



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 21033—202×

代替 GB/T 21033—2007

## 饲料中免疫球蛋白 IgG 的测定 高效液相 色谱法

Determination of immunoglobulin in feeds—High performance liquid  
chromatography

(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 21033—2007《饲料中免疫球蛋白 IgG 的测定 高效液相色谱法》，本文件与 GB/T 21033—2007 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改流动相 A 配制（见 5.2，见 2007 版的 4.3）；
- b) 更改流动相 B 配制（见 5.3，见 2007 版的 4.4）；
- c) 增加正己烷处理试样（见 8.1）。

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：国粮武汉科学研究设计院有限公司、山东新希望六和集团有限公司。

本文件主要起草人：王博媛、杨青、刘小敏、陈析羽、邵瑞。

本文件所代替标准历次版本发布情况为：

——2007 年首次发布为 GB/T 21033—2007；

——本次为第一次修订。



# 饲料中免疫球蛋白 IgG 的测定高效液相色谱法

## 1 范围

本文件描述了饲料中免疫球蛋白 IgG 的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、宠物饲料和饲料原料（包括血浆蛋白粉等）中免疫球蛋白 IgG 的测定。

本文件的定量限为5 mg/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实验方法

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 原理

根据高效亲和色谱的原理，在磷酸盐缓冲液条件下免疫球蛋白 IgG 与配基连接，在 pH2.5 的盐酸甘氨酸条件下洗脱免疫球蛋白 IgG。

## 5 试剂和材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 流动相 A：称取磷酸二氢钾 3.4 g 和磷酸氢二钾 4.6 g，用水溶解并定容至 1 000 mL，混匀。调节溶液 pH 6.5。

5.3 流动相 B：称取甘氨酸 3.8 g，加入 300 mL 水，搅拌并滴加 3.0 mL 盐酸，溶解后定容至 1 000 mL，混匀。调节溶液 pH 2.5。

5.4 IgG 储备标准液：称取 IgG 标准品（纯度≥95 %）0.0100 g，用流动相 A（5.2）溶解并定容至 10.0 mL，摇匀，浓度为 1.0 mg/mL。

5.5 IgG 工作标准溶液：取 IgG 标准储备液，用流动相 A（5.2）稀释成含 IgG 0.1、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的标准系列，临用现配。

5.6 微孔滤膜：0.45 μm，水系。

## 6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：具紫外检测器和梯度洗脱装置。  
 6.2 分析天平：精度 0.000 1 g。  
 6.3 pH 计。  
 6.4 匀浆机。  
 6.5 离心机。

## 7 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 1.0 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，保存，备用。

## 8 试验步骤

### 8.1 试样处理

平行做两份试验。称取一定量试样（精确至 0.000 1g），配合饲料、浓缩饲料、宠物饲料称取试样 2~10g；血浆蛋白粉称取试样 0.1 g；浓缩乳清蛋白粉称取试样 0.5 g。于茄形瓶中，加入正己烷 1 mL，准确加入 25.0 mL 流动相 A（5.2），用匀浆机匀浆 5 min，取溶液 10 mL 于离心管中，以 3500 r/min 离心 10 min，过 0.45 μm 微孔滤膜备用。

### 8.2 测定

#### 8.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：Pharmacia HI-Trap Protein G 柱，1 mL；  
 b) 梯度洗脱条件：梯度洗脱程序见表 1，先用 5 倍柱体积的重蒸馏水或去离子水洗柱，再用 10 倍柱体积流动相 A（5.2）平衡柱，按洗脱程序进行洗脱；  
 c) 流速：0.5 mL/min；  
 d) 进样量：20 μL；  
 e) 紫外检测波长：280 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	0.5	100	0
4.5	0.5	100	0
5.5	0.5	0	100
15.0	0.5	0	100
18.5	0.5	100	0
26.0	0.5	100	0

#### 8.2.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（5.5）和试样溶液（8.1）上机测定。IgG 标准溶液的液相色谱图见附录 A。

### 8.2.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中IgG保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中IgG的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

### 8.2.4 定量

以IgG的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。试样溶液中IgG的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用流动相A（5.2）稀释后，重新测定（或重新试验）。单点校准定量时，试样溶液中IgG的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

## 9 试验数据处理

试样中IgG的含量以质量分数 $w$ 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho$ ——从标准曲线查得的试样溶液IgG的质量浓度，单位为微克每毫升（mg/mL）；

$V$ ——提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）。

$$w = \frac{A \times \rho_s \times V}{A_s \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A$ ——试样溶液中IgG色谱峰面积；

$A_s$ ——标准溶液中IgG的峰面积；

$\rho_s$ ——标准溶液中IgG的质量浓度，单位为微克每毫升（mg/mL）；

$V$ ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

$m$ ——试样质量，单位为克（g）。

平行测定结果用算术平均值表示，保留小数点后两位有效数字。

## 10 精密度

在重复性条件下，两次独立测定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)  
IgG 标准溶液液相色谱图

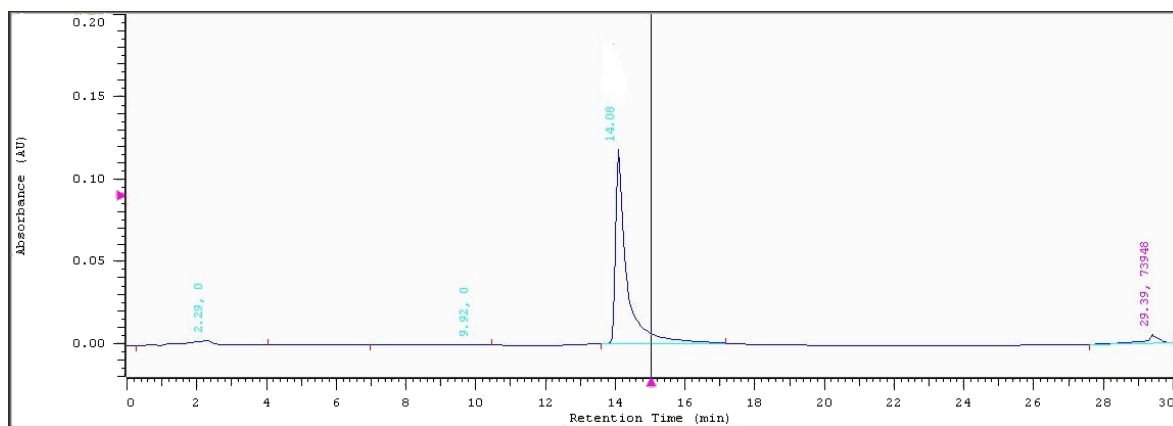


图 A.1 IgG 标准溶液 (1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 液相色谱图