

DB37

山 东 省 地 方 标 准

DB37/T 2617—2014

饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定 高效液相色谱法

2014-10-13 发布

2014-11-10 实施

山东省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由山东省农业厅提出。

本标准由山东省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：山东省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所。

本标准主要起草人：滕葳、赵善仓、张树秋、郭长英、邓立刚、李增梅、王磊、柳琪、赵玉华。

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中黄曲霉毒素B₁的高效液相色谱检测法。

本标准适用于饲料中黄曲霉毒素B₁的测定。

本方法检测限为5 μg/kg。

2 规范性引用文件

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 6682 分析实验室用水规则和试验方法

3 原理

样品中黄曲霉毒素经溶液提取，黄曲霉毒素免疫亲和柱净化，供高效液相色谱（带荧光检测器）测定。

4 试剂与材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂。本标准所述溶液如未指明溶剂，均指水溶液。

4.1 水，GB/T 6682，一级。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 氯化钠。

4.5 甲醇+水（7+3）溶液：取 70 mL 甲醇加 30 mL 水。

4.6 柱后衍生液（0.05 %碘溶液）：称 0.1 g 碘，溶解于 20 mL 甲醇，加水定容至 200 mL，过 0.45 μm 滤膜，4 °C 避光保存。

4.7 黄曲霉毒素 B₁ 标准品：纯度 ≥99 %。

4.8 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液：用甲醇配制成 1 μg/mL 的标准储备液，于-4 °C 保存。

4.9 黄曲霉毒素 B₁ 标准工作液：准确移取适量储备液，用甲醇稀释成一系列标准工作液，现用现配。

4.10 免疫亲和柱：免疫亲和柱应含有黄曲霉毒素 B₁ 的抗体。亲和柱的最大容量不小于 100 ng 黄曲霉毒素 B₁。

4.11 滤膜：0.45 μm 滤膜。

5 仪器与设备

5.1 高效液相色谱仪，带荧光检测器和柱后衍生系统。

- 5.2 天平：感量 0.01 g。
- 5.3 高速均质机。
- 5.4 玻璃纤维滤纸。
- 5.5 漩涡混合器。
- 5.6 三角瓶：200 mL。
- 5.7 玻璃注射器：10.0 mL。
- 5.8 空气压力泵。
- 5.9 玻璃试管：直径 12 mm，长 75 mm，无荧光特征。

6 试样的制备

将饲料样品用粉碎机粉碎，过 0.85 mm 筛。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 15 g（准确至 0.01 g）样品于 200 mL 三角瓶（5.6）中，加入 5 g 氯化钠（4.3），再加入甲醇+水溶液（4.4）75 mL，用均质机高速搅拌提取 1 min，定量滤纸过滤。准确移取 10.0 mL 滤液，再加入 20.0 mL 水稀释，摇匀，用玻璃纤维滤纸过滤，待净化。

7.2 净化

将免疫亲和柱（4.9）连接于 10.0 mL 玻璃注射器（5.7）下。准确移取 10.0 mL 稀释后提取液注入注射器中，调节空气压力泵（5.8），控制试样以 2 mL/min~3 mL/min 稳定的流速过柱，然后取 10 mL 水淋洗亲和柱，弃去全部流出液，并使 2 mL~3 mL 空气通过柱体。准确加入 1.0 mL 甲醇（4.1）洗脱，流速为 1 mL/min~2 mL/min，收集全部洗脱液于玻璃试管（5.9）中。用流动相定容至 2 mL，于漩涡混合器（5.5）上震荡 1 min，过 0.45 μm 滤膜。供液相色谱测定。

7.3 测定条件

7.3.1 液相色谱参考条件

参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（4.6×250 mm，5 μm），或相当者；
- b) 激发波长：360 nm，发射波长：430 nm；
- c) 流动相：水：甲醇：乙腈=56：22：22；
- d) 柱温：35 ℃；
- e) 流速：0.7 mL/min；
- f) 进样量：10 μL；
- g) 柱后衍生液：0.05 % 碘液；
- h) 衍生液流速：0.3 mL/min；
- i) 反应管温度：70 ℃。

7.3.2 样品测定

按上述仪器条件，根据保留时间定性，外标法定量。黄曲霉毒素 B1 标准品色谱图见图 1。

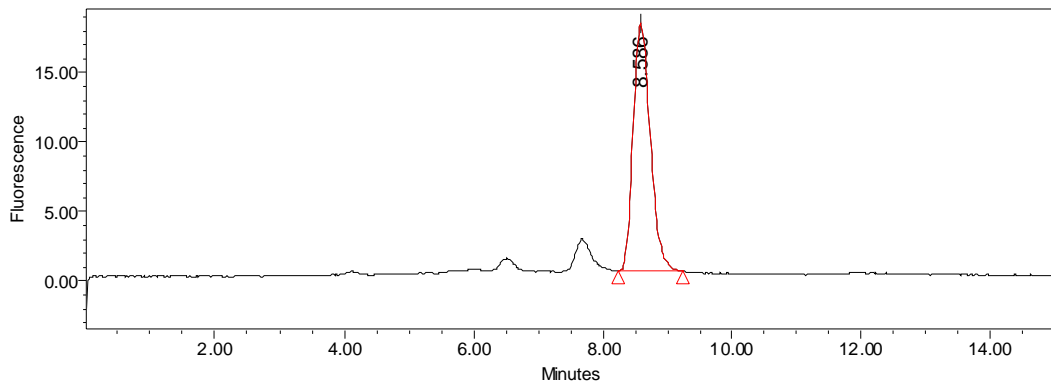


图1 黄曲霉毒素 B1 标准品色谱图

8 结果计算

按式（1）计算样品中黄曲霉毒素B1残留量，数值以毫克每千克（mg/kg）表示：

$$\omega = \frac{C_s \times A \times V}{m \times A_s} \times \frac{45}{2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω ——样品中黄曲霉毒素B1残留量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C_s ——标准溶液中相应黄曲霉毒素B1色谱峰的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

A ——试样溶液中相应黄曲霉毒素B1的峰面积；

A_s ——标准溶液中相应黄曲霉毒素的峰面积；

V ——洗脱所用甲醇的总体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）。

计算结果表示到二位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过两次测定平均值的15 %。