



中 华 人 民 共 和 国 农 业 行 业 标 准

NY/T XXXXX—XXXX

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分 辨荧光免疫层析定量法

（公开征求意见稿）

Determination of deoxynivalenol in feeds—Time resolved fluorescence
immunochromatographic quantitative method

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：江苏省家禽科学研究所、上海雄图生物科技有限公司。

本文件主要起草人：施寿荣、汪劲能、肖蕴祺、沈一茹、张鹏飞、胡艳、张珊、陈静龙、郭长征、王宇、金雪霞、吴姝、陈婧瑛，李梦，蒋燊，谭祈峻。

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法

警示：脱氧雪腐镰刀菌烯醇具有细胞毒性，为了安全，试验人员操作时应戴手套、口罩等防护工具，在通风橱内操作。凡接触脱氧雪腐镰刀菌烯醇的容器，需浸入 4%次氯酸钠溶液，过夜后清洗。

1 范围

本文件描述了饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的时间分辨荧光免疫层析定量测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、植物性饲料原料和以植物性饲料原料为载体的混合型饲料添加剂中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

本文件的检出限为 40 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇与时间分辨荧光微球标记的特异性抗体结合后，抑制了层析过程中标记抗体与检测线脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗原的免疫反应，使检测线时间分辨荧光强度降低。通过检测线和质控线的时间分辨荧光强度比值和设定的基质匹配的标准曲线进行定量。

5 试剂或材料

除非另有规定外，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，二级。

5.2 磷酸盐缓冲溶液：取 2.178 g 十二水磷酸氢二钠、0.144 g 磷酸二氢钾、0.12 g 氯化钾、4.8 g 氯化钠，溶解于 1 000 mL 水中，混匀，用适量盐酸调 pH 至 6.8~7.2。

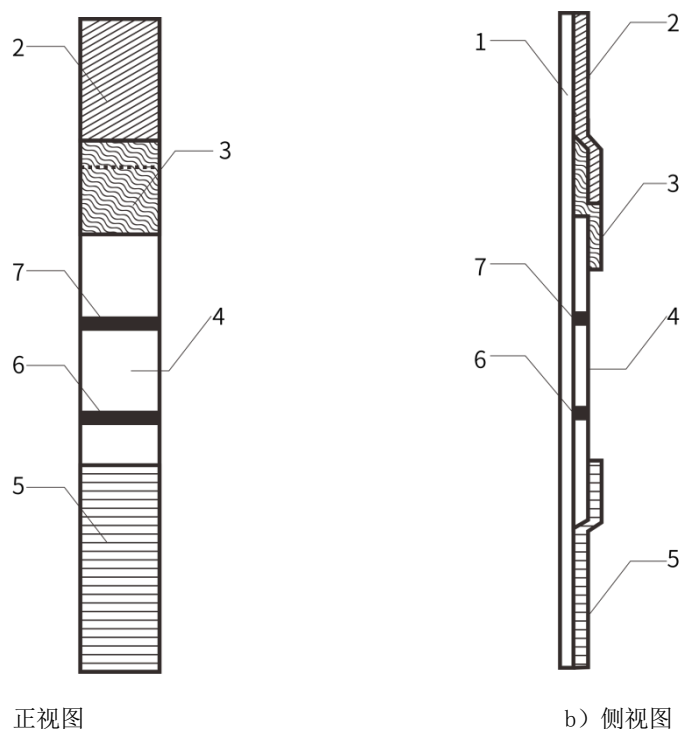
5.3 提取溶液：量取 800 mL 甲醇，用水定容至 1 000 mL，混匀。

5.4 稀释液：在 1 000 mL 磷酸盐缓冲溶液（5.2）中分别加入 2.5 g 蔗糖、1.0 g 牛血清白蛋白（BSA，纯度 $\geq$ 98%）和 2.0 g 吐温-20，混匀。

5.5 标准储备溶液（100 mg/L）：称取 1 g（精确至 0.000 01 g）脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品（CAS：51481-10-8，纯度不低于 98%）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解、定容，混匀。—18℃以下避光保存，有效期 3 个月。或购买有证标准物质。

5.6 标准中间溶液（10 mg/L）：准确移取 1 mL 标准储备溶液（5.5）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释、定容，混匀。2℃~4℃保存，有效期 1 个月。

5.7 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量试纸条结构图见图 1。



标引序号说明：

- 1 — 底板；
- 2 — 样品垫；
- 3 — 结合垫；
- 4 — 硝酸纤维素膜；
- 5 — 吸水垫；
- 6 — 质控线（C线）；
- 7 — 检测线（T线）。

图1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量试纸条结构示意图

6 仪器设备

- 6.1 时间分辨荧光免疫定量分析仪：激发波长 $365\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ 、发射波长 $615\text{ nm} \pm 5\text{ nm}$ 。
- 6.2 天平：精度 $0.000\ 01\text{ g}$ 和 0.01 g 。
- 6.3 涡旋振荡器：转速不低于 $2\ 000\text{ r/min}$ 。
- 6.4 离心机：转速不低于 $4\ 000\text{ r/min}$ 。
- 6.5 干式恒温孵育器： $37.0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

7 样品

按照 GB/T 20195 规定制备试样，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，备用。选取类型相同，均匀一致、且在待测物保留时间处，仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

称取 5.0 g 试样（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管中，准确加入 25 mL 提取液（5.3），涡旋振荡提取 5 min，4 000 r/min 离心 2 min，准确移取上清液 100 μL 于 2 mL 离心管中，加入 600 μL 稀释液（5.4），涡旋混合 1 min，待测。

同时制备基质空白试样溶液。

8.2 标准系列溶液制备

分别准确移取标准中间溶液（5.6）0 mL、0.01 mL、0.025 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL 于 5 mL 容量瓶中，用基质空白试样溶液（8.1）定容，混匀，制备成质量浓度为 0 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1 200 ng/mL、1 600 ng/mL、2 000 ng/mL 标准系列溶液，准确移取 100 μL 标准系列溶液于 2 mL 离心管中，加入 600 μL 稀释液（5.4），涡旋混合 1 min，待测。

8.3 测定

准确移取 100 μL 标准系列溶液（8.2）和试样溶液（8.1），加入试纸条加样孔中，37℃恒温孵育 6 min，上机(6.1)测定。以标准溶液浓度的对数值（Logc）为横坐标，检测线 T 荧光信号值与质控线 C 荧光信号值的比值（T/C）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。也可采用性能相当的标准曲线 ID 卡。试样溶液中待测物的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用提取溶液（5.3）稀释后，重新测定。

8.4 质量控制

若测定出现以下情况, 视为无效测定, 需重新试验。

- 1) 试纸条质控线 C 的荧光信号值小于 50;
- 2) 试纸条检测线 T 的荧光信号值为 0。

9 试验数据处理

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量 w 以质量分数计，数值以微克每千克（μg/kg）表示，按式（1）计算。

$$w = \frac{\rho \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——从标准曲线上查得的测定液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样溶液体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样溶液超出线性范围后的稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）。

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，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%。