



中华人民共和国国家标准

GB/T 30956—2014

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

Determination of deoxynivalenol in feeds—High performance
liquid chromatography with immunoaffinity column clean-up

2014-07-08 发布

2015-01-10 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)归口。

本标准由农业部饲料质量监督检验测试中心(南昌)、中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所[国家饲料质量监督检验中心(北京)]、上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所、上海市饲料质量监督检验站负责起草。

本标准主要起草人:文虹、饶辉、周华娇、符金华、尹腾桂、徐田放、饶正华、杨琳芬、邢磊、赵薇娜、赵志辉。

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 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脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)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、精料补充料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的测定。
本标准定量限为 0.1 mg/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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 原理

试样中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇用水提取后,提取液经免疫亲和柱净化、浓缩后,用配有紫外检测器或二极管阵列检测器的高效液相色谱仪进行测定,外标法定量。

4 试剂

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

4.1 甲醇:色谱级。

4.2 乙腈:色谱级。

4.3 聚乙二醇(polyethylene glycol, $M=8\ 000$)。

4.4 HPLC 流动相:量取 100 mL 乙腈(4.2)至 1 000 mL 的容量瓶中,加入水定容至 1 000 mL。混合均匀并通过 0.45 μm 滤膜,备用。

4.5 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol)标准品:纯度 $\geq 98\%$ 。

4.6 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备液:准确称取适量的脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品,用甲醇(4.1)配成浓度为 0.1 mg/mL 的标准储备液,贮于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,可使用 3 个月。

4.7 脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液:脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准储备液(4.6)用流动相(4.4)稀释,配制 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液。脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液储藏在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱里,可使用 7 天。

5 仪器和设备

除实验室常用设备外,还需要以下仪器和设备:

- 5.1 免疫亲和柱,柱容量 ≥ 1.25 mg,回收率 $\geq 85\%$ 。
- 5.2 振荡器。
- 5.3 氮吹仪。
- 5.4 高速均质器:18 000 r/min~22 000 r/min。
- 5.5 高效液相色谱仪,配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 5.6 真空装置或空气压力泵,符合免疫亲和柱的要求。
- 5.7 玻璃纤维滤纸,直径 21 mm、125 mm。

6 试样的制备

按 GB/T 14699.1 采集有代表性的样品,按 GB/T 20195 进行样品制备。粉碎过 1 mm 孔筛,混合均匀,装入密闭容器,低温保存备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取粉碎试样约 50 g(精确到 0.1 g)置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 10 g 聚乙二醇(4.3)及 200 mL 水,高速均质(5.4)2 min,或振荡器(5.2)振荡 60 min。静置,通过快速定性滤纸过滤,以玻璃纤维滤纸(5.7)过滤 1~2 次,至滤液澄清,随即进行免疫亲和柱净化操作。

7.2 净化

将免疫亲和柱(5.1)连接于 10 mL 玻璃定量管下。准确移取 1 mL 澄清提取滤液(7.1)注入玻璃定量管中,将空气压力泵(5.6)与玻璃定量管连接,调节压力使溶液以不超过 2 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱,直至有部分空气通过柱体。以 5 mL 水清洗柱子 1 次,弃去全部流出液,并使 3 mL 以上空气通过柱体。准确加入 1 mL 甲醇(4.1)洗脱,流速不超过 1 mL/min,收集洗脱液于玻璃试管中,再用氮吹仪(5.3)于 50℃以下吹干。用 0.5 mL 流动相(4.4)溶解残渣,涡旋混匀,过 0.45 μ m 滤膜,供液相色谱测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱测定参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,填料直径 5 μ m 或相当者;
流动相:见 4.4;
流速:0.8 mL/min;
检测波长:218 nm;
进样量:20 μ L;
柱温:室温。

7.3.2 色谱测定

分别取试样溶液和标准工作液各 20 μ L(或相同体积)注入高效液相色谱仪进行测定,以标准工作液浓度为横坐标,以峰面积积分值为纵坐标,绘制标准工作曲线,以保留时间定性,用标准工作曲线对试样进行定量。脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液色谱图参见附录 A。

8 结果计算与表示

8.1 结果计算

试样中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量,以质量分数 X 计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

$$X = \frac{c \times V}{m} \times n \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c —— 试样溶液中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V —— 上机液的定容液体积,单位为毫升(mL);

m —— 试样称取量,单位为克(g);

n —— 稀释倍数。

8.2 结果表示

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

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 15%。

附录 A
(资料性附录)

脱氧雪腐镰刀菌烯醇的标准品色谱图

脱氧雪腐镰刀菌烯醇的标准品色谱图见图 A.1。

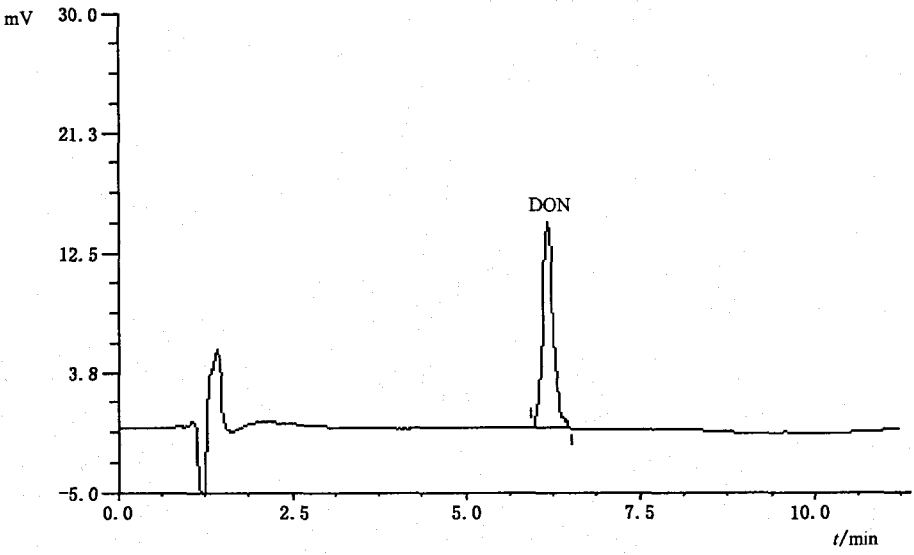


图 A.1 2 mg/kg 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的标准溶液液相色谱图