—2019

印楝素乳油

Azadirachtin emulsifiable concentrate

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准使用重新起草法修改采用FAO specification 627/EC (May 2006)《印楝素乳油》(Azadirachtin emulsifiable concentrate)。

本标准与FAO specification 627/EC (May 2006)《印楝素乳油》(Azadirachtin emulsifiable concentrate)的主要技术差异及原因如下：

- 本标准增加了水分，指标项目更加全面，FAO规格未控制该项指标；
- FAO控制持久起泡性（1 min后无泡沫为合格），结合我国产品现实情况，本标准控制持久起泡性（1 min后泡沫量） ≤ 40 mL。
- FAO控制pH值范围5.0~7.0，结合我国产品现实情况，本标准控制pH值范围4.0~7.0。
- FAO控制热储后印楝素A质量分数不低于储前质量分数的75%，本标准控制热储后印楝素A质量分数不低于储前质量分数的95%，本指标高于FAO规格。

本标准由中华人民共和国农业农村部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业农村部农药检定所、浙江省农业科学院、成都绿金生物科技有限责任公司。

本标准主要起草人：

印楝素乳油

1 范围

本标准规定了印楝素乳油的要求、试验方法、验收和质量保证期以及标志、标签、包装、储运。
本标准适用于由符合标准的印楝素母药与乳化剂溶解在适宜溶剂中配制成的印楝素乳油。

注：本标准以印楝素A为有效成分，印楝素A的其他名称、结构式和基本物化参数参见附录A。

2 术语和定义

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 1600—2001 农药水分测定方法

GB/T 1601 农药 pH值的测定方法

GB/T 1603 农药乳液稳定性测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605—2001 商品农药采样方法

GB 3796 农药包装通则

GB 4838 农药乳油包装

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 8170—2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 19136—2003 农药热贮稳定性测定方法

GB/T 19137—2003 农药低温稳定性测定方法

GB/T 28137 农药持久起泡性测定方法

3 要求

3.1 外观

应为稳定的均相油状液体，无可见的悬浮物和沉淀。

3.2 技术指标

印楝素乳油还应符合表1要求。

表1 印楝素乳油控制项目指标

项 目	指 标	
	0.3%	0.5%
印楝素A质量分数/%	0.30 ^{+0.07} _{-0.07}	0.50 ^{+0.12} _{-0.12}
黄曲霉毒素（B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂ ）质量分数 ^{a、b} /μg/kg	≤	300
水分/%	≤	0.5
pH值范围		4.0~7.0
乳液稳定性（稀释200倍）		合格
持久起泡性（1 min后泡沫量）/mL	≤	40
低温稳定性 ^b		合格
热储稳定性 ^b		合格
^a 为占印楝素 A 实测含量的质量分数。 ^b 正常生产时，黄曲霉毒素质量分数、低温稳定性、热储稳定性试验每 3 个月至少测定一次。		

4 试验方法

安全提示：使用本标准的人员应有实验室工作的实践经验。本标准并未指出所有的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施，并保证符合国家有关法规的规定。

4.1 一般规定

本标准所用试剂和水在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和 GB/T 6682-2008中规定的三级水。检验结果的判定按 GB/T 8170—2008中的4.3.3进行。

4.2 抽样

按 GB/T 1605—2001 中5.3.2方法进行。用随机数表法确定抽样的包装件；最终抽样量应不少于800 mL。

4.3 鉴别试验

液相色谱法——本鉴别试验可与印楝素A质量分数的测定同时进行。在相同的色谱操作条件下，试样溶液中主色谱峰的保留时间与标样溶液中印楝素A的色谱峰的保留时间，其相对差值应在1.5%以内。

4.4 印楝素 A 质量分数的测定

4.4.1 方法提要

试样用甲醇溶解，以乙腈+水为流动相，使用 C₁₈为填料的不锈钢柱和紫外检测器，在波长214 nm 下对试样中的印楝素A进行反相高效液相色谱分离，外标法定量。

4.4.2 试剂和溶液

乙腈：色谱纯。

甲醇：色谱纯。

水：超纯水或新蒸二次蒸馏水。

印楝素标样：已知印楝素A质量分数， $\omega \geq 90.0\%$ 。

4.4.3 仪器

高效液相色谱仪：具有可变波长紫外检测器。

色谱柱：250 mm×4.6 mm (i.d.) 不锈钢柱，内装 C₁₈、5 μm 不锈钢柱 (或同等效果的色谱柱)。

过滤器：滤膜孔径约0.45 μm。

微量进样器：50 μL。

定量进样管：5 μL。

4.4.4 高效液相色谱操作条件

流动相： ψ (乙腈:水) =35:65，经滤膜过滤，并进行脱气。

流速：1.0 mL/min。

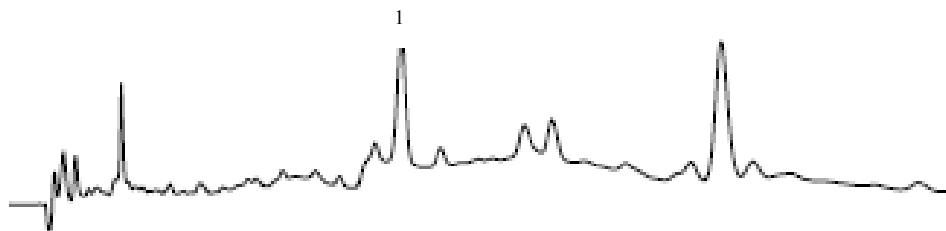
柱温：室温 (温度变化应不大于2 ℃)。

检测波长：214 nm。

进样体积：5 μL。

保留时间：印楝素A约13.2 min。

上述操作参数是典型的，可根据不同仪器特点对给定的操作参数作适当调整，以期获得最佳效果。典型的印楝素乳油高效液相色谱图见图1。



说明：

1——印楝素A。

图1 印楝素乳油的高效液相色谱图

4.4.5 测定步骤

4.4.5.1 标样溶液的制备

称取0.01 g (精确至0.000 01 g) 印楝素A标样于50 mL容量瓶中，用甲醇定容至刻度，摇匀。

4.4.5.2 试样溶液的制备

称取含0.01 g (精确至0.000 01 g) 印楝素A的试样于50 mL容量瓶中，用甲醇溶液定容至刻度，摇匀，过滤。

4.4.5.3 测定

在上述操作条件下，待仪器稳定后，连续注入数针标样溶液，直至相邻两针印楝素A峰面积相对变化小于2.0%后，按照标样溶液、试样溶液、试样溶液、标样溶液的顺序进行测定。

4.4.5.4 计算

将测得的两针试样溶液以及试样前后两针标样溶液中印楝素 A 峰面积分别进行平均。试样中印楝素 A 的质量分数按式 (1) 计算:

$$\omega_1 = \frac{A_2 \times m_1 \times \omega}{A_1 \times m_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ω_1 ——试样中印楝素A的质量分数,以%表示;

A_2 ——试样溶液中印楝素A峰面积的平均值;

m_1 ——标样的质量,单位为克(g);

ω ——标样溶液中印楝素A的质量分数,以%表示;

A_1 ——标样溶液中印楝素A峰面积的平均值;

m_2 ——试样的质量的数值,单位为克(g)。

4.4.6 允许差

印楝素A质量分数两次平行测定结果之差,0.3%乳油应不大于0.03%,0.5%乳油应不大于0.05%,取其算术平均值作为测定结果。

4.5 黄曲霉毒素(B₁+B₂+G₁+G₂)质量分数的测定

4.5.1 方法提要

试样中的黄曲霉毒素(B₁+B₂+G₁+G₂)用甲醇水溶液提取,提取液经免疫亲和柱净化,净化液经反相高效液相色谱分离,柱后衍生,荧光检测器检测,外标法定量。

4.5.2 试剂和溶液

4.5.2.1 试剂

乙腈:色谱纯。

甲醇:色谱纯。

水:新蒸二次蒸馏水或超纯水。

甲苯。

氯化钠。

十二水合磷酸氢二钠。

磷酸二氢钾。

氯化钾。

盐酸。

氢氧化钠。

溴化钾。

浓硝酸。

吐温20。

4.5.2.2 溶液配制

稀释溶剂:ψ(甲苯:乙腈)=98:2。

磷酸盐缓冲溶液（以下简称PBS）：称取8.0 g氯化钠、2.92 g十二水合磷酸氢二钠、0.2 g磷酸二氢钾、0.2 g氯化钾，用900 mL水溶解，用盐酸（0.1 mol/L）或氢氧化钠（0.1 mol/L）调节pH至7.4，用水定容至1000 mL。

提取溶剂： ψ （甲醇：水）=8:2。

吐温20溶液： ψ （吐温20：PBS）=1:9。

4.5.2.3 标准品

黄曲霉毒素 B₁ 标样：已知黄曲霉毒素 B₁ 质量分数， $\omega \geq 98.0\%$ 。

黄曲霉毒素 B₂ 标样：已知黄曲霉毒素 B₂ 质量分数， $\omega \geq 98.0\%$ 。

黄曲霉毒素 G₁ 标样：已知黄曲霉毒素 G₁ 质量分数， $\omega \geq 98.0\%$ 。

黄曲霉毒素 G₂ 标样：已知黄曲霉毒素 G₂ 质量分数， $\omega \geq 98.0\%$ 。

4.5.2.4 标准溶液配制

标准储备溶液：称取黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁和G₂标样各1 mg（精确至0.01 mg）分别置于100 mL容量瓶中，用稀释溶剂定容至刻度，配制黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁和G₂浓度均为10 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液。密封后在0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，1年内有效。

混合标准工作液：准确移取黄曲霉毒素B₁和G₁标准储备溶液各200 μL 、黄曲霉毒素G₂和B₂标准储备溶液各40 μL ，置于20 mL容量瓶中，用稀释溶剂稀释至刻度，配制黄曲霉毒素B₁和G₁浓度为100 ng/mL、黄曲霉毒素G₂和B₂浓度为20 ng/mL的混合标准工作液。密封后在0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，3个月内有效。

标准系列工作溶液：分别准确移取混合标准工作液 10 μL 、50 μL 、100 μL 、150 μL 、200 μL 、250 μL 、300 μL 于 10 mL 容量瓶中，用稀释溶剂稀释至刻度，配制黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、1.5 ng/mL、2.0 ng/mL、2.5 ng/mL、3.0 ng/mL，黄曲霉毒素 B₂ 和 G₂ 浓度为 0.02 ng/mL、0.10 ng/mL、0.20 ng/mL、0.30 ng/mL、0.40 ng/mL、0.50 ng/mL、0.60 ng/mL 的标准系列工作溶液。

4.5.3 仪器和设备

使用前用酸性溶液清洗所有与黄曲霉毒素水溶液接触的玻璃器皿，如用2 mol/L硫酸溶液浸泡几小时。用清水冲洗去除微量酸，用pH试纸检查是否含有酸残留。

玻璃器皿（容量瓶等）：A级。

免疫亲和柱：含有抗黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁和G₂的抗体。

固相萃取装置（带真空泵）。

一次性注射器：50 mL。

高效液相色谱仪：具有荧光检测器。

电化学柱后衍生器。

色谱柱：250 mm \times 4.6 mm (i.d.) 不锈钢柱，内装RP-C₁₈、5 μm 填充物（或具同等效果的色谱柱）。

过滤器：滤膜孔径约0.22 μm 。

微量进样器：500 μL 。

定量进样管：200 μL 。

4.5.4 高效液相色谱操作条件

流动相： ψ （水：乙腈：甲醇）=6:2:3，每升流动相中添加120 mg 溴化钾和350 μL 硝酸（4 mol/L），经滤膜过滤，并进行脱气。

流速：1.0 mL/min。

柱温：室温（温差变化应不大于2 $^{\circ}\text{C}$ ）。

电化学柱后衍生器：反应池工作电流 100 μA 。

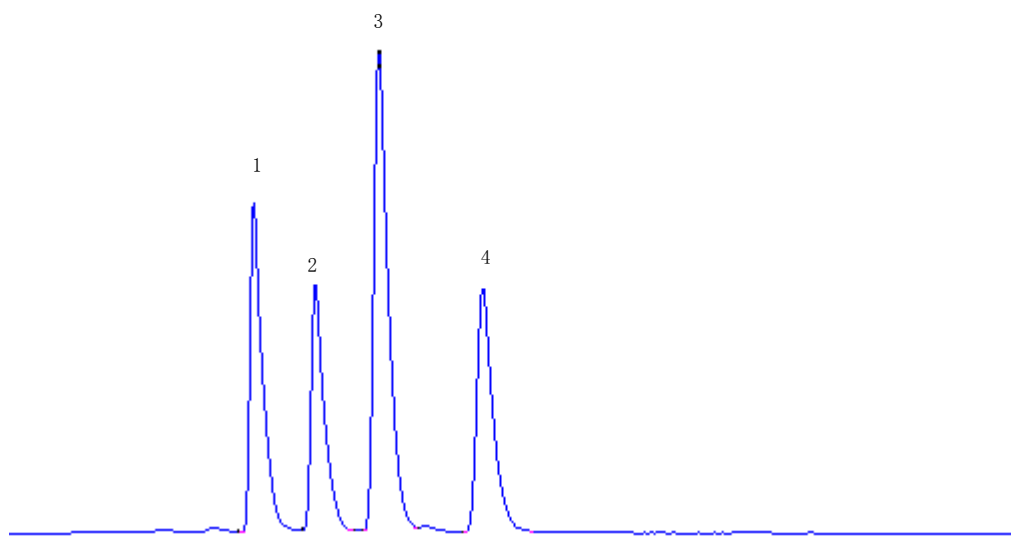
激发波长：360 nm。

发射波长：420 nm。

进样体积：200 μL 。

保留时间：黄曲霉毒素 G₂ 约 5.9 min，黄曲霉毒素 G₁ 约 7.4 min，黄曲霉毒素 B₂ 约 8.9 min，黄曲霉毒素 B₁ 约 11.3 min。

上述操作参数是典型的，可根据不同仪器进行调整，以期获得最佳效果，典型的黄曲霉毒素标样高效液相色谱图见图 2。



说明：

1——黄曲霉毒素G₂；

2——黄曲霉毒素G₁；

3——黄曲霉毒素B₂；

4——黄曲霉毒素B₁。

图2 黄曲霉毒素标样的高效液相色谱图

4.5.5 测定步骤

4.5.5.1 样品提取

称取5 g（精确至0.01 g）试样于100 mL（ V_1 ）容量瓶中，加入提取溶剂定容至刻度，摇匀。用移液管移取上述溶液10 mL（ V_2 ）于锥形瓶中，再用移液管加入40 mL吐温20溶液，摇匀，作为提取溶液。

4.5.5.2 净化

将免疫亲和柱连接于50 mL一次性注射器下端，放入固相萃取装置中。将提取溶液全部移入注射器筒中，调节压力使溶液以约3 mL/min的速度缓慢通过亲和柱。待溶液全部流出后，以水淋洗亲和柱3次，每次5 mL，用真空泵抽干亲和柱，弃去全部流出液。

用0.75 mL甲醇洗脱亲和柱，1 min后再加入0.75 mL甲醇重复洗脱，用真空泵抽干亲和柱，收集全部洗脱液至试管中。在50℃下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干，用流动相定容至1 mL（ V_3 ），过滤，作为待测溶液。

4.5.5.3 样品测定

4.5.5.3.1 标准曲线的制作

系列标准工作溶液由低到高浓度依次进样检测，以峰面积为纵坐标、浓度为横坐标作图，得到标准曲线回归方程。

4.5.5.3.2 试样溶液的测定

待测溶液中待测化合物的响应值应在标准曲线线性范围内，浓度超过线性范围的样品则应稀释后重新进样分析。

4.5.5.4 计算

试样中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 或 G₂ 的质量分数按式 (2) 计算：

$$X_i = \frac{c_i \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X_i ——试样中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 或 G₂ 的质量分数，单位为微克每千克 (μg/kg)；

c_i ——进样溶液中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 或 G₂ 按照外标法在标准曲线中对应的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

V_1 ——试样提取液的体积 ($V_1=100$ mL)，单位为毫升 (mL)；

V_3 ——样品经免疫亲和柱洗脱后的最终定容体积 ($V_3=1$ mL)，单位为毫升 (mL)；

m ——试样的称样量，单位为克 (g)；

V_2 ——用于免疫亲和柱的分取样品体积 ($V_2=10$ mL)，单位为毫升 (mL)。

试样中黄曲霉毒素 (B₁+B₂+G₁+G₂) 的质量分数按式 (3) 计算：

$$\omega_2 = \frac{\sum X_i}{\omega_1} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ω_2 ——试样中黄曲霉毒素 (B₁+B₂+G₁+G₂) 的质量分数，单位为微克每千克 (μg/kg)；

100——换算系数。

4.5.5.5 允许差

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 或 G₂ 的质量分数两次平行测定结果之差，应不大于算术平均值的 30%，取其算术平均值作为测定结果。

4.5.5.6 定量限

黄曲霉毒素 B₁ 的定量限为 0.2 μg/kg，黄曲霉毒素 B₂ 的定量限为 0.04 μg/kg，黄曲霉毒素 G₁ 的定量限为 0.2 μg/kg，黄曲霉毒素 G₂ 的定量限为 0.04 μg/kg。

4.6 水分的测定

按 GB/T 1600—2001 中 2.1 进行。

4.7 pH 值的测定

按 GB/T 1601 进行。

4.8 乳液稳定性试验

按 GB/T 1603 进行，稀释倍数为 200 倍。在量筒中无浮油（膏）、沉油和沉淀析出为合格。

4.9 低温稳定性试验

按 GB/T 19137—2003 中2.1进行，储后离心管底部离析物不超过0.3 mL合格。

4.10 热储稳定性试验

按 GB/T 19136—2003 中2.3进行。热储后，印楝素A质量分数应不低于储前的95%，pH值和乳液稳定性符合标准要求为合格。

5 验收和质量保证期

5.1 验收

应符合 GB/T 1604的规定。

5.2 质量保证期

在规定的储运条件下，印楝素乳油的保证期从生产日期起为2年。质量保证期内，各项指标均应符合标准要求。

6 标志、标签、包装、储运

6.1 标志、标签、包装

印楝素乳油的标志、标签和包装应符合 GB 3796和 GB 4838的规定。

印楝素液体乳油采用塑料桶和塑料瓶包装，每桶净重25 kg、50 kg或200 kg，每瓶净含量一般为100 g(mL)、500 g(mL)。纸箱或钙塑箱包装，每箱5 kg或10 kg，也可根据用户要求或订货协议采用其他形式的包装，但需符合 GB 3796和 GB 4838的规定。

6.2 储运

印楝素乳油包装件应储存在通风、干燥的库房中。储运时，严防潮湿和日晒，不得与食物、种子、饲料混放，避免与皮肤、眼睛接触，防止由口鼻吸入。

附 录 A

(资料性附录)

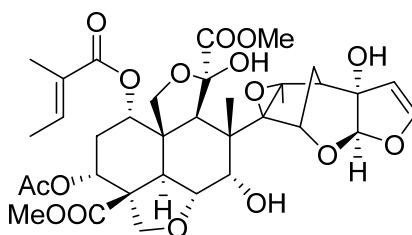
印楝素 A 及相关杂质黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的其它名称、结构式和基本物化参数

A.1 本产品有效成分印楝素A的其它名称、结构式和基本物化参数如下：

ISO通用名称：Azadirachtin A

CAS登录号：11141-17-6

结构式：



实验式：C₃₅H₄₄O₁₆

相对分子质量：720.7

生物活性：杀虫

熔点：161 °C

溶解度：水中 0.26 g/L，易溶于乙醇、乙酸乙酯、丙酮和三氯甲烷，不溶于正己烷

稳定性：避光条件下稳定，DT₅₀：50 d (pH 5，室温)，在高温、碱性和强酸性介质中快速分解

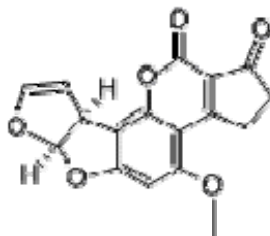
A.2 本产品中相关杂质黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的其它名称、结构式和基本物化参数

a) 黄曲霉毒素B₁

ISO通用名称：Aflatoxin B₁

CAS登录号：1162-65-8

结构式：



实验式：C₁₇H₁₂O₆

相对分子质量：312.27

熔点：268 °C~269 °C

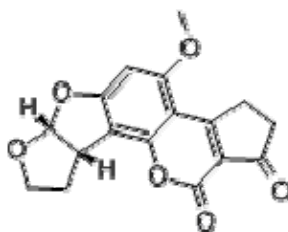
溶解度：能溶于多种极性有机溶剂，如氯仿、甲醇、乙醇、丙醇、乙二甲基酰胺，难溶于水，不溶于石油醚、乙醚和己烷

稳定性：一般在中性溶液中较稳定，但在强酸性溶液中稍有分解，在pH 9-10的强碱溶液中迅速分解，易被碱或强氧化剂破坏

b) 黄曲霉毒素B₂ISO通用名称: Aflatoxin B₂

CAS登录号: 7220-81-7

结构式:

实验式: C₁₇H₁₄O₆

相对分子质量: 314.29

熔点: 286 °C~289 °C

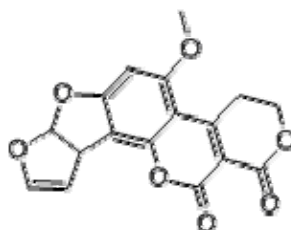
溶解度: 能溶于多种极性有机溶剂, 如氯仿、甲醇、乙醇、丙醇、乙二甲基酰胺, 难溶于水, 不溶于石油醚、乙醚和己烷

稳定性: 一般在中性溶液中较稳定, 但在强酸性溶液中稍有分解, 在pH 9-10的强碱溶液中迅速分解, 易被碱或强氧化剂破坏

c) 黄曲霉毒素G₁ISO通用名称: Aflatoxin G₁

CAS登录号: 1165-39-5

结构式:

实验式: C₁₇H₁₂O₇

相对分子质量: 328.27

熔点: 244 °C~246 °C

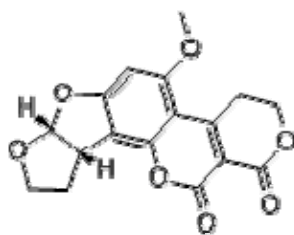
溶解度: 能溶于多种极性有机溶剂, 如氯仿、甲醇、乙醇、丙醇、乙二甲基酰胺, 难溶于水, 不溶于石油醚、乙醚和己烷

稳定性: 一般在中性溶液中较稳定, 但在强酸性溶液中稍有分解, 在pH 9-10的强碱溶液中迅速分解, 易被碱或强氧化剂破坏

d) 黄曲霉毒素G₂ISO通用名称: Aflatoxin G₂

CAS登录号: 7241-98-7

结构式:



实验式: $C_{17}H_{14}O_7$

相对分子质量: 330.29

熔点: $237\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 240\text{ }^{\circ}\text{C}$

溶解度: 能溶于多种极性有机溶剂, 如氯仿、甲醇、乙醇、丙醇、乙二甲基酰胺, 难溶于水, 不溶于石油醚、乙醚和己烷

稳定性: 一般在中性溶液中较稳定, 但在强酸性溶液中稍有分解, 在pH 9-10的强碱溶液中迅速分解, 易被碱或强氧化剂破坏

附录 B

(资料性附录)

黄曲霉毒素 (B₁+B₂+G₁+G₂) 质量分数的测定

黄曲霉毒素 (B₁+B₂+G₁+G₂) 质量分数的测定也可按照 GB 5009.22 《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》进行。
