

# 农业行业标准

《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定  
时间分辨荧光免疫层析定量法》

(公开征求意见稿)

编制  
说明

# 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法

## 编制说明

### 一、工作简况

#### (一) 任务来源

根据农业农村部农产品质量安全监管司下达的 2022 年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知（农质标函[2022]66 号），由江苏省家禽科学研究所和上海雄图生物科技有限公司联合负责《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法》起草工作。起草单位成立标准起草组进行本标准制定的各项工作。

#### (二) 标准制定背景

##### 1. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染现状及其测定方法研究进展

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（Deoxynivalenol, DON）又名呕吐毒素，是由镰刀菌属产生的毒性代谢产物，属于单端孢霉烯族化合物，是一种无色针状结晶，具有较强的热抗力，121°C 高压加热 25 min 仅少量破坏，脱氧雪腐镰刀菌烯醇是食品、谷物中常见的真菌毒素，在自然界中广泛存在。镰刀菌属通常在作物生长期就感染，其最适生长温度为 5°C~25°C，分布于小麦、大麦、玉米等谷物籽实中，在谷物和饲料中检出率极高。据联合国粮农组织（FAO）统计，全世界每年谷物产量的 25% 受到真菌毒素不同程度的污染，随着饲料工业的快速发展，近年来，中国的饲料也受到真菌毒素污染的严重挑战，自 2006 年以来，玉米等饲料原料价格普遍上涨，加上近年来气候的变化，华北、东北地区降雨量增加，进一步加重了饲料原料中真菌毒素的污染，在世界各地真菌毒素已构成重要的食品安全问题。欧盟要求粮食谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇最高限量要小于 1 mg/kg，中国 2017 年发布的 GB 13078-2017《饲料卫生标准》规定了植物性饲料原料脱氧雪腐镰刀菌烯醇最高限量为 5 mg/kg，饲料产品中猪配合饲料脱氧雪腐镰刀菌烯醇最高限量为 1 mg/kg，其它配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇最高限量为 3 mg/kg，犊牛、羔羊、泌乳期精料补充料脱氧雪腐镰刀菌烯醇最高限量为 1 mg/kg，其它精料补充料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇最高限量为 3 mg/kg。

目前，国标和农业部公告中规定测定脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法有同位素稀释液相色谱-串联质谱法、免疫亲和层析净化高效液相色谱法、薄层色谱测定法、酶联免疫吸附筛查法、胶体金法等。薄层色谱法，灵敏度差，对环境污染较大，现代检测中已很少使用；液相色谱-质谱法，此方法需要大型的仪器设备，设备价格昂贵，操作过程复杂、时间较长，且无法在现场和小型实验室或企业中使用，也不适合大批量样品的快速检测；酶联免疫吸附法（ELISA）可半定量、无需贵重仪器设备，但应用时必须通过多次洗涤，才能使反应产物和游离底物进行分离，影响到结果的重复性，而且检测时间较长，每次使用都需要做标准曲线，无法满足现场快速检测的要求，使用成本高；胶体金快速检测试纸条等方法，此类方法用于大量样品的筛查，具有操作简便，检测快速，成本低等优点，但稳定性和准确性差，极易造成假阳性或者假阴性检测结果，导致作出错误判断。

## 2. 必要性

脱氧雪腐镰刀菌烯醇对人和动物均有很强的毒性，能引起动物呕吐、腹泻、皮肤刺激、拒食、神经紊乱、流产、死胎等，严重时损害造血系统而造成死亡，猪是对脱氧雪腐镰刀菌烯醇最敏感的动物，家禽次之，反刍动物由于瘤胃微生物的作用，耐受力最强。由于中国传统饮食习惯中粮谷比例大大高于西方，使得脱氧雪腐镰刀菌烯醇的危害更为突出。1998年，在国际癌症研究机构公布的评价报告中，脱氧雪腐镰刀菌烯醇被列为三类致癌物。为保障饲料卫生、畜禽安全、人体健康，检测饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇十分必要。

但由于现有检测方法的限制，无法同时集合快速、准确、定量、低成本等优点，不利于饲料生产加工企业、畜牧养殖企业及基层检测单位对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇进行有效监管。饲料生产加工企业、畜牧养殖企业及基层检测单位因为检测数量大、检测时间有限、需要控制成本、要求结果准确的特点，迫切需要方便、准确、快速和低成本，可实现大量样本快速定量检测的脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测方法，以满足饲料原料及饲料产品生产、加工、销售等过程的监控、监督、检查的工作需要。时间分辨荧光免疫层析定量法能很好地满足上述要求。鉴于大仪器检测方法的专业性要求高和成本昂贵、胶体金和酶联免疫法稳定性差的缺点，脱氧雪腐镰刀菌烯醇快速定量检测技术的研究及制订相应的检测方法标准是非常必要的。

本标准的制定便于饲料、畜禽养殖等相关生产、加工企业及其流通企业、第三方检测机构和各级政府监管部门对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的准确定量检测，实现有效监管。保障饲料及畜牧产品的质量和人民群众的身体健康，最终实现我国养殖业、饲料生产和食品加工等行业的健康、高效、快速发展。

### 3. 可行性

时间分辨荧光免疫分析技术（Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA）是 20 世纪 80 年代中期发展起来的一种新型非放射性免疫标记技术，利用免疫反应的高度特异性和标记示踪物的高度灵敏性相结合而建立的一类微量物质检测技术，其灵敏度、可测范围和稳定性都优于现有的酶联免疫分析法和胶体金法，具有广阔的应用前景。再结合 POCT 理念，达到真正定量快检的目的。

该方法用的是镧系元素及其螯合物经特殊包裹加工而成的荧光微球作为荧光标记物，荧光强度比普通荧光标记物更高、峰形更窄大大提高了检测的灵敏度。镧系元素及其螯合物的激发波长和发射波长之间有一个较大的 Stokes 位移，减少了由激发光引起的非特异性杂散光对检测结果的干扰，提高荧光检测的稳定性和准确性；同时荧光寿命更长，消除了环境中非特异性荧光物质对待测物的干扰，增强了本产品的灵敏度。

农业标准 NY/T 2548-2014《饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定 时间分辨荧光免疫层析法》的发布也证实了此方法的可行性。

### 4. 预期经济社会效益分析

#### 4.1 提高饲料质量，保障畜禽健康安全

脱氧雪腐镰刀菌烯醇是由真菌产生的代谢物，广泛存在于粮油食品和饲料中。这些产毒真菌分布于各级食物链，即使是在现今拥有先进的农业技术和食品加工工艺的条件下，在作物种植、收获、储藏和加工过程中，仍然无法避免和防止产毒真菌的危害。随着我国经济的快速发展，人民群众物质文化生活水平不断提高，对食品安全和饲料安全的关注进一步提高，迫切需要相应的快速定量检测技术。本标准的制定可以有效对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇进行准确定量检测，实现有效监管，从而提高饲料原料及其成品的质量品质，保障养殖畜禽所食饲料的安全。

#### 4.2 实现以人为本，保证广大群众生命健康

脱氧雪腐镰刀菌烯醇可通过污染的粮食谷物和那些被污染的饲料饲喂的食源性动物，最后以肉、蛋、奶为媒介进入食物链危害人类健康。其具有致癌、致畸形、致突变，还具有细胞毒性、免疫毒性，可能影响人类的免疫系统。制定本标准便于饲料、畜禽养殖等相关的食品生产加工企业及其流通企业、第三方检测机构和各级政府监管部门对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的准确定量检测，实现有效监管。保障饲料及畜牧产品的质量和人民群众的身体健康，最终实现我国农牧行业的健康发展。

#### 4.3 适应市场经济

当前欧盟、美国、日本、澳大利亚等发达国家都已建立更严格的食物安全监控体系，并通过制订复杂、严苛的技术标准、法规及认证制度作为贸易技术壁垒，以达到阻止进口农产品及食品进入，保护国内市场。由于毒素残留超标，引起外国拒收，退货、扣留、索赔、取消合同等事件经常发生，给我国农产品生产者造成很大的经济损失，并影响了我国农产品的外贸形象及安全可信度。制定本标准可以利于出口企业及海关对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇进行监管。从源头保证农产品质量，提高我国农产品的竞争力。

### (三) 主要工作过程

#### 1. 建立标准起草组

2022年4-5月，项目下达后成立标准制定小组，查询国内外资料，广泛开展调研，召开第一次标准起草讨论会，确定标准制订方案和工作计划。

#### 2. 形成标准草案

2022年6-7月，进行标准的研制工作，确定标准研制的总体思路，主要包括方法的建立，方法的优化，方法性能测试，方法的验证研究等。

2022年8-9月，标准起草，根据实验结果和相关资料，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》形成标准文本。

#### 3. 征求意见阶段

2022年10月-2023年10月，对《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法》定向征求意见，通过发函征询意见，广泛征求相关生产企业、

科研人员、检测机构和相关主管部门的意见，根据反馈意见对标准进行汇总修改，形成标准预审稿（第一版）。

#### 4. 标准预审阶段

2024年1月，开展《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法》预审，形成预审意见。

2024年2月-2025年5月，针对《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法》预审意见进行了补充完善，再次形成标准的预审稿（第二版）申请审核。

## 二、标准编制原则、主要内容及其确定依据及修订前后技术内容的对比

### （一）本标准编制的原则

本标准是根据 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分：试验方法标准》的要求而进行编写的。有关技术内容是在参考国内、外有关标准及文献的基础上经研究、改进和验证后制定的。

### （二）主要技术内容确定及依据

#### 1. 技术原理

当将待测样品滴加在加样区时，样品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗原与结合垫中荧光微球标记的脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体结合并通过毛细作用向前层析，到达检测区后，检测线 T 线上固定的脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗原与剩余未结合的荧光微球标记脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体结合。检测线 T 线上结合的荧光微球标记的脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体浓度与样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的浓度成反比。层析结束后，采用时间分辨荧光免疫定量分析仪读取 T 线的荧光强度（FIT）和 C 线的相对荧光强（FIC）度并计算 FIT/FIC 值，通过试剂盒中写有标准曲线和检测项目信息的 ID 卡，用时间分辨荧光免疫定量分析仪内置的分析软件自动计算出样品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的浓度。

#### 2. 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量检测试剂盒组成

脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量检测试剂盒中主要包括：样品提

取液、样品稀释液、定量检测试纸条、说明书、标准曲线 ID 卡。样品提取液为 80% 甲醇溶液，样品稀释液为 7 mmol/L pH 7.0 的磷酸缓冲溶液，独立包装的检测试纸条，其中的试纸条的结构是由样品垫、喷有时间分辨铕（Eu）荧光微球标记脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体的结合垫、包埋有脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗原的 T 线和羊抗兔二抗的 C 线的硝酸纤维素膜和吸水垫依次搭接构成，37°C 烘干后，切成 8 cm 宽、0.4 cm 宽的试纸条，固定在 PVC 塑料卡壳内，最后密封在铝箔袋中，同时铝箔袋内装有干燥剂。说明书为检测方法原理、试纸条性能参数、操作步骤、注意事项的详细说明。ID 卡用于存储定量试纸条的标准曲线和项目信息，直接插入时间分辨荧光免疫定量分析仪使用即可。

### 3. 实验条件确定

#### 3.1 样品提取液中甲醇浓度对试纸条性能的影响

脱氧雪腐镰刀菌烯醇易溶于水及氯仿、甲醇、丙酮等有机溶剂，其中甲醇对免疫反应影响最小，所以使用甲醇（分析纯）和水（去离子水，GB/T 6682）的混合溶液作为样本提取液。为了验证提取液中甲醇浓度对时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条的影响，分别用 20%、40%、60%、80% 和 100% 甲醇水溶液提取阴性玉米样品，震荡离心后的样品上清再用样品稀释液稀释后点卡，评价提取液中甲醇浓度对试纸条 FIT、FIC 及 FIT/FIC 的影响，具体实验结果见图 1。从图中可知，当样品中甲醇浓度在 80% 时，试纸条的 FIT、FIC、FIT/FIC 以及免疫竞争抑制率最高，较低或较高的甲醇浓度都会使其信号值和免疫抑制率下降，因此，本实验采用 80% 甲醇水溶液作为样品提取液。

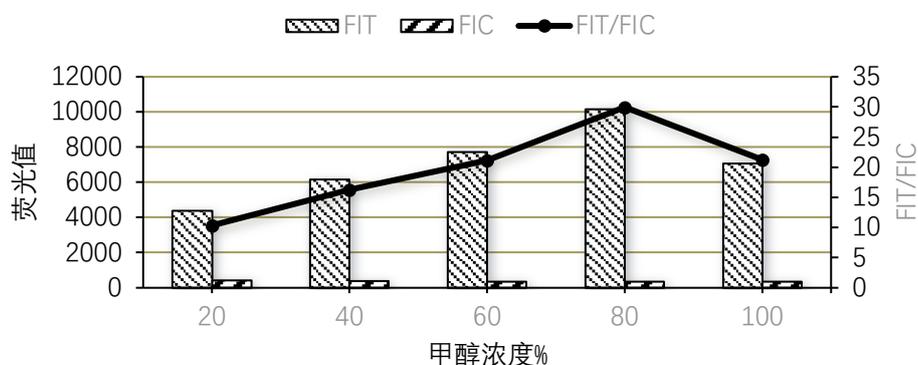


图 1 提取液中甲醇浓度对试纸条性能的影响

### 3.2 试纸条最佳孵育时间的确定

分别取 100  $\mu\text{L}$  浓度为 0、100、1000、10000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  脱氧雪腐镰刀菌烯醇玉米基质标准溶液，加入时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条加样孔里，置于 37 度恒温孵育器的大平板上，盖好盖子，分别在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 分钟后用时间分辨荧光免疫定量分析仪读取试纸条 FIT/FIC 比值，结果如下图 2。由图可以看出，FIT/FIC 比值在反应 6 分钟时进入稳定状态，且随着脱氧雪腐镰刀菌烯醇加标浓度的增加，FIT/FIC 进入稳定状态速度越快。本方法最后确定试纸条最佳孵育时间为加样后 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 6 分钟，孵育结束开始读数。

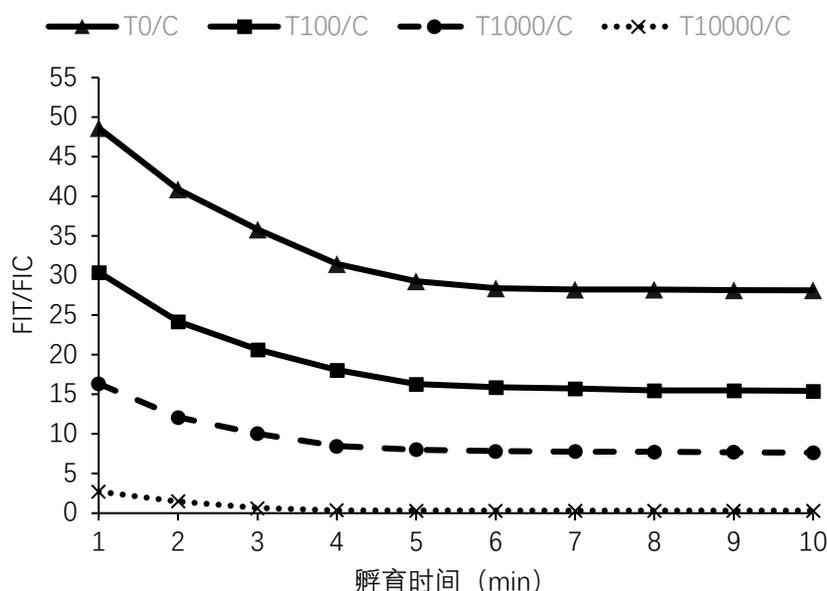


图 2 试纸条最佳孵育时间

### 3.3 样品 pH 值对试纸条性能的影响

在经过本方法前处理后的玉米上清中添加 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液，再将样品上清溶液分别调至 pH 2.5、4.0、5.5、7.0、8.5、10.0 和 11.5，最后用本方法的样品稀释液处理后作为最终的样品检测溶液，评价溶液中 pH 值变化对试纸条性能的影响，结果如图 3 所示。从图中可以看出，当经过前处理的样品检测溶液 pH 值在 4~10 之间时，浓度结果变化不大，表明本方法的样品稀释液有较强的缓冲能力，在一定程度上降低了样本酸碱度对检测结果的干扰。在特殊情况下，pH 值超出这个区间的样品，可以通过调整 pH 得到更理想的检测结果。

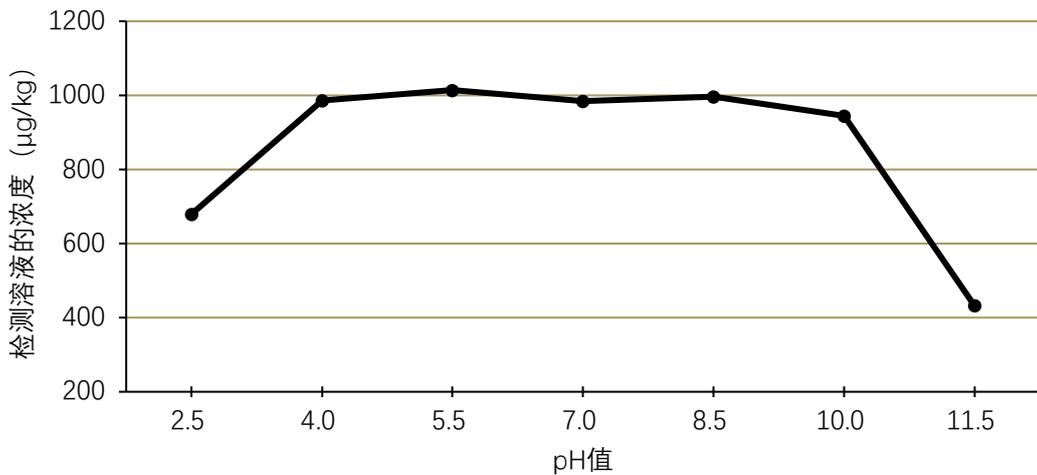


图3 样品 pH 值对试纸条性能的影响

### 3.4 试纸条标准曲线的建立

按本方法取空白玉米样品（浓度低于 30 µg/kg）经过前处理后，制备成基质空白试样溶液，分别准确移取标准中间溶液（10mg/L）0 mL、0.01 mL、0.025 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL 于 5 mL 容量瓶中，用基质空白试样溶液定容，混匀，制备成质量浓度为 0 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1 200 ng/mL、1 600 ng/mL、2 000 ng/mL 标准系列溶液，准确移取 100 µL 标准系列溶液于 2 mL 离心管中，加入 600 µL 稀释液，涡旋混合 1 min，上机。以标准溶液浓度的对数值（Logc）为横坐标，检测线 T 荧光信号值与质控线 C 荧光信号值的比值（T/C）为纵坐标，绘制标准曲线，结果如图 4。曲线相关系数 0.9982，有较好的线性相关。标曲信息存于 ID 卡中，可用于同批试纸条检测。

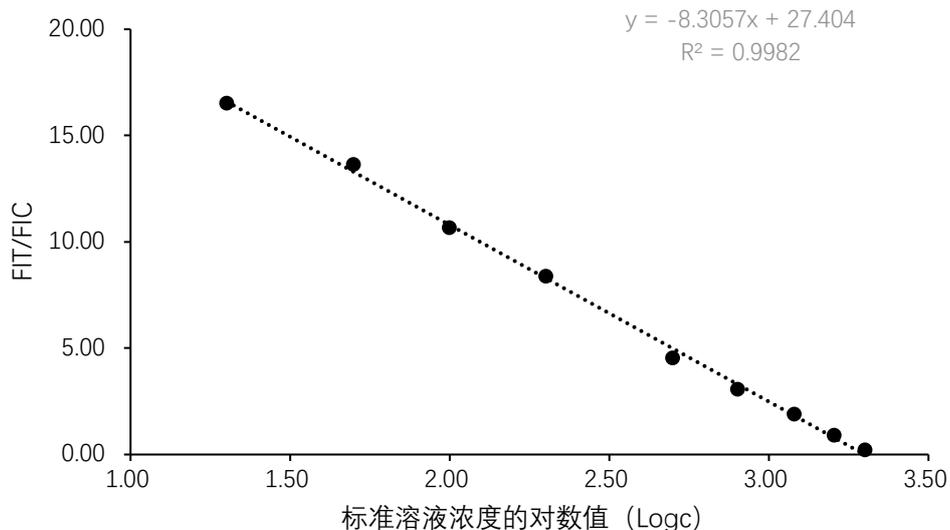


图4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量检测试纸条标准曲线的建立

### 3.5 基质效应

取标准中间溶液 (10mg/L) 0 mL、0.01 mL、0.025 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、0.6 mL、0.8 mL、1 mL 于 5 mL 容量瓶中, 用 80% 甲醇水溶液定容, 混匀, 制备成质量浓度为 0 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、800 ng/mL、1 200 ng/mL、1 600 ng/mL、2 000 ng/mL 溶剂标准系列溶液, 准确移取 100  $\mu$ L 标准系列溶液于 2 mL 离心管中, 加入 600  $\mu$ L 稀释液, 涡旋混合 1 min, 上机。按 3.4 方法建立溶剂标准曲线。与 3.4 的玉米基质标准曲线一起对多种基质类型样本进行检测, 结果与国标方法 (GB/T 30956) 比较, 确认基质效应是否影响实验结果, 并确定本方法的标准曲线。结果见表 1。

表 1 两种标准曲线与国标方法的比较

样本类型	GB/T 30956 测定结果 ( $\mu$ g/kg)	基质标曲 (3.4) 测定结果 ( $\mu$ g/kg)	准确度%	溶剂标曲 (3.5) 测定结果 ( $\mu$ g/kg)	准确度%
玉米	1432	1485.25	103.7	1622.35	113.3
DDGS	692	675.92	97.7	640.95	92.6
玉米蛋白粉	1164	1089.4	93.6	882.14	75.8
玉米胚芽粕	4290	4295.79	100.1	4507.89	105.1
喷浆玉米皮	1146	1161.65	101.4	1443.05	125.9
小麦	642	635.78	99.0	646.43	100.7

麸皮	164	165.91	101.2	190.48	116.1
猪配合饲料	319	331.82	104.0	382.01	119.8
鸡配合饲料	126	126.75	100.6	156.47	124.2
犊牛精料补充料	306	298.88	97.7	330.58	108.0

由表 1 可以得出，部分基质如玉米蛋白粉、喷浆玉米皮、鸡配合饲料存在比较明显的基质效应，用溶剂标准曲线测得的结果准确度不在 80%~120%以内。而用玉米基质标准曲线可以得到与国标方法更相符的结果，准确度在 91.5%~106.3%。因此本方法以玉米基质标准溶液建立标准曲线。

### 3.5 样品前处理方法的优化

#### 3.5.1 样品粉碎粒度对结果的影响

取有价值玉米样本(GB/T 30956)粉碎后分别过 40 目(0.425 mm)、20 目(0.85 mm)、10 目(2.00 mm)标准筛，取过筛后的样品 1 g 按本方法进行检测，并与 GB/T 30956 检测结果比较，可以看出样品粉碎粒度大小(粗细)对检测结果的影响，结果见表 2。

表 2 样品粉粒度对结果的影响(浓度单位:  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

样品过筛目数		10目(1.7mm)	20目(0.85mm)	40目(0.425mm)
平行试验	1	614.35	768.53	816.36
	2	628.78	759.25	815.52
	3	616.29	761.83	825.12
3次检测结果的平均值		619.81	763.20	819.00
GB/T 30956检测结果		812.10		
符合度%		76.32	93.98	100.86

从表 2 可以看出，筛孔 40 目和国标方法(GB/T 30956)的符合度最高，能满足 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求，20 目次之，10 目符合度最差，因此以本方法检测时，选择 40 目试验筛。

#### 3.5.2 样品称样量对结果的影响

分别称取过 40 目筛的玉米和小麦样品 1 g、5 g、10 g 按本标准方法进行检测，做 6 次平行重复，比较样品称样量对检测结果的影响，结果见表 3。

表 3 称样量对结果的影响（浓度单位：μg/kg）

样品类型		玉米			小麦		
称样量 (g)		1	5	10	1	5	10
平行 试验	1	797.40	762.26	810.82	610.4	626.96	600.4
	2	812.33	810.86	825.73	650.42	615.18	640.54
	3	825.68	802.89	790.23	655.58	655.43	673.4
	4	827.24	783.40	782.58	623.34	620.19	624.35
	5	798.21	818.72	824.66	648.21	655	641.81
	6	818.39	765.70	781.99	600.98	642.59	627.76
平均值		813.21	797.4	802.70	631.5	635.9	634.7
CV (%)		1.6	3	2.5	3.7	2.8	3.8
GB/T 30956		812.10			642		
符合度%		99.71	97.35	98.84	98.4	99.0	98.9

表 3 数据证明，样品均匀的前提下，称样量对检测结果准确度影响较小，1 g、5 g、10 g 称样量都能满足 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的要求。综合考虑到实际样品均匀性和实验操作的便捷性，本方法选择代表性样品 5g 作为本方法的称样量。

#### 4. 技术参数确定

##### 4.1 方法检出限和定量限的确定

检出限与定量限：随机挑选一台设备测定 20 次小麦、玉米阴性样品；

检出限（LOD）：采用 20 个阴性样品（或一个阴性样本 20 次检测）检测值的均值，加上 3 倍标准偏差计算；

定量限（LOQ）：采用 20 个阴性样品（或一个阴性样本 20 次检测）检测值的均值，加上 10 倍标准偏差计算；

实验数据见表 4。

表4 检出限和定量限

阴性样品类型	检测值 (µg/kg)					平均值 (µg/kg)	标准偏差 (µg/kg)	检出限 (µg/kg)	定量限 (µg/kg)
玉米	24.72	16.68	9.38	8.99	23.31	15.11	6.64	35.03	81.51
	15.14	15.8	14.93	19.21	2.98				
	9.01	15.89	16.42	4.24	16.17				
	4.03	2.13	9.34	17.66	9.21				
小麦	13.39	10.82	18.53	17.19	16.2	12.45	5.43	28.72	66.70
	2.07	19.13	9.55	9.28	8.32				
	2.06	4.23	14.61	14.77	14.54				
	13.91	8.31	2.08	8.9	11.23				

测试结果表明, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的 LOD 为 40 µg/kg, LOQ 为 100 µg/kg。

#### 4.2 方法特异性

选择脱氧雪腐镰刀菌烯醇结构类似物、代谢物和其他 5 种真菌毒素的标准品在阴性玉米中进行添加, 添加的浓度为 1000 µg/kg, 然后每个样品用本标准方法脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫层析定量检测试纸条进行测试, 检测 3 次取平均值; 结果显示 (表 5) 与赭曲霉毒素 A, 伏马菌素 B<sub>1</sub>, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮交叉反应率均 <5%, 与其代谢物、结构类似物有一定的交叉反应 (<20%)。实验结果表明, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫层析定量检测试纸条对赭曲霉毒素 A, 伏马菌素 B<sub>1</sub>, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、T-2 毒素、玉米赤霉烯酮几乎无交叉反应, 其方法特异性可以满足检测要求。

表5 交叉反应率表

序号	名称	测定值 (µg/kg)	交叉反应率
1	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)	1004	100.40%
2	赭曲霉毒素 A (OTA)	36	3.6%
3	伏马菌素 B <sub>1</sub> (FB1)	41	4.1%
4	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> (AFB1)	25	2.5%
5	玉米赤霉烯酮 (ZEN)	29	2.9%
6	T-2 毒素 (T-2)	47	4.7%
7	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	138	13.8%
8	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	165	16.5%

### 4.3 方法的准确度和精密度

在用国标法测定为阴性的不同基质空白样品中分别添加脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品，浓度分别为 100, 500, 1000, 1500, 2500, 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，然后按照本标准脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素荧光免疫层析定量检测试纸条的检测方法进行检测，确认方法的准确度和精密度。并且通过添加回收的方式确认基质和标准曲线匹配的情况。检测结果见表 6。

表 6 不同样本检测的准确性和重复性

样本及分析	平行 试验	脱氧雪腐镰刀菌烯醇添加量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
		100	500	1000	1500	2500	5000
玉米	1	100.62	493.23	1003.2	1596.85	2536.79	5102.36
	2	100.03	484.12	1009.36	1507.43	2601.3	5000.69
	3	100.33	528.675	1028.34	1503.14	2559.51	5042.38
	4	105.95	513.8	1000.58	1539.64	2500.33	5110.37
	5	101.75	501.17	1084.31	1523.2	2618.12	5000.32
	6	98.85	492.485	1052.67	1500.39	2539.61	5109.47
检测平均值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		101.26	502.25	1029.74	1528.44	2559.28	5060.93
回收率%		101.26	100.45	102.97	101.90	102.37	101.22
变异系数 CV%		2.45	3.26	3.21	2.40	1.71	1.05
小麦	1	94.91	519.35	1027.71	1528.65	2512.11	4976.15
	2	99.43	502.88	1050.57	1546.64	2515.44	5200.13
	3	96.02	482.09	1039.23	1599.93	2575.27	5000.14
	4	102.57	511.03	1023.46	1509.36	2543.69	5102.36
	5	99.87	500.46	1000.23	1531.23	2500.41	5023.98
	6	104.92	519.21	1015.42	1508.39	2596.36	5106.35
检测平均值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		99.62	505.84	1026.10	1537.37	2540.55	5068.19
回收率%		99.62	101.17	102.61	102.49	101.62	101.36
变异系数 CV%		3.81	2.78	1.72	2.20	1.51	1.65
DDGS	1	103.13	487.93	1009.07	1440.74	2475.63	5000.39
	2	108.68	502.21	1066.04	1508.73	2362.46	5213.2
	3	99.02	514.32	1046.44	1537.03	2460.88	5004.79
	4	103.63	500.69	1011.56	1523.36	2458.29	5128.39
	5	102	532.46	978.63	1500.21	2476.83	5079.32
	6	99.32	511.2	1062.36	1521.47	2509.88	5112.38
检测平均值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )		102.63	508.14	1029.02	1505.26	2457.33	5089.75
回收率%		102.63	101.63	102.90	100.35	98.29	101.79
变异系数 CV%		3.44	2.97	3.37	2.26	2.03	1.59

浓缩饲料（猪）	1	98.7	502.23	959.85	1523.69	2503.67	4757.66
	2	102.8	512.57	979.6	1491.25	2408.79	4891.59
	3	101.85	511.01	994.13	1540.11	2583.76	4873.15
	4	103.75	532.96	964.55	1444.18	2522.76	5183.61
	5	97.49	485.25	991.44	1572.48	2539.82	5165.78
	6	99.35	496.75	1008.53	1461.88	2480.06	4751.7
检测平均值（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）		100.66	506.80	983.02	1505.60	2506.48	4937.25
回收率%		100.66	101.36	98.30	100.37	100.26	98.74
变异系数 CV%		2.48	3.21	1.89	3.24	2.37	3.90
配合饲料（鸡）	1	98.55	511.63	1008.02	1482.96	2490.42	4720.22
	2	96.25	535.86	1070.67	1434.8	2368.88	4963.19
	3	97.68	486.58	989.29	1485.58	2513.02	5115.44
	4	103.48	521.69	981.16	1546.68	2595.47	5070.63
	5	102.13	491.12	1012.82	1518.74	2486.38	4803.02
	6	99.13	524.96	985.78	1553.95	2490.69	5057.83
检测平均值（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）		99.54	511.97	1007.96	1503.79	2490.81	4955.06
回收率%		99.54	102.39	100.80	100.25	99.63	99.10
变异系数 CV%		2.76	3.82	3.29	2.99	2.91	3.23
精料补充料（牛羊）	1	96.3	480.58	995.76	1448.81	2537.16	4794.44
	2	104.4	512.22	1022.35	1508.42	2467.98	4864.07
	3	104.89	482.35	992.74	1463.49	2565.67	5102.28
	4	107.1	478.28	978.42	1466.38	2443.24	4903.39
	5	98.64	483.9	1018.33	1496.53	2570.92	5050.2
	6	99.09	504.21	1065.09	1577.82	2504.95	4826.78
检测平均值（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）		101.74	490.26	1012.12	1493.58	2514.99	4923.53
回收率%		101.74	98.05	101.21	99.57	100.60	98.47
变异系数 CV%		4.22	2.91	3.04	3.14	2.08	2.54

从表 6 可以看出，本标准建立的脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量方法可以检测各种常见饲料基质及饲料原料基质，6 种基质中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的添加回收率在 95%~105%，与标准曲线可以高度匹配，6 次重复的变异系数在 10% 以内。回收率和变异系数均符合 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》，说明本方法具有较好的准确度和精密度。

## 5. 实际样品的分析

### 5.1 常见饲料样本分析

应用本标准建立的方法与 GB/T 30956 进行比较。应用本标准建立的方法分析了不同饲料及其原料高粱、小麦、玉米、豆粕、麸皮、喷浆玉米皮、鸡配合饲料、乳猪料、犊牛精料补充料等，结果分析如表 7。

表 7 脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测试纸条实际检测数据对比 (µg/kg)

样本	高粱	小麦	玉米	豆粕	麸皮	喷浆玉米皮	鸡配合饲料	乳猪料	犊牛精料补充料	
GB/T 30956	1018.32	822.12	407.09	1120.97	1276.42	4356.02	2209.44	368.50	560.14	
本标准方法检测值	1	1109.10	889.22	422.36	1099.31	1394.44	4586.03	2303.56	373.04	574.65
	2	1033.43	848.34	390.02	1211.03	1203.09	4273.89	2257.48	363.09	577.32
	3	1019.32	867.56	435.48	1133.03	1334.04	4380.53	2314.75	377.67	564.80
平均值	1053.95	868.37	415.95	1147.79	1310.52	4413.48	2291.93	371.27	572.26	
符合度%	103.50	105.63	102.18	102.39	102.67	101.32	103.73	100.75	102.16	

表 7 结果说明，在不同的饲料及其原料中，本标准建立的脱氧雪腐镰刀菌烯醇时间分辨荧光免疫层析定量方法检测值与 GB/T 30956 检测值的符合率为 100.75%~105.63%，不存在显著差异。

## 5.2 荧光背景较强的饲料样本分析

应用本标准方法构建的脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫层析定量检测试纸条检测荧光背景较强的饲料基质，并与 GB/T 30956 检测方法的结果进行比较。叶绿素、维生素 A、E 等物质会产生荧光反应，因此荧光背景较强的天然饲料基质选择苜蓿、鱼粉，分析结果见表 8。另外，通过检测人为添加荧光染料（非本方法的标记荧光物质）的玉米基质，以未添加荧光染料的同批次玉米样品为对照，验证荧光背景的干扰情况，结果分析见表 9。

表 8 荧光背景较强的饲料基质检测结果 (µg/kg) 样品	苜蓿1	苜蓿2	鱼粉

本标准方法检测值	1	194.27	<100	<100
	2	199.17	100.62	<100
	3	182.93	<100	<100
平均值		192.1	/	/
GB/T 30956		186	95.3	56.1
符合度%		103.3	/	/

表 9 添加荧光染料玉米基质的检测结果 (µg/kg)

样品		添加荧光染料玉米	对照
本标准方法检测值	1	703.77	714.05
	2	745.87	739.32
	3	734.92	704.79
平均值		728.17	719.4

由表 8 和表 9 可以看出,应用本标准方法构建的脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫层析定量检测试纸条,样品的荧光背景对检测结果的影响较小(这主要是由本方法标记荧光的特性决定的),可以忽略。因此本方法也适用于检测荧光背景较强的饲料基质。

#### 6. 与国内同类产品技术参数比较 (charm、X、Y 三个厂家对比的适用性)

应用本标准方法构建的脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫层析定量快检试纸条与同类产品进行对比,就适用范围、检测限、线性范围、准确度、精密度、检测时间几个方面比较其适用性。选择市面上三个厂家进行本次比较。比较结果见表 10。

表 10 本方法与国内同类产品技术参数比较

适用性项目	本方法	厂家1 (charm)	厂家2 (X)	厂家3 (Y)
方法原理	时间分辨荧光免疫层析定量法	胶体金免疫层析法	上转发光免疫层析法	酶联免疫分析法
适用范围	适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和植物性饲料原料及其附产物中	适用于小麦、玉米等粮食及其制品(含饲料)中脱氧雪腐镰刀菌烯醇	适用于快速定量检测小麦、玉米、黄豆等谷物及饲料原料的脱氧雪	可定性、半定量检测粮食和饲料样本中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量

	脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定	的测定	腐镰刀菌烯醇含量	
检测限(μg/kg)	100	200	100	200
线性范围(μg/kg)	100~10000	0~1500	100~6000	100~5000
准确度(%)	98.05~102.97	75.6~126.3	81.6~118.0	85.3~116.87
精密度(%)	1.05~4.79	11.54~18.16	9.64~17.18	8.87~16.65
检测时间(min)	6	8	15	20

表 8 说明,本标准方法构建的脱氧雪腐镰刀菌烯醇荧光免疫层析定量检测试纸条与市面上其他厂家生产的同类检测功能的产品比较,适用范围更广,可以满足大部分的饲料基质类型的检测;检测限较低,线性范围宽,测高浓度样品或低浓度样品都有优势;准确度和精密度优于其他同类产品;检测时间较短,检测效率更高,更适用于饲料样品快速定量检测。综上,本方式适用于各类饲料原料及饲料成品的快速定量检测,更具有传统定性方法的迭代性。

### 三、试验验证的分析、综述报告,技术经济论证,预期的经济效果

本方法目前已经农业部生物毒素检测重点实验室、江苏国托检测有限公司和江苏实朴检测服务有限公司验证,分别用玉米、小麦、大米、DDGS、高粱、面粉、妊娠母猪料进行准确性和重复性验证,以及盲样检测评估,验证结果,其添加回收率在 93.2%~107.4%,与国标高效液相方法比较,该方法准确度 95.7%~103.4%。

本标准可以满足粮食和饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇定量检测的需求,建立的方法具有稳定性、重复性好,操作简便、耗时少,性价比高等优点。

### 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况,或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

经确定,国外无《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法》相关标准,故没有国际、国外标准对比。

## 五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

经确定，国外无可采用的《饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法》相关标准，故不涉及采用国际标准的情况。

## 六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

已经颁布的各类行业标准：

1. GB/T 23503-2009《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法》
2. GB/T 5009.111-2003《谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定》
3. GB/T 5009.111-2016 食品安全国家标准《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》
4. 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》
5. LS/T 6113-2015《粮油检测 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定 快速定量法》
6. SN/T 1571-2005《进出口粮谷中呕吐毒素检验方法 液相色谱法》
7. KJ201702《食品中呕吐毒素的快速检测胶体金免疫层析法》（2017 食药监第 58 号公告）

从上述行业标准中可以看出，免疫分析方法是行业标准的基本检测方法。时间分辨荧光免疫层析定量法的操作简便快速，结果准确定量，检出限低，线性范围宽，结果和国标液相方法符合度高。时间分辨荧光免疫层析定量方法尚未出现在饲料行业的标准中。

应用本标准方法技术对样本处理后，能够满足 GB 13078-2017《饲料卫生标准》的限量要求，并且限量在该技术的最佳浓度测定范围内。该技术检出范围 100~10000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，满足了绝大多数饲料及其原料样本的测定，提高了检测效率，降低了检测成本。

本标准由于方法学原理的不同，内容与 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》、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》没有相关性。

本标准颁布实施后，针对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定，符合现行的法律法规和强制性（国家、行业、地方）标准要求。

## 七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准制定过程中未出现重大分歧。

## 八、涉及专利的有关说明

无相关专利。

## 九、贯彻国家标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等建议

粮食饲料容易滋生霉菌，危害畜禽品质，进而威胁人体健康，造成很大的经济损失。本方法可以很大程度的满足我国对饲料脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测要求，适用于全国各个地区。

本方法的建立可以便于饲料、畜禽养殖等相关的食品生产加工企业及其流通企业、第三方检测机构和各级政府监管部门对饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的准确定量检测，实现有效监管，为农业、畜牧业、市场监管等领域提供有效服务。

利用时间分辨荧光免疫层析法测定各类饲料原料和饲料产品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇，可以快速准确得到检测结果，很大程度提高检测效率，降低风险成本，同时为饲料及畜牧产品的质量安全和人民群众的身体健康提供保障。本标准的建立将有助于提升我省农产品质量安全管控，实现我省食农等行业的健康发展，具有显著的经济和社会效益。

建议本标准作为推荐性行业标准发布。

本标准过渡期建议设置为3个月。

## 十、其他应当说明的事项

无其他应当说明的事项。