



中华人民共和国国家标准

GB/T 8381.6—2005

配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 薄层色谱法

Method for determination of deoxynivalenol in formula feed—
Thin layer chromatography

2005-09-05 发布

2006-02-01 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

本标准参考了 GB/T 14929.5—1994《谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定方法》。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准由农业部饲料质量监督检验测试中心(沈阳)负责起草,吉林省兽药监察所、国家饲料质量监督检验中心(北京)参加起草。

本标准主要起草人:陈莹莹、曹东、董永亮、肖勇、李雪兰、李广生、刘同民、杨曙明。

配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 薄层色谱法

1 范围

本标准规定了测定配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的薄层色谱方法。

本标准适用于配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定。

本方法的检出限为 1 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 原理

配合饲料中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇经提取、净化、浓缩和硅胶 G 薄层板展开后,加热薄层板。由于在制备薄层板时加入了三氯化铝,使脱氧雪腐镰刀菌烯醇在 365 nm 紫外灯下显蓝色荧光,根据其在薄层板上显示荧光的最低检出量来测定含量。

4 试剂

除非另有说明,在本分析中仅使用确认为分析纯的试剂和蒸馏水(或去离子水,或相当纯度的水)。

- 4.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(以下简称 DON)标准品, SIGMA D0156¹⁾。
- 4.2 乙酸乙酯。
- 4.3 石油醚,沸程 60℃~90℃、30℃~60℃。
- 4.4 乙醚。
- 4.5 氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)。
- 4.6 硅胶 G,薄层层析用。
- 4.7 乙酸乙酯-甲醇,19+1。
- 4.8 三氯甲烷-无水乙醇,8+2。
- 4.9 甲醇-水,4+1。
- 4.10 甲醇-丙酮,1+2。
- 4.11 三氯甲烷-乙腈,4+1。
- 4.12 甲苯-乙酸乙酯-甲酸,6+3+1。
- 4.13 中性氧化铝,层析用,经 300℃活化 4 h,置干燥器中备用。
- 4.14 活性炭:取 20 g 活性炭,用 27%(体积分数)盐酸溶液浸泡过夜、抽滤后,用热蒸馏水洗至无氯离子,在 120℃烘干备用。

1) D0156 是美国 Sigma 公司的商品代号。给出这一信息是为了方便本标准的使用者,并不表示对该产品的认可。
如果其他等效产品具有相同的效果,则可使用这些等效的产品。

4.15 DON 标准品溶液:称取 5.0 mg DON 标准品,准确到 0.1 mg,用乙酸乙酯-甲醇(4.7)溶解,转入 10 mL 容量瓶中,再用乙酸乙酯-甲醇稀释至刻度,此溶液含 DON 0.5 mg/mL。吸取此标准溶液 0.5 mL,用乙酸乙酯-甲醇稀释至 10 mL,此溶液含 DON 25 μ g/mL。

5 仪器和设备

- 5.1 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.2 天平:感量 0.01 g。
- 5.3 小型粉碎机。
- 5.4 电动振荡器。
- 5.5 旋转蒸发器。
- 5.6 层析柱:内径 2 cm,长 10 cm。
- 5.7 刻度吸管:容量 10 mL、25 mL。
- 5.8 具塞浓缩瓶:容量 10 mL,底部具 0.2 mL 刻度尾管。
- 5.9 玻璃板:规格 5 cm $\times$ 20 cm。
- 5.10 薄层涂布器:涂布厚度 0.3 mm。
- 5.11 展开槽:卧式,内长 25 cm,宽 6 cm,高 4 cm;立式,内长 10 cm,宽 6 cm,高 25 cm。
- 5.12 紫外光灯:波长 365 nm。
- 5.13 微量注射器:10 μ L、25 μ L。

6 试样的制备

将按 GB/T 14699.1 取得的样品,四分法缩分,取约 200 g,经粉碎,全部过 1 mm 孔筛,混匀,装入磨口瓶中备用。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 20 g 试样(6),精确到 0.01 g,置 200 mL 具塞锥形瓶中,加 8 mL 水和 100 mL 三氯甲烷-无水乙醇(4.8),密塞,在瓶塞上涂层水,盖严防漏。振荡 1 h,通过折叠快速定性滤纸过滤,取 25 mL 滤液于 100 mL 蒸发瓶中,置旋转蒸发器(5.5)上 45 $^{\circ}$ C 减压蒸发至干。

7.2 净化

7.2.1 液-液分配

用 100 mL 石油醚(4.3)分次溶解蒸发瓶中的残渣,洗入 250 mL 分液漏斗中,再用 30 mL 甲醇-水(4.9)分次洗涤蒸发瓶,转入同一分液漏斗。振摇分液漏斗 1.5 min,静置约 15 min,使分层后,将下层甲醇-水提取液过净化柱,不要将两交界处的白色絮物放入柱内。

7.2.2 柱净化

在层析柱(5.6)下端塞约 0.1 g 脱脂棉,尽量塞紧,先装入 0.5 g 中性氧化铝(4.13),敲平表面,再加入 0.5 g 活性炭(4.14),敲紧。将层析柱下端插入胶塞,塞在抽滤瓶上,抽滤瓶中放入一平底管接收流出液。打开真空泵,使活性炭压紧,将分液漏斗中的甲醇-水提取液小心地沿管壁加入柱内,控制流速不超过 3 mL/min,提取液过柱快完毕时,加入 10 mL 甲醇-水淋洗柱,继续抽滤,直至不再有液体流出。

7.3 试料溶液的制备

过柱后的流出液(7.2.2)转入 100 mL 蒸发瓶中,置旋转蒸发器上,45 $^{\circ}$ C 减压蒸发至干。取下蒸发瓶置沸水浴上至完全干燥,趁热加入 3 mL 乙酸乙酯(4.2),加热至沸腾,在水浴上轻轻地反复摇动蒸发瓶,使残渣中的 DON 溶出,放冷至室温后转入浓缩瓶(5.8)中。加约 0.5 mL 甲醇-丙酮(4.10)于蒸发瓶中,超声破碎残渣,将蒸发瓶置水浴上挥干溶剂后,加入 3 mL 乙酸乙酯,加热至沸,转动蒸发瓶,使充

分沸腾,放冷至室温后转入同一浓缩瓶中,再用 0.5 mL 甲醇-丙酮和 3 mL 乙酸乙酯同样处理一次,乙酸乙酯并入浓缩瓶中。将浓缩瓶置约 95℃ 水浴上,蒸汽加热浓缩至干,放冷至室温后,准确加入 0.2 mL 三氯甲烷-乙腈(4.11)溶解残渣留做薄层层析用。

7.4 测定

7.4.1 薄层板的制备

取 4 g 硅胶 G(4.6),加 15% 氯化铝(4.5)溶液约 9 mL,研磨 2 min 至呈粘稠状,铺成 5 cm×20 cm 的薄层板三块,置室温干燥后,于 105℃ 活化 1 h,贮干燥器中备用。

7.4.2 点样

在距薄层板(7.4.1)下端 2.5 cm 处为基线点样。在距板左边缘 0.8 cm~1 cm 处点试料溶液(7.3) 1 μ L,在距左边缘 2.0 cm 处点 1 μ L 标准品溶液(4.15),在距右边缘 1.2 cm 处点 2 μ L 标准品溶液。再在距板上端 1.5 cm 处点三个标准品溶液各 2 μ L,使之与基线上三个点的位置相对应。

7.4.3 展开

7.4.3.1 横展

以乙醚(4.4)为横展剂,在卧式展开槽内倒入 10 mL 展开剂,将点好样的薄层板(7.4.2)靠试料溶液点的长边斜浸入展开剂,展至板端过 1 min~2 min,使试料中的 DON 偏离原点 0.7 cm~1 cm,取出通风挥干 3 min。再用 10 mL 石油醚(30℃~60℃)横展一次,展至板端过 1 min,取出通风挥干 5 min。

7.4.3.2 纵展

以甲苯-乙酸乙酯-甲酸(4.12)为纵展剂。将横展挥干后的薄层板置立式展开槽内纵展 15 cm。取出通风挥干约 10 min。

7.4.4 显影

将薄层板(7.4.3)置 130℃ 烘箱中加热 7 min~10 min,取出后冷却 1 min~5 min 后于紫外光灯(5.12)下观察。

7.4.5 观察与评定

薄层板经横展后,试料溶液中的 DON 向右移动约 0.7 cm~1 cm,使其摆脱了杂质荧光的干扰。薄层板上端未经纵展的三个标准品点可分别作为横展后试料溶液中 DON 点和两个标准品点的定位点。试料溶液中的 DON 点又可与纵展后的标准品点比较 R_f 值而定位。这样从横向和纵向两个方向确定试料溶液 DON 点的位置,达到定性的目的。

如果在薄层板上与标准荧光斑点对应处未见试料中的被测物斑点,则需按上述方法重新点第二块板。只是在点完试料溶液后,在滴加试料溶液处再滴加 1 μ L 标准品溶液,与第一块板同样展开、显荧光。如果第二块板上试料溶液加 1 μ L 标准品溶液所显荧光强度与 1 μ L 标准溶液相同,则试样中 DON 含量为阴性或 1 mg/kg 以下。

阳性试样可通过稀释试料溶液或调整点样量直至所产生斑点的荧光强度与 1 μ L 标准品溶液所显荧光强度相同进行定量。虽然基线上的三个 DON 点在横展中都稍有移动,但对各点荧光强度无影响,两个标准品点均可用于和试料溶液点比较荧光强度。



6005-6 1828 T-80