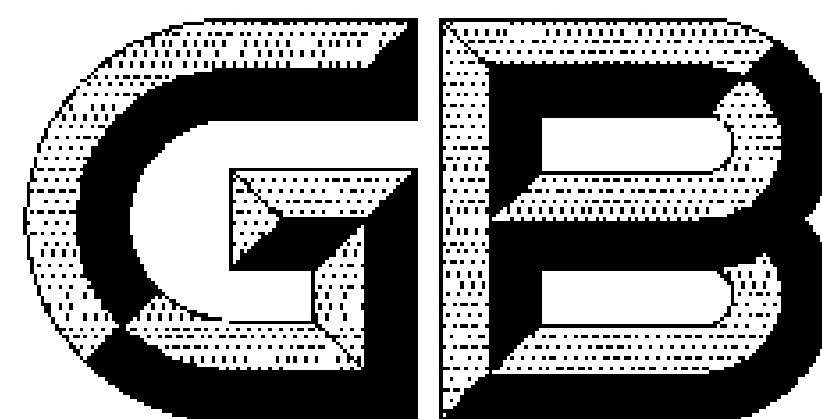




中华人民共和国国家标准

GB/T 30955—2014

饲料中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

Determination of aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 content in feeds—
High performance liquid chromatography with immunoaffinity column clean-up

2014-07-08 发布

2015-01-10 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位：浙江大学饲料科学研究所、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]、北京中检维康技术有限公司。

本标准主要起草人：余东游、饶正华、李卫芬、李兰、王雄、果旗、梁权。

饲料中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定 免疫亲和柱净化-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、B₂、G₁、G₂ 的免疫亲和层析净化-高效液相色谱法的测定方法。

本标准适用于饲料中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定。

本标准的检测限：黄曲霉毒素 B₁ 为 0.2 μg/kg，黄曲霉毒素 B₂ 为 0.2 μg/kg，黄曲霉毒素 G₁ 为 0.3 μg/kg，黄曲霉毒素 G₂ 为 0.3 μg/kg。

本标准的定量限：黄曲霉毒素 B₁ 为 1.0 μg/kg，黄曲霉毒素 B₂ 为 1.0 μg/kg，黄曲霉毒素 G₁ 为 1.0 μg/kg，黄曲霉毒素 G₂ 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

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样经过甲醇-水提取后，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柱层析净化，经高效液相色谱仪分离，荧光检测器柱后光化学衍生测定黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的含量。

4 试剂

除非另有说明，均为分析纯的试剂；实验室用水符合 GB/T 6682 中二级用水规定，标准溶液和流动相用水符合一级用水规定。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 苯：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲醇+水(8+2)：取 80 mL 甲醇(4.1)加 20 mL 水，混合均匀。

4.5 甲醇+水(45+55)：取 45 mL 甲醇(4.1)加 55 mL 水，混合均匀。

4.6 苯+乙腈(98+2)：取 2 mL 乙腈(4.3)加入 98 mL 苯(4.2)，混合均匀。

4.7 黄曲霉毒素标准储备溶液：用苯+乙腈(98+2)溶液(4.6)分别配制 0.100 mg/mL 的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准储备液，保存于 4℃ 备用，可使用 1 年。

4.8 黄曲霉毒素混合标准工作液：准确移取适量的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准储备溶液(4.7)，

50℃下,氮气吹干仪吹干,用适量的甲醇+水(45+55)溶液(4.5)定容为混合标准工作液,黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 各分别为0 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL。

4.9 PBS缓冲溶液:称取8.0 g氯化钠,1.2 g磷酸氢二钠,0.2 g磷酸二氢钾,0.2 g氯化钾,用990 mL纯水溶解,然后用浓盐酸调节pH值至7.0,最后用纯水稀释至1 000 mL。

4.10 次氯酸钠。

5 仪器和设备

实验室常规仪器、设备、材料及下列各项。

5.1 高速均质器,18 000 r/min~22 000 r/min,或震荡器。

5.2 黄曲霉毒素免疫亲和柱,柱容量 ≥ 300 ng。

5.3 玻璃纤维滤纸,直径11 cm,孔径1.5 μ m。

5.4 玻璃定量管,10 mL。

5.5 氮吹仪,50℃。

5.6 光化学衍生系统。

5.7 高效液相色谱仪,带荧光检测器。

6 试样采集与制备

按GB/T 14699.1采样;按GB/T 20195用四分法缩减至500 g,粉碎后过1 mm孔径的分析筛,混匀后装入密闭容器,冷藏保存。

7 分析步骤

7.1 提取

称取试样(粒度小于1 mm)50.0 g于250 mL具塞锥形瓶中,加入5.0 g氯化钠及准确加入100.0 mL(V_1)甲醇+水(8+2)溶液(4.4),以均质器高速搅拌提取2 min,或震荡器震荡30 min。定量滤纸过滤,准确移取10.0 mL(V_2)滤液并加入40.0 mL(V_3)PBS缓冲溶液(4.9)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10.0 mL玻璃定量管下。准确移取10.0 mL(V_4)样品提取液注入玻璃定量管中,将空气压力泵与玻璃定量管连接,调节压力使溶液以不超过2 mL/min流速缓慢通过免疫亲和柱,待溶液全部流出后,以10.0 mL纯水清洗柱子2次,弃去全部流出液。准确加入1.0 mL(V)甲醇(4.1)洗脱,流速不超过1 mL/min,收集全部洗脱液于玻璃试管中,加纯水定容为2.0 mL,供色谱检测用。

7.3 测定

7.3.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,长150 mm,内径4.6 mm,填料直径5 μ m,或相当者。

流动相:甲醇+水(45+55)溶液(4.5)。

流速:0.8 mL/min。

检测波长:激发波长360 nm;发射波长440 nm。

光化学衍生系统。

柱温:30℃。

进样量:20 μL。

7.3.2 色谱测定

分别取相同体积样液和标准工作溶液注入高效液相色谱仪,在上述色谱条件下测定试样的响应值(峰高或峰面积)。经过与黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准溶液谱图比较响应值得到试样中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的浓度 c (μg/L)。标准品色谱图参见附录 A。

警告——黄曲霉毒素是高致癌性物质,应十分小心处理。使用过的玻璃容器及黄曲霉毒素溶液用 5% 浓度次氯酸钠溶液浸泡过夜。

8 结果计算与表述

8.1 结果计算

试样中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 含量以质量分数 X_i 计,单位为微克每千克(μg/kg),按式(1)计算:

$$X_i = \frac{P_i \times V_i \times c_i \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \times 10^3 \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

P_i ——试样溶液中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 各组分的峰面积值;

V_i ——样品的总稀释体积,单位为毫升(mL);

c_i ——黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 各标准溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V_{st} ——标准溶液的进样体积(μL);

P_{st} ——黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 各标准溶液峰面积平均值;

m ——试样质量,单位为克(g)。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果表示到小数点后一位。

9 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的 15%。

附录 A
(资料性附录)
标准品色谱图

黄曲霉毒素标准溶液色谱图见图 A.1。

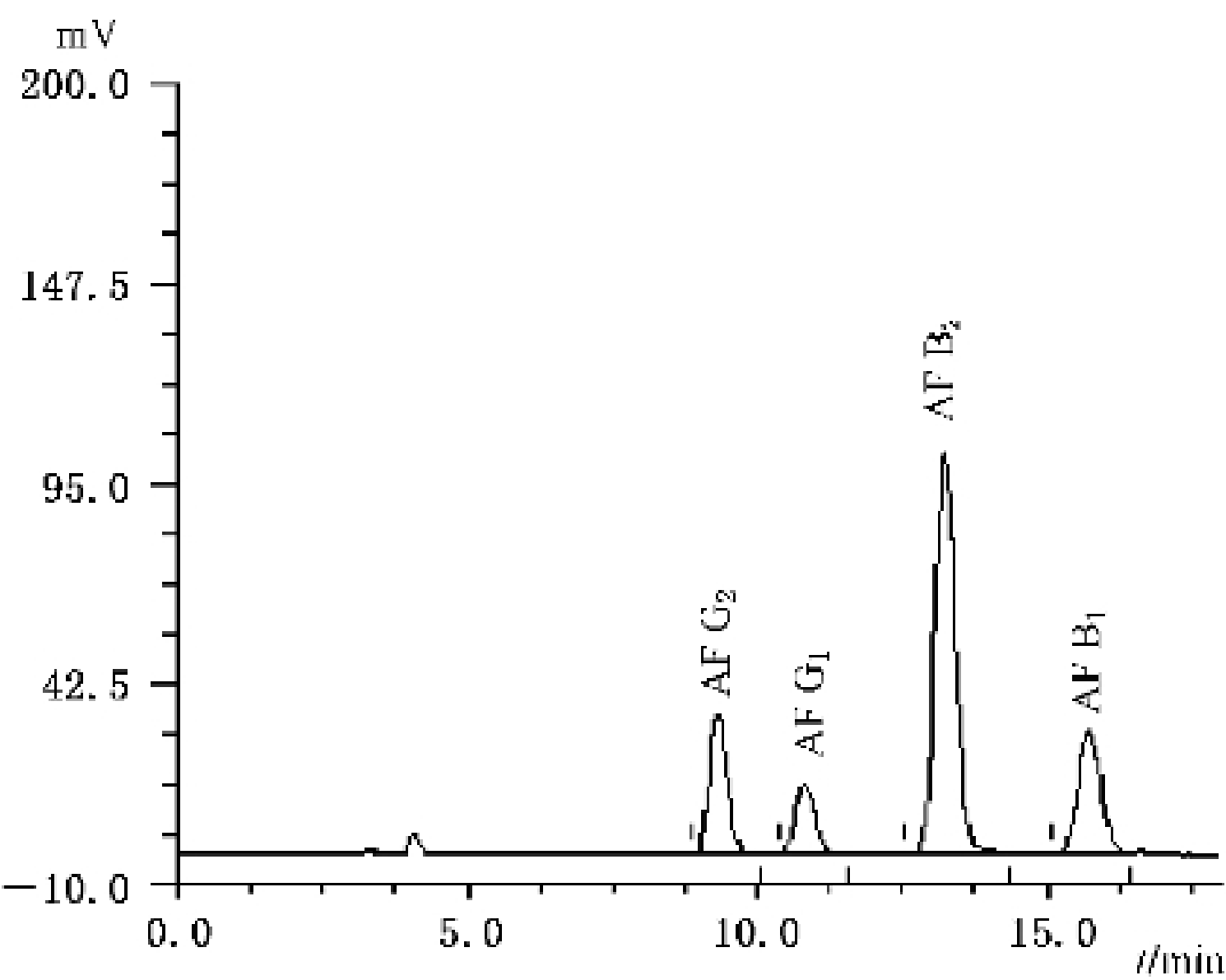


图 A.1 黄曲霉毒素标准溶液(B₁ 10 μg/L、B₂ 10 μg/L、G₁ 10 μg/L、G₂ 10 μg/L) 色谱图