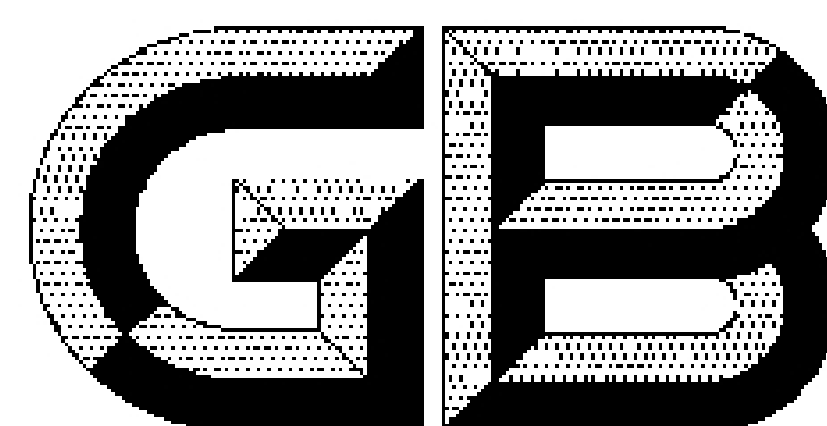




中华人民共和国国家标准

GB/T 40223—2021

植物代谢产物游离棉酚测定 酶联免疫吸附法

Determination of free gossypol of plant metabolites—
Enzyme-linked immunosorbent assay

2021-05-21 发布

2021-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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。

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。

本文件由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本文件起草单位：江南大学、北京工商大学、河北科技大学、北京萨姆伯科技有限公司。

本文件主要起草人：郭玲玲、马爱进、郝帅、徐丽广、孙茂忠、宋珊珊。



植物代谢产物游离棉酚测定 酶联免疫吸附法

1 范围

本文件规定了植物代谢产物游离棉酚的酶联免疫吸附测定方法。

本文件适用于棉粕及发酵饲料中游离棉酚的测定。

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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经处理后，样液中的游离棉酚、微孔板上固定的棉酚抗原与加入的棉酚抗体竞争结合，洗板除去未结合的其他成分，再与辣根过氧化物酶标抗体结合，加酶标底物显色，用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度值，计算游离棉酚的含量。

5 试剂和材料



除非另有规定，本文件所用化学试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

5.1 游离棉酚的检测试剂盒：参见附录 A。

5.2 棉酚：纯度 $\geq 95\%$ ，CAS 号为 652-78-8。

5.3 应按照试剂盒说明书配制所需溶液。

6 仪器设备

6.1 小型粉碎机。

6.2 分样筛：孔径 0.9 mm。

6.3 匀浆机。

6.4 涡旋混合器。

6.5 电子天平：感量 0.01 g。

6.6 具塞离心管：15 mL。

6.7 微孔板酶标仪:带 450 nm 滤光片。

6.8 试剂盒所要求的仪器。

7 样品的制备及保存

7.1 样品制备

称取 100 g 样品,用小型粉碎机进行粉碎,粉碎后的样本过孔径 0.9 mm 分样筛。装入清洁密封容器,并加以标识,待测。

7.2 样品保存

取样后应立即试验,如不能及时试验,应在 -18°C 冰箱中冻存,且不超过 2 周。

8 试验步骤

8.1 样本前处理

称取 1.00 g 过筛的样品,置于 15 mL 具塞离心管中,加入试剂盒所要求提取液,按照试剂盒说明书所述方法进行稀释和检测。

8.2 测定

按照酶联免疫试剂盒所述操作步骤对待测试样(液)进行定量检测。

8.3 平行试验

按以上步骤,对同一标准溶液、同一样品溶液均应进行平行试验测定。

8.4 空白试验

除不称取试样外,均按上述步骤进行。

8.5 阳性质控

根据待测样本中游离棉酚的含量,选择一个合适的质控标准,以确定试验过程的操作准确性。

9 试验数据处理

9.1 酶联免疫试剂盒定量检测的标准工作曲线绘制

按照试剂盒说明书提供的计算方法或者计算机软件,根据标准品质量浓度与吸光度变化关系绘制标准工作曲线。

9.2 待测液质量浓度计算

按照试剂盒说明书提供的计算方法以及计算机软件,将待测液吸光度代入 9.1 所获得标准工作曲线,计算待测液质量浓度(ρ)。

9.3 结果计算

样品中游离棉酚的含量按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times a \times 1\,000}{m \times 1\,000}$$

.....(1)

式中：

X ——样品中游离棉酚的含量,单位为毫克每千克(mg/kg)；

ρ ——从标准工作曲线上得到的样品中游离棉酚质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

V ——样本提取液体积,单位为毫升(mL)；

a ——在前处理过程中的稀释倍数；

m ——试样的称样量,单位为克(g)。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

11 准确度

本方法供酶联免疫试剂盒测试的游离棉酚溶液加标浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,平均回收率为 77.3%~111.6%；当供酶联免疫试剂盒测试的游离棉酚溶液加标浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时,平均回收率为 80.1%~110.5%；当供酶联免疫试剂盒测试的游离棉酚溶液加标浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,平均回收率为 86.4%~105.4%。

12 其他

当称样量为 1.00 g 时,游离棉酚的检出限为 2 mg/kg,定量限为 3 mg/kg。

附 录 A
(资料性)
游离棉酚检测试剂盒

- A.1 包被游离棉酚包被原的酶标板。
 - A.2 样品提取液：甲醇水(95+5)。
 - A.3 样本稀释液：含 0.01%吐温-20 的 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲溶液。
 - A.4 游离棉酚的标准溶液：0 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 。
 - A.5 辣根过氧化物酶标抗体。
 - A.6 洗涤液浓缩液(10 倍浓缩)：可用水稀释后使用。
 - A.7 底物溶液。
 - A.8 反应终止液。
-