



中华人民共和国国家标准

GB/T 21033—2007

饲料中免疫球蛋白 IgG 的测定 高效液相色谱法

Determination of immunoglobulin in feeds—
High-performance liquid chromatography

2007-06-21 发布

2007-09-01 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

饲料中免疫球蛋白 IgG 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱仪测定饲料中免疫球蛋白 IgG 含量的方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、含 IgG 的饲料原料(包括血浆蛋白粉等)中免疫球蛋白 IgG 的测定。最低检出限为 5 μg (取样 1 g,最低检出浓度为 5 mg/kg)。

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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

根据高效亲和色谱的原理,在磷酸盐缓冲液条件下免疫球蛋白 IgG 与配基连接,在 pH2.5 的盐酸甘氨酸条件下洗脱免疫球蛋白 IgG。

4 试剂

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,水为去离子水或相当纯度的水,应符合 GB/T 6682 二级用水的规定。

4.1 磷酸二氢钾。

4.2 磷酸氢二钾。

4.3 流动相 A: pH6.5, 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液。

4.4 流动相 B: pH2.5, 0.05 mol/L 甘氨酸盐酸缓冲液。

4.5 IgG 储备标准液:

称取 IgG 标准品(纯度 $\geq 95\%$)0.010 0 g,用流动相 A(4.3)溶解并定容至 10.0 mL,摇匀,浓度为 1.0 mg/mL。

4.6 IgG 工作标准溶液:

取 IgG 标准储备液,用流动相 A(4.3)稀释成含 IgG 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/mL 的标准系列。临用时配制。

5 仪器和设备

5.1 实验室常用仪器设备。

5.2 pH 计。

5.3 超纯水装置。

5.4 匀浆机。

5.5 高效液相色谱仪：具紫外检测器和梯度洗脱装置。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 采样，按 GB/T 20195 选取饲料样品至少 500 g，四分法缩减至少 100 g，磨碎，通过 0.28 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器中，避光低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 试样处理

称取一定量试样(精确至 0.000 1 g)(配合饲料、浓缩饲料称取试样 2 g~5 g；血浆蛋白粉称取试样 0.1 g；鸡蛋粉称取试样 0.5 g)于茄形瓶中，准确加入 25.0 mL 流动相 A(4.3)，用匀浆机匀浆 5 min，取溶液 10 mL 于离心管中，以 1 000 g(3 500 r/min)离心 10 min。通过 0.45 μm 微孔滤膜后进样。

7.2 测定

7.2.1 HPLC 测定参数的设定

色谱柱：Pharmacia HI-Trap Protein G 柱，1 mL。

波长：280 nm。

进样量：20 μL。

7.2.2 梯度洗脱条件

梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0	0.5	100	0
4.5	0.5	100	0
5.5	0.5	0	100
15.0	0.5	0	100
18.5	0.5	100	0
26.0	0.5	100	0

7.2.3 测定

7.2.3.1 先用 5 倍柱体积的重蒸馏水或去离子水洗柱，再用 10 倍柱体积流动相 A(4.3)平衡柱，按洗脱程序进行洗脱。

7.2.3.2 分别取 7.1 试样处理液和 4.6 标准工作液进行测定。以色谱峰面积积分值做单点或多点校准定量。

8 结果计算

8.1 试样中 IgG 含量 ω，以质量分数表示，数值以 % 表示，按式(1)计算：

$$\omega = \frac{P_i \times V \times c \times V_{st} \times 100}{P_{st} \times m \times V_i \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

P_i——试样峰面积值；

V——试样体积，单位为毫升(mL)；

c——标准工作液(4.6)中 IgG 的浓度，单位为毫克每毫升(mg/mL)；

V_{st}——标准工作液进样体积，单位为微升(μL)；

P_{st}——标准工作液峰面积值；

m——称取试样的质量，单位为克(g)；

V_i ——试样进样体积,单位为微升(μL)。

8.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留小数点后两位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的测定值的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。
