

# 高效液相色谱 在饲料行业的应用

# 目录

前言	1
<b>第 1 章 饲料中三聚氰胺的检测</b>	<b>2</b>
1.1 前言	2
1.2 系统配置	2
1.3 样品预处理	3
1.4 色谱条件	3
1.5 典型谱图	4
1.6 性能指标	5
<b>第 2 章 饲料中氨基酸的检测 (AAK)</b>	<b>8</b>
2.1 前言	8
2.2 系统配置	8
2.3 样品预处理	9
2.4 色谱条件	9
2.5 典型谱图	10
2.6 性能指标	11
<b>第 3 章 饲料中含硫氨基酸的检测 (AAK)</b>	<b>13</b>
3.1 前言	13
3.2 样品预处理	13
3.3 典型谱图	13
<b>第 4 章 饲料中氨基酸的检测 (AAP)</b>	<b>14</b>
4.1 前言	14
4.2 仪器配置	14
4.3 衍生方法	15
4.4 样品预处理	16
4.5 色谱条件	16
4.6 典型谱图	16
4.7 性能指标	17
<b>第 5 章 饲料中含硫氨基酸的检测 (AAP)</b>	<b>19</b>
5.1 前言	19
5.2 样品预处理	19
5.3 典型谱图	19
<b>第 6 章 饲料中维生素类物质的检测</b>	<b>21</b>
6.1 前言	21
6.2 系统配置	21
6.3 饲料中维生素 B1 的检测	22
6.4 饲料中维生素 B2 的检测	23
6.5 饲料中维生素 B6 的检测	24
6.6 饲料中维生素 B12 的检测	25
6.7 饲料中维生素 E 的检测	26
6.8 饲料中维生素 D3 的检测	27
6.9 饲料中维生素 K3 的检测	28

6.10	饲料中维生素 A 检测	29
6.11	饲料中泛酸的检测	30
6.12	饲料中叶酸的检测	31
6.13	饲料中烟酸、叶酸的检测	32
<b>第 7 章 黄曲霉毒素 B1B2G1G2 的 HPLC 分析解决方案 33</b>		
7.1	仪器设备与试剂	34
7.2	实验方法	35
7.3	实验结果	37
<b>第 8 章 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的 HPLC 分析解决方案 39</b>		
8.1	仪器设备与试剂	39
8.2	实验方法	40
8.3	实验结果	40
<b>第 9 章 玉米赤霉烯酮 HPLC 分析解决方案 42</b>		
9.1	仪器设备与试剂	42
9.2	实验方法	43
9.3	实验结果	43
<b>第 10 章 赭曲霉毒素 A 检测 45</b>		
10.1	仪器设备与试剂	45
10.2	实验方法	46
10.3	实验结果	47
<b>第 11 章 饲料中喹乙醇的测定 48</b>		
11.1	设备与试剂	48
11.2	实验方法	49
11.3	实验结果	50
<b>第 12 章 氟苯尼考与甲砒霉素分析 51</b>		
12.1	仪器配制	51
12.2	溶液配制	51
12.3	实验结果	51
<b>第 13 章 喹乙醇、卡巴氧、喹烯酮、乙酰甲喹分析 52</b>		
13.1	仪器配制	52
13.2	实验方法	52
13.3	实验结果	52

## 前言

随着畜牧养殖业的迅速发展，人们对饲料营养成分的分析要求在不断提高，饲料分析的内容已从比较单一的高含量营养成分，如蛋白质、脂肪等的总量分析，深入到比较复杂的微量营养元素，如氨基酸、维生素、微量元素及饲料中有害物质等分析。如用传统的化学分析方法，很难甚至不能进行这些成分的分析。因而采用高灵敏度、高效、自动化的分析方法已成为饲料行业领域分析的发展方向。

高效液相色谱法是现代仪器分析中一支突起的新技术，由于其具有准确性好、灵敏度高、分析速度快等优点，已成为现代仪器分析非常重要的手段，它在饲料分析领域有着非常广泛的应用。它可以检测饲料中氨基酸、维生素、脂肪酸、有机酸、添加剂和有害物质，也可同时测定几种或几十种成分。

鉴于此，依利特公司结合自身技术应用实力雄厚的特点，提出了为饲料行业用户提供解决方案的设想并加以实施，形成了《高效液相色谱在饲料行业的应用》。

我们希望此应用文集能给广大饲料行业用户在饲料分析方面提供一个参考，并且能为用户提供一个解决方案。



# 第1章 饲料中三聚氰胺的检测

## 1.1 前言

三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环化合物，重要的氮杂环有机化工原料，简称三胺。由于食品和饲料工业蛋白质含量测试方法的缺陷，三聚氰胺常被某些企业当作食品或饲料添加剂，以提高食品或饲料中蛋白质含量指标。

饲料中三聚氰胺经三氯乙酸提取、离心后，经混合型阳离子交换固相萃取柱净化，洗脱物吹干后用流动相溶解，用高效液相色谱仪进行测定。

## 1.2 系统配置

表 1-1 饲料中三聚氰胺测试用分析方法包

序号	名称	规格级别
1	柠檬酸	分析纯
2	辛烷磺酸钠	色谱纯
3	三聚氰胺标准品	纯度≥99.0%
4	水系滤膜(100片/盒)	φ50mm, 0.45μm
5	有机系滤膜(100片/盒)	φ50mm, 0.45μm
6	针筒式有机相过滤器(100支/包)	φ13mm, 0.45μm
7	Elite MSP 三聚氰胺专用柱	5μm, 4.6×150mm
8	混合型阳离子固相萃取柱(50支/盒)	HyperSep Retain-CX, 60mg/3mL

表 1-2 饲料中三聚氰胺测试用前处理配置包

序号	名称	规格级别
1	超声波水浴	AS3120 型, 3L, 功率: 120W
2	隔膜真空泵	GM 型
3	溶剂过滤器	1000mL
4	分析天平	AL104, 感量 0.0001g JD60-4, 0.0001g
5	离心机	TG16G, 16000 转, 6×50mL TD5G, 5000 转, 12×10mL
6	pH 计	FE20K 酸度计 6010 酸度计
7	涡旋混合器	QL-861
8	固相萃取仪	SPE-12
9	氮气吹干仪	PGC-01D

表 1-3 饲料中三聚氰胺液相色谱仪标准配置包

序号	品名及规格	数量
1	<b>EClassical3100 等度 HPLC 系统</b>	<b>1 套</b>
<b>单系统基本配置:</b>		
	(1) P3100 高压恒流输液泵	1 台
	(2) UV3100 型紫外可变波长检测器	1 台
	(3) Rheodyne 7725i 高压六通进样阀	1 个
	(4) ZJ-1 支架	1 个
	(5) Elite MSP 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm 色谱柱	1 支
	(6) 色谱数据工作站 (不含打印机、计算机)	1 套
	(7) EClassical3100 系统工具包	1 套
	(8) TP 溶剂瓶托盘	1 个
2	<b>500mL 溶剂瓶 (无色)</b>	<b>2 支</b>
3	<b>O3100 色谱柱温箱</b>	<b>1 台</b>
4	<b>S3100 自动进样器</b>	<b>1 支</b>

## 1.3 样品预处理

称取饲料样品 0.40g(精确到 0.01g), 置于 10mL 具塞刻度试管中, 加入 7mL 1%三氯乙酸, 涡旋混匀, 超声提取 30min; 再加入 0.5mL 10%乙酸锌溶液和 0.5mL 10%亚铁氰化钾溶液, 涡旋混匀, 用 1%三氯乙酸定容至满刻度线; 样品经 10000rpm, 离心 5min; 取 5mL 上清液作为待净化液。

依次用 3mL 甲醇和 5mL 水活化 SPE 柱; 将待净化液用水稀释至 10mL, 转移至固相萃取柱, 依次用 3mL 水和 3mL 甲醇洗涤, 抽至近干后, 用 6mL 5%氯化甲醇溶液洗脱。整个过程控制流速不超过 1mL/min。洗脱液 50 $^{\circ}$ C 下用氮气吹干, 残留物用 1mL 流动相溶解, 涡旋混合, 过 0.45 $\mu$ m 油系滤膜, 供 HPLC 分析。

## 1.4 色谱条件

色谱柱: Elite MSP 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm

流动相: 离子对试剂缓冲液:乙腈=90:10 (离子对试剂缓冲液: 准确称取 2.10g 柠檬酸和 2.16g 辛烷磺酸钠, 加入约 980mL 水溶解, 调节 pH 至 3.0 后, 定容至 1L, 并用 0.45 $\mu$ m 水系微孔滤膜过滤备用)

流速: 1.5mL/min

柱温: 室温

检测波长: 240nm

进样量: 20 $\mu$ L

## 1.5 典型谱图

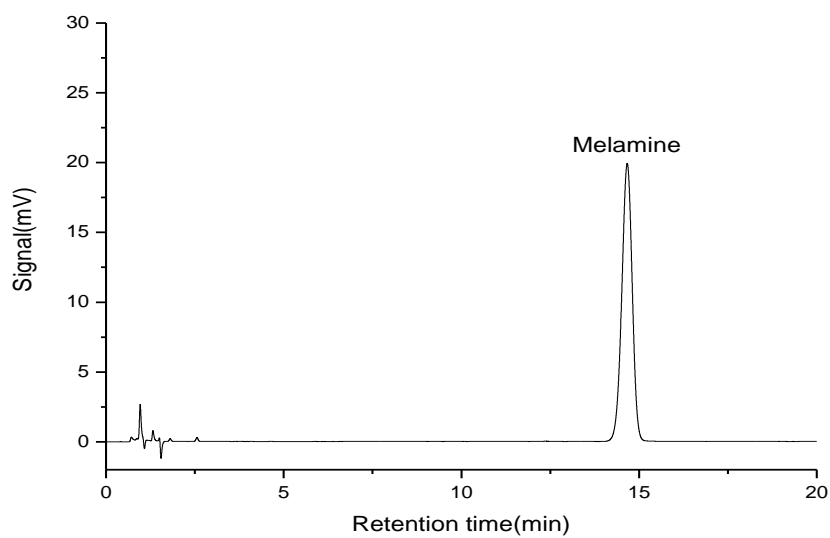


图 1-1 三聚氰胺标准品谱图

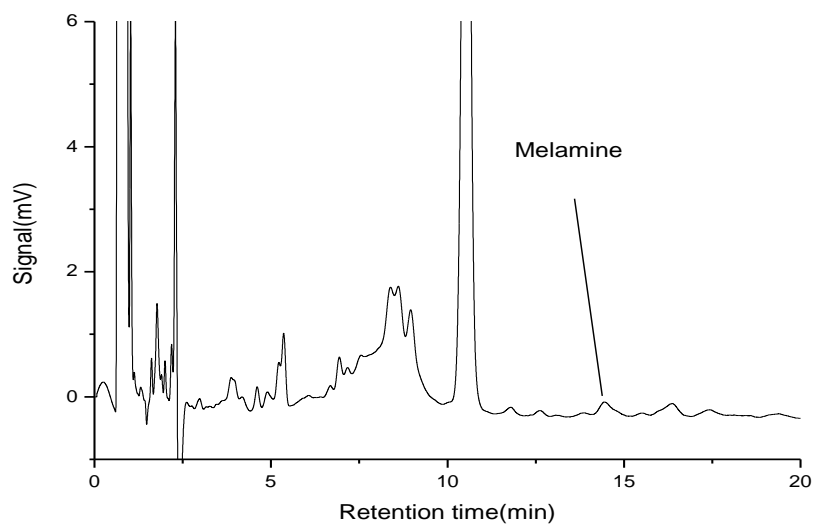


图 1-2 某饲料样品分析谱图(含量 0.63mg/kg)

## 1.6 性能指标

### 1.6.1 连续进样重复性测试

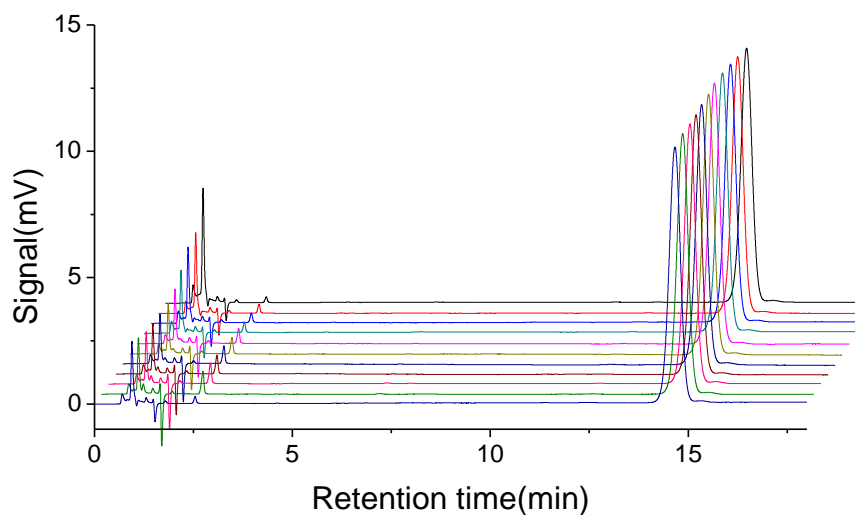


图 1-3 5 µg/mL 标准品 11 针连续进样重叠谱图

表 1-4 5 µg/mL 标准品连续进样 11 次重复性数据

序号	保留时间/min	峰面积/mV sec
1	14.687	207.21
2	14.679	206.85
3	14.665	206.28
4	14.637	205.23
5	14.638	206.12
6	14.616	206.36
7	14.586	207.66
8	14.620	207.55
9	14.627	207.84
10	14.659	207.83
11	14.689	207.71
平均值	14.65	206.97
RSD/%	0.23	0.42



### 1.6.2 线性范围

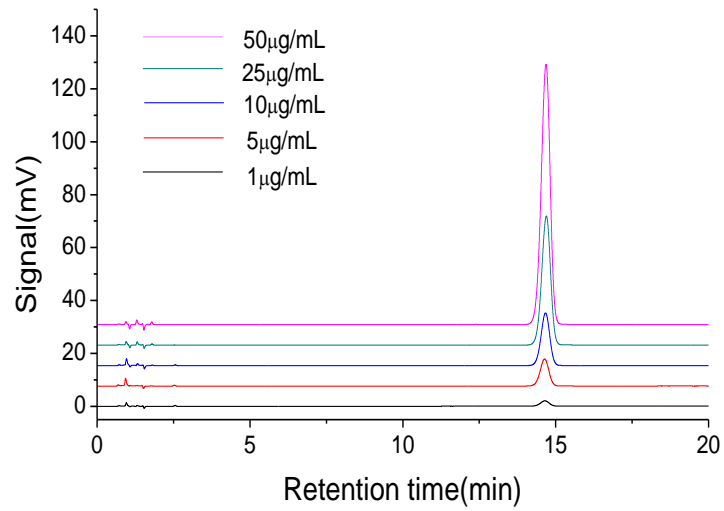


图 1-4 不同浓度标准品叠加谱图

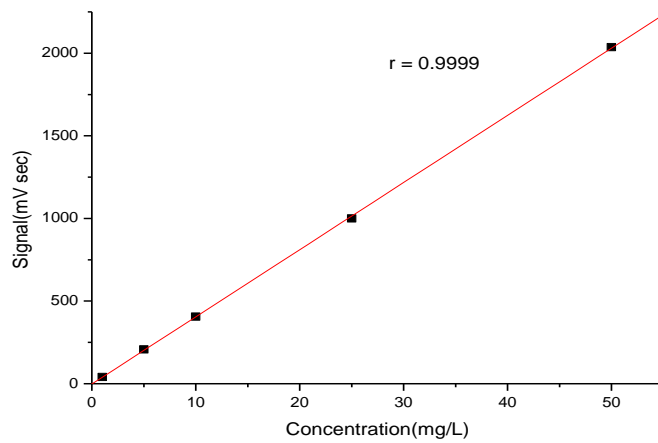


图 1-5 三聚氰胺浓度与峰面积关系

### 1.6.3 方法最低检出和最低定量限

以 3 倍信噪比峰高对应的浓度换算为方法检出限，以 10 倍信噪比峰高对应的浓度换算为方法定量限。

表 1-5 Elite P1201 测试三聚氰胺方法检出限和定量限

计算方法	方法检出限(mg/kg)	方法定量限(mg/kg)
校正曲线方法	0.046	0.153

### 1.6.4 方法准确性

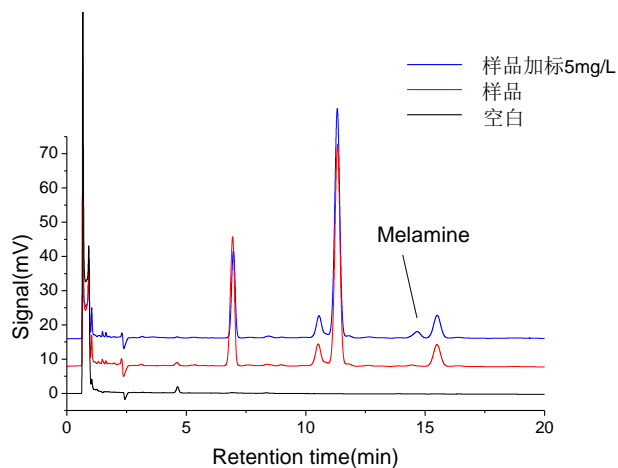


图 1-6 未知饲料样品、空白及加标叠加谱图

表 1-6 饲料加标回收率结果

加标量(mg/kg)	平行实验一(mg/kg)	平行实验二(mg/kg)	平均值(mg/kg)	回收率%
1.0	1.05	1.03	1.04	104.0%
5.0	4.36	4.51	4.44	88.8%
10.0	9.63	9.25	9.44	94.4%
25.0	21.97	21.77	21.87	87.5%

### 1.6.5 方法稳定性

同一饲料加标样品，一分为三，采用所述方法连续处理三次，并测试谱图计算结果。

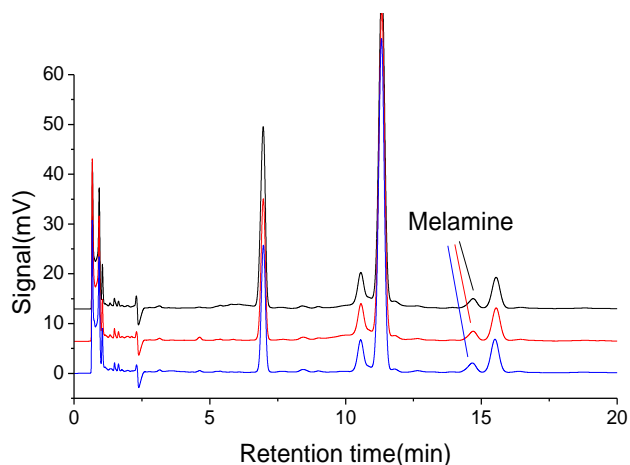


图 1-7 某加标饲料样品平行测试叠加谱图

表 1-7 平行样品测试结果

平行实验一(mg/kg)	平行实验二(mg/kg)	平行实验三(mg/kg)	平均值(mg/kg)	RSD%
4.36	4.51	4.42	4.43	1.47

## 第2章 饲料中氨基酸的检测 (AAK)

### 2.1 前言

氨基酸是构成蛋白质的基本单位，是维持动物生长所必需的营养物质，其种类和含量是衡量饲料蛋白质价值的根本指标，测定饲料中氨基酸具有非常重要的意义。

饲料中氨基酸分析大都采用氨基酸分析仪以离子交换分离，柱后衍生测定，这种方法准确度较高，但是分析时间较长，灵敏度较低。柱前衍生反相高效液相色谱法测定氨基酸，与氨基酸分析仪相比，分析时间短、灵敏度高，所以常用于饲料中氨基酸的测定。

### 2.2 系统配置

表 2-1 饲料中氨基酸测试用分析方法包

序号	名称	规格级别
1	氨基酸标准品(18 种)	纯度≥98%
2	水系滤膜(100 片/盒)	φ50mm, 0.45μm
3	有机系滤膜(100 片/盒)	φ50mm, 0.45μm
4	针筒式有机相过滤器(100 支/包)	φ13mm, 0.45μm
5	一次性注射器(200 支/包)	1mL
6	氨基酸专用分析柱	5μm, 4.6×250mm
7	专用保护柱及保护柱芯	5μm, 4.6×50mm
8	氨基酸试剂盒	一套

表 2-2 氨基酸试剂盒

序号	名称	规格	数量/瓶
1	氨基酸衍生化溶液	250mL	1
2	衍生缓冲固体组分 A	25g	1
3	衍生缓冲固体组分 B	100g	1
4	平衡缓冲固体组分 A	25g	1
5	平衡缓冲固体组分 B	50	1
6	流动相 B 固体组分	100g	3

表 2-3 饲料中氨基酸测试用前处理配置包

序号	名称	规格级别
1	超声波水浴	AS3120 型, 3L, 功率: 120W
2	隔膜真空泵	GM 型
3	溶剂过滤器	1000mL
4	分析天平	AL104, 感量 0.0001g JD60-4, 0.0001g
5	PH 计	FE20K 酸度计 6010 酸度计
6	氮吹仪	PGC-01D
7	安瓿瓶	5mL

表 2-4 饲料中氨基酸测试液相色谱仪配置

序号	品名及规格	数量
1	<b>EClassical3100 梯度 HPLC 系统</b>	<b>1 套</b>
	<b>单系统基本配置:</b>	
(1)	P3100 高压恒流输液泵	2 台
(2)	UV3100 型紫外可变波长检测器	1 台
(3)	Rheodyne 7725i 高压六通进样阀	1 个
(4)	ZJ-1 支架	1 个
(5)	TD-1-15 型梯度混合器	1 个
(6)	EliteAAK(5 μm, 4.6×250mm)色谱柱	1 支
(7)	色谱数据工作站 (不含打印机、计算机)	1 套
(8)	EClassical3100 系统工具包	1 套
(9)	TP 溶剂瓶托盘	1 台
2	<b>500mL 溶剂瓶 (无色)</b>	<b>2 支</b>
3	<b>O3100 色谱柱温箱</b>	<b>1 台</b>
4	<b>S3100 自动进样器</b>	<b>1 支</b>

## 2.3 样品预处理

取 25mg(根据样品氨基酸含量而定)饲料样品(如饲料样品为块状固体,需先用粉碎设备粉碎),加入 5mL 安瓿瓶中,再加入 3mL6mol/L 盐酸溶液,酒精灯高温拉丝封口,放入烘箱中 110℃水解 24 小时。

将水解后样品从安瓿瓶转入蒸发皿中,并用水多次洗涤安瓿瓶,洗液一并转入蒸发皿,80℃水浴蒸干,或在氮气保护下,80℃水浴加热安瓿瓶,直至样品蒸干。

用衍生溶液多次洗涤蒸发皿(或安瓿瓶),洗液转入 25mL 容量瓶中,并用衍生缓冲溶液定容,用 0.45 μm 滤膜过滤,备用。

取已过滤的样品溶液 10mL 至 50mL 棕色试剂瓶中,加入 5mL 衍生溶液,混匀,放入 60℃水浴中,暗处反应 60min。反应完毕后,取出冷却至室温,加入平衡缓冲溶液稀释至刻度,静置片刻,过膜,备用。

## 2.4 色谱条件

色谱柱: EliteAAK 5 μm 4.6×250mm

流动相: 流动相 A: 乙腈:水=50:50; 流动相 B: 缓冲溶液

流速: 1.2mL/min

柱温: 27℃

检测波长: 360nm

进样量: 10 μL

## 2.5 典型谱图

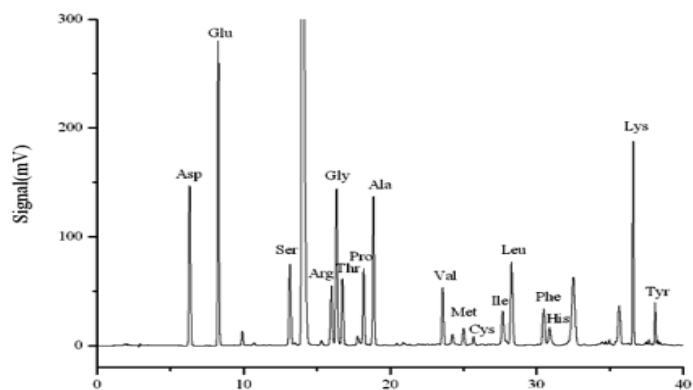


图 2-1 18 种氨基酸标准谱图

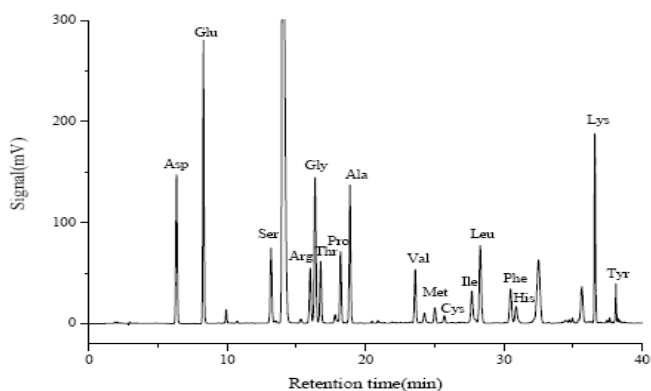


图 2-2 某饲料样品 1 氨基酸测试谱图

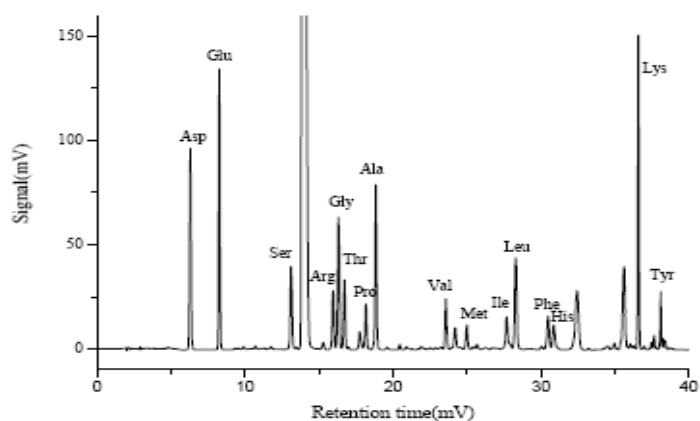


图 2-3 某饲料样品 2 氨基酸测试谱图

## 2.6 性能指标

### 2.6.1 分离度

表 2-5 18 种氨基酸的分离情况

名称	Asp	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr
分离度		11.8	25.6	6.1	1.7	1.8
名称	Pro	Ala	Val	Met	Cys	Ile
分离度	1.5	3.6	23.7	3.0	3.1	2.7
名称	Leu	Trp	Phe	His	Lys	Tyr
分离度	2.5	6.5	1.7	1.5	2.2	2.5

### 2.6.2 重复性

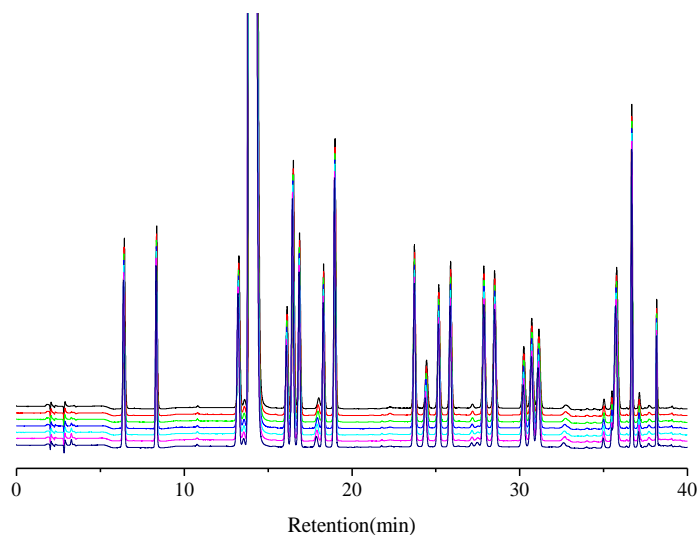


图 2.4 连续进样重复性比较

表 2.6 连续进样重复性数据

名称	Asp	Glu	Ser	Arg	Gly	Thr
保留时间 RSD (%)	0.25	0.15	0.14	0.10	0.11	0.07
峰面积 RSD (%)	0.49	0.55	0.49	0.61	0.47	0.48
名称	Pro	Ala	Val	Met	Cys	Ile
保留时间 RSD (%)	0.05	0.06	0.02	0.03	0.03	0.02
峰面积 RSD (%)	0.41	0.43	0.48	0.61	0.76	0.62
名称	Leu	Trp	Phe	His	Lys	Tyr
保留时间 RSD (%)	0.02	0.04	0.02	0.04	0.01	0.01
峰面积 RSD (%)	0.51	0.79	0.57	0.56	0.74	0.35

### 2.6.3 最低检出限

以 Asp 为例，最低检出限 D 为 0.098mg/kg。

### 2.6.4 衍生产物的稳定性

衍生后的氨基酸样品连续 7 天分析的色谱峰保留时间和面积的重现性结果，衍生物最少在 7 天中具有很好的稳定性。

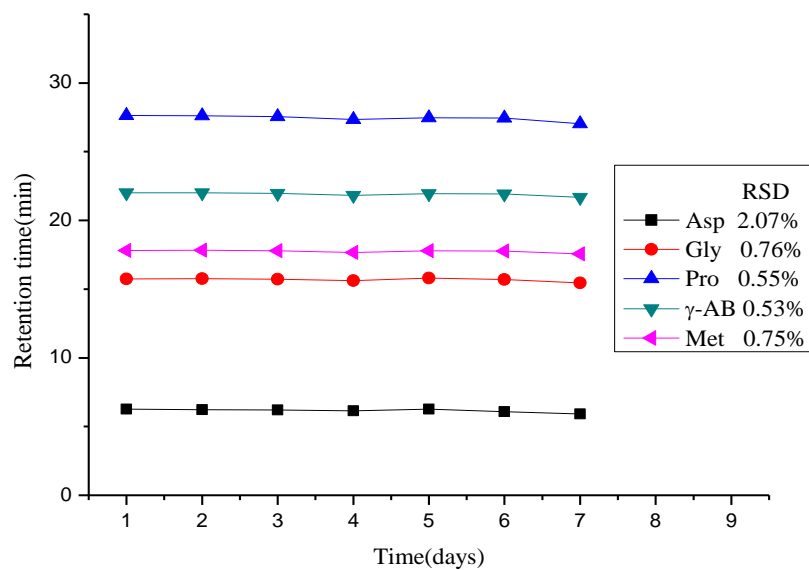


图 2-5 衍生产物的稳定性

## 第3章 饲料中含硫氨基酸的检测（AAK）

### 3.1 前言

含硫氨基酸在酸水解条件下非常容易被破坏，无法进行准确的定量检测。近年来，氧化水解法成为分析含硫氨基酸较为常用的水解方法。

采用氧化水解，2,4-二硝基氟苯柱前衍生紫外检测高效液相色谱法测定饲料中的含硫氨基酸具有良好的结果。

### 3.2 样品预处理

称取一定量的标准品或饲料样品，置 5mL 安瓿瓶中，加入已冷却的过甲酸溶液 0.3mL，连同冰水浴一道置于 4℃ 冰箱中，反应 16 小时。

以 1.767mol/L 偏重亚硫酸钠溶液为终止剂，于氧化液中加入偏重亚硫酸钠溶液 0.1mL，充分摇匀后，直接加入 6mol/L 盐酸溶液 3mL，酒精灯高温拉丝封口，置烘箱 110±3℃ 水解 24 小时，水解液氮气吹干，用衍生缓冲溶液多次洗涤安瓿瓶，合并洗涤液转移至 25mL 容量瓶中，并用缓冲溶液定容，备用。

衍生方法及色谱条件同饲料中氨基酸 AAK 的测定。

### 3.3 典型谱图

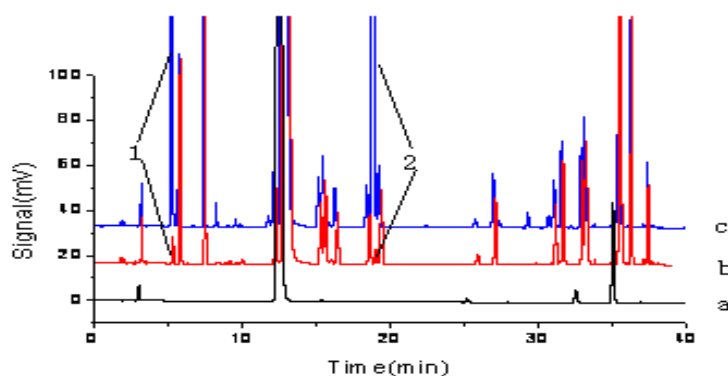


图 3-1 空白(a)、饲料样品(b)、样品加标(c)色谱图

1.磺基丙氨酸，2.蛋氨酸



## 第4章 饲料中氨基酸的检测（AAP）

### 4.1 前言

氨基酸是构成蛋白质的基本单位，是维持动物生长所必需的营养物质，其种类和含量是衡量饲料蛋白质价值的根本指标，测定饲料中氨基酸具有非常重要的意义。由于氨基酸种类较多，结构接近，大部分没有紫外吸收或荧光响应，使得氨基酸分析一直是高效液相色谱领域较难解决的问题之一。

依利特公司应用异硫氰酸苯酯（PITC）作为衍生试剂，开发并推出氨基酸高效液相色谱(HPLC)柱前衍生分析的全套解决方案。衍生过程简单快速，衍生产物单一，稳定性可达3天；具有较高灵敏度，定量结果准确可靠；而且分析成本低，适合常规氨基酸的分析。

Elite-AAP 氨基酸分析系统采用柱前衍生方法，配备专用 C18 键合固定相使 17 种氨基酸得到很好的分离，并通过紫外检测器完成氨基酸的检测

### 4.2 仪器配置

表 4-1 氨基酸试剂盒

序号	名称	规格	数量
1	氨基酸标准品(17种)	1mL×10/盒	1
2	氨基酸衍生化溶液	10mL	1
3	流动相 B 固体组分	40 瓶/盒	1

表 4-2 饲料中氨基酸测试用前处理配置包

序号	名称	数量
1	流动相超声装置	1 套
2	溶剂过滤装置	1 套
3	氮吹仪	1 套
4	涡旋混合器	1 套
5	移液枪	200μL、1mL 各一支
6	恒温干燥箱	温度 > 120℃
7	5mL 水解用安瓿瓶	50 支
8	封口膜	1 卷
9	有机系滤膜(100 片/盒)	φ50mm, 0.45μm
10	针筒式有机相过滤器(100 支/包)	φ13mm, 0.45μm
11	三乙胺	分析纯
12	盐酸	分析纯
13	过甲酸(氧化水解用)	分析纯

表 4-3 饲料中氨基酸测试液相色谱仪标准配置

序号	品名及规格	数量
1	EClassical3100 梯度 HPLC 系统	1 套
<b>单系统基本配置:</b>		
	(1) P3100 高压恒流输液泵	2 台
	(2) UV3100 型紫外可变波长检测器	1 台
	(3) Rheodyne 7725i 高压六通进样阀	1 个
	(4) ZJ-1 支架	1 个
	(5) TD-1-15 型梯度混合器	1 个
	(6) EliteAAP(5 $\mu$ m, 4.6 $\times$ 250mm)色谱柱	1 支
	(7) 色谱数据工作站 (不含打印机、计算机)	1 套
	(8) EClassical3100 系统工具包	1 套
	(9) TP 溶剂瓶托盘	1 台
2	500mL 溶剂瓶 (无色)	2 支
3	O3100 色谱柱温箱	1 台
4	S3100 自动进样器	1 支

### 4.3 衍生方法

#### ● 衍生方法 1—正己烷萃取去除过量衍生试剂

- 1) 精密量取氨基酸标准溶液 (或样品溶液) 200 $\mu$ L, 置一 5mL 塑料离心管中。
- 2) 精密加入 1.0mol/L 三乙胺乙腈溶液 100 $\mu$ L, 0.2mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 100 $\mu$ L, 涡旋混合 10s, 室温放置 1h。
- 3) 加入 0.6mL 正己烷, 漩涡 1min, 静置 10min。
- 4) 吸取下层溶液, 用 0.05mol/L 乙酸钠水溶液稀释 4 倍。
- 5) 10 $\mu$ L 进样分析。
- 6) 适用样品: 氨基酸含量较高的样品。

#### ● 衍生方法 2—氮吹去除过量衍生试剂

- 1) 精密量取氨基酸标准溶液 (或样品溶液) 200 $\mu$ L, 置一 1.5mL 塑料离心管中。
- 2) 精密加入 1.0mol/L 三乙胺乙腈溶液 100 $\mu$ L, 0.2mol/L 异硫氰酸苯酯乙腈溶液 100 $\mu$ L, 涡旋混合 10s, 10000rpm 离心 1min, 室温放置 1h。氮吹至干。
- 3) 加入 400 $\mu$ L 0.05mol/L 乙酸钠水溶液, 涡旋 1min。可根据灵敏度要求减小富溶体积, 最小可减至 100 $\mu$ L。
- 4) 10 $\mu$ L 进样分析。
- 5) 适用样品: 氨基酸含量较低的样品。

## 4.4 样品预处理

称取适量饲料样品于 5mL 安瓿瓶中，加入已冷却的过甲酸溶液 300 $\mu$ L，封口膜封口，连同冰水浴一道置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，反应 16h。氧化后的样品恢复至室温，氮吹至干。加 3mL 6mol/L 盐酸于安瓿瓶中，酒精灯高温拉丝封口，放入烘箱中 110 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 水解 24h，水解液氮气吹干，加水充分洗涤安瓿瓶，转移至 25mL 容量瓶中，加水定容至刻度。取 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤样品 200 $\mu$ L 衍生，10 $\mu$ L 进样分析。

## 4.5 色谱条件

色谱柱：Elite AAP 氨基酸分析专用色谱柱。

流动相：流动相 A：乙腈-甲醇-水（60:20:20），超声脱气 10~15min。

流动相 B：流动相 B 固体组分全部转移至 500 mL 烧杯中，加水约 480mL，用冰乙酸调 pH 至 6.5 $\pm$ 0.05，加水定容至 500mL，摇匀，用 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤，超声脱气 10~15min。

柱温：42 $^{\circ}$ C。

流速：1.0mL/min。

检测波长：254nm。

## 4.6 典型谱图

图 4-1 是采用 Elite-AAP 氨基酸分析方法得到的 17 种基本氨基酸分离谱图，由图可见，17 种氨基酸得到较好的分离，完全满足氨基酸的定性和定量要求。

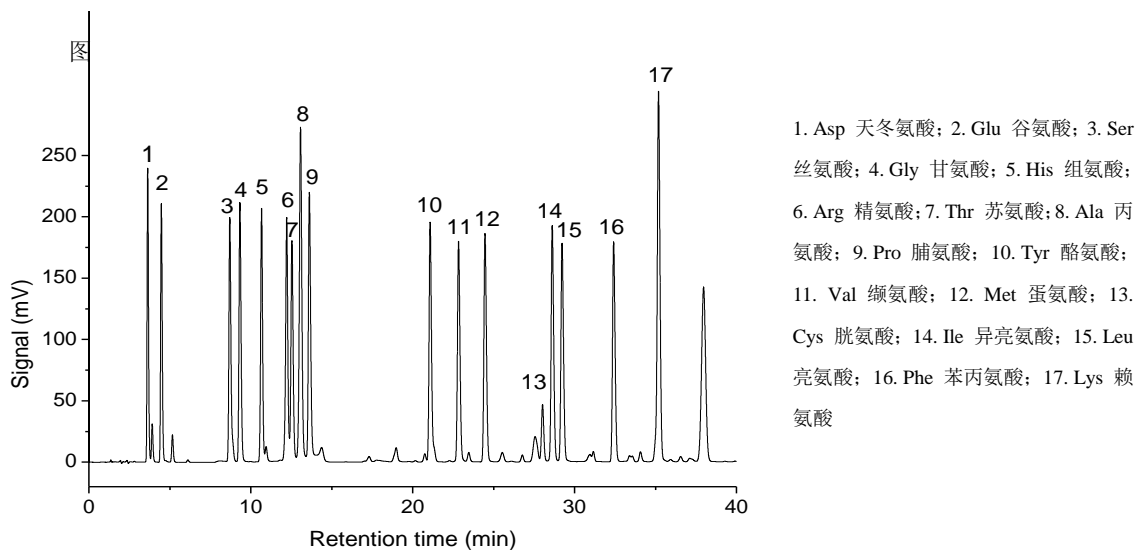


图 4-1 氨基酸典型分离谱图

## 4.7 性能指标

### 4.7.1 方法重复性

表 4-4 分析方法重复性 (n=5)

氨基酸	峰面积 RSD (%)		
	0.025 $\mu\text{mol/mL}$	0.25 $\mu\text{mol/mL}$	1.0 $\mu\text{mol/mL}$
天冬氨酸	4.90	1.49	1.08
谷氨酸	4.47	1.53	1.36
丝氨酸	2.86	1.60	1.16
甘氨酸	2.37	1.30	1.10
组氨酸	1.96	1.32	1.38
精氨酸	2.67	1.49	1.17
苏氨酸	3.59	1.99	1.02
丙氨酸	2.11	1.71	0.91
脯氨酸	2.27	1.69	1.76
酪氨酸	2.47	1.00	1.05
缬氨酸	3.63	1.63	0.87
蛋氨酸	3.26	1.18	1.19
异亮氨酸	3.18	1.44	0.94
亮氨酸	4.89	1.27	1.01
苯丙氨酸	3.11	1.4	1.37
赖氨酸	2.88	1.17	1.09

### 4.7.2 方法准确性

表 4-5 分析方法准确性(加标浓度 0.25  $\mu\text{mol/mL}$ , n=5)

氨基酸	加标回收率(%)	氨基酸	加标回收率(%)
天冬氨酸	118.48	脯氨酸	109.48
谷氨酸	106.68	酪氨酸	90.44
丝氨酸	94.17	缬氨酸	93.93
甘氨酸	104.06	蛋氨酸	106.77
组氨酸	96.97	异亮氨酸	96.40
精氨酸	102.19	亮氨酸	100.80
苏氨酸	87.32	苯丙氨酸	91.16
丙氨酸	98.03	赖氨酸	95.74

### 4.7.3 衍生产物稳定性

同一样品，连续3天进样，每天进样3次，计算各氨基酸9次进样峰面积的RSD值。结果表明衍生产物至少在3天内具有很好的稳定性。

表 4-6 衍生产物稳定性

氨基酸	峰面积 RSD (%)	氨基酸	峰面积 RSD (%)
天冬氨酸	1.48	酪氨酸	0.94
谷氨酸	1.36	缬氨酸	1.60
丝氨酸	0.31	蛋氨酸	0.61
甘氨酸	0.62	胱氨酸	6.63
组氨酸	1.96	异亮氨酸	1.56
精氨酸	0.73	亮氨酸	1.63
苏氨酸	0.80	苯丙氨酸	1.08
丙氨酸	0.46	赖氨酸	0.63
脯氨酸	1.06		

### 4.7.4 最低检测浓度

以 Asp 为例，最低测试浓度为  $3.13 \times 10^{-6}$  mol/L。

### 4.7.5 线性相关性

表 4-7 线性相关性

氨基酸	线性方程	线性相关系数 (R)
天冬氨酸	$y = 7,145.78 x - 103.85$	0.9996
谷氨酸	$y = 7,210.30 x - 92.165$	0.9997
丝氨酸	$y = 8,117.37 x - 64.25$	0.9997
甘氨酸	$y = 8,205.19 x - 41.035$	0.9996
组氨酸	$y = 7,843.39 x - 107.435$	0.9996
精氨酸	$y = 5,985.01 x - 46.955$	0.9997
苏氨酸	$y = 5,590.62 x - 42.57$	0.9998
丙氨酸	$y = 12,971.29 x - 99.51$	0.9997
脯氨酸	$y = 8,871.93 x + 9.20$	0.9994
酪氨酸	$y = 8,884.18 x - 102.57$	0.9997
缬氨酸	$y = 8,591.62 x - 67.24$	0.9996
蛋氨酸	$y = 9,276.57 x - 85.38$	0.9997
异亮氨酸	$y = 8,946.21 x - 65.14$	0.9996
亮氨酸	$y = 9,131.72 x - 90.24$	0.9997
苯丙氨酸	$y = 8,837.57 x - 63.08$	0.9997
赖氨酸	$y = 16,817.23 x - 94.68$	0.9997

## 第5章 饲料中含硫氨基酸的检测 (AAP)

### 5.1 前言

含硫氨基酸在酸水解条件下非常容易被破坏,无法进行准确的定量检测。因此,在 Elite AAP 氨基酸分析方法的基础上,建立含硫氨基酸的分析方法。作为 Elite AAP 氨基酸分析方法的补充及公司技术储备。

### 5.2 样品预处理

称取适量蛋氨酸和胱氨酸标准品于 1.5mL 离心管中,加入已冷却的过甲酸溶液 300 $\mu$ L, 封口膜封口,连同冰水浴一道置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中,反应 16h。

氧化后的样品恢复至室温,氮吹至干。加 200 $\mu$ L 水,涡旋 30s,精密加入 1mol/L 三乙胺乙醇溶液 100 $\mu$ L,精密加入 0.1mol/L 异硫氰酸苯酯乙醇溶液 100 $\mu$ L,涡旋 10S,室温放置 1 小时,加 0.6mL 正己烷,漩涡混合器震荡 1min,静置 10min,用吸取下层溶液 200 $\mu$ L,0.05mol/L 无水乙酸钠水溶液稀释 4 倍,经 0.45 $\mu$ m 有机滤膜过滤,收集滤液,10 $\mu$ L 进样分析。

色谱条件同饲料中氨基酸 AAP 的测定。

### 5.3 典型谱图

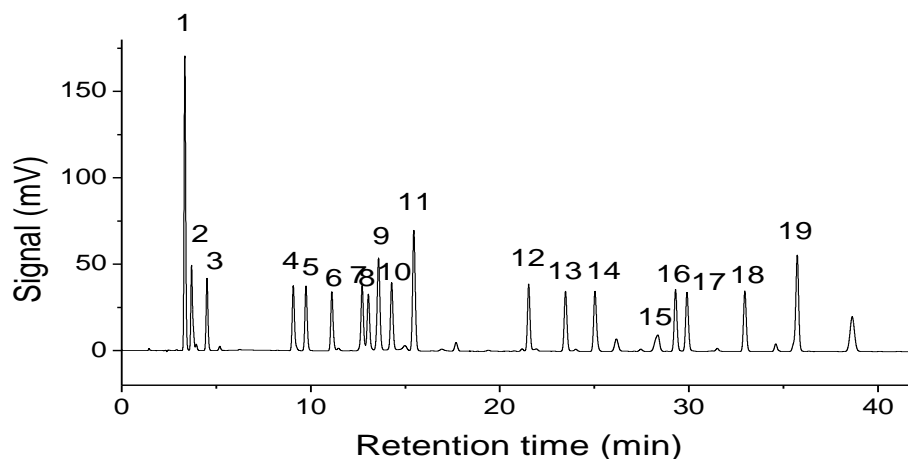


图 5-1 蛋氨酸、胱氨酸氧化衍生样品与 17 种混标直接衍生样品混合后分析谱图

1.磺基丙氨酸, 2. Asp 天冬氨酸; 3. Glu 谷氨酸; 4. Ser 丝氨酸; 5. Gly 甘氨酸; 6. His 组氨酸; 7. Arg 精氨酸; 8. Thr 苏氨酸;  
9. Ala 丙氨酸; 10. Pro 脯氨酸; 11. 蛋氨酸砷, 12. Tyr 酪氨酸; 13. Val 缬氨酸; 14. Met 蛋氨酸; 15. Cys 胱氨酸; 16. Ile 异亮氨酸; 17. Leu 亮氨酸; 18. Phe 苯丙氨酸; 19. Lys 赖氨酸

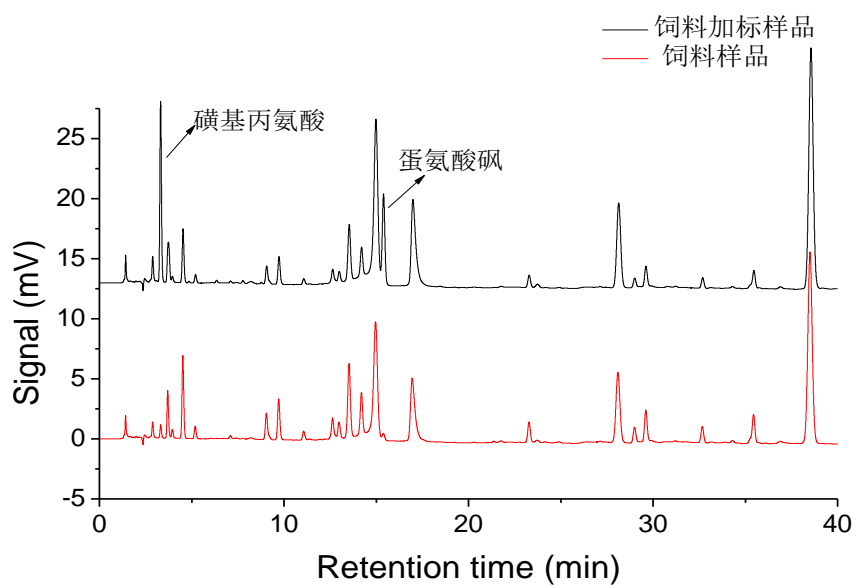


图 5-2 饲料样品和饲料加标样品分析谱图

图 5-2 可以看出，磺基丙氨酸和蛋氨酸砒能够与周围杂质峰分离较好。

## 第6章 饲料中维生素类物质的检测

### 6.1 前言

维生素又名维他命，通俗来讲，即维持生命的物质，是维持人体和动物体生命活动必须的一类有机物质，也是保持人体和动物体健康的重要活性物质。维生素在体内的含量很少，但不可或缺，它对机体的新陈代谢、生长、发育、健康有极重要作用。如果长期缺乏某种维生素，就会引起生理机能障碍而发生某种疾病。

目前所知的维生素就有几十种，大致可分为脂溶性和水溶性两大类。脂溶性维生素溶解于油脂，经胆汁乳化，在小肠吸收，由淋巴循环系统进入到体内各器官；水溶性维生素易溶于水而不易溶于非极性有机溶剂，吸收后体内贮存很少，过量的多从尿中排出。

在畜禽饲料中，添加维生素能促进其生长发育，提高饲料转换效率，保护生物机体健康，对提高养殖业的经济效率是非常重要的，但是不同的动物体对不同维生素的需求不同，因而不同饲料需要添加的维生素的量也不同，因此对饲料中维生素的量进行检测就显得非常必要。

### 6.2 系统配置

表 6-1 饲料中维生素类物质检测液相色谱仪标准配置

序号	品名及规格	数量
1	Agress1100 等度 HPLC 系统	1 套
	<b>单系统基本配置:</b>	
	(1) P1100 高压恒流输液泵	1 台
	(2) D1100 型紫外可变波长检测器	1 台
	(3) Rheodyne 7725i 高压六通进样阀	1 个
	(4) VB1100 阀支架	1 个
	(5) 依利特色谱柱 (根据具体实验选择)	1 支
	(6) 色谱数据工作站光盘 (不含打印机、计算机)	1 套
	(7) Agress1100 系统工具包	1 套
	(8) ST1100 溶剂瓶托盘	1 台
2	500mL 溶剂瓶 (无色)	2 支
3	O1100 色谱柱温箱 (选配)	1 台



## 6.3 饲料中维生素 B1 的检测

### 6.3.1 样品预处理

称取维生素预混饲料 0.2g(精确至 0.0001g);复合预混饲料 1g(精确至 0.001g),于 100mL 棕色容量瓶中,加入三分之二体积的提取液超声提取 20min,待冷却后,用提取液定容至刻度,混匀,过滤。

### 6.3.2 色谱条件

色谱柱: Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 150mm

流动相: 缓冲液:甲醇=75:25(缓冲液的配制方法: 在已装入约 700mL 去离子水的 1000mL 容量瓶中,加入 50mg EDTA(精确到 0.001g), 1.1g 庚烷磺酸钠(精确到 0.001g), 待全部溶解后加入 25mL 冰乙酸、5mL 三乙胺,用去离子水定容至刻度。用冰乙酸、三乙胺调节该溶液 pH 值至 3.40 $\pm$ 0.02, 过 0.45 $\mu$ m 滤膜。)

检测波长: 246nm

流速: 0.8mL/min

进样量: 10 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.3.3 典型谱图

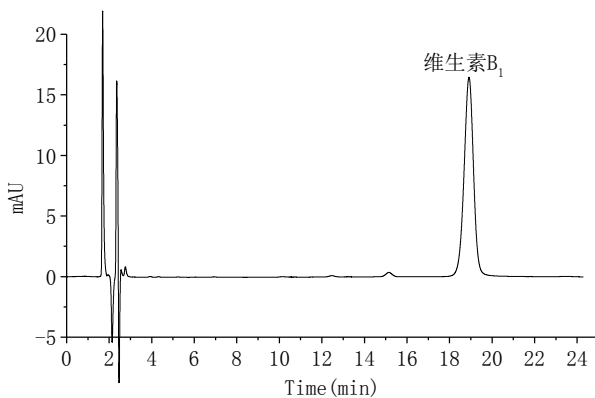


图 6-1 20 $\mu$ g/mL 维生素 B1 标准品谱图

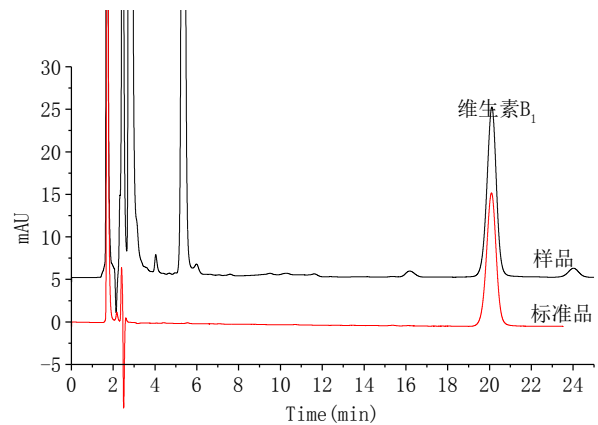


图 6-2 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.4 饲料中维生素 B2 的检测

### 6.4.1 样品预处理

称取维生素预混饲料 0.2g(精确至 0.0001g); 复合预混饲料 2g(精确至 0.001g), 于 50mL 棕色容量瓶中, 加入三分之二体积的提取液于 80℃~100℃ 水浴中煮沸 30min, 待冷却后, 加入 14mL 甲醇, 用提取液定容至刻度, 混匀, 过滤。维生素预混饲料进一步稀释 5 倍进样。

### 6.4.2 色谱条件

色谱柱: Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 缓冲液: 甲醇=86:14(缓冲液的配制方法: 在已装入约 700mL 去离子水的 1000mL 容量瓶中, 加入 50mg EDTA(精确到 0.001g), 1.1g 庚烷磺酸钠(精确到 0.001g), 待全部溶解后加入 25mL 冰乙酸、5mL 三乙胺, 用去离子水定容至刻度。用冰乙酸、三乙胺调节该溶液 pH 值至 3.40 $\pm$ 0.02, 过 0.45 $\mu$ m 滤膜。)

检测波长: 267nm

流速: 1.0mL/min

进样量: 10 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.4.3 典型谱图

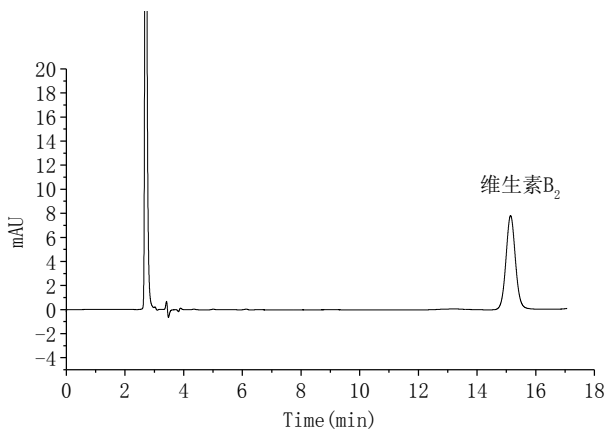


图 6-3 5 $\mu$ g/mL 维生素 B2 标准品谱图

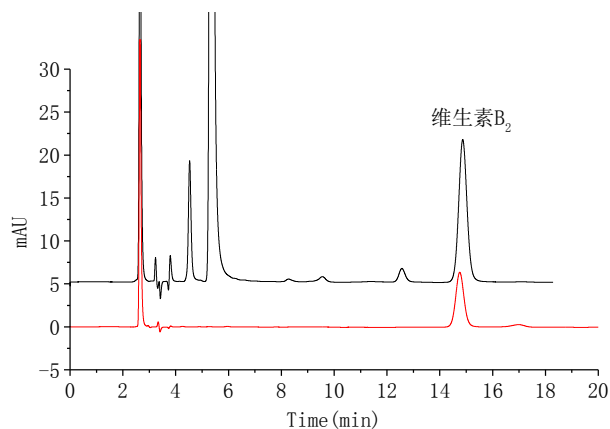


图 6-4 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.5 饲料中维生素 B6 的检测

### 6.5.1 样品预处理

称取维生素预混饲料 0.2g(精确至 0.0001g); 复合预混饲料 1g(精确至 0.001g), 于 50mL 棕色容量瓶中, 加入三分之二体积的提取液超声提取 20min(中间旋摇一次以防样品附着瓶底), 待温度降至室温后用提取液定容至刻度, 过滤, 待用。

### 6.5.2 色谱条件

色谱柱: Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 缓冲液: 甲醇=86:14(缓冲液的配制方法: 在已装入约 700mL 去离子水的 1000mL 容量瓶中, 加入 50mg EDTA(精确到 0.001g), 1.1g 庚烷磺酸钠(精确到 0.001g), 待全部溶解后加入 25mL 冰乙酸、5mL 三乙胺, 用去离子水定容至刻度。用冰乙酸、三乙胺调节该溶液 pH 值至 3.40 $\pm$ 0.02, 过 0.45 $\mu$ m 滤膜。)

检测波长: 280nm

流速: 1.0mL/min

进样量: 10 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.5.3 典型谱图

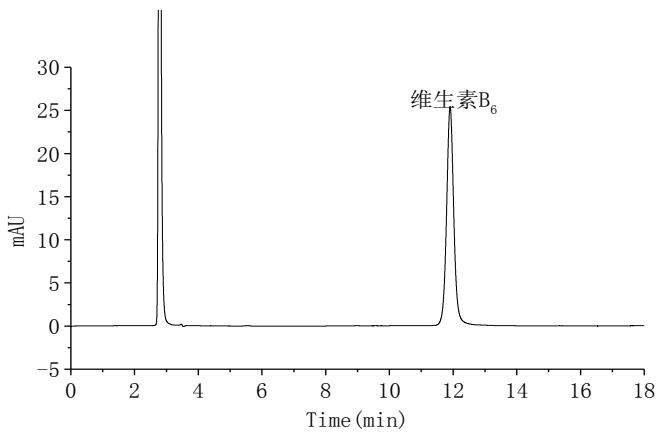


图 6-5 20 $\mu$ g/mL 维生素 B6 标准品谱图

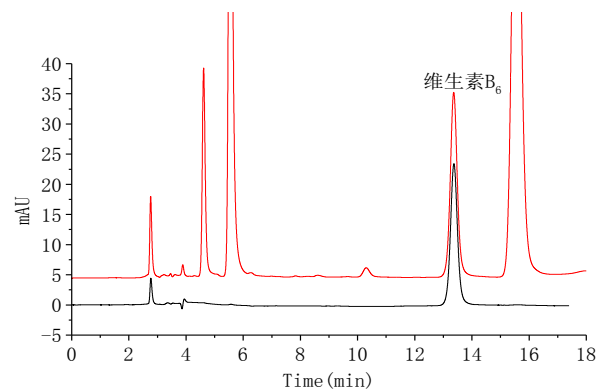


图 6-6 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.6 饲料中维生素 B12 的检测

### 6.6.1 样品预处理

称取维生素预混饲料 5.0000g(精确至 0.0001g), 置于 100mL 棕色容量瓶中, 加入 60mL 去离子水, 摇匀, 置于超声水浴中超声提取 15min, 用去离子水定容至刻度混合均匀。再用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 进样。

### 6.6.2 色谱条件

色谱柱: Supersil NH2 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 3% 正磷酸水溶液 260mL 与 700mL 乙腈混合, 超声脱气。

检测波长: 361nm

流速: 1.7mL/min

进样量: 20 $\mu$ L

柱温: 30 $^{\circ}$ C

### 6.6.3 典型谱图

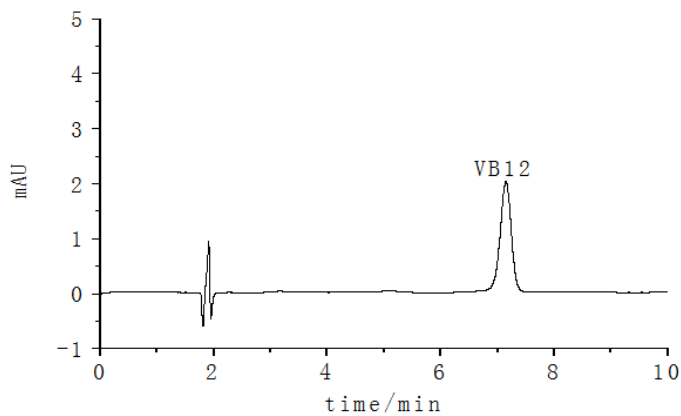


图 6-7 2.5 $\mu$ g/mL 维生素 B12 标准品谱图

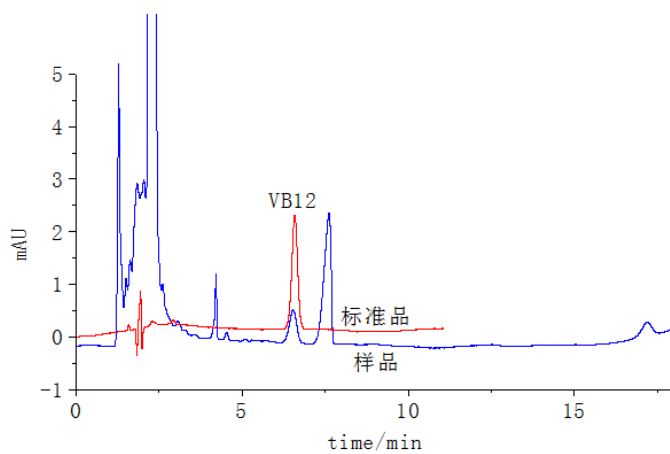


图 6-8 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.7 饲料中维生素 E 的检测

### 6.7.1 样品预处理

称取饲料 0.5g(精确至 0.0001g)于 50mL 棕色容量瓶中, 加入约 40mL 甲醇, 于 60 摄氏度超声波水浴中超声提取 30min, 冷却至室温, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀。如果试样中维生素 E(*dl-α*-生育酚乙酸酯)的标示量低于 10g/kg, 则将溶液过 0.45 $\mu$ m 滤膜, 进样测定, 否则需将溶液用甲醇进一步稀释, 使维生素 E(*dl-α*-生育酚乙酸酯)的进样度在 10 $\mu$ g/mL~120 $\mu$ g/mL 之间。

### 6.7.2 色谱条件

色谱柱: Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 甲醇:水=98:2

检测波长: 285nm

流速: 1.0mL/min

进样量: 20 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.7.3 典型谱图

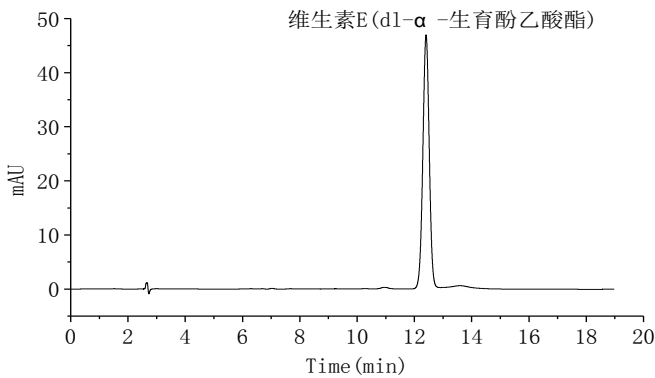


图 6-9 130 $\mu$ g/mL 维生素 E(*dl-α*-生育酚乙酸酯)标准品谱图

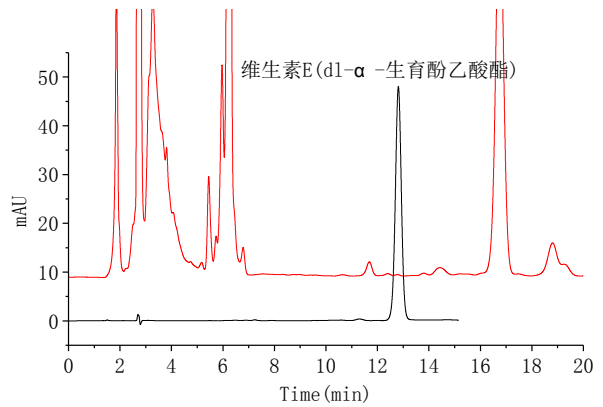


图 6-10 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.8 饲料中维生素 D<sub>3</sub> 的检测

### 6.8.1 样品预处理

称取试样 0.500g 于 50mL 棕色容量瓶中，加入约 40mL 甲醇，于 65℃ 超声波水浴中超声提取 30min，冷却至室温，用甲醇稀释至刻度，摇匀，过 0.45μm 滤膜，进样测定。

### 6.8.2 色谱条件

色谱柱：Supersil ODS-B 5μm 4.6mm×250mm

流动相：甲醇:水=98:2

检测波长：285nm

流速：1.0mL/min

进样量：20μL

柱温：室温

### 6.8.3 典型谱图

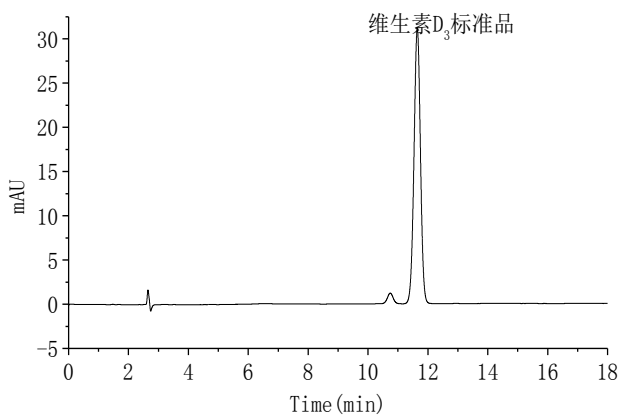


图 6-11 10μg/mL 维生素 D<sub>3</sub> 标准品谱图

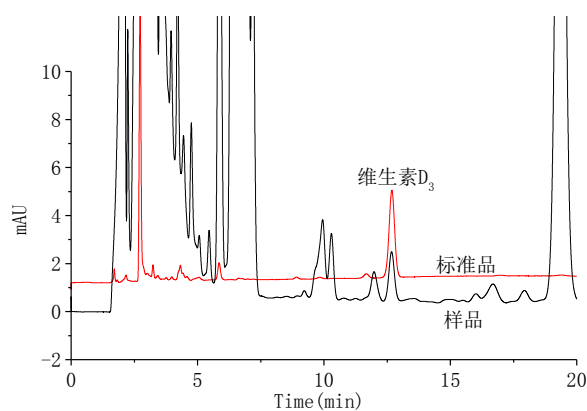


图 6-12 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.9 饲料中维生素 K3 的检测

### 6.9.1 样品预处理

称取试样 1g 左右置于 250mL 容量瓶中，用水溶解并稀释至刻度，摇匀。精密吸取 25mL 于 125mL 分液漏斗中，加三氯甲烷 40mL 和 1mol/L 碳酸钠溶液 5mL，剧烈振摇 30s，静止分层，分出三氯甲烷层通过预先用三氯甲烷润湿的棉花过滤如 250mL 容量瓶中，再用三氯甲烷 40mL 迅速洗涤滤器，洗液并入容量瓶，水层用三氯甲烷萃取 2 次，每次约 20mL，萃取液过滤，并用三氯甲烷 20mL 洗涤滤器，洗液和全部滤液并入容量瓶中，用三氯甲烷稀释至刻度，摇匀。精密吸取 2mL 于 100mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀。过 0.45 $\mu$ m 有机滤膜，待测。

### 6.9.2 色谱条件

色谱柱：SinoChrom ODS-BP 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相：甲醇:水=65:35

检测波长：251nm

流速：1.0mL/min

进样量：20 $\mu$ L

柱温：30 $^{\circ}$ C

### 6.9.3 典型谱图

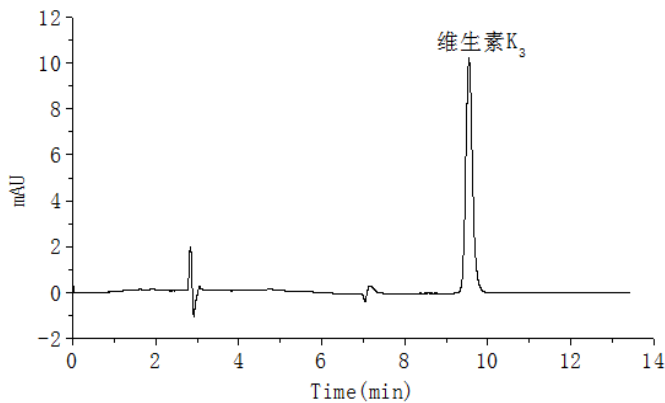


图 6-13 10 $\mu$ g/mL 维生素 K3 标准品谱图

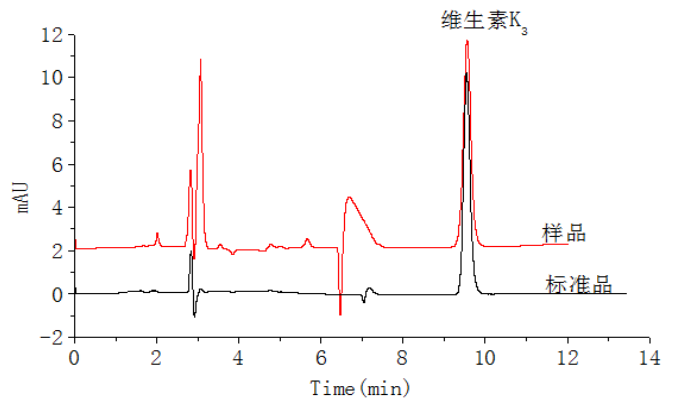


图 6-14 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.10 饲料中维生素 A 检测

### 6.10.1 样品预处理

**维生素 A 标准贮备液:** 称取维生素 A 乙酸酯标准品 34.4mg 于皂化瓶中, 按照样品处理步骤皂化和提取, 将乙醚提取液全部浓缩蒸发至干, 用正己烷溶解残渣置入 100mL 容量瓶中并稀释至刻度, 混匀, 4℃ 保存。

**维生素 A 标准工作液:** 准确吸取 1mL 维生素 A 标准贮备液 1.0mL, 用正己烷稀释 100 倍。该标准工作液浓度为 3.44 $\mu$ g/mL。

### 6.10.2 样品前处理

**皂化:** 称取饲料样品 2g 精确至 0.001g 于 250mL 圆底烧瓶中, 加入 50mL L-抗坏血酸乙醇溶液, 使试样完全分散、浸湿, 加入 10mL 氢氧化钾溶液, 混匀。置于沸水浴上回流 30min, 不时震荡, 防止试样粘附在壁上。皂化结束, 分别用 5mL 无水乙醇、5mL 纯水自冷凝管顶端冲洗内部, 取出烧瓶冷却至约 40℃。

**提取:** 定量转移全部皂化液于盛有 100mL 无水乙醚的 500mL 分液漏斗中, 用 30-50mL 水分 2-3 次冲洗圆底烧瓶并入分液漏斗, 加盖、放气、随后混合, 激烈震荡 2min, 静置、分层。转移水相于第二个分液漏斗中, 分次用 100mL、60mL 乙醚重复提取 2 次, 弃去水相, 合并三次乙醚相。用水每次 100mL 洗涤乙醚提取液至中性, 初次水洗时轻轻旋摇, 防止乳化。乙醚提取液通过无水硫酸钠脱水, 转移到 250mL 棕色容量瓶中, 加入 100mg BHT 使之溶解, 用乙醚定容至刻度。浓缩: 50℃ 水浴条件下将乙醚提取液全部蒸干。残渣用正己烷溶解, 并稀释至 25ml。取 0.1mL 于 10mL 容量瓶, 定容至刻度, 待用。

### 6.10.3 色谱条件

色谱柱: Supersil SiO<sub>2</sub> 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 正己烷:异丙醇=98:2

检测波长: 326nm

流速: 1.0mL/min

进样量: 20 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.10.4 典型谱图

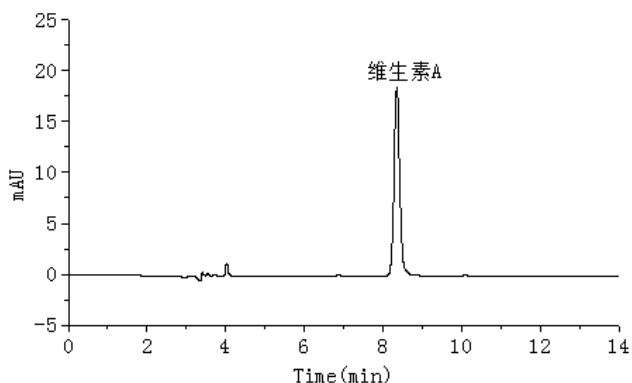


图 6-15 44 $\mu$ g/mL 维生素 A 标准品谱图

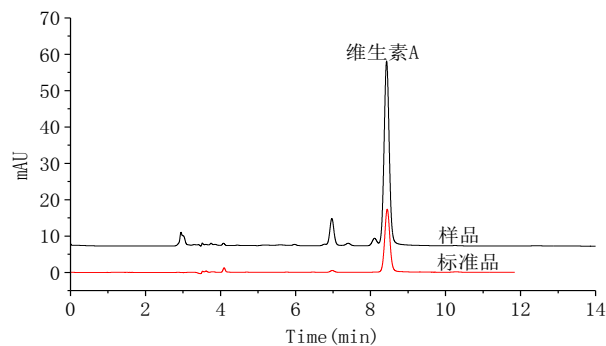


图 6-16 饲料样品检测谱图



## 6.11 饲料中泛酸的检测

### 6.11.1 样品预处理

取维生素预混饲料 0.25g(精确至 0.0001g), 置于 100mL 棕色容量瓶中, 加入 60mL 水浸湿, 摇匀, 加 10mL 1% 二乙胺四乙酸二钠溶液混匀, 置于超声波水浴上振荡提取 15min, 用水定容至刻度混合均匀。再用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤, 进样。

### 6.11.2 色谱条件

色谱柱: Supersil AQ-C18 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 称取 3.12g 二水磷酸二氢钠溶于 1L 水中, 用氢氧化钠溶液 (0.1mol/L) 调节 pH 至 5.5, 通过 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤脱气。

检测波长: 200nm

流速: 1mL/min

进样量: 10 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.11.3 典型谱图

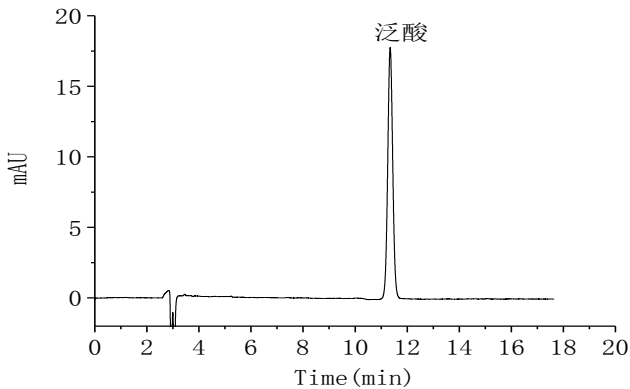


图 6-17 20 $\mu$ g/mL 泛酸标准品谱图

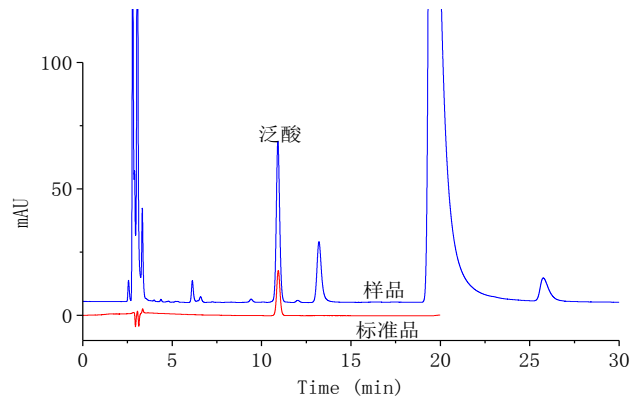


图 6-18 维生素预混禽饲料样品检测谱图

## 6.12 饲料中叶酸的检测

### 6.12.1 样品前处理

精密称取维生素预混饲料 0.5g (0.4992g)，置于 100mL 棕色容量瓶中，加入 0.1mol/L 碳酸钠溶液 10mL 浸湿试样，加 70mL 提取液混匀，置于超声水浴中超声提取 15min，用提取液定容至刻度，混合均匀。再用 0.45 μm 滤膜过滤，即得。

### 6.12.2 色谱条件

色谱柱：Supersil ODS-B 5μm 4.6mm×250mm

流动相：乙腈

检测波长：280nm

流速：1.4mL/min

进样量：20μL

柱温：室温

### 6.12.3 典型谱图

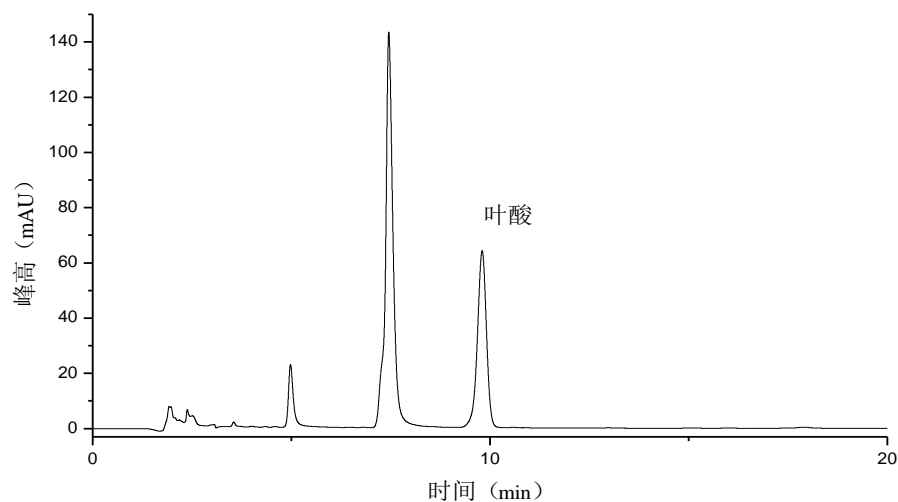


图 6-19 维生素预混禽饲料样品中叶酸检测谱图

## 6.13 饲料中烟酸、叶酸的检测

### 6.13.1 样品前处理

称取维生素预混饲料 0.5g(精确至 0.0001g),置于 100mL 棕色容量瓶中,加入 0.1mol/L 碳酸钠溶液 10mL 浸湿试样,加 70mL 提取液混匀,置于超声水浴中超声提取 15min,用提取液定容至刻度,混合均匀。再用 0.45 $\mu$ m 滤膜过滤,进样。

### 6.13.2 色谱条件

色谱柱: Supersil C8 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm

流动相: 称取 4.84g 的磷酸氢二钾, 9.82g 的磷酸二氢钾,溶于去离子水中,加 20mL 乙腈,用去离子水定容至 1L,混匀用 20%氢氧化钾调节 pH 至 6.5。

检测波长: 280nm

流速: 1.4mL/min

进样量: 20 $\mu$ L

柱温: 室温

### 6.13.3 典型谱图

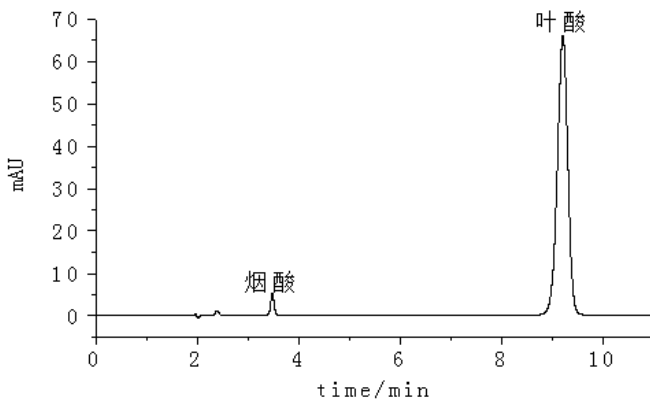


图 6-20 20 $\mu$ g/mL 混合标准品谱图

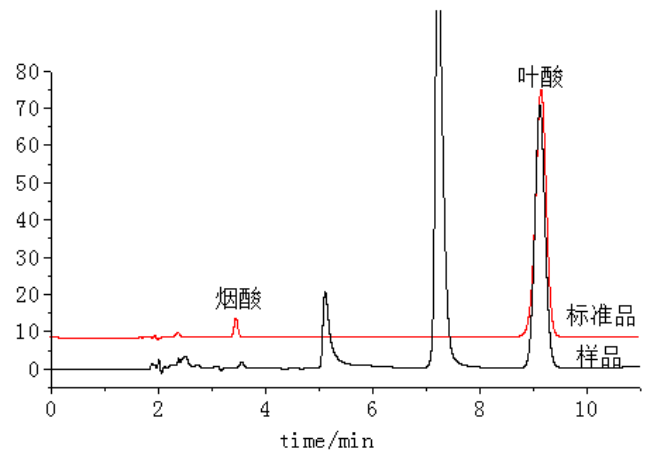
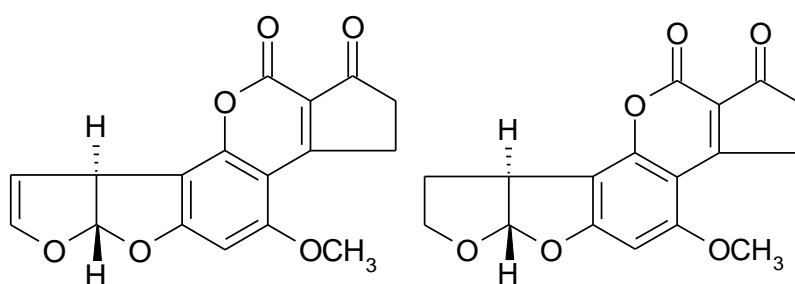


图 6-21 维生素预混禽饲料样品检测谱图

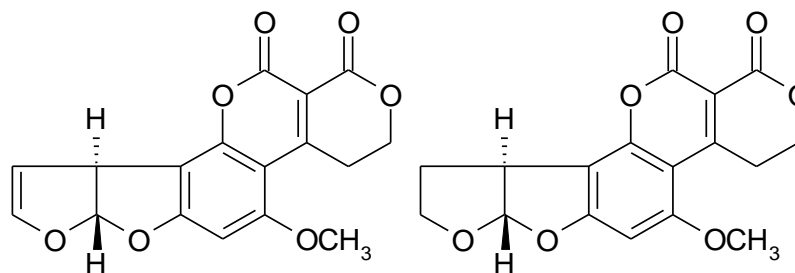
## 第7章 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub> 的 HPLC 分析解决方案

黄曲霉毒素(Aflatoxins)是生长在食物及饲料中的黄曲霉和寄生曲霉代谢的一组化学结构类似的产物,目前已分离鉴定出的黄曲霉毒素有 17 种,主要是黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 以及由 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 在体内经过羟化而衍生成的代谢产物 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 等。

黄曲霉毒素是一种毒性极强的物质。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用,严重时可导致肝癌甚至死亡。在天然被污染的食品中,以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 最为多见,其毒性和致癌性也是最强的。生产企业如果使用劣质的原料,如发霉的花生、小麦、玉米等生产饲料或者饲料存储不当,则有可能造成饲料中黄曲霉毒素超标。



黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>



黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>

图 7-1 四种常见的黄曲霉毒素

依利特公司,结合 NY/T 2071-2011《饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定液相色谱-串联质谱法》、GB/T 5009.23-2006《食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的测定》,提出了黄曲霉毒素分析的全套解决方案。相关人员可参考本实验中的方法,进行饲料中黄曲霉毒素的检测。

## 7.1 仪器设备与试剂

表7-1(a) EClassical 3100型高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量	订货号
1	UV3100紫外-可见检测器(选配)	1台	31020023
2	P3100高压恒流泵	1台	31010047
3	O3100色谱柱恒温箱(选配)	1台	31040010
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个	32027725i
5	ZJ-1 阀支架	1个	18050004
6	色谱数据工作站	1套	
7	TD-1-15梯度混合器(选配)	1个	31060001
8	TP3100溶剂托盘	1台	
9	SinoChrom ODS-BP5 $\mu$ m4.6 $\times$ 200mm色谱柱	1支	
10	荧光检测器	1台	
11	AD适配器	1台	
12	PD3110柱后衍生器	1套	
13	S3100自动进样器(选配)	1台	31090005
14	DG3100在线脱气机(选配)	1台	31050006

表7-1(b) iChrom 5100型高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量	订货号
1	D5101紫外-可见检测器(选配)	1台	31020022
2	P5102高压恒流泵	1台	31010041
3	O5100色谱柱恒温箱(选配)	1台	31040009
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个	32027725i
5	VB5101 阀支架	1个	18050012
6	色谱数据工作站	1套	
7	M5102系统组织器	1台	31080009
8	SinoChrom ODS-BP5 $\mu$ m4.6 $\times$ 200mm色谱柱	1支	
9	荧光检测器	1台	
10	AD适配器	1台	
11	PD3110柱后衍生器	1套	
12	5100系统工具包	1套	
13	S5101自动进样器(选配)	1台	31090004
14	M5102系统组织器(选配)	1台	31080010

注：或同等配置的其他型号的高效液相色谱仪

表7-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	氯化钠	分析纯
4	去离子水	18.2MΩ
5	黄曲霉毒素混标标准溶液	SIGMA

表7-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	
5	试验筛	二号筛	
6	精密电子天平	感量为万分之一	称量
7	高速均质器	转速大于10000r/min	
8	免疫亲和柱	黄曲霉毒素免疫亲和柱	
9	泵流操作架	配套免疫亲和柱	含空气泵

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000μL, 0~5000μL)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、滤膜等若干。

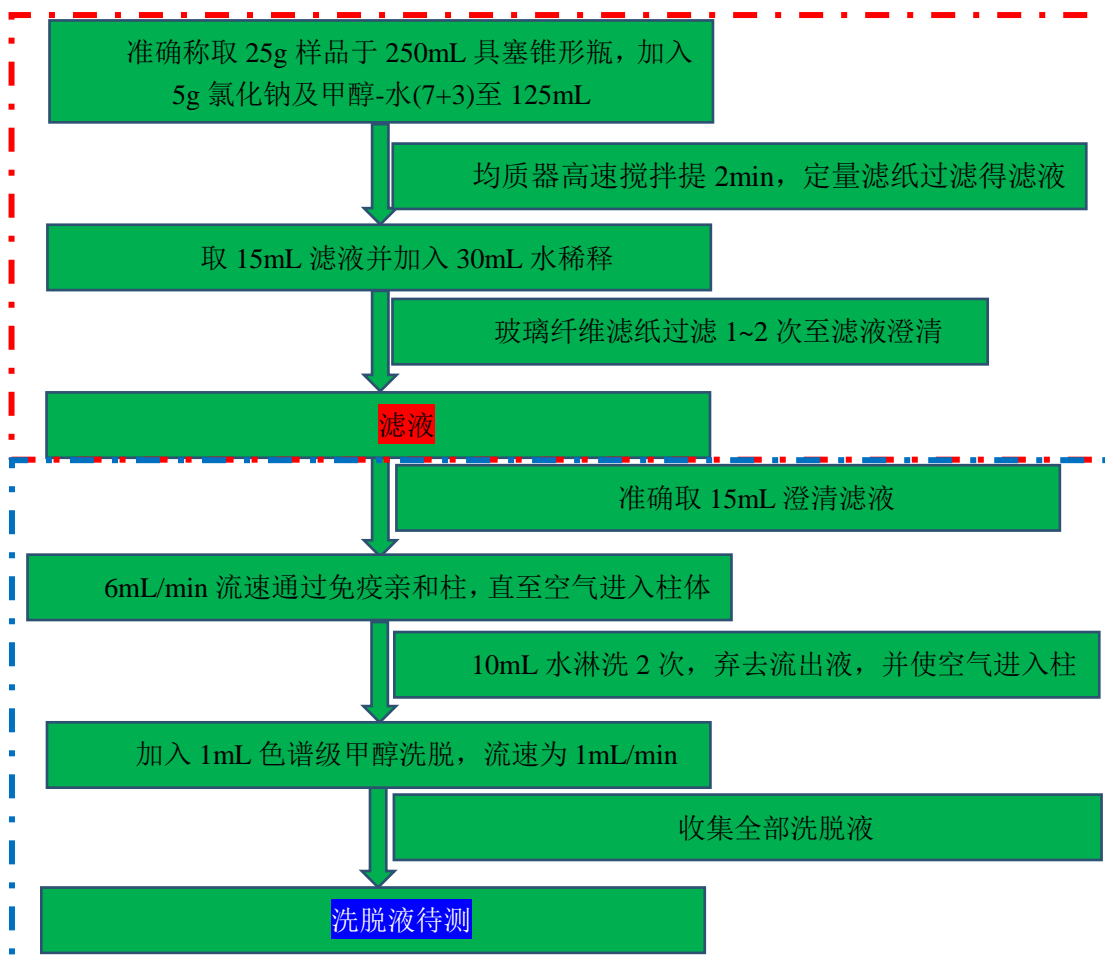
## 7.2 实验方法

### 7.2.1 标准溶液配制

**黄曲霉毒素混标标准储备液(100μg/L):** 黄曲霉毒素混标样品(约 5mL)置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇定容。

**黄曲霉混标标准工作液:** 用流动相稀释黄曲霉混标标准储备液分别配置的黄曲霉混标标准工作液。如其中 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 浓度为 20.0μg/L, 10.0μg/L, 6.0μg/L, 2.0μg/L, 0.6μg/L, 0.2μg/L。而相对应 B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 浓度为 6.0μg/L, 3.0μg/L, 1.8μg/L, 0.6μg/L, 0.18μg/L, 0.06μg/L。

## 7.2.2 样品前处理



## 7.2.3 色谱条件

流动相：甲醇:乙腈:水=20:20:60(V:V:V)

色谱柱：SinoChrom ODS-BP 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 200mm

流速：0.8mL/min

检测波长：激发 360nm，发射 450nm

进样量：20 $\mu$ L

柱温：室温

## 7.3 实验结果

### 7.3.1 典型分离色谱图

进样分析浓度为 $20.0\mu\text{g/L}$ ( $B_1$ 、 $G_1$ )的黄曲霉毒素标准工作液,使用7.2.3中的色谱条件,结果如下图所示。

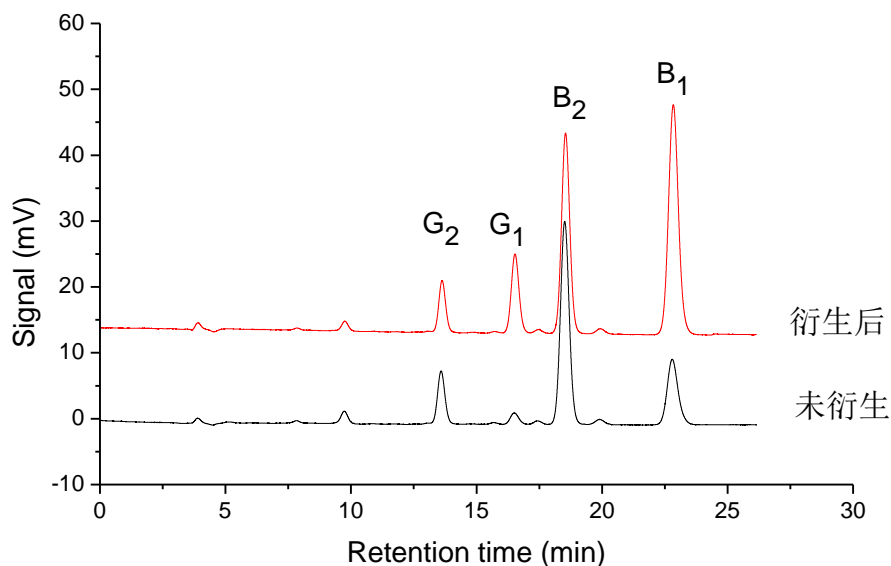


图7-2 黄曲霉毒素标准溶液衍生色谱图

表 7-4 衍生结果对比

名称	未衍生			衍生		
	峰面积(mV sec)	峰高(mV)	噪声(mV)	峰面积(mV sec)	峰高(mV)	噪声(mV)
$G_2$	160.22	7.98		149.77	7.82	
$G_1$	39.49	1.72		256.92	11.92	
$B_2$	752.59	30.79	0.025	711.06	30.43	0.025
$B_1$	295.13	9.87		982.48	34.92	

使用光化学衍生器后,  $B_1$  及  $G_1$  的响应值较使用前明显增加。其中  $G_1$  峰面积和峰高增加约 7 倍,  $B_1$  峰面积和峰高增加约 3.5 倍。但对  $B_2$  及  $G_2$  的响应值变化较小, 基本可以忽略。

而对于噪声的影响, 使用光化学衍生器前后, 噪声基本保持不变, 因此,  $B_1$  及  $G_1$  灵敏度能够分别提高约 7 倍和 3.5 倍。



### 7.3.2 线性范围与检出限

将黄曲霉毒素标准工作溶液，按上述色谱条件进行光化学衍生后的分析，黄曲霉毒素的线性及检出限如下表所示。

表 7-5 线性方程

黄曲霉毒素	线性方程	线性相关系数 R
G <sub>2</sub>	$y = 22.185 x - 0.3282$	0.99990
G <sub>1</sub>	$y = 23.547 x + 1.0349$	0.99987
B <sub>2</sub>	$y = 33.410 x + 1.6965$	0.99984
B <sub>1</sub>	$y = 41.875 x + 3.3725$	0.99994

从上表可知，黄曲霉毒素光化学系统衍生效果良好，B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>浓度在0.2μg/L到20.0μg/L，B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>浓度在0.06μg/L到6.0μg/L线性范围内线性相关系数均大于0.999。

以 3 倍信噪比对应的浓度换算为仪器的检出限，以 10 倍信噪比对应的浓度为仪器的定量限。计算 4 种黄曲霉毒素的检出限及定量限，结果如下表所示。

表7-6 检出限对比

黄曲霉毒素	方法检出限(μg/kg)	NY/T 2071-2011 (μg/kg)
G <sub>2</sub>	0.03	1
G <sub>1</sub>	0.08	1
B <sub>2</sub>	0.01	1
B <sub>1</sub>	0.03	1

从以上结果可知，光化学系统衍生后的黄曲霉毒素检测的灵敏度明显高于国标中的要求，完全符合定量要求。

## 第8章 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的 HPLC 分析解决方案

### 8.1 仪器设备与试剂

表8-1 iChrom 5100型高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量	订货号
1	D5101紫外-可见检测器	1台	31020022
2	P5102高压恒流泵	1台	31010041
3	O5100色谱柱恒温箱	1台	31040009
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个	32027725i
5	VB5101阀支架	1个	18050012
6	色谱数据工作站	1套	
7	M5102系统组织器	1台	31080009
8	SinoPak C18 5 $\mu$ m4.6 $\times$ 200mm色谱柱	1支	
9	5100系统工具包	1套	
10	S5101自动进样器(选配)	1台	31090004
11	M5102系统组织器(选配)	1台	31080010

表8-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	聚乙二醇	分析纯
4	氯化钠	分析纯
5	磷酸氢二钠	分析纯
6	磷酸二氢钾	分析纯
7	氯化钾	分析纯
8	盐酸	分析纯
9	去离子水	18.2M $\Omega$
10	脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液	FERMENTER

## 8.2 实验方法

### 8.2.1 溶液配制

脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液：用流动相稀释溶解配制脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液。其浓度为 100 $\mu$ g/L, 200 $\mu$ g/L, 500 $\mu$ g/L, 1000 $\mu$ g/L, 2000 $\mu$ g/L, 5000 $\mu$ g/L。

### 8.2.2 样品处理

准确称取试样 25.0g（准确到 0.1g）于 250mL 具塞锥形瓶中，加入 5g 聚乙二醇（Mn=8000），准确加入 100mL 水，混匀，置于超声波中超声 20min。以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清，收集滤液 A 于干净的容器中。10000 r/min 离心 5min。事先将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。待免疫亲和柱原有液体流尽后，准确移取滤液 A 2.0mL，注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相连接，控制样液以每秒 1 滴的流速流过免疫亲和柱（逗点科技），准确加入 2mL 甲醇洗脱免疫亲和柱，控制每秒 1 滴的下滴速度通过免疫亲和柱。收集全部洗脱液至试管中，在 50 $^{\circ}$ C 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干，加 1.0mL 初始流动相，涡旋 30s 溶解残留物，0.45 $\mu$ m 滤膜过滤，收集滤液于进样瓶中以备进样。

### 8.2.3 色谱条件

流动相：甲醇:水=20:80(V:V)

色谱柱：Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 250mm

流速：0.8mL/min

进样量：50 $\mu$ L

检测波长：218nm

柱温：35 $^{\circ}$ C

## 8.3 实验结果

### 8.3.1 典型分离色谱图

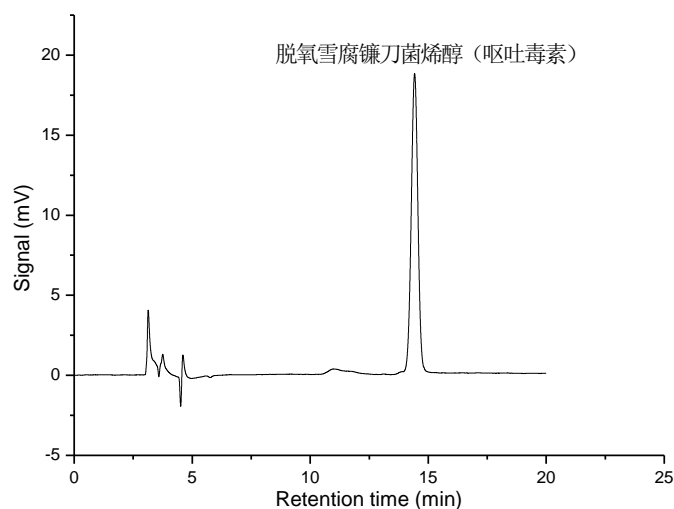


图8-1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）典型谱图

表 8-3 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）色谱参数

	保留时间(min)	峰面积(mV sec)	拖尾因子	塔板数
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	14.42	362.29	1.00	12500

### 8.3.2 线性

表8-4 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）线性测试结果

物质	线性方程	R2
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$y=0.0379x-0.8044$	0.9999

从上表可知，脱氧雪腐镰刀菌烯醇浓度在100 $\mu\text{g/L}$ 到5000 $\mu\text{g/L}$ 线性范围内线性相关系数大于0.9999。

### 8.3.3 检出限

以 3 倍信噪比对应的浓度换算为仪器的检出限，以 10 倍信噪比对应的浓度为仪器的定量限。计算脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限，结果如下表所示。

表8-5 脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出限计算结果

	仪器检出限( $\mu\text{g/L}$ )	仪器定量限( $\mu\text{g/L}$ )	方法检出限( $\mu\text{g/kg}$ )	方法定量限( $\mu\text{g/kg}$ )
iChrom 5100	17.5	58.5	35	117

## 第9章 玉米赤霉烯酮 HPLC 分析解决方案

### 9.1 仪器设备与试剂

表9-1 iChrom 5100型高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量	订货号
1	D5101紫外-可见检测器(选配)	1台	31020022
2	P5102高压恒流泵	1台	31010041
3	O5100色谱柱恒温箱(选配)	1台	31040009
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个	32027725i
5	VB5101阀支架	1个	18050012
6	Chromsoft色谱数据工作站	1套	
7	M5102系统组织器	1台	31080009
8	AD适配器	1台	31030024
9	Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 200mm色谱柱	1支	31110107
10	荧光检测器	1台	
11	5100系统工具包	1套	
12	S5101自动进样器(选配)	1台	31090004
13	M5102系统组织器(选配)	1台	31080010

注：或同等配置的其他型号的高效液相色谱仪

表9-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	氯化钠	分析纯
4	去离子水	18.2M $\Omega$
5	磷酸氢二钠	分析纯
6	磷酸二氢钾	分析纯
7	氯化钾	分析纯
8	吐温-20(Tween-20)	分析纯
9	盐酸	分析纯
10	玉米赤霉烯酮标准溶液（纯度99.5%）	SIGMA

## 9.2 实验方法

### 9.2.1 标准溶液配制

玉米赤霉烯酮标准工作液：用流动相稀释溶解配制玉米赤霉烯酮标准工作液。分别配制浓度为 5 $\mu$ g/L、10 $\mu$ g/L、20 $\mu$ g/L、50 $\mu$ g/L、100 $\mu$ g/L 的玉米赤霉烯酮标准品工作液。

### 9.2.2 样品前处理

准确称取试样 40.0g(准确到 0.1g)于均质器配置的搅拌中,加入 4.0g 氯化钠及 100mL 乙腈+水(9+1),以均质器搅拌提取 1min。以槽纹折叠滤纸过滤,准确称取 10.0mL 滤液并加入 40.0mL 水稀释,用玻璃纤维滤纸过滤至澄清,滤液备用。

将免疫亲和柱连接于 10.0mL 玻璃注射器下,准备移取 10.0mL 样品提取液于玻璃注射器中,将空气压力泵与玻璃注射器相连接,调节压力使溶液以 6ml/min 流速缓慢通过免疫亲和柱,直至 2~3mL 空气通过免疫亲和柱。以 10mLPSB/吐温-20 缓冲液和 10.0mL 水先后淋洗免疫亲和柱,弃去全部流出液,并使 2~3mL 空气通过免疫亲和柱。准确加入 1.5mL 甲醇洗脱,流速为 1~2mL/min。收集全部洗脱液于玻璃试管中,供检测用。

PBS/吐温-20 缓冲液:称取 8.0g 氯化钠、1.2g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、0.2g 氯化钾溶于 900mL 水中,加入 1mL 吐温-20,用水稀释至 1L。

### 9.2.3 色谱条件

流动相:乙腈:水:甲醇=46:46:8(V:V:V)

色谱柱:Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 250mm

流速:1.0mL/min

进样量:20 $\mu$ L

检测波长:激发 274nm,发射 440nm

柱温:40 $^{\circ}$ C

## 9.3 实验结果

### 9.3.1 典型分离色谱图

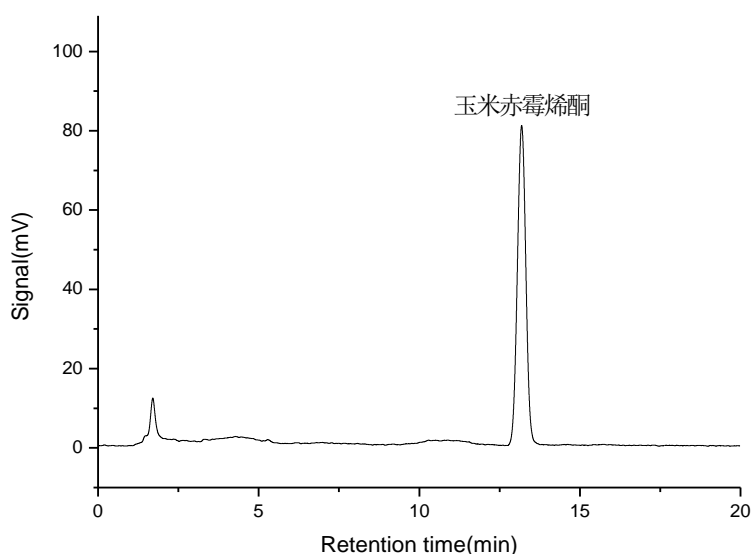


图9-1 玉米赤霉烯酮典型谱图

表 9-3 玉米赤霉烯酮色谱参数

物质	保留时间(min)	峰面积(mV sec)	拖尾因子	塔板数
玉米赤霉烯酮	13.19	1478.47	1.01	11600

### 9.3.2 线性

表9-4玉米赤霉烯酮检出限计算结果

物质	线性方程	R <sup>2</sup>
玉米赤霉烯酮	y=14.5862x+4.1748	0.9999

从上表可知，玉米赤霉烯酮浓度在5μg/L到100μg/L线性范围内线性相关系数大于0.9999。

### 9.3.3 检出限

以3倍信噪比为仪器检出限，10倍信噪比为仪器定量限计算。

表9-5 玉米赤霉烯酮信噪比测试结果

	仪器检出限(μg/L)	仪器定量限(μg/L)	方法检出限(μg/kg)	方法定量限(μg/kg)
iChrom 5100	0.11	0.32	0.20	0.68

NY/T 2071-2011《饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定液相色谱-串联质谱法》明确规定，玉米赤霉烯酮的检出限为 5μg/kg，定量限为 10μg/kg。

## 第10章 赭曲霉毒素 A 检测

### 10.1 仪器设备与试剂

表10-1 iChrom 5100型高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量
1	D5101紫外-可见检测器(选配)	1台
2	P5102高压恒流泵	1台
3	O5100色谱柱恒温箱(选配)	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	VB5101阀支架	1个
6	Chromsoft色谱数据工作站	1套
7	M5102系统组织器	1台
8	C18 5 $\mu$ m色谱柱	1支
9	荧光检测器	1台
10	AD适配器	1台
11	5100系统工具包	1套
12	S5101自动进样器(选配)	1台

表10-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	冰醋酸	分析纯
3	氯化钠	分析纯
4	磷酸氢二钠	分析纯
5	磷酸二氢钾	分析纯
6	氯化钾	分析纯
7	吐温-20(Tween-20)	分析纯
8	盐酸	分析纯
9	碳酸氢钠	分析纯
10	去离子水	18.2M $\Omega$
11	赭曲霉毒素A标准溶液	SIGMA

表10-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	
5	精密电子天平	感量为万分之一	称量
6	高速均质器	转速大于22000r/min	
7	免疫亲和柱	赭曲霉毒素A免疫亲和柱	
8	泵流操作架		
9	氮吹仪		

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL、2mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000 $\mu$ L, 0~5000 $\mu$ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性 PVC 手套、一次性口罩、进样针、槽纹折叠滤纸、玻璃纤维滤纸、0.22 $\mu$ m 滤膜等若干。



## 10.2 实验方法

### 10.2.1 标准溶液配制

#### ● 提取

准确称取试样 25g(准确到 0.001g)于均质器配置的搅拌钵中,加入 100mL 甲醇+水(8+2),将搅拌杯装于均质器上,于 22000r/min 高速搅拌提取 3min。提取液以槽纹折叠滤纸过滤于干净烧杯中。准确移取 10.0mL 滤液并加入 50.0mL 容量瓶中,加 PBS 缓冲液稀释至刻度,混合均匀,经玻璃纤维滤纸过滤至澄清,滤液备用。

#### ● 净化

将免疫亲和柱连接于 10mL 玻璃注射器下端,准确移取 20.0mL 样品提取液于玻璃注射器中,将空气压力泵与玻璃注射器上端连接,调节压力使溶液以 1 滴/s~2 滴/s 流速缓慢通过免疫亲和柱,至有空气通过免疫亲和柱时停止加压。用上述方法,以 10mL 淋洗缓冲液和 10.0mL 水先后淋洗免疫亲和柱,弃去全部流出液,准确加入 1.5mL 甲醇以上述方式洗脱,收集全部洗脱液于玻璃试管中,在 45℃以氮吹仪用氮气吹干。用流动相溶解残渣并定容至 500 $\mu$ L,即为试样提取净化液,供液相色谱测定时使用。

PBS 缓冲液:称取 8.0g 氯化钠、1.2g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、0.2g 氯化钾溶于 990mL 水中,用浓盐酸调节 pH 值至 7.0,用水稀释至 1L。

淋洗缓冲液:称取 25g 氯化钠,5g 碳酸氢钠溶于水,加入 0.1mL 吐温-20,用水稀释至 1L。

### 10.2.2 色谱条件

流动相:乙腈:水:冰醋酸=96:102:2(V:V:V)

色谱柱:Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 150mm

流速:1.0mL/min

检测波长:激发 333nm,发射 460nm

进样量:20 $\mu$ L

柱温:室温

## 10.3 实验结果

### 10.3.1 典型分离色谱图

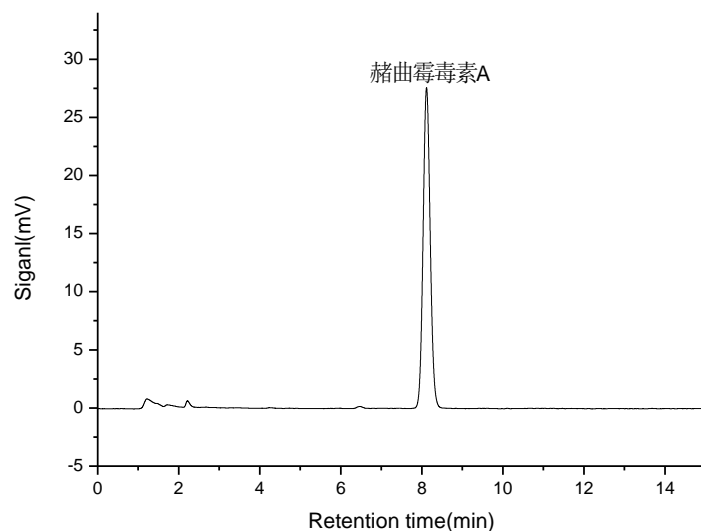


图 10-1 赭曲霉毒素 A 典型谱图

表 10-4 赭曲霉毒素 A 色谱参数

物质	保留时间(min)	峰面积(mV sec)	拖尾因子	塔板数
赭曲霉毒素 A	8.12	334.196	1.07	10290

### 10.3.2 线性

表 10-5 赭曲霉毒素 A 线性测试结果

物质	线性方程	R2
赭曲霉毒素 A	$y = 32.8591x + 6.9463$	0.9997

### 10.3.3 检出限

表 10-6 赭曲霉毒素 A 检出限计算结果

仪器检出限( $\mu\text{g/L}$ )	仪器定量限( $\mu\text{g/L}$ )	方法检出限( $\mu\text{g/kg}$ )	方法定量限( $\mu\text{g/kg}$ )
$3.41 \times 10^{-2}$	$11.38 \times 10^{-2}$	0.017	0.057

由以上结果可知，使用该解决方案对饲料中赭曲霉毒素 A 进行检测，具有灵敏度高、线性相关性好、分析快速操作简单等优点，满足 GB/T 30957-2014《饲料中赭曲霉毒素 A 的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》对饲料中赭曲霉毒素 A 的检测要求。

## 第11章 饲料中喹乙醇的测定

喹乙醇又称喹酰胺醇，商品名为倍育诺、快育灵，是一种化学合成的生长促进剂，也属于广谱抗菌药物。可促进机体蛋白质合成代谢，提高饲料能量利用率，从而加快生长发育，提高了个体瘦肉率。同时喹乙醇对预防和控制猪腹泻病作用显著。

但是喹乙醇有中度至明显的蓄积毒性，对大多数动物有明显的致畸作用，对人也有潜在的三致性，即致畸形，致突变，致癌。因此，喹乙醇在美国和欧盟都被禁止用作饲料添加剂。我国农业部早在2001年第168号公告中规定：喹乙醇只能用于体重低于35千克的猪，添加量为50-100ppm的饲料，禁止用于家禽及水产养殖。但仍然有不法分子在饲料中超标添加喹乙醇，从而导致喹乙醇在食用肉中残留。

依利特公司，结合GB/T 8381.7-2009《饲料中喹乙醇的测定 高效液相色谱法》，对饲料中喹乙醇进行了分析检测，提出了喹乙醇检测的全套解决方案。供相关人员参考。

### 11.1 设备与试剂

表11-1 Agress 1100型高效液相色谱系统配置清单

序号	仪器名称	梯度系统
1	D1100紫外-可见检测器	1台
2	P1100高压恒流泵	2台
3	ST1100溶剂脱盘	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	VB1110阀支架	1个
6	GM1100型梯度混合器	1个
7	色谱数据处理工作站	1套
8	Agress1100系统工具包	1套
9	Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 200mm 液相色谱柱	1支
10	500mL无色溶剂瓶（选配）	2只
11	O1100色谱柱恒温箱（选配）	1台

表11-2 所需化学试剂和溶液

序号	试剂和溶液	备注
1	甲醇	色谱纯
2	超纯水	18.2M $\Omega$
3	盐酸	分析纯
4	提取液：甲醇/水(5/95)	配制
5	淋洗液1：0.02mol/L盐酸	配制
6	淋洗液2：0.1mol/L盐酸	配制
7	淋洗液3：甲醇/水(5/95)	配制
8	洗脱液：甲醇/水(40/60)	配制
9	喹乙醇标准品	美仑生物，纯度99.0%

表11-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	溶解, 流动相脱气, AS3120
4	精密电子天平	感量为万分之一	称量
5	离心机	转速可达3500r/min	提取
6	摇床	转速可达110r/min	提取
7	螺口离心管	50mL	--
8	微孔有机相滤膜	孔径0.22 $\mu$ m	样品过滤
9	固相萃取小柱	Oasis HLB 1mL	净化
10	固相萃取仪		净化
11	恒温振荡器		提取

## 11.2 实验方法

### 11.2.1 试液制备

喹乙醇标准储备液：称取喹乙醇标准品 0.05020g（含量大于 99.6%），于 50mL 棕色容量瓶中，超声溶解，冷却至室温，定容至刻度，摇匀，使其溶液浓度为 1mg/mL，储存于-18℃冰箱中，备用。

喹乙醇标准工作液：准确称取标准储备液于容量瓶中，用洗脱液稀释，依次配制成浓度为 10 $\mu$ g/mL、20 $\mu$ g/mL、40 $\mu$ g/mL、60 $\mu$ g/mL、80 $\mu$ g/mL、100.0 $\mu$ g/mL 的标准溶液，现配现用。

### 11.2.2 样品前处理

#### ● 提取

称取 5g 试样（精确至 0.1mg）于具塞锥形瓶中，加入 50mL 提取液，具塞至于摇篮中，室温下恒温振荡器振荡速度 110r/min，避光振荡 45min。提取液在 3500r/min 下离心 10min，上清液经滤纸过滤，滤液作为 SPE 小柱净化使用。

#### ● 净化

SPE 小柱的活化：临用前分别向 SPE 小柱中加入 2mL 甲醇和 2mL 超纯水，对小柱进行活化。将提取滤液 2mL 加入活化好的 SPE 小柱，分别用 2mL 淋洗液 1、淋洗液 2 和淋洗液 3 淋洗小柱。并将小柱吹干，最后用 2mL 洗脱液洗脱。

洗脱液过 0.22 $\mu$ m 有机相滤膜，滤液上机测定。

### 11.2.3 色谱条件

流动相：甲醇/水，梯度洗脱  
 色谱柱：Supersil ODS-B 5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm  
 流量：1.0mL/min  
 检测波长：UV260nm  
 进样体积：10 $\mu$ L  
 柱温：30 $^{\circ}$ C

表 11-3 梯度洗脱表

时间/min	超纯水/%	甲醇/%
0	85	15
5	85	15
10	30	70
14	30	70
18	85	15
25	85	15

## 11.3 实验结果

### 11.3.1 分析谱图

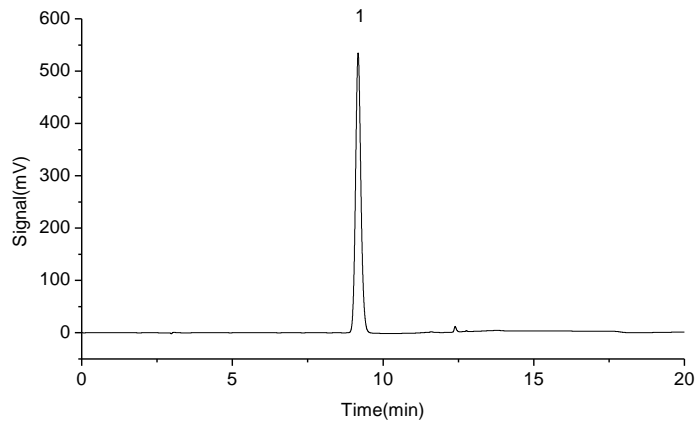


图 11-1 喹乙醇标准品分析谱图

1.喹乙醇

### 11.3.2 分析结果

表 11-4 喹乙醇测定结果

样品	喹乙醇	拖尾因子	柱效 (N/m)
保留时间 (min)	9.171	1.12	52000

### 11.3.3 线性范围

取喹乙醇标准工作液按照 7.2.3 进行分析得到喹乙醇线性如下表：

表11-5 线性方程

样品名称	线性方程	线性相关系数 R <sup>2</sup>
喹乙醇	Y=68.494x-208.86	0.9998

由上表可知，喹乙醇样品在 10~100 $\mu$ g/mL 的浓度范围内线性良好。

## 第12章 氟苯尼考与甲砒霉素分析

### 12.1 仪器配制

表12-1 Agress 1100型高效液相色谱系统配置清单

序号	仪器名称	数量
1	D1100紫外-可见检测器	1台
2	P1100高压恒流泵	1台
3	ST1100溶剂脱盘	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	VB1110阀支架	1个
6	Elitapex色谱数据处理工作站	1套
7	Agress1100系统工具包	1套
8	Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 200mm	1支
9	500mL无色溶剂瓶（选配）	2只
10	O1100色谱柱恒温箱（选配）	1台

### 12.2 溶液配制

取氟苯尼考与甲砒霉素对照品适量,加流动相溶解并稀释制成每 1ml 中约含氟苯尼考 50 $\mu$ g 与甲砒霉素 30 $\mu$ g 的混合溶液。

### 12.3 实验结果

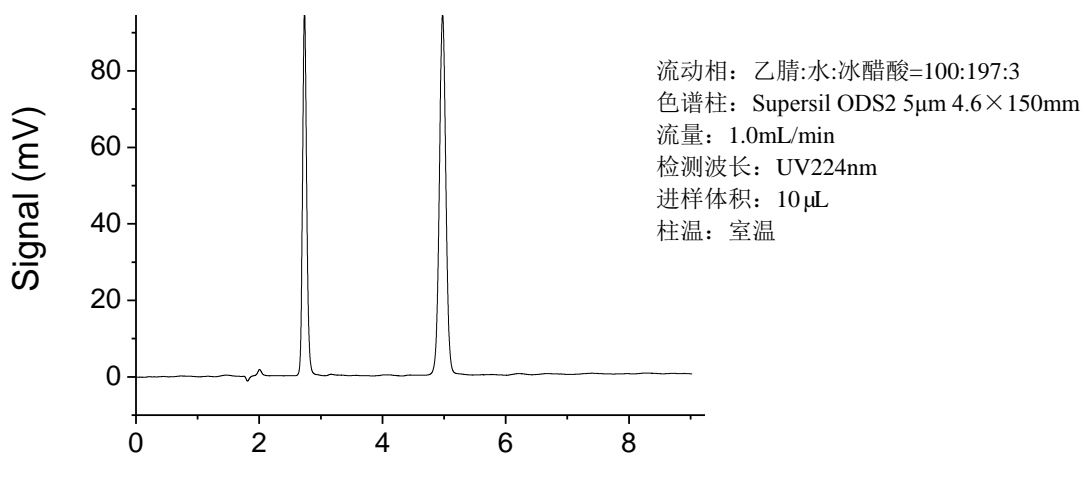


图 12-1 氟苯尼考与甲砒霉素对照品分析谱图

1. 甲砒霉素；2. 氟苯尼考

## 第13章 喹乙醇、卡巴氧、喹烯酮、乙酰甲喹分析

### 13.1 仪器配制

表13-1 Agress 1100型高效液相色谱系统配置清单

序号	仪器名称	数量
1	D1100紫外-可见检测器	1台
2	P1100高压恒流泵	1台
3	ST1100溶剂脱盘	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	VB1110阀支架	1个
6	Elitapex色谱数据处理工作站	1套
7	Agress1100系统工具包	1套
8	Supersil ODS2 5 $\mu$ m 4.6 $\times$ 200mm	1支
9	500mL无色溶剂瓶 (选配)	2只
10	O1100色谱柱恒温箱 (选配)	1台

### 13.2 实验结果

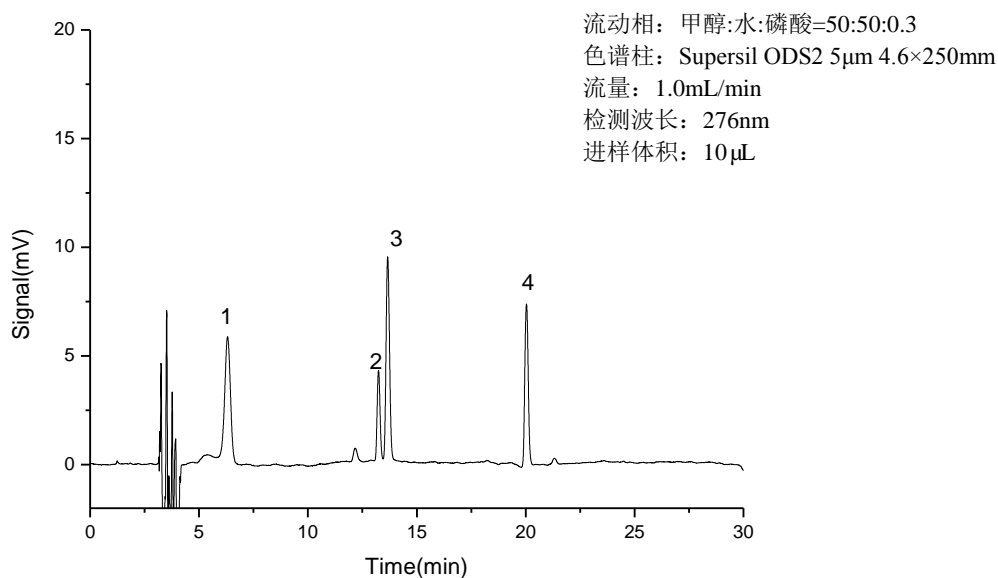


图 13-1 喹乙醇、卡巴氧、喹烯酮、乙酰甲喹分析谱图

1. 喹乙醇; 2. 卡巴氧; 3. 喹烯酮; 4. 乙酰甲喹

#### 大连公司

公司地址：高新园区七贤岭学子街 2-2 号  
公司电话：0411-84753333(总机)-转销售部  
公司传真：0411-84732323  
客服电话：400-66-35483  
公司网址：<http://www.eliteHPLC.com>



#### 苏州公司

苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 14 栋 501  
电话：0512-67997572

#### 北京办事处

地址：北京市朝阳区汤立路 201 号东亚奥北中心南区 4 号楼 2 单元 2307 室  
电话：13624984285

#### 济南办事处

地址：山东省济南市历下区奥体西路 1222 号力高国际 10 楼 1-1816 室  
电话：18842689516

#### 上海办事处

地址：徐汇区梅陇路 130 号华东理工大学实验四楼 204 室  
电话：15140566435

#### 武汉办事处

地址：武汉市洪山区鸿桂苑东区 1 栋 1 单元 2501  
电话：18842683216

#### 南京办事处

地址：江苏省南京市建邺区云锦路 45 号万达东坊 14 幢 608 室  
电话：13951643881

#### 厦门办事处

地址：厦门市集美区鱼福三里 383 号 127 单元  
电话：18842685196

#### 西安办事处

地址：陕西省西安市西稍门十字西南角柠檬宫舍 11505 室  
电话：18842681836

#### 广州办事处

地址：广州市白云区东兴二街 3 号擎山苑 C2 栋 1404 房  
电话：18842683616

#### 成都办事处

地址：成都武侯区九兴大道 6 号高发大厦 A 座 610  
电话：18842681865