



中华人民共和国国家标准

GB/T 19539—2025

代替 GB/T 19539—2004

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

Determination of ochratoxin A in feeds

2025-08-01 发布

2026-02-01 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) 删除了酶联免疫吸附测定法(见2004年版的第4章)；
- d) 增加了液相色谱-串联质谱法(见第4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：郝燕娟、杨雨澄、赵恩泽、王智民、罗梓峰、栗胜兰、梁淑珍、林翠纹、罗群、龙志曦、沈达荣、丁桢灏、潘浣钰、谢书越、何绮霞。

本文件及其所代替文件的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 的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂和植物性饲料原料中赭曲霉毒素 A 的测定。

本文件检出限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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 原理

试样中的赭曲霉毒素 A 用乙腈水提取, 经免疫亲和柱净化, 用液相色谱-串联质谱仪检测, 基质匹配标准溶液校准, 外标法定量。

5 试剂或材料

警告:

a) 凡接触赭曲霉毒素 A 的容器, 需浸入 4% 次氯酸钠溶液, 半天后清洗备用;

b) 为了安全, 分析人员操作时要戴上医用乳胶手套。

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

5.1 水: GB/T 6682, 一级。

5.2 甲醇: 色谱级。

5.3 氢氧化钾溶液: 称取 5.6 g 氢氧化钾, 加入适量水溶解, 用水定容至 100 mL。

5.4 磷酸盐缓冲液(PBS): 称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾溶于 900 mL 水中, 用氢氧化钾溶液(5.3)调节 pH 至 7.0, 用水定容 1 L, 混匀。

5.5 提取液: 量取 800 mL 乙腈和 200 mL 水, 混匀。

5.6 洗脱液: 量取 2 mL 乙酸, 用甲醇定容至 100 mL, 混匀。

- 5.7 甲酸铵溶液(0.005 mol/L):称取 0.315 2 g 甲酸铵,加适量水溶解,用水定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.8 标准储备溶液(100 $\mu\text{g/mL}$):准确称取(CAS 号 303-47-9,纯度 $\geq 99\%$)标准品 10 mg(精确至 0.01 mg)于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.2)溶解并定容至刻度,混匀。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 6 个月。或使用标准物质/标准样品。
- 5.9 标准中间溶液(1 $\mu\text{g/mL}$):准确移取标准储备液(5.8)1 mL,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.2)稀释至刻度,混匀。 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下避光保存,有效期 3 个月。
- 5.10 标准系列溶液:分别准确移取适量标准中间溶液(5.9),用甲醇(5.2)稀释定容,混匀,制备成质量浓度分别为 0.25 $\mu\text{g/L}$ 、0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 标准系列溶液。 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存,有效期 7 d。
- 5.11 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱:柱容量 $\geq 100\text{ ng}$,或性能相当者。
- 5.12 中速定性滤纸:无荧光特性。
- 5.13 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。
- 5.14 精密 pH 试纸:5.5~9.0。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 6.2 超声清洗仪。
- 6.3 分析天平:精度 0.01 g、0.01 mg。
- 6.4 离心机:转速不低于 8 000 r/min。
- 6.5 固相萃取装置。
- 6.6 氮吹仪。
- 6.7 涡旋混合器。

7 样品

按 GB/T 20195 的规定制备样品,至少 200 g。固体样品粉碎使其全部通过 1 mm 孔径的试验筛,充分混匀,装入密闭容器中避光保存。选取类型相同、均匀一致,且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法检出限 30%的饲料样品作为空白样品。

8 试验步骤



注意:试验过程全程避光操作。

8.1 提取

平行做两份试验。称取 25 g 试样(精确至 0.01 g),置于 200 mL 具塞锥形瓶中,加 100 mL 提取液(5.5),超声提取 30 min,冷却至室温,过滤。准确移取 10 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,用 PBS(5.4)稀释至刻度,混匀,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液,备用。若试样溶液 pH 超出 6.5~8.5 范围,应准确移取 20 mL 试样溶液调节 pH 至 6.5~8.5 再进行净化处理。

8.2 净化

将免疫亲和柱(5.11)连接于 10 mL 玻璃定量管下。准确移取 20 mL 试样溶液(8.1)于玻璃定量管

中,调节压力使溶液以不超过 2 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱,直至 3 mL 以上空气通过柱体。分别以 10 mL PBS(5.4)、10 mL 水清洗免疫亲和柱,弃去全部流出液,并使 3 mL 以上空气通过免疫亲和柱。分两次加 2 mL 洗脱液(5.6),流速不超过 1 mL/min,收集洗脱液于玻璃试管中于 45 ℃ 氮气吹干。准确加入 1 mL 甲醇(5.2),涡旋混匀,使样品完全复溶,微孔滤膜(5.13)过滤,备用。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取空白试样,按照 8.1、8.2 处理得到空白试样溶液。准确移取 0.5 mL 的标准系列溶液(5.10)于 45 ℃ 氮气吹干,准确加入 0.5 mL 基质空白溶液,涡旋混匀。配制成质量浓度分别为 0.25 μg/L、0.5 μg/L、1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、10 μg/L 的基质匹配标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 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 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 1.7 μm,或性能相当者。
- b) 柱温:30 ℃。
- c) 流速:0.3 mL/min。
- d) 进样量:2 μL。
- e) 流动相:A 相为甲酸铵溶液(5.7);B 相为甲醇(5.2)。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	A 相(体积分数)/%	B 相(体积分数)/%
0.0	90	10
1.0	90	10
2.5	10	90
4.5	10	90
5.5	90	10
7.0	90	10

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下。

- a) 电离方式:电喷雾电离,正离子模式(ESI⁺)。
- b) 检测方式:多反应监测(MRM)。
- c) 毛细管电压:0.5 kV。
- d) 离子源温度:150 ℃。
- e) 脱溶剂温度:450 ℃。
- f) 干燥气流量:氮气 900 L/h。

多反应监测(MRM)定性离子对、定量离子对及其他参考质谱条件见表 2。

表 2 多反应监测(MRM)定性离子对、定量离子对及其他参考质谱条件

被测物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
赭曲霉毒素 A	404.1	238.8 ^a	15	20
	404.1	357.8	15	14
^a 定量离子。				

8.4.3 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(8.3)和试样溶液(8.2)上机测定。赭曲霉毒素 A 标准溶液定量离子色谱图见附录 A 中图 A.1。

8.4.4 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 $\pm 2.5\%$ 之内。根据表 2 选择的定性离子对,比较试样图谱中目标物定性离子的相对离子丰度与质量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 3 规定的范围,则可判定为试样中存在对应的目标物。

表 3 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	$>20\sim 50$	$>10\sim 20$	≤ 10
最大允许偏差/%	± 20	± 25	± 30	± 50

8.4.5 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,绘制曲线,相关系数不应低于 0.99。试样溶液中待测物的响应值应在标准曲线的线性范围内,如超出线性范围,应重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

9 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,数值以微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$)表示。多点校准按式(1)计算,单点校准按式(2)计算:

$$w = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times V_5 \times 1\,000}{V_2 \times V_4 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——从基质匹配标准曲线查得的试样溶液中赭曲霉毒素 A 的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g}/\text{L}$);

V_1 ——试样提取溶液总体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——加入 PBS 稀释后定容的体积,单位为毫升(mL);

V_5 ——试样复溶体积,单位为毫升(mL);

1 000 ——换算系数;

V_2 ——用于稀释的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——用于净化的试样溶液体积,单位为毫升(mL);
 m ——试样的质量,单位为克(g)。

$$w = \frac{\rho_s \times A \times V_1 \times V_3 \times V_5 \times 1\,000}{A_s \times V_2 \times V_4 \times m \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:
 ρ_s ——标准溶液中赭曲霉毒素 A 的质量浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);
 A ——试样溶液中赭曲霉毒素 A 的峰面积;
 V_1 ——试样提取溶液总体积,单位为毫升(mL);
 V_3 ——加入 PBS 缓冲液稀释后定容的体积,单位为毫升(mL);
 V_5 ——试样复溶体积,单位为毫升(mL);
1 000 ——换算系数;
 A_s ——标准溶液中赭曲霉毒素 A 的峰面积;
 V_2 ——用于稀释的提取液体积,单位为毫升(mL);
 V_4 ——用于净化的试样溶液体积,单位为毫升(mL);
 m ——试样的质量,单位为克(g)。

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。

10 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。

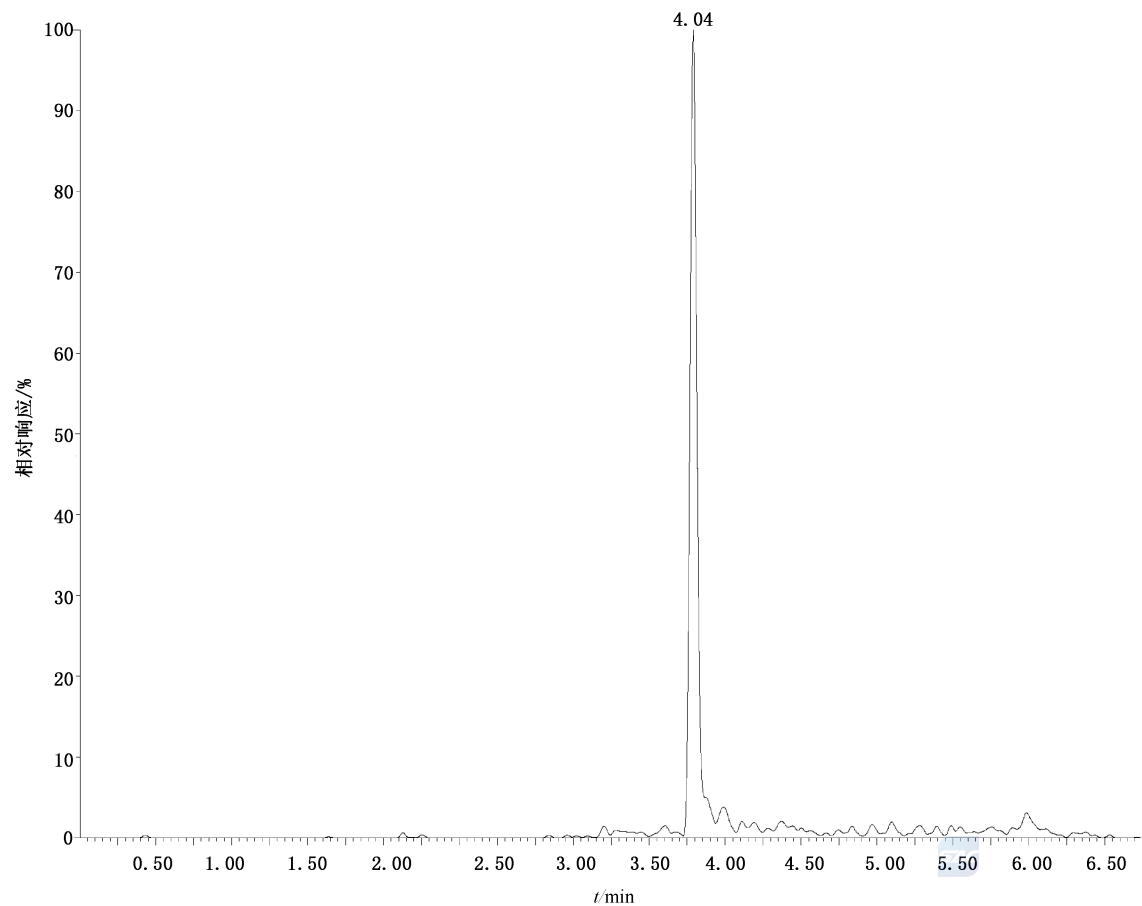


图 A.1 赭曲霉毒素 A 标准溶液(1 μg/L)定量离子色谱图