

# 团 体 标 准

T/CFIAS 6015—2024

---

## 饲料用真菌毒素生物降解剂的降解性能测定方法 体外法

Determination for detoxification performance of biodegradable mycotoxins  
detoxification agents for feed—in vitro method

2024-12-31 发布

2024-12-31 实施

---

中国饲料工业协会 发 布



## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国饲料工业协会团体标准技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量检验检测中心(北京)]、江苏奥迈生物科技有限公司、中国农业大学、南京农业大学、华中农业大学、中国农业科学院农产品加工研究所、中粮营养健康研究院有限公司、安佑生物科技集团股份有限公司、帝斯曼(中国)有限公司、新疆畜牧科学院畜牧业质量标准研究所(新疆维吾尔自治区种羊与羊毛羊绒质量安全监督检验中心)。

本文件主要起草人：索德成、孙育荣、樊霞、汪成飞、马秋刚、刘强、王帅、邢福国、姜德铭、宫平、邬本成、关舒、冯玉超、安志新、魏佩玲、程亚婷。



# 饲料用真菌毒素生物降解剂的降解性能测定方法 体外法

## 1 范围

本文件规定了对声称具有真菌毒素降解功能的微生物降解菌或降解酶对饲料用真菌毒素生物降解剂降解性能测定的方法。

本文件适用饲料用真菌毒素生物降解剂对真菌毒素（黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A、T-2毒素、伏马毒素B<sub>1</sub>）降解性能的测定。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20195	动物饲料 试样的制备
GB/T 28716	饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
GB/T 28718	饲料中T-2毒素的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
GB/T 30955	饲料中黄曲霉毒素B <sub>1</sub> 、B <sub>2</sub> 、G <sub>1</sub> 、G <sub>2</sub> 的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
GB/T 30956	饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
GB/T 30957	饲料中赭曲霉毒素A的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法
NY/T 1970	饲料中伏马毒素的测定
NY/T 3803	饲料中37种霉菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**真菌毒素生物降解** Biodegradation of mycotoxins

通过微生物或其代谢产生的酶与真菌毒素作用，破坏真菌毒素毒性基团的效果，将真菌毒素转化成没有毒性或毒性较低的物质。

### 3.2

**真菌毒素生物降解剂** Biodegradable mycotoxins detoxification agent

能将真菌毒素转化成没有毒性或毒性较低物质的微生物或降解酶、与相应载体混合制成的产品。

### 3.3

**真菌毒素降解率** Detoxification rate of mycotoxins

在一定温度、pH值等条件下，单位质量真菌毒素生物降解剂在单位时间内降解真菌毒素的量与加入真菌毒素量的百分比。

## 4 原理

将规定剂量的真菌毒素加入规定剂量饲料用真菌毒素生物降解剂中进行降解处理，利用液相色谱或液相色谱串联质谱测定处理前后的真菌毒素含量，通过计算评价饲料用真菌毒素生物降解剂中降解真菌毒素的能力。

## 5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

- 5.1 水：GB/T 6682，一级。
- 5.2 甲酸：色谱纯。
- 5.3 甲醇：色谱纯。
- 5.4 乙腈：色谱纯。
- 5.5 磷酸溶液：量取浓磷酸 3.4 mL，加蒸馏水至 1 000 mL，摇匀。
- 5.6 氢氧化钠溶液（1.0 mol/L）：称取 40.0 g 氢氧化钠，加水溶解，定容至 1 000 mL。
- 5.7 磷酸盐缓冲溶液（pH=6.5）：称取二水磷酸二氢钠 5.46 g，十二水磷酸氢二钠 5.37 g，加水 900 mL 溶解，用磷酸溶液（5.5）或氢氧化钠溶液（5.6）调 pH 至 6.5，混匀，定容至 1 000 mL。
- 5.8 真菌毒素标准储备溶液（100  $\mu$ g/mL）：分别称取黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>（CAS：1162-65-8，纯度不低于 98%）、玉米赤霉烯酮（CAS：17924-92-4，纯度不低于 98%）、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（CAS：51481-10-8，纯度不低于 98%）、赭曲霉毒素 A（CAS：303-47-9，纯度不低于 98%）、T-2 毒素（CAS：21259-20-1，纯度不低于 98%）、伏马毒素 B<sub>1</sub>（CAS：116355-83-0，纯度不低于 98%）标准品各 10 mg（精确至 0.01 mg），分别置于 100 mL 棕色容量瓶中，用乙腈溶解、定容，混匀。—18 ℃ 以下避光贮存，有效期 6 个月。或采用有证标准溶液。
- 5.9 微孔滤膜：0.22  $\mu$ m，有机系。
- 5.10 Luria-Bertani (LB) 培养基：称取胰蛋白胨 10 g、酵母浸粉 5 g、氯化钠 10 g，加水至 1 L，121 ℃ 高压灭菌 20 min，备用。

## 6 仪器设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器（ESI）和紫外检测器。
- 6.2 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾离子源（ESI）。
- 6.3 分析天平：精度 0.1 mg 和 0.01 mg。
- 6.4 离心机：转速不低于 10 000 r/min。
- 6.5 超声波清洗仪。
- 6.6 摇床。
- 6.7 高压灭菌锅。
- 6.8 超净工作台。
- 6.9 生化培养箱。

## 7 样品

- 7.1 试样的制备：按照 GB/T 20195 规定制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部过 0.425 mm 试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，避光保存，备用。
- 7.2 失活样品的制备：称取 50 g 试样（7.1），在高压灭菌锅 121 ℃ 处理 30 min，取出 105 ℃ 烘干至恒重后装入密闭容器中，避光保存，备用。

## 8 试验步骤

警示：整个分析操作过程应在规定区域内进行。该区域应避光、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中，操作者应按照接触毒物的要求采取相应的保护措施。

### 8.1 微生物降解菌类产品真菌毒素降解率试验

- 8.1.1 平行做两份试验。取 150 mL 三角瓶 3 支，分别标记为空白组、试样组和灭活试样组。称取 0.1 g（精确至 0.1 mg）待测微生物降解菌样品置于试样组中；称取 0.1 g（精确至 0.1 mg）灭活待测微生物降解菌样品置于对应灭活试样组中；空白组不加任何试样。每支三角烧瓶中加入 50 mL LB 培养基（或

产品推荐使用的培养基），37℃振荡培养12h（或产品推荐的适宜培养时间），使微生物充分复活，并处于对数生长期。

8.1.2 取3支20 mL离心管，分别标记空白组、试样组和灭活试样组。每管加入适量的真菌毒素标准溶液（推荐参数参见附录A），用氮吹仪吹干，再分别加入10 mL对应上述复活菌液（8.1.1），充分混匀。将3组离心管置于37℃恒温振荡摇床（或培养箱），200 r/min避光孵育24 h。孵育结束后，加5 mL甲醇，充分混匀，终止反应。10 000 r/min离心机上离心10 min，取上清液过0.22 μm的滤膜，备用。或根据产品要求方法测定。

如有必要，可进行降解产物的结构和毒性鉴定。

## 8.2 降解酶类产品真菌毒素降解率试验

平行做两份试验。取3支20 mL离心管，分别标记空白组、试样组和灭活试样组。每管加入适量的真菌毒素标准溶液（推荐添加量参见附录A），用氮吹仪吹干，再分别在试样组中加入0.02 g（精确至0.1 mg）酶产品，充分混匀；灭活试样组中加入0.02 g（精确至0.1 mg）灭活酶产品；空白组中不加产品。然后分别加入10 mL磷酸盐缓冲溶液（5.7），充分混匀。将3组离心管置于37℃恒温振荡摇床（或培养箱），200 r/min避光孵育2 h。孵育结束后，加5 mL甲醇，充分混匀，终止反应。10 000 r/min离心机上离心10 min，取上清液过0.22 μm的滤膜，备用。或根据产品要求方法测定。

如有必要，可进行降解产物的结构和毒性鉴定。

## 8.3 净化

试验过程中如存在干扰，可采用相应的真菌毒素检测标准方法进行净化处理后，上机测定。

## 8.4 测定

### 8.4.1 液相色谱参考条件

真菌毒素液相色谱参考条件如下：

- 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的液相色谱测定条件参见GB/T 30955；
- 玉米赤霉烯酮的液相色谱测定条件参见GB/T 28716；
- 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的液相色谱测定条件参见GB/T 30956；
- 赭曲霉毒素A的液相色谱测定条件参见GB/T 30957；
- T-2毒素的液相色谱测定条件参见GB/T 28718；
- 伏马毒素B<sub>1</sub>的液相色谱测定条件参见NY/T 1970。

### 8.4.2 液相色谱串联质谱参考条件

黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A、T-2毒素、伏马毒素B<sub>1</sub>的液相色谱串联质谱参考条件参见NY/T 3803。

### 8.4.3 测定

在仪器的最佳条件下，分别取空白组、试样组和灭活试样组所得溶液（8.1、8.2）上机测定。

## 9 试验数据处理

黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A、T-2毒素、伏马毒素B<sub>1</sub>降解率计为D<sub>i</sub>，数值以质量百分数（%）表示，按式（1）计算：

$$D_i = \left( \frac{A_{im} - A_{ix}}{A_{io}} \right) \times 100\% \quad \text{..... (1)}$$

式中：

D<sub>i</sub> ——黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A、T-2毒素、

伏马毒 B<sub>1</sub> 降解率;

$A_{im}$  ——灭活试样组中加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、伏马毒 B<sub>1</sub> 测得浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$A_{ix}$  ——试样组中加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、伏马毒素 B<sub>1</sub> 测得浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ );

$A_{io}$  ——空白组加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、伏马毒素 B<sub>1</sub> 测得浓度, 单位为微克每毫升 ( $\mu\text{g/mL}$ )。

测定结果用平行测定的算术平均值表示, 保留三位有效数字。

## 10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的15%。





附 录 A  
(资料性)

饲用生物降解类真菌毒素脱毒剂吸附率测定参考真菌毒素的加入量

真菌毒素吸附剂的吸附率测定参考真菌毒素的加入量见表A. 1。

表A. 1 饲用生物降解类真菌毒素脱毒剂吸附率测定参考真菌毒素的加入量

毒素名称	真菌毒素标准溶液浓度 μ g/mL	加入毒素体积 mL	反应溶液中毒素浓度 μ g/mL
黄曲霉毒素B <sub>1</sub>	100	0. 02	0. 20
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	100	0. 2	2. 00
玉米赤霉烯酮	100	0. 1	1. 00
赭曲霉毒素A	100	0. 1	1. 00
T-2毒素	100	0. 1	1. 00
伏马毒素B <sub>1</sub>	100	0. 2	2. 00



附录 B  
(资料性)

真菌毒素生物降解剂降解性能的快速测定 酶联免疫法

B.1 原理

将规定剂量的真菌毒素加入规定剂量饲料用真菌毒素生物降解剂中进行降解处理，利用酶联免疫法测定真菌毒素含量，通过计算评价饲料用真菌毒素生物降解剂中降解真菌毒素的能力。

B.2 试剂或材料

见正文中的第5章。

B.3 仪器设备

B.3.1 真菌毒素酶联免疫试剂盒：附有说明书或等同指导性文件。

B.3.2 分析天平：精度0.1 mg和0.01 mg。

B.3.3 离心机：转速不低于10 000 r/min。

B.3.4 摇床。

B.3.5 高压灭菌锅。

B.3.6 超净工作台。

B.3.7 生化培养箱。

B.4 样品

见正文第7章。

B.5 试验步骤

警示：整个分析操作过程应在规定区域内进行。该区域应避光、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中，操作者应按照接触毒物的要求采取相应的保护措施。

B.5.1 微生物降解菌类产品降解性能测定

B.5.1.1 平行做两份试验。取150 mL三角瓶3支，分别标记为空白组、试样组和灭活试样组。称取0.1 g（精确至0.1 mg）待测微生物降解菌样品置于试样组中；称取0.1 g（精确至0.1 mg）灭活待测微生物降解菌样品置于对应灭活试样组中；空白组不加任何产品。每支三角烧瓶中加入50 mL LB培养基（或产品推荐使用的培养基），37℃振荡培养12 h（或产品推荐的适宜培养时间），使微生物充分复活，并处于对数生长期。

B.5.1.2 取3支20 mL离心管，分别标记空白组、试样组和灭活试样组。每管加入适量的真菌毒素标准溶液（推荐参数参见附录A），用氮吹仪吹干，再分别加入10 mL对应上述复活菌液（8.1.1），充分混匀。将3组离心管置于37℃恒温振荡摇床（或培养箱），200 r/min避光孵育24 h。孵育结束后，加5 mL甲醇，充分混匀，终止反应。10 000 r/min离心机上离心10 min，取上清液过0.22 μm的滤膜，备用。或根据产品要求方法测定。

B.5.2 降解酶类产品降解性能测定

平行做两份试验。取3支20 mL离心管，分别标记空白组、试样组和灭活试样组。每管加入适量的真菌毒素标准溶液（推荐添加量参见附录A），用氮吹仪吹干，再分别在试样组中加入0.02 g（精确至0.1 mg）酶产品，充分混匀；灭活试样组中加入0.02 g（精确至0.1 mg）灭活酶产品；空白组中不加产品。然后分别加入10 mL磷酸盐缓冲溶液（5.7），充分混匀。将3组离心管置于37℃恒温振荡摇床（或培养

箱)，200 r/min避光孵育2 h。孵育结束后，加5 mL甲醇，充分混匀，终止反应。10 000 r/min离心机上离心10 min，取上清液，备用。或根据产品要求方法测定。

#### B.5.3 测定

分别取各组上清液（B5.1、58.2）按相关对应的真菌毒素酶联免疫试剂盒说明书的操作规程测定。

#### B.6 试验数据处理

见正文第9章。

#### B.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。





