

团 体 标 准

T/CFIAS 6014—2024

饲料用真菌毒素吸附剂吸附性能的测定方 法 体外法

Determination for the adsorb performance of mycotoxins adsorbents 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、中国农业科学院农产品加工研究所、华中农业大学、安佑生物科技集团股份有限公司、中粮营养健康研究院有限公司、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：樊霞、索德成、汪成飞、孙育荣、马秋刚、王帅、刘强、邢福国、姜德铭、邬本成、关舒、宫平、魏佩玲、冯玉超、安志新、龚小园。

饲料用真菌毒素吸附剂吸附性能的测定方法 体外法

1 范围

本文件规定了对声称具有真菌毒素吸附功能的饲料用真菌毒素吸附剂吸附性能测定的方法。

本文件适用饲料用真菌毒素吸附剂对真菌毒素（黄曲霉毒素B₁、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B₁）吸附能力的测定。

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 ₁ 、B ₂ 、G ₁ 、G ₂ 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

真菌毒素吸附剂 mycotoxins adsorbents

具有吸附真菌毒素性能的产品。

3.2

真菌毒素吸附浓度 adsorption concentration of mycotoxins

加入真菌毒素的质量与加入饲料用真菌毒素吸附剂质量的比值。

3.3

真菌毒素吸附率 adsorption rate of mycotoxins

在一定温度、pH值等条件下，单位质量真菌毒素吸附剂在单位时间内吸附真菌毒素的量与加入真菌毒素量的百比值。表示为真菌毒素吸附率（吸附浓度、pH），即在相应pH值下的单位吸附浓度的吸附率。

3.4

真菌毒素吸附量 adsorption amount of mycotoxins

在一定温度和pH值等条件下、单位质量真菌毒素吸附剂所吸附的真菌毒素的量。

3.5

真菌毒素最大吸附量 maximum adsorption amount of mycotoxins

在一定温度和pH值等条件下，单位质量真菌毒素吸附剂所吸附的真菌毒素的最大量。

4 原理

将规定剂量的真菌毒素及真菌毒素吸附剂进行吸附处理，采用液相色谱或液相色谱串联质谱测定。以吸附率和最大吸附量表示。

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=3.0）：称取磷酸二氢钾 6.8 g，加水 900 mL，摇匀。再用磷酸溶液（5.5）或氢氧化钠溶液（5.6）调节 pH 至 3.0，混匀，定容至 1 000 mL。
- 5.8 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，用磷酸溶液或氢氧化钠溶液调 pH 至 6.5，混匀，定容至 1 000 mL。
- 5.9 真菌毒素标准储备溶液（100 μ g/mL）：分别称取黄曲霉毒素 B₁（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 B₁（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 $^{\circ}$ C 以下避光贮存，有效期 6 个月。或采用有证标准溶液。
- 5.10 微孔滤膜：0.22 μ m，有机系。

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。

7 样品

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。

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 真菌毒素吸附率（吸附浓度、pH 值）试验

平行做两份试验。取 10 mL 离心管，加入适量的真菌毒素标准溶液的一种（推荐参数参见附录 A），用氮气吹干，准确称取 0.02 g 试样（精确至 0.0001 g）置于离心管中，加入 10 mL 相应 pH 值的磷酸盐缓冲溶液（5.7 或 5.8），于 37 $^{\circ}$ C 的恒温摇床上悬摇 120 min，冷却至室温，10 000 r/min 离心机上离心 10 min，取上清液，过 0.22 μ m 的滤膜，备用。

另取 1 支空白离心管，不加试样，按上述操作进行，作为空白对照溶液。

8.2 真菌毒素最大吸附量试验

平行做两份试验。取 6 支 10 mL 离心管，加入 0.01 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL 真菌毒素标准溶液的一种，用氮气吹干，分别准确称取 0.02 g 试样（精确至 0.0001 g）于 6 支 10 mL 离心管中，加入 10 mL 相应的 pH 值磷酸盐缓冲溶液（5.7 或 5.8），于 37 °C 的恒温摇床上悬摇 120 min，冷却至室温，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。

另取 6 支空白离心管，不加试样，按上述操作进行，作为空白对照溶液。

8.3 复杂基质样品的净化

试验过程中存若在干扰，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：

- a) 黄曲霉毒素 B₁ 的液相色谱测定条件参见 GB/T 30955；
- b) 玉米赤霉烯酮的液相色谱测定条件参见 GB/T 28716；
- c) 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的液相色谱测定条件参见 GB/T 30956；
- d) 赭曲霉毒素 A 的液相色谱测定条件参见 GB/T 30957；
- e) T-2 毒素的液相色谱测定条件参见 GB/T 28718；
- f) 伏马毒素 B₁ 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 B₁、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 B₁ 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，分别取空白对照溶液和试样溶液（8.1、8.2）上机测定。

9 试验数据处理

9.1 真菌毒素吸附率的计算

9.1.1 吸附浓度的计算

黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 吸附浓度 C_i 以质量分数计，数值以微克每克（μg/g）表示，按式（1）计算：

$$C_i = \frac{M_i}{m_i} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- M_i ——试样中加入真菌毒素的量，单位为微克（μg）；
 m_i ——试样质量，单位为克（g）。

9.1.2 真菌毒素吸附率的计算

黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 吸附率计为 X_i （ C_i , pH），数值以质量百分数（%）表示，按式（2）计算：

$$X_i = \left(1 - \frac{c_{1i}}{c_{0i}}\right) \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_{1i} ——试样组中加入黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 标准溶液处理后测得的浓度,单位为微克每毫升 (μg/mL);

C_{0i} ——空白组加入黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 标准溶液处理后测得的浓度,单位为微克每毫升 (μg/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。

9.2 真菌毒素最大吸附量的计算

9.2.1 真菌毒素添加浓度的要求

进行最大吸附量的计算时,应先计算黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 最高浓度点的吸附率。如其吸附率仍然大于 90%,可适当增加真菌毒素的量,使其毒素吸附率小于 90%,根据加入浓度点进行最大吸附量的计算。

9.2.2 吸附量的计算

黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 吸附量 Q_{eq} 以质量分数表示,数值以微克每克 (μg/g) 表示,按式 (3) 计算:

$$Q_{eq} = \frac{(C_0 - C_{eq})}{m} \times V \dots\dots\dots (3)$$

式中:

C_0 ——对照溶液中黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 浓度,单位为微克每毫升 (μg/mL);

C_{eq} ——平衡时上清液中黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 的浓度,单位为微克每毫升 (μg/mL);

m ——试样质量,单位为克 (g);

V ——定容体积,单位为毫升 (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。

9.2.3 真菌毒素最大吸附量的计算

黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 最大吸附量 Q_{max} 以质量分数表示,数值以微克每克 (μg/g) 表示,按式 (4) (Langmuir 模型方程) 计算:

$$\frac{C_{eq}}{Q_{eq}} = \frac{1}{K_L \times Q_{max}} + \frac{C_{eq}}{Q_{max}} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

K_L ——Langmuir 吸附常数,单位为毫升每微克 (mL/μg);

C_{eq} ——平衡时上清液中黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 的浓度,单位为微克每毫升 (μg/mL);

Q_{eq} ——单位质量吸附剂结合黄曲霉毒素 B₁、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 B₁ 的质量,单位为微克每克 (μg/g);

Q_{max} ——以 $C_{eq}/Q_{eq} - C_{eq}$ 做直线, Q_{max} 为其计算其线性方程斜率的倒数。

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)

真菌毒素吸附剂的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 真菌毒素吸附剂的吸附率测定参考真菌毒素的加入量

毒素名称	吸附剂称样量 g	真菌毒素标准溶液浓度 μ g/mL	加入毒素体积 mL	吸附浓度 μ g/g	最终溶液中毒素浓度 μ g/mL
黄曲霉毒素B ₁	0.02	100	0.02	100	0.20
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.02	100	0.2	1000	2.00
玉米赤霉烯酮	0.02	100	0.1	500	1.00
赭曲霉毒素A	0.02	100	0.1	500	1.00
T-2毒素	0.02	100	0.1	500	1.00
伏马毒素B ₁	0.02	100	0.2	1000	2.00



附录 B

(资料性)

真菌毒素吸附剂吸附性能的快速测定 酶联免疫法

B.1 原理

将规定剂量的真菌毒素及饲料用真菌毒素吸附剂进行吸附处理,利用酶联免疫法测定。以吸附率和最大吸附量表示。

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 酶标仪。

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 真菌毒素吸附率(吸附浓度、pH值)吸附实验

做两份试验。平行做两份试验。取10 mL离心管,加入适量的真菌毒素标准溶液的一种(推荐参数参见附录A),用氮气吹干,准确称取0.02 g试样(精确至0.0001 g)置于离心管中),加入10 mL相应pH值的磷酸盐缓冲溶液,于37℃的恒温摇床上悬摇120 min,冷却至室温,10 000 r/min离心机上离心10 min,取上清液,备用。

另取1支空白离心管,不加试样,按上述操作进行,作为空白对照溶液。

B.5.2 真菌毒素最大吸附量实验

平行做两份试验。取6支10 mL离心管,加入0.01 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1 mL真菌毒素标准溶液的一种,用氮气吹干,分别准确称取0.02 g试样(精确至0.0001 g)于6支10 mL离心管中,加入10 mL相应的pH值磷酸盐缓冲溶液,于37℃的恒温摇床上悬摇120 min,冷却至室温,10 000 r/min离心机上离心10 min,取上清液,备用。

另取6支空白离心管,不加试样,按上述操作进行,作为空白对照溶液。

B.5.3 测定

分别取各组上清液(B5.1、B5.2)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%。



