



中华人民共和国国家标准

GB/T 30957—2014

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

Determination of ochratoxin A in feeds—
High performance liquid chromatography with immunoaffinity column clean-up

2014-07-08 发布

2015-01-10 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。

本标准由农业部饲料质量监督检验测试中心(南昌)、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所负责起草。

本标准主要起草人:饶辉、文虹、周华娇、符金华、徐田放、饶正华、尹腾桂、杨琳芬、邢磊、赵薇娜、赵志辉。

饲料中赭曲霉毒素 A 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赭曲霉毒素 A 的免疫亲和柱净化-高效液相色谱测定方法。
本标准适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料中赭曲霉毒素 A 的测定。
本标准定量限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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

试样经过甲醇-水提取,提取液经过滤、稀释后,滤液经过含有赭曲霉毒素 A 特异抗体的免疫亲和层析柱层析净化,用 PBS 缓冲液和纯水清洗,甲醇洗脱,洗脱液通过带荧光检测器的高效液相色谱仪测定赭曲霉毒素 A 的含量。

4 试剂

除特殊说明外,所用试剂均为分析纯试剂,用水符合 GB/T 6682 中二级用水的规定。

4.1 甲醇:色谱级。

4.2 乙腈:色谱级。

4.3 氯化钠。

4.4 磷酸氢二钠。

4.5 磷酸二氢钾。

4.6 氯化钾。

4.7 盐酸。

4.8 碳酸氢钠。

4.9 吐温-20(Tween-20)。

4.10 乙酸。

4.11 清洗缓冲液:将 25 g 氯化钠(4.3)、5 g 碳酸氢钠(4.8)溶于水中,加入 0.1 mL 吐温-20(4.9),加水稀释至 1 L。

4.12 PBS 缓冲液:称取 8.0 g 氯化钠(4.3)、1.2 g 磷酸氢二钠(4.4)、0.2 g 磷酸二氢钾(4.5)、0.2 g 氯化钾(4.6)溶于 900 mL 水中,用浓盐酸(4.7)调节 pH 值至 7.0,用水定容为 1 L。

4.13 提取液:甲醇+水(8+2):将 800 mL 甲醇(4.1)与 200 mL 水混合均匀。

4.14 HPLC 流动相:量取 495 mL 乙腈(4.2)至 1 000 mL 的容量瓶中,加入 10 mL 乙酸(4.10),用水定容至 1 000 mL。混合均匀并通过 0.45 μm 滤膜,备用。

4.15 赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A)标准品:纯度 $\geq 99\%$ 。

4.16 赭曲霉毒素 A 标准储备液:准确称取适量的赭曲霉毒素 A 标准品,用甲醇配成浓度为 0.1 mg/mL 的标准储备液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中贮存,可使用 12 个月。

4.17 赭曲霉毒素 A 标准中间液(5.0 $\mu\text{g/mL}$):准确移取 5.0 mL 赭曲霉毒素 A 标准储备液(4.16)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇(4.1)稀释并定容至刻度。该溶液保存于 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱里,可使用 3 个月。

4.18 赭曲霉毒素 A 标准工作液:赭曲霉毒素 A 标准中间液(4.17)用流动相(4.14)稀释,配制 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、2.5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 浓度的赭曲霉毒素 A 标准工作液。赭曲霉毒素 A 标准工作液储藏在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱里,可使用 7 天。

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 免疫亲和柱,容量 $\geq 0.1\text{ }\mu\text{g}$ 赭曲霉毒素 A,回收率 $\geq 85\%$ 。

5.2 振荡器。

5.3 氮吹仪。

5.4 高速均质器:18 000 r/min $\sim$ 22 000 r/min。

5.5 高效液相色谱,配有荧光检测器。

5.6 真空装置或空气压力泵,符合免疫亲和柱的要求。

5.7 玻璃纤维滤纸,直径 21 mm、125 mm,无荧光特性。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的样品,按 GB/T 20195 进行样品制备。粉碎过 1 mm 孔筛,混合均匀,装入密闭容器,低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 样品处理

7.1.1 提取

准确称取粉碎试样 25.0 g (精确到 0.1 g)于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 5.0 g 氯化钠,加入 100 mL 提取液(4.13)。将搅拌杯置于均质器(5.4)上,高速搅拌提取 2 min,或振荡器(5.2)振荡 60 min。提取液经定性快速滤纸过滤于干净的烧杯中。准确移取 5.0 mL 滤液并加入 45.0 mL PBS 缓冲液(4.12)稀释,混合均匀,经玻璃纤维滤纸(5.7)过滤至澄清后,随即进行免疫亲和柱净化操作。

7.1.2 净化

将免疫亲和柱(5.1)连接于 10 mL 玻璃定量管下。准确移取 10.0 mL 样品提取液于玻璃定量管中,调节压力使溶液以不超过 2 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱,直至 3 mL 以上空气通过柱体。分别以 10 mL 清洗缓冲液(4.11)、10 mL 水清洗免疫亲和柱,弃去全部流出液,并使 3 mL 以上空气通过免疫亲和柱。准确加入 1.5 mL 甲醇(4.1)洗脱,流速不超过 1 mL/min,收集洗脱液于玻璃试管中,加入

1.5 mL 水,定容至 3.0 mL(V),混匀后,过 0.45 μm 滤膜,供高效液相色谱测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱测定参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,填料直径 5 μm ,或相当者;

流动相:见 4.14;

流速:1.0 mL/min;

检测波长:激发波长 333 nm;发射波长 477 nm;

进样量:20 μL ;

柱温:25 $^{\circ}\text{C}$ 。

7.2.2 色谱测定

分别取试样溶液和标准工作液各 20 μL (或相同体积)注入高效液相色谱仪进行测定,以标准工作液浓度为横坐标,以峰面积积分值为纵坐标,绘制标准工作曲线,以保留时间定性,用标准工作曲线对试样进行定量。赭曲霉毒素 A 标准溶液色谱图参见附录 A。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

试样中赭曲霉毒素 A 含量,以质量分数 X 计,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$),按式(1)计算:

$$X = \frac{c \times V}{m} \times n \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

c ——试样溶液中赭曲霉毒素 A 的含量,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V ——上机液的定容液体积,单位为毫升(mL);

m ——试样称取量,单位为克(g);

n ——稀释倍数。

8.2 结果表示

测定结果用平行测定的算术平均值表示,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两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

附录 A
(资料性附录)

赭曲霉毒素 A 的标准品色谱图

赭曲霉毒素 A 的标准品色谱图参见图 A.1。

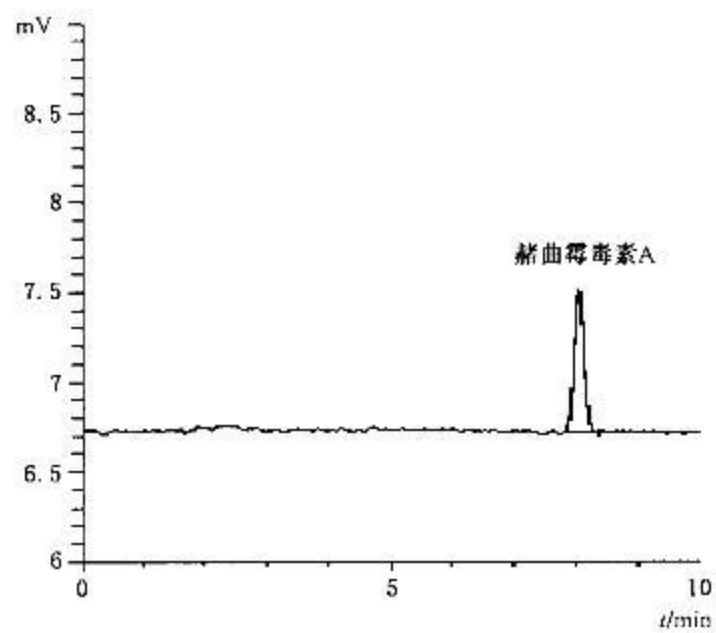


图 A.1 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 赭曲霉毒素 A 标准品的液相色谱图