



中华人民共和国国家标准

GB/T 19539—2004

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

Determination of ochratoxin A in feeds

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 发布
中国国家标准化管理委员会

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。

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 μg/mL OA 贮备液。贮备液置于 4℃冰

箱中避光保存。

标定贮备液的浓度,用1 cm石英比色杯,以苯-冰乙酸(3.2.4)为参比,在OA的最大吸收峰波长333 nm处,测定吸光度值A。储备液中OA的含量(X_1)以微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$)表示,按式(1)计算。

$$X_1 = \frac{A \times M \times 100}{\epsilon \times \delta} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

A——测定的吸光度值;

M——OA的摩尔质量($M=403 \text{ g/mol}$);

ϵ ——OA在苯-冰乙酸中的分子吸收系数($\epsilon=555 \text{ m}^2/\text{mol}$);

δ ——比色杯的光径长度,单位为厘米(cm)。

3.2.11 OA标准工作溶液:根据计算的OA标准储备液的浓度,精密吸取标准储备液(3.2.10)适量,用苯稀释成浓度为 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液。

3.3 仪器与设备

3.3.1 小型粉碎机。

3.3.2 电动振荡器。

3.3.3 薄层板涂布器。

3.3.4 玻璃器皿:分液漏斗、蒸发皿、浓缩瓶。所有玻璃器皿均需用稀盐酸浸泡,依次用自来水、蒸馏水冲洗。

3.3.5 快速定性滤纸。

3.3.6 展开槽:250 mm×150 mm×50 mm(立式,具磨口)。

3.3.7 紫外光灯:波长365 nm。

3.3.8 点样器:1 μL ~99 μL 。

3.3.9 薄层扫描仪:配有汞灯光源。

3.4 试样制备

按GB/T 14699.1饲料采样方法取得试样,四分法浓缩减取约200 g,经粉碎,混匀,装入磨口瓶中备用。

3.5 分析步骤

3.5.1 试样处理

称取约20 g试样(3.4)(精确至0.01 g),置于200 mL具塞锥形瓶中,加30 mL石油醚和100 mL甲醇溶液(3.2.2),瓶盖盖紧。振荡30 min后,通过快速定性滤纸滤入分液漏斗中,待分层后,放出甲醇水层20 mL,置于100 mL分液漏斗中,用pH试纸测试,一般为5~6。加入25 mL三氯甲烷,振荡2 min,静置分层后,放出三氯甲烷层于另一个分液漏斗中,再用10 mL三氯甲烷重复振荡提取甲醇水层(在用三氯甲烷振荡提取时,如发生乳化现象,可滴加甲醇促使其分层),将三氯甲烷层合并于同一分液漏斗中,加入50 mL~100 mL氯化钠溶液(3.2.5),振荡,放置分层后,将三氯甲烷层放出,经装有约20 g无水硫酸钠的玻璃漏斗流入蒸发皿中,将蒸发皿置蒸气浴上通风挥干。用约8 mL三氯甲烷分次将蒸发皿中的残渣溶解,转入浓缩瓶中,置60℃水浴减压浓缩至干,加入2 mL苯-冰乙酸(3.2.4)溶解残渣,摇匀,供薄层色谱点样用。

3.5.2 点样

在距薄层板下端1.5 cm~2 cm的基线上,以1 cm的间距,用点样器依次点标准工作溶液(3.2.11)2 μL 、4 μL 、7 μL 、10 μL (相当于2 ng、4 ng、7 ng、10 ng)和试样液(3.5.1)20 μL 。

3.5.3 展开

将薄层板放入有展开剂的展开槽中,展至离原点13 cm~15 cm,取出,吹干。

3.5.4 观察与确定

将展开后的薄层板置于波长365 nm紫外光灯下,观察与OA标准点(4 ng)比移值相同处的试样的

蓝绿色荧光点。若相同位置上未出现荧光点,则试样中的 OA 含量在本测定方法的最低检测量 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下。如果相同位置上出现荧光点,用显色剂对准各荧光点进行喷雾后吹干,观察荧光点由蓝绿色变为蓝紫色且荧光强度明显加强可验证试样中含有 OA。于荧光点下方用铅笔标记,待扫描定量测定。

3.5.5 定量测定

3.5.5.1 薄层扫描工作条件

光源:高压汞灯;
 激发波长:365 nm;
 发射波长:450 nm;
 检测方式:反射;
 狭缝:可根据斑点大小进行调节;
 扫描方式:距齿扫描。

3.5.5.2 标准曲线绘制

以 OA 标准工作溶液质量(ng)为横坐标,以峰面积积分值为纵坐标,绘制标准曲线。

3.6 结果计算和表述

根据试样液荧光斑点峰面积扫描积分值从标准曲线上查出对应的 OA 质量(ng),试样中 OA 的含量(X)以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示,按式(2)计算。

$$X = \frac{m_1 \times V_1}{m_0 \times V_2} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

V_1 ——试样液(3.5.1)最后定容体积,单位为微升(μL);
 V_2 ——试样液点样体积,单位为微升(μL);
 m_1 ——从标准曲线上查得试样液点上对应的 OA 的质量,单位为纳克(ng);
 m_0 ——最后提取液相当试样的质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位有效数字。

3.7 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的相对差值不大于 10%。

4 酶联免疫吸附测定法(快速筛选法)

4.1 原理

方法的检测依据是抗原-抗体反应。将 OA 抗体的羊抗体吸附在固相载体表面,加入 OA 抗体、酶标 OA 结合物、OA 标准或试样液,在 OA 抗体与固相载体表面羊抗体结合的同时,游离的 OA、酶标 OA 结合物与结合在固体表面 OA 抗体竞争,未结合的酶标 OA 结合物洗涤除去。加入酶底物,在结合酶的催化作用下,无色底物降解产生有蓝色物质。加入终止剂后颜色转变为黄色。通过酶标检测仪,在 450 nm 波长处测吸收值。吸光强度与试样中 OA 的浓度成反比。

酶联免疫吸附测定法具有操作简单,快速灵敏,结果可靠的特点。目前有专门测定 OA 的酶联免疫检测试剂盒的商品。在分析时适当参考操作说明书。

4.2 试剂与材料

4.2.1 包被抗体的聚苯乙烯微量反应板 24 孔或 48 孔。

4.2.2 70% 甲醇溶液。

4.2.3 OA 标准溶液:精密吸取标定后的标准储备液(3.2.10)适量,用甲醇溶液(4.2.2)配制成 OA 标准溶液 1~5,浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

4.2.4 酶标抗原溶液:OA 与辣根过氧化物酶结合物。

- 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

根据需要对限量法(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。

4.5.5 反应

将酶标板轻轻摇晃,使孔中的试剂摇匀,置温度 18℃~30℃ 培育反应 10 min。

4.5.6 洗涤

将微孔中液体倾倒入水池内,倒置微孔支架,在干净纸巾上轻拍,除去所有残留的液体,用移液器加蒸馏水 250 μL 到每个微孔中,洗板,放置 2 min,再排空液体,重复洗涤 3 次。

4.5.7 显色

加 100 μL 底物溶液(4.2.9)到每孔中,充分摇匀,置 18℃~30℃ 恒温箱中,反应 5 min。

4.5.8 终止

加 100 μL 终止液(4.2.10)到每孔中,摇匀。

4.5.9 测定

在 450 nm 处,以空气为空白调零,测定吸收值。在 60 min 内读数。

4.6 结果计算和表述

4.6.1 限量法

若试样孔的吸收值小于标准品孔的吸收值,即 $A_{\text{试样孔}} < A_{\text{标准孔}}$,超过限量值,为阳性。若试样孔的吸收值大于或等于标准品孔的吸收值,即 $A_{\text{试样孔}} \geq A_{\text{标准孔}}$,则小于或等于所设限量值,为阴性。

限量值为标准值(μg/L)乘以稀释因子。按 4.5.1 操作,稀释因子为 25,若控制标准值为 4 μg/L 时,试样中 OA 的限量在 100 μg/kg。

4.6.2 定量法

百分吸收值:所得的标准或试样的吸收值除以第一个标准(0 标准)的吸收值再乘以 100,作为百分吸收值 A%,按式(3)计算。

$$A\% = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

A——标准品或试样的吸收值;

A_0 ——空白的吸收值。

标准曲线的绘制:所计算的百分吸收值对应 OA 浓度(μg/L)的半对数坐标作标准曲线图,曲线在 1 ng/kg~8 ng/kg 范围内应当成线性。根据试样的百分吸收值,通过标准曲线,查得相对应浓度。试样中 OA 的含量(X)以微克每千克(μg/kg)表示,可按式(4)计算。

$$X = \frac{c \times V \times n}{m} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

c——从标准曲线上查得相对应试样提取液(4.5.1)中 OA 浓度,单位为微克每升(μg/L);

V——试样提取液(4.5.1)体积,单位为毫升(mL);

n——试样稀释倍数;

m——试样质量,单位为克(g)。

计算结果表示到小数点后一位有效数字。

4.7 重复性

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的相对差值不大于 15%。