

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2549—2014

饲料中黄曲霉毒素B₁的测定 免疫亲和荧光光度法

Determination of aflatoxin B₁ in feed—
Immunoaffinity fluorescence 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、张文、胡小风、丁小霞、张奇、周海燕、陈小媚、唐晓倩、张兆威、王督。

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 免疫亲和荧光光度法

1 范围

本标准规定了免疫亲和荧光光度法测定饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的方法。

本标准适用于饲料及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 0.3 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 与免疫亲和柱中固定相上抗体发生特异性结合,其他与抗体不发生免疫亲和反应的成分随流动相流出,利用甲醇使固定相上抗体变性,将固定相上抗体结合的黄曲霉毒素 B₁ 洗脱,荧光定量检测。

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 氯化汞(HgCl₂)。

4.3 硫酸奎宁(C₂₀H₂₆N₂O₆S)。

4.4 甲醇(CH₃OH)。

4.5 浓硫酸(H₂SO₄)。

4.6 70%甲醇溶液:取 70 mL 甲醇(4.4),加 30 mL 水(4.1),混匀。

4.7 黄曲霉毒素 B₁ 荧光增强剂:准确称取 2.72 g 氯化汞(4.2),溶于水中,定容至 1.0 L。

4.8 1 000 ng/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液。

4.9 100 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(4.8)1 mL 于 10 mL 容量瓶中,加甲醇定容。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 12 h 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。

4.10 黄曲霉毒素 B₁ 标准工作液:分别准确吸取黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液(4.9)0.00 mL、0.01 mL、0.05 mL、0.25 mL、0.50 mL、1.00 mL、3.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,甲醇定容,分别相当于 0.0 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、30.0 ng/mL 浓度标准工作溶液。

4.11 黄曲霉毒素 B₁ 免疫亲和微柱:柱容量≥30 ng, AFB₁ 免疫亲和柱与其他种类黄曲霉毒素的交叉反应率均≤10%。

5 仪器设备

- 5.1 黄曲霉毒素荧光速测仪或荧光光度计:能在激发波长为(360±5) nm,检测波长为(440±5) nm 条件下测定。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 g。
- 5.3 均质机:转速大于等于 20 000 r/min。
- 5.4 漩涡混合器。
- 5.5 恒温装置:(37.0±2.0)℃。
- 5.6 微量移液器:10 μL~100 μL,100 μL~1 000 μL。
- 5.7 中速定性滤纸。
- 5.8 玻璃纤维滤纸。
- 5.9 泵流操作架或固相萃取装置。
- 5.10 分样筛:20 目。

6 分析步骤

6.1 试样制备

样品粉碎至全部通过分样筛(5.10),充分混合。

6.2 提取

准确称取 25.0 g 试样于烧杯中,加入 100.0 mL 甲醇溶液(4.6),用均质机(5.3)20 000 r/min 提取 2 min 后,静置 1 min,中速定性滤纸(5.7)过滤。取 10 mL 滤液,用 20 mL 水稀释,漩涡混合器(5.4)混匀,经玻璃纤维滤纸(5.8)过滤,备用。

6.3 纯化

将黄曲霉毒素 B₁ 免疫亲和微柱(4.11)与泵流操作架或固相萃取装置(5.9)连接,加入 10.0 mL 纯水平衡微柱,当微柱中仅余少量液体时,加入 10.0 mL 稀释后的提取液(6.2),流速为 1.5 mL/min 通过微柱;取 10.0 mL 水分两次淋洗,微柱中液体被抽干时,停止抽滤,弃去全部流出液。加 1.0 mL 甲醇(4.4)于微柱中,流速为 1 mL/min,抽滤至微柱中液体全部流出,收集全部洗脱液于比色杯(光径为 1 cm),加入 1.0 mL 纯水,混匀待测。

6.4 标准曲线

将配制好的黄曲霉毒素 B₁ 的标准工作液(4.10),在黄曲霉毒素荧光速测仪或荧光光度计(5.1)上,激发波长 360 nm、检测波长 440 nm 条件下测量本底荧光值,再加入 0.2 mL 的荧光增强剂(4.7),再次测量荧光值。将增强后的荧光值与本底荧光值的差值与黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液浓度建立标准曲线。

6.5 黄曲霉毒素含量测定

采用黄曲霉毒素荧光速测仪或荧光光度计(5.1)在激发波长 360 nm、检测波长 440 nm 条件下测定待测液的荧光值,然后向比色杯中加入黄曲霉毒素 B₁ 荧光增强剂(4.7)0.2 mL 混匀后,再次测定其荧光值,将增强后的荧光值与本底荧光值代入标准曲线,计算得到测定液中黄曲霉毒素 B₁ 含量。如样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量超过标准曲线范围,则需稀释后再次测量。

7 结果计算与表示

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($\mu\text{g}/\text{kg}$)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(ng/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)。

计算结果保留到小数点后一位。

8 精密度

8.1 重复性

在重复性条件下,黄曲霉毒素 B₁ 含量不大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 B₁ 含量大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 B₁ 含量不大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 B₁ 含量大于 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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%。
