



中华人民共和国国家标准

GB/T 19539—202×

代替GB/T 19539—2004

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

Determination of ochratoxin A in feeds

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 19539—2004《饲料中赭曲霉毒素 A 的测定》。与 GB/T 19539—2004 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围（见第 1 章，2004 年版的第 1 章）；
- b) 删除了薄层色谱法（见 2004 年版的第 3 章）；
- c) 增加了酶联免疫吸附测定法的检出限和定量限（见第 1 章）；
- d) 增加了液相色谱-串联质谱法（见第 5 章）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：广州汇标检测技术中心、全国畜牧总站。

本文件主要起草人：

本文件及其所代替文件历次版本发布情况为：

——2004年首次发布为GB/T 19539—2004；

——本次为第一次修订。

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

1 范围

本文件描述了饲料中赭曲霉毒素A（Ochratoxin A，以下简称OTA）的测定方法。

本标文件适用于饲用谷物原料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、宠物添加剂预混合饲料中赭曲霉毒素 A 的测定。

本文件第一法的定量限为 4 ug/kg，第二法的定量限为 1 ug/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 第一法 酶联免疫吸附测定法（快速筛选法）

4.1 原理

试样用甲醇-水提取，采用抗原-抗体免疫竞争性反应，OTA含量与试样最终颜色深浅成反比，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

注：不同的试剂盒制造商的产品组成和操作会有差别，在分析时应参考说明书。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇。

4.2.3 氯化钠。

4.2.4 氯化钾。

4.2.5 磷酸二氢钾。

- 4.2.6 十二水磷酸氢二钠。
- 4.2.7 吐温 20。
- 4.2.8 柠檬酸钠。
- 4.2.9 四甲基联苯胺 (TMB)。
- 4.2.10 二丁基羟基甲苯 (BHT)。
- 4.2.11 过氧化氢。
- 4.2.12 浓硫酸。
- 4.2.13 柠檬酸。
- 4.2.14 提取液 (70%甲醇溶液): 取甲醇 (4.2.2) 70 mL, 用水稀释, 定容至 100 mL, 混匀。
- 4.2.15 洗涤液: 分别称取 40.0 g 氯化钠 (4.2.3)、1.0 g 氯化钾 (4.2.4)、1.0 g 磷酸二氢钾 (4.2.5)、14.5 g 十二水磷酸氢二钠, 加入 2.5 mL 吐温 20 (4.2.7), 用水溶解并定容至 500 mL, 得到浓缩洗涤液, 使用前用水 10 倍稀释。
- 4.2.16 柠檬酸缓冲溶液: 分别称取 10.15 g 柠檬酸钠 (4.2.8)、13.76 g 柠檬酸 (4.2.13), 用水溶解并定容至 1 000 mL, 混匀。
- 4.2.17 底物溶液甲: 称取 0.4 g TMB (4.2.9), 用柠檬酸缓冲溶液 (4.2.16) 溶解并定容至 1 000 mL, 混匀。
- 4.2.18 底物溶液乙: 移取 1.5 mL 30%过氧化氢 (4.2.11), 用柠檬酸缓冲溶液 (4.2.16) 稀释至 1 000 mL。
- 4.2.19 反应终止液: 准确移取 22 mL 浓硫酸缓慢加入至 178 mL 水中, 混匀。
- 4.2.20 赭曲霉毒素 A 标准储备溶液 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取赭曲霉毒素 A (CAS 号: 303-47-9, 纯度 $\geq 99\%$) 标准品适量 (精确至 0.01 mg) 于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇 (4.2.2) 溶解并定容至刻度, 混匀, 于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存, 有效期 12 个月。或购买有证标准物质。
- 4.2.21 标准中间溶液 (5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确移取赭曲霉毒素 A 标准储备溶液 (4.2.20) 1 mL, 置于 20 mL 容量瓶中, 用甲醇 (4.2.2) 稀释至刻度, 混匀。于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存, 有效期 3 个月。
- 4.2.22 标准系列溶液: 准确移取质量中间溶液 (4.2.21), 用提取液 (4.2.14) 稀释定容, 混匀, 配制成质量浓度分别为 0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.05 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 标准系列溶液。4 $^\circ\text{C}$ ~8 $^\circ\text{C}$ 下避光保存, 有效期 7 天。
- 4.2.23 包被抗体的聚苯乙烯微量反应板: 24 孔或 48 孔。
- 4.2.24 酶标抗原溶液: OA 与辣根过氧化酶结合物。
- 4.2.25 抗体溶液: OA 抗体。

4.3 仪器设备

- 4.3.1 酶标测定仪: 带 450 nm 波长。
- 4.3.2 分析天平: 精度 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 4.3.3 振荡器。
- 4.3.4 微量移液器: 100 μL 、1000 μL 、10 mL。
- 4.3.5 分液器或玻璃移液管: 25 mL。
- 4.3.6 离心机: 转速不低于 10 000 r/min。
- 4.3.7 快速定量滤纸。

4.4 样品

按照 GB/T 20195 规定制备试样, 至少 200 g, 粉碎使其全部过 1 mm 试验筛, 混合均匀, 装入密闭

容器中，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 试样溶液的制备

平行做两份试验。称取 5 g 试样（精确至 0.01 g），置于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 25 mL 提取液（4.2.14），密塞。振荡器（4.3.3）提取 5min。过滤，取 1 mL 滤液，加 9 mL 水稀释，摇匀，备用。

4.5.2 测定

注：反应前所有试剂平衡至室温；分析后立即将所有试剂和微孔板放回 4℃ 贮存；孵育过程中注意微孔板避光和密封；测试过程应该尽可能避免微孔板内留有气泡或出现干燥。

4.5.2.1 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 μg/L~4 μg/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 μg/L)	标准溶液 7 (4 μg/L)	待测试样溶液									

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 1~7							待测试样溶液				
0 μg/L	0.05 μg/L	0.1 μg/L	0.2 μg/L	1 μg/L	2 μg/L	4 μg/L					

4.5.2.2 反应

分别吸取系列标准工作溶液（4.2.22）和试样溶液（4.5.1）50 μL 至相应微孔中，加入 50 μL 抗体溶液（4.2.25），轻轻摇晃，混匀。置室温避光培育反应 15 min。

4.5.2.3 洗涤

将微孔中液体倾倒到水池内，倒置微孔支架，在干净纸巾上轻拍，除去所有残留的液体，用移液器加洗涤液（4.2.15）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。

4.5.2.4 显色

加 50 μL 底物溶液甲（4.2.17）和底物溶液乙（4.2.18）到每孔中，充分摇匀，置室温避光培育反应 15 min。

4.5.2.5 终止

加 100 μL 终止液（4.2.10）到每孔中，摇匀。

4.5.2.6 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 试验数据处理

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 试样孔 < A 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 试样孔 ≥ A 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

试样中赭曲霉毒素 A 的含量，以质量分数 w_i 计，单位为微克每千克（μg/kg）按公式（1）计算：

$$w = \frac{\rho_1 \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_1 —从标准曲线查得的试样溶液中 OTA 质量浓度，单位为微克每升（μg/L）；

V —提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

m —试样质量，单位为克（g）；

n —超出标准曲线范围后的稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

5 第二法 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

用提取液提取试样中的赭曲霉毒素 A，经离子交换固相萃取柱净化后，采用液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

- 5.2.1 水：GB/T 6682 一级。
- 5.2.2 甲醇：色谱纯。
- 5.2.3 乙腈：色谱纯。
- 5.2.4 冰乙酸。
- 5.2.5 甲酸。
- 5.2.6 正己烷：色谱纯。
- 5.2.7 氢氧化钾。
- 5.2.8 氢氧化钾溶液（0.1 mol/L）：称取氢氧化钾 0.56 g，用水溶解并定容至 100 mL，混匀。
- 5.2.9 2%乙酸水溶液：准确量取 20 mL 冰乙酸，用水定容至 980 mL，混匀。
- 5.2.10 提取液：氢氧化钾溶液（5.2.8）-甲醇（5.2.2）-水=2+60+38。
- 5.2.11 淋洗液：氢氧化钾溶液（5.2.8）-乙腈（5.2.3）-水=3+50+47。
- 5.2.12 洗脱液：甲醇-乙腈-甲酸-水（40+50+5+5）。
- 5.2.13 复溶液：乙腈-2%乙酸水溶液（50+50）。
- 5.2.14 碳酸氢钠溶液（30 g/L）：称取碳酸氢钠 30.0 g，溶于 1 000 mL 水。
- 5.2.15 赭曲霉毒素 A 标准储备溶液（100 μg/mL）：准确称取赭曲霉毒素 A（CAS 号：303-47-9，纯度≥99%）标准品适量（精确至 0.01 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2.2）溶解并定容至刻度，混匀，于-18℃以下避光保存，有效期 6 个月。或购买有证标准物质。
- 5.2.16 标准中间溶液（1.0 μg/mL）：准确移取赭曲霉毒素 A 标准储备溶液（4.2.20）0.1 mL，置于 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.2.2）稀释至刻度，混匀。于-18℃以下避光保存，有效期 3 个月。
- 5.2.17 固相萃取柱：高分子聚合物基质阴离子交换固相萃取柱，200mg/6 mL，或性能等效者。
- 5.2.18 微孔滤膜：孔径 0.22 μm，有机系。

5.3 仪器设备

- 5.3.1 液相色谱-串联质谱：配有电喷雾离子源。
- 5.3.2 分析天平：精度 0.01 g 和 0.000 01 g。
- 5.3.3 涡旋混合器。
- 5.3.4 超声波清洗机。
- 5.3.5 振荡器。
- 5.3.6 冷冻离心机：转速不低于 8 000 r/min。
- 5.3.7 固相萃取装置。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入棕色磨口瓶中避光保存，备用。选取与待测样品类型相同，均匀一致，且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为空白样品。

5.5 试验步骤

5.5.1 试样提取

平行做两份试验。称取试样 5.0 g（精确至 0.01 g），加入 25 mL 提取液（5.2.10），于涡旋振荡器上振荡提取 5 min，8 000 r/min 冷冻离心 10 min，用定性滤纸过滤，取 10 mL 滤液于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 正己烷，涡旋振荡器振荡提取 5 min，8 000 r/min 离心，取下层溶液，用碳酸氢钠溶液调节 pH=8，备用。

5.5.2 试样净化

分别用 5 mL 甲醇、3 mL 提取液活化固相萃取柱，然后将试样提取液（5.5.1）5 mL 加入固相萃取柱，调节流速以 1 滴/s~2 滴/s 的速度通过柱子，分别依次用 3 mL 淋洗液（5.2.11）、3 mL 水、3 mL 甲醇淋洗柱，抽干，用 5 mL 洗脱液（5.2.12）洗脱，收集洗脱液于玻璃试管中，于 45 °C 下氮气吹干，用 1 mL 复溶液（5.2.13）溶解，过 0.22 μm 微孔滤膜，得到试样溶液，用液相色谱-串联质谱仪测定。

5.5.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取空白试样，按照 5.5.1、5.5.2 处理得到空白试样溶液。取适量的混合标准系列溶液（5.2.16），以空白基质溶液进行稀释，配制浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 的基质标准工作溶液。临用现配。

5.5.3 测定

5.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 50 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者。
- b) 柱温：30 °C。
- c) 流速：0.3 mL/min。
- d) 进样量：5 μL。
- e) 流动相：A：水；B：乙腈（5.2.3）。梯度洗脱程序见表 3。

表 3 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.0	75	25
0.5	75	25
1.5	20	80
2.0	5.0	95
3.5	5.0	95
3.7	75	25

6.5	75	25
-----	----	----

5.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）。
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）。
- c) 毛细管电压：2.5 kV。
- d) 离子源温度：150 °C。
- e) 脱溶剂温度：600 °C。
- f) 干燥气流量：氮气 1000 L/Hr。

赭曲霉毒素 A 的定性、定量离子对及其他参考质谱条件等见表 4。

表 4 赭曲霉毒素 A 的定性、定量离子对及其他参考质谱条件

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (V)
赭曲霉毒素 A	402.1>358.1	20	20
	402.1>166.9 ^a	20	35
^a 为定量离子。			

5.5.3.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液（5.5.3）和试样溶液（5.5.2）上机测定赭曲霉毒素 A 标准溶液定量离子质量色谱图见附录 A。

5.5.3.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与基质匹配标准系列溶液中目标物的保留时间相对偏差应在 ±2.5% 之内。根据表4选择的定性离子对，比较试样谱图中目标物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表5规定的范围，则可判定为样品中存在对应的目标物。

表5 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/ (%)	>50	20~50	10~20	≤10
最大允许偏差/ (%)	±20	±25	±30	±50

5.5.3.5 定量

以基质匹配标准系列溶液的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数不应低于0.98。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液用复溶液（5.2.13）稀释（稀释倍数n）至线性范围内，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

5.6 试验数据处理

试样中赭曲霉毒素 A 的含量，以质量分数 w 计，单位为毫克每千克 (mg/kg)。多点校准按公式 (3) 计算，单点校准按公式 (4) 计算：

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times A \times n}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- w ——试样中赭曲霉毒素 A 的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- ρ_r ——从标准曲线查得的试样溶液中赭曲霉毒素 A 的浓度，单位为纳克每毫升（ $\mu\text{g/L}$ ）；
- V_1 ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 ——用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_3 ——试样定容的体积，单位为毫升（mL）；
- m ——试样的质量，单位为克（g）；
- n ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times A \times n}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- w ——试样中赭曲霉毒素A的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- A ——试样溶液中赭曲霉毒素 A 的峰面积；
- A_s ——标准溶液中赭曲霉毒素 A 的峰面积；
- ρ ——标准溶液中赭曲霉毒素 A 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
- V_1 ——试样提取溶液的总体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 ——用于净化的试样提取液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_3 ——试样定容的体积，单位为毫升（mL）；
- m ——试样的质量，单位为克（g）；
- n ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下，两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的15%。

附录 A
(资料性)
赭曲霉毒素A标准溶液定量离子色谱图

赭曲霉毒素 A 标准溶液的定量离子色谱图见图 A.1。

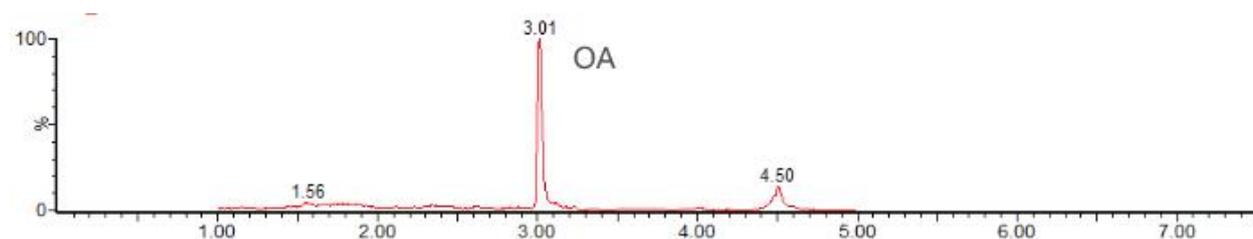


图 A.1 赭曲霉毒素 A 标准溶液 (10 ng/mL) 定量离子色谱图