



中华人民共和国国家标准

GB/T 28716—2012

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

Determination of zearalenone in feed—High performance liquid chromatographic
method with immunoaffinity column clean-up

2012-09-03 发布

2013-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所、农业部饲料质量监督检验中心(南昌)、浙江大学饲料科学研究所、北京中检维康技术有限公司、北京市兽药饲料监察所。

本标准主要起草人:饶正华、李兰、果旗、文虹、余东游、王雄、魏秀莲、孙志文。

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

1 范围

本标准规定了饲料中玉米赤霉烯酮含量的免疫亲和柱净化高效液相色谱的测定方法。

本标准适用于饲料中玉米赤霉烯酮的测定。

本标准的检测限为 $2\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 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

试样经乙腈水提取后, 提取液用磷酸盐缓冲溶液稀释, 用免疫亲和柱进行净化。净化提取液用反相高效液相色谱荧光检测器进行测定, 外标法定量。

4 试剂

除非另有说明, 所有试剂均为分析纯; 实验室用水符合 GB/T 6682 中二级水规定, 标准溶液和流动相用水符合一级水规定。

4.1 乙腈: 色谱纯。

4.2 甲醇: 色谱纯。

4.3 氢氧化钠溶液: $c(\text{NaOH}) = 0.2\ \text{mol/L}$ 。

4.4 提取剂——乙腈+水(8+2): 将 800 mL 乙腈(4.1)与 200 mL 水混合均匀。

4.5 磷酸盐缓冲溶液(PBS): 将 8 g 氯化钠、1.16 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾溶解至 1 000 mL 水中, 用氢氧化钠溶液(4.3)调节 pH 至 7.4。

4.6 玉米赤霉烯酮标准品, 玉米赤霉烯酮含量 $\geq 99.5\%$ 。

4.7 流动相: 量取 460 mL 乙腈(4.1)至 1 000 mL 的容量瓶中, 加入 460 mL 水和 80 mL 甲醇(4.2)。混合均匀并通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜, 备用。

4.8 玉米赤霉烯酮标准储备液($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$): 称取 5.0 mg 玉米赤霉烯酮标准品(精确至 0.1 mg)于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈(4.1)溶解并定容至刻度。此标准储备液在冷冻($-18\ ^\circ\text{C}$)密封情况下保存, 可使用 1 年。

4.9 玉米赤霉烯酮标准中间液($5.0\ \mu\text{g}/\text{mL}$): 准确移取 10.0 mL 玉米赤霉烯酮标准储备液(4.8)于 100 mL 容量瓶中, 用乙腈(4.1)稀释并定容至刻度。该溶液保存于 $2\ ^\circ\text{C} \sim 8\ ^\circ\text{C}$ 冰箱里, 可使用 6 个月。

4.10 玉米赤霉烯酮标准工作液:玉米赤霉烯酮标准中间液用流动相(4.7)稀释,制备5个玉米赤霉烯酮标准浓度的溶液。准确移取适量玉米赤霉烯酮标准中间液,用流动相(4.7)稀释成浓度分别为0.02 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.10 $\mu\text{g/mL}$ 、0.50 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液。玉米赤霉烯酮标准工作液储藏在2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱里,可使用6个月。

5 仪器和设备

除实验室常用设备外,还需要以下仪器和设备:

- 5.1 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱:柱容量 $\geq 2 \mu\text{g}$ 玉米赤霉烯酮。
- 5.2 振荡器:200 r/min。
- 5.3 氮吹仪:30 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.4 高速均质器:18 000 r/min~22 000 r/min。
- 5.5 高效液相色谱仪:配有荧光检测器。
- 5.6 真空装置或空气压力泵:能与免疫亲和柱配合使用。
- 5.7 玻璃微纤维滤纸:直径11 cm、孔径1.5 μm ,无荧光特性。
- 5.8 试验筛:1 mm孔径。

6 试样制备

按GB/T 14699.1采样;按GB/T 20195制备样品,实验室样品应能完全通过1 mm试验筛(5.8)。

7 分析步骤

7.1 提取

称取试样40.0 g于250 mL具塞锥形瓶中,加入4.0 g氯化钠及100.0 mL提取剂(4.4),于振荡器(5.2)上振荡60 min,或于高速匀质器(5.4)匀质2 min后,用定量滤纸过滤,准确移取10.0 mL滤液并加入40.0 mL PBS溶液(4.5)稀释,用玻璃纤维滤纸(5.7)过滤1次~2次,至滤液澄清,备用。

7.2 净化

将免疫亲和柱连接于10.0 mL玻璃注射器下。准确移取10.0 mL样品提取液(7.1)注入玻璃注射器中,将空气压力泵(5.6)与玻璃注射器连接,调节压力使溶液以不大于2 mL/min流速缓慢通过免疫亲和柱,抽干。

分别以10.0 mL纯水淋洗柱子两次(对颜色较重的样品,第一次改用10.0 mL 10%甲醇水溶液清洗柱子一次),保持流速不大于2 mL/min~3 mL/min,并抽干。

准确加入1.5 mL甲醇(4.2)洗脱,流速不大于2 mL/min,收集洗脱液于55 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,用1.0 mL流动相(4.7)溶解残渣,涡旋混匀,过0.45 μm 滤膜,上机测定。

注:玉米赤霉烯酮免疫亲和柱的使用要求按厂家说明执行。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱测定参考条件

7.3.1.1 色谱柱: C_{18} 柱,长150 mm,内径4.6 mm,粒度5 μm ,或相当者。

7.3.1.2 流动相:见4.7。

- 7.3.1.3 流速:0.8 mL/min。
- 7.3.1.4 检测波长:激发波长 274 nm;发射波长 440 nm。
- 7.3.1.5 进样量:20 μL。
- 7.3.1.6 柱温:30 ℃。

7.3.2 色谱测定

分别取相同体积样液和标准溶液注入高效液相色谱仪,在上述色谱条件下测定试样的响应值(峰高或峰面积)。经过与玉米赤霉烯酮标准溶液谱图比较响应值得到试样中玉米赤霉烯酮的浓度。标准品色谱图参见图 A.1。

8 结果

8.1 计算

试样中玉米赤霉烯酮含量以质量分数 X 计,单位为微克每千克(μg/kg),按式(1)计算:

$$X = \frac{P_i \times V \times c_{st} \times V_{st}}{P_{st} \times m \times V_i} \times 10^3 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- P_i —— 试样溶液峰面积值;
- V —— 样品的总稀释体积,单位为毫升(mL);
- c_{st} —— 标准溶液浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_{st} —— 标准溶液进样体积,单位为微升(μL);
- P_{st} —— 标准溶液峰面积平均值;
- m —— 试样质量,单位为克(g);
- V_i —— 试样溶液进样体积,单位为微升(μL)。

8.2 结果表示

检测结果以两次测定值的算术平均值表示;计算结果表示到小数点后一位。

9 重复性

在重复性条件下,获得的玉米赤霉烯酮的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的15%。

附录 A
(资料性附录)

玉米赤霉烯酮标准品色谱图

玉米赤霉烯酮标准溶液(200 $\mu\text{g/mL}$)的色谱图见图 A.1。

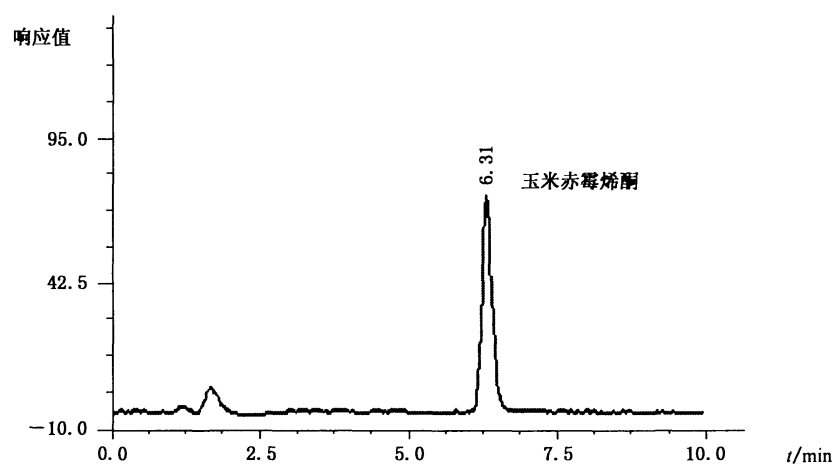


图 A.1 玉米赤霉烯酮标准溶液(200 $\mu\text{g/mL}$)色谱图