

ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.118—2008
代替 GB/T 5009.118—2003

GB/T 5009.118—2008

谷物中 T-2 毒素的测定

Determination of T-2 toxin in cereals

中华人民共和国
国家标准
谷物中 T-2 毒素的测定
GB/T 5009.118—2008

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街 16 号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2009 年 3 月第一版 2009 年 3 月第一次印刷

*

书号: 155066·1-36045 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68533533



GB/T 5009.118—2008

2008-11-21 发布

2009-03-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

- 15.3 电动振摇器。
 15.4 电热恒温水浴锅。
 15.5 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶。

16 分析步骤

16.1 提取

称取 20 g 粉碎并通过 20 目筛的试样,置 200 mL 具塞锥形烧瓶中,加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(4+1),密塞,振荡 1 h,通过滤纸过滤,取 25 mL 滤液于蒸发皿中,置 90 °C 水浴上通风挥干。用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中残渣,洗入 250 mL 分液漏斗中,再用 20 mL 甲醇-水(4+1)分次洗涤,转入同一分液漏斗中,振摇 1.5 min,静置约 15 min,收下层甲醇-水提取液过层析柱净化(层析柱的装备:在层析柱下端与小管相连接处塞约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝,敲平表面,再加入 0.4 g 活性炭,敲紧)。

将过柱后的洗脱液倒入蒸发皿中,并于水浴锅上浓缩至干,趁热加 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,挥干,再重复一次,最后加 3 mL 乙酸乙酯,冷至室温后转入浓缩瓶中。用适量乙酸乙酯洗涤蒸发皿,并入浓缩瓶中。将浓缩瓶置 95 °C 水浴锅上,挥干冷却后,用含 20% 甲醇的 PBS 定容,供 ELISA 检测之用。

16.2 ELISA 检测

16.2.1 用 T-2-BSA(4 μg/mL)包被酶标板,每孔 100 μL,4 °C 过夜。

16.2.2 酶标板用 PBS-T 洗 3 次,每次 3 min 后,加入不同浓度的 T-2 标准溶液(制作标准曲线)或试样提取液(检测试样毒素含量)与抗体-酶结合物溶液(1+100)的混合液(1+1,每孔 100 μL,该混合液应于使用的前一天配好,4 °C 过夜备用),置 37 °C 1.5 h。

16.2.3 酶标板洗 3 次,每次 3 min 后,加入底物溶液。每孔 100 μL,37 °C 30 min。

16.2.4 用 1 mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 50 μL,于 450 nm 处测定吸光度值。

17 结果计算

按式(3)计算:

$$c = m_1 \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1}{m} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

c ——T-2 浓度,单位为纳克每克(ng/g);

m_1 ——酶标板上所测得的 T-2 毒素的量,根据标准曲线求得,单位为纳克(ng);

V_1 ——试样提取液的体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——滴加样液的体积,单位为毫升(mL);

D ——样液的总稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

前 言

本标准代替 GB/T 5009.118—2003《小麦中 T-2 毒素的酶联免疫吸附测定(ELISA)》。

本标准与 GB/T 5009.118—2003 相比主要修改如下:

——修改了标准的中文名称,标准的中文名称改为“谷物中 T-2 毒素的测定”;

——增加了高效液相色谱法作为第一法。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准由中华人民共和国卫生部负责解释。

本标准负责起草单位:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中国疾病预防控制中心营养与食品安全所。

本标准参加起草单位:北京中检维康技术有限公司。

本标准主要起草人:隋凯、李军、卫锋、肖珊珊、杨春光、戚应春、阳传和、罗雪云、计融。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 14933—1994、GB/T 5009.118—2003。

称取 0.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、2.9 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、8.0 g 氯化钠(NaCl)、0.2 g 氯化钾(KCl)、0.5 mL 吐温-20,加水至 1 000 mL。

8.13.3 底物缓冲液为 pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液,配制方法为:

0.1 mol/L 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$),即称取柠檬酸 19.2 g,加水至 1 000 mL,为甲液;

0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),即称取磷酸氢二钠 71.7 g,加水至 1 000 mL,为乙液;

取甲液 24.3 mL,乙液 25.7 mL,加水至 100 mL,即可。

8.13.4 底物溶液:取 50 μL TMB(10 mg TMB 溶于 1 mL 二甲基甲酰胺中)溶液+10 mL 底物缓冲液+10 μL 30%过氧化氢,混匀。

8.14 T-2 毒素标准溶液:用甲醇配成 1 mg/mL T-2 毒素贮备液,−20 °C 冰箱贮存。于检测当天,精密吸取贮备液,用 20% 甲醇的 PBS(配制方法同 PBS-T,不加吐温-20 即可)稀释成制备标准曲线的所需浓度。

9 仪器

所有玻璃器皿均用硫酸洗液浸泡,用自来水、蒸馏水冲洗。

9.1 酶标检测仪。

9.2 酶标板(40 孔或 96 孔)。

9.3 电动振荡器。

9.4 电热恒温水浴锅。

9.5 具 0.2 mL 尾管的 10 mL 小浓缩瓶。

10 分析步骤

10.1 提取

称取 20 g 粉碎并通过 20 目筛的试样,置 200 mL 具塞锥形烧瓶中,加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(4+1),密塞,振荡 1 h,通过滤纸过滤,取 25 mL 滤液于蒸发皿中,置 90 °C 水浴上通风挥干。用 50 mL 石油醚分次溶解蒸发皿中残渣,洗入 250 mL 分液漏斗中,再用 20 mL 甲醇-水(4+1)分次洗涤,转入同一分液漏斗中,振摇 1.5 min,静置约 15 min,收下层甲醇-水提取液过层析柱净化(层析柱的装备;在层析柱下端与小管相连接处塞约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝,敲平表面,再加入 0.4 g 活性炭,敲紧)。

将过柱后的洗脱液倒入蒸发皿中,并于水浴锅上浓缩至干,趁热加 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,挥干,再重复一次,最后加 3 mL 乙酸乙酯,冷至室温后转入浓缩瓶中。用适量乙酸乙酯洗涤蒸发皿,并入浓缩瓶中,将浓缩瓶置 95 °C 水浴锅上,挥干冷却后,用含 20% 甲醇的 PBS 定容,供 ELISA 检测之用。

10.2 ELISA 检测

10.2.1 用 T-2-BSA(4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)包被酶标板,每孔 100 μL ,4 °C 过夜。

10.2.2 酶标板用 PBS-T 洗 3 次,每次 3 min 后,加入不同浓度的 T-2 标准溶液(制作标准曲线)或试样提取液(检测试样中的毒素含量)与抗体溶液的混合液(1+1,每孔 100 μL ,该混合液应于使用的前一天配好,4 °C 过夜备用),置 37 °C 1 h。

10.2.3 酶标板洗 3 次,每次 3 min 后,加入酶标二抗,每孔 100 μL ,37 °C 1.5 h。

10.2.4 同上述洗涤后,加入底物溶液,每孔 100 μL ,37 °C 30 min。

10.2.5 用 1 mol/L 硫酸溶液终止反应,每孔 50 μL ,于 450 nm 处测定吸光度值。

11 结果计算

按式(2)计算:

谷物中 T-2 毒素的测定

1 范围

本标准规定了谷物中 T-2 毒素的测定方法。

本标准适用于谷物及其制品中 T-2 毒素的测定。

本标准的第一法检出限为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,第二法和第三法的检出限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

第一法 高效液相色谱测定法

2 原理

试样中的 T-2 毒素用甲醇-水提取后,提取液经免疫亲和柱净化,浓缩、衍生、定容后,用配有荧光检测器的液相色谱仪进行测定,外标法定量。

3 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为蒸馏水或相当纯度的去离子水。

3.1 甲醇(CH_3OH):HPLC 级。

3.2 乙腈(CH_3CN):HPLC 级。

3.3 甲苯($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$):HPLC 级。

3.4 甲醇-水(8+2):取 80 mL 甲醇,加 20 mL 水。

3.5 4-二甲基氨基吡啶(DMAP)溶液:准确称取 0.032 5 g 于 100 mL 容量瓶中,用甲苯稀释至刻度。

3.6 1-氰酸蒽(1-anthroylnitrile,1-AN)溶液:准确称取 0.030 0 g 于 100 mL 容量瓶中,用甲苯稀释至刻度。

3.7 T-2 毒素(T-2 toxin)标准品:纯度 $\geq 98\%$ 。

3.8 T-2 毒素标准溶液:准确称取适量的 T-2 毒素标准品,用乙腈配成浓度为 0.5 mg/mL 的标准储备液,−20 °C 冰箱中避光保存。使用前用乙腈稀释成适当浓度的标准工作液。

3.9 T-2 毒素免疫亲和柱。

3.10 玻璃纤维滤纸。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱仪配有荧光检测器。

4.2 粉碎机。

4.3 高速均质器。

4.4 氮吹仪。

4.5 离心机。

4.6 涡旋混合仪。

4.7 空气压力泵。

4.8 玻璃注射器:20 mL。

4.9 天平:感量 0.000 1 g。