

ICS

备案号:

DB34

安徽省地方标准

DB34/T 813—2008

饲料中黄曲霉毒素的测定 免疫亲和层析净化荧光光度法

2008-08-01 发布

2008-08-01 实施

安徽省质量技术监督局 发布

前 言

本标准由安徽省畜牧兽医局提出。

本标准由安徽省质量技术监督局批准。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所。

本标准主要起草人：张莉、丁在亮、刘红云、刘发全。

本标准自2008年8月1日首次发布。

饲料中黄曲霉毒素的测定

免疫亲和层析净化荧光光度法

1 范围

本标准规定了免疫亲和层析净化荧光光度法测定饲料中黄曲霉毒素的条件和详细分析步骤。

本标准适用于饲料中配合、浓缩饲料和单一饲料中黄曲霉毒素的测定。

免疫亲和层析净化荧光光度法测定黄曲霉毒素B₁+B₂+G₁+G₂总量，检出限为1μg/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/T 6682-1992 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1-1993 饲料采样方法

3 原理

试样经过甲醇+水提取，提取液经过滤、稀释后，滤液经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和层析净化，黄曲霉毒素交联在层析介质中的抗体上，此抗体对黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂具有专一性。用水将免疫亲和柱上杂质除去。以甲醇通过免疫亲和层析柱洗脱，加入溴溶液衍生，以提高测定灵敏度。洗脱液通过荧光光度计测定黄曲霉毒素(B₁+B₂+G₁+G₂)总量。

4 试剂和溶液

所有试剂除非另有规定，仅使用分析纯试剂、超纯水

4.1 甲醇(CH₃OH):色谱纯。

4.2 甲醇+水(7+3):取70 ml 甲醇加30 ml 水。

4.3 甲醇+水(8+2):取80 ml 甲醇加20 ml 水。

4.4 氯化钠(NaCl)。

4.5 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)。

4.6 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)。

4.7 氯化钾(KCl)。

4.8 溴溶液储备液(0.01%):称取适量溴，溶于水，配成0.01%的储备液，4℃避光保存。

4.9 溴溶液工作液(0.002%):取10ml 0.01%的溴溶液加入40ml 水混匀，于棕色瓶中保存备用。需每次使用前配制。

4.10 二水硫酸奎宁(C₂₀H₂₄N₂O₂·H₂SO₄·2H₂O)。

4.11 硫酸溶液(0.05mol/L):取2.8ml 浓硫酸，缓慢加入适量水中，冷却后定容至1000ml。

4.12 荧光光度计校准溶液:称取3.40g 硫酸奎宁(C₂₀H₂₄N₂O₂·H₂SO₄·2H₂O)用0.05mol/L 硫酸溶液稀释至100ml，此溶液荧光光度计读数相当于20 μg/L 黄曲霉毒素标准溶液。

5 仪器和设备

5.1 分析天平:0.01g。

- 5.2 荧光光度计。
- 5.3 高速均质器. 18000r/min~22000r/min。
- 5.4 黄曲霉毒素免疫亲和柱。
- 5.5 玻璃纤维滤纸:直径 11cm, 孔径 1.5 μ m。
- 5.6 玻璃注射器:10mL, 20mL。
- 5.7 玻璃试管:直径 12mm, 长 75mm, 无荧光特性。
- 5.8 移液管: 1mL、5mL、10mL。
- 5.9 空气压力泵。

6 试样制备

按GB/T 14699.1-1993 饲料采样方法采样, 选取有代表性的饲料样品, 至少500g, 四分法缩减至200g, 粉碎, 使全部通过1mm孔筛, 混匀, 贮于磨口瓶中低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 提取

准确称取经过磨细(粒度小于2mm)的试样25.0g于250mL具塞锥形瓶中, 加入5.0g氯化钠及甲醇+水(7+3)至125.0mL(V_1), 以均质器高速搅拌提取2 min。定量滤纸过滤, 准确移取15.00 mL(V_2)滤液并加入30.0mL(V_3)水稀释, 用玻璃纤维滤纸过滤1~2次, 至滤液澄清, 备用。

7.2 净化

将免疫亲和柱连接于20.0mL玻璃注射器下。准确移取15.00 mL(V_4)样品提取液注入玻璃注射器中, 将空气压力泵与玻璃注射器连接, 调节压力使溶液以约6 mL/min流速缓慢通过免疫亲和柱, 抽干。以10 mL水淋洗柱子两次, 弃去全部流出液, 抽干。准确加入1.00 mL(V)色谱级甲醇洗脱, 流速为1mL/min~2 mL/min, 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 供检测用。

7.3 荧光光度计校准

在激发波长360nm, 发射波长450nm 条件下, 以0.05m ol/L硫酸溶液为空白, 调节荧光光度计的读数值为0.0 μ g/L; 以荧光光度计校准溶液(4.12)调节荧光光度计的读数值为20.0 μ g/L。

7.4 样液测定

取上述净化后的甲醇洗脱液加入1.00mL 0.002%溴溶液, 混匀, 静置1min, 按7.3条件进行操作, 于荧光光度计中读取样液中黄曲霉毒素($B_1+B_2+G_1+G_2$)的浓度 c (μ g/L)。

7.5 空白试验

用水代替试样, 按7.1~7.4 步骤做空白试验。

8 结果计算

8.1 计算公式

$$X = \frac{(c_1 - c_0) \times v}{W}$$

其中

$$W = \frac{m \times V_2 \times V_4}{V_1 \times (V_2 + V_3)}$$

式中:

- X — 样品中黄曲霉毒素($B_1+B_2+G_1+G_2$)含量 (μ g/kg),
 c_1 — 试样中黄曲霉毒素($B_1+B_2+G_1+G_2$)的含量 (μ g/kg) ;

c_0 — 空白试验黄曲霉毒素(B1+B2+G1+G2)的含量 ($\mu\text{g/L}$);

V — 最终甲醇洗脱液体积 (mL);

W — 最终净化洗脱液所含的试样质量 (g);

m — 试样称取的质量的数值 (g);

V_1 — 样品和提取液总体积 (mL);

V_2 — 稀释用样品滤液体积 (mL);

V_3 — 稀释液体积 (mL);

V_4 — 通过亲和柱的样品提取液体积 (mL)。

8.2 结果表示

每个试样平行测定两次, 以其算术平均值作为结果。计算结果精确到 $0.1\mu\text{g/L}$ 。

9 允许误差

重复测定结果相对偏差不得超过20%。
