

中华人民共和国国家标准

GB/T 28718—2012

饲料中 T-2 毒素的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

Determination of T-2 toxin in feed—High performance
liquid chromatography with immunoaffinity column clean-up

2012-09-03 发布

2013-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准起草单位:上海市饲料质量监督检验站、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所、浙江大学饲料科学研究所。

本标准主要起草人:赵志辉、林森、杨海锋、陆天华、顾赛红、凤懋熙、武爱波。

饲料中 T-2 毒素的测定

免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 T-2 毒素含量的免疫亲和柱净化-高效液相色谱测定方法。

本标准适用于饲料原料、配合饲料、浓缩饲料中 T-2 毒素含量的测定。

本标准的方法检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 14699.1 饲料 采样

3 原理

用甲醇和水混合溶液提取试样中的 T-2 毒素, 经免疫亲和柱净化, 1-蒽腈衍生化后, 用高效液相色谱荧光检测器测定, 外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定, 在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 甲醇: 色谱纯。

4.2 乙腈: 色谱纯。

4.3 甲苯: 色谱纯。

4.4 甲醇+水(80+20): 取 80 mL 甲醇加 20 mL 水。

4.5 4-二甲基氨基吡啶(DMAP, 0.325 g/L): 准确称取 0.032 5 g 4-二甲基氨基吡啶, 用甲苯溶解并定容至 100 mL。

4.6 1-蒽腈(1-anthrolynitrile, 1-AN, 0.3 g/L): 称取 0.030 g 1-蒽腈, 用甲苯溶解并定容至 100 mL。

4.7 T-2 毒素标准品: 纯度大于等于 98%。

4.8 T-2 毒素标准储备液: 准确称取适量的 T-2 毒素标准品(精确至 0.000 2 g), 用乙腈配成浓度为 0.5 mg/mL 的标准储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中避光保存, 有效期 3 个月。使用前用乙腈稀释成适当浓度的标准工作液。

4.9 T-2 毒素标准工作液: 根据使用需要, 准确吸取一定量的 T-2 毒素标准储备液, 用乙腈稀释, 分别配成相当于 10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL 的标准工作液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期 7 d。

4.10 T-2 毒素免疫亲和柱: 柱容量大于等于 2 μg 。

4.11 玻璃纤维滤纸: 直径 11 cm, 孔径 1.5 μm , 无荧光特性。

5 仪器和设备

- 5.1 实验室常用设备。
- 5.2 高效液相色谱仪:配有荧光检测器。
- 5.3 分析天平:精度为 0.000 1 g。
- 5.4 粉碎机:转速 10 000 r/min。
- 5.5 均质器:转速大于 10 000 r/min。
- 5.6 涡旋混合器。
- 5.7 注射器:10 mL。
- 5.8 氮气吹干仪。
- 5.9 试验筛:1 mm 孔径。
- 5.10 空气压缩机。
- 5.11 离心机。
- 5.12 超声波仪:功率大于 180 W。
- 5.13 天平:精度为 0.01 g。
- 5.14 水浴锅。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 规定,取有代表性饲料样品至少 500 g,四分法缩减至少 100 g,磨碎,过试验筛(5.9),混匀装入密闭容器中,避光低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取试样 50 g(精确到 0.01 g)于 500 mL 烧杯中,加入 100 mL 甲醇+水(80+20),高速均质 2 min 或超声 30 min,3 000 r/min 离心 5 min,上清液经定量滤纸过滤,移取 10.0 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,进行免疫亲和柱净化操作。

7.2 净化

将免疫亲和柱连接于注射器(5.7)下,准确移取 10.0 mL 提取液(7.1),注入注射器中。将空气压缩机与注射器连接,调节压力,使溶液以每秒约 1 滴的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中。再用 10 mL 水淋洗免疫亲和柱,流速约为每秒 1 滴至 2 滴,直至空气进入亲和柱中,弃去全部流出液,抽干小柱。

7.3 洗脱

准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱,流速约为每秒 1 滴,收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中。

7.4 衍生化

7.4.1 T-2 毒素标准工作液的衍生化:取不同浓度的 T-2 毒素标准工作液各 1.0 mL,在 50 ℃下用氮气吹干,加入 50 μ L 4-二甲基氨基吡啶(4.5)和 50 μ L 1-蒎蒽(4.6),在涡旋混合器上混匀 1 min,50 ℃水浴反应 15 min,50 ℃下用氮气吹干,用 1.0 mL 流动相(7.5.2)溶解,高效液相色谱测定。

7.4.2 样品的衍生化:将洗脱液(7.3)在 50 ℃下用氮气吹干,按 7.4.1 步骤进行。

7.5 高效液相色谱参考条件

- 7.5.1 色谱柱:C₁₈柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm,或相当者。
- 7.5.2 流动相:乙腈(4.2)+水=80+20(体积比)。
- 7.5.3 流速:1.0 mL/min。
- 7.5.4 检测波长:激发波长:381 nm,发射波长:470 nm。
- 7.5.5 进样体积:20 μL。
- 7.5.6 柱温:35 ℃。

7.6 定量测定

根据样液中 T-2 毒素衍生物含量情况,分别取适量的标准工作液和试样溶液,按照保留时间进行定性,以标准工作液做单点或多点校准,并用色谱峰面积积分值定量。在上述色谱条件下,标准品色谱图参见图 A.1。

7.7 平行试验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

8 结果计算

试样中 T-2 毒素含量按式(1)计算:

$$X = \frac{A_1 \times c \times V}{A_s \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X ——T-2 毒素的含量,单位为微克每千克(μg/kg);
- A₁ ——试样溶液中 T-2 毒素衍生物的峰面积;
- c ——标准工作溶液中 T-2 毒素衍生物的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- V ——试样溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);
- A_s ——标准工作溶液中 T-2 毒素衍生物的峰面积;
- m ——最终样液所代表的试样量,单位为千克(kg)。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果表示到小数点后一位。

9 重复性

同一实验室由同一操作人员使用同一台仪器完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 10%。

附 录 A
(资料性附录)
T-2 毒素的液相色谱图

T-2 毒素标准溶液(750 $\mu\text{g/L}$)的色谱图见图 A.1。

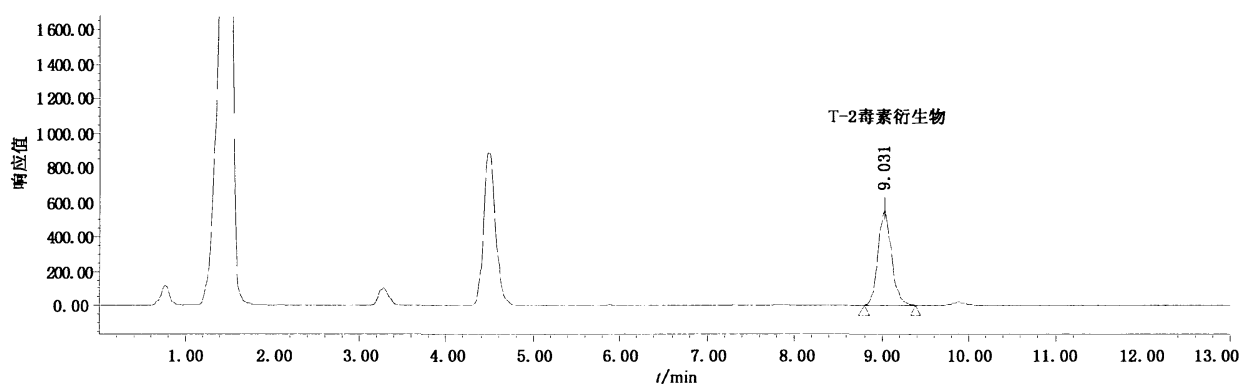


图 A.1 T-2 毒素标准溶液(750 $\mu\text{g/L}$)的色谱图