



中华人民共和国国家标准

GB/T 19540—2004

饲料中玉米赤霉烯酮的测定

Determination of zearalenone in feeds

2004-06-10 发布

2004-10-01 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

前 言

本标准参考国内外有关标准、文献,经研究、改进和验证后制定。本标准非等效于 AOAC(美国公职分析化学家协会)1988 年最后通过的玉米中玉米赤霉烯酮的薄层色谱法和 1994 年首次通过的玉米、大麦、饲料中玉米赤霉烯酮的酶联免疫吸附测定法。其中薄层色谱测定方法为仲裁方法,酶联免疫吸附测定方法为快速筛选方法。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准由江苏省微生物研究所负责起草。

本标准主要起草人:宓晓黎、丁贵平、李利东、袁建兴、成恒嵩。

饲料中玉米赤霉烯酮的测定

1 范围

本标准规定了玉米赤霉烯酮(zearalenone,以下简称ZEN)的薄层色谱测定方法和酶联免疫吸附测定法。

本标准适用于配合饲料和饲用谷物原料中ZEN的测定。

薄层色谱测定方法的最低检测量为20 ng,酶联免疫吸附测定方法的最低检测量为0.25 ng。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料采样方法

3 薄层色谱法(仲裁法)

3.1 原理

试样中ZEN用三氯甲烷提取,提取液经液-液萃取、浓缩,然后进行薄层色谱分离,限量定量,或用薄层扫描仪测定荧光斑点的吸收值,外标法定量。

3.2 试剂与材料

所用试剂除另有规定,均使用分析纯试剂。水符合GB/T 6682中一级水的规定。

3.2.1 三氯甲烷。

3.2.2 40 g/L氢氧化钠溶液:称取4 g氢氧化钠,加水适量溶解,用水稀释至100 mL。

3.2.3 磷酸溶液(1+10)。

3.2.4 磷酸溶液(1+19)。

3.2.5 无水硫酸钠:650℃灼烧4 h,冷却后贮于干燥器中备用。

3.2.6 展开剂:三氯甲烷-丙酮-苯-乙酸(18+2+8+1)。

3.2.7 显色剂:20 g氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)溶于100 mL乙醇中。

3.2.8 薄层板:称取4 g硅胶G,置于乳钵中加10 mL 0.5%羧甲基纤维素钠水溶液研磨至糊状。立即倒入薄层板涂布器内制备成10 cm×20 cm、厚度0.3 mm的薄层板,在空气中干燥后,用甲醇预展薄层板至前沿,吹干,标记方向,在105℃~110℃活化1 h,置于干燥器内保存备用。

3.2.9 ZEN标准储备溶液

警告:

1 凡接触ZEN的容器,需浸入4%次氯酸钠(NaOCl)溶液,半天后清洗备用。

2 为了安全,分析人员操作时要带上医用乳胶手套。

称取适量的ZEN标准品,用甲醇配制成约100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ZEN标准储备溶液。避光,于-5℃以下储存。

标准储备液的浓度,用1 cm石英比色杯,以甲醇为参比,在ZEN的最大吸收峰波长314nm处,测定吸光度值A。储备液中ZEN的含量(X_1)以微克每毫升(1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)表示,按式(1)计算。

$$X_1 = \frac{A \times M \times 100}{\epsilon \times \delta} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- A——测定的吸光度值;
- M——ZEN 的摩尔质量(M=318 g/mol);
- ϵ ——ZEN 在甲醇中的分子吸收系数($\epsilon=600 \text{ m}^2/\text{mol}$);
- δ ——比色杯的光径长度,单位为厘米(cm)。

3.2.10 ZEN 标准工作溶液:根据计算的标准储备液的浓度,精密吸取标准储备液(3.2.9)适量,用三氯甲烷稀释成浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液。

3.3 仪器与设备

- 3.3.1 小型粉碎机。
- 3.3.2 电动振荡器。
- 3.3.3 薄层板涂布器。
- 3.3.4 玻璃器皿:分液漏斗、漏斗。所有玻璃器皿均用稀盐酸浸泡,依次用自来水、蒸馏水冲洗。
- 3.3.5 旋转蒸发器:配有 200 mL 心形瓶。
- 3.3.6 慢速滤纸。
- 3.3.7 展开槽:250 mm \times 150 mm \times 50 mm(立式,具磨口)。
- 3.3.8 点样器:1 μL ~99 μL 。
- 3.3.9 紫外光灯:波长 254 nm,365 nm。
- 3.3.10 薄层色谱扫描仪:配有汞灯光源。

3.4 试样制备

按 GB/T 14699.1 饲料采样方法取得试样,四分法浓缩减取约 200 g,经粉碎,混匀,装入磨口瓶中备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 试样处理

称取约 20 g 试样(3.4)(精确至 0.01 g),置于具塞锥形瓶中,加入 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷,盖紧瓶塞,在振荡器上振荡 1 h,加入 10 g 无水硫酸钠,混匀,过滤,量取 50 mL 滤液于分液漏斗中,沿管壁慢慢地加入氢氧化钠溶液(3.2.2)10 mL,并轻轻转动 1 min,静置使分层,将三氯甲烷相转移至第二个分液漏斗中,用氢氧化钠溶液(3.2.2)10 mL,重复提取 1 次,并轻轻转动 1 min,弃去三氯甲烷层,氢氧化钠溶液层并入原分液漏斗中,用少量蒸馏水淋洗第二个分液漏斗,洗液倒入原分液漏斗中,再用 5 mL 三氯甲烷重复洗 2 次,弃去三氯甲烷层。向氢氧化钠溶液层中加入 6 mL 磷酸溶液(3.2.3)后,再用磷酸溶液(3.2.4)调节 pH 值至 9.5 左右,于分液漏斗中加入 15 mL 三氯甲烷,振摇,将三氯甲烷层经盛有约 5 g 无水硫酸钠的慢速滤纸的漏斗中,滤于浓缩瓶中,再用 15 mL 三氯甲烷重复提取 2 次,三氯甲烷层一并滤于浓缩瓶中,最后用少量三氯甲烷淋洗滤器,洗液全部并于浓缩瓶中,真空浓缩至小体积,将其全量转移至具塞试管中,在氮气流下蒸发至干,用 2 mL 三氯甲烷溶解残渣。摇匀,供薄层色谱点样用。

3.5.2 点样

在距薄层板下端 1.5 cm~2 cm 的基线上,以 1 cm 的间距,用点样器依次点标准工作溶液(3.2.10) 2.5 μL 、5 μL 、10 μL 、20 μL (相当于 50 ng、100 ng、200 ng、400 ng)和试样液(3.5.1)20 μL 。

3.5.3 展开

将薄层板放入有展开剂(3.2.6)的展开槽中,展至离原点 13 cm~15 cm 处,取出,吹干。

3.5.4 观察与确证

将展开后的薄层板置于波长 254 nm 紫外光灯下,观察与 ZEN(50 ng)标准点比移值相同处的试样的蓝绿色荧光点。若相同位置上未出现荧光点,则试样中的 ZEN 含量在本测定方法的最低检测量

500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。如果相同位置上出现荧光点,用显色剂(3.2.7)对准各荧光点进行喷雾,130 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min,然后在365 nm紫外光线下,观察荧光点由蓝绿色变为蓝紫色,且荧光强度明显加强,可确定试样中含有ZEN。于荧光点下方用铅笔标记,待扫描定量测定。

3.5.5 定量测定

3.5.5.1 薄层扫描工作条件

光源:高压汞灯。

激发波长:313 nm;发射波长:400 nm。

检测方式:反射。

狭缝:可根据斑点大小进行调节。

扫描方式:距齿扫描。

3.5.5.2 标准曲线绘制

以ZEN标准工作溶液质量(ng)为横坐标,以峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线。

3.6 结果计算和表述

根据试样液荧光斑点峰面积积分值从标准曲线上查出对应的ZEN质量(ng),试样中ZEN的含量(X)以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按(2)式计算。

$$X = \frac{m_1 \times V_1}{m_0 \times V_2} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

V_1 ——试样液(3.5.1)最后定容体积,单位为微升(μL);

V_2 ——试样液点样体积,单位为微升(μL);

m_1 ——从标准曲线上查得试样液点上对应的ZEN质量,单位为纳克(ng);

m_0 ——最后提取液相当试样的质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位有效数字。

3.7 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的相对差值不大于10%。

4 酶联免疫吸附测定法(快速筛选法)

4.1 原理

方法的检测依据是抗原-抗体反应。将ZEN抗体的羊抗体吸附在固相载体表面,加入ZEN抗体、酶标ZEN结合物、ZEN标准或试样液,在ZEN抗体与固相载体表面羊抗体结合的同时,游离的ZEN、酶标ZEN结合物与结合在固体表面的ZEN抗体竞争,未结合的酶标ZEN结合物洗涤除去。加入酶底物,在结合酶的催化作用下,无色底物降解产生蓝色物质。加入终止剂后颜色转变为黄色。通过酶标检测仪,在450 nm波长处测吸收值。吸光强度与试样中ZEN的浓度成反比。

酶联免疫吸附测定法具有操作简单,快速灵敏,结果可靠的特点。目前有专门测定ZEN的酶联免疫检测试剂盒的商品。在分析时适当参考操作说明书。

4.2 试剂与材料

4.2.1 包被抗体的聚苯乙烯微量反应板24孔或48孔。

4.2.2 70%的甲醇溶液。

4.2.3 标准品溶液:精密吸取标定后的标准储备液(3.2.9)适量,用甲醇溶液(4.2.2)配制成ZEN标准品溶液1~5,浓度分别为0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、15 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、45 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、135 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

4.2.4 酶标抗原溶液:ZEN与辣根过氧化物酶结合物。

4.2.5 抗体溶液:抗ZEN抗体。

4.2.6 柠檬酸缓冲溶液 [$c(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) = 0.1 \text{ mol}/\text{L}$, $\text{pH} = 4.0$]:称取10.1471 g柠檬酸钠

($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 13.764 2 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)加水溶解至 1 L。

4.2.7 底物溶液甲, 四甲基联苯胺, 用柠檬酸缓冲溶液(4.2.6)配成浓度为 0.4 g/L。

4.2.8 底物溶液乙: 取 1.5 mL 30%过氧化氢, 用柠檬酸缓冲溶液(4.2.6)稀释至 1 L。

4.2.9 底物溶液: 底物溶液甲与底物溶液乙 1:1 的混合液。

4.2.10 终止液: 硫酸溶液(1+17)。

4.3 仪器与设备

4.3.1 酶标检测仪, 带 450 nm 波长。

4.3.2 小型粉碎机。

4.3.3 50 μL 、100 μL 、1 000 μL 微量移液器。

4.3.4 电动振荡器。

4.3.5 玻璃器皿: 50 mL 锥形瓶、漏斗、量筒。

4.3.6 快速滤纸。

4.4 试样制备

同 3.4。

4.5 分析步骤

4.5.1 试样处理

称取约 5 g 试样(4.4)(精确至 0.01 g), 置于 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 25 mL 甲醇溶液(4.2.2), 密塞。振荡器提取 10 min。提取液通过快速滤纸过滤。取 1.0 mL 滤液, 加 19.0 mL 蒸馏水稀释, 摇匀, 为试样液。

4.5.2 分析前注意事项

分析前将所有试剂平衡至室温; 分析后立即将所有试剂放回 2℃~8℃冰箱; 在所有培育中, 避光, 盖上微孔板盖。

4.5.3 定位

根据需要设定限量法(见表 1)和定量法(见表 2)。取足够数量的微孔置微孔架上, 标准品和试样做两个平等实验, 记录标准品孔和试样孔的位置。限量法时控制标准品孔号中的浓度为限量值/稀释因子, 并通过调节稀释因子使之浓度在 0~135 $\mu\text{g/L}$ 范围内。

表 1 限量法微孔定位

孔 号											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
标准品溶液 1 (0 $\mu\text{g/L}$)	标准品溶液 2 (5 $\mu\text{g/L}$)	待测试样液									

表 2 定量法微孔定位

孔 号											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
标准品溶液 1~5					待测试样液						
0 $\mu\text{g/L}$	5 $\mu\text{g/L}$	15 $\mu\text{g/L}$	45 $\mu\text{g/L}$	135 $\mu\text{g/L}$							

4.5.4 加试剂

在每孔中依次加入试剂; 加入 50 μL 标准溶液(4.2.3)或试样液(4.5.1)至相应微孔中; 加入 50 μL 酶标结合物(4.2.4)到每个微孔中; 再加入 50 μL ZEN 抗体(4.2.5)到每个微孔中。

4.5.5 反应

将酶标板轻轻摇晃, 使孔中的试剂摇匀, 置温度 18℃~30℃培育反应 10 min。

4.5.6 洗涤

将微孔中液体倾到到水池内,倒置微孔支架,在干净纸巾上轻拍,除去所有残留的液体,用移液器加蒸馏水 250 μL 到每个微孔中,洗板,放置 2 min,再排空液体,重复洗涤 3 次。

4.5.7 显色

加 100 μL 底物溶液(4.2.9)到每孔中,充分摇匀,置 18 $^{\circ}\text{C}$ ~30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中,反应 5 min。

4.5.8 终止

加 100 μL 终止液(4.2.10)到每孔中,摇匀。

4.5.9 测定

在 450 nm 处,以空气为空白调零,测定吸收值。在 60 min 内读数。

4.6 结果计算和表述

4.6.1 限量法

若试样孔的吸收值小于标准品孔的吸收值,即 $A_{\text{试样孔}} < A_{\text{标准孔}}$,超过限量值,为阳性。若试样孔的吸收值大于或等于标准孔的吸收值,即 $A_{\text{试样孔}} \geq A_{\text{标准孔}}$,则小于或等于所设限量值,为阴性。

限量值为标准值($\mu\text{g}/\text{L}$)乘以稀释因子。按 4.5.1 操作,稀释因子为 100,若控制标准值为 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,试样中 ZEN 的限量在 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

4.6.2 定量法

百分吸收值:所得的标准或试样的吸收值除以第一个标准(0 标准)的吸收值再乘以 100,作为百分吸收值 $A\%$,按式(3)计算。

$$A\% = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

A ——标准品或试样的吸收值;

A_0 ——空白的吸收值。

标准曲线的绘制:所计算的百分吸收值对应 ZEN 浓度($\mu\text{g}/\text{L}$)的半对数坐标作标准曲线图,曲线在 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~135 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内应当成线性。根据试样的百分吸收值,通过标准曲线,查得相对应浓度。试样中 ZEN 的含量(X)以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(4)计算。

$$X = \frac{c \times V \times n}{m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

c ——从标准曲线上查得相对应试样提取液(4.5.1)中 ZEN 浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——试样提取液(4.5.1)体积,单位为毫升(mL);

n ——试样稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位有效数字。

4.7 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的相对差值不大于 15%。