



中华人民共和国国家标准

GB/T 17480—2008
代替 GB/T 17480—1998

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 酶联免疫吸附法

Determination of aflatoxin B₁ in animal feeding stuffs—
Enzyme-linked immunosorbent assay

2008-11-21 发布

2009-02-01 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

本标准代替 GB/T 17480—1998《饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 酶联免疫吸附法》。

本标准与 GB/T 17480—1998 相比主要修改如下：

- 范围中增加“本标准检出限为 0.1 μg/kg”；
- 规范性引用文件中，用“GB/T 20195 动物饲料 试样的制备”代替“GB/T 8381—1987 饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法”；
- 试剂盒组成中，增加“注意：不同测试盒制造商间的产品组成和操作会有细微的差别，应严格按照说明书要求规范操作”；
- 仪器、设备条款中，删除冰箱条款；增加电动振荡器、具塞磨三角瓶；
- 将“取样”条款改为“试样制备”，同时将“按 GB/T 8381—1987 中 5.1 要求采集、处理样品，制成分析用的试样”改为“按 GB/T 20195 要求制备试样”；
- 限量测定条款中，将测定操作的分级条款合并为一个条款，并删除表格，均用文字叙述测定过程；
- 定量测定条款中增加“结果保留 2 位有效数字”；
- 原“其他”条款删除，将“凡接触 AFB₁ 的容器，需浸入 1%次氯酸钠(NaClO₂)溶液，12 h 后清洗备用。为分析人员安全，操作时要带上医用乳胶手套”改为“警告”条款；
- 增加了资料性附录 A；
- 将样品溶液稀释表及稀释倍数与结果计算表作为资料性附录 B。

本标准的附录 A 和附录 B 均为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

本标准起草单位：江苏省微生物研究所有限责任公司。

本标准主要起草人：李利东、宓晓黎、袁建兴、杜姝莲。

本标准于 1998 年首次发布，本次为第一次修订。

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定

酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的酶联免疫吸附测定(ELISA)方法。
本标准适用于各种饲料原料、配合饲料及浓缩饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定。
本标准检出限为 0.1 μg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998,IDT)

3 原理

试样中黄曲霉毒素 B₁、酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原与包被于微量反应板中的黄曲霉毒素 B₁ 特异性抗体进行免疫竞争性反应,加入酶底物后显色,试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量与颜色成反比。用目测法或仪器法通过与黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液比较判断或计算试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水或去离子水或相当纯度的水。

4.1 黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒中的试剂

注意: 不同试剂盒制造商间的产品组成和操作会有细微的差别,应严格按说明书要求规范操作。

4.1.1 包被抗黄曲霉毒素 B₁ 抗体的聚苯乙烯微量反应板。

4.1.2 样品稀释液:甲醇-蒸馏水(7+93)。

4.1.3 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液:1.00 μg/L、50.00 μg/L。

警告——凡接触黄曲霉毒素 B₁ 的容器,需浸入 1%次氯酸钠(NaClO₂)溶液,12 h 后清洗备用。为分析人员安全,操作时要带上医用乳胶手套。

4.1.4 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原:黄曲霉毒素 B₁-辣根过氧化物酶交联物。

4.1.5 0.01 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液的配制:称取 3.01 g 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O)、0.25 g 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、8.76 g 氯化钠(NaCl),加水溶解至 1 L。

4.1.6 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原稀释液:称取 0.1 g 牛血清白蛋白(BSA)溶于 100 mL pH7.5 磷酸盐缓冲液(4.1.5)。

4.1.7 0.1 mol/L pH7.5 磷酸盐缓冲液:称取 30.1 g 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O)、2.5 g 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ · 2H₂O)、87.6 g 氯化钠(NaCl),加水溶解至 1 L。

4.1.8 洗涤母液:吸取 0.5 mL 吐温-20 于 1 000 mL 0.1 mol/L pH 7.5 磷酸盐缓冲液(4.1.7)。

4.1.9 pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液:称取 15.09 g 乙酸钠(CH₃COONa · 3H₂O)、1.56 g 柠檬酸(C₆H₈O₇ · H₂O),加水溶解至 1 L。

4.1.10 底物溶液 a:称取四甲基联苯胺(TMB) 0.2 g 溶于 1 L pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液。

4.1.11 底物溶液 b:1 L pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液中加入 0.3%过氧化氢溶液 28 mL。

4.1.12 终止液:硫酸溶液, $c(\text{H}_2\text{SO}_4)=2 \text{ mol/L}$ 。

4.2 甲醇水溶液:5 mL 甲醇加 5 mL 水混合。

4.3 测试盒中试剂的配制

4.3.1 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原溶液:在酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原(4.1.4)中加入 1.5 mL 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原稀释液(4.1.6),配成试验用酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原溶液,冰箱中保存。

4.3.2 洗涤液:洗涤母液(4.1.8)中加 300 mL 蒸馏水配成试验用洗涤液。

5 仪器和设备

5.1 小型粉碎机。

5.2 分样筛:孔径 1.00 mm。

5.3 分析天平:感量 0.01 g。

5.4 滤纸:快速定性滤纸,直径 9 cm~10 cm。

5.5 具塞三角瓶:100 mL。

5.6 电动振荡器。

5.7 微量连续可调取液器及配套吸头:10 μL ~100 μL 。

5.8 恒温培养箱。

5.9 酶标测定仪:内置 450 nm 滤光片。

6 分析步骤

6.1 试样制备

按 GB/T 20195 要求制备试样。试样需通过孔径 1.00 mm 的分样筛。

如果样品脂肪含量超过 10%,在粉碎之前用石油醚脱脂。在这种情况下,分析结果以未脱脂样品质量计。

6.2 试样提取

6.2.1 称取 5 g 试样(6.1),精确至 0.01 g,置于 100 mL 具塞三角瓶(5.5)中,加入甲醇水溶液(4.2) 25 mL,加塞振荡 10 min,过滤,弃去 1/4 初滤液,再收集适量试样液。如果样品中离子浓度高,建议按照附录 A 的规定对试样滤液进行萃取。

6.2.2 根据各种饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的限量规定和黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.1.3)浓度,用样品稀释液(4.1.2)将试样液(6.2.1)适当稀释,制成待测试样稀释液。如果黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液浓度为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 时,建议按照附录 B 的规定稀释试样。

6.3 限量测定

6.3.1 试剂平衡:将测试盒(4.1)于室温中放置约 15 min,平衡至室温。

6.3.2 测定:在微量反应板(4.1.1)上选一孔,加入 50 μL 样品稀释液(4.1.2)、50 μL 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原稀释液(4.1.6),作为空白孔;根据需要,在微量反应板(4.1.1)上选取适量的孔,每孔依次加入 50 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.1.3)或试样液(6.2.2)。再每孔加入 50 μL 酶标黄曲霉毒素 B₁ 抗原溶液(4.3.1)。在振荡器(5.6)上混合均匀。放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱(5.8)中反应 30 min。将反应板从培养箱中取出,用力甩干,加 250 μL 洗涤液(4.3.2)洗板 4 次,洗涤液不得溢出,每次间隔 2 min,甩掉洗涤液,在吸水纸上拍干。每孔各加入 50 μL 底物溶液 a(4.1.10)和 50 μL 底物溶液 b(4.1.11)。摇匀。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱(5.8)中反应 15 min。每孔加 50 μL 终止液(4.1.12),在显色后 30 min 内测定。

6.3.3 结果判定

6.3.3.1 目测法:比较试样液孔与标准溶液孔的颜色,若试样液孔颜色比标准溶液孔浅者,为黄曲霉毒

素 B₁ 含量超标;若相当或深者为合格。

6.3.3.2 仪器法:用酶标测定仪(5.9),在 450 nm 处用空白孔调零点,测定标准溶液孔及试样液孔吸光度 A 值,若 $A_{\text{试样液孔}}$ 小于 $A_{\text{标准溶液孔}}$,为黄曲霉毒素 B₁ 含量超标;若 $A_{\text{试样液孔}}$ 大于或等于 $A_{\text{标准溶液孔}}$,为合格。

6.3.3.3 若试样液中黄曲霉毒素 B₁ 含量超标,则根据试样液的稀释倍数,计算黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

6.4 定量测定

若试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量超标,则用酶标测定仪(5.9)在 450 nm 波长处进行定量测定,通过绘制黄曲霉毒素 B₁ 的标准曲线来确定试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。用样品稀释液(4.1.2)将 50.0 μg/L 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.1.3)稀释成 0.0 μg/L、0.1 μg/L、1.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L 的标准工作溶液,按限量法测定步骤测得相应的吸光度值 A 。以 0.0 μg/L 黄曲霉毒素 B₁ 标准工作溶液的吸光度值 A_0 为分母,其他浓度标准工作溶液的吸光度值 A 为分子的比值,再乘以 100 为纵坐标,对应的黄曲霉毒素 B₁ 标准工作溶液浓度的常用对数值为横坐标绘制标准曲线。根据试样 $A/A_0 \times 100$ 的值在标准曲线上查得对应的黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量以质量分数 X 计,单位以微克每千克(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试样提取液中黄曲霉毒素 B₁ 含量,单位为微克每升(μg/L);

V ——试样提取液体积,单位为毫升(mL);

n ——试样稀释倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g)。

计算结果保留 2 位有效数字。

7 精密度

重复测定结果的相对偏差不得超过 10%。

附 录 A
(资料性附录)
浓缩饲料的提取方法

称取 10 g 试样(6.1),精确至 0.01 g,置于 100 mL 具塞三角瓶(5.5)中,加入甲醇水溶液(4.2) 50 mL,加塞振荡 15 min,过滤,弃去 1/4 初滤液后收集滤液。

准确吸取 10.0 mL 滤液(相当于 2.00 g 样品)于 125 mL 分液漏斗中,加入 20 mL 三氯甲烷,加塞轻轻振摇 3 min,静置分层。放出三氯甲烷层,经盛有 5 g 预先用三氯甲烷湿润的无水硫酸钠的快速定性滤纸过滤至 100 mL 蒸发皿中,再加 5 mL 三氯甲烷于分液漏斗中,重复提取,三氯甲烷层一并滤于蒸发皿中,最后用少量三氯甲烷洗涤滤纸,洗液并入蒸发皿中,65 °C 水浴挥干。准确加入 10.0 mL 甲醇水溶液(4.2),充分溶解蒸发皿中残渣,得到试样液。

附录 B
(资料性附录)
试样液的稀释

如果黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液浓度为 1.00 μg/L 时,按表 B.1 用样品稀释液(4.1.2)将试样滤液(6.2.1)稀释,制成待测试样稀释液。若试样液中黄曲霉毒素 B₁ 含量超标,则根据表 B.2 中试样液的稀释倍数,计算黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

表 B.1 样品溶液的稀释

饲料中黄曲霉毒素 B ₁ 限量/(μg/kg)	试样滤液量/mL	样品稀释液量/mL	稀释倍数
≤10	0.10	0.10	2
≤15	0.10	0.20	3
≤20	0.05	0.15	4
≤30	0.05	0.25	6
≤50	0.05	0.45	10

表 B.2 稀释倍数与结果计算

稀释倍数	试样中黄曲霉毒素 B ₁ 含量/(μg/kg)
2	>10
3	>15
4	>20
6	>30
10	>50