

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2548—2014

饲料中黄曲霉毒素B₁的测定 时间分辨 荧光免疫层析法

Determination of aflatoxin B₁ in feed—Time-resolved fluorescent
immunochromatographic method

2014-03-24 发布

2014-06-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院油料作物研究所、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、丁小霞、唐晓倩、张奇、张文、王督、姜俊、周海燕、张兆威。

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 时间分辨荧光免疫层析法

1 范围

本标准规定了时间分辨荧光免疫层析法测定饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的方法。

本标准适用于饲料和饲料原料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定。

本标准黄曲霉毒素 B₁ 检出限为 0.30 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 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样中黄曲霉毒素 B₁ 与钨乳胶标记的特异性抗体发生结合后,抑制了层析过程中抗体与硝酸纤维素膜检测线上黄曲霉毒素 B₁-BSA 偶联物的免疫反应,使检测线时间分辨荧光强度降低,通过检测时间分辨荧光强度变化进行定量测定。

4 试剂

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水,按照 GB/T 6682 中的要求,二级。

4.2 甲醇(CH₃OH)。

4.3 蔗糖(C₁₂H₂₂O₁₁)。

4.4 牛血清白蛋白(BSA),纯度大于 98%。

4.5 吐温-20(C₅₈H₁₁₄O₂₆)。

4.6 70%甲醇溶液:取 70 mL 甲醇(4.2),加 30 mL 水(4.1),混匀。

4.7 样品稀释液:取 1.0 g 蔗糖(4.3)、0.5 g 牛血清白蛋白(4.4)和 2.5 g 吐温-20(4.5),溶解于 100.0 mL 水(4.1)中。

4.8 钨标记黄曲霉毒素 B₁ 抗体溶液:黄曲霉毒素 B₁ 抗体纯度 80%以上,亲和力常数不低于 1.00×10⁸ L/mol。黄曲霉毒素 B₁ 抗体与黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 交叉反应率小于 10%。

4.9 1 000 ng/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液。

4.10 100 ng/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液:准确吸取黄曲霉毒素标准溶液(4.9)1 mL 于 10 mL 容量瓶中,甲醇定容。4℃可保存 3 个月。

警告:

由于黄曲霉毒素毒性很强,试验人员应注意自我保护。操作时,应避免吸入、接触黄曲霉毒素标准溶液。标准溶液配置应在通风橱内进行,工作时应戴眼镜、穿工作服、戴医用乳胶手套。凡接触黄曲霉毒素的容器,需浸入 10%次氯酸钠溶液 12h 以上。同时,为了降低接触黄曲霉毒素的机会,本标准鼓励直接购买并使用黄曲霉毒素的有证标准储备液。

5 仪器设备与材料

5.1 时间分辨荧光检测仪:能在激发波长为(365±5) nm,检测波长为(615±5) nm 条件下测定。

5.2 黄曲霉毒素时间分辨荧光免疫层析装置(图1):固定有黄曲霉毒素—BSA 偶联物,检测灵敏度不低于 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$,用于样品中黄曲霉毒素与镧标记抗体预反应后再与黄曲霉毒素—BSA 偶联物反应的载体。

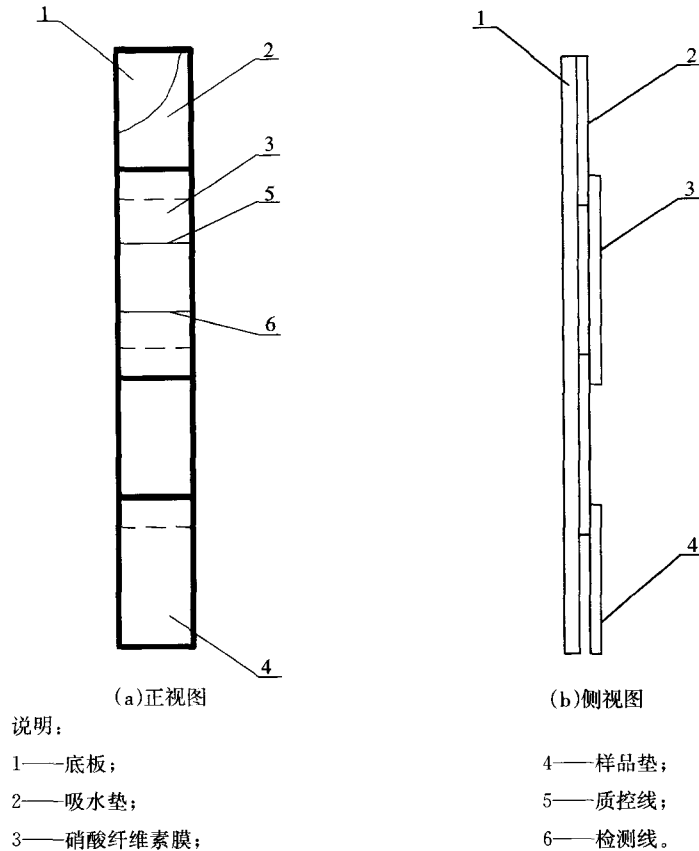


图1 黄曲霉毒素免疫层析装置示意图

- 5.2.1 黄曲霉毒素—BSA 偶联率为(1:5)~(1:20)(BSA:AFB₁)。
- 5.2.2 样品垫:玻璃纤维、聚酯纤维或纸质薄片。
- 5.2.3 硝酸纤维素膜:4 cm 毛细时间不小于 135 s。
- 5.2.4 吸水纸。
- 5.2.5 底板。
- 5.2.6 连接胶带。
- 5.3 均质机,转速大于等于 20 000 r/min。
- 5.4 分析天平:感量 0.1 g。
- 5.5 分样筛,20 目。
- 5.6 恒温装置:温控范围为(37.0±2.0)℃。
- 5.7 漩涡混合器。
- 5.8 微量移液器:1 μL~10 μL,10 μL~100 μL,100 μL~1 000 μL。
- 5.9 中速定性滤纸。
- 5.10 净化柱:3 mL 硅胶 SPE 柱。
- 5.11 镧乳胶:荧光寿命≥600 μs。

6 分析步骤

- 6.1 试样制备:样品粉碎至全部通过分样筛(5.5),充分混合。
- 6.2 准确称取 25.0 g 试样于烧杯中,加入 100 mL 甲醇溶液(4.6),用均质机(5.3)在 20 000 r/min 条件下提取 2 min 后,静置 1 min,中速定性滤纸(5.9)过滤,收集滤液。
- 6.3 取 2.0 mL 滤液过净化柱(5.10),收集净化液。用样品稀释液(4.7)将净化液稀释至黄曲霉毒素时间分辨荧光免疫层析装置(5.2)检测范围内,漩涡混合器(5.7)混匀,备用。
- 6.4 取 150 μ L 钨标记黄曲霉毒素 B₁ 抗体溶液于 1.5 mL 样品瓶中,备用。
- 6.5 取稀释后的净化液(6.3)200 μ L,垂直滴加于样品瓶内(6.4),漩涡混合。取出黄曲霉毒素免疫层析检测装置(5.2),按箭头方向插入加样后的样品瓶中,于恒温装置(5.6)中反应 8 min,取出黄曲霉毒素免疫层析检测装置(5.2),在激发波长 365 nm,检测波长 615 nm 条件下上机(5.1)检测。
- 6.6 标准曲线。
- 6.6.1 空白基质溶液制备:取阴性样品,按 6.1 制备空白基质溶液,备用。
- 6.6.2 分别准确吸取黄曲霉毒素标准 B₁ 标准储备液(4.10)0.000 mL、0.001 mL、0.005 mL、0.010 mL、0.020 mL、0.050 mL、0.100 mL、0.150 mL 于 10 mL 容量瓶中,用空白基质溶液(6.6.1)定容,分别相当于 0.00 ng/mL、0.05 ng/mL、0.10 ng/mL、0.20 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL、1.50 ng/mL 浓度标准工作溶液。由低浓度到高浓度进行检测(6.5),根据检测线 T 信号值与质控线 C 信号值的比值(T/C)和标准工作溶液浓度的自然对数值(ln*c*)建立标准曲线。

7 结果计算

试样中黄曲霉毒素 B₁ 含量以质量分数 *X* 计,数值以微克每千克(μ g/kg)表示,按式(1)计算。

$$X = \frac{\rho \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——从标准曲线上查得的测定液中黄曲霉毒素 B₁ 含量的数值,单位为纳克每毫升(μ g/mL);

V——样品测定液体积的数值,单位为毫升(mL);

n——试样稀释倍数的数值;

m——试样质量的数值,单位为克(g)。

计算结果保留至小数点后两位。

8 精密度

8.1 重复性

在重复性条件下,黄曲霉毒素含量不大于 10.0 μ g/kg 时,两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%;黄曲霉毒素含量大于 10.0 μ g/kg 时,两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

8.2 再现性

在再现性条件下,黄曲霉毒素含量不大于 10.0 μ g/kg 时,两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 30%;黄曲霉毒素含量大于 10.0 μ g/kg 时,两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。