

ICS XXX

CCS XXX

团体标准

T/CCOA XXX—XXXX

饲料及谷物原料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮的测定-高效液相色谱法

Determination of deoxynivalenol, aflatoxin and zearalenone in feed and cereal raw materials—High performance liquid chromatography

(征求意见稿)

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

中国粮油学会 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。

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。

本文件由中国粮油学会提出并归口。

本文件起草单位：江苏省苏微微生物研究有限公司、国家粮食和物资储备局科学研究院、江西省农业技术推广中心、中国农业大学。

本文件主要起草人：李丽、张海涛、张冰、杨婷婷、叶金、董泽民、陈金男、贺平丽、吴宇、王松雪、万文根、王红连、华洵璐、于婷。

饲料及谷物原料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了饲料及谷物原料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮高效液相色谱法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合饲料、成品饲料及玉米、小麦等谷物原料和酒糟粕等饲料原料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮的同时定量检测。

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

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮，经三合一免疫亲和材料净化、采用柱后光化学衍生法衍生，以高效液相色谱仪串联紫外检测器和荧光检测器进行测定，外标法定量。

5 材料和试剂

除另有说明外，所有试剂均为分析纯，实验室用水应符合 GB/T 6682 中三级水的要求。

5.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮三合一免疫亲和柱：性能应满足附录 A 的要求，不同品牌、不同批次的免疫亲和柱使用前，应按照附录 A 进行性能测定。

5.2 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON，C₁₅H₂₀O₆，CAS：51481-10-8）：纯度≥99%，或符合量值溯源要求的有证标准溶液。

5.3 黄曲霉毒素 B₁（AFB₁，C₁₇H₁₂O₆，CAS：1162-65-8）：纯度≥98%，或符合量值溯源要求的有证标准溶液。

5.4 玉米赤霉烯酮（ZEN，C₁₈H₂₂O₅，CAS：17924-92-4）：纯度≥99%，或符合量值溯源要求的有证标准溶液。

5.5 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.6 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

5.7 样品提取液：乙腈-水溶液 (70:30, 体积比)，取 700 mL 乙腈 (5.5) 加入 300 mL 水，混匀。

5.8 初始流动相：乙腈-水溶液 (15:85, 体积比)，取 15 mL 乙腈 (5.5) 加入 85 mL 水，混匀。

5.9 磷酸盐缓冲液 (PBS)：称取 16.0 g 氯化钠 (NaCl)、2.88 g 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄)、0.48 g 磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 和 0.4 g 氯化钾 (KCl)，溶于约 900 mL 纯水中，用浓盐酸调节 pH 至 7.0，定容至 1000 mL。

5.10 0.5% Tween-20 PBS 溶液：取 995 mL 的 PBS 溶液 (5.9)，加入 5 mL 的 Tween-20，超声混合均匀。

5.11 玻璃纤维滤纸：GF/A (1.6 μm)，直径 90 mm。

5.12 离心管：50 mL 和 10 mL。

5.13 滤纸：中速定性滤纸。

5.14 标准混合中间溶液：准确移取一定量的脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (5.2)、黄曲霉毒素 B₁ (5.3)、玉米赤霉烯酮 (5.4) 的标准溶液于 10 mL 棕色容量瓶中，乙腈 (5.5) 定容，配制浓度分别为 40 μg/mL、1 μg/mL、20 μg/mL。于 2°C~8°C 保存，有效期为 6 个月。

5.15 标准系列溶液：准确移取适量标准混合中间溶液 (5.14)，用初始流动相稀释并定容，混匀，配制成质量浓度分别为 DON: 40 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、2000 ng/mL、4000 ng/mL；AFB₁: 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、100 ng/mL；ZEN: 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、250 ng/mL、1000 ng/mL、2000 ng/mL 的标准系列溶液，临用现配。

5.16 微孔滤膜：0.45 μm，亲水性聚四氟乙烯膜。

6 仪器和设备

6.1 粉碎机：电机转速≥1000 r/min。

6.2 离心机：转速不低于 10000 r/min。

6.3 天平：分度值 0.01 mg 和 0.01 g。

6.4 涡旋混合器。

6.5 高效液相色谱仪：配有紫外检测器 (二极管阵列检测器) 和荧光检测器。

6.6 氮吹仪。

6.7 试验筛：筛孔 1.00 mm。

6.8 固相萃取装置：12 位，配备负压装置。

6.9 光化学柱后衍生器 (适用于光化学柱后衍生法)。

7 样品

按 GB/T 20195 的规定制备样品，至少 500 g。固体样品粉碎使其全部通过 1 mm 孔径的试验筛 (6.7)，充分混匀，装入密闭容器中避光保存。选取类型相同、均匀一致，且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法检出限 30% 的饲料样品作为空白样品。

8 试样步骤

注意:试验过程全程避光操作。

8.1 提取

用天平（6.3）准确称取粉碎后的样品 5.0 g（精确到 0.01 g）于 50 mL 离心管（5.12）中，加入 20 mL 样品提取液（5.7）。使用涡旋混合器（6.4）涡旋提取 20 min，7000 r/min 离心 5min（6.2）或过滤（5.13）得上清液。准确移取 3 mL 上清液，加入 27 mL 0.5% Tween-20 PBS 溶液（5.10），充分混匀。混合溶液经玻璃纤维滤纸（5.11）过滤，收集滤液备用。若试样溶液 pH 超出 6.5~8.5 范围，应准确移取 20 mL 试样溶液调节 pH 至 6.5~8.5 再进行净化处理。

8.2 净化

将免疫亲和柱平衡至室温，上端接于 30 mL 玻璃定量管，下端连接固相萃取装置。待柱内保护液自然流尽后，向注射器中准确加入 20 mL 过滤液，在重力作用下使样液通过免疫亲和柱，控制流速约为 1 滴/s，直至空气进入亲和柱中。用 10 mL 水淋洗免疫亲和柱 2 次，抽干小柱。准确加入 2.0 mL 甲醇（5.6）洗脱，流速约为 1 滴/s，收集洗脱液。洗脱液置于 40 °C 条件下氮气吹至近干。残留物用 1 mL 初始流动相（5.8）复溶。经 0.45 μm 有机滤膜过滤，待上机。

8.3 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件列出如下：

- 1) 色谱柱：C₁₈ 柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）或性能相当者；
- 2) 流动相：A 相为甲醇；B 相为水；C 相为乙腈；
- 3) 梯度洗脱：参考下表 1；
- 4) 流速：1.0 mL/min；
- 5) 柱温：40 °C；
- 6) 进样体积：80 μL；
- 7) 紫外检测器：218 nm；
- 8) 荧光检测器：0 min ~ 21 min 设置为激发波长 362 nm，发射波长 440 nm，21 min ~ 30 min 设置为激发波长 274 nm，发射波长 440 nm，其中 21 min 可根据玉米赤霉烯酮的出峰时间进行适当调整；或分别设置，通道 1：激发波长 362 nm，发射波长 440 nm；通道 2：激发波长 274 nm，发射波长 440 nm。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	A（甲醇/%）	B（水/%）	C（乙腈/%）
0	0	85	15
3	0	85	15
4	20	55	25
15	20	55	25
16	30	30	40
24	30	30	40
25	0	85	15
30	0	85	15

8.4 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应峰面积，以标准系列工作液的浓度为横坐标，以相应色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.5 定性判定

在相同测试条件下，试样溶液与标准系列工作液中各目标化合物的保留时间相比，相对偏差在±2.5%以内。

8.6 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，根据标准曲线得到试样溶液中各目标化合物的浓度。试样溶液中各目标化合物的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围时，需适当减少提取液用量后再净化处理、进样分析。

8.7 空白试验

除不称取试样外，均按照上述测定步骤进行。

9 分析结果的表述

试样中 DON、AFB₁ 和 ZEN 的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中待测组分的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

ρ——由标准曲线计算得到的试样溶液中待测组分的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

*V*₁——试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

*V*₂——用于净化的提取液体积，单位为毫升（mL）；

*V*₃——样品经净化洗脱后的定容体积，单位为毫升（mL）；

1000——换算系数；

m——试样的称样量，单位为克（g）。

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%，在再现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 25%。

11 其他

本文件的方法脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限为 9.5 μg/kg，定量限为 31.8 μg/kg；黄曲霉毒素 B₁ 的检出限为 0.01 μg/kg，定量限为 0.03 μg/kg；玉米赤霉烯酮的检出限为 2.4 μg/kg，定量限为 7.9 μg/kg。

附 录 A

(规范性)

三合一免疫亲和柱性能评价要求

本附录规定了三合一免疫亲和柱的技术性能要求，用于对其产品的技术性能进行验证，以确认其适用于本方法。

A.1 柱本底

随机抽取同一批次的免疫亲和柱 3 根，按照说明书中的方法，去除保护液，直至空气进入，用洗脱液洗脱免疫亲和柱，洗脱液经高效液相色谱仪检测，通常不得检出。

A.2 柱容量

柱容量验证：在5 mL的0.5% Tween-20 PBS溶液中加入15000 ng DON、1500 ng AFB₁、8000 ng ZEN标准储备溶液，充分混匀。分别取同一批次3根免疫亲和柱，每根柱的上样量为1 mL。经上样、淋洗、洗脱，收集洗脱液，用氮气吹至近干，用初始流动相定容至1 mL，用液相色谱仪分离测定DON、AFB₁和ZEN的含量。

结果判定：结果DON $\geq$ 2500 ng、AFB₁ $\geq$ 200 ng和ZEN $\geq$ 1250 ng，为可使用商品。

A.3 柱回收

柱回收验证：评价浓度采用限量浓度或者用户检测需求的浓度，检验同一批次免疫亲和柱的准确性。

结果判定：柱回收率 $\geq$ 85%，相对标准偏差不大于10%，为可使用商品。

附 录 B

(资料性)

液相色谱图

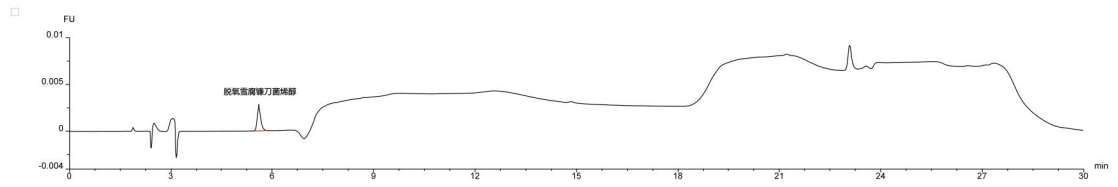


图 B.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液色谱图

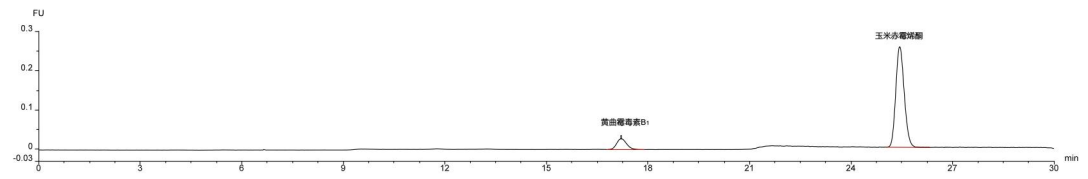


图 B.2 黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮标准溶液色谱图

附 录 C

(资料性)

实验室间比对试验统计结果

经 5 家实验室对 9 个不同样品进行实验室间比对,建立了本方法的精密度。结果按 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 统计分析,脱氧雪腐镰刀菌烯醇统计结果见表 C.1,黄曲霉毒素 B₁ 统计结果见表 C.2,玉米赤霉烯酮统计结果见表 C.3。

表 C.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇实验室间比对试验统计结果

样品	玉米皮 1	玉米蛋白粉 1	玉米胚芽粕	玉米蛋白粉 2	玉米皮 2	玉米皮 3	干酒糟及其可溶物 1	干酒糟及其可溶物 2	喷浆玉米皮	玉米 1	玉米 2
实验室数目	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
参加统计实验室数目	5	5	5	5	5	5	5	5	5	4	5
离群实验室数目	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
平均值/μg/kg	973.49	551.45	3935.52	286.88	4531.86	266.49	981.04	3352.11	717.27	1069.22	397.26
重复性标准偏差, Sr/μg/kg	10.63	13.6	48.57	4.43	107.24	5.22	14.69	40.71	5.28	51.56	7.49
重复性限, r/μg/kg	29.77	38.07	136.01	12.40	300.27	14.60	41.14	113.99	14.77	144.37	20.97
重复性变异系数, CVr/%	1.09	2.47	1.23	1.54	2.37	1.96	1.50	1.21	0.74	4.82	1.89
再现性标准偏差, SR/μg/kg	64.53	34.88	102.48	13.91	187.27	18.44	42.23	118.4	11.82	51.56	16.61
再现性限, R/μg/kg	180.67	97.66	286.93	38.94	524.34	51.65	118.25	331.53	33.1	144.37	46.50
再现性变异系数, CVR/%	6.63	6.33	2.60	4.85	4.13	6.92	4.30	3.53	1.65	4.82	4.18

表 C.2 黄曲霉毒素 B₁ 实验室间比对试验统计结果

样品	玉米皮 1	玉米蛋白粉 1	玉米胚芽粕	玉米蛋白粉 2	玉米皮 3	干酒糟及其可溶物 1	喷浆玉米皮	玉米 1	玉米 2
实验室数目	5	5	5	5	5	5	5	5	5
参加统计实验室数目	5	5	5	5	5	5	5	5	5
离群实验室数目	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均值/μg/kg	50.72	197.19	70.15	330.02	3.64	3.59	5.23	19.49	46.62
重复性标准偏差, Sr/μg/kg	2.10	0.98	1.78	1.53	0.15	0.07	0.16	0.58	1.42
重复性限, r/μg/kg	5.88	2.75	4.99	4.28	0.41	0.20	0.44	1.61	3.97
重复性变异系数, CVr/%	4.14	0.50	2.54	0.46	3.99	1.99	3.03	2.96	3.04
再现性标准偏差, SR/μg/kg	3.85	2.36	5.52	6.84	0.44	0.13	0.29	0.65	2.23
再现性限, R/μg/kg	10.77	6.62	15.47	19.16	1.22	0.35	0.80	1.82	6.26
再现性变异系数, CVR/%	7.58	1.20	7.88	2.07	12	3.50	5.49	3.33	4.79

表 C.3 玉米赤霉烯酮实验室间比对试验统计结果

样品	玉米皮 1	玉米蛋白粉 1	玉米胚芽粕	玉米蛋白粉 2	玉米皮 2	玉米皮 3	干酒糟及其可溶物 1	干酒糟及其可溶物 2	喷浆玉米皮	玉米 1	玉米 2
实验室数目	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
参加统计实验室数目	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
离群实验室数目	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均值/μg/kg	686.36	4736.65	1579.42	2204.31	2886.23	1384.02	391.12	178.65	1015.67	96.44	141.55
重复性标准偏差, Sr/μg/kg	12.05	62.31	28.13	16.75	31.09	13.80	5.27	1.24	8.28	5.98	4.75
重复性限, r/μg/kg	33.73	174.46	78.75	46.89	87.04	38.64	14.76	3.46	23.17	16.75	13.29
重复性变异系数, CVr/%	1.76	1.32	1.78	0.76	1.08	1.00	1.35	0.69	0.81	6.20	3.35
再现性标准偏差, SR/μg/kg	32.70	195.94	69.29	40.55	101.64	46.41	14.47	3.17	16.11	5.98	13.43
再现性限, R/μg/kg	91.55	548.63	194.01	113.55	284.59	129.94	40.51	8.86	45.12	16.75	37.61
再现性变异系数, CVR/%	4.76	4.14	4.39	1.84	3.52	3.35	3.70	1.77	1.59	6.20	9.49