ICS 点击此处添加ICS号

点击此处添加中国标准文献分类号

|  |
| --- |
|  |

DB34

安徽省地方标准

DB 34/ XXXXX—XXXX

|  |
| --- |
|  |

畜禽血清中AFB1生物标志物的测定—高效液相色谱法

Determination of AFB1 biomarker in animal serum—High performance liquid chromatographic method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

|  |
| --- |
|  |
|  |

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

安徽省市场监督管理局   发布

前  言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由安徽农业大学提出。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽农业大学，农业农村部猪肉质量安全控制重点实验室，望江县小月山农业发展有限公司，和县农业农村局，望江县畜牧兽医局，安徽省动物疫病预防与控制中心，安徽省农业科学院，宿松县春润食品有限公司。

本标准起草人：王希春，杨长根，高亚飞，陈祥国，赵家喜，王军，汤继顺，赵杰，吴金节，李玉，冯士彬，孙裴，涂健，冯江华。

畜禽血清中AFB1生物标志物的测定—高效液相色谱法

1. 范围

本标准规定了畜禽血清中黄曲霉毒素B1（AFB1）生物标志物高效液相色谱法测定的原理、试剂和设备、分析步骤、分析结果的表述、重复性、检出限与定量限、回收率。

本标准适用于畜禽血清中AFB1生物标志物的测定。

1. 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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实验方法

1. 原理

通过蛋白酶的消化作用，从血清白蛋白中释放出AFB1生物标志物（AFB1-Lysine），并采用固相萃取柱进一步浓缩。浓缩的AFB1生物标志物经高效液相色谱仪进行分离，在激发波长为405 nm和发射波长470 nm的荧光检测器中检测。

1. 试剂和设备
   1. 试剂

甲醇（CH3OH）：色谱纯。

磷酸二氢铵（NH4H2PO4）。

叠氮化钠（[NaN](https://www.baidu.com/s?wd=NaN3&tn=SE_PcZhidaonwhc_ngpagmjz&rsv_dl=gh_pc_zhidao" \t "https://zhidao.baidu.com/question/_blank)[3](https://www.baidu.com/s?wd=NaN3&tn=SE_PcZhidaonwhc_ngpagmjz&rsv_dl=gh_pc_zhidao" \t "https://zhidao.baidu.com/question/_blank)）。

白蛋白试剂（DMA）。

蛋白检测染料试剂浓缩液（考马斯亮蓝G-250）。

氯化钠（NaCl）。

磷酸氢二钠（Na2HPO4）。

磷酸二氢钾（KH2PO4）。

氢氧化铵（(NH4OH）。

甲酸（HCOOH）。

* 1. 设备
     1. 高效液相色谱仪，带荧光检测器。
     2. 固相萃取柱。
     3. 粒径5 µm C18高效液相色谱柱（250 × 4.6 mm）。
     4. 涡旋振荡器。
     5. 微量进样器。
     6. 天平：感量0.0001 g。
     7. pH计。
     8. 超低温冰箱。
     9. 离心机：转速≥4000 r/min。

1. 分析步骤

5.1 样品制备

采集新鲜血液5 mL，室温静置2 h，于4 ℃、3000 r/min离心15 min，取上清液转移至另一离心管中。

5.2 总蛋白及白蛋白含量测定

5.2.1 血清总蛋白浓度测定

4 ℃下取1 mg/mL蛋白标准品置于玻璃管中用于制备标准曲线，各管添加量见表 1；取待测血清5 μL至离心管中，加入95 μL水稀释样品，涡旋混合均匀，然后将4 μL稀释样品转移到预先添加796 μL色谱级用水的玻璃管中；向所有管中加入200 μL考马斯亮蓝G-250，室温下涡旋，混合均匀转移至待测试管中；以试管1作为空白，在595 nm的紫外波长下，使用分光光度计进行测量；记录标准品和样品的吸光度读数，根据标准吸光度制作标准曲线，由公式计算可得总蛋白浓度。

**表1 血清总蛋白标准曲线绘制**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 标准溶液(μL) | HPLC用水(μL) | 标准(μg) |
| 1 | 0 | 800 | 0 |
| 2 | 2 | 798 | 2 |
| 3 | 4 | 796 | 4 |
| 4 | 6 | 794 | 6 |
| 5 | 8 | 792 | 8 |
| 6 | 10 | 790 | 10 |
| 7 | 15 | 785 | 15 |

血清总蛋白含量计算公式见（1）（2）（3）：

标准曲线: y = ax + b……………………………………………………(1)

X ——— (A - b) / a（μg）………………………………………………(2)

150 μL血清总蛋白浓度 C=X μg/mL×20×250×150 μL /1000（μg）.............................………(3)

式中：

X ———待测血清中总蛋白含量（μg）；

A ———待测血清吸光度读数。

5.2.2 血清白蛋白含量测定

4 ℃下取4 g/dL蛋白标准品溶液置于玻璃管中用于制备标准曲线，各管添加量见表2；取待测血清10 μL置于一个单独的玻璃管，并在管内加10 μL色谱级用水；向所有管中加入1 mL DMA，室温下涡旋；混合均匀转移至待测试管中，以试管1作为空白，在630 nm的紫外波长下，使用分光光度计进行测量；记录标准品和待测血清的吸光度读数，根据标准吸光度制作标准曲线，由公式计算可得血清白蛋白含量。

**表2 血清白蛋白标准曲线制备**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 标准品溶液(μL) | HPLC用水(μL) | 标准品(μg) |
| 1 | 0 | 20 | 0 |
| 2 | 2.5 | 17.5 | 100 |
| 3 | 5 | 15 | 200 |
| 4 | 7.5 | 12.5 | 300 |
| 5 | 10 | 10 | 400 |
| 6 | 15 | 5 | 600 |
| 7 | 20 | 0 | 800 |

150 μL血清白蛋白计算公式见（1）（2）（4）：

标准曲线: y = ax + b……………………………………………………(1)

X ——— (A - b) / a（μg）………………………………………………(2)

150 μL血清白蛋白浓度= X / 10 × 150（μg）……………………………………(4)

式中：

X ———10 μL待测血清中白蛋白含量（μg）；

A ———待测血清吸光度读数。

5.3 蛋白质消化

在离心管中添加150 μL血清和10 mg/mL蛋白酶（附录A.1.7），血清与蛋白酶比例为1:4，酶需要量为血清总蛋白含量C/1000/4/10（mL），37 ℃水浴中孵育3 h，确保水位正确，样品在摇床上消化3 h。

5.4 净化

加入1 mL水、1 mL甲醇激活平衡固相萃取柱，自然流出，加入待测血清，然后以1.0 ml/min的流速顺序加入1 mL水两次、1 mL甲醇-水溶液（附录A.1.4）和氢氧化铵（附录A.1.8）洗涤，在0.5 mL甲醇中洗脱后真空干燥，随后用甲酸-水溶液（附录A.1.5）在甲醇中洗脱纯化两次，干燥55 min。

注：由于不同厂商提供的固相萃取柱操作程序可能不同，实际操作时，请参照厂商提供的操作说明和程序使用。

5.5 溶解

向待测血清中加入150 μL甲醇-水溶液（附录A.1.3），离心机转速4000 r/min，离心5 min，涡旋5 min，在2 min内进样分析。

5.6 仪器参考条件

色谱柱：C18柱，250 mm×4.6 mm，5 μm 或相当者。

检测波长：激发波长405 nm，发射波长470 nm。

流动相：A相:磷酸二氢铵（附录A.1.1），含叠氮化钠（附录A.1.2）；B相:甲醇。梯度洗脱，洗脱程序见表 3。

流速：1.0 ml/min。

柱温：25 ℃。

进样量：150 μL。

**表3 流动相洗脱程序**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 时间min | 流动相A % | 流动相B % |
| 0 | 30 | 70 |
| 5 | 30 | 70 |
| 15 | 65 | 35 |
| 18 | 65 | 35 |
| 20 | 30 | 70 |
| 25 | 30 | 70 |

5.7 试样溶液的测定

在5.6色谱条件下，将150.0 μL AFB1生物标志物标准工作溶液（附录A.2.2）按浓度从低到高依次注入高效液相色谱仪，AFB1生物标志物标准品色谱图参考附录B；待仪器条件稳定后，以目标物质的浓度为横坐标（x 轴），目标物质的峰面积为纵坐标（y 轴），对各个数据点进行最小二乘线性拟合，标准工作曲线见公式（4）：

y = ax -b ……………………………………………………(5)

式中：

y ———目标物质的峰面积比；

a ———回归曲线的斜率；

x ———目标物质的浓度；

b ———回归曲线的截距。

标准工作溶液和样液中待测物的响应值均应在仪器线性响应范围内，如果样本含量超过标准曲线范围，需稀释后再测定。

5.8 空白试验

不加入试样，按5.3、5.4和5.5的步骤做空白实验。确认不含有干扰待测组分的物质。

1. 分析结果的表述

样品分析见公式（6）：

X=3………………………………………………(6)

式中：

X ———待测血清白蛋白中AFB1生物标志物的含量，单位为皮克每毫克（pg/mg）；

ci ———待测物进样液中AFB1生物标志物的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ———定容体积，单位为毫升（mL）；

f ———试液稀释倍数；

m ———150.0 μL白蛋白含量，单位为毫克（mg）。

注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

1. 重复性

血清样本中AFB1生物标志物含量在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

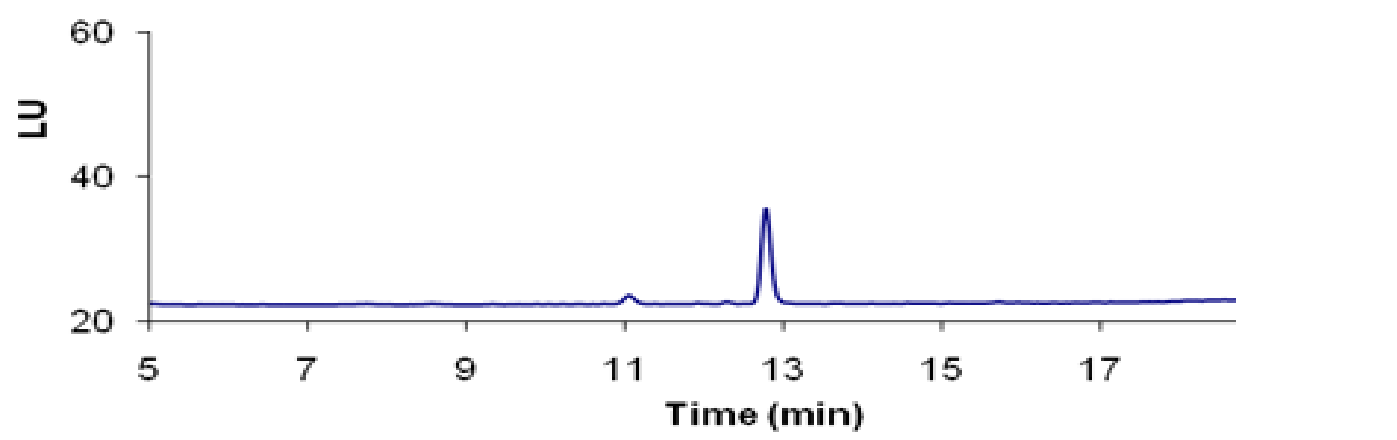
1. 检出限与定量限

本方法中血清AFB1生物标志物的最低检出限为0.02 ng/mL，定量限为1.0 ng/mL。

1. 回收率

添加浓度在0.5 ng/mL~1.0 ng/mL时，回收率在75~94 %之间。

1. （规范性附录）
   1. 溶液配制
      1. 磷酸二氢铵（20 mmol/L，pH7.2）:精密称定2.3g无水磷酸二氢铵，溶于1000 mL水中，用氨水调PH至7.2，混合均匀。
      2. 叠氮化钠（0.001 %）：精密称定叠氮化钠1.0 mg，溶于100 mL水，混合均匀。
      3. 甲醇-水溶液（25+75）：分别量取250 mL甲醇和750 mL水，混合均匀。
      4. 甲醇-水溶液（70+30）：分别量取700 mL甲醇和300 mL水，混合均匀。
      5. 甲酸-水溶液（2+98）：分别量取20 mL甲酸和980 mL水，混合均匀。
      6. 磷酸盐缓冲液（PBS）：精密称定8.0 g氯化钠、1.2 g磷酸氢二钠、0.2 g磷酸二氢钾、0.2 g氯化钾，用980 mL水溶解，然后用盐酸调整pH至7.4，最后用水稀释至1000 mL，混合均匀。
      7. 蛋白酶(蛋白质：总蛋白：1:4，w / w)：称取链霉蛋白酶置于离心管中，将其重量（mg）除以10后，加入等量的PBS。不用时放入冰箱。
      8. 氢氧化铵-水溶液（1+99）：分别量取10 mL氢氧化铵和990 mL水，混合均匀。
   2. AFB1生物标志物标准溶液配制
      1. 标准储备溶液（0.1 mg/mL）：精密称定AFB1-Lysine标准品（纯度≥95%）0.01g（精确至0.0001 g）至小烧杯中，用甲醇-水溶液（A.1.3）溶解，并转移至100 mL容量瓶中，定容至刻度。此溶液密封后-20℃避光保存。有效期6个月。
      2. 标准工作液：准确吸取标准溶液，用甲醇-水溶液（A.1.4）稀释，配制成AFB1-Lysine浓度依次为0.02 ng/mL、0.05 ng/mL、0.10 ng/mL、0.20 ng/mL、0.50 ng/mL、1.00 ng/mL的标准工作溶液。
2. （资料性附录） AFB1生物标志物标准品的液相色谱图



AFB1生物标志物标准品色谱图

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_