

ICS 13.060.50
Z 16



中华人民共和国国家标准

GB/T 20466—2006

GB/T 20466—2006

水中微囊藻毒素的测定

Determination of microcystins in water

中华人民共和国
国家标准
水中微囊藻毒素的测定
GB/T 20466—2006

*

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.spc.net.cn

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 16 千字
2006年12月第一版 2006年12月第一次印刷

*

书号: 155066·1-28595 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 20466—2006

2006-08-24 发布

2007-01-01 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

置 30 min。

按以上操作配制其余反应液。这些反应液用于制作微囊藻毒素标准抑制曲线。

- b) 量取 500 μL 抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体(4.2.1)和 500 μL 水样(4.4.1)于 1.5 mL 试管中,混合后用电动振荡器(4.3.3)振荡,室温静置 30 min。此反应液用于测定水样中微囊藻毒素的含量。

4.4.2.4 竞争反应

用洗涤液(4.2.14)洗涤 3 次封闭过的酶标微孔板(每次洗涤 3 min),滴加抗原抗体反应溶液(4.4.2.3)(100 μL /孔)。不同浓度做两次平行试验。37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温放置 90 min。在酶标微孔板的适当孔位滴加抗体稀释溶液(4.2.15),作为阴性对照。

4.4.2.5 二抗溶液与抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体反应

用洗涤液(4.2.14)洗涤 3 次竞争反应后的酶标微孔板(每次洗涤 3 min),滴加二抗溶液(4.2.16)(100 μL /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温放置 30 min。

4.4.2.6 显色及显色后吸光度的确定

用洗涤液(4.2.14)洗涤 5 次经 4.4.2.5 反应的酶标微孔板(每次洗涤 3 min)。滴加底物溶液(4.2.19)(100 μL /孔),37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温放置 15 min~20 min,显色。滴加 1 mol/L 硫酸(4.2.11)(50 μL /孔),终止显色反应。

30 min 内,用酶标仪(4.3.4)在 450 nm 处,测定显色后的吸光度。

4.4.2.7 定量

取经 4.4.2.6 测定的标准系列溶液的吸光度平均值与水样吸光度平均值,按式(2)分别计算标准系列溶液吸光度(或水样吸光度)与阴性对照试验的比值(X_2),其数值以%表示。

$$X_2 = \frac{\text{OD}_1}{\text{OD}_2} \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X_2 ——标准系列溶液吸光度(或水样吸光度)与阴性对照试验的比值,%;

OD_1 ——标准系列溶液的吸光度平均值与水样吸光度平均值;

OD_2 ——水样吸光度平均值。

以 X_2 为纵坐标,不同标准系列溶液浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线或计算回归方程。依据测定水样的吸光度,在标准曲线上查出(或用回归方程计算出)样品中微囊藻毒素的含量。

4.5 结果计算

水样中微囊藻毒素的含量(X_3)以 $\mu\text{g/L}$ 表示,按式(3)计算:

$$X_3 = c_2 \times V_2 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X_3 ——水样中微囊藻毒素的含量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

c_2 ——从标准曲线上查出的微囊藻毒素含量,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

V_2 ——水样的稀释倍数。

计算结果应表示到小数点后两位。

4.6 允许差

同一水样,两次平行测定结果之差,不得超过平均值的 10%。

5 测定结果的保证与控制

每一测定批次,应使用已知量的样品做测定结果的控制试验。

前 言

本标准由中国科学院提出。

本标准由全国食品工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国科学院水生生物研究所。

本标准主要起草人:甘南琴、肖邦定、宋立荣、刘永定、陈伟。

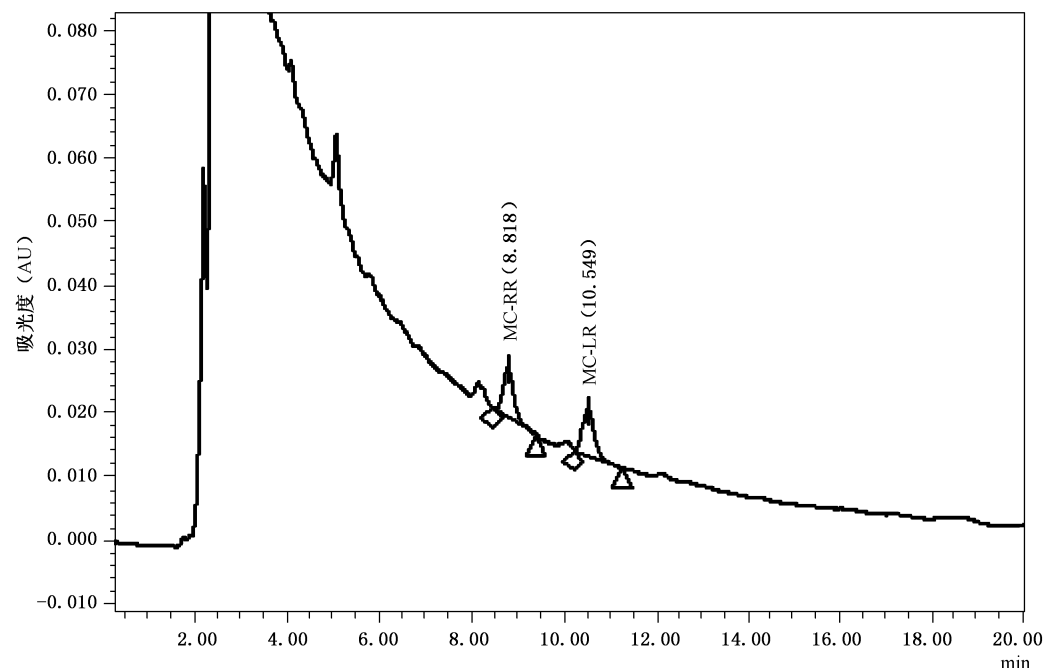


图 2 水样微囊藻毒素色谱图

3.5 结果计算

水样中微囊藻毒素的含量(X_1)以 $\mu\text{g/L}$ 表示,按式(1)计算:

$$X_1 = \frac{c_1 \times V_1}{V} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X_1 ——分别代表 MC-RR、MC-YR、MC-LR 的浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

c_1 ——从标准曲线上查出的微囊藻毒素(MC-RR、MC-YR、MC-LR)的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V_1 ——水样定容体积数,单位为毫升(mL);

V ——采集水样的体积数值,单位为毫升(mL)。

计算结果应表示到小数点后两位。

3.6 允许差

同一水样,两次平行测定结果之差,不得超过平均值的 10%。

4 间接竞争酶联免疫吸附法

4.1 方法提要

水中的微囊藻毒素经离心或过滤处理后与一定量的特异性抗体反应,多余的游离抗体则与酶标板内的包被抗原结合。加入酶标记物和底物显色,与标准微囊藻毒素比较,计算水样中微囊藻毒素的含量。

4.2 试剂

除非另有规定,仅使用分析纯试剂、蒸馏水或去离子水。

4.2.1 抗微囊藻毒素(MC-LR)的单克隆抗体:杂交瘤技术制备,经亲和层析纯化。

4.2.2 人工抗原:MC-LR-牛血清白蛋白结合物(MC-LR-BSA)。

4.2.3 20%(体积分数)乙醇溶液:20 mL 乙醇与 80 mL 水混合。

4.2.4 标准稀释液:称取 0.005 g 明胶和 0.1 g 叠氮化钠,用水溶解,定容至 100 mL。

4.2.5 微囊藻毒素(MC-LR)标准系列溶液:称取适量微囊藻毒素(MC-LR)标准品(3.2.10),用 20%(体积分数)乙醇溶液(4.2.3)配制成 MC-LR 含量为 0.5 mg/mL 的溶液。再用标准稀释液(4.2.4)稀

水中微囊藻毒素的测定

1 范围

本标准规定了高效液相色谱法和间接竞争酶联免疫吸附法测定水中微囊藻毒素(环状七肽)的条件和详细分析步骤。

本标准适用于饮用水、湖泊水、河水、地表水中微囊藻毒素的测定。

样品中微囊藻毒素的检出限:高效液相色谱法和酶联免疫吸附法均为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。

2 微囊藻毒素的分子式、分子质量及结构式

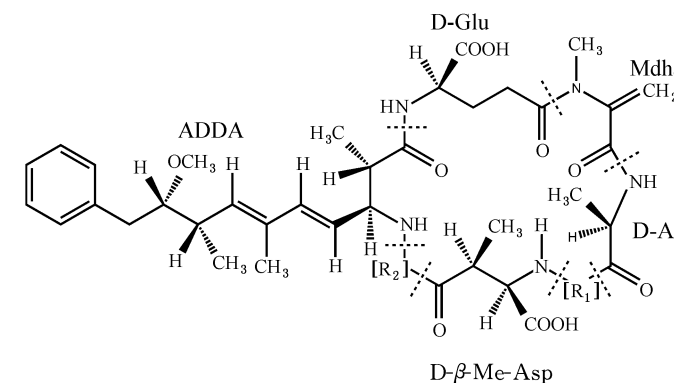
2.1 分子式

微囊藻毒素-RR(MC-RR): $\text{C}_{49}\text{H}_{75}\text{N}_{13}\text{O}_{12}$,微囊藻毒素-YR(MC-YR): $\text{C}_{52}\text{H}_{72}\text{N}_{10}\text{O}_{13}$,微囊藻毒素-LR(MC-LR): $\text{C}_{49}\text{H}_{74}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$ 。

2.2 分子质量

MC-RR:1 038.2, MC-YR:1 044.0, MC-LR: 994.5。

2.3 结构式



MC-RR、MC-YR、MC-LR 中的 R_1 和 R_2 见表 1。

表 1 MC-RR、MC-YR、MC-LR 中的 R_1 和 R_2

微囊藻毒素名称	R_1	R_2
MC-RR	L-Arg	L-Arg
MC-YR	L-Tyr	L-Arg
MC-LR	L-Leu	L-Arg

3 高效液相色谱法

3.1 方法提要

微囊藻毒素在波长 238 nm 下有特异的吸收峰。不同的微囊藻毒素异构体在高效液相色谱中有不同的保留时间,与标准微囊藻毒素的保留时间相比较,可确定样品中微囊藻毒素的组成。依据出峰面积,计算水样中微囊藻毒素的含量。

3.2 试剂和溶液

除非另有规定,仅使用分析纯试剂、蒸馏水或去离子水。