



中华人民共和国国家标准

GB/T 21033—2025

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 IgG in feeds—
High performance liquid chromatography

2025-12-31 发布

2026-07-01 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 21033—2007《饲料中免疫球蛋白 IgG 的测定 高效液相色谱法》，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：

- 将“范围”中的检出限更改为定量限(见第 1 章,2007 年版的第 1 章)；
- 更改了流动相 A 溶液的配制方法(见 5.2,2007 年版的 4.3)；
- 更改了流动相 B 溶液的配制方法(见 5.3,2007 年版的 4.4)；
- 更改了免疫球蛋白 IgG 标准物质的来源为猪源或牛源(见 5.4,2007 年版的 4.5)；
- 增加了正己烷处理试样(见 8.1)；
- 增加了定性和定量要求(见 8.2.3 和 8.2.4)；
- 更改了试验数据处理中的计算公式(见第 9 章,2007 年版的第 8 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：国粮武汉科学研究设计院有限公司、中国农业大学、新希望六和股份有限公司。

本文件主要起草人：程林丽、王博媛、杨青、陈析羽、邵瑞、王琳、师梦雨、邓露芳、宗文丽、郭亮、刘昊东、李军雁、龚珊、曹城强、张丹、刘小敏。

 本文件及其所代替文件的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、浓缩饲料和含 IgG 的饲料原料中免疫球蛋白 IgG(猪源性或牛源性)的测定,免疫球蛋白 IgG 的定量限为 100 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 IgG 用磷酸盐缓冲液提取,正己烷脱脂,用高效液相色谱仪测定,外标法定量。

5 试剂或材料

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。用磷酸调节溶液 pH 6.5 ± 0.1 。

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。用盐酸调节溶液 pH 2.5 ± 0.1 。

5.4 IgG 标准溶液(1.0 mg/mL):称取 0.010 g(精确至 0.01 mg)IgG(猪源 IgG,纯度不低于 95%;牛源 IgG,纯度不低于 95%;或有证标准物质)标准品,用流动相 A(5.2)溶解并定容至 10.0 mL,混匀。临用现配。

注:配合饲料、浓缩饲料、猪源性饲料原料检测时使用猪源 IgG 标准品,牛源性饲料原料检测时使用牛源 IgG 标准品。

5.5 IgG 标准系列溶液:准确移取适量 IgG 标准溶液(5.4)于 10 mL 容量瓶中,用流动相 A(5.2)稀释、定容,混匀,配制质量浓度分别为 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、500 $\mu\text{g/mL}$ 、

1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准系列溶液。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:配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平:精度 0.1 mg 和 0.01 mg。

6.3 pH 计:精度 ± 0.1 。

6.4 匀浆机。

6.5 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

7 样品

固体样品按 GB/T 20195 制备,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛,充分混匀,装入密闭容器中,2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,备用;膏状样品匀浆后尽快检测。

8 试验步骤

8.1 试样溶液制备

平行做两份试验。称取试样 2 g~5 g(IgG 含量高的饲料原料 0.1 g),精确至 0.000 1 g,置于 50 mL 离心管中,准确加入 25 mL 流动相 A(5.2),匀浆 5 min,3 500 r/min 离心 10 min,取 10 mL 上清液于离心管中,加入 5 mL 正己烷,涡旋 3 min,8 000 r/min 离心 5 min,吸取水相过微孔滤膜(5.6),滤液待测。

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:Protein G 柱(1 mL),或性能相当者;
- b) 梯度洗脱条件:梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速:0.5 mL/min;
- d) 进样量:20 μL ;
- e) 检测波长:280 nm。



表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	100	0
4.5	100	0
5.5	0	100
15.0	0	100
18.5	100	0
26.0	100	0

注:梯度洗脱前先用 5 倍柱体积的水洗柱,再用 10 倍柱体积流动相 A(5.2)平衡色谱柱。

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(质量浓度相当)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 的质量浓度为横坐标、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 的质量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。单点校准定量时,试样溶液中 IgG 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 IgG(猪源性或牛源性)的含量多点校准按照公式(1)计算:

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

式中:

w ——试样中 IgG(猪源性或牛源性)的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ ——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($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g);

f ——超出曲线后的稀释倍数。

试样中 IgG(猪源性或牛源性)的含量 w ,单点校准按照公式(2)计算:

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

式中:

w ——试样中 IgG(猪源性或牛源性)的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

A ——试样溶液中 IgG 色谱峰面积;

ρ_s ——标准溶液中 IgG 的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);

A_s ——标准溶液中 IgG 的峰面积;

m ——试样质量,单位为克(g);

f ——超出曲线后的稀释倍数。

IgG 含量的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。

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

A.1 猪源 IgG 标准溶液液相色谱图见图 A.1。

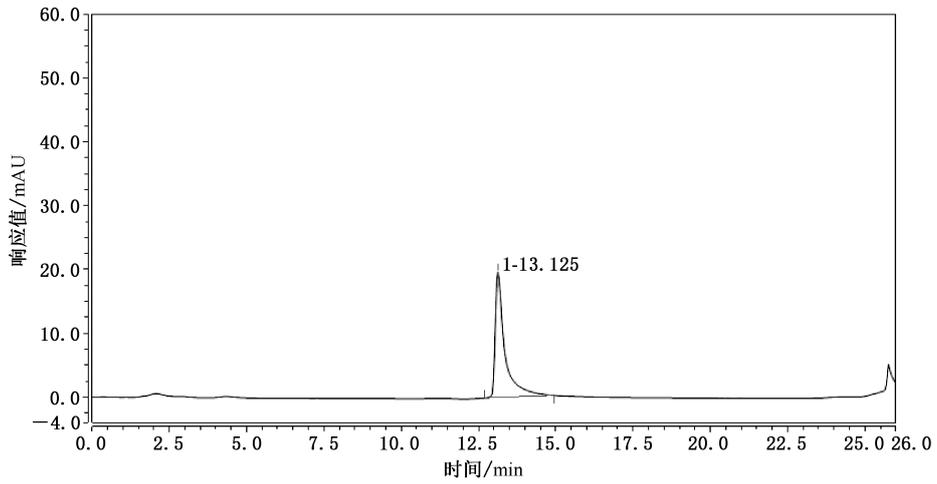


图 A.1 猪源 IgG 标准溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)液相色谱图

A.2 牛源 IgG 标准溶液液相色谱图见图 A.2。

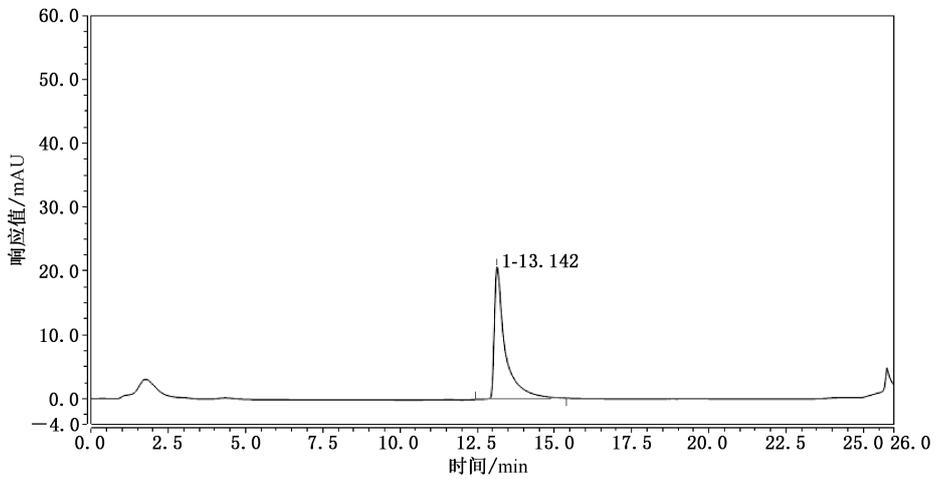


图 A.2 牛源 IgG 标准溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)液相色谱图