

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4681—2025

代替农业部 1486 号公告—6—2010

饲料中6种雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱-质谱法

Determination of six resorcylic acid lactones in feeds—
Gas chromatography-mass spectrometry

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



前 言

本文件按照 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》的规定起草。

本文件代替农业部 1486 号公告—6—2010《饲料中雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱-质谱法》，与农业部 1486 号公告—6—2010 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

农业部 1486 号公告—6—2010 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了范围(见第 1 章，农业部 1486 号公告—6—2010 的第 1 章)；
- b) 增加了免疫亲和净化(见第 4 章)；
- c) 增加了资料性附录(见附录 A)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本文件起草单位：中国农业大学。

本文件主要起草人：陈义强、程林丽、罗荪琳、刘颖、蒋慧。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2010 年首次发布的为农业部 1486 号公告—6—2010；

——本次为第一次修订。



饲料中 6 种雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱-质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中 6 种雷琐酸内酯类化合物的气相色谱-质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉烯酮、 α -玉米赤霉烯醇和 β -玉米赤霉烯醇的测定。

本文件 6 种雷琐酸内酯类化合物的检测限为 $2.0 \mu\text{g/kg}$, 定量限为 $5.0 \mu\text{g/kg}$ 。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 免疫亲和净化 气相色谱-质谱法(方法一)

4.1 原理

试样中的待测物用乙腈溶液提取, 经免疫亲和柱净化, 衍生化后用气相色谱-质谱联用仪检测, 基质匹配标准溶液校准, 外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定, 仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水: GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.2 甲醇: 色谱级。

4.2.3 乙腈: 色谱级。

4.2.4 甲苯: 色谱级。

4.2.5 乙腈溶液: 准确量取 80 mL 乙腈(4.2.3)和 20 mL 水, 混匀。

4.2.6 磷酸盐缓冲液(pH 7.0): 称取 8.0 g 氯化钠、1.44 g 磷酸氢二钠、0.24 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾, 用 800 mL 纯水溶解, 然后用浓盐酸调节 pH 至 7.0, 用水定容至 1 000 mL, 混匀。

4.2.7 衍生化试剂: N,O-双三甲基硅烷基-三氟乙酸胺(BSTFA)+三甲基氯硅烷(TMCS)= 99+1。

4.2.8 混合标准储备溶液($100 \mu\text{g/mL}$): 准确称取玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇和玉米赤霉烯酮各 10 mg(精确至 0.01 mg), 分别用甲醇(4.2.2)溶解, 定量转移至同一 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容。标准品信息见附录 A, 混合标准储备溶液于 -18°C 以下保存, 有效期 3 个月。

4.2.9 混合标准中间液($5 \mu\text{g/mL}$): 准确移取混合标准储备溶液(4.2.8)1 mL 于 20 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释、定容, 混匀。 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存, 有效期 1 个月。

4.2.10 混合标准系列溶液: 准确移取混合标准中间溶液(4.2.9)适量, 用甲醇稀释成 2 ng/mL 、 10 ng/mL 、 20 ng/mL 、 50 ng/mL 、 100 ng/mL 、 500 ng/mL 和 $1\,000 \text{ ng/mL}$ 的混合标准系列溶液。 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 保存, 有效期 1 周。

4.2.11 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱:柱容量为 1 500 ng。

4.3 仪器设备

4.3.1 气相色谱-质谱联用仪:配电子轰击离子源(EI)。

4.3.2 天平:精度 0.01 g 和 0.01 mg。

4.3.3 pH 计:精度 ± 0.1 。

4.3.4 涡旋混合器。

4.3.5 电热恒温干燥箱:精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

4.3.6 振荡仪。

4.3.7 离心机,转速不低于 8 000 r/min。

4.3.8 氮吹仪。

4.3.9 固相萃取装置。

4.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入密闭容器中,备用。选取与待测样品类型相同,均匀一致,且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品,作为基质空白样品。

4.5 测定步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。准确称取 5 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中,加入 1 g 氯化钠,准确加入 20 mL 乙腈溶液(4.2.5),200 r/min 振荡 30 min,8 000 r/min 离心 10 min,准确移取 2 mL 上清液,加入 28 mL 磷酸盐缓冲液(4.2.6),混匀,备用。

4.5.2 净化

将备用液(4.5.1)全部过免疫亲和柱(4.2.11),控制流速 1 滴/s $\sim$ 2 滴/s,待溶液全部流出后,用 10 mL 水淋洗亲和柱,弃去全部流出液。准确加入 3 mL 甲醇(4.2.2)洗脱,流速约为 1 滴/s,收集洗脱液于 5 mL 具塞玻璃试管中,50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干,待衍生。

4.5.3 衍生化

将 200 μL 衍生化试剂(4.2.7)加入具塞玻璃试管(4.5.2),涡旋混合,密封,60 $^{\circ}\text{C}$ 衍生 15 min,冷却至室温后,准确加入 800 μL 甲苯(4.2.4)混匀,待测。

4.5.4 基质匹配标准系列溶液的制备

称取 7 份基质空白试样各 5 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,按 4.5.1 和 4.5.2 处理。分别加入混合标准系列溶液(4.2.10)1 mL 溶解残渣,涡旋混合,配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 和 1 000 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液,现配现用。50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干,按 4.5.3 衍生,待测。

4.5.5 测定

4.5.5.1 气相色谱参考条件

气相色谱参考条件如下:

- 色谱柱:DB-5MS 毛细管柱,长度:30 m,内径:0.25 mm,膜厚:0.25 μm ,或性能相当者;
- 载气:氮气;
- 载气流速:1.0 mL/min;
- 进样口温度:250 $^{\circ}\text{C}$;
- 进样方式:不分流;
- 进样量:2 μL ;
- 升温程序:初始温度 120 $^{\circ}\text{C}$,以 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速度升至 280 $^{\circ}\text{C}$,保持 5.2 min。

4.5.5.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电子轰击电离(EI)；
- b) 电子轰击能：70 eV；
- c) 离子源温度：230 ℃；
- d) 四级杆温度：150 ℃；
- e) 传输线温度：250 ℃；
- f) 溶剂延迟：5 min；
- g) 采集方式：选择离子检测(SIM)，间隔 0.3 sec。

6 种待测物的定性离子和定量离子见表 1。

表 1 6 种待测物的定性离子和定量离子

待测物名称	定性离子(m/z)	定量离子(m/z)
玉米赤霉酮	449,450,335,307	307
α-玉米赤霉醇	523,433,335,307	307
β-玉米赤霉醇	523,433,335,307	307
玉米赤霉烯酮	462,429,333,305	333
α-玉米赤霉烯醇	536,431,333,305	305
β-玉米赤霉烯醇	536,431,333,305	305

4.5.5.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准系列溶液(4.5.4)和试样溶液(4.5.3)上机测定。基质匹配标准系列溶液中 6 种待测物的定量离子色谱图见附录 B。

4.5.5.4 定性

在相同试验条件下，试样中待测物的保留时间与基质匹配标准溶液(质量浓度相当)相应组分的保留时间一致，其相对偏差在 1%之内，且试样中待测物定性离子的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配标准溶液中对应的定性离子的相对离子丰度进行比较，若偏差不超过表 2 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度，%	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差，%	±20	±25	±30	±50

4.5.5.5 定量

以基质匹配标准溶液的质量浓度为横坐标，待测物定量离子色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应降低 4.5.1 中移取的上清液体积，并按 4.5.2~4.5.5 重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的峰面积与基质匹配标准溶液的峰面积相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中待测物的含量以其质量分数 w_i 表示，单位为毫克每千克(mg/kg)，多点校准按公式(1)计算；单点校准按公式(2)计算。

$$w_i = \frac{c_i \times V_0 \times V_1}{m \times V_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- c_i ——试样中待测物色谱峰面积对应质量浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；
- V_0 ——乙腈提取液体积的数值，单位为毫升(mL)；
- V_1 ——衍生化试剂与甲苯体积的数值，单位为毫升(mL)；
- m ——试样质量的数值，单位为克(g)；
- V_2 ——净化移取上清液体积的数值，单位为毫升(mL)；

1 000——单位换算系数。

$$w_i = \frac{A \times c_s \times V_0 \times V_1}{A_s \times m \times V_2 \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样中待测组分的峰面积；

c_s ——标准工作液浓度的数值，单位为纳克每毫升(ng/mL)；

A_s ——标准工作液峰面积。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 3 位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下，2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

5 液液分配萃取 气相色谱-质谱法(方法二)

5.1 原理

试样中的待测物用甲醇提取、浓缩至干后用乙醚溶解，用乙醚-碳酸钠溶液液液分配除去水溶性杂质，再次浓缩后用乙腈溶解，用乙腈-正己烷液液分配除去非极性杂质，经 HLB 固相萃取柱进一步净化，衍生化后，用气相色谱-质谱检测，外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中规定的二级水。

5.2.1 甲醇：色谱级。

5.2.2 乙腈：色谱级。

5.2.3 正己烷。

5.2.4 乙醚。

5.2.5 无水碳酸钠。

5.2.6 无水硫酸钠。

5.2.7 衍生化试剂：N,O-双三甲基硅烷基-三氟乙酸胺(BSTFA)+三甲基氯硅烷(TMCS)= 99+1。

5.2.8 HLB 固相萃取柱：规格为 60 mg。

5.2.9 0.1%碳酸钠溶液：称取 0.1 g 无水碳酸钠，加水溶解定容至 100 mL。

5.2.10 混合标准储备溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)：混合标准储备溶液(100 $\mu\text{g/mL}$)：准确称取玉米赤霉酮、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇和玉米赤霉烯酮各 10 mg(精确至 0.01 mg)，分别用甲醇(4.2.2)溶解，定量转移至同一 100 mL 容量瓶中，用甲醇定容。标准品信息见附录 A，混合标准储备溶液于-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存，有效期 3 个月。

5.2.11 混合标准中间溶液(1 $\mu\text{g/mL}$)：取混合标准储备溶液(5.2.10)1 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释定容，2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 个月。

5.2.12 混合标准系列溶液：取适量混合标准中间溶液(5.2.11)，用甲醇稀释至 0.001 $\mu\text{g/mL}$ 、0.01 $\mu\text{g/mL}$ 、0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准系列溶液。2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存 1 周。

5.3 仪器

5.3.1 气相色谱-质谱联用仪：配电子轰击离子源(EI)。

5.3.2 天平：精度 0.01 g 和 0.01 mg。

5.3.3 pH 计：精度 ± 0.1 。

5.3.4 涡旋混合器。

5.3.5 电热恒温干燥箱：精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.6 振荡仪。

5.3.7 离心机:转速不低于 8 000 r/min。

5.3.8 氮吹仪。

5.3.9 固相萃取装置。

5.3.10 旋转蒸发仪。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入密闭容器中,备用。选取与待测样品类型相同,均匀一致,且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品,作为基质空白样品。

5.5 测定步骤

5.5.1 提取

称取 5 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 离心管中,加 20 mL 甲醇(5.2.1),涡动 1 min,3 600 r/min 离心 5 min,分离上清液至鸡心瓶中。下层残渣用 20 mL 甲醇(5.2.1)重复提取 1 次,合并 2 次提取液。

5.5.2 净化

将上述提取液于 50 °C 减压浓缩至干,加 20 mL 乙醚,涡动 30 s,转移至 50 mL 离心管中,加 5 mL 0.1%碳酸钠溶液(5.2.5),轻摇数下,3 800 r/min 离心 5 min,弃下层水相。再加 5 mL 0.1%碳酸钠溶液(5.2.5)重复操作一次,合并有机相。有机相中加 5 g 无水硫酸钠,300 r/min 振荡 10 min,3 500 r/min 离心 5 min。转移上清液至鸡心瓶中,35 °C 减压浓缩至干,准确移取 1 mL 乙腈溶解。准确移取 0.1 mL 于试管中,准确移取 0.9 mL 乙腈稀释,加 0.5 mL 正己烷,手摇混合,静置 1 min,弃上层正己烷。下层中再加 0.5 mL 正己烷重复操作一次,充分除尽正己烷层后,50 °C 氮气吹干。残渣加 200 μ L 乙腈溶解,加 800 μ L 水稀释。备用。

将 HLB 固相萃取柱依次用 2 mL 乙腈和 2 mL 水预洗,将上述备用液过柱,5 mL 水淋洗,抽真空 1 min。4 mL 乙腈洗脱,备用液过柱的流速和洗脱液的流速均控制在 1 mL/min 以内。50 °C 氮气吹干,供衍生化用。

准确移取 500 μ L 混合物标准系列溶液于试管中,50 °C 氮气吹干,供衍生化用。

5.5.3 衍生化

分别加衍生化试剂 100 μ L 于上述氮气吹干后的各试管中,涡动溶解,60 °C 衍生化 15 min,冷却至室温后供气相色谱-质谱测定。

5.5.4 测定

5.5.4.1 气相色谱参考条件

气相色谱参考条件如下:

- 气相色谱柱:DB-5MS 柱,长 30 m,内径 0.25 mm,粒径 0.25 μ m;
- 进样口温度:250 °C;
- 柱温程序:起始 120 °C,以 15 °C/min 速度升至 280 °C,保持 10 min;
- 进样量:2 μ L,不分流;
- 载气:氮气;
- 载气流速:1.0 mL/min。

5.5.4.2 质谱条件

质谱参考条件如下:

- 电离方式:电子轰击离子源(EI);
- 电子轰击能:70 eV;
- 离子源温度:230 °C;
- 四极杆温度:150 °C;
- 溶剂延迟:7 min;
- 检测模式:选择离子检测。

6 种雷琐酸内酯类化合物的定性离子和定量离子见表 3。

表 1 雷琐酸内酯类化合物的定性离子和定量离子

化合物名称	定性离子, m/z	定量离子, m/z
玉米赤霉酮	449, 450, 335, 307	449
玉米赤霉烯酮	462, 429, 333, 305	333
α-玉米赤霉醇	523, 433, 335, 307	433
β-玉米赤霉醇	523, 433, 335, 307	433
α-玉米赤霉稀醇	536, 431, 333, 305	305
β-玉米赤霉稀醇	536, 431, 333, 305	305

5.5.4.3 定性

在相同试验条件下,根据试样溶液中雷琐酸内酯类化合物的含量,选择峰面积相近的标准溶液和试样溶液等体积参插进样。用保留时间与质谱选择离子共同定性。试样中待测物的保留时间与混合标准系列溶液(质量浓度相当)相应组分的保留时间一致,其相对偏差在 1%之内,且与其选择离子的相对丰度的差异不大于 20%,则可判定为样品中存在对应的待测物。

5.5.4.4 定量

以混合系列标准溶液的质量浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中待测物的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围,应按 5.5.1~5.5.3 重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的峰面积与标准溶液的峰面积相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中雷琐酸内酯类化合物的含量 w_i 以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),多点校准按公式(3)计算;单点校准按公式(4)计算。

$$w_i = \frac{c_i \times V}{m} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- c_i ——试样液中对应的雷琐酸内酯类化合物浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——上机前最终定容体积的数值,单位为毫升(mL);
- m ——样品质量的数值,单位为克(g);
- n ——稀释倍数。

$$w_i = \frac{A \times c_s \times V}{A_s \times m} \times n \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- A ——试样溶液中雷琐酸内酯类化合物的峰面积;
- A_s ——标准工作液中雷琐酸内酯类化合物的峰面积;
- c_s ——标准工作液中雷琐酸内酯类化合物浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)。

5.7 精密度

在重复性条件下,2 次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 20%。

附 录 A
(资料性)

雷琐酸内酯类化合物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

雷琐酸内酯类化合物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号见表 A. 1。

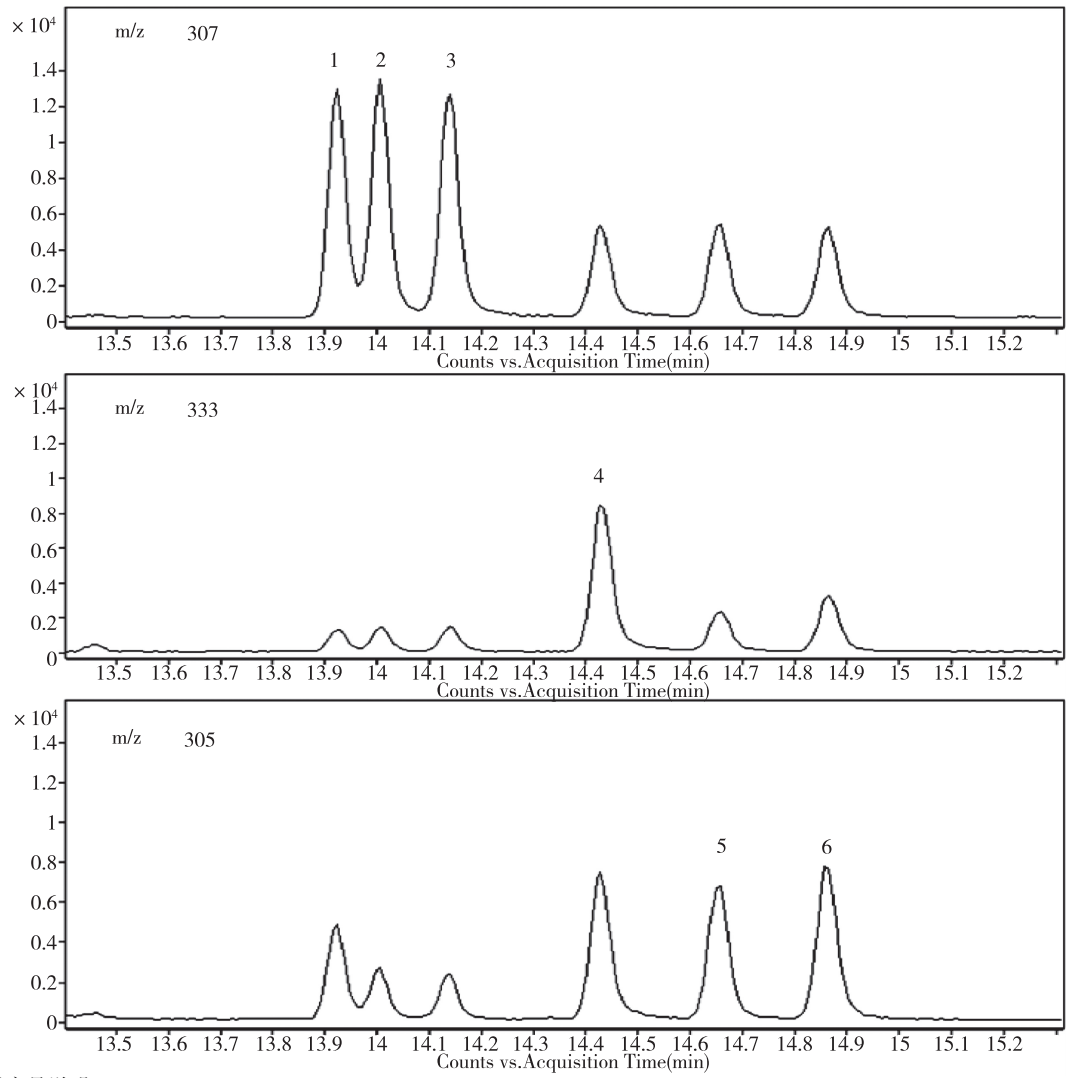
表 A. 1 雷琐酸内酯类化合物中英文通用名称、化学分子式和 CAS 号

中文通用名称	英文通用名称	化学分子式	CAS 号
玉米赤霉酮	Zearalanone	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	5975-78-0
α-玉米赤霉醇	Alpha-Zearalanol	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	26538-44-3
β-玉米赤霉醇	Beta-Zearalanol	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	42422-68-4
玉米赤霉烯酮	Zearalenone	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	17924-92-4
α-玉米赤霉烯醇	Alpha-Zearalenol	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	36455-72-8
β-玉米赤霉烯醇	Beta-Zearalenol	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	71030-11-0
注：以上标准物质纯度均为 99% 以上。			

附 录 B
(资料性)

雷琐酸内酯类化合物基质匹配标准溶液的定量离子色谱图

B.1 雷琐酸内酯类化合物基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见图 B.1。



标引序号说明：

- 1——玉米赤霉酮；
- 2—— α -玉米赤霉醇；
- 3—— β -玉米赤霉醇；
- 4——玉米赤霉烯酮；
- 5—— α -玉米赤霉烯醇；
- 6—— β -玉米赤霉烯醇。

图 B.1 雷琐酸内酯类化合物基质匹配标准溶液(50 ng/mL)的定量离子色谱图