

畜禽饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 —高效液相色谱法

Determinaton of deoxynivalenol in animal foodstuff—High performance liquid chromatographic method

<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

2014 - 12 - 17 发布

2015 - 01 - 17 实施



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由安徽农业大学提出。

本标准起草单位：安徽农业大学、和县畜牧兽医局、马鞍山市农业委员会。

本标准起草人：王希春、佘兆法、吴金节、陈祥国、夏效平、耿芳芳、许伟、李玉、冯士彬、李贺侠、张宁。



<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途



<http://bzxx.ahbz.org.cn>
仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

畜禽饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定-高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了畜禽饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的高效液相色谱法的术语和定义、原理、设备、试剂、检测步骤。

本标准适用于饲料原料或配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

本方法的最低检出限为 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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，仅所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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 deoxynivalenol, Don

脱氧雪腐镰刀菌烯醇是禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 等真菌产生的一种次级代谢产物，属单端孢霉烯族毒素，又称呕吐毒素 (vomitoxin, VT)。

4 原理

液相色谱系统由储液器、泵、进样器、色谱柱、检测器、记录仪等几部分组成。原理是根据被测样品中各组分在流动相和固定相中溶解度不同而分离。被测样品与溶剂混合后在高压泵的作用下通过毛细管进入色谱柱，样品在色谱柱中作定向迁移运动并和流动相发生互相作用，使多组分的样品逐渐分离为单个组分，再进入检测，通过对比与分析即可定性定量地鉴定样品中的各个未知组分。

本检测方法原理是毒素经粗提后，流经流动相为乙腈和水的色谱柱时，被分离的组分在流动相和固定相中溶解度不同而分离。通过具有紫外吸收检测器的液相色谱仪进行检测，根据保留时间定性，外标法定量。

5 设备

5.1 高效液相色谱仪 (Waters Acquity, 配有紫外检测器)

- 5.2 层析柱：内径 2 cm，长度 25 cm，砂芯有活塞
- 5.3 粉碎机（DFY-500）
- 5.4 旋转蒸发器（RE-5203）
- 5.5 循环水真空泵（SHZ）
- 5.6 振荡器（HY-5）
- 5.7 离心机（TGL-18R）
- 5.8 恒温水浴锅（HH）
- 5.9 氮吹仪（UGC-12C）

6 试剂

6.1 本检测方法所用试剂，凡未指明规格者，均为分析纯，水应符合 GB/T 6682 一级用水的规定。

6.2 甲醇：HPLC 级和分析纯

6.3 乙腈：HPLC 级和分析纯

6.4 乙醇

6.5 乙酸乙酯

6.6 石油醚

6.7 硅镁吸附剂

6.8 无水硫酸钠

6.9 DON 标准品：纯度 $\geq 99\%$

6.10 DON 标准溶液

——DON 标准贮备液：准确称取适量的 DON 标准品，用乙腈配置成 1 mg/mL 的标准贮备液，避光储存于 4℃ 冰箱中，用于制备标准曲线。

——DON 标准工作液：取 DON 标准贮备液，用流动相逐级稀释成 0.02 ng/ μL 、1 ng/ μL 、5 ng/ μL 、10 ng/ μL 、15 ng/ μL 、20 ng/ μL 系列标准工作液。

注：凡接触过 DON 的容器，用双氧水或次氯酸钠浸泡过夜进行脱毒；为了安全，分析人员操作时要佩戴医用乳胶手套。

7 检测步骤

7.1 样品

饲料原料或配合饲料。

<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

7.2 试样制备

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的试样，按 GB/T 20195 进行试样的制备，粉碎，通过 0.90 mm 孔径分子筛，装入洁净的盛样容器中。

7.3 试样提取

称取试样 50.0 g（精确到 0.1 g）置于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 100 mL 乙腈-水（84:16），振荡 30 min（重复 1~2 次），过滤到分液漏斗，加约两倍体积石油醚脱脂，弃上层石油醚，收集下层乙腈-水层，90℃ 水浴挥干。加入少量乙酸乙酯溶解，离心，取上清液过柱（乙酸乙酯-甲醇（95:5）洗

柱)，90℃水浴减压挥干，1.5 mL 乙酸乙酯溶解残渣，离心，并转入定容瓶中，吹N₂挥干，乙腈定容至 2 mL。

7.4 试样提取液的纯化

7.4.1 层析柱制备：在层析柱底部加入适量脱脂棉，加入 10 mL 乙酸乙酯-甲醇溶液。

按下列顺序湿法装柱：

- 1) 无水硫酸钠 1.5 g；
- 2) 弗罗里硅土 8g；
- 3) 无水硫酸钠 2 g；
- 4) 脱脂棉少量。

7.4.2 过柱、洗脱：当柱内溶剂液面降至上层脱脂棉与无水硫酸钠界面时，用移液管将澄清的提取液移入柱内，用少量乙酸乙酯-甲醇溶液淋洗刻度试管移入柱内。当液面再次降至脱脂棉与无水硫酸钠界面时，分次加入 150 mL 乙酸乙酯-甲醇溶液，洗脱速度控制在 0.5 mL/min 左右，接收洗脱液至圆底烧瓶中。于旋转蒸发器上减压浓缩至干，1.5 mL 乙酸乙酯溶解残渣，离心，并转入定容瓶中，吹 N₂ 挥干，乙腈定容至 2 mL，经 0.45 nm 滤膜过滤后供 HPLC 检测用。

7.5 检测

7.5.1 色谱条件

7.5.1.1 色谱柱：Eclipse XDB- C18 分析柱（25 cm×4.6 mm，粒径 5 μm）；

7.5.1.2 流动相：乙腈-水（84:16）；

7.5.1.3 流速：0.8 mL/min；

7.5.1.4 检测波长：218 nm；

7.5.1.5 柱温：30 ℃；

7.5.1.6 进样量：20 μL。

7.5.2 定量测定

按照高效液相色谱仪说明书调整仪器操作参数。

向液相色谱柱中注入 DON 标准工作液和样液，标准工作液和样液中 DON 的响应值均应在仪器检测线性范围内，依据保留时间定性，得到色谱峰面积响应值，用外标法定量。

7.5.3 结果计算

所得实验数据按公式(1)计算：

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

式中：

X —— 试样中 DON 的含量，μg/g；

A —— 样液中 DON 的峰面积；

A_s —— 标准工作液中 DON 的峰面积；

c —— 标准工作液中 DON 的浓度，μg/mL；

V —— 样液最终定容体积，mL；

m —— 最终样液所代表的试样量，g；

平行测量结果用算术平均值表示，结果保留到小数点后一位有效数字。

7.6 重复性

在同一实验室、同一分析者对同一试样同时两次平行测定结果的相对误差不大于 10%。

7.7 回收率

本方法的回收率为 82.7%~98.5%。

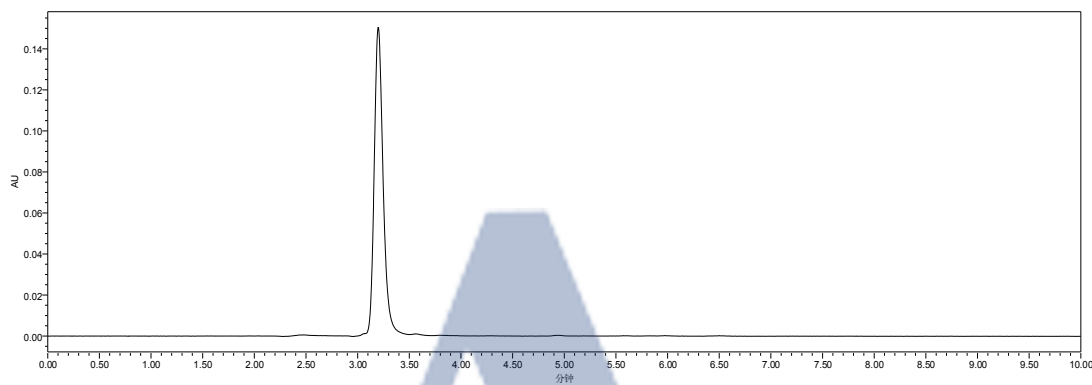


<http://bzxx.ahbz.org.cn>

仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途

附录 A
(资料性附录)
DON 标准品的液相色谱图

DON 标准品的液相色谱图见图A.1。



图A.1 DON 标准品 (20 ng/μL) 的液相色谱图

<http://bzxx.ahbz.org.cn>
仅供学习交流使用，请勿传播或其他用途