

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2550—2014

饲料中黄曲霉毒素B₁的测定 胶体金法

Determination of aflatoxin B₁ in feed—Colloid gold 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、姜俊、张奇、丁小霞、张文、张兆威、王督、唐晓倩。

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 胶体金法

1 范围

本标准规定了胶体金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 测定。

本标准黄曲霉毒素 B₁ 检出限为 1.0 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 在层析过程中与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制了抗体和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,使检测线颜色变浅,通过检测颜色变化进行测定。

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 蔗糖(C₁₂H₂₂O₁₁)。
- 4.3 牛血清白蛋白(BSA),纯度大于 98%。
- 4.4 吐温-20(C₅₈H₁₁₄O₂₆)。
- 4.5 甲醇(CH₃OH)。
- 4.6 70%甲醇溶液:取 70.0 mL 甲醇(4.5),加水(4.1)30.0 mL,混匀。
- 4.7 样品稀释液:取 1.0 g 蔗糖(4.2)、0.5 g 牛血清白蛋白(4.3)和 2.5 g 吐温-20(4.4)溶解于 100.0 mL 水(4.1)中。
- 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 B₁ 标准溶液(4.8)1.0 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 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。

5 仪器设备

- 5.1 光谱成像检测仪或胶体金免疫层析检测仪:图像分辨率优于 2 048×1 532 dpi。
- 5.2 分析天平:感量 0.1 g。
- 5.3 分样筛:20 目。
- 5.4 均质机,转速大于等于 20 000 r/min。

- 5.5 漩涡混合器。
- 5.6 恒温装置： $(37.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ 。
- 5.7 微量移液器： $1 \mu\text{L} \sim 10 \mu\text{L}$ ， $10 \mu\text{L} \sim 100 \mu\text{L}$ ， $100 \mu\text{L} \sim 1\,000 \mu\text{L}$ 。
- 5.8 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析装置(图 1)：固定黄曲霉毒素 B₁ - BSA 偶联物，检测灵敏度不低于 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，用于样品中黄曲霉毒素及黄曲霉毒素 B₁ - BSA 偶联物与胶体金标记抗体反应的载体。

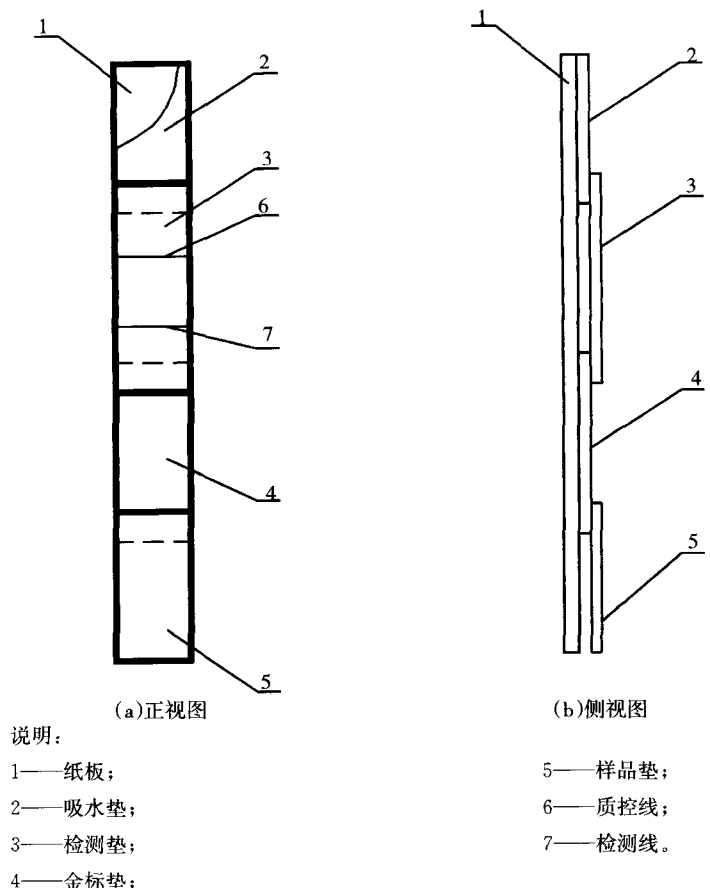


图 1 黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析装置

- 5.8.1 黄曲霉毒素 B₁ - BSA 偶联率为 $(1 : 5) \sim (1 : 20)$ (BSA : AFB₁)。
- 5.8.2 样品垫：玻璃纤维、聚酯纤维或纸质薄片。
- 5.8.3 硝酸纤维素膜：4 cm 毛细时间不小于 135 s。
- 5.8.4 金标垫：附着有 $5 \mu\text{L}$ 胶体金标记的黄曲霉毒素 B₁ 抗体。
- 5.8.5 吸水纸。
- 5.8.6 底板。
- 5.8.7 连接胶带。
- 5.9 中速定性滤纸。
- 5.10 净化柱：3 mL 硅胶 SPE 柱。

6 分析步骤

6.1 试样制备

样品粉碎至全部通过分样筛(5.3)，充分混合。

6.2 前处理和空白基质溶液制备

6.2.1 前处理

准确称取 25.0 g 试样置于烧杯中,准确加入 100 mL 甲醇溶液(4.6),用均质机(5.4)在 20 000 r/min 条件下提取 2 min,静置 1 min,中速定性滤纸(5.9)过滤,收集滤液,取 2.0 mL 滤液过净化柱(5.10),收集净化液。用稀释液(4.7)稀释净化液至黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析装置(5.8)检测范围内,漩涡混合器(5.5)混匀,备用。

6.2.2 空白基质溶液制备:取阴性样品,按 6.2.1 制备空白基质溶液,备用。

6.3 取 100 μL 稀释后的净化液(6.2.1)加入于黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析装置(5.8)内,恒温装置(5.6)中反应 10 min。

6.4 上机(5.1)检测。

6.5 标准曲线

分别准确吸取黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液(4.9)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(6.1.2)定容,分别相当于 0.00 ng/mL、0.01 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。由低到高浓度进行(6.3、6.4)检测,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对数值(logc)建立黄曲霉毒素 B₁ 标准曲线。

7 结果计算

7.1 胶体金免疫层析装置有效确认

黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析装置质控线出现红色条带,视为胶体金免疫层析装置有效,可用目测法或光谱成像检测仪或胶体金免疫层析检测仪(5.1)测定结果;如果胶体金免疫层析装置质控线不出现红色条带、弥散或严重不均匀,视为胶体金免疫层析装置失效,需重新检测。

7.2 目测法

黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析装置中检测线出现红色条带,表示样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量小于其限量值,判定为阴性;黄曲霉毒素胶体金免疫层析装置中检测线未出现红色条带,表示样品中黄曲霉毒素 B₁ 含量大于其限量值,判定为阳性。

7.3 仪器法结果计算与表示

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(μg/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

采用仪器法测定,在重复性条件下,黄曲霉毒素 B₁ 含量不大于 10.0 μg/kg 时,两次独立测定结果的相对相差不超过 20%;黄曲霉毒素 B₁ 含量大于 10.0 μg/kg 时,两次独立测定结果的相对相差不超过 15%。

8.2 再现性

采用仪器法测定,在再现性条件下,黄曲霉毒素 B₁ 含量不大于 10.0 μg/kg 时,两次独立测定结果的相对相差不得超过 30%;黄曲霉毒素 B₁ 含量大于 10.0 μg/kg 时,两次独立测定结果的相对相差不得超过 20%。
