



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—202×

代替GB/T 19540—2004、GB/T 28716—2012

饲料中玉米赤霉烯酮的测定

Determination of zearalenone in feeds

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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 GB/T 19540—2004《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》和 GB/T 28716—2012《饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》。与 GB/T 19540—2004 和 GB/T 28716—2012 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 更改了适用范围（见第1章，GB/T 19540—2004 和 GB/T 28716—2012 的第1章）。
- b) 删除了薄层色谱法和酶联免疫吸附测定法（见 GB/T 19540—2004）；
- c) 增加了液相色谱-串联质谱法（见第4章）；

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。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：上海市农业科学院、上海市兽药饲料检测所。

本文件主要起草人：韩铮、曹莹、赵志辉、聂冬霞、郭大凯、王欣艺、杨海锋。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2004年首次发布为 GB/T 19540—2004，2012年首次发布为 GB/T 28716—2012；
- 本次为第一次修订。

饲料中玉米赤霉烯酮的测定

1 范围

本文件描述了饲料中玉米赤霉烯酮的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱法。
本文件适用于植物性饲料原料、配合饲料、精料补充料和浓缩饲料中玉米赤霉烯酮的测定。
本文件的检出限为 2 µg/kg、定量限为 10 µg/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 液相色谱-串联质谱法（仲裁法）

4.1 原理

试样中的待测物用乙腈水溶液提取，提取液用磷酸盐缓冲溶液稀释，经免疫亲和柱净化，用液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配标准曲线校准，外标法定量。

4.2 试剂或材料

警示——玉米赤霉烯酮毒性很强，操作时注意避免接触皮肤和衣物，带上医用乳胶手套。各种有机试剂小心操作，取用应在通风橱中进行。

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.3 乙腈：色谱纯。

4.2.4 甲酸：色谱纯。

4.2.5 氯化钠。

4.2.6 氢氧化钠溶液（0.2 mol/L）：称取 8.0 g 氢氧化钠，用水溶解，转移至 1 000 mL 容量瓶中，定容，混匀。

4.2.7 80%乙腈溶液：量取 800 mL 乙腈（4.2.3）于 1 000 mL 容量瓶中，用水稀释、定容，混匀。

4.2.8 0.1%甲酸溶液：移取 1 mL 甲酸（4.2.4）于 1 000 mL 容量瓶中，用水稀释、定容，混匀。

4.2.9 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：称取 8.0 g 氯化钠、1.16 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，用水溶解稀释定容至 1 000 mL，用氢氧化钠溶液（4.2.6）调节 pH 至 7.4。

4.2.10 乙腈-0.1%甲酸溶液：量取 100 mL 乙腈（4.2.3）于 1 000 mL 容量瓶中，用 0.1%甲酸溶液（4.2.8）稀释、定容，混匀。

4.2.11 标准储备溶液（100 μg/mL）：称取玉米赤霉烯酮标准品（CAS 号：17924-92-4，纯度不低于 99.5%）10 mg（精确至 0.01 mg）于 100 mL 容量瓶中，用乙腈（4.2.3）溶解、定容，混匀。-18 ℃以下贮存，有效期 12 个月。

4.2.12 标准中间溶液（10 μg/mL）：准确移取 5 mL 标准储备溶液（4.2.11）于 50 mL 容量瓶中，用乙腈（4.2.3）稀释、定容，混匀。-18 ℃以下贮存，有效期 6 个月。

4.2.13 标准系列溶液：准确移取适量的标准中间溶液（4.2.12）于 10 mL 容量瓶中，用乙腈-0.1%甲酸溶液（4.2.10）配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的标准系列溶液。临用现配。

4.2.14 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱：柱容量≥1.5 μg，柱回收率≥80%（验证方法参见附录 A），或性能相当者。

4.2.15 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

4.3.2 电子天平：精度 0.01 g、0.000 01 g。

4.3.3 涡旋混合器。

4.3.4 超声波清洗器：功率≥250W。

4.3.5 离心机：转速≥10 000 r/min。

4.3.6 氮吹仪：温控范围 30 ℃~60 ℃。

4.3.7 固相萃取装置。

4.3.8 空气压力泵。

4.4 样品

按 GB/T 20195 规定制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.425 mm 孔径的试验筛，混合均匀，装入密闭容器中，备用。选取类型相同、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，作为空白样品。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样约 5.0 g（精确至 0.01 g），置于 50 mL 离心管中，准确加入 0.5 g 氯化钠（4.2.5）和 25 mL 80%乙腈溶液（4.2.7），涡旋混合 2 min，在 250W 的超声功率下提取 30 min（每 5 min 涡旋混合 1 次），10 000 r/min 离心 5 min，移取 5 mL 上清液于 50 mL 离心管中，加入 20 mL PBS（4.2.9），超声混匀，备用。

4.5.2 净化

将免疫亲和柱连接至固相萃取装置，将空气压力泵（4.3.8）与固相萃取装置连接。准确移取 5 mL 样品提取液（4.5.1），调节压力使溶液以不大于 2 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱，抽干。分别以 10 mL 纯水淋洗柱子两次（对颜色较重的样品，第一次改用 10 mL 10% 甲醇水溶液清洗柱子一次），保持流速不大于 2 mL/min~3 mL/min，并抽干。准确加入 1.5 mL 甲醇（4.2.2）洗脱，流速不大于 2 mL/min，收集洗脱液于 40 °C 氮气吹干，用 1 mL 乙腈-0.1% 甲酸溶液（4.2.10）溶解残渣，涡旋混匀，过滤膜（4.2.15），上机测定。

4.5.3 基质匹配标准系列溶液的配制

取基质空白样品，按 4.5.1 和 4.5.2 进行提取和净化处理，得到基质空白溶液。分别准确移取标准系列溶液（4.2.13）各 1 mL，于 40 °C 下氮气吹至近干，准确加入 1 mL 基质空白溶液，涡旋混匀。配制成质量浓度分别为 2 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液。临用现配。

4.5.4 测定

4.5.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C₁₈柱，柱长150 mm，内径2.1 mm，粒径1.8 μm，或性能相当者；
- 柱温：40 °C；
- 流速：0.4 mL/min；
- 进样量：3 μL；
- 流动相：A相为乙腈（4.2.3），B相为0.1%甲酸溶液（4.2.8），梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序

| 时间 (min) | A 相 (%) | B 相 (%) |
|----------|---------|---------|
| 0 | 10 | 90 |
| 4 | 90 | 10 |
| 5 | 90 | 10 |
| 5.1 | 10 | 90 |
| 8 | 10 | 90 |

4.5.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 电离模式：电喷雾电离，负离子模式（ESI⁻）；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 毛细管电压：3 kV；
- 离子源温度：150 °C；
- 雾化器温度：500 °C；

多反应监测（MRM）离子对及碰撞能量参考值见表2。

表2 玉米赤霉烯酮特征离子及参考质谱条件

| 被测物名称 | 母离子 <i>m/z</i> | 子离子 <i>m/z</i> | 锥孔电压 V | 碰撞能量 eV |
|-------|-------------------|-------------------|-----------|------------|
|-------|-------------------|-------------------|-----------|------------|

| | | | | |
|--------|-------|--------|----|----|
| 玉米赤霉烯酮 | 317.2 | 131.1 | 66 | 30 |
| | | 175.1* | | 24 |

*用于定量测定

4.5.4.3 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（4.5.3）和试样溶液（4.5.2）上机测定。基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见附录图B.1。

4.5.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与基质匹配标准系列溶液（浓度相当）中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。根据表2选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物监测离子对的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表3 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 |

4.5.4.5 定量

以基质匹配标准系列溶液中待测物的质量浓度为横坐标，定量离子色谱峰的面积作为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应大于 0.99。试样溶液中待测物的响应值应在标准曲线线性范围之内，若超出线性范围，应重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的质量浓度与基质匹配标准溶液的质量浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中玉米赤霉烯酮的含量以质量分数 w_1 计，数值以微克每千克 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 表示，多点校准按式 (1) 计算，单点校准按式 (2) 计算：

$$w_1 = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- ρ ——由基质匹配标准曲线查得试样溶液中待测物的质量浓度，单位纳克每毫升 (ng/mL)；
- V_1 ——试样提取溶液的体积，单位为毫升 (mL)；
- V_3 ——氮气吹干后加入复溶液的体积，单位为毫升 (mL)
- f ——试样稀释倍数；
- 1000——换算系数；
- V_2 ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升 (mL)；
- m ——试样质量，单位为克 (g)。

$$w_1 = \frac{A \times \rho_s \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

ρ_s ——基质匹配标准溶液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_1 ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——氮气吹干后加入复溶液的体积，单位为毫升（mL）；

1000——换算系数；

f ——试样稀释倍数；

A_s ——基质匹配标准溶液中待测物的色谱峰面积；

V_2 ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

4.7 精密度

在重复性条件下，两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%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样中的待测物经乙腈水溶液提取后，提取液用磷酸盐缓冲溶液稀释，用免疫亲和柱进行净化，高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5.2 试剂或材料

警示——玉米赤霉烯酮毒性很强，操作时注意避免接触皮肤和衣物，带上医用乳胶手套。各种有机试剂小心操作，取用应在通风橱中进行。

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2.2 乙腈：色谱纯。

5.2.3 甲醇：色谱纯。

5.2.4 氯化钠。

5.2.5 氢氧化钠溶液（0.2 mol/L）：称取 8.0 g 氢氧化钠，用水溶解，转移至 1 000 mL 容量瓶中，定容，混匀。

5.2.6 80%乙腈溶液：移取 800 mL 乙腈（5.2.2）于 1 000 mL 容量瓶中，用水稀释、定容，混匀。

5.2.7 磷酸盐缓冲溶液（PBS）：称取 8.0 g 氯化钠、1.16 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，用水溶解稀释定容至 1 000 mL，用氢氧化钠溶液（5.2.5）调节 pH 至 7.4。

5.2.8 流动相：量取 460 mL 乙腈（5.2.2）至 1 000 mL 容量瓶中，加入 460 mL 水和 80 mL 甲醇（5.2.3），混匀，备用。

5.2.9 标准储备溶液（50 $\mu\text{g/mL}$ ）：称取玉米赤霉烯酮标准品（CAS 号：17924-92-4，纯度不低于 99.5%）5 mg（精确至 0.01 mg）于 100 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）溶解、定容，混匀。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下贮存，有效期 12 个月。

5.2.10 标准中间溶液（5 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取 10 mL 标准储备溶液（5.2.9）于 100 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）稀释、定容，混匀。-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下贮存，有效期 6 个月。

GB/T ×××××-202×

5.2.11 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.2.10），用流动相（5.2.8）稀释成质量浓度分别为 20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL、1000 ng/mL 的标准工作液。临用现配。

5.2.12 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱：柱容量 $\geq 1.5 \mu\text{g}$ ，柱回收率 $\geq 80\%$ （验证方法参见附录 A），或性能相当者。

5.2.13 玻璃微纤维滤纸：无荧光特性。

5.2.14 微孔滤膜：0.22 μm ，有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配有荧光检测器。

5.3.2 电子天平：精度 0.01 g、0.000 01 g。

5.3.3 振荡器：振荡频率 $\geq 50 \text{ r/min}$ 。

5.3.4 氮吹仪：温控范围 30 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.3.5 高速均质器：转速 $\geq 18\ 000 \text{ r/min}$ 。

5.3.6 固相萃取装置。

5.3.7 空气压力泵。

5.4 样品

同 4.4。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 40 g（精确至 0.01 g）于 250 mL 具塞锥形瓶中，加入 4.0 g 氯化钠（5.2.4）及 100 mL 80%乙腈溶液（5.2.6），于振荡器（5.3.3）上振荡 60 min，或于高速均质器（5.3.5）均质 2 min 后，用定量滤纸过滤，准确移取 10 mL 滤液并加入 40 mL PBS（5.2.7）稀释，用玻璃纤维滤纸（5.2.13）过滤 1 次~2 次，至滤液澄清，备用。

5.5.2 净化

将免疫亲和柱连接至固相萃取装置，将空气压力泵（5.3.7）与固相萃取装置连接。准确移取 10 mL 样品提取液（5.5.1），调节压力使溶液以不大于 2 mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱，抽干。分别以 10 mL 纯水淋洗柱子两次（对颜色较重的样品，第一次改用 10 mL 10%甲醇水溶液清洗柱子一次），保持流速不大于 2 mL/min~3 mL/min，并抽干。准确加入 1.5 mL 甲醇（5.2.3）洗脱，流速不大于 2 mL/min，收集洗脱液于 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干，用 1 mL 流动相（5.2.8）溶解残渣，涡旋混匀，过滤膜（5.2.14），上机测定。

5.5.3 测定

5.5.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱： C_{18} 柱，柱长 150 mm，内径 4.6 mm，粒径 5 μm ，或性能相当者；

b) 流动相：甲醇（5.2.3）+水+乙腈（5.2.2）=46+8+46；

c) 流速：0.8 mL/min；

- d) 检测波长：激发波长 274 nm，发射波长 440 nm；
 e) 进样量：20 μL；
 f) 柱温：30 ℃。

5.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（5.2.11）和试样溶液（5.5.2）上机测定。玉米赤霉烯酮标准溶液的高效液相色谱图见附录图C.1。

5.5.3.3 定性

以保留时间定性，试样溶液中玉米赤霉烯酮的保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中玉米赤霉烯酮的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

5.5.3.4 定量

以玉米赤霉烯酮的质量浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应大于 0.99。试样溶液中玉米赤霉烯酮的质量浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中玉米赤霉烯酮的质量浓度与标准溶液的质量浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中玉米赤霉烯酮的含量以质量分数 w_1 计，数值以微克每千克（μg/kg）表示，多点校准按式（3）计算，单点校准按式（4）计算：

$$w_1 = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- ρ ——由标准曲线查得试样溶液中待测物的质量浓度，单位纳克每毫升（ng/mL）；
 V_1 ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
 V_3 ——氮气吹干后加入复溶液的体积，单位为毫升（mL）；
 1000——换算系数；
 f ——试样稀释倍数；
 V_2 ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
 m ——试样质量，单位为克（g）。

$$w_1 = \frac{A \times \rho_s \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times V_2 \times m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (4)$$

式中：

- A ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；
 ρ_s ——标准溶液中待测物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 V_1 ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；
 V_3 ——氮气吹干后加入复溶液的体积，单位为毫升（mL）；
 1000——换算系数；
 f ——试样稀释倍数；
 A_s ——标准溶液中待测物的色谱峰面积；

GB/T ×××××—202×

V_2 ——净化时所用试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下，获得的玉米赤霉烯酮的两次独立测试结果的绝对差值不大于其算术平均值的 20%。

附录 A

(规范性)

玉米赤霉烯酮免疫亲和柱质量验证方法

A.1 柱容量验证

A.1.1 在 5 mL 的 80%乙腈溶液-PBS (1:4, v:v) 中加入 9 000 ng 玉米赤霉烯酮标准品, 充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱, 每根柱的上样量为 1 mL。经上样、淋洗、洗脱, 收集洗脱液, 用氮气吹干至 1 mL, 用流动相定容至 1 mL, 用液相色谱仪分离测定玉米赤霉烯酮的含量。

A.1.2 结果判定: 玉米赤霉烯酮含量 $\geq 1\ 500$ ng, 为可使用商品。

A.2 柱回收率验证

A.2.1 在 5 mL 的 80%乙腈溶液-PBS (1:4, v:v) 中加入 9 000 ng 玉米赤霉烯酮标准品, 充分混匀。分别取同一批次 3 根免疫亲和柱, 每根柱的上样量为 1 mL。经上样、淋洗、洗脱, 收集洗脱液, 用氮气吹干至 1 mL, 用流动相定容至 1 mL, 用液相色谱仪分离测定玉米赤霉烯酮的含量。

A.2.2 结果判定: 柱回收率 $\geq 80\%$ ($RSD \leq 15\%$), 为可使用商品。

附录 B
(资料性)
玉米赤霉烯酮标准溶液的定量离子色谱图

玉米赤霉烯酮标准溶液 (50 ng/mL) 的定量离子色谱图见图 B.1。

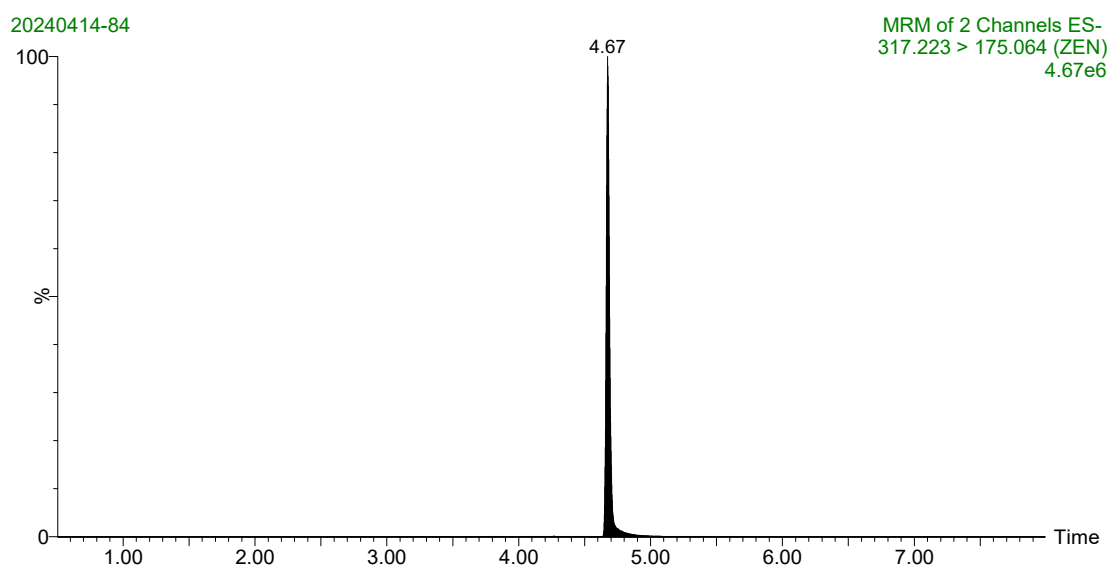


图 B.1 玉米赤霉烯酮标准溶液 (50 ng/mL) 定量离子色谱图

附录 C
(资料性)

玉米赤霉烯酮标准溶液的高效液相色谱图

玉米赤霉烯酮标准溶液 (50 ng/mL) 的高效液相色谱图见图 C.1。

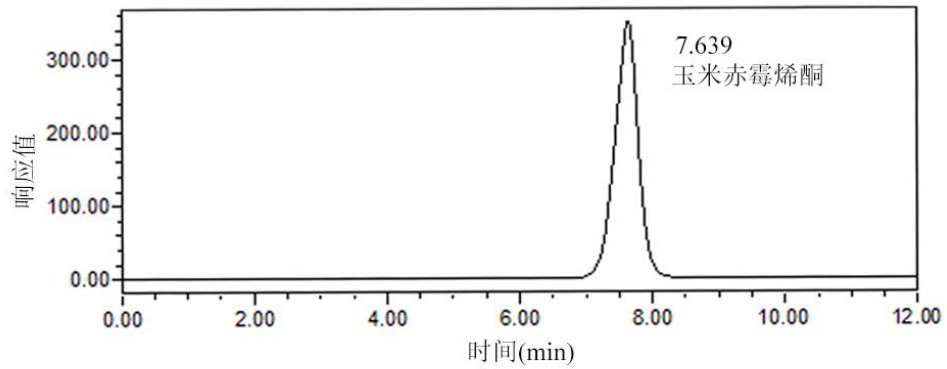


图 C.1 玉米赤霉烯酮标准溶液 (50 ng/mL) 的高效液相色谱图