

中华人民共和国农业行业标准

《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》

（公开征求意见稿）编制说明

合肥迈可罗生物工程有限公司
中国农业科学院饲料研究所
安徽赛如分析检测科技有限公司
安徽省兽药饲料监察所
安徽省畜牧推广总站
合肥工业大学生物与食品工程学院
北京市畜牧总站
安徽省饲料与健康养殖行业协会
安徽省农业科学院畜牧兽医研究所

2025年01月

目 录

1 工作简况.....	3
1.1 任务来源.....	3
1.2 制定背景.....	3
1.2.1 地顶孢霉培养物产品简介.....	3
1.2.2 地顶孢霉培养物现行农业部备案标准.....	3
1.2.3 地顶孢霉培养物应用、生产和企业标准情况.....	4
1.3 标准编制工作过程.....	7
1.3.1 起草阶段.....	7
1.3.2 第三方验证.....	8
1.3.3 定向征求意见阶段.....	8
1.3.4 预审阶段.....	8
2 《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准制定原则、主要内容及依据.....	9
2.1 标准制定原则.....	9
2.1.1 基本原则.....	9
2.1.2 对菌种和工艺的原则要求.....	9
2.1.3 标准制定过程中的实验方法.....	12
2.2 标准编制技术内容、依据和说明.....	13
2.2.1 标准名称.....	14
2.2.2 范围.....	14
2.2.3 术语和定义.....	14
2.2.4 技术要求和试验方法.....	15
2.2.5 检验规则.....	22
3 试验验证的分析、综述报告，预期的经济效益、社会效益和生态效益.....	23
3.1 试验方法建立——麦角甾醇的测定.....	23
3.1.1 方法原理.....	23
3.1.2 试剂及材料.....	23
3.1.3 仪器和设备.....	23
3.1.4 方法的筛选及确立.....	24
3.1.5 方法评价.....	26
3.2 预期的经济效益、社会效益和生态效益.....	31
4 采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况.....	32
5 与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系.....	32
6 重大分歧意见的处理经过和依据.....	32
7 贯彻农业行业标准的要求和措施建议.....	32
8 涉及专利相关说明.....	32
9 废止现行有关标准的建议.....	32
10 农业行业标准所涉及的产品、过程或者服务目录.....	33
11 其他应予说明的事项.....	33

中华人民共和国农业行业标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》 (公开征求意见稿) 编制说明

1. 工作简况

1.1 任务来源

2024年4月30日，农业农村部农产品质量安全监管司下达“关于下达2024年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知”（农质标函[2024]71号），合肥迈可罗生物工程有限公司获批承担“制定《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准”项目（项目编号：NYB-24294）。

地顶孢霉培养物由项目单位合肥迈可罗生物工程有限公司首创原研，2006年7月获国家农业部饲料和饲料添加剂新产品证书[新饲证字(2006)04号]，2013年中华人民共和国农业部公告第2045号发布，地顶孢霉培养物被列入《饲料添加剂目录（2013）》，归类“其他类别”。

1.2 制定背景

1.2.1 地顶孢霉培养物产品简介

地顶孢霉培养物，是古尼虫草真菌（*Cordyceps gunnii*，无性系名称：地顶孢霉 *Acromonium terricola*）经液固双相发酵的固体发酵产物，其有效成分包括地顶孢霉菌丝体及其分泌活性物质、发酵后培养基及其活性降解组分如活性寡糖和活性小肽等。

饲料添加剂地顶孢霉培养物，由项目单位合肥迈可罗生物工程有限公司首创原研，于2006年7月获国家农业部饲料和饲料添加剂新产品证书[新饲证字(2006)04号]，首批适用于猪和鸡。其后，产品原研单位开展了大量研究，按农业农村部公告第226号的要求，申报了扩大适用范围至泌乳奶牛，于2022年11月获批。

2013年中华人民共和国农业部公告第2045号发布，地顶孢霉培养物被列入《饲料添加剂目录（2013）》，归类“其他类别”。

目前，地顶孢霉培养物没有国家及行业标准。

1.2.2 地顶孢霉培养物现行农业部备案标准

2006年，合肥迈可罗生物工程有限公司研制的地顶孢霉培养物获批饲料添加剂新产品时，备案有经农业部审评专家审定的产品标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）。

备案标准（NYSL-1004-2006）中，关于地顶孢霉培养物的主要规定和技术

指标包括：

1) 产品定义：是指以玉米、黄豆粉、豆粕等为主要原料，用古尼虫草 *Cordyceps gunnii* 上分离的地顶孢霉 *Acremonium terricola*，经双相（液、固）发酵后所得到的固体发酵培养物，为促进生长饲料添加剂。

2) 菌种：地顶孢霉 *Acremonium terricola*。

3) 主要技术指标：腺苷 $\geq 350\text{mg/kg}$ ，麦角甾醇 $\geq 550\text{mg/kg}$ ，水分 $\leq 8.0\%$ ，粗蛋白质 $\geq 20\%$ ，粒度（40 目试验筛通过率） $\geq 95\%$ 。

4) 卫生学指标：铅 $\leq 5\text{mg/kg}$ ，砷 $\leq 2\text{mg/kg}$ ，镉 $\leq 0.5\text{mg/kg}$ ，汞 $\leq 0.1\text{mg/kg}$ ，霉菌总数 $\leq 4 \times 10^4\text{cfu/g}$ ，细菌总数 $\leq 2 \times 10^6\text{cfu/g}$ ，沙门氏菌不得检出。

2021 年在申报到适用范围至泌乳奶牛时，根据专家意见将备案标准（NYSL-1004-2006）按照《GB/T1.1-2020 标准化工作导则第一部分：标准化文件的结构和起草规则》、《GB/T20001.10.2014 标准编写规则 第 10 部分：产品标准》的相关规定进行修订，具体如下：

对标准文本做编辑性格式内容调整，保持 NYSL-1004-2006 标准中所有技术指标内容不变，对有效成分中腺苷的检测方法做修订，采用行业标准 NY/T 2116《虫草制品中虫草素和腺苷的测定 高效液相色谱法》。

1.2.3 地顶孢霉培养物应用、生产和企业标准情况

1.2.3.1 地顶孢霉培养物应用研究

标准项目承担单位作为地顶孢霉培养物原研者，进行了长期、大量试验研究和规模化测试，结果表明，地顶孢霉培养物可以调节平衡动物免疫，增强动物体内的抗氧化活性，调节动物胃肠道微生物菌群，进而提高饲料转化率，提高动物的生产性能，在养殖业中具有广阔的应用前景。尤其是在奶牛应用上，地顶孢霉培养物能够有效预防和缓解奶牛乳房炎，降低牛乳体细胞数，改善牛乳风味，并显著提高牛乳日产量。项目单位仅地顶孢霉在奶牛上的应用研究成果，在国内外已发表论文近 20 篇，获得发明专利授权 3 项。

1.2.3.2 地顶孢霉培养物的生产情况

据查询了解，目前国内约有 60 余家企业有“饲料添加剂地顶孢霉培养物”及其相关“混合型饲料添加剂地顶孢霉培养物”产品的企业标准，其中仅 7 家“饲料添加剂地顶孢霉培养物”产品企业标准。

2024 年 7-9 月，标准编制工作组在前期调研的基础上，通过电子邮件和快递的形式，向备案有“地顶孢霉培养物”及其相关产品企业标准的相关厂商发送了电子版和纸质版的“关于商请提供‘《饲料添加剂地顶孢霉培养物》行业标准’相关材料及样品的函”。商请提供的材料包括：生产许可证，工艺简述，产品标准，近

3 年年产量数据等；商请提供的样品为地顶孢霉培养物（原粉，非混合型饲料添加剂）。

通过顺丰快递发送快递 61 件，成功送达 58 件，并通过当地饲料监察部门联系发送文件 8 份。

截至 2024 年 9 月 30 日，仅收到回复及回执 11 家。其中：具有地顶孢霉培养物生产许可证的企业 4 家，分别是：

1) 荆州市宏达生物科技股份有限公司（鄂饲添（2023）T09001），年产量 0.5 吨；

2) 广东容大生物股份有限公司[粤饲添（2023）T18004]，年产量 12 吨；

3) 江苏三仪生物工程有限公司[苏饲添（2019）T03002]，年产量约 7 吨；

4) 甘肃大北农生物工程有限公司[甘饲添(2024)T00006]，年产量 261 吨。

另外，处于试生产阶段拟申请生产许可的企业 2 家，分别是：

1) 北京博锦元生物科技有限公司，2024 年试生产 3 吨。

2) 合肥卓领生物科技有限公司，2024 年试生产 2 吨。

上述企业和原研厂家的相关情况总结列如下表 1。

表 1：地顶孢霉培养物主要生产厂家情况汇总

单位	许可证号	发酵工艺	年产量 (吨)
合肥迈可罗生物工程有限公司	皖饲添（2021）T05001	固态发酵	500
荆州市宏达生物科技股份有限公司	鄂饲添（2023）T09001	固态发酵	0.5
广东容大生物股份有限公司	粤饲添（2023）T18004	液态发酵	12
江苏三仪生物工程有限公司	苏饲添（2019）T03002	液态发酵	7
甘肃大北农生物工程有限公司	甘饲添(2024)T00006	液体发酵	261
北京博锦元生物科技有限公司	-	固态发酵	3
合肥卓领生物科技有限公司	-	固态发酵	2

注：“-”表示暂时未申请许可。

另外，复函中声称不具有地顶孢霉培养物生产许可证的企业 5 家，分别是：

1) 大连三仪生物工程有限公司；

2) 河南省晨源生物科技有限公司；

3) 河北科星药业有限公司；

4) 山东益远药业有限公司；

5) 江西博莱大药厂有限公司。

1.2.3.3 各企业地顶孢霉培养物产品标准

综合分析 7 家“饲料添加剂地顶孢霉培养物”和 50 余家“混合型饲料添加剂地顶孢霉培养物”产品的企业标准，标准中规定的技术项目千差万别，技术指标良莠不齐。主要体现在以下几个方面：

1) 菌种：可查询的直接资料很少，但一些技术指标能够间接反映出有些厂家使用的菌种可能不是地顶孢霉。

《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）采用腺苷而非虫草素（3-脱氧腺苷）作为产品技术指标项，是因为地顶孢霉的虫草素含量很低，而有些企业标准中虫草素的含量指标高达 3000mg/kg~5000 mg/kg。

2) 生产工艺：如上述 1.2.2 所述，经农业部评审专家审定的地顶孢霉培养物的备案标准，明确规定地顶孢霉培养物是液固双相发酵的固体发酵产物。

多家企业的产品标准明确其产品是液体发酵产品。

3) 技术指标：如上述 1.2.2 所述，经农业部审评专家审定的地顶孢霉培养物的备案标准，采用了能够反映经高温烘干后培养物中菌丝量的麦角甾醇（真菌细胞膜中的恒定组分）和地顶孢霉特征的次生代谢产物腺苷，作为主要理化技术指标。而有厂家竟采用了 CFU 这种不宜反映丝状真菌生物量的指标，且指标值很低，仅为 10⁴CFU/g。

本标准编制过程中收集到的产品所对应的企业标准主要指标项如表 2 所示。

表 2：地顶孢霉培养物主要生产厂商的企业标准

项目	合肥迈可罗 NYSL-1004- 2006	江苏三仪 Q/320382SY SW18-2023	广东容大 Q/（GD） RD29-2017	荆州宏达 Q/JHDS002- 2023	北京博锦 元 Q/BJY1- 2023	合肥卓领 Q/HFZL2 -2023	甘肃大北农 Q/GSDBNS W01
外观与性状	略	略	略	略	略	略	略
粒度	略	略	略	略	略	略	略
腺苷，mg/kg，≥	350	-	-	-	350	300	0.1%或 0.2%
粗蛋白质，%，≥	20	-	-	-	20	20	-
虫草素，mg/kg， ≥	-	-	1000	3000/5000	-	-	-
麦角甾醇 mg/kg， ≥	550	-	-	-	600	500	-
水分，%，≤	8	10	12	10	10	10	12
总砷，mg/kg，≤	2.0	2.0	20	20	2.0	2.0	8.0
铅，mg/kg，≤	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

汞, mg/kg, ≤	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
镉, mg/kg, ≤	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
沙门氏菌, 25g 中	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出	不得检出
霉菌总数, CFU/g, ≤	4×10 ⁴	2×10 ⁴	2×10 ⁴	2×10 ⁴	-	-	-
细菌总数, CFU/g, ≤	2×10 ⁶	-	-	-	-	-	-
黄曲霉毒素 B ₁ , μg/kg, ≤	-	10	10	10	-	-	-

注：“-”表示没有规定；麦角甾醇测定方法：高效液相色谱法

1.3 标准编制工作过程

1.3.1 起草阶段

2024年4月30日，根据农质标函[2024]71号《关于下达2024年农业国家和行业标准制修订项目计划的通知》文件，任务下达。

2024年5月，项目单位合肥迈可罗生物工程有限公司邀请了中国农业科学院饲料研究所、安徽赛如分析检测科技有限公司、安徽省兽药饲料监察所、安徽省畜牧技术推广总站和北京畜牧总站等单位共同参与项目工作，并组织召开了线上会议，成立了《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准编制工作组。会议讨论编制了“制定《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准项目实施方案”。

2024年5月30日“实施方案”获全国饲料工业标准化技术委员会批准。

2024年6月标准编制工作组查询了大量资料，完成了地顶孢霉培养物国内生产企业名录、企业标准、团体标准、相关国内外法规标准、文献、专利等查询工作。

2024年7月6日，项目单位合肥迈可罗生物工程有限公司组织参与单位在安徽合肥召开“制定《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准”项目启动会议，选举负责项目的首席科学家，在“制定《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准项目实施方案”的基础上，进一步对标准制定的原则、关键定义和技术项目及参数等进行了讨论和明确，并进行分工，确定计划实施进度。

2024年7-9月，通过向生产企业发送“关于商请提供《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》行业标准相关材料及样品的函”，采集不同生产企业地顶孢霉培养物的产品样品以及质量标准、产品工艺、年产量等技术信息，并对产品的主要技术指标进行检测分析。

2024年8-9月，综合分析收集到的产品信息、样品及样品检测结果，制定《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准文本（定向征求意见稿）及其编制说明。

1.3.2 第三方验证

2024年4-11月完成三家方法验证，合肥迈可罗生物工程有限公司于2024年4月委托安徽省食品药品检验研究院、安徽省公众检测研究院有限公司，安徽赛如分析检测科技有限公司委托安徽省产品质量监督检验研究院共同完成标准（征求意见稿）中新建的麦角甾醇的检测方法。三家检测结果显示征求意见稿中检测方法适用于饲料添加剂地顶孢霉培养物中麦角甾醇的检测。

1.3.3 定向征求意见阶段

2024年10月，标准编制工作组将《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准文本（征求意见稿）及编制说明（征求意见稿）以电子或书面邮件形式发送相关企业和专家，广泛征求意见。发函单位27个，回函单位24个，未回函单位3个；提出意见单位24个，无意见单位0个。发函单位性质包括生产企业，科研院所，第三方检测机构及使用企业。

2024年11月，对征集的意见进行汇总。共收到反馈意见151条，采纳105条，部分采纳7条，未采纳39条，提出的意见主要包括书写规范、格式要求、定义和术语、产品工艺、技术指标、微生物指标等方面的问题。详见征求意见稿处理表。根据征求意见稿修订并完成标准预审稿编制，

2024年12月初标准编制组向全国饲料工业标准化委员会提交预审申请。

1.3.4 预审阶段

2025年1月14日，全国饲料工业标准化技术委员会微生物及酶制剂标准化工作组组织专家对合肥迈可罗生物工程有限公司等单位起草的农业行业标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》（预审稿）进行了认真审查。专家组由饶正华、李俊玲、商军、王长林、张惠媛、张晓琳、羊宋贞、李英俊、刘明组成。列席企业代表有北京挑战生物技术有限公司、北京昕大洋科技发展有限公司、合肥卓领生物科技有限公司。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出了以下5个方面的修改意见：①范围：增加“原料和菌种”“灭菌后的植物性饲料原料为主要原料”，“液固双相发酵”修改成“固态发酵”。②术语和定义：规范“地顶孢霉”，删除地顶孢霉培养物。③原料和菌种单独列为第4章；删除附录A“地顶孢霉的鉴定”。④编制说明增加样品的批次数量，根据测定结果优化腺苷和麦角甾醇指标。⑤按GB/T 1.1-2020、GB/T 20001.10-2014、GB/T 20001.4-2015的要求进一步规范标准文本，并进一步完善编制说明。与会专家一致同意标准起草单位按照意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

1.3.5 公开征求意见

1.3.6 终审

1.3.7 全体委员审查会

1.3.8 报批

2. 《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》标准制定原则、主要内容及依据

2.1 标准制定原则

2.1.1 基本原则

本文件根据《GB/T1.1-2020 标准化工作导则第一部分：标准化文件的结构和起草规则》、《GB/T20001.10.2014 标准编写规则 第10部分：产品标准》及GB/T20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的规定进行编制。

参考国内外标准，GB10648-2013《饲料标签》、GB13708《饲料卫生标准》、NY/T1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》、GB/T 23181-2008《微生物饲料添加剂通用要求》、《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》，以及农业部备案产品标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）、企业标准中各项技术指标，结合样品实测数据进行制定。

本标准着重对产品的生产菌种、生产工艺、产品技术指标和卫生指标提出要求，以推广科学技术成果，增强产品的安全性、通用性，提高经济效益、社会效益、生态效益，做到技术上先进，经济上合理。

2.1.2 对菌种和工艺的原则要求

如上所述，本标准着重对产品的技术指标和卫生指标提出要求，以确保产品的质量、安全和效能。地顶孢霉培养物是微生物发酵产品，菌种和工艺是最为关键的生产要素，不仅在技术指标层面影响产品的质量，更是在安全和效能的层面决定产品的生命。

2.1.2.1 菌种

本标准对菌种的原则要求，参照了GB/T23181-2008《微生物饲料添加剂通用要求》、NY/T1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》、农办牧[2021]43号

文件《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》等标准和文件的相关规定和要求。

2.1.2.1.1 菌落形态

挑取菌种点接于马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）上，25℃静置培养7天，菌落圆形，菌落直径22mm~25mm，白色表面凸起，质地丝绒状，反面黄色；无渗出现象产生，无可溶性色素产生，见图1。



图1 PDA培养基上菌落形态（正面）

2.1.2.1.2 菌体形态

用干净的胶头滴管吸取液体菌液一滴或者用接种挑取取固体培养物上菌丝于干净的载玻片上，并加盖盖玻片，在光学显微镜（400×）下观察，菌丝无色，壁光滑、具隔膜，宽1.5 μm ~3 μm ；瓶梗直接从菌丝上长出，基部膨大，顶端细长，单生或2~6个轮生，长6~24 μm ；分生卵圆形或椭圆形，大小为2.0~3.5 \times 1.2~1.8 μm ，壁平滑，形成较长分生孢子链，见图2。



图2 显微镜下的地顶孢霉形态

2.1.2.1.3 分子生物学鉴定

利用商业化试剂盒从生产菌种或者生产产品中提取基因组DNA模板，以ITSrDNA基因的引物（表3），进行PCR扩增、纯化和测序。测序结果与表所列基因序列（CICC 21-378-869-1609）进行序列比对，99%为阈值，判定其属种。

表 3 ITS rDNA 基因 PCR 扩增引物和产物序列

PCR引物序列	PF 5' TACCGAGTTCTTACAACCTCCCAAAC PR 3' GATATGCTTAAGTTCAGCGGGTAG
PCR产物序列	TACCGAGTTCTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACTTATACCTATACTGTTGCTTCGGCGGGTCAT CGCCCCGGGAAAGACAGGGAGCCGGCAACGGCCCCCTGGAAAACCCCGGAACCAGGGCCTCGC CGGGGACTTAACTCTGTATTCTCTTTACTGTATTGTATACCGTCTGAGTGACAAAAACATAA TGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCAGT ACTCTGGCGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAGGTACCCCGCTGCGTCTGTGGC GGGTGGGAGCCTGGTGTGGGGACCGCGGAAAACCTGCCCCAGGGCAGCCGCCGCCCTAAATG AATTGGCGGCCTCGTCGCGGCCCTCTCTGCGTAGTAGCACACACCTCGCAACGGGAGCCCGCGG CGGCCACTGCCGTAACCGCACCATCTTCTTTCTAGAGTTGACCTCGAATCAGGTAGGACTACCC GCTGAACTTAAGCATATC

2.1.2.2 工艺

农业部评审专家审定的备案产品标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）中明确载明，地顶孢霉培养物是液固双相发酵的固体发酵产物。

2006 年地顶孢霉培养物获批新饲料添加剂，2022 年获批扩大应用范围至泌乳奶牛，均是采用地顶孢霉固体发酵培养物完成了毒理试验、安全性试验、有效性试验等等。

地顶孢霉固体发酵产物中不仅含有真菌的菌丝体/孢子及其分泌的各种活性物质，还含有发酵过程中分解固相培养基中的多糖和蛋白所产生的大量活性寡糖和小肽。液体发酵，多采用易于吸收转化、相对廉价的小分子碳源和氮源，分泌和分解产生的活性物质很少。行业内的共识是，液体发酵和固体发酵产品在功能和功效上差异很大。譬如，固体发酵的酵母培养物具有液体发酵的酵母粉的不可取代性。

对于发酵产品，液体发酵工艺和固体发酵工艺，显然属于截然不同的两条工艺路线。如上所述，一些厂家的地顶孢霉培养物是液体发酵产品，相较于地顶孢霉固体发酵产品，则应属于“生产工艺发生重大变化”。2019 年颁布实施的农业农村部公告第 226 号《新饲料添加剂申报材料要求》规定，“生产工艺发生重大变化，应当照本要求规定准备相关材料”。

所以，本标准限定地顶孢霉培养物为地顶孢霉的固体发酵产物，生产工艺见图 3。

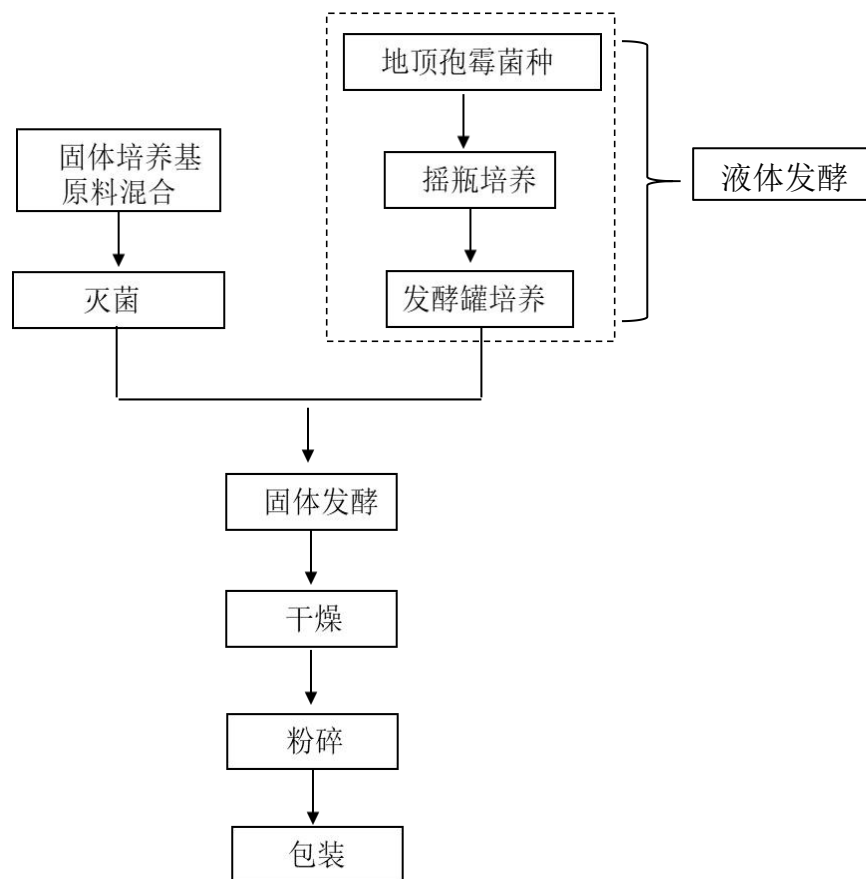


图3 地顶孢霉培养物工艺流程图

2.1.3 标准制定过程中的实验方法

标准制定过程中的实验方法分为标准方法和新建的检测方法。其中：

- 1) 新建的检测方法，用于技术指标项“麦角甾醇”含量的测定，将于下文中“第3项”详述。
- 2) 标准实验方法所遵循的标准如下表：

表4：参照标准文件

标准编号	标准方法名称
GB/T 6432	饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法
GB/T 6435	饲料中水分的测定
GB/T 8170	数值修约规则与极限数值的表示和判定
GB 10648	饲料标签
GB 13078	饲料卫生标准
GB/T 5917.1	饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
GB/T 13079	饲料中总砷的测定
GB/T 13080	饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
GB/T 13081	饲料中汞的测定

GB/T 13082	饲料中镉的测定
GB/T 13091	饲料中沙门氏菌的测定
GB/T 13093	饲料中细菌总数的测定
GB/T 42959	饲料微生物检验 采样
NY/T 2071	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 30956	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
NY/T 2116	虫草制品中虫草素和腺苷的测定 高效液相色谱法
NY/T 1444-2007	微生物饲料添加剂技术通则
GB/T 23181-2008	微生物饲料添加剂通用要求

2.2 标准编制技术内容、依据和说明

地顶孢霉培养物无相关国家标准和行业标准,本标准以农业部备案产品标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物(虫草欣康)》(NYSL-1004-2006)为蓝本,参照相关的国家标准、行业标准和法律法规的要求,结合调研测试的国内主要生产企业的产品情况,进行了完善,具体项目见表5。

表5: 拟定标准与 NYSL-1004-2006 主要技术指标项内容比较

项 目		NYSL-1004-2006	本标准	本标准 检验要求
外观与性状		灰白色,色泽一致,粉状,略有香甜味,无发酵霉变、结块及异味。	色泽一致,粉状或颗粒,无结块,无可见异物,有地顶孢霉发酵的特殊气味,无异臭。	批检验
粒度(0.425mm 试验筛通过率)/%	≥	95	95	批检验
腺苷/mg/kg	≥	350	350	批检验
麦角甾醇/mg/kg	≥	550	550	批检验
水分/%	≤	8.0	8.0	批检验
粗蛋白质/%	≥	20	20	批检验
铅/mg/kg	≤	5	5	型式检验
砷/mg/kg	≤	2	2	型式检验
镉/mg/kg	≤	0.5	0.5	型式检验
汞/mg/kg	≤	0.1	0.1	型式检验
黄曲霉毒素 B ₁ / μg/kg	≤	/	10	型式检验

玉米赤霉烯酮/mg/kg	≤	/	0.5	型式检验
脱氧雪腐镰刀菌烯醇/mg/kg	≤	/	5	型式检验
霉菌总数/cfu/g	≤	4×10 ⁴	-*	/
细菌总数/cfu/g	≤	2×10 ⁶	-*	/
沙门氏菌（25g）		不得检出	不得检出	型式检验

*注：“-”表明拟取消该指标项。

2.2.1 标准名称

本标准的名称为《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》，与饲料添加剂目录中的名称保持一致。英文名称：《Feed additives-Culture of *Acremonium terricola*》。

2.2.2 范围

NYSL-1004-2006 标准中适用范围为：本文件适用于地顶孢霉经过液固双相发酵所得培养物，经多道工序加工而成的饲料添加剂。

本次制定标准的适用范围为：本文件适用于以灭菌后的植物性饲料原料为主要原料，地顶孢霉为菌种，经固态发酵、干燥粉碎后获得的饲料添加剂地顶孢霉培养物产品。

修订之处在于：

- 1) 进一步明确生产工艺中用灭菌后的植物性原料作为发酵原料，发酵产品是固体培养物；
- 2) 进一步明确培养物的后续加工工序。

2.2.3 术语和定义

2.2.3.1 关于地顶孢霉的定义

NYSL-1004-2006 标准中对地顶孢霉的定义包括了菌种名称、分类地位、在 MA 培养基上的菌落描述、菌丝和孢子的显微形态描述。

本次制定标准正文中对于地顶孢霉的定义为：

地顶孢霉 *Acremonium terricola*，从古尼虫草 *Cordyceps gunnii* 中分离得到的丝状真菌，属于真菌界，子囊菌门，粪壳菌纲，肉座菌目，麦角菌科、虫草属。菌丝无色，壁光滑、具隔膜，宽 1.5μm~3 μm；瓶梗直接从菌丝上长出，基部膨大，顶端细长，单生或 2~6 个轮生，长 6μm~24 μm；分生孢子卵圆形或椭圆形，大小为 2.0~3.5×1.2~1.8 μm，壁平滑，形成较长分生孢子链。（引自中国工业微生物菌种保藏管理中心向合肥迈可罗生物工程有限公司出具的菌种鉴定报告（CICC 21-378-869-1609））。

2.2.3.2 关于地顶孢霉培养物的定义

NYSL-1004-2006 标准中对地顶孢霉培养物的定义为：

地顶孢霉培养物（商品名虫草欣康），是指以玉米、黄豆粉、豆粕等为主要原料，用古尼虫草 *Cordyceps gunnii* 上分离的地顶孢霉 *Acremonium terricola*，经双相（液、固）发酵后所得到的固体培养物，为促进生长饲料添加剂。

本次拟制定标准“地顶孢霉培养物”的定义：

地顶孢霉培养物，以灭菌后的植物性饲料原料为主要原料，地顶孢霉为菌种，经固态发酵、干燥粉碎后获得的饲料添加剂地顶孢霉培养物产品。

修订之处在于：

- 1) 删除“（商品名虫草欣康）”；
- 2) 删除“玉米、黄豆粉、豆粕”，原料可采用与玉米、大豆、豆粕具有同等功能的原料替代，以有利于各企业根据自身情况和属地特点做适当调整。

预审时专家建议标准文本中删除“地顶孢霉培养物”定义的条款。

2.2.4 技术要求和试验方法

2.2.4.1 菌种

菌种应为地顶孢霉（*Acremonium terricola*）。

2.2.4.2 原料

发酵的原料虽然要经过发酵，但原料的安全决定了产品的安全，所以规定：**原料来源于《饲料原料目录》和（或）《饲料添加剂品种目录》。**

2.2.4.3 外观与性状

本标准产品是采用植物性饲料原料为主要原料的虫草真菌发酵产物，后续有烘干和粉碎工艺环节。根据本标准产品的实际感官状态，明确其外观与性状指标为：**色泽一致，粉状或颗粒状，无结块，无可见异物，有地顶孢霉发酵的特殊气味，无异臭。**

因为发酵原料中可选的饲料原料种类很多，不宜对产品的色泽做具体限定，仅要求色泽一致。

发酵过程中的杂菌污染，或者腐败变质，会反映在产品的气味上，因此要求“有地顶孢霉发酵的特殊气味，无异臭”。

在仓储期间，植物性原料易吸潮，会产生结块，所以特别提出“无结块”。

特别提出“无可见异物”，防止加工过程中有异物的混入。

检测方法主要采用眼观和鼻嗅，取适量试样置于干净的白纸上，在自然光下观察；



图 4 地顶孢霉培养物样品示例

本次标准制定过程中，采集到的几家样品，除在颜色上有差异外，其它方面均符合上述感官指标要求。

2.2.4.4 粒度

饲料颗粒度指的是饲料中的各种颗粒大小和分布情况。饲料颗粒度对饲料的机械性、均一性、流动性、营养成分和饲喂效果等方面有着重要影响，饲料添加剂的粒度分布还影响其与其他饲料的混匀效果。

采用 GB/T 5917.1 《饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法》的方法测定了采集集到的样品粒度，见表 6。

表 6 不同样品粒度测定结果

样品来源	粒度，通过率%	
	0.85mm 标准筛	0.425mm 标准筛
合肥迈可罗生物工程有限公司	100	96.1
	100	95.6
	100	95.3
荆州市宏达生物科技股份有限公司	100	96.0
	100	95.7
北京博锦元生物科技有限公司	100	95.6
	100	95.2
合肥卓领生物科技有限公司	100	95.7

	100	96.1
--	-----	------

参考相关企业标准，根据检测结果，将粒度要求规定为：0.425mm 标准筛通过率≥95%。

2.2.4.5 理化指标

2.2.4.5.1 水分

水分是重要的质量指标，它的控制关系到产品是否容易发生结块和霉变，与产品的保质期息息相关。

本次标准制定过程中，采用 GB/T 6435 《饲料中水分的测定》对采集到的样品水分进行测定，结果如下表 7 所示，均符合要求。

表 7 不同厂家地顶孢霉培养物水分测定结果

样品来源	水分，%	
	标识量	实际检测值
合肥迈可罗生物工程有限公司	≤8	7.7
	≤8	7.4
	≤8	7.2
荆州市宏达生物科技股份有限公司	≤10	6.7
	≤10	7.5
北京博锦元生物科技有限公司	≤10	6.5
	≤10	7.2
合肥卓领生物科技有限公司	≤10	7.3
	≤10	7.1

根据市场收集样品实测结果和生产厂家企标控制要求，本标准规定地顶孢霉培养物水分含量不高于8.0%。

2.2.4.5.2 粗蛋白

本标准制定，拟删除原先 NYSL-1004-2006 中粗蛋白指标项。理由如下：

1) 粗蛋白主要来源于培养基，其含量并不反映发酵水平和程度，和产品质量无关；

2) 地顶孢霉培养物作为饲料添加剂，添加量仅 0.1%-0.3%，在营养学角度粗蛋白含量不影响产品的使用效果。

取消这个指标项，有利于生产企业更自主的调配固体发酵培养基配方，同时减少产品检测方面的人力、物力、资金投入。

本次标准制定过程中，依然采用 GB/T 6432 《饲料中粗蛋白的测定 凯氏定氮法》对采集到的样品粗蛋白进行了检测，检测结果见表 8。

表 8 不同样品粗蛋白测定结果（单位：%）

样品来源	标识量	实际检测值
合肥迈可罗生物工程有限公司	≥20	22.4
	≥20	22.2
	≥20	22.0
荆州市宏达生物科技股份有限公司	-	28.3
	-	22.0
北京博锦元生物科技股份有限公司	≥20	21.9
	≥20	22.3
合肥卓领生物科技股份有限公司	≥20	22.0
	≥20	21.0

注：“-”表示企业标准未规定标识量。

2.2.4.5.3 麦角甾醇

麦角甾醇是真菌细胞膜的特异性重要组成成分，结构稳定，含量恒定，能够相对准确标识发酵真菌的生物量，反映真菌发酵的程度和发酵产品的质量。所以，麦角甾醇含量为本产品关键性标识项目。

对采集到的地顶孢霉培养物样品中麦角甾醇的含量进行检测，麦角甾醇检测结果见表 9。

表 9 不同样品麦角甾醇测定结果（单位：mg/kg）

样品来源	标识量	实际检测值
合肥迈可罗生物工程有限公司	≥550	780.4
	≥550	796.2
	≥550	776.4
荆州市宏达生物科技股份有限公司	-	12.8
	-	18.6
北京博锦元生物科技股份有限公司	≥600	798.1
	≥600	783.5
合肥卓领生物科技股份有限公司	≥500	687.2
	≥500	695.4

注：“-”表示企业标准未规定标识量。

另外收集合肥迈可罗生物工程有限公司等不同生产企业正常生产的不同月份不同批次 30 个产品麦角甾醇实测结果见图 10。

表 10 不同批次产品麦角甾醇实测结果（单位：mg/kg）

样品编号	麦角甾醇实测值	样品编号	麦角甾醇实测值	样品编号	麦角甾醇实测值
1	752.2	11	572.0	21	584.8

2	733.8	12	675.6	22	568.9
3	649.4	13	614.4	23	789.1
4	690.6	14	659.0	24	714.6
5	789.1	15	619.6	25	670.9
6	714.6	16	539.8	26	658.0
7	670.9	17	547.5	27	739.0
8	658.0	18	585.6	28	613.0
9	739.0	19	752.2	29	681.8
10	713.0	20	733.9	30	771.0

从以上表 10 中结果可见，不同批次 30 个产品麦角甾醇的含量有差异，数值范围在 534.8mg/kg~789.1mg/kg，计算 RSD%为 10.7%，其中麦角甾醇含量在 550mg/kg 以下的样品占比约 6.7%，含量在 550mg/kg~650mg/kg 的样品占比约 26.7%，含量大于等于 650mg/kg 的占比约 66.6%。由于丝状真菌的固体发酵，在规模化生产过程中，一些技术参数不易控制，且批次内不同发酵点很难做到均一，在制定相应的技术指标时，需在一定程度上放宽标准线。

综合上述分析，本标准编制组一致同意仍保留《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）备案标准的麦角甾醇含量要求，规定麦角甾醇含量大于等于 550mg/kg。

2.2.4.5.4 腺苷

腺苷全称腺嘌呤核苷，是各种核苷中的一种，也是核酸的基本结构单位。腺苷是虫草类产品的主要活性成分，是鉴别地顶孢霉培养物产品质量的重要指标。腺苷为本标准产品的强制性标识项目。

采用 NY/T2116《虫草制品中虫草素和腺苷的测定 高效液相色谱法》对采集到的地顶孢霉培养物样品中腺苷含量进行检测，腺苷检测结果见表 11。

表 11 不同样品腺苷测定结果（单位：mg/kg）

样品编号	标识量	实际检测值
合肥迈可罗生物工程有限公司	≥350	541.2
	≥350	534.4
	≥350	528.5
荆州市宏达生物科技股份有限公司	-	177.4
	-	179.3
北京博锦元生物科技有限公司	≥350	498.6
	≥350	523.1
合肥卓领生物科技有限公司	≥300	469.8
	≥300	489.4

注：“-”表示企业标准未规定标识量。

另外收集合肥迈可罗生物工程有限公司等不同生产企业正常生产的不同月份不同批次 30 个产品腺苷实测结果见图 12。

表 12 不同批次腺苷实测结果（单位：mg/kg）

样品编号	腺苷实测值	样品编号	腺苷实测值	样品编号	腺苷实测值
1	448.0	11	510.0	21	370.6
2	461.5	12	532.2	22	392.1
3	477.2	13	508.7	23	446.9
4	457.5	14	522.4	24	512.1
5	418.9	15	514.4	25	372.4
6	477.8	16	521.6	26	531.2
7	538.7	17	494.6	27	535.3
8	477.8	18	465.3	28	542.6
9	429.8	19	411.3	29	490.7
10	340.3	20	540.0	30	390.7

从以上表 12 中结果可见，不同批次 30 个产品腺苷的含量有差异，数值范围在 340.3mg/kg~542.6mg/kg，计算 RSD%为 12.3%，其中含腺苷量在 350mg/kg 以下的样品占比约 3.3%，含量在 350mg/kg~450mg/kg 的样品占比约 30%，含量大于等于 450mg/kg 的占比约 66.7%。

综合上述分析，本标准编制组一致同意仍保留《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）备案标准的腺苷含量要求，规定腺苷含量大于等于 350mg/kg。

2.2.4.6 卫生要求

卫生学要求主要包括无机物、毒素和微生物污染三个方面。

饲料添加剂种类繁多，添加量各异，现在尚无强制性的统一的卫生标准。

《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》（NYSL-1004-2006）中，卫生学指标为：铅 \leq 5mg/kg，砷 \leq 2mg/kg，镉 \leq 0.5mg/kg，汞 \leq 0.1mg/kg，霉菌总数 \leq 4 \times 10⁴cfu/g，细菌总数 \leq 2 \times 10⁶cfu/g，沙门氏菌不得检出。本标准增加了“黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇，删除霉菌总数和细菌总数。

1) 无机物污染的指标，参照现行的 GB 13078《饲料卫生标准》、NY/T 1444-2007《微生物饲料添加剂技术通则》，仍属严格控制的标准线。结合多年来的生产实际情况，本标准将采用《饲料添加剂 地顶孢霉培养物（虫草欣康）》

(NYSL-1004-2006)“铅≤5mg/kg, 砷≤2mg/kg, 镉≤0.5mg/kg, 汞≤0.1mg/kg”的卫生指标。

2) 毒素污染指标, 鉴于地顶孢霉培养物的发酵采用了玉米、豆粕等原料, 为进一步严控产品质量, 确保产品的安全使用, 参照 GB 13078《饲料卫生标准》中植物源性饲料原料的规定, 本标准拟增加“黄曲霉毒素 B₁ (≤10 μg/kg)、玉米赤霉烯酮 (≤0.5 mg/kg)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (≤5 mg/kg)”三个卫生指标项。

3) 鉴于地顶孢霉培养物是微生物(真菌)发酵产品, 作为生产用菌种的地顶孢霉本身是一种霉菌, 现有国家标准 GB/T 13092《饲料中霉菌总数测定方法》无法辨别地顶孢霉培养物中生产用菌地顶孢霉和其他有害霉菌, 同时参照 GB 13078《饲料卫生标准》中特别针对“饼粕类发酵产品”不做霉菌污染物计数的规定, 所以标准编制工作组决定删除“霉菌总数”卫生指标。

参照 GB 13078《饲料卫生标准》中只对动物源性饲料原料要求做细菌总数计数的规定, 另外根据企业实际生产过程中细菌总数的检测结果(表 13)分析, 由于工厂化大规模生产过程中固体发酵阶段在非完全无菌环境下进行, 生产温度较适宜, 细菌总数难以控制, 从日常生产中 30 个批次产品细菌总数回顾性数据可知, 细菌总数小于 2×10^6 占比约为 76.7%, 大于等于 2×10^6 占比约为 23.3%, 因此标准编制工作组决定本标准删除“细菌总数”卫生指标。

表 13 不同批次细菌总数实测结果(单位: CFU/g)

样品编号	细菌总数	样品编号	细菌总数	样品编号	细菌总数
1	3.0×10^5	11	3.5×10^6	21	4.8×10^5
2	3.4×10^6	12	4.1×10^5	22	4.5×10^5
3	4.1×10^5	13	4.0×10^5	23	4.5×10^5
4	4.2×10^5	14	4.1×10^5	24	4.1×10^5
5	4.0×10^6	15	4.1×10^5	25	4.5×10^5
6	4.5×10^5	16	3.1×10^7	26	4.0×10^5
7	4.4×10^5	17	4.2×10^5	27	3.9×10^6
8	3.7×10^5	18	3.9×10^7	28	4.2×10^5
9	3.9×10^5	19	4.7×10^5	29	4.5×10^5
10	4.3×10^5	20	4.4×10^5	30	3.9×10^6

参照 GB 13078《饲料卫生标准》的规定, 为确保产品的安全性, 标准编制工作组决定本标准保留“沙门氏菌”不得检出的卫生指标。

4) 本次标准编制过程中, 对收集到的地顶孢霉培养物样品, 按表 4 所列的方法进行了卫生指标的检测, 均符合上述要求。结果如表 14 所示。

表 14 不同样品卫生指标的检测

项目 限定值/样品	迈可罗			荆州宏达		北京博锦元		合肥卓领	
铅 ≤5mg/kg	2.7	2.9	2.8	3.8	4.0	3.1	3.0	2.9	3.2
砷 ≤2mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
镉 ≤0.5mg/kg	0.44	0.44	0.42	0.37	0.15	0.43	0.42	0.41	0.44
汞 ≤0.1mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
黄曲霉毒素 B ₁ ≤10 μg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
玉米赤霉烯酮 ≤0.5 mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 ≤5 mg/kg	-	-	-	-	-	-	-	-	-
沙门氏菌 25g 不得检出	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“-”，未检出。

2.2.5 检验规则

2.2.5.1 组批和抽样

根据生产实际情况规定组批规则。

2.2.5.2 出厂检验和型式检验

产品外观与性状是对产品的基本要求，且可以对产品正常与否进行最直观最简便的初步判断，设为出厂检验；

水分与产品的保质期密切相关，设为出厂检验；

麦角甾醇、腺苷是反映发酵情况和产品质量的重要指标，设为出厂检验；

地顶孢霉培养物持续生产中，产品中无机污染物和毒素等主要来源于原料。在没有发生原料厂家变更，原材质量稳定的情况下，设为型式检验；

从多年生产研究及检测结果来看，地顶孢霉培养物产品中没有检测出过沙门氏菌，所以沙门氏菌也设为型式检验项目进行监控。

型式检验在正常生产情况下，每半年至少进行 1 次型式检验。有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- 1) 产品定型投产时；
- 2) 生产工艺、配方或主要原料来源有较大改变，可能影响产品质量时；
- 3) 停产 3 个月以上，重新恢复生产时；
- 4) 出厂检验结果与上次型式检验结果有较大差异时；
- 5) 饲料管理部门提出检验要求时。

2.2.5.3 判定规则

- 1) 所验项目全部合格，判定为该批次产品合格。
- 2) 检验结果中有任何指标不符合本文件规定时，可自同批产品中重新加倍

取样进行复检。复检结果有一项指标不符合本文件规定，则判定该批产品不合格。卫生指标中的微生物指标不得复检。

3) 除微生物指标外，各项目指标的极限数值判定按 GB/T 8170 中全数值比较法执行。

2.2.5.4 标识、包装、运输、贮存

本产品的标签应符合 GB10648-2013《饲料标签》的规定。

包装材料应该清洁卫生、无毒、无害、防潮、不透光。

运输中防止包装破损、防雨、防潮、防晒，不应与有毒有害物质混运。

产品应存放于通风、干燥，有防虫、防鼠设施的仓库中，不应与有害有毒物质混贮。

2.2.5.5 保质期

NYSL-1004-2006 备案标准中规定：在保证贮存和运输的条件下，自生产之日起保质期为 12 个月，本标准规定：未开启包装的产品，在规定的运输、贮存条件下，产品保质期应与标签中标明的保质期一致。

3. 试验验证的分析、综述报告，预期的经济效益、社会效益和生态效益；

3.1 试验方法建立——麦角甾醇的测定

3.1.1 方法原理

试样中麦角甾醇经提取液超声提取后，用高效液相色谱进行测定，外标法定量。

3.1.2 试剂及材料

甲醇：色谱纯，美国 Tedia 公司。

甲醇：分析纯，天津市永大化学试剂有限公司

无水乙醇：分析纯，天津市富宇精细化工有限公司

麦角甾醇标准品：纯度 98%，毕得医药。

地顶孢霉培养物：批号 20240416，合肥迈可罗生物工程有限公司

3.1.3 仪器和设备

高效液相色谱仪（Agilent 1100）；安捷伦

电子天平（FA2004）：上海舜宇恒平科学仪器有限公司

数控超声波清洗器（KQ-400DB）：昆山市超声仪器有限公司

紫外可见分光光度计（UV-2450）：日本岛津

3.1.4 方法的筛选及确立

3.1.4.1 波长的选择及确定

称取麦角甾醇标准品分别溶于甲醇，乙醇，95%乙醇中，配置成 5ug/mL 的溶液，在紫外分光光度计上进行全波长扫描，由扫描结果知在三种溶剂中均有两个吸收峰，分别在 271nm 和 281nm 处，在 281nm 处吸收峰值更大，因此色谱波长选择最大吸收波长 281nm。全波长扫描结果见图 5。

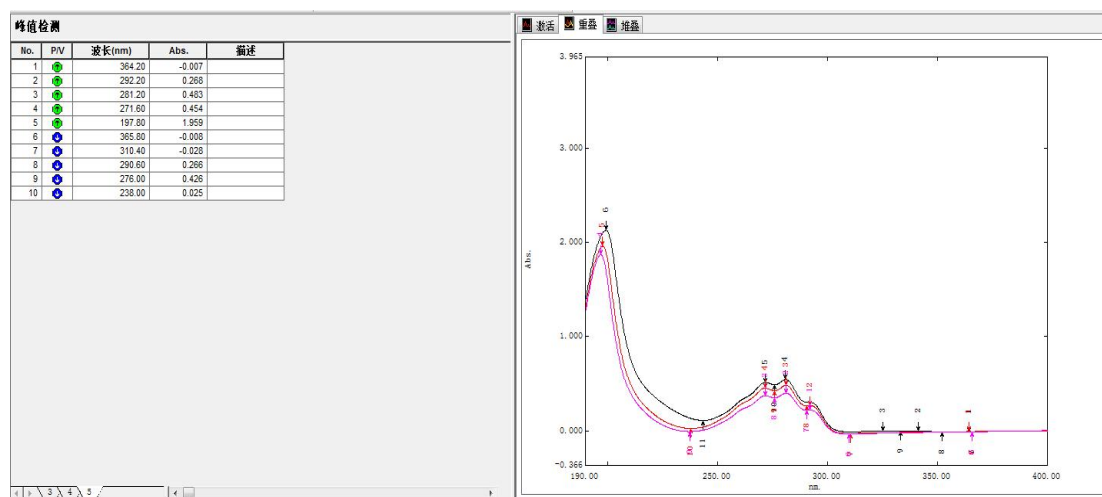


图 5 麦角甾醇标准品在不同溶剂中的全波长扫描图

3.1.4.2 提取溶剂的选择及确定

麦角甾醇可溶于有机溶剂中，本试验选择几种毒性小，对环境污染小的常用有机试剂，甲醇、无水乙醇、95%乙醇。

称取10mg麦角甾醇标准品分别加入等体积的甲醇、无水乙醇、95%乙醇，比较其溶解速率，无水乙醇 \geq 95%乙醇 $>$ 甲醇，综合考虑选择95%乙醇作为麦角甾醇标准品的溶剂。

取同一批次样品（20240416批次）3份，各称取1.0 g，分别用50 mL甲醇、50 mL无水乙醇、50 mL95%乙醇提取，对照品用相应的溶剂溶解，在相同检测条件下，考察不同浸提时间，样品中麦角甾醇的含量，结果见表15。

表15 不同溶剂提取不同时间样品中麦角甾醇含量（单位：mg/kg）

溶剂 超声时间	甲醇		无水乙醇		95%乙醇	
	峰面积	含量	峰面积	含量	峰面积	含量
15min	397.4	600.7	374.4	615.1	354.2	610.6
25min	420.4	623.4	389.7	640.3	380.3	654.8
35min	450.0	673.7	404.8	666.9	399.9	695.2
45min	469.3	716.3	413.0	688.4	416.5	719.2
55min	490.2	722.8	418.4	695.9	432.8	726.3

由以上表格结果知：同批次样品分别用甲醇、无水乙醇、95%乙醇做提取溶

剂,无水乙醇提取样品中麦角甾醇的效果较差;用甲醇和95%乙醇提取样品中麦角甾醇其含量变化不明显,提取效果无显著差异,但95%乙醇相较于甲醇价格更为低廉,对环境污染低,更环保,且对人体健康伤害更小。

综合考虑,本标准方法采用95%乙醇为样品的提取溶剂。

3.1.4.3 提取时间的选择及确定

由表格15可看出,随着浸提时间的增加,样品中浸提出的麦角甾醇的含量逐渐升高,但当浸提时间增加到一定时间45min和55min,麦角甾醇的含量增加不明显。

综合考虑,选择浸提时间为45min为宜。

3.1.4.4 样品称样量的选择

分别称取0.2g、0.5g、1.0g、2.0g样品,于50mL容量瓶,用95%乙醇超声提取45min后,定容,用0.22 μm滤膜过滤,用高效液相色谱法进行分析,检测结果见表16。

表16 不同称量量测定麦角甾醇的含量(单位:mg/kg)

称量量	峰面积	含量	均值
0.2088	74.0	690.2	704.5
0.2089	76.6	714.1	
0.2092	76.2	709.3	
0.5018	179.1	695.1	699.1
0.5012	181.3	704.5	
0.5006	179.4	697.9	
1.0119	361.1	695.0	705.2
1.0021	366.8	712.8	
1.0105	367.3	707.9	
2.0025	714.3	694.7	701.0
2.0024	728.6	708.6	
2.0108	722.4	699.6	

由表16结果知,在0.2g~2.0g范围内称取不同重量的样品,用50mL提取液提取,测麦角甾醇含量,检测结果经统计软件分析 $p \leq 0.1$,因此所选择称量量对样品中麦角甾醇浸提效果无显著差异。

综合考虑,本标准选择称量量为1g,置于50mL容量瓶中用95%乙醇浸提。

3.1.4.5 方法的确立

高效液相色谱法

色谱柱: C18 (250mm×4.6mm, 5μm)

流动相: 甲醇, 色谱纯

流速：1mL/min

进样量：20 μ L

波长：281 nm

等度洗脱

麦角甾醇标准溶液的配制：精密称取 10mg 麦角甾醇标准样品，用 95%乙醇溶解并稀释制成 100 μ g/mL 标准储备溶液（储存条件：存放于 0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C冰箱中）。根据实验需要再用 95%乙醇稀释成适合浓度的标准工作溶液（储存条件：0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C避光放置，建议现配现用）。

样品溶液的配制：精密称取1g（精确至0.0001g）样品，置于50 mL容量瓶中，加入适量95%乙醇，用超声清洗器超声提取45min，冷却至室温后，用95%乙醇稀释至刻度，摇匀后静置，取上清液用0.22 μ m微孔滤膜过滤，滤液上机待测。

3.1.5 方法评价

任何一种分析测定方法，根据其使用的对象和要求，都应有相应测定方法的评价指标。一般常用的分析评价指标包括：精密度、检测限、定量限、线性范围、重复性、回收率等；测定方法的这些指标可以作为对分析测定方法的评价尺度，也可以作为建立新的测定方法的实验研究依据。

本研究从精密度、检测限、线性范围、重现性、加标回收等方面进行了较详细的研究。

3.1.5.1 线性关系

分析方法的线性是在给定范围内获取与样品中供试物浓度成正比的试验结果的能力。换句话说，就是供试物浓度的变化与试验结果(或测得的响应信号)成线性关系。

所谓线性范围是指利用一种方法取得精密度、准确度均符合要求的试验结果，而且成线性的供试物浓度的变化范围。

线性范围的确定可用作图法(响应值 Y / 浓度 X)或计算回归方程($Y=a+bX$)来研究建立。

取标准储备液，用95%乙醇溶液稀释，得到浓度为0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、2 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL的系列标准工作液，以标准溶液浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

以下的 Y 值为各离子峰面积，X 值为检测浓度(μ g/mL)，得到标准曲线如下图 6，麦角甾醇在 0.5~40 μ g/ml 的范围内呈优异线性关系， $R^2=0.9992$ 。

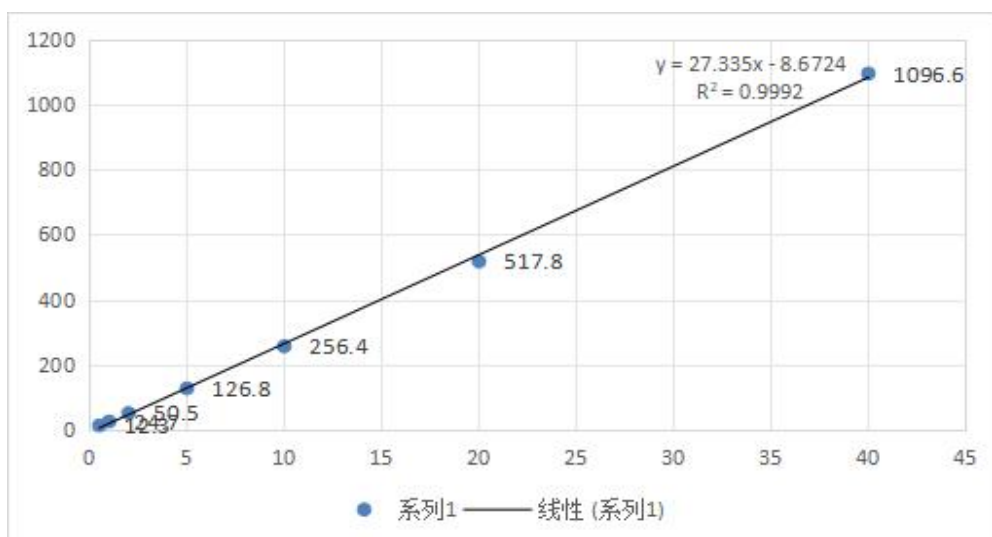


图 6 麦角甾醇线性关系

3.1.5.2 方法检出限和定量限

方法标准中样品能检出的被测组分的最低浓度（量）一般称为方法检测限。

依据 GB/T 27417-2017，信噪比（S/N）3:1 时的浓度，认为是检出限；信噪比（S/N）10:1 或 3 倍检出限时浓度为定量限。依据 GB/T 35655-2017，线性范围下线为定量限。

标液配制：精密称取麦角甾醇标准品 10.4mg，置于 100mL 容量瓶中，加入适量 95%乙醇，溶解定容至刻度。从中吸取 5mL 于 25mL 容量瓶中，用 95%乙醇定容至刻度，即得。

样品1测定：准确称取空白基质1.0 g，精确到0.0001 g，置于100 mL容量瓶中，加入标液0.5ml，加入适量95%乙醇，置于超声波清洗机中超声提取45 min，取出后用95%乙醇定容至刻度，摇匀。取适量样液离心，上清液经0.22 μm滤膜过滤，滤液供高效液相色谱分析。检测结果见表13。

样品2测定：准确称取空白基质1.0 g，精确到0.0001 g，置于100 mL容量瓶中，加入标液1.4mL，加入适量95%乙醇，置于超声波清洗机中超声提取45 min，取出后用95%乙醇定容至刻度，摇匀。取适量样液离心，上清液经0.22 μm滤膜过滤，滤液供高效液相色谱分析。检测结果见表13。

样品3测定：准确称取空白基质 1.0 g，精确到 0.0001 g，置于 100 mL 容量瓶中，加入标液 0.7mL，加入适量 95%乙醇，置于超声波清洗机中超声提取 45 min，取出后用 95%乙醇定容至刻度，摇匀。取适量样液离心，上清液经 0.22 μm 滤膜过滤，滤液供高效液相色谱分析。检测结果见表 17。

表 17 检出限和定量限

样品	保留时间	峰面积	信噪比 (S/N)	样品浓度 (μg/mL)

标液	13.467	569.7	294.4	20.80
样品 1	/	/	/	0.10
样品 2	13.471	16.0	9.5	0.29
样品 3	13.484	5.7	3.8	0.15

由以上表内结果知，方法的检出限为：0.15 $\mu\text{g/mL}$ ，折算样品检出限为 7.5 mg/kg 。定量限：0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，折算样品定量限为 25 mg/kg 。

3.1.5.3 精密度

精密度是指在规定的测试条件下，同一个均匀供试品经多次取样测定所得结果之间接近的程度。精密度一般用相对标准偏差（RSD）表示： $\text{RSD} = \text{标准偏差} / \text{平均值} * 100\%$ 。

标准品储备液：精密称取麦角甾醇标准品 10.20 mg ，置于 100 mL 容量瓶中，加入适量 95%乙醇溶解并定容至刻度，即得。

标准品浓度 1：精密移取麦角甾醇标准品储备液 5 mL 于 50 mL 容量瓶中，用 95%乙醇定容至刻度，得到浓度为 10.2 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

标准品浓度 2：精密移取麦角甾醇标准品母液 5 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 95%乙醇定容至刻度，得到浓度为 20.4 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

标准品浓度 3：精密移取麦角甾醇标准品母液 7.5 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 95%乙醇定容至刻度，得到浓度为 30.6 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液。

对上述浓度的标准溶液，各进行 6 次试验测定，峰面积结果见表 18。

表 18 精密度结果

浓度 $\mu\text{g/mL}$	1	2	3	4	5	6	平均	S	RSD %
10.2	285.4	285.0	283.0	284.0	284.1	281.8	283.9	1.32	0.47
20.4	570.9	571.1	572.2	571.9	570.2	570.3	571.1	0.82	0.14
30.6	848.2	850.3	850.7	852.8	848.6	850.7	850.2	1.66	0.20

3.1.5.4 重复性

重复性指的是在同一实验室内，一小段时间内，由同一实验人员在相同的设备上进行分析。

标准品溶液 1：精密称取麦角甾醇标准品 10.40 mg ，置于 100 mL 容量瓶中用 95%乙醇溶解定容至刻度，精密移取 5 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 95%乙醇定容至刻度。

标准品溶液 2：精密称取麦角甾醇标准品 10.20 mg ，置于 100 mL 容量瓶中用 95%乙醇溶解定容至刻度，精密移取 5 mL 于 25 mL 容量瓶中，用 95%乙醇定

容至刻度。

样品溶液：精密称取 20240416 批样品 1g（精确至 0.0001g）样品，置 50 mL 容量瓶中，加入适量 95%乙醇，超声提取 45min，冷却至室温后，用 95%乙醇稀释至刻度，摇匀后静置，取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，取续滤液即得。同法制备 6 份样品。

取上述标准品溶液和样品溶液，分别进行测定，检测结果见表 19。

表 19 重复性

样品	浓度 (mg/mL)	保留时间	峰面积	含量
标准品 1-1	0.0208	13.501	570.8	/
标准品 1-2		13.493	570.1	
标准品 1-3		13.524	568.0	
标准品 2-1	0.0204	13.522	533.5	
标准品 2-2		13.534	532.8	
标准品 2-3		13.540	529.2	
	重量 (g)	/	/	含量 (mg/kg)
样品 1	1.0563	13.552	399.1	706.63
样品 2	1.0561	13.551	395.1	699.68
样品 3	1.0512	13.558	385.2	685.33
样品 4	1.0616	13.564	398.4	701.87
样品 5	1.0493	13.558	393.2	700.83
样品 6	1.0609	13.554	398.6	702.68
RSD%	/	/	/	1.05

3.1.5.5 绝对差值

为了进一步研究精密度试验，以不同人员对不同样品进行一系列平行测试。在重复性条件下进行二次独立测定，计算其结果的绝对差值。

不同实验人员分别称取同一批次样品 6 份，每份样品各 1g(精确到 0.0001g)，分别置于 50 mL 容量瓶中，用 95%乙醇溶液浸提 45min，用 95%乙醇定容，摇匀后静置，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，滤液待测，二次独立测定检测结果见表 20。

表 20 绝对差值

序号	D1/ (mg/kg)	D2/ (mg/kg)	平均值	D1 与 D2 差值	差值/平均值
1	685.2	701.7	693.5	16.5	2.38%
2	686.3	709.8	698.0	23.5	3.36%
3	686.6	708.8	697.7	22.2	3.18%
4	692.3	720.4	706.3	28.1	3.97%
5	666.9	674.5	670.7	7.6	1.13%
6	695.9	719.8	707.8	23.9	3.38%
7	672.3	701.4	686.8	29.0	4.23%
8	708.6	738.5	723.5	29.9	4.14%
9	685.1	711.5	698.3	26.4	3.78%

10	695.4	724.7	710.1	29.2	4.12%
11	654.7	718.6	686.6	63.9	9.31%
12	666.1	700.4	683.2	34.3	5.03%

由以上结果知,进行重复性条件下获得的二次独立测定的结果绝对差值最大值为9.61%。因此规定,在重复性条件下,利用本检测方法,获得的二次独立测试结果的绝对值不大于算术平均值的10%。

3.1.5.6 添加回收试验结果分析

为了验证方法的准确性和可靠性,我们对测定方法进行加标回收试验。试验结果见表21。

其中样品本底溶液:取 20240416 批次样品,精密称取 0.2g (精确至 0.0001g) 样品,置 50 mL 容量瓶中,加入适量 95%乙醇,超声提取 45min,冷却至室温后,用 95%乙醇稀释至刻度,摇匀后静置,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得。

标准品储备溶液:精密称取麦角甾醇标准品 10.70mg,置于 100mL 容量瓶中用 95%乙醇溶解定容至刻度。

添加 50%标准品溶液:称取 0.2g 样品于 50mL 容量瓶中,加入 5mL 标准品储备溶液,加入适量 95%乙醇,超声提取 45min,冷却至室温后,用 95%乙醇稀释至刻度,摇匀后静置,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得。同法配制 3 份。

添加 100%标准品溶液:称取 0.2g 样品于 50mL 容量瓶中,加入 10mL 标准品储备溶液,加入适量 95%乙醇,超声提取 45min,冷却至室温后,用 95%乙醇稀释至刻度,摇匀后静置,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得。同法配制 3 份。

添加 150%标准品溶液:称取 0.2g 样品于 50mL 容量瓶中,加入 15mL 标准品储备溶液,加入适量 95%乙醇,超声提取 45min,冷却至室温后,用 95%乙醇稀释至刻度,摇匀后静置,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤,取续滤液即得。同法配制 3 份。

表21 加标回收率

加标含量	峰面积	本底峰面积	扣除本底峰面积	测得含量 ($\mu\text{g/mL}$)	称量含量 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率 (%)
50%-1	415.4	116.2	299.2	10.6	10.7	99.07
50%-2	401.1	115.8	285.3	10.1		94.39
50%-3	405.6	116.4	289.2	10.3		96.26
100%-1	695.1	116.2	578.9	20.6	21.4	96.26
100%-2	693.1	115.9	577.2	20.5		95.79
100%-3	698.9	116.3	582.6	20.7		96.73

150%-1	993.3	115.7	877.6	31.2	32.1	97.20
150%-2	992.1	116.2	875.9	31.1		96.88
150%-3	985.8	116.3	869.5	30.9		96.26

从以上结果可以看出,样品回收率在不同添加量,不同样品中其回收率不同,回收率在 94.39%~99.07%之间,回收率总体情况满意。

综上所述,地顶孢霉培养物中麦角甾醇的检测方法为:高效液相色谱法,检测波长 281nm,浸提溶液为 95%乙醇;样品处理方法为:1g 样品,置于 50 mL 容量瓶中,加入适量 95%乙醇,用超声清洗器超声提取 45min。

由方法评价结果知,新建麦角甾醇检测方法,麦角甾醇在 0.5 μ g/mL~40 μ g/mL 的浓度范围内呈优异线性关系,精密度高,重复性好,样品加标回收率符合要求。

总之本标准建立的麦角甾醇检测方法简便、快捷、准确,适用于测定饲料添加剂地顶孢霉培养物中麦角甾醇的含量。

以上方法学研究结果所形成的麦角甾醇检测方法,进一步经 3 家第三方检测机构:安徽省食品药品检验研究院、安徽省公众检测研究院有限公司、安徽省产品质量监督检验研究院,对新建立的麦角甾醇的检测方法的线性、加标回收率、精密度等进行验证。

因此,该方法适用于行业标准《饲料添加剂 地顶孢霉培养物》麦角甾醇含量的测定。

3.3 方法验证

委托安徽省食品药品检验研究院、安徽省公众检测研究院有限公司、安徽省产品质量监督检验研究院三家单位进行第三方验证,详情见验证报告。下表 22 列出检出限、线性关系、精密度、加标回收率、变异系数结果。

另外,根据三家检测机构对 10 个饲料添加剂地顶孢霉培养物检测结果看,空白无干扰,样品出峰时间与标准物质出峰时间一致,且无杂质峰干扰。

表22 第三方验证结果

验证单位	定量限	线性关系	精密度 (RSD%)	加标回收率 (%)
安徽省食品药品检验研究院	25mg/kg	R ² =0.9998	2.2~3.9	95.6~98.1
安徽省公众检测研究院有限公司	25mg/kg	R ² =0.9999	0.39~0.92	98.8~99.7
安徽省产品质量监督检验研究院	25mg/kg	R ² =0.9995	1.15~3.38	90.6~101.4

3.2 预期的经济效益、社会效益和生态效益

2006 年 7 月地顶孢霉培养物获国家农业部饲料和饲料添加剂新产品证书[新饲证字(2006)04 号],首批适用于猪和鸡。2013 年中华人民共和国农业部公告第 2045 号发布,地顶孢霉培养物被列入《饲料添加剂目录(2013)》,归类“其他

类别”。2022 年经农业农村部批准地顶孢霉培养物适用范围扩大至泌乳奶牛上。目前地顶孢霉培养物可在家禽、家畜和奶牛养殖方面广泛应用。

在动物日粮中添加地顶孢霉培养物可显著提高养殖企业的经济效益，按照国内养殖规模，地顶孢霉培养物的市场需求有 300 多亿元，按照 1:3 的投入产出计算，可为养殖户增加上千亿的收入。

本标准的制定，将很好地适应我国饲料添加剂行业的发展形势，对规范和提高饲料添加剂地顶孢霉培养物产品质量，满足下游行业的需要将发挥积极的作用，同时对促使我国地顶孢霉培养物生产厂家参与国际竞争、促进产品的进出口贸易将发挥重要作用。

地顶孢霉培养物是虫草源真菌饲料添加剂，应用于饲料工业，可替代抗生素使用，将从饲料源头上确培养殖安全，实现畜禽产品健康化、绿色化。

本标准中新建立的检测方法，使用的试剂均为常见试剂，对环境污染小，对人体伤害小，同时可以降低企业的实验资金投入，以合理利用资源，科学技术成果，增强产品的安全性、通用性，提高经济效益、社会效益、生态效益，做到技术上先进，经济上合理。

4. 采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

本产品未查到国际标准化组织和其他国家或地区的相关标准。

5. 与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系

在本标准的制定过程中严格遵守国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准，与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调性原则。

6. 重大分歧意见的处理经过和依据

无重大分歧意见。

7. 贯彻农业行业标准的要求和措施建议

本标准颁布以后，推荐饲料添加剂地顶孢霉培养物的相关管理要求符合本产品标准。本标准为首次制定，建议给予市场现有产品一定的过渡期，标准发布之日起一年后正式实施。

8. 涉及专利相关说明

无。

9. 废止现行有关标准的建议

无。

10. 农业行业标准所涉及的产品、过程或者服务目录

本文件适用于农业农村部公告《饲料添加剂品种目录》中规定的经固态发酵、干燥、粉碎等工艺制得的饲料添加剂地顶孢霉培养物。

11. 其他应予说明的事项

无。

参考文献

- [1] GB 13078 饲料卫生标准
- [2] NY/T 1444-2007 微生物饲料添加剂技术通则
- [3] GB/T 23181-2008 微生物饲料添加剂通用要求
- [4] GB/T 5917.1 饲料粉碎粒度测定 两层筛筛分法
- [5] GB/T 6435 饲料中水分的测定
- [6] GB 10648 饲料标签
- [7] GB/T 13079 饲料中总砷的测定
- [8] GB/T 13080 饲料中铅的测定 原子吸收光谱法
- [9] GB/T 13081 饲料中汞的测定
- [10] GB/T 13082 饲料中镉的测定方法
- [11] GB/T 13091 饲料中沙门氏菌的测定
- [12] GB/T 13093 饲料中细菌总数的测定
- [13] NY/T 2116 《虫草制品中虫草素和腺苷的测定 高效液相色谱法》
- [14] GB/T 30956 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
- [15] NY/T 2071 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