



中华人民共和国国家标准

GB/T 8381—2008/ISO 6651:2001
代替 GB/T 8381—1987

饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 半定量薄层色谱法

Determination of aflatoxin B₁ in animal feeding stuffs—
Semi-quantitative thin layer chromatographic methods

(ISO 6651:2001, Animal feeding stuffs—Semi-quantitative
determination of aflatoxin B₁—Thin layer chromatographic methods, IDT)

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
中国国家标准化管理委员会

发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 原理	1
4 试剂	1
5 仪器	2
6 采样	3
7 分析步骤	3
8 计算和结果表示	8
9 实验室间试验	8
10 试验报告	8
附录 A (资料性附录) 实验室间试验结果	9

前 言

本标准等同采用国际标准 ISO 6651:2001《饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的半定量测定 薄层色谱法》(英文版)。

本标准等同翻译 ISO 6651:2001, 为便于使用, 做了下列编辑性修改:

- 标准中文名称修改为《饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 半定量薄层色谱法》;
- 删除了国际标准的前言;
- 将“本国际标准”改为“本标准”;
- 用小数点符号“.”代替小数点符号“,”;
- 在引用文件中, 用“GB/T 20195 动物饲料 试样的制备”代替“ISO 6498”;
- 在引用文件中, 增加“GB/T 14699.1 饲料 采样”;
- 对图 2 中的展开方向符号进行了更正, 将“Ⅰ”改为“Ⅱ”, “Ⅱ”改为“Ⅰ”。

本标准代替 GB/T 8381—1987《饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法》。

本标准与 GB/T 8381—1987 相比, 主要变化如下:

- 在试剂条款中, 删除黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液制备时仪器校正内容, 并增加黄曲霉毒素 B₁ 三氯甲烷标准溶液制备与浓度测定;
- 层析时可选择的展开剂种类由两种增至五种;
- 方法 A——单向薄层色谱法中, 增加不同体积的标准溶液和样品溶液的点样点;
- 方法 B——双向薄层色谱法中, 减少辅助板的数量, 并且点样的分布方式不同;
- 检测中增加薄层扫描仪荧光法;
- 确证试验中增加硫酸推测试验。

本标准的附录 A 是资料性附录。

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: 宓晓黎、李利东、袁建兴、杜姝莲。

本标准于 1987 年首次发布, 本次为第一次修订。

灯距薄层板 10 cm 时,照射强度应使 1.0 ng 黄曲霉毒素 B₁ 斑点能被清晰分辨。

警告——紫外光对眼睛有害,应戴防护镜。

- 5.9 紫外分光光度计。
- 5.10 薄层扫描仪:可荧光检测(可选)。
- 5.11 槽状滤纸。
- 5.12 10.0 mL 带聚乙烯塞试管。
- 5.13 500 mL 三角瓶:具磨口玻璃塞。
- 5.14 50 mL 移液管。
- 5.15 分析天平。

6 采样

按照 GB/T 14699.1 采集实验室样品。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 如果样品脂肪含量超过 5%,在粉碎之前用石油醚脱脂。如果经脱脂,分析结果以未脱脂样品计。

7.1.2 粉碎实验室样品,全部通过分样筛(5.2),充分混合,详见 GB/T 20195。

7.2 试料

称量制备试样 50 g,精确至 0.01 g,置于锥形瓶(5.13)中。

7.3 提取

加 25 g 硅藻土(4.9),用量筒准确量取 25 mL 水、250 mL 三氯甲烷(4.1)至试料(7.2)中,加瓶塞,用振荡设备(5.3)振摇或搅拌 30 min,通过槽状滤纸(5.11)过滤,弃 10 mL 初滤液,随后至少收集 50 mL 滤液。

7.4 柱纯化

7.4.1 柱的制备

加 2/3 柱体积的三氯甲烷(5.4)到层析柱中,加 5 g 硫酸钠(4.10),使硫酸钠层表面平整,分次加入 10 g 硅胶(4.7),如有气泡时,小心搅动,静置 15 min,再小心地加 10 g 硫酸钠(4.10),打开活塞,让液体流出,直至液体恰在硫酸钠层的上表面,关闭活塞。

7.4.2 纯化

用移液管(5.14)吸取 50 mL 收集的滤液(7.3)至 250 mL 锥形瓶中,加 100 mL 正己烷(4.2),混合,把混合液定量地转移至层析柱中,用正己烷洗涤锥形瓶,并倒入柱中,打开活塞,使液体以 8 mL/min~12 mL/min 流速流出,直至液体在硫酸钠层的上表面,关闭活塞。加 100 mL 乙醚(4.3)到柱中,再打开活塞,直到液体流出至硫酸钠层上表面。弃去流出液体。在整个操作过程中,保证柱不干。

用 150 mL 三氯甲烷-甲醇混合液(4.5)洗脱柱子,收集全部洗脱液到 500 mL 旋转蒸发瓶(5.5)内,用旋转蒸发器在惰性气体(4.12)保护下,50 °C 以下减压蒸馏至干。

如果旋转蒸发器不适用,可加助沸剂,在水浴中蒸发至干。

用三氯甲烷(4.1)或苯-乙腈混合液(4.4)转移残留物至 10 mL 试管(5.12)中,置于水浴中,通惰性气体(4.12),再蒸发此溶液。用三氯甲烷(4.1)或苯-乙腈混合液(4.4)定容至 2.0 mL。

7.5 薄层色谱

7.5.1 方法 A——单向薄层色谱法

7.5.1.1 选择展开剂

预先配制选择的溶剂(4.6.1、4.6.2、4.6.3、4.6.4 或 4.6.5),保证黄曲霉毒素 B₁ 与 B₂ 在薄层板上

展开后完全分离,其结果也取决于所用薄层板的批号。点 25 μL 定性溶液(4.15)在一薄层板(5.7)上,按 7.5.1.2 展开,挥发,照射。用合适的溶剂会产生两个明显点。

7.5.1.2 操作步骤

取 TLC 板,在距薄层板下端 30 mm 的基线上用毛细管或微量注射器点样,每点间隔 20 mm,黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液和试液的点样体积如下:

- 10 μL , 15 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14);
- 10 μL 试液(7.4.2),在同一点,加 20 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准液;
- 10 μL , 20 μL 试液(7.4.2)。

在暗处用所选择的展开剂展开(7.5.1.1)。从展开槽中取出板,置暗处蒸发溶剂,然后在紫外灯下检查,板置于灯(5.8)10 cm 处,黄曲霉毒素 B₁ 斑点显蓝色荧光。

7.5.2 方法 B——双向薄层色谱法

7.5.2.1 点样(见图 1)

在板上画两条直线平行于两个毗邻的边,分别距每边 50 mm 和 60 mm,建立溶剂前沿迁移限线,用毛细管或微量注射器点下列溶液:

- 在 A 点,20 μL 试液(7.4.2);
- 在 B 点,20 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14);
- 在 C 点,10 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14);
- 在 D 点,20 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14);
- 在 E 点,40 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14)。

用空气或惰性气体慢慢吹干,斑点的直径约 5 mm。

单位为毫米

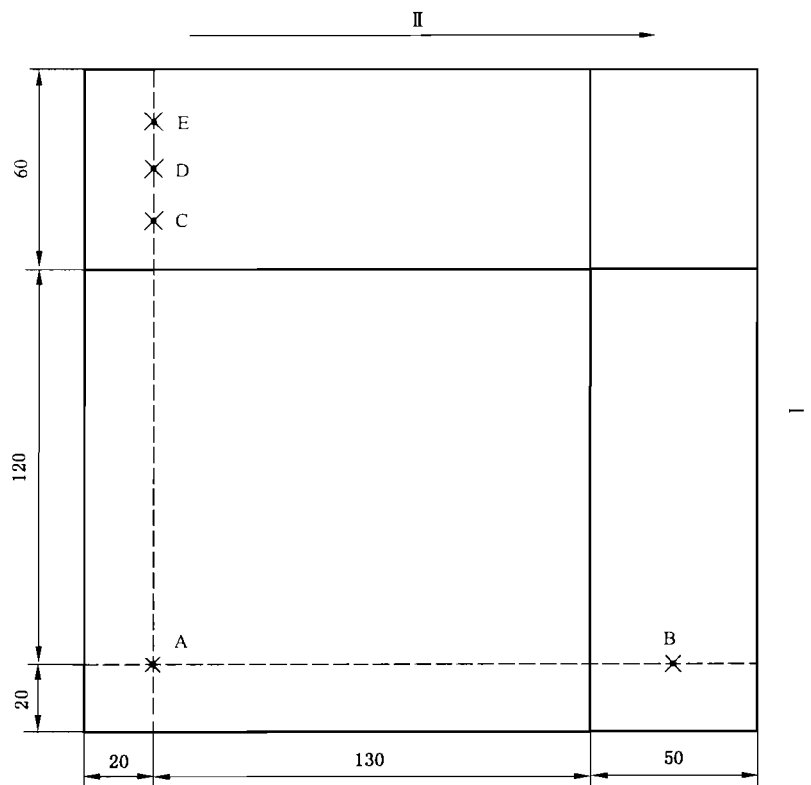


图 1 点样示意图

7.5.2.2 展开(见图 1)

在暗处,用展开剂(4.6.3)(在饱和展开槽中约 1 cm 厚)按方向 I 展开至溶剂前沿限线,取出展开槽中板,挥干,室温放置在暗处至少 15 min。

然后在暗处用展开剂(4.6.1)(在非饱和展开槽中约 1 cm 厚)沿方向 II 展开至溶剂前沿限线,从展开槽中取出板,在室温、暗处挥干。

7.5.2.3 色谱解析(见图 2)

将薄层板置于紫外灯(5.8)10 cm 处检查色谱,标记 B、C、D、E 标准溶液中黄曲霉毒素 B₁ 的蓝色荧光斑点。

通过 E、D、C 和 B 画两条分别平行于两个展开方向的假想线,相互垂直并相交于 P 点,P 点为点样 A 中黄曲霉毒素 B₁ 荧光斑点的理论位置,但是实际上点样 A 中黄曲霉毒素 B₁ 的荧光斑点可能位于 Q 点,使得 Q 点分别与 C 点、B 点连成的直线成 100°角。

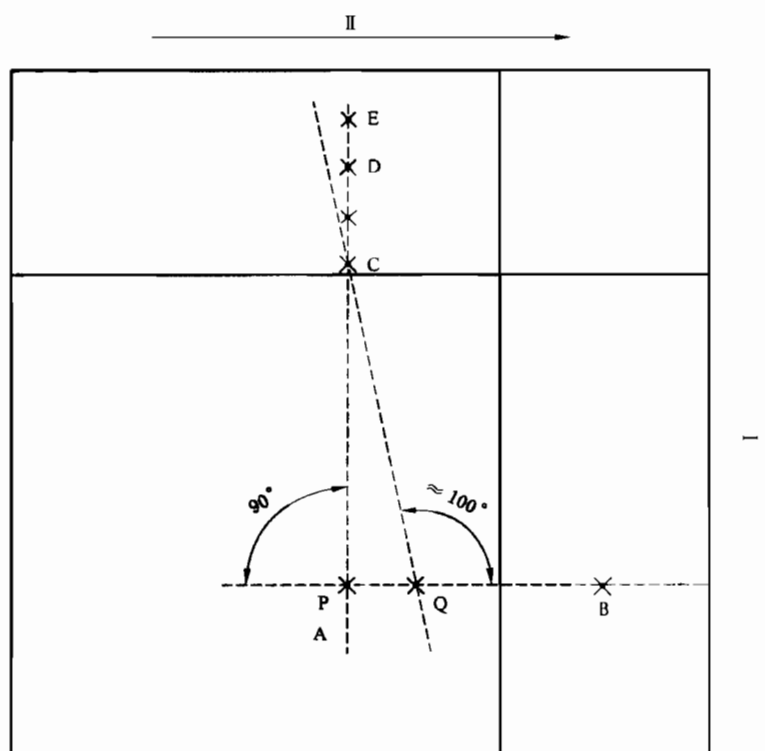


图 2 色谱解析

7.5.2.4 辅助色谱

在一新板上,画两条直线平行于两个毗邻边,如图 1 所示,在 A 点,点 20 μL 试液(7.4.2),叠加点 20 μL 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14),按 7.5.2.2 展开,在紫外灯下检查色谱并核查:

- 试液中的黄曲霉毒素 B₁ 斑点与标准溶液中的黄曲霉毒素 B₁ 斑点叠加;
- 此点的荧光强度比第一块板 Q 点处的黄曲霉毒素 B₁ 斑点荧光强度更强。

7.6 检测

7.6.1 目测法

7.6.1.1 方法 A

通过试液荧光斑点与标准溶液荧光斑点比较,测定试液中黄曲霉毒素 B₁ 的量。

试液加标准溶液的点所获得的荧光应该比 10 μL 试液点更强,并且应是只显示一个斑点,如果 10 μL 试液给出的荧光强度反而比 40 μL 标准溶液更强,在重新薄层层析之前,应该用三氯甲烷(4.1)或苯-乙腈混合液(4.4)稀释试液 10 倍或 100 倍。

7.8 检测数量

相同试验样品进行重复检验。

8 计算和结果表示

8.1 目测法

试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量(X_1)以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(3)计算:

$$X_1 = \frac{c \times V_1 \times V_3}{m \times V_2} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

c ——黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(4.14)的浓度(约 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

m ——柱纯化用提取液的体积所相当的试料质量(10.0 g),单位为克(g);

V_1 ——提取液最终体积(必要时进行稀释),单位为微升(μL);

V_2, V_3 ——分别为试样体积和具有类似荧光强度标准溶液的体积,单位为微升(μL)。

8.2 薄层扫描仪荧光法

试样中黄曲霉毒素 B₁ 的含量(X_2)以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(4)计算:

$$X_2 = \frac{m_1 \times V_1}{m \times V_2} \dots\dots\dots(4)$$

式中:

m_1 ——以 V_2 体积计算,从测定中推算出的提取液斑点中黄曲霉毒素 B₁ 的质量,单位为纳克(ng);

V_1 ——提取液最终体积(必要时考虑稀释),单位为微升(μL);

m ——柱纯化用提取液的体积所相当的试料质量(10.0 g),单位为克(g);

V_2 ——点到板上的提取液体积(10 μL 或 20 μL),单位为微升(μL)。

9 实验室间试验

实验室间试验方法精密度汇总于附录 A。实验室间试验获得的值可以不适用于附录 A 未列出的浓度范围和基质。

10 试验报告

试验报告应给出的内容:

- 样品测定的所有必要信息;
- 如果已知,使用的采样方法;
- 使用本标准提及的试验方法 A 或方法 B;
- 检测方法(目测法或薄层扫描仪荧光法);
- 在本标准中没有详细说明的所有操作方法或认为选择可能影响试验结果的任何事件的描述;
- 试验结果。

附 录 A
(资料性附录)
实验室间试验结果

配合饲料(方法 B)的三组实验室间试验,其中两组完成在国际水平(No. 1 和 No. 2),其结果如表 A.1 所示。

试验 2 中 11 个实验室也按方法 A 分析了样品,其饲料组成适合于方法 A,用目测或薄层扫描荧光法所获得的数据与方法 B 类似。

表 A.1 实验室间试验结果统计

参 数	试 验		
	1	2	3
参加实验室的数目	23	11	13
平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	162.7	25.4	13.4
重复性标准差(S_r)/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	16.9	2.7	1.7
重复性变异系数/%	10	11	13
重复性限($2.83S_r$)/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	47.8	7.6	4.8
再现性标准差(S_R)/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	45.2	6.8	4.0
再现性变异系数/%	28	27	30
再现性限($2.83S_R$)/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	128.0	19.2	11.3

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定
半定量薄层色谱法

GB/T 8381—2008/ISO 6651:2001

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

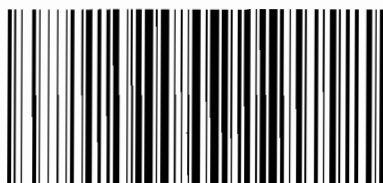
开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 21 千字
2009年1月第一版 2009年1月第一次印刷

*

书号: 155066·1-35441 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 8381-2008