

ICS 65.120
B 46



中华人民共和国国家标准

GB/T 19539—2004

GB/T 19539—2004

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

Determination of ochratoxin A in feeds

中华人民共和国
国家标准
饲料中赭曲霉毒素 A 的测定
GB/T 19539—2004

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.bzcb.com

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 11 千字
2004 年 9 月第一版 2004 年 9 月第一次印刷

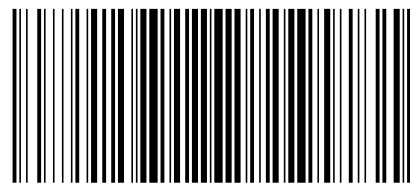
*

书号: 155066·1-21401 定价 10.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 19539—2004

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

本标准中的薄层色谱方法和酶联免疫吸附测定方法主要依据 GB/T 5009.96—2003《谷物和大豆中赭曲霉毒素 A 的测定》中薄层色谱方法和卫生部食品卫生监督检验所建立的酶联免疫吸附法。本标准规定以薄层色谱法为仲裁方法,酶联免疫吸附测定法为快速筛选法。

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、袁建兴、李利东、丁贵平、成恒嵩。

4.2.5 抗体溶液:OA 抗体。

4.2.6 柠檬酸缓冲溶液 [$c(\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) = 0.1 \text{ mol/L}$, $\text{pH} = 4.0$]:称取 10.147 1 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 酶标测定仪: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 12.5 mL 甲醇溶液(4.2.2),密塞。振荡器(4.3.4)提取 5 min。提取液通过快速滤纸过滤,取 1 mL 滤液,加 9 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(如表 1)和定量法(如表 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 $\mu\text{g/L}$ ~8 $\mu\text{g/L}$ 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
标准溶液 1 (0 $\mu\text{g/L}$)	标准溶液 4 (4 $\mu\text{g/L}$)	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
标准溶液 1~5					待 测 试 样 液						
0 $\mu\text{g/L}$	1 $\mu\text{g/L}$	2 $\mu\text{g/L}$	4 $\mu\text{g/L}$	8 $\mu\text{g/L}$							

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)或试样提取液(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 OA 抗体(4.2.5)到每个微孔中。

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

1 范围

本标准规定了赭曲霉毒素 A(Ochratoxin A,以下简称 OA)的薄层色谱测定方法和酶联免疫吸附测定方法。

本标准适用于配合饲料、饲用谷物原料中 OA 的测定。

薄层色谱测定方法的最低检测量为 2 ng,酶联免疫吸附测定方法的最低检测量为 0.05 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

试样中的 OA 经提取、液-液分配萃取、浓缩,然后进行薄层分离,限量定量,或用薄层扫描仪测定荧光斑点的荧光强度,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 石油醚。

3.2.2 甲醇溶液(55+45)。

3.2.3 三氯甲烷。

3.2.4 苯-冰乙酸(99+1)。

3.2.5 40 g/L 氯化钠溶液。

3.2.6 无水硫酸钠:650℃灼烧 4 h,冷却后贮于干燥器中备用。

3.2.7 展开剂(用时选择一种):

a) 甲苯-乙酸乙酯-甲酸-水(6+3+1.2+0.06);

b) 甲苯-乙酸乙酯-甲酸(6+3+1.4);

c) 苯-冰乙酸(9+1)。

3.2.8 显色剂:碳酸氢钠乙醇溶液(在 100 mL 水中溶解 6.0 g 碳酸氢钠,加 20 mL 乙醇)。

3.2.9 薄层板:称取 4 g 硅胶 G,加约 10 mL 0.5%羧甲基纤维素钠水溶液于乳钵中研磨至糊状。立即倒入涂布器内制成 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,除去杂质,吹干,在 105℃~110℃活化 1 h,置于干燥器内保存备用。

3.2.10 OA 标准储备溶液:

警告:

1 凡接触 OA 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 OA 标准品,用苯-冰乙酸(3.2.4)配制成药 10 $\mu\text{g/mL}$ OA 贮备液。贮备液置于 4℃冰