

中华人民共和国国家标准
《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》

编制说明

(公开征求意见稿)

上海市农业科学院
上海市兽药饲料检测所

2024年8月

目 录

一、工作简况	1
(一) 任务来源	1
(二) 标准修订背景	1
(三) 工作过程	3
二、国家标准编制原则和主要技术内容确定的依据	6
(一) 标准编制原则	6
(二) 标准主要技术内容的确定	7
1 标准修订的目的和方法研制中必用的基础信息	7
2 液相色谱-串联质谱法的建立	8
2.1 质谱条件的确定	8
2.2 液相色谱条件的确定	11
2.3 氮吹温度的考察与确认	15
2.4 样品提取与净化条件的确定	15
2.5 标准溶液的稳定性	18
2.6 基质效应评价	19
2.7 方法性能考察	20
3 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法的验证	32
3.1 样品的提取与净化	32
3.2 液相色谱参考条件	32
3.3 标准曲线线性范围	32
3.4 检出限和定量限	33
3.5 准确度和精密度	35
4 本标准方法适用性考察	36
三、标准复核验证情况，技术经济论证，预期经济效果	38
四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况	38
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准	39
六、与有关法律、法规的关系	39
七、重大分歧意见的处理经过和依据	40
八、涉及专利的有关说明	40
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措施建议	40
十、其他应予说明的事项	40
参考文献	41

一、工作简况

（一） 任务来源

根据下达的 2023 年饲料工业国家标准复审修订计划项目，本标准修订项目的编号为 20233890-T-469，项目名称为《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》，项目承担单位为上海市农业科学院和上海市兽药饲料检测所，本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出并归口。

（二） 标准修订背景

饲料是人类的间接食品，饲料质量的好坏以及是否安全，直接影响了畜禽的正常发育和健康成长，以及生态环境的可持续发展和人类健康。当前饲料安全及畜产品安全问题已经引起全社会的关注。而饲料中存在的真菌毒素是饲料安全的最大隐患之一。玉米赤霉烯酮是一种重要真菌毒素，主要污染玉米、小麦等饲料原料及产品，其具有类雌激素作用，主要作用于生殖系统，可造成家禽和家畜的雌激素水平提高，导致动物急慢性中毒，引起动物繁殖机能异常甚至死亡。目前我国已在国家标准 GB 13078-2017《饲料卫生标准》中规定了饲料中玉米赤霉烯酮的限量标准，因此有必要系统制定饲料中玉米赤霉烯酮的国标检测方法，为饲料中玉米赤霉烯酮的检测和监管提供技术支持。

目前，国内有关饲料中玉米赤霉烯酮的测定方法主要包括 2 项国家标准、1 项行业标准、5 项地方标准和 1 项团体标准（表 1）。其中，农业标准 NY/T 2071-2011 和地方标准 DB22/T 1618-2012、DB37/T 4045. 2-2020 采用了液相色谱串联质谱法精确测定玉米赤霉烯酮。而目前国标方法 GB/T 19540-2004 中使用的薄层色谱法为半定量法，酶联免疫法也已经不适合当

前检测需求。GB/T 28716-2012 使用了高效液相色谱法，尚缺乏相关液相色谱串联质谱法检测玉米赤霉烯酮的国家标准。农业行业标准 NY/T 2071-2011 的适用范围为单一饲料、配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料，缺乏部分饲料原料以及精料补充料。因此需要进一步制定完善液相色谱串联质谱法检测玉米赤霉烯酮的国家标准。国外，有关饲料中玉米赤霉烯酮的测定方法标准详见表 2。国际标准方面，其中 ISO 的两个标准分别采用了荧光色谱法和高效液相色谱法。欧盟在最新的两个标准 EN 17194:2019 和 EN 16877:2016 中采用了液相色谱串联质谱法。

为提高饲料中玉米赤霉烯酮检测效率，满足我国饲料行业及企业的检测需要，亟需对现行国家标准《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》（GB/T 19540-2004）和《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》（GB/T 28716-2012）进行修订整合，新增液相色谱-串联质谱法，保留合并 GB/T 28716-2012 中的高效液相色谱法，删除 GB/T 19540-2004 中的薄层色谱法和酶联免疫吸附法，以此修订形成新的国家标准，进一步规范饲料中玉米赤霉烯酮的测定方法标准，提升检测效率，为饲料原料的开发利用、养殖动物营养和饲料配方研究及饲料产品质量控制提供准确、快速、可靠的国家标准方法，促进我国饲料工业和畜牧业的高质量发展。

表 1 国内饲料中玉米赤霉烯酮的测定标准方法

序号	标准编号	标准名称	检测方法
1	GB/T 19540-2004	饲料中玉米赤霉烯酮的测定	薄层色谱法；酶联免疫吸附法
2	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	免疫亲和柱净化 高效液相色谱法
3	NY/T 2071-2011	饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法	液相色谱-串联

序号	标准编号	标准名称	检测方法
			质谱法
4	DB32/T 4368-2022	饲料中玉米赤霉烯酮的测定 时间分辨荧光免疫层析定量法	时间分辨荧光免疫层析定量法
5	DB22/T 1618-2012	饲料中玉米赤霉烯酮的测定 液相色谱-质谱/质谱法	液相色谱-质谱/质谱法
6	DB42/T 808-2012	饲料中黄曲霉毒素 B ₁ 、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和桔霉素的测定 高效液相色谱法	高效液相色谱法
7	DB36/T 1026-2018	饲料中玉米赤霉烯酮的快速筛查 胶体金快速定量法	胶体金快速定量法
8	T/SDAA 0049-2021	饲料中黄曲霉毒素 B ₁ 、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素快速测定 上转发光法	上转发光法
9	DB37/T 4045.2-2020	饲草中主要农药残留及真菌毒素的测定 第 2 部分: 饲草中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的测定 液相色谱-串联质谱法	液相色谱-串联质谱法

表 2 国外饲料中玉米赤霉烯酮的测定标准方法

序号	标准编号	标准名称	检测方法
1	ISO 6870:2002	动物饲料.玉米赤霉烯酮含量的定性测定	荧光色谱法
2	ISO 17372:2008/Amd 1:2013	动物饲料.免疫亲和色谱柱和高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮	免疫亲和色谱柱和高效液相色谱法
3	EN 15792:2009	动物饲料 动物饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和和柱纯化-高效液相色谱荧光检测法	免疫亲和柱纯化高效液相色谱荧光检测法
4	EN 17194:2019	动物饲料: 取样和分析方法 - 原料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 B ₁ 、伏马毒素 B ₁ 和 B ₂ 、毒素 T-2 和 HT-2、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 的测定	液相色谱质谱法
5	EN 16877:2016	动物饲料:取样和分析方法测定 T-2 与 HT-2 毒素和玉米赤霉烯酮,脱氧雪腐镰刀菌烯醇	液相色谱质谱法
6	AOAC 976.22	玉米中玉米赤霉烯酮含量的测定	薄层色谱法
7	AOAC 985.18	玉米中 α -玉米赤霉烯醇和玉米赤霉烯酮含量的测定	液相色谱法
8	AOAC 994.01	玉米、小麦和饲料中玉米赤霉烯酮含量的测定	酶联免疫吸附法

(三) 工作过程

1 成立标准编制工作组

2023 年 12 月, 上海市农业科学院农产品质量标准和检测技术研究所

（简称上海农科院质标所）和上海市兽药饲料检测所接到国家标准修订任务后，成立了标准编制小组，落实了人员分工，详见表 3。

表 3 标准主要起草人员和任务分工

人 员	职 称	任务分工
韩铮	研究员	项目主持人，负责项目的全面工作
曹莹	正高级畜牧师	标准文本和编制说明编写和完善、方法验证
赵志辉	研究员	方案设计与标准文本修改
聂冬霞	研究员	检测方法研究、标准文本和编制说明编写
郭大凯	研究实习员	样品采集、样品检测、检测方法研究
王欣艺	研究实习员	样品采集、样品检测、检测方法研究、方法验证
杨海锋	高级实验师	标准文本修改

2 标准修订进展

2023 年 12 月~2024 年 1 月，标准编制小组查阅了国内外有关标准文献资料，同时调研国内主要饲料质检机构、饲料生产企业等标准方法的采用情况，制定了标准修订内容和技术路线草案。

2024 年 2 月，上海市农业科学院、上海市兽药饲料检测所在上海组织有关专家、主要起草人员召开标准修订项目启动会，确定标准修订的主要内容、技术路线、分工、完成时限等。

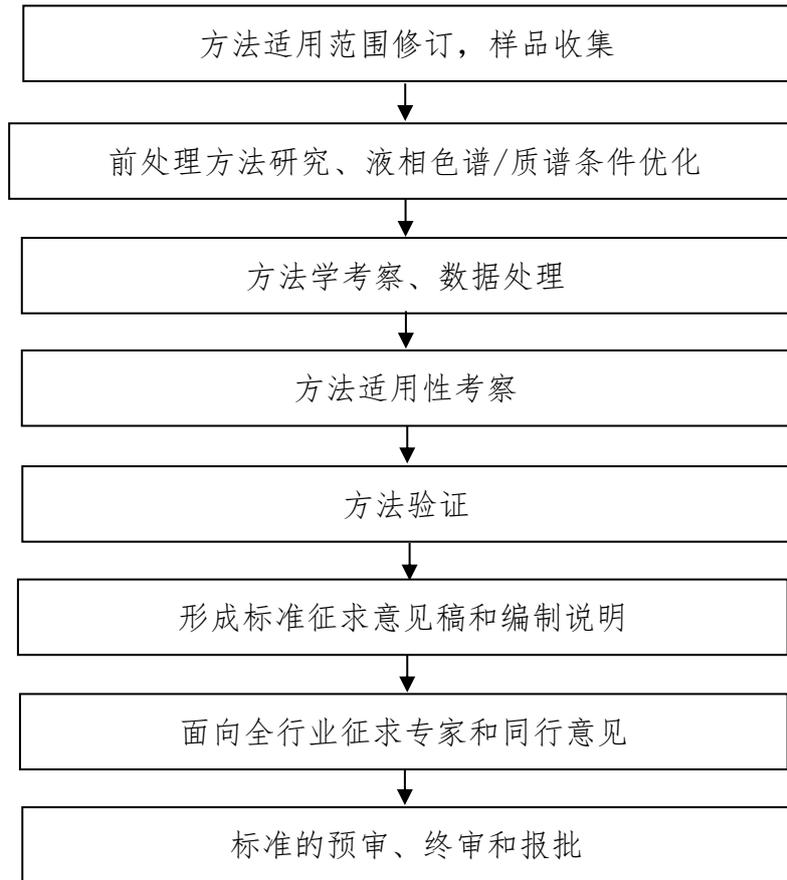


图 1 标准修订技术路线图

2024 年 2 月~5 月，开展样品收集、方法学研究和实际样品检测。验证高效液相色谱法，针对饲料中玉米赤霉烯酮的液质方法和仪器条件进行优化、并对所建立方法的线性、灵敏度、回收率和精密度等进行验证，建立了不同饲料基质中玉米赤霉烯酮的精准检测技术，并应用于实际样品的检测。

2024 年 6 月~7 月，标准编制小组形成标准文本和编制说明的定向征求意见稿，发省部级饲料质检机构、大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会等单位进行定向征求意见，期间收到来自 21 个回函单位共 25 个专家的 187 条意见，其中采纳 164 条，部分采纳 3 条，未采纳 20 条。同时邀请农业农村部食品质量监督检验测试中心（上海）、上海海关

动植物与食品检验检疫技术中心、江苏省畜产品质量检验检测中心三家单位对本标准方法进行了验证复核，验证结论均为满足检测需求。

2024年8月2日，全国饲料工业标准化技术委员会饲料检测方法标准化工作组组织专家对上海市农业科学院和上海市兽药饲料检测所起草的国家标准《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》（预审稿）进行了认真审查。专家组由杨曙明、曲志娜、张丽英、樊霞、李云、吴银良、吴宁鹏和张凤枰组成。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，提出以下修改意见：

（1）删除酶联免疫吸附法(第6章)；

（2）范围中饲料原料改为植物性饲料原料，删除添加剂预混合饲料；

（3）编制说明中增加喷浆玉米皮等基质的添加回收试验数据；

（4）按照 GB/T 1.1—2020、GB/T 20001.4—2015 的要求规范标准文本及编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述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。

二、国家标准编制原则和主要技术内容确定的依据

（一）标准编制原则

按照 GB/T 20000.2—2009 《标准化工作指南 第2部分 采用国际标准》、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》、GB/T 20001.4—2015 《标准编制规则 第4部分：试验方法标准》的规定和要求编写标准全文。查阅了国内外相关标准，结合现行标准实施情况，以保证标准的先进性和衔接性。建立的饲料中玉米赤霉烯酮的

检测技术满足国家限量标准 GB 13078-2017《饲料卫生标准》。

(二) 标准主要技术内容的确定

1 标准修订的目的和方法研制中必用的基础信息

本次修订拟结合国内外玉米赤霉烯酮检测技术发展趋势和我国饲料行业发展现状，开发应用水平高、稳定性和重复性好的技术及方法，保证检测数据准确、可靠，并提高检测效率，全力满足我国饲料中玉米赤霉烯酮的检测需要。删除 GB/T 19540-2004 中的薄层色谱法和酶联免疫吸附法；合并 GB/T 28716-2012 中的免疫亲和柱净化-高效液相色谱法；新增液相色谱-串联质谱法。

本标准首先建立且优化了液相色谱-串联质谱法，结合部分地方标准和收集查阅到的国内外关于玉米赤霉烯酮检测相关的文献，开发建立液相色谱串联质谱检测方法，开展多种饲料基质的方法学研究，考察方法的适用性和实际样品测定的可操作性。本标准同时对 GB/T 28716-2012 中的免疫亲和柱净化-高效液相色谱法进行了验证，证明其适用性。

玉米赤霉烯酮的化学结构、理化特性是在方法研究建立中必须考虑和应用的基础信息，其基本信息、化学结构和理化性质见图 2 和表 4。

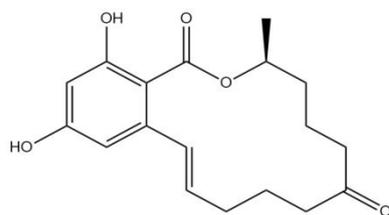


图 2 玉米赤霉烯酮的化学结构

表 4 玉米赤霉烯酮的基本信息和理化性质

化合物名称	玉米赤霉烯酮
英文名称	Zearalenone
分子式	C ₁₈ H ₂₂ O ₅
分子量	318.36
CAS 号	17924-92-4
极性和溶解性	极性较弱，几乎不溶于水、四氯化碳等，但溶于碱性水溶液、正己烷、苯、乙腈、二氯甲烷、甲醇和乙醇等

本标准所用试剂和水，在没有注明其他要求时，所有试剂均为分析纯，实验室用水符合 GB/T 6682-2008 中二级水规定，标准溶液和流动相用水符合一级水规定。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。试样的制备均按 GB/T 14699-2023 抽取有代表性的饲料样品，用四分法缩减取约 200 g，按照 GB/T 20195-2006 制备样品，粉碎后过 0.425 mm 孔径的分析筛，混匀，装入样品瓶中备用。

2 液相色谱-串联质谱法的建立

2.1 质谱条件的确定

配制浓度为 50 ng/mL 的玉米赤霉烯酮标准溶液，通过注射泵直接注入质谱仪中进行一级质谱全扫描（图 3），在电离过程中发现产生了一个明显的母离子 $[M-H]^- m/z 317.22$ ，优化锥孔电压，使得母离子响应最高。打开质谱氦气，进行二级扫描，比较其提取离子色谱图的响应和峰型（图 4）， $m/z 175.1$ 的子离子信号响应最高， $m/z 131.1$ 的子离子信号响应次之，重复进行多次二级扫描考察稳定性，此两个子离子的信号强度依旧较高，因此选择 $[M-H]^- m/z 317.2 > 131.1$ 作为玉米赤霉烯酮的定性离子对， $[M-H]^- m/z 317.2 > 175.1$ 作为玉米赤霉烯酮的定量离子对，与相关文献和其余标准相对

比，发现定量离子对的选择基本一致，定性离子对的选择与欧盟标准 EN 16877 2016 相一致。依次优化气流速、辅助气、吹扫气、离子传输温度和雾化器温度，然后优化碰撞电压，当碰撞能达到 24 eV 时，定量离子对 317.2>175.1 的响应达到峰值（如图 5）；当碰撞能达到 30 eV 时，定性离子对 317.2>131.1 的响应达到峰值（如图 6），从而确定了玉米赤霉烯酮最终的质谱条件。

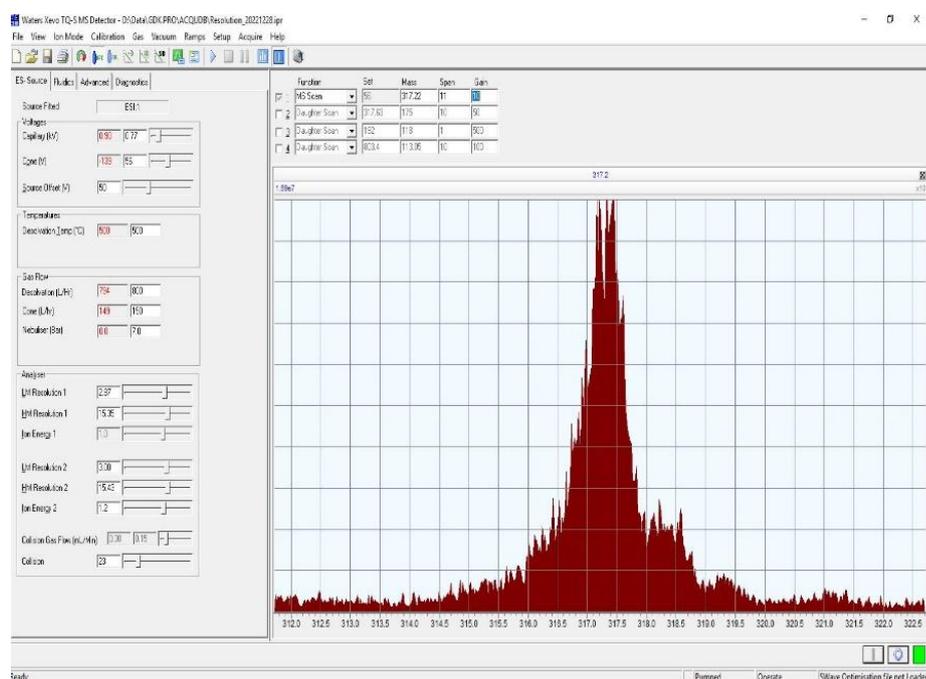


图 3 优化母离子的响应信号

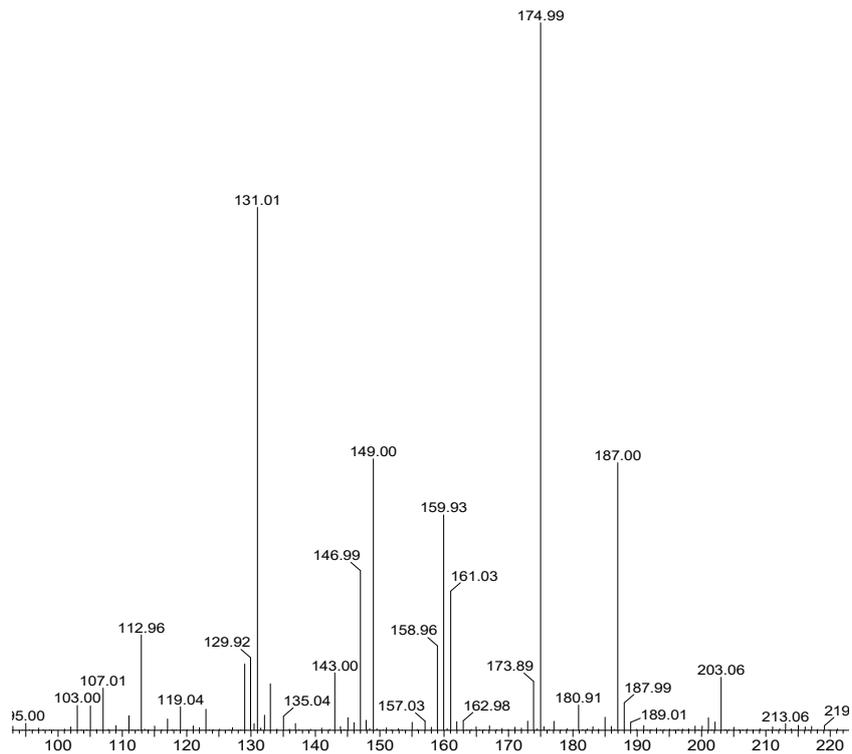


图 4 玉米赤霉烯酮的离子碎片谱图

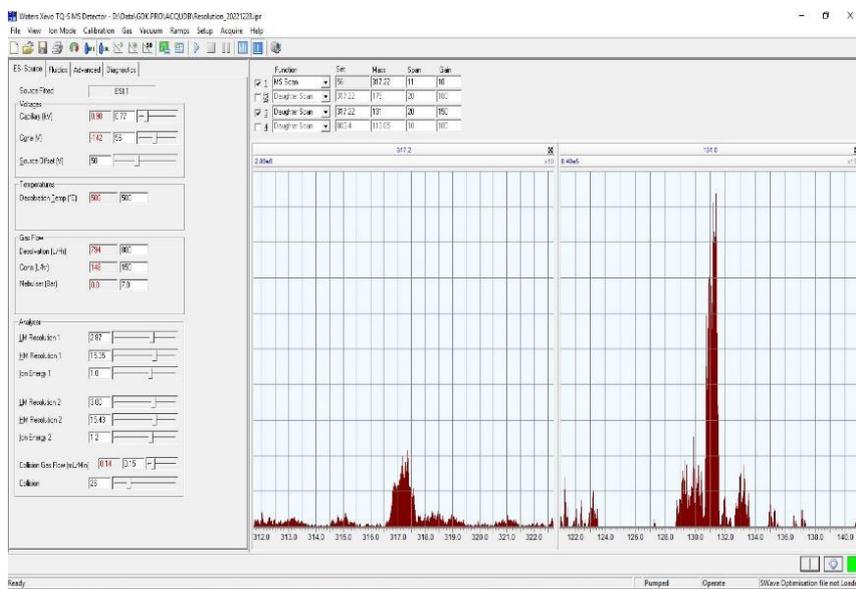


图 5 优化定量离子通道的响应信号 (m/z 317.2/175.1)

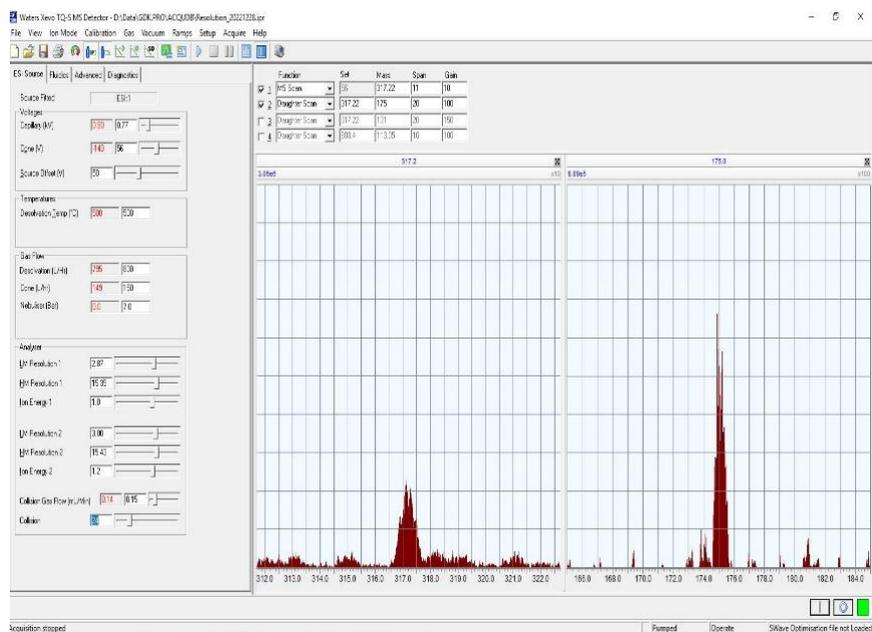


图 6 优化定性离子通道的响应信号 (m/z 317.2/131.1)

最终确定质谱仪器的方法参数如下：电离方式为电喷雾电离，负离子模式 (ESI-)；检测方式为多反应监测 (MRM)；脱溶剂气流速为 800 L/h；反吹气流速为 150 L/h；雾化器温度为 500 °C；电离电压为 3.0 kV；源温度为 150 °C。多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 5。

表 5 玉米赤霉烯酮的 MRM 离子对、锥孔电压和碰撞电压

被测物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	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

2.2 液相色谱条件的确定

2.2.1 色谱柱的选择

玉米赤霉烯酮极性较弱，根据其结构性质以及饲料复杂的基质情况，在方法研究过程中，试验比较了 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm×3 mm,

2.5 μm)、Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)三种色谱柱对目标物分离度和灵敏度的不同影响。进样浓度为 50 ng/mL 的玉米赤霉烯酮标准溶液 (图 7)。结果表明, 三种色谱柱的峰型和分离度均较好, 目标物色谱峰附近无杂质干扰, 进一步考察色谱峰面积 (表 6), 发现使用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm \times 2.1mm, 1.7 μm)色谱柱时玉米赤霉烯酮响应最低(峰面积值为 125451);使用 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ (100 mm \times 3mm, 2.5 μm)色谱柱时玉米赤霉烯酮的响应有所提高 (峰面积值为 201254); 使用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱时玉米赤霉烯酮的色谱峰型最为尖锐, 响应最高 (峰面积值为 211479), 因此选择 Waters HSS T3 色谱柱, 由于 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱利用了 Waters HSS (高强度二氧化硅) 颗粒技术, 能提供出色的峰型和低 pH 值稳定性, 能耐受 100%水相, 且耐受压力高达 18000 psi, 它还能提高保留率, 因此可作为开发极性和非极性化合物分离方法的理想选择。

表 6 三种色谱柱相关性能参数对比

色谱柱	分离度(R)	峰型	杂质干扰	峰面积
C ₁₈ (100 mm \times 2.1mm, 1.7 μm)	R >1.5	对称、尖锐	无干扰	125451
C ₁₈ (100 mm \times 3mm, 2.5 μm)	R >1.5	对称、尖锐	无干扰	201254
T3 (150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)	R >1.5	对称、尖锐	无干扰	211479

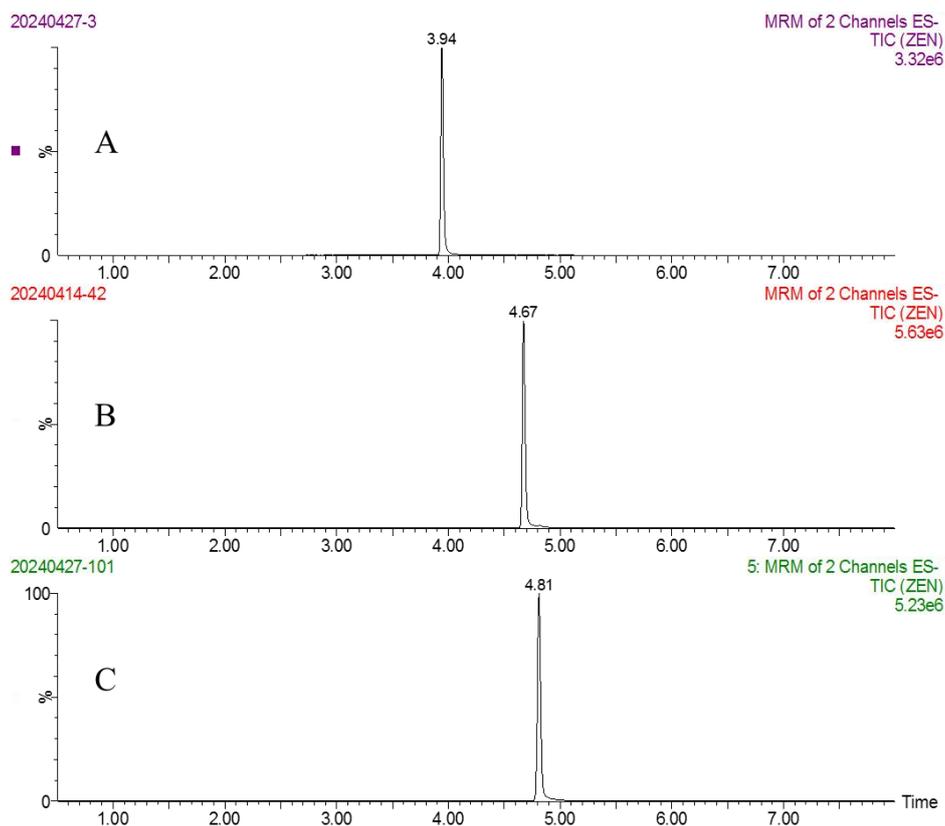


图 7 三种色谱柱对于玉米赤霉烯酮的分离效果，A 为 Waters BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱；B 为 Waters HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 色谱柱；C 为 Waters BEH C₁₈ (100 mm×3 mm, 2.5 μm) 色谱柱

2.2.2 流动相的确定

由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态下电离，因此流动相的种类和比例不仅影响目标化合物的保留时间和峰型，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度。本实验分别考察了乙腈-水、乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液、乙腈-0.1% 甲酸水溶液、甲醇-水、甲醇-5 mmol/L 乙酸铵水溶液、甲醇-0.1% 甲酸水溶液作为流动相，进样浓度为 50 ng/mL 的玉米赤霉烯酮标准溶液，实验发现以乙腈为有机相时，峰型较好，响应更高（图 8）。相比于乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液体系，当使用乙腈-0.1% 甲酸水溶液为

流动相时，响应值更高，分离效果更好，空白残留减少，进样重复性更佳，故选择乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动相。

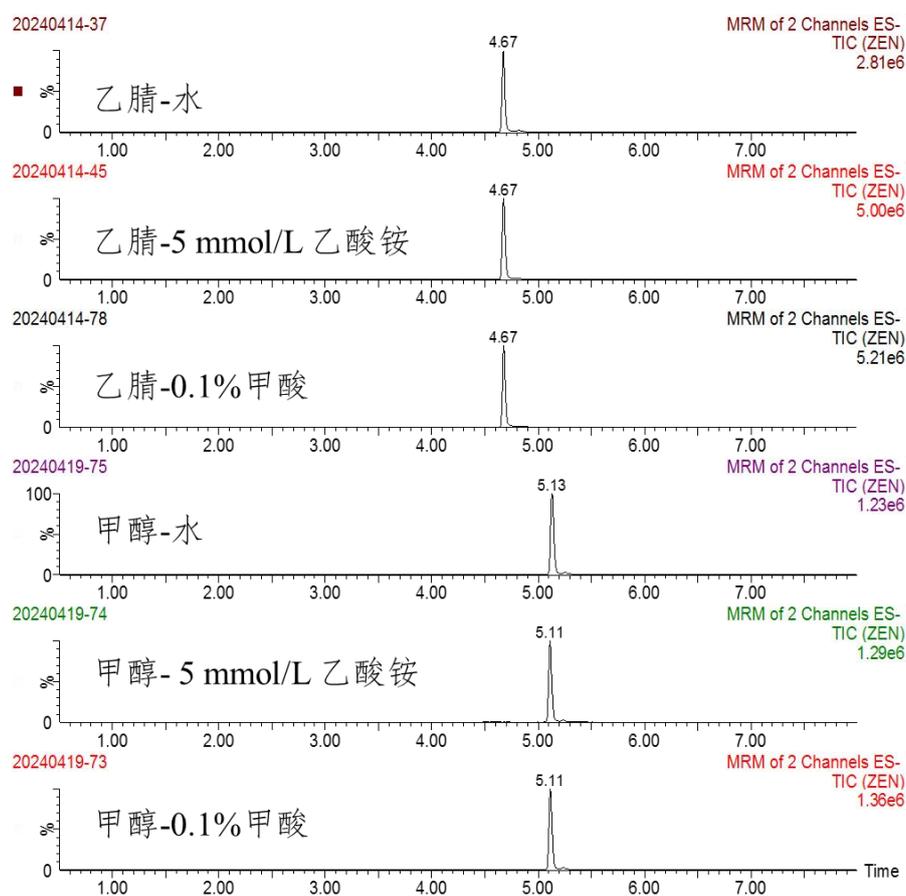


图 8 六种不同流动相条件下玉米赤霉烯酮的分离效果

色谱条件最终确定如下：色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱，150 mm × 2.1 mm，1.8 μm，或性能相当者；柱温为 40℃；进样量为 3 μL；流动相：A 相为乙腈，B 相为含 0.1% (v/v) 甲酸的水溶液；流速为 0.4 mL/min。因为饲料样品基质较复杂，因此试验选择梯度程序洗脱，起始的有机相比比例控制在 10%左右，洗脱程序见表 7。

表 7 乙腈-0.1%甲酸水流动相梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0	0.4	10	90
4	0.4	90	10
5	0.4	90	10
5.1	0.4	10	90
8	0.4	10	90

2.3 氮吹温度的考察与确认

取 50 ng/mL 的玉米赤霉烯酮标准溶液, 分别考察了氮吹温度为 25 °C、30 °C、40 °C、50 °C 及 55 °C 时玉米赤霉烯酮的回收率情况, 结果如下表 8 所示, 研究表明氮吹温度对玉米赤霉烯酮的复溶上机测试无明显影响。

表 8 氮吹温度对回收率的影响 (n=3)

氮吹温度 (°C)	回收率
25	94.4±2.2%
30	93.6±2.4%
40	95.2±1.7%
50	93.1±3.0%
55	94.0±2.4%

2.4 样品提取与净化条件的确定

2.4.1 提取溶液的确定

根据玉米赤霉烯酮的理化性质, 其具有一种酚的二羟基苯酸的内酯结构, 不溶于水、二硫化碳和四氯化碳, 溶于碱性水溶液、甲醇、乙腈、苯、氯仿、二氯甲烷等溶剂。结合相关文献与其余相关标准中真菌毒素的提取

方法，本试验主要考察的提取试剂为甲醇、乙腈以及不同比例的乙腈水混合溶液（50%、70%和 80%，v/v）。称取 6 组仔猪配合饲料空白样品各 5 g，向其添加标准溶液使最终加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，用 5 种提取溶液分别进行提取操作，平行试验三次，过滤膜上机测试，计算回收率，所得结果如下表 9，80%乙腈水回收率最高，纯乙腈的回收率次之，50%乙腈水回收率最低。参考结合常见免疫亲和柱说明书所要求的提取液，将提取试剂确定为 80%乙腈水溶液。

表 9 不同提取溶液的回收率比较 (n=3)

提取溶剂	回收率
甲醇	80.4 \pm 2.1%
乙腈	89.6 \pm 2.8%
50%乙腈水溶液	66.8 \pm 1.9%
70%乙腈水溶液	84.5 \pm 2.6%
80%乙腈水溶液	91.2 \pm 3.0%

2.4.2 提取方式的确定

称取 3 组仔猪配合饲料空白样品各 5 g，向其添加标准溶液使最终加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，分别使用震荡、超声和混匀三种提取方式进行提取，平行试验三次，考察提取回收率，所得结果如下表 10，三种提取方式的提取回收率均能满足要求，且超声提取的回收率最高，因此选择超声提取方式。

表 10 不同提取方式的回收率比较 (n=3)

提取方式	回收率
超声	93.9 \pm 1.8%
震荡	92.1 \pm 2.3%
混匀	90.7 \pm 2.4%

2.4.3 提取时间的确定

称取 4 组仔猪配合饲料空白样品各 5 g，向其添加标准溶液使最终加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，加入 25 mL 的 80% (v/v) 乙腈水溶液，涡旋 1 分钟后，分别超声 10 分钟，20 分钟，30 分钟和 60 分钟，平行试验三次，考察提取回收率，所得结果如下表 11，回收率随着超声时间增加而增加，在 30 分钟时回收率最高，提取时间达到 60 分钟时回收率反而下降，因此选择超声 30 分钟。

表 11 不同提取时间的回收率比较 (n=3)

提取时间	平均回收率
10 分钟	62.3 \pm 2.1%
20 分钟	86.5 \pm 3.2%
30 分钟	93.8 \pm 2.5%
45 分钟	90.2 \pm 3.5%
60 分钟	88.2 \pm 1.9%

2.4.4 净化方式的确定

饲料基质比较复杂，需要进一步净化，其最主要的杂质是油脂、蛋白质等，考虑到玉米赤霉烯酮的理化性质，结合文献资料，主要考察了固相萃取小柱 (C₁₈、HLB、PSA)、玉米赤霉烯酮免疫亲和柱 (飞测、中检维康、月旭) 和玉米赤霉烯酮净化柱 (ROMER、普瑞邦) 等三类共 8 种净化小柱。称取 8 组仔猪配合饲料空白样品，向其添加标准溶液使最终加标浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，分别使用不同的净化小柱对空白饲料加标样品进行净化，平行试验三次，最终过滤膜上机测定。结果如表 12，其中免疫亲和柱的回收率最高 (93.5 \pm 2.8%)，由于免疫亲和柱是基于抗原抗体反应，利用抗体

与真菌毒素分子具有高度亲和性和专一性的特点，实现待测样品净化和富集的净化材料，其具有高特异性，相比传统的固相萃取小柱和多功能净化柱，使用免疫亲和柱净化可以获得更为纯净的样品提取物，结合高效液相色谱串联质谱可以获得准确的定量检测结果，因此本试验选择免疫亲和柱作为最终净化方式。

表 12 不同净化方式的净化效率 (n=3)

净化方式	品牌或型号	平均回收率
固相萃取小柱	Uptent C ₁₈	83.6±2.4%
	Uptent HLB	84.7±1.8%
	Uptent PSA	59.2±2.4%
免疫亲和柱	中检维康 IAC 柱	93.5±2.8%
	飞测 IAC 柱	90.8±1.8%
	月旭 IAC 柱	92.6±2.7%
多功能净化柱	ROMER MycoSep 226	75.9±1.6%
	普瑞邦 MFC 226	78.6±3.0%

2.5 标准溶液的稳定性

2.5.1 标准储备溶液的稳定性

本标准制修订小组所在团队在接到制修订任务前已经开始对玉米赤霉烯酮标准储备溶液 (100 µg/mL) 的稳定性进行了长期考察。根据确定的色谱质谱条件，取配制好的玉米赤霉烯酮标准储备溶液 (100 µg/mL)，分别于 0 天、14 天、1 个月、2 个月、3 个月、6 个月、9 个月和 12 个月时取出。每次试验时，分别精确吸取玉米赤霉烯酮标准储备溶液适量，逐级稀释配制成 100 ng/mL 的标准溶液，由高效液相色谱-串联质谱测定，平行测定 6 次，峰面积的相对标准偏差 (RSD) 小于 5%。试验结果表明，标准储备

溶液在-18℃下保存 12 个月是稳定的。

表 13 标准储备溶液稳定性考察

时间	第 1 次 (0 天)	第 2 次 (14 天)	第 3 次 (1 月)	第 4 次 (2 月)	第 5 次 (3 月)	第 6 次 (6 月)	第 7 次 (9 月)	第 8 次 (12 月)	RSD/ %
平均峰面积	394826	395382	409153	407721	417559	421126	423012	401637	2.5

2.5.2 标准中间溶液的稳定性

本标准制修订小组所在团队在接到制修订任务前已经开始对玉米赤霉烯酮标准中间溶液（10 μg/mL）的稳定性进行了长期考察。根据确定的色谱质谱条件，取配制好的玉米赤霉烯酮标准中间溶液（10 μg/mL），分别在 0 天、14 天、1 个月、2 个月、3 个月、6 个月时取出。每次试验时，分别精确吸取玉米赤霉烯酮标准中间溶液适量，逐级稀释配制成 50 ng/mL 的标准溶液，由高效液相色谱-串联质谱测定，平行测定 6 次，峰面积的相对标准偏差（RSD）小于 5 %。试验结果表明，标准中间溶液在-18℃下保存 6 个月是稳定的。

表 14 标准中间溶液稳定性考察

时间	第 1 次 (0 天)	第 2 次 (14 天)	第 3 次 (1 月)	第 4 次 (2 月)	第 5 次 (3 月)	第 6 次 (6 月)	RSD/%
平均峰面积	203169	211744	199527	194512	197594	211744	3.2

2.6 基质效应评价

本标准方法学考察涉及小麦、玉米、仔猪配合饲料、育肥羊精料补充料、猪浓缩饲料共五种代表性饲料原料及饲料基质。基质效应会影响高效液相色谱串联质谱的分析结果，出现信号抑制或者信号增强，采用初始流

动相和空白样品基质液分别稀释标准中间溶液，配制成标准系列溶液。基质效应通过基质标准曲线的斜率和溶剂标准曲线的斜率的比值（百分比）计算得到，用于评价基质影响。比值大于 100%表现为信号增强作用，比值小于 100%表现为信号抑制作用。五种基质的基质效应如下表 15 所示，范围为 51.2%-76.0%，为保证结果的准确性，采用基质匹配校准曲线消除基质效应。

表 15 五种基质的基质效应

基质种类	基质效应
玉米	51.2%
小麦	61.7%
仔猪配合饲料	73.6%
羊精料补充料	76.0%
猪浓缩饲料	69.3%

2.7 方法性能考察

2.7.1 基质标准曲线线性范围

取基质空白试样，经提取净化得到空白基质溶液，取标准中间溶液适量，以空白基质溶液进行稀释，配制成 2 ng/mL，10 ng/mL，50 ng/mL，100 ng/mL，200 ng/mL 基质标准系列曲线，由低浓度到高浓度供液相色谱串联质谱仪测定，以定量离子色谱峰面积为纵坐标，基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。各种基质匹配标准曲线方程、线性范围及相关系数 (R^2) 见表 16 和图 9 至 13。可以看出玉米赤霉烯酮在各种基质中线性良好，相关系数均大于等于 0.99。

表 16 基质匹配标准曲线方程、线性范围及相关系数

基质种类	线性方程	线性范围	相关系数 R ²
玉米	Y=473.94X+328.2	2-200 ng/mL	0.998
小麦	Y=574.47X+1123.93	2-200 ng/mL	0.998
仔猪配合饲料	Y=685.46X+1437.93	2-200 ng/mL	0.992
羊精料补充料	Y=706.46X-214.40	2-200 ng/mL	0.995
猪浓缩饲料	Y=636.21X+988.09	2-200 ng/mL	0.998

Compound name: ZEN
 Correlation coefficient: r = 0.999101, r² = 0.998204
 Calibration curve: 574.471 * x + 1123.93
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

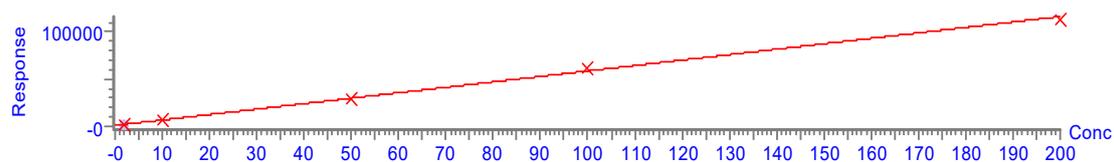


图 9 小麦基质匹配标准曲线

Compound name: ZEN
 Correlation coefficient: r = 0.999167, r² = 0.998335
 Calibration curve: 473.94 * x + 328.92
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

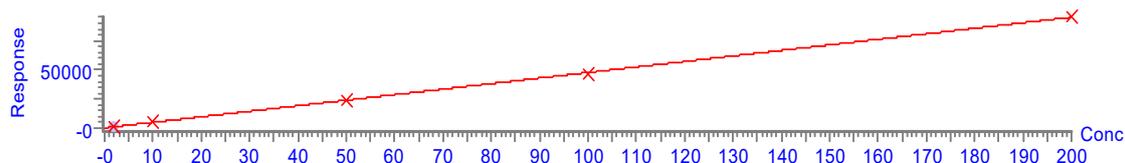


图 10 玉米基质匹配标准曲线

Compound name: ZEN
 Correlation coefficient: r = 0.995931, r² = 0.991878
 Calibration curve: 685.467 * x + 1437.03
 Response type: External Std, Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

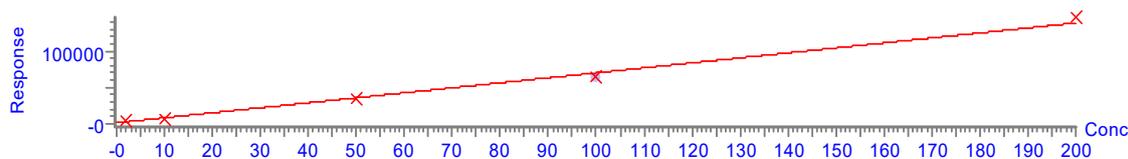


图 11 配合饲料基质匹配标准曲线

Compound name: ZEN
Correlation coefficient: $r = 0.997716$, $r^2 = 0.995437$
Calibration curve: $706.762 * x + -214.399$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

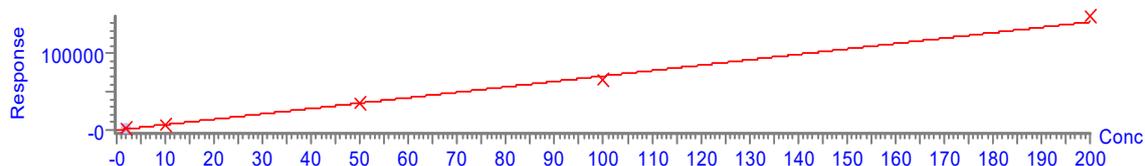


图 12 羊精料补充料基质匹配标准曲线

Compound name: ZEN
Correlation coefficient: $r = 0.999321$, $r^2 = 0.998642$
Calibration curve: $636.215 * x + 988.097$
Response type: External Std, Area
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

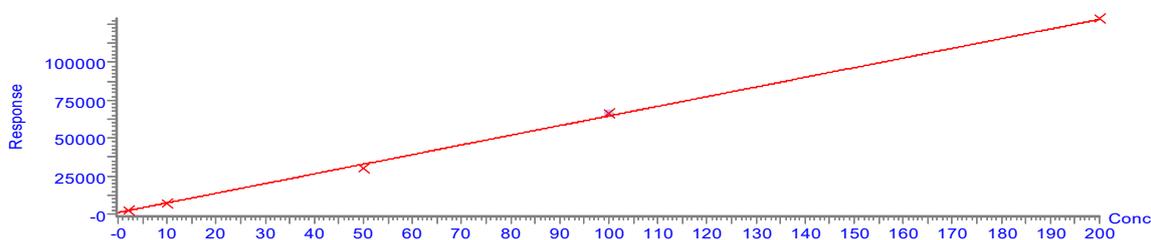


图 13 猪浓缩饲料基质匹配标准曲线

2.7.2 检出限和定量限

饲料基质复杂，因此本试验选择小麦、玉米、仔猪配合饲料、育肥羊精料补充料和猪浓缩饲料共五种饲料作为考察对象。在上述空白饲料中添加一定浓度的玉米赤霉烯酮，按照本标准进行试验。以当色谱峰的信噪比大于等于 3 的浓度为检出限，信噪比大于等于 10 的浓度为定量限的原则，确定了本方法的检出限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。方法检出限和定量限加标见图 14 至图 18。

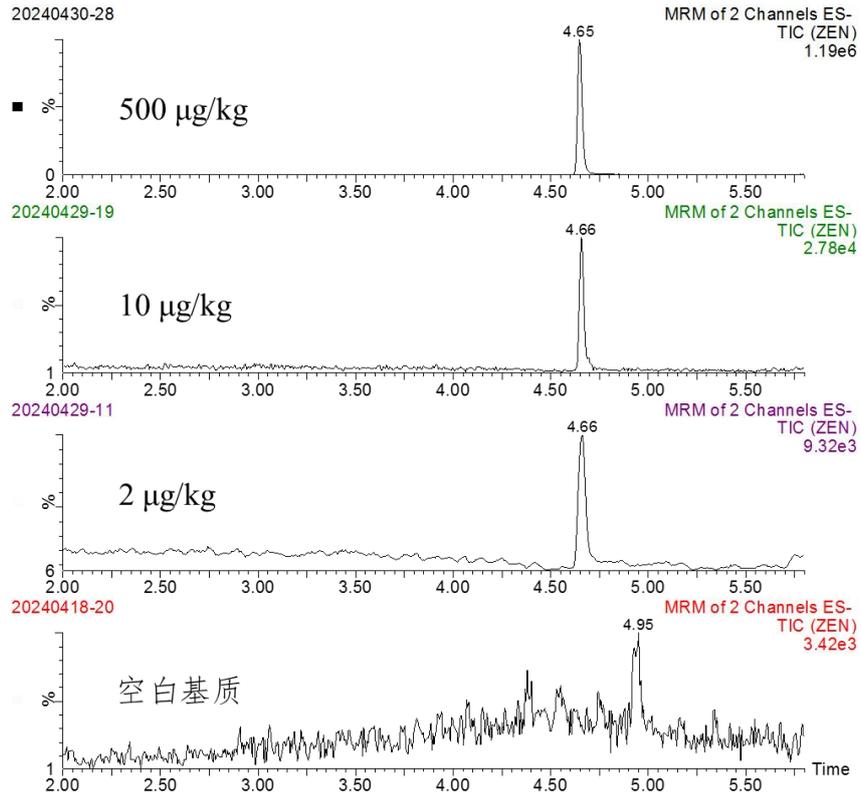


图 14 玉米基质的空白，检出限 (2 µg/kg) 加标，定量限加标 (10 µg/kg)，
限量加标 (500 µg/kg) 色谱图

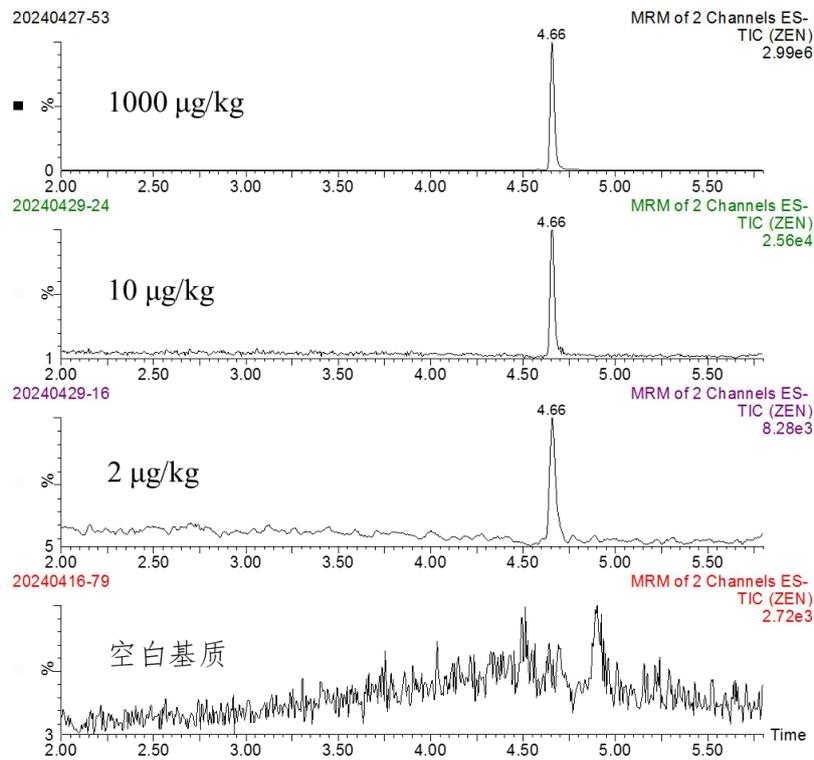


图 15 小麦基质的空白，检出限加标(2 µg/kg)，定量限加标(10 µg/kg)，

限量加标 (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

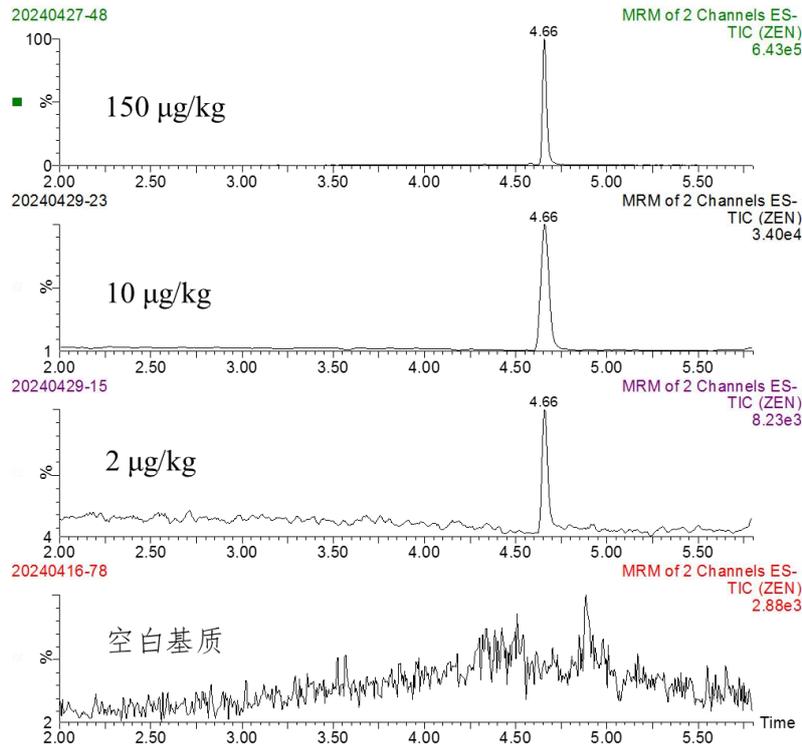


图 16 仔猪配合饲料基质的空白，检出限加标 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，定量限加标 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，限量加标 (150 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

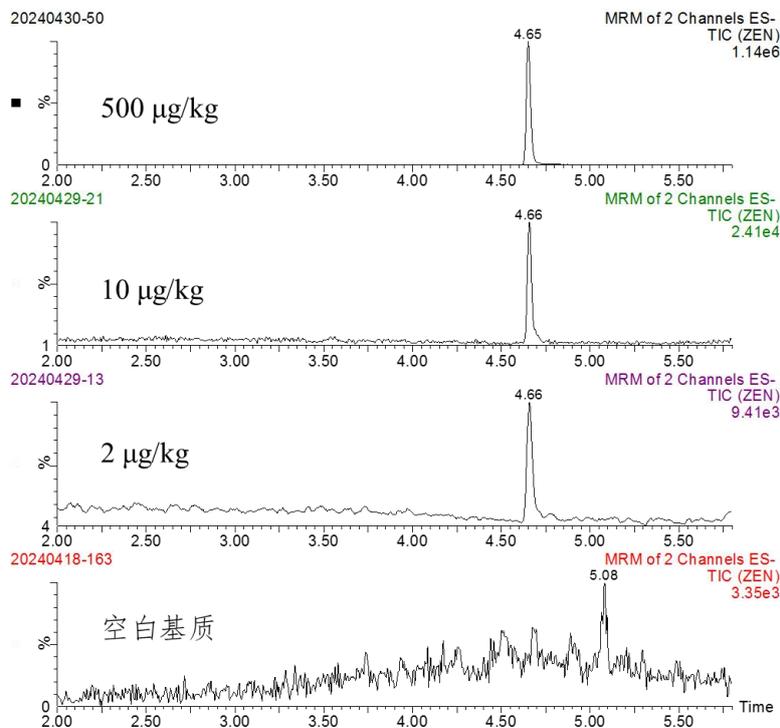


图 17 羊精料补充料基质的空白，检出限加标 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)，定量限加

标 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) , 限量加标 (500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 色谱图

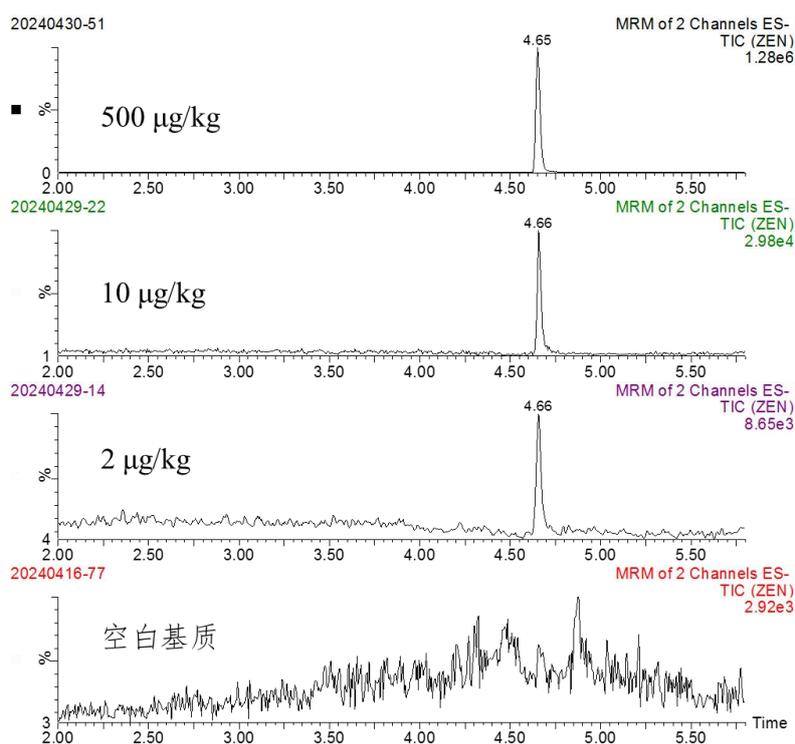


图 18 猪浓缩饲料基质的空白, 检出限加标 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) , 定量限加标 (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) , 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标色谱图

2.7.3 方法准确度、回收率和精密度考察

本方法采用液相色谱-串联质谱法考察了玉米赤霉烯酮在小麦、玉米、玉米 DDGS、喷浆玉米皮、玉米浆干粉、仔猪配合饲料、育肥羊精料补充料和猪浓缩饲料中的添加回收情况。根据 GB 13078-2017《饲料卫生标准》及 GB/T 23182-2008《饲料中兽药及其他 化学物检测试验规程》等标准, 考虑本试验添加回收水平需包括定量限及规定限量, 确定了玉米基质的添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 小麦基质的添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 猪配合饲料的添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 羊精料补充料的添加水平为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 猪浓缩饲料的添加水平为

10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。各浓度在一批内进行 6 个平行试验考察批内精密度, 进行 5 个不同批次的试验考察批间精密度, 发现玉米赤霉烯酮在所选五种基质的平均回收率范围在 80.9%~111.2%之间, 批内精密度在 1.4%~9.4%之间, 批间精密度在 2.9%~9.5%之间, 具体结果见下表 17 至表 21。

表 17 玉米基质添加回收试验结果

加标 浓度 (μg /kg)	测 定 批 次	回收率 (%)						平均 回收 率(%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
10	I	87.4	103.4	83.27	95.6	95.5	91.7	92.8	6.9	6.0
	II	92.6	95.9	81.3	93.9	93.6	89.1	91.1	5.3	
	III	100.6	98.3	99.2	98.4	92.4	92.3	96.9	3.4	
	IV	90.1	92.5	90.4	89.7	88.1	93.1	90.7	1.9	
	V	82.8	81.7	83.2	95.2	90.4	92.7	87.7	6.1	
100	I	91.5	96.7	92.4	89.4	95.6	93.5	93.2	2.6	6.5
	II	96.1	90.4	91.6	92.4	112.6	88.8	95.3	8.4	
	III	104.2	103.1	91.4	94.8	92.7	95.4	96.9	5.1	
	IV	105.6	97.7	106.7	87.9	99.5	110.1	101.3	7.2	
	V	96.8	96.6	100.6	99.1	98.1	87.9	96.5	4.2	
500	I	101.4	94.7	97.9	100.1	89.3	99.8	97.2	4.2	4.7
	II	99.5	89.5	100.1	99.4	101.1	96.5	97.7	4.0	
	III	98.9	99.3	92.5	86.5	99.1	99.5	96.0	5.1	
	IV	104.2	92.5	103.5	105.4	101.9	102.7	101.7	4.2	
	V	101.5	103.7	99.1	91.6	102.4	101.1	99.9	4.0	
1000	I	98.7	101.9	102.9	99.3	102.4	101.6	101.1	1.6	3.2
	II	104.5	102.8	101.7	97.5	100.7	100.2	101.2	2.2	
	III	102.1	96.6	103.6	87.5	104.7	102.9	99.6	6.0	
	IV	105.1	104.5	100.8	103.2	102.3	100.6	102.8	1.7	
	V	102.8	101.1	101.7	100.9	97.5	102.6	101.1	1.7	

表 18 小麦基质添加回收试验结果

加标 浓度 (μg /kg)	测 定 批 次	回收率 (%)						平均 回 收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
10	I	90.6	82.9	88.5	97.1	82.5	97.1	89.8	6.6	6.9
	II	85.8	90.5	79.8	88.6	89.1	88.7	87.1	4.1	
	III	83.2	74.5	78.5	78.9	81.6	88.5	80.9	5.4	
	IV	93.1	84.1	87.4	99.1	91.6	86.9	90.4	5.4	
	V	84.3	81.3	97.2	81.9	81.8	85.4	85.3	6.5	
100	I	102.6	94.2	89.6	97.4	101.4	98.4	97.3	4.5	7.4
	II	91.4	99.7	111.5	90.7	89.8	91.3	95.7	8.1	
	III	88.4	87.7	87.8	84.9	101.6	85.2	89.3	6.4	
	IV	108.2	92.4	91.7	97.4	94.2	90.9	95.8	6.2	
	V	113.5	94.8	92.7	95.3	96.7	89.2	97.0	8.0	
500	I	96.8	100.4	95.6	102.5	90.9	97.8	97.3	3.8	4.5
	II	101.3	97.8	88.9	99.9	100.3	103.8	98.7	4.8	
	III	93.7	100.6	92.6	96.8	96.6	95.8	96.0	2.7	
	IV	102.7	100.6	93.8	101.7	98.1	100.1	99.5	2.9	
	V	96.9	87.3	98.5	97.4	86.7	100.8	94.6	5.8	
1000	I	98.8	96.3	92.7	96.7	97.8	95.2	96.3	2.0	3.4
	II	98.5	95.7	97.6	100.2	96.2	94.5	97.1	1.9	
	III	92.4	92.8	95.9	96.4	105.2	94.6	96.2	4.4	
	IV	102.7	100.9	105.5	100.1	98.7	102.0	101.7	2.1	
	V	101.2	97.2	98.0	102.7	98.3	97.5	99.2	2.1	

表 19 仔猪配合饲料基质添加回收试验结果

加标 浓度 (μg /kg)	测 定 批 次	回收率 (%)						平均 回 收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
10	I	95.2	93.9	80.9	90.1	91.2	88.1	89.9	5.2	6.8
	II	89.5	94.5	91.2	97.7	92.6	80.3	91.0	6.0	
	III	92.2	95.2	97.3	98.8	92.7	97.9	95.7	2.6	
	IV	93.6	79.2	83.1	84.5	84.6	102.2	87.9	8.8	
	V	93.8	78.3	92.1	91.4	83.5	97.7	89.5	7.3	
150	I	95.6	90.7	87.3	91.8	105.4	91.4	93.7	6.2	9.5
	II	78.4	89.9	88.1	90.7	101.6	90.6	89.9	7.5	
	III	94.1	99.9	91.7	99.6	84.7	95.2	94.2	5.5	
	IV	101.1	88.1	102.8	111.2	103.7	100.6	101.3	6.8	
	V	103.1	109.4	112.3	112.4	103.1	111.8	108.7	3.7	
500	I	93.4	95.1	91.9	95.1	93.2	91.2	93.3	1.6	5.1
	II	94.9	95.4	89.5	93.6	91.3	92.7	92.9	2.2	
	III	94.4	105.5	101.6	107.6	98.5	105.7	102.2	4.5	
	IV	94.2	95.5	93.5	94.7	86.3	95.3	93.3	3.4	
	V	101.3	97.1	99.9	99.1	89.8	98.8	97.7	3.8	
1000	I	104.7	103.6	109.2	105.9	104.8	100.1	104.7	2.6	2.9
	II	108.9	107.4	105.3	105.8	99.8	105.9	105.5	2.7	
	III	107.5	107.8	103.2	107.8	98.5	108.5	105.6	3.4	
	IV	107.1	102.3	112.0	107.1	107.5	106.9	107.2	2.6	
	V	109.7	108.4	110.6	108.3	104.1	108.6	108.3	1.9	

表 20 羊精料补充料基质添加回收试验结果

加标 浓度 (μg /kg)	测 定 批 次	回收率 (%)						平均 回 收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
10	I	96.8	95.5	92.7	99.4	91.5	99.0	95.8	3.1	7.7
	II	95.7	92.3	80.5	95.7	82.9	97.1	90.7	7.2	
	III	96.6	104.5	87.4	85.5	104.6	88.4	94.5	8.4	
	IV	84.7	91.7	88.4	87.3	82.9	100.8	89.3	6.5	
	V	93.5	77.4	84.7	81.1	93.4	84.5	85.8	6.9	
100	I	107.3	94.9	97.7	109.4	92.9	99.6	100.3	6.1	7.8
	II	97.9	102.7	96.1	89.8	97.1	93.2	96.1	4.2	
	III	89.5	107.4	88.6	91.3	91.8	84.7	92.2	7.8	
	IV	94.9	94.7	101.7	97.5	92.3	85.3	94.4	5.3	
	V	113.5	104.2	106.7	98.5	110.6	85.4	103.2	9.0	
500	I	96.7	95.3	95.7	93.7	87.9	94.6	94.0	3.1	7.3
	II	99.1	89.9	98.7	97.9	100.1	104.4	98.4	4.4	
	III	95.5	94.7	97.2	101.2	94.1	100.5	97.2	2.8	
	IV	102.1	118.3	120.4	108.4	107.5	110.4	111.2	5.7	
	V	99.1	89.3	100.2	98.7	96.6	99.5	97.2	3.8	
1000	I	100.1	102.5	96.6	101.9	101.2	99.8	100.4	1.9	3.8
	II	102.6	106.8	106.3	101.2	105.3	105.5	104.6	1.9	
	III	99.5	101.0	98.5	98.2	99.5	96.6	98.9	1.4	
	IV	107.8	112.1	102.3	103.9	103.1	106.1	105.9	3.2	
	V	105.2	95.4	101.1	102.4	107.4	110.5	103.7	4.7	

表 21 猪浓缩饲料基质添加回收试验结果

加标 浓度 (μg /kg)	测定 批次	回收率 (%)						平均 回收 率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
10	I	90.5	85.7	86.5	83.2	102.5	79.6	88.0	8.3	7.0
	II	88.9	92.8	96.3	104.2	87.6	90.5	93.4	6.0	
	III	92.4	77.5	82.6	88.4	90.8	86.9	86.4	5.8	
	IV	95.1	79.8	85.4	86.9	88.7	93.8	88.3	5.8	
	V	100.4	89.5	89.8	96.7	84.1	85.8	91.1	6.3	
100	I	96.1	94.9	91.2	99.6	89.7	95.2	94.5	3.4	5.8
	II	101.1	88.8	102.8	107.2	103.0	100.4	100.6	5.7	
	III	93.4	100.5	88.6	96.8	96.6	95.8	95.3	3.8	
	IV	100.7	99.6	93.8	101.4	98.4	100.7	99.1	2.6	
	V	93.6	89.2	83.1	94.5	84.6	92.2	89.5	4.9	
500	I	93.8	78.3	102.1	91.9	83.4	97.8	91.2	8.9	7.7
	II	87.1	98.5	91.7	99.7	84.7	95.2	92.8	6.0	
	III	98.1	88.1	102.2	110.0	101.7	100.5	100.1	6.5	
	IV	89.5	89.7	97.8	84.9	102.6	88.5	92.2	6.6	
	V	104.2	92.4	96.7	97.4	84.2	90.9	94.3	6.6	
1000	I	85.6	95.4	79.5	88.9	92.8	95.9	89.7	6.5	7.3
	II	105.8	102.8	98.4	110.0	92.8	96.8	101.1	5.7	
	III	89.5	98.8	87.5	98.5	86.9	96.1	92.9	5.4	
	IV	105.8	100.2	98.5	89.9	90.5	88.4	95.6	6.7	
	V	100.9	105.8	90.4	89.5	95.7	101.2	97.3	6.1	

3 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法的验证

3.1 样品的提取与净化

称取试样 40.0 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 4.0 g 氯化钠及 100.0 mL 提取剂,于振荡器上振荡 60 min,或于高速均质器均质 2 min 后,用定量滤纸过滤,准确移取 10.0 mL 滤液并加入 40.0 mL PBS 溶液稀释,用玻璃纤维滤纸过滤 1 次~2 次,至滤液澄清,备用。

将免疫亲和柱连接于固相萃取装置,将空气压力泵与玻璃注射器连接。准确移取 10.0 mL 样品提取液,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 10.0 mL 纯水淋洗柱子两次(对颜色较重的样品,第一次改用 10.0 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 甲醇洗脱,流速不大于 2 mL/min,收集洗脱液于 40 °C 氮气吹干,用 1.0 mL 流动相溶解残渣,涡旋混匀,过 0.45 μm 滤膜,上机测定。

3.2 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱,长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μm;
- b) 流动相: 乙腈+水+甲醇(46:46:8,体积比),等度洗脱;
- 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 °C。

3.3 标准曲线线性范围

所有操作均按照原 GB/T 28716-2012 中要求进行,配制玉米赤霉烯酮

标准工作溶液，在确定后的液相色谱条件下进行测定，以峰面积值为纵坐标，以玉米赤霉烯酮浓度为横坐标作标准曲线图，结果见表 22 和图 19。线性良好，相关系数 R^2 为 0.9994。

表 22 玉米赤霉烯酮的高效液相色谱法测定的标准曲线

浓度 (ng/mL)	20	50	100	500	1000
峰面积值	35596	87361	171565	925912	1950919
线性方程	$Y=1952.7X-17927$				
相关系数 (R^2)	0.9994				

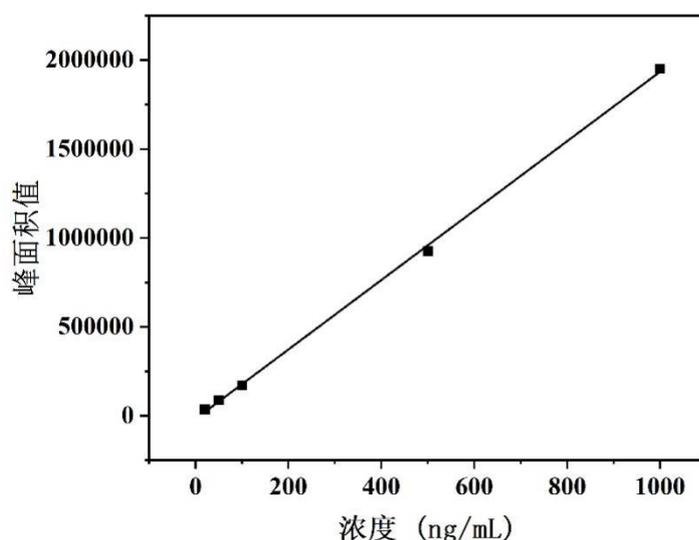


图 19 玉米赤霉烯酮的高效液相色谱法测定的标准曲线图

3.4 检出限和定量限

在空白基质中添加一定量的玉米赤霉烯酮标准品，样品经前处理后用液相色谱进行测定，当检测样品中色谱峰的信噪比大于等于 3 时，添加玉米赤霉烯酮的浓度即为检出限，试样中玉米赤霉烯酮的峰的信噪比大于等于 10 时，添加玉米赤霉烯酮的浓度即为定量限。该玉米赤霉烯酮高效液相色谱分析方法的检出限为 $2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。空白玉米粉基质的

色谱图见图 20，方法检出限，定量限和限量（依据《GB 13078-2017》）加标的色谱图见图 21、图 22 和图 23。

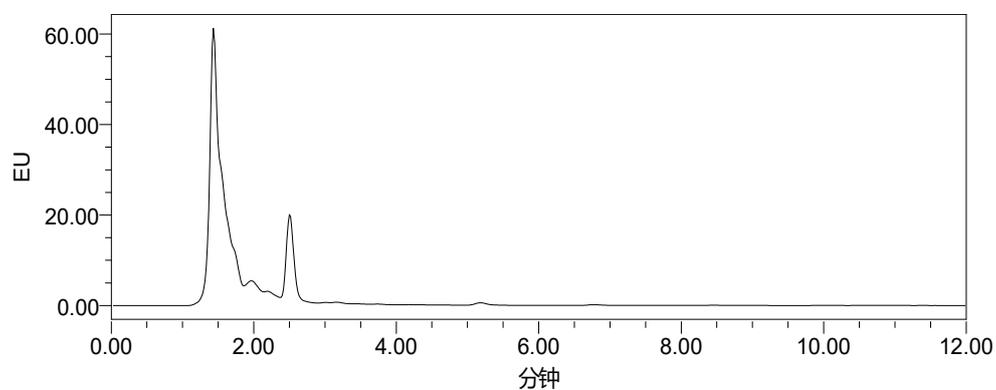


图 20 空白玉米粉基质的色谱图

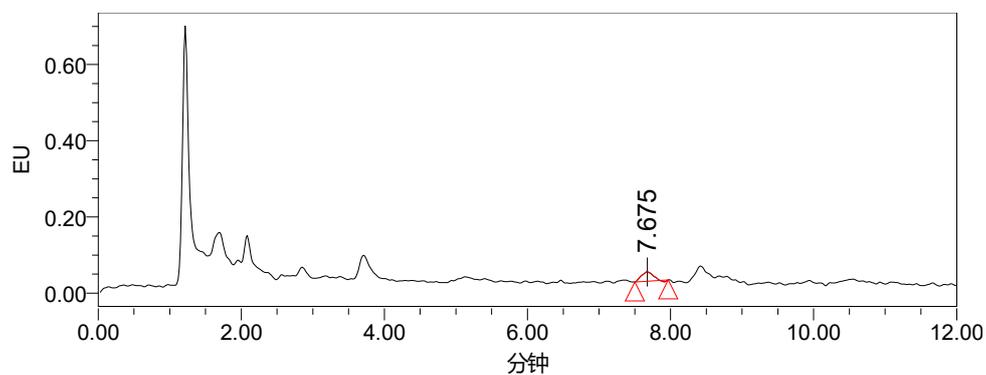


图 21 玉米粉检出限 (2 µg/kg) 加标的色谱图

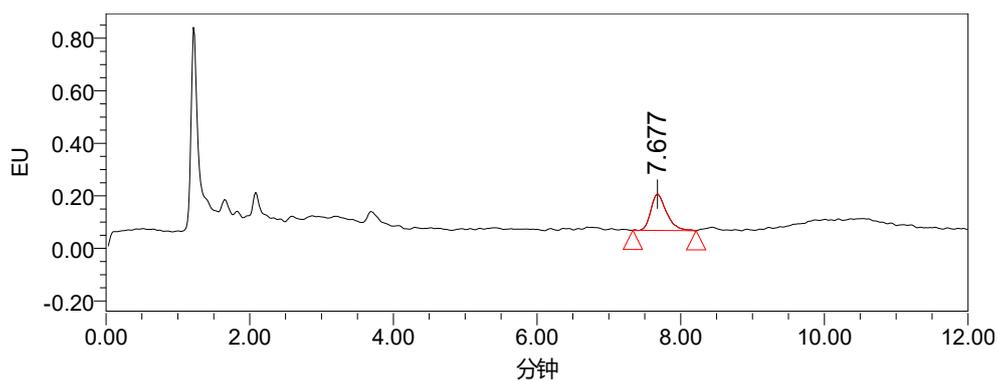


图 22 玉米粉定量限 (10 µg/kg) 加标的色谱图

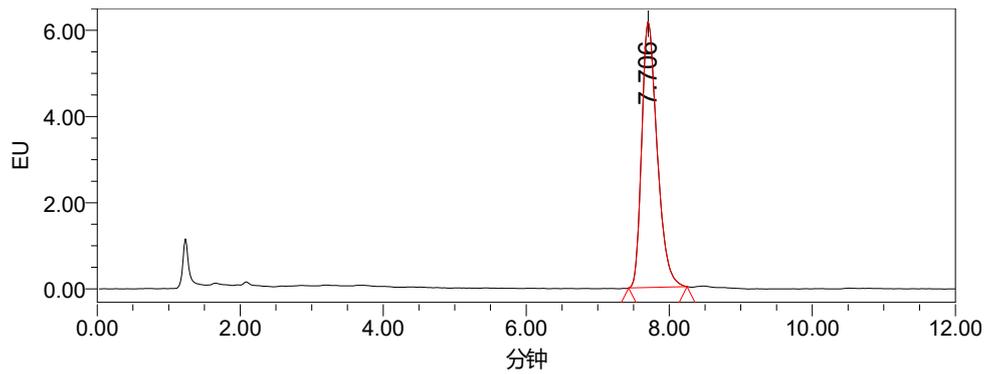


图 23 玉米粉限量（500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）加标的色谱图

3.5 准确度和精密度

高效液相色谱法用于检测饲料中的玉米赤霉烯酮，考察方法准确度和精密度的添加回收试验浓度分别为 1 倍定量限（10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ），0.2 倍限量（100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）、1 倍限量（500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）和 2 倍限量（1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ），按以上浓度制备添加回收试验样品，测定结果见表 23。平均回收率在 85.9%~115.2%之间，批内 $\text{RSD}\leq 7.9\%$ ，批间 $\text{RSD}\leq 11.3\%$ 。

综上所述，通过对标准曲线的验证以及在玉米、玉米 DDGS、喷浆玉米皮、玉米浆干粉、羊精料补充料和猪配合饲料中添加回收率、准确度和精密度的验证，证明了高效液相色谱法能继续适用于饲料中玉米赤霉烯酮的测定。

表 23 玉米粉添加回收试验（高效液相色谱法）

添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定批次	回收率 (%)						平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
		1	2	3	4	5	6			
10	I	85.5	82.0	92.4	87.6	84.6	83.3	85.9	4.3	11.3
	II	92.5	102.6	103.9	110.4	107.9	104.1	103.6	5.9	
	III	98.1	103.4	117.5	118.1	106.8	105.2	108.2	7.4	
	IV	108.2	112.4	115.1	117.9	118.8	115.5	114.6	3.4	
	V	114.7	115.1	114.8	116.5	113.5	114.9	114.9	0.8	
100	I	108.4	114.9	102.7	116.8	111.2	117.2	111.9	5.0	7.1
	II	106.3	107.7	92.8	105.4	104.5	88.8	100.9	7.9	
	III	115.2	118.0	116.1	116.2	112.4	113.3	115.2	1.8	
	IV	95.7	98.5	106.7	105.9	102.1	96.9	101.0	4.6	
	V	119.4	118.6	117.9	116.4	117.2	112.7	117.0	2.0	
500	I	90.8	96.9	91.9	93.7	97.9	89.8	93.5	3.5	7.5
	II	104.1	103.3	106.1	106.4	109.6	98.4	104.6	3.6	
	III	102.0	100.6	100.3	102.3	103.1	104.6	102.2	1.6	
	IV	113.9	111.0	111.0	112.5	111.4	118.9	113.1	2.7	
	V	113.5	109.4	108.0	113.5	111.6	111.9	111.3	2.0	
1000	I	89.7	91.2	90.9	89.1	90.9	91.8	90.6	1.1	6.6
	II	96.2	97.9	96.7	94.4	97.1	96.6	96.5	1.2	
	III	99.2	100.2	103.2	103.8	100.5	101.1	101.3	1.8	
	IV	104.1	104.8	103.7	99.1	105.0	104.4	106.2	2.3	
	V	105.9	107.6	108.3	108.9	108.1	106.9	107.6	1.0	

4 本标准方法适用性考察

对本标准中两种测试方法以及 NY/T 2071-2011 标准方法进行了方法适

用性考察并对结果进行了对比分析，选择了包含饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料四大类共 17 种基质进行适用性考察，具体检测结果见下表 24，三种方法的检测结果相近，相对偏差小于 15%，对 10 种用四种方法检测的样品结果做了 F 检验（一致性检测），其 P-value 均大于 0.05，无显著性差异，证明了本标准方法的适用性良好。

表 24 方法适用性考察及四种方法对比结果

序号	样品名称	HPLC 法 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	HPLC-MS /MS 法 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	NY/T 2071-2011 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对偏差
1	花生粕	未检出	未检出	未检出	/
2	豆粕	未检出	未检出	未检出	/
3	玉米粉	未检出	未检出	未检出	/
4	麦麸	28.4	32.4	39.1	13.26%
5	玉米酒糟 DDGS	69.6	79.8	76.1	5.61%
6	玉米淀粉渣	未检出	未检出	未检出	/
7	喷浆玉米皮	45.4	48.7	51.9	5.45%
8	哺乳母猪浓缩饲料	40.8	51.8	53.8	11.71%
9	蛋鸡浓缩饲料	402.3	356.0	375	5.03%
10	猪浓缩饲料	31.7	27.9	29.1	5.36%
11	生长育肥猪配合饲料	58.0	64.5	70.2	7.76%
12	肉鸡配合饲料	46.3	51.2	58.9	9.95%
13	肉鸭配合饲料	32.3	36.0	32.1	5.36%
14	鱼配合饲料	77.0	75.8	70.8	3.60%
15	育肥羊精料补充料	47.6	36.5	/	13.20%
16	肉牛精料补充料	184.6	179.7	/	1.35%
17	肉牛育肥后期精料补充料	157.2	145.6	/	3.83%

三、标准复核验证情况，技术经济论证，预期经济效果

标准复核验证情况：邀请了农业农村部食品质量监督检验测试中心（上海）、上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、江苏省畜产品质量检验测试中心共三家有资质的检测机构对该标准进行复核验证，不同实验室间平均回收率均在 84.1%-116.1%之间，检测结果的相对标准偏差（RSD）均小于 15%，验证结论均为满足检测需求。

国标修订版修改完善了饲料中玉米赤霉烯酮的测定方法，删除了薄层色谱法和酶联免疫吸附测定法，验证了高效液相色谱法，增加了液相色谱-串联质谱法，为定量和定性提供了依据。经试验验证，采用《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》规定的方法测定饲料中玉米赤霉烯酮，方法重复性好，精密度符合标准要求，能满足饲料原料、配合饲料、浓缩饲料、精料补充料、饲料中玉米赤霉烯酮的测定。

玉米赤霉烯酮是饲料质量控制的重要指标。修订其测定的国家标准方法，对于规范饲料原料生产、提高产品质量和安全水平、加强饲料质量安全监管具有重要意义，保障了我国畜产品质量安全，有助于推动畜牧产业和畜牧业经济快速健康发展。本标准作为饲料质量安全基础性标准，建议将本标准列为国家推荐性标准颁布、实施。

四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况

将本文件与农业行业标准 NY/T 2071-2011 以及欧盟标准 EN 17194:2019 进行比较，选取空白玉米粉和猪配合饲料样品加标（20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）进行回收率考察，结果见下表 25，本方法回收率更佳，变

异系数更小。

本文件液质方法的检出限（2 µg/kg）低于 NY/T 2071-2011（5 µg/kg），方法定量限（10 µg/kg）低于欧盟标准 EN 17194:2019（20 µg/kg），灵敏度更高。且本文件适用范围比 NY/T 2071-2011 以及欧盟标准 EN 17194:2019 更广。

表 25 本标准与国内外标准的比较（n=3）

加标浓度 (µg/kg)	样品名称	本文件液质法		NY/T 2071-2011		EN 17194:2019	
		回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
20	玉米粉	88.5	6.9	84.9	7.5	81.8	8.1
	猪配合饲料	90.1	4.2	87.5	5.9	83.9	7.1
100	玉米粉	92.2	5.9	89.4	6.1	91.8	6.9
	猪配合饲料	93.8	3.8	92.8	4.8	93.4	4.4

五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

无。

六、与有关法律、法规的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、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同一性的原则。本文件制定过程中参考了 GB 13078-2017《饲料卫生标准》中玉米赤霉烯酮在各类饲料原料及饲料产品中的限量标准，并以此为基础进行了空白样品的添加回收试验。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准在编制过程中没有重大意见分歧。

八、涉及专利的有关说明

本标准未明确涉及某一具体专利，但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。

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措施建议

本标准实施后，建议替代 GB/T 19540-2004 和 GB/T 28716-2012，原标准废止。（1）首先应在实施前保证文本的充足供应，让每个使用者都能及时得到文本；（2）发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会组织标准起草单位通过标准培训、会议宣贯、影音文件等方式，积极开展本标准的宣贯工作；

十、其他应予说明的事项

无。

参考文献

- [1] GB/T 1.1-2009 中华人民共和国国家标准《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》
- [2] GB/T 20001.4-2015 中华人民共和国国家标准《标准编写规则第4部分：试验方法标准》
- [3] GB/T 19540-2004 中华人民共和国国家标准《饲料中玉米赤霉烯酮的测定》
- [4] GB/T 28716-2012 中华人民共和国国家标准《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》
- [5] NY/T 2071-2011 中华人民共和国农业行业标准《饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》
- [6] DB22/T 1618-2012 中华人民共和国吉林省地方标准《饲料中玉米赤霉烯酮的测定 液相色谱-质谱/质谱法》
- [7] DB42/T 808-2012 中华人民共和国湖北省地方标准《饲料中黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和桔毒素的测定 高效液相色谱法》
- [8] DB37/T 4045.2-2020 中华人民共和国山东省地方标准《饲草中主要农药残留及真菌毒素的测定 第2部分：饲草中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的测定 液相色谱-串联质谱法》
- [9] 尚艳娥, 杨卫民. CAC、欧盟、美国与中国粮食中真菌毒素限量标准的差异分析[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(01): 10-15
- [10] 谢瑜杰, 陈辉, 胡雪艳, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法检测奶粉中玉米赤霉烯酮及其代谢物[J]. 食品工业科技, 2020, 41(07): 233-238
- [11] 李洪波, 宋志超, 陈蕾, 等. 复合免疫亲和柱净化-UPLC-MS/MS 测定饲料中黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素[J]. 中国饲料, 2022, (05): 79-83
- [12] 宋月, 杨丽君, 吴平谷, 等. 复合柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定粮油中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮类毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32 (01): 39-44
- [13] 王松雪, 鲁沙沙, 张艳, 等. 国内外真菌毒素检测标准制修订现状与进展[J]. 食品工业科技, 2011, 32(03): 408-416
- [14] 吴限鑫, 林秋君, 郭春景, 等. 国内外主要粮油产品中真菌毒素限量、检测标准及风险评估现状分析[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(09): 130-138

- [15] 张玮, 李会荣, 朱娜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮含量的研究[J]. 饲料研究, 2023, 46(03):126-129
- [16] 赵飞. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定玉米粉中玉米赤霉烯酮[J]. 当代化工, 2022, 51(04): 997-1000
- [17] 杨燕. 超高效液相色谱-串联质谱法检测粮食中的玉米赤霉烯酮[J]. 粮食科技与经济, 2020, 45(09): 76-79
- [18] Zhang, Z., Cai, Y., Fan, K., Huang, Q., Zhao, X., Cao, H., & Han, Z. Development of a reliable UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of zearalenone and zearalenone-14-glucoside in various feed products [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10, 955266
- [19] Huang, L. C., Zheng, N., Zheng, B. Q., Wen, F., Cheng, J. B., Han, R. W., & Wang, J. Q. Simultaneous determination of aflatoxin M₁, ochratoxin A, zearalenone and α -zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS [J]. *Food chemistry*, 2014, 146, 242-249
- [20] Belhassen, H., Jiménez-Díaz, I., Ghali, R., Ghorbel, H., Molina-Molina, J. M., Olea, N., & Hedili, A. Validation of a UHPLC-MS/MS method for quantification of zearalenone, α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol, β -zearalanol and zearalanone in human urine [J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 962, 68-74
- [21] Soleimany, F., Jinap, S., Faridah, A., & Khatib, A. J. F. C. A UPLC-MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals [J]. *Food control*, 2012, 25(2), 647-653
- [22] Zhang, Y. Y., Zhao, M. J., Liu, C. Y., Ma, K., Liu, T. Y., Chen, F., & Lv, G. P. Comparison of two commercial methods with a UHPLC-MS/MS method for the determination of multiple mycotoxins in cereals [J]. *Food Chemistry*, 2023, 406, 135056
- [23] Han, Z., Jiang, K., Fan, Z., Di Mavungu, J. D., Dong, M., Guo, W., & Wu, Y. Multi-walled carbon nanotubes-based magnetic solid-phase extraction for the determination of zearalenone and its derivatives in maize by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Control*, 2017, 79, 177-184
- [24] Lijalem, Y. G., Gab-Allah, M. A., Choi, K., & Kim, B. Development of isotope dilution-liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the accurate determination of zearalenone and its metabolites in corn [J]. *Food Chemistry*, 2022, 384, 132483