农业行业标准
《饲料中雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱－质谱法》

编制说明

（公开征求意见稿）

中国农业大学

2022 年 10 月

《饲料中雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱—质谱法》

编制说明

（公开征求意见稿）

一、标准修订工作简况

1．任务来源

本标准项目是中华人民共和国农业部提出并下达的饲料中化合物添加剂检测农业行业标准项目。任务下达名称为《饲料中雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱-质谱法》，项目编号为2017，完成单位为中国农业大学。在完成标准的全部研究工作后我们形成了相关方法，起草了征求意见稿进行广泛征求意见，同时联系了三家具有资质的试验室进行了方法验证。2022年7月14日，组织预审专家进行了预审查，在预审意见的基础上进一步补充数据和修改后，形成了本公开征求意见稿。

2．制定背景

雷琐酸内酯类化合物（Resorcylic acid lactones，RALs）属于同化激素中的非甾类雌性激素，主要化合物包括α-玉米赤霉醇（Zeranol，ZER）、β-玉米赤霉醇（β-taleranol，TAL）、玉米赤霉烯酮（Zearalenone，ZON）、α-玉米赤霉烯醇（α-Zearalanonle，α-ZOL）、β-玉米赤霉烯醇（β-Zearalanonle，β-ZOL）和玉米赤霉酮（Zearalanone，ZAN）。其中的α-玉米赤霉醇能改善生产性能，很快产生显著和直接的经济效益，因此对生产者有很大的吸引力。玉米赤霉醇具有使用剂量低，促进蛋白质合成、提高瘦肉率、增重和提高饲料转化率的作用，曾允许作为生长促进剂应用于食用牛和猪等动物生长。因此，自人类发现α-玉米赤霉醇的促生长效果以来，美国等几十个国家曾一度广泛使用，我国也曾于上世纪80年代末期开始示范和推广应用。但后来发现雷琐酸内酯类化合物具有致癌、致畸和致突变作用，在动物和人类体内残留具有很大的健康安全隐患。目前该类化合物已被欧盟、美国等许多国家严禁用于家畜促生长；我国农业部明确规定ZER禁止用于所有食品动物，所有可食性动物组织和动物尿液中均不得检出。

饲料中雷琐酸内酯类化合物存在途径除了经不法分子非法添加外，还可能因为饲料霉变产生。雷琐酸内酯类化合物中的玉米赤霉烯酮、α-玉米赤霉烯醇、β-玉米赤霉烯醇等常常由霉菌代谢产生，存在于霉变的玉米、小麦和大麦等谷类作物中。特别是玉米赤霉烯酮，它是谷类食品和饲料的重要污染物，在世界各地的玉米等作物中均有发现，多年来受到各国食品和饲料安全部门的监控和密切关注。相关研究和产品质量监测数据很多。

虽然政府禁止ZER等雷琐酸内酯类化合物用作动物生长促进剂，但由于玉米赤霉醇用量低、

对动物增重剂效果好、经济回报高，违法使用仍然存在。另外，长期饲喂霉变饲料，特别是少量不易发现有霉变的玉米，会对免疫系统产生影响，使猪很容易感染疾病，导致生产性能降低，或因并发症而死亡。为了保证动物性食品的安全和确保我国饲料行业的健康发展，研究建立饲料中雷琐酸内酯类化合物的检测方法具有十分重要的意义。

文献报道的饲料中雷琐酸内酯类化合物检测方法较多。如代荣逵等（2017）、葛文霞等（2016）、任丹丹等（2015）、吴伟峰等（2015）和姜雪等（2015）都对饲料中的 ZEA 检测方法进行了介绍。王丽娟等（2017）测定了糕点中的 ZEA。贾涛（2016）和崔晓娜等（2016）采用液相色谱-串联质谱测定了饲料中的玉米赤霉烯醇。戎晓平等（2015）采用液相色谱法对粮食和饲料中的 ZEA 污染进行了调查分析。刘拉平等（2016）和徐飞等（2015）采用液相色谱-串联质谱法检测了粮食中的 ZEA。刘震坤等（2014）对饲料中 ZEA 的生物学检测法、薄层色谱法（TLC）、高效液相色谱法（HPLC）、免疫学检测方法、气相色谱法、微生物检测方法等进行了综合研究。薛勇等（2014）对家禽饲料中 ZEA 污染情况进行了检测与分析，发现 97 份饲料样品中玉米赤霉烯酮的含量均≤ 500 μg/kg，3 份饲料样品中玉米赤霉烯酮的含量超过 500 μg/kg。张晓等（2007）建立了饲料中 ZEA 的酶联免疫检测法（ELISA），该方法检测回收率范围为 67%-99%，最低检出限为 0.1 μg/kg。朱孟丽等（2007）研究了高效液相色谱法测定饲料中 ZEA 的方法。样品经乙腈-水（体积比 84:16）提取，固相萃取小柱净化，C18 色谱柱分离，荧光检测器检测，方法最低检测限为 10 μg/kg。本项目组 Shen JZ 等（2010）建立了多种饲料中雷琐酸内酯类化合物的 GC/MS 法，用甲醇提取、0.5%碳酸钠洗涤、乙酸乙酯萃取、正已烷去脂、固相萃取柱净化、衍生化后，GC/MS 检测。方法的检测限均小于等于 2.0 μg/kg。但是该方法操作比较复杂，使用过程繁琐。

GC/MS 方法为生物样品中雷琐酸内酯类化合物检测的经典测定方法之一。欧盟委员会残留基准实验室的 Blokland MH 等 2006 年报道了尿和肉样品中雷琐酸内酯类化合物 GC/MS 方法，该方法采用负离子化学电离模式，可用于对玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇、玉米赤霉烯酮、α-玉米赤霉烯醇和β-玉米赤霉烯醇进行定量分析和对玉米赤霉酮进行定性分析。欧盟早于 FAIR5-CT-1997-3443 计划中对食品中因非法使用造成玉米赤霉醇残留或来自食品中真菌毒素的污染而造成化合物残留进行了区别鉴定，其后便着手开发对该类化合物的快速筛选和确证分析方法。Blokland MH 等在这一大背景条件下开发了基于两步净化的 GC/MS 分析方法。欧盟指令 2002/657 中发布了有效的尿样中玉米赤霉醇 GC/MS 检测标准，其 CC（alpha）和 CC（beta）分别如下：ZER 为 0.06-0.11 μg/L；TAL 为 0.07-0.12 μg/L；α-ZOL 为 0.07-0.11；β-ZOL 为 0.21-0.36；ZON 为 0.35-0.60 μg/L；ZAN 为 0.19-0.33 μg/L。以上文献为研究建立该类化合物 GC/MS 检测方法都提供了有价值的启发和参考。

我国有关饲料中雷琐酸内酯类化合物的检测方法标准有《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》、《GB/T 19540-2004 饲料中玉米赤霉烯酮的测定》、《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》等。农业部1486号公告－6-2010为我单位制定，规定了饲料中雷琐酸内酯类化合物的气相色谱-质谱检测方法。它适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中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、玉米赤霉烯酮和玉米赤霉酮的测定；对6种化合物的检测限均为2 μg/kg，定量限均为5 μg/kg。GB/T 19540-2004规定了玉米赤霉烯酮的薄层色谱测定方法和酶联免疫吸附测定法，适用于配合饲料和饲用谷物原料中ZNE的测定。薄层色谱测定方法的最低检测量为20 ng，酶联免疫吸附测定方法的最低检测量为0.25 ng。GB/T 28716-2012规定了饲料中玉米赤霉烯酮含量的免疫亲和柱净化高效液相色谱的测定方法，检测限为2 μg/kg，定量限为10 μg/kg。

农业部1486号公告－6－2010 标准方法要经过两次液液分配、多次氮气吹干、外加固相萃取小柱净化过程，样品前处理过程过于复杂，不利于我国饲料监控过程中的时效要求。此外，甲醇提取对少数添加剂预混合饲料的回收率不理想。因此，我们对农业部1486号公告-6-2010的饲料检测方法进行了修订。

3. 主要工作过程

本标准方法研制的主要工作过程如下：

2018年7月，成立标准编制小组，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案。

2018年9月-10，查询和收集了国内外相关标准和文献资料，制定了初步的实验方案。

2018年11月-2019年10月，方法建立和条件优化。

2019年11月-2020年11月，检测方法技术参数的确定并形成征求意见稿。

2020年12月-2021年11月，完成三家单位的方法验证试验。

2020年11月-2022年6月 多次标准征求意见。

2022年6月24日 形成预审稿。

2022年7月14日 召开标准预审会

2022年7月23日 形成公开征求意见稿

二、标准编制原则、主要技术内容及确定依据

1. 标准编制原则

1.1 执行标准

1、依据GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求，以参照国内外相关标准与文献为基础进行修订。

在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

1.2 先进性

对本标准中有关内容的确定，主要借鉴参考本领域国内先进研究技术，以提高本标准中检测技术的准确性和可重复性。

1.3 可操作性

在标准制定过程中，始终把经济实用和可操作性作为重要的依据，广泛征求生产单位和使用单位的意见，使本标准便于实施。

1.4 通用性

本标准制定过程中收集不同种类的产品进行检测并归纳总结出适用范围和方法检出限。

2. 主要技术内容确定依据

本标准的适用范围为配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料等常用畜禽饲料。

本标准使用各项气相色谱-质谱仪进行检测方法开发。使用仪器型号为普及率较高的 Agilent 公司的气相色谱-质谱仪。

本标准方法学考察包括检测限（LOD）和定量限（LOQ）。其中 LOD 拟设定信噪比为 3 时的样品添加浓度，LOQ 拟设定为信噪比为 10 时且回收率结果和相对标准偏差符合要求的样品添加浓度。本标准设低、中、高 3 个添加浓度进行回收率测定，浓度分别为 2 倍方法定量限、5～20 倍定量限浓度和 50 倍～200 倍定量限浓度。定量限以上添加浓度的回收率范围应该在 80%～120%之间，结果的变异系数应在 20%以内。标准曲线则使用经空白饲料样品溶液稀释标准贮备溶液得到的系列标准工作溶液，设置 5 个点以上进行测定。

3. 本方法与原标准方法的区别

3.1 标准标题修改

本标准原名称为《饲料中雷琐酸内酯类药物的测定 气相色谱－质谱法》，现改名为《饲料中雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱－质谱法》。一方面，被用作促生长药物的主要是α-玉米赤霉醇，且我国早在 2002 年《食品动物禁用的兽药及其化合物清单(中华人民共和国农业部公告第 193 号)》中明确规定玉米赤霉醇等具有雌激素样作用的物质禁止用于所有食品动物，因此其他几种化合物被称作药物不太合适；另一方面，这几种化合物中的玉米赤霉烯酮是六大常见的霉菌毒素之一，在饲料中天然存在，在大众认知上难以将其称呼为药物，因此，特将标准名称修改。

3.2 主要技术区别

在原标准以及参考文献的基础上，通过对提取溶剂的选择和条件优化、净化方法的优化、以及仪器检测条件的优化，修订了饲料中雷琐酸内酯类化合物的气相色谱-质谱检测标准方法。饲料中的

雷琐酸内酯类化合物经乙腈-水（8+2，v/v）提取，免疫亲合色谱柱净化后，用气相色谱-质谱法测定，外标法定量。与原方法相比，修订后的方法前处理过程简化很多，且能满足对饲料中雷琐酸内酯类化合物含量的检测要求。本方法与原标准方法对比见表 1。

表 1 本方法与原标准方法对照表

步骤	序号	农业部 1486 号公告-6-2010	免疫亲和柱法
样品前处理过程	1.	甲醇提取	乙腈-水（80+20，v/v）提取
	2.	——	取 2 mL 上清经磷酸缓冲液（pH7.0）稀释
	3.	转换溶剂为乙醚	——
	4.	乙醚-0.1%碳酸钠溶液液液分配，除水相	——
	5.	5 g 无水硫酸钠干燥	——
	6.	转换溶剂为乙腈	——
	7.	乙腈-正己烷液液分配，除上层	——
	8.	加水稀释为 20%乙腈液	——
	9.	60 mgHLB 柱净化	1500 ng 免疫亲和柱净化
仪器分析条件	10.	柱温程序：保持 10 min	柱温程序：保持 5.2 min
	11.	玉米赤霉酮定量离子：m/z449	玉米赤霉酮定量离子：m/z307
	12.	玉米赤霉醇定量离子：m/z433	玉米赤霉醇定量离子：m/z307

3.3 基质匹配曲线定量

在空白饲料样品中添加 50 μg/kg 的雷琐酸内酯类化合物，经免疫亲和柱净化并衍生后，经 GC/MS 测定，计算得到各种饲料基质添加回收的绝对回收率，如表 2 所示。结果发现各饲料的绝对回收率普遍偏高，全部在 110%以上，部分达到了将近 140%，有较强的基质增强效应。在净化后空白基质中分别加入 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 标准工作液，衍生化后进样分析，绘制基质匹配标准曲线，得到各化合物回收率在 85%-100%之间，满足定量分析的要求，因此采用基质匹配曲线定量。

表 2 基质匹配曲线校准前后的回收率比较

化合物	饲料	绝对回收率	校正回收率
玉米赤霉酮	配合饲料	123.25	92.92
	浓缩饲料	135.72	91.09

	精料补充料	114.73	88.57
	添加剂预混合饲料	110.06	97.79
玉米赤霉烯酮	配合饲料	119.90	95.77
	浓缩饲料	122.12	91.67
	精料补充料	122.98	87.24
	添加剂预混合饲料	117.52	89.64
α-玉米赤霉醇	配合饲料	131.88	92.52
	浓缩饲料	134.18	87.09
	精料补充料	123.79	93.28
	添加剂预混合饲料	121.47	91.49
β-玉米赤霉醇	配合饲料	138.42	88.77
	浓缩饲料	128.10	94.60
	精料补充料	115.72	90.16
	添加剂预混合饲料	129.38	90.97
α-玉米赤霉烯醇	配合饲料	123.72	90.67
	浓缩饲料	130.22	90.42
	精料补充料	119.08	96.35
	添加剂预混合饲料	117.77	96.23
β-玉米赤霉烯醇	配合饲料	123.54	88.18
	浓缩饲料	135.01	99.85
	精料补充料	121.92	90.48
	添加剂预混合饲料	121.03	94.42

3.4 与原标准方法的净化效果及准确度和精密度比较

对不同的饲料基质各三份，分别按照原标准方法与本方法进行前处理过程和上机测定，计算得在各饲料基质中雷索酸内酯类化合物的平均回收率，如表 3 所示。结果显示，原标准方法与本方法对六种化合物回收率的结果差别不大，但本方法的回收率稳定在 84%以上，原标准方法对配料饲料中的玉

米赤霉酮和α-玉米赤霉醇的回收率低于 80%，且使用原标准方法计算得到三个平行样品间的标准偏差大都高于本方法，表明本方法测定结果可能更稳定。

表 3 原标准方法与本方法对雷索酸内酯类化合物回收率的比较

化合物名称	饲料	原标准		本方法	
		回收率	标准偏差	回收率	标准偏差
玉米赤霉酮	配合饲料	78.44	12.72	92.74	6.26
	浓缩饲料	91.03	7.70	88.41	7.27
	精料补充料	86.93	6.75	90.04	2.27
	添加剂预混合饲料	97.05	4.04	89.17	1.28
玉米赤霉烯酮	配合饲料	90.31	4.97	85.72	8.22
	浓缩饲料	91.75	8.47	92.40	2.33
	精料补充料	88.48	12.28	94.58	2.49
	添加剂预混合饲料	86.80	10.58	94.81	7.36
α-玉米赤霉醇	配合饲料	79.62	8.94	87.09	1.52
	浓缩饲料	87.46	4.08	89.28	1.40
	精料补充料	90.93	9.64	86.21	3.02
	添加剂预混合饲料	92.25	12.55	84.27	7.86
β-玉米赤霉醇	配合饲料	90.84	6.34	98.00	7.98
	浓缩饲料	90.11	4.49	89.59	4.46
	精料补充料	91.14	8.46	90.03	5.86
	添加剂预混合饲料	82.60	12.52	88.04	3.96
α-玉米赤霉烯醇	配合饲料	80.01	11.84	89.16	5.44
	浓缩饲料	94.42	4.80	95.23	1.55
	精料补充料	86.47	4.93	87.42	7.20
	添加剂预混合饲料	84.95	9.75	91.38	1.47
β-玉米赤霉烯醇	配合饲料	84.96	9.69	97.39	8.68
	浓缩饲料	90.88	3.47	84.10	7.08

	精料补充料	90.18	6.84	86.72	1.72
	添加剂预混合饲料	87.37	11.38	86.72	4.78

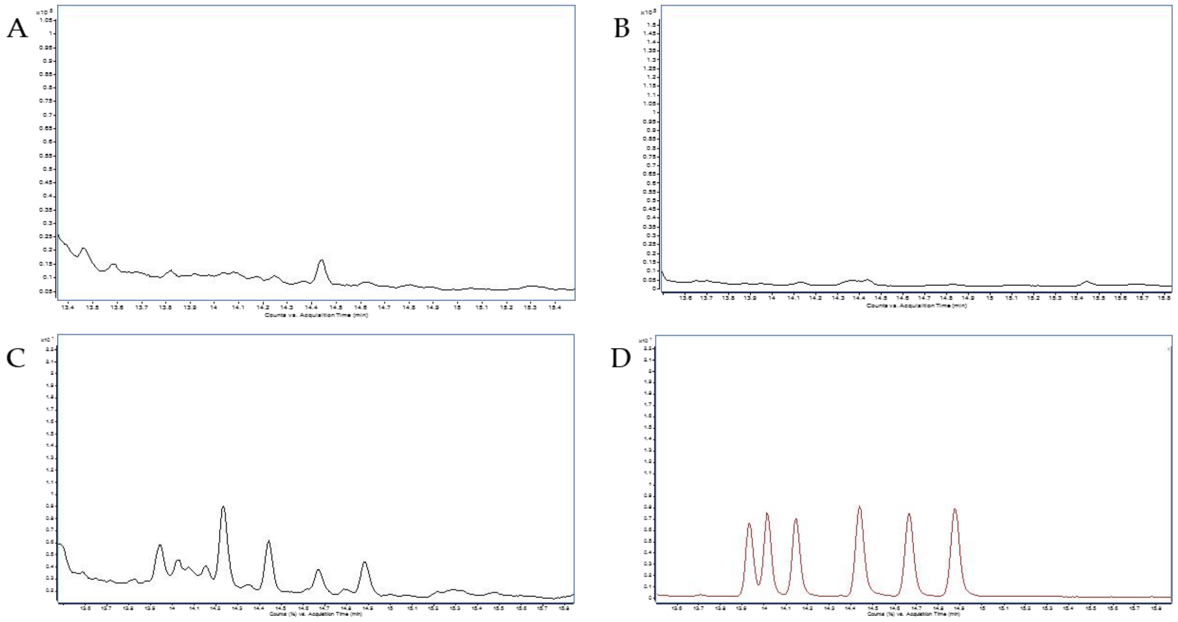

图 1　SPE 与 IAC 净化效果比较

注：A：SPE 净化后空白样品色谱图；B：IAC 净化后空白样品色谱图；C：SPE 净化后添加样品色谱图；D：IAC 净化后添加样品色谱图

4. 测试条件的确定

4.1 仪器分析条件

本方法参考《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》的仪器分析条件，对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、玉米赤霉烯酮和玉米赤霉酮进行测定。采用Rtx-5MS毛细管柱(DB-5MS，30 m*0.32 mm*0.25 μm)以及原来的DB-5MS分离柱(DB-5MS，30 m*0.25 mm*0.25 μm)均进行了分离检测，载气流速为1 mL/min，进样口温度280 ℃，炉温初始120 ℃，以15 ℃/min的速率升至280 ℃，并在此温度下保持5.2 min，色谱时间15.9 min。在此条件下，六种雷琐酸内酯类化合物分离良好，但前者的分离比后者略佳。选择仪器响应值最强的离子作为定量离子，各化合物的定性定量离子见表4。

表 4　雷琐酸内酯类化合物的质谱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	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

4.2 称样量

每种饲料基质分别称取 2g、5g 和 5g 样品，用 20mL、20mL 和 50mL 提取溶剂提取，经玉米赤霉烯酮免疫亲和柱净化，衍生化后 GC/MS 测定，基质匹配曲线定量，计算得回收率，如表 5 所示。结果显示三种称样量与提取溶剂组合对雷琐酸内酯类化合物的回收率没有明显差异，考虑到饲料中雷琐酸内酯类化合物含量可能较低，称样量太少可能影响方法的灵敏度，因此选择称取 5g 样品；从环保角度考虑，20mL 提取溶剂即能得到较好的回收率，且与 50mL 提取溶剂所得到的回收率没有显著差异，因此最终确定方法称取 5g 样品，使用 20mL 提取溶剂提取。

表 5 不同试样与提取液比例下雷琐酸内酯类化合物的回收率

化合物	饲料	2 g 试样+20 mL 提取溶剂	5 g 试样+20 mL 提取溶剂	5 g 试样+50 mL 提取溶剂
玉米赤霉酮	配合饲料	97.30	94.61	96.13
	浓缩饲料	88.17	93.86	93.78
	精料补充料	99.43	97.51	96.55
	添加剂预混合饲料	88.10	94.59	95.10
玉米赤霉烯酮	配合饲料	96.97	96.98	93.58
	浓缩饲料	91.90	90.85	89.63
	精料补充料	99.98	89.99	99.79
	添加剂预混合饲料	92.20	95.39	96.34
α-玉米赤霉醇	配合饲料	93.71	94.04	95.82
	浓缩饲料	95.33	89.40	87.03
	精料补充料	93.00	92.89	99.16
	添加剂预混合饲料	98.78	97.65	98.47
β-玉米赤霉	配合饲料	95.35	97.65	95.30

醇	浓缩饲料	97.22	87.07	90.99
	精料补充料	88.28	96.52	96.86
	添加剂预混合饲料	97.65	91.74	99.14
α-玉米赤霉烯醇	配合饲料	89.96	93.69	87.76
	浓缩饲料	98.66	93.51	87.96
	精料补充料	90.67	99.54	94.66
	添加剂预混合饲料	97.18	88.13	97.45
β-玉米赤霉烯醇	配合饲料	98.42	99.51	96.73
	浓缩饲料	94.74	88.15	92.75
	精料补充料	93.75	91.82	89.22
	添加剂预混合饲料	90.82	88.96	98.44

4.3 样品前处理

（1）提取溶剂

文献报道的饲料中雷琐酸内酯类化合物检测方法采用甲醇、乙酸乙酯、甲醇-水（80+20）、乙腈-水（80+20）作为提取溶剂。我们使用这些提取溶剂进行了多种饲料（猪配合饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料）的实验（回收率见表 6-表 9）。结果表明，除乙酸乙酯外，其它提取溶剂均具有较好的提取效果，但甲醇相对于其它两种提取溶剂而言对六种化合物的提取率略低，加入适量水后，提取液甲醇-水（80+20）和乙腈-水（80+20）对多种饲料中化合物提取的回收率均很高，前者提取回收率为 75%至 87%，后者对化合物的提取效率均超过了 84%。且后者的共提取杂质比前者要少很多。经过综合考虑及进一步优化，我们选择乙腈-水（体积比 80:20）作为样品提取液。

表 6 甲醇对雷琐酸内酯类化合物的提取回收率（单位：%）

化合物名称	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	标准偏差
玉米赤霉酮	70.33	79.12	78.59	76.01	6.48
玉米赤霉烯酮	72.73	84.05	79.62	78.80	7.24
α-玉米赤霉醇	73.46	73.27	84.50	77.07	8.35
β-玉米赤霉醇	76.40	84.69	74.67	78.59	6.82

α-玉米赤霉烯醇	76.67	87.10	82.58	82.12	6.37
β-玉米赤霉烯醇	75.66	82.02	83.32	80.33	5.11

表 7 80%甲醇对雷琐酸内酯类化合物的提取回收率（单位：%）

化合物名称	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	标准偏差
玉米赤霉酮	81.55	77.23	84.48	81.09	4.50
玉米赤霉烯酮	76.16	76.40	75.65	76.07	0.50
α-玉米赤霉醇	82.76	88.29	82.97	84.68	3.70
β-玉米赤霉醇	75.14	93.46	80.42	83.01	11.36
α-玉米赤霉烯醇	88.96	87.18	87.48	87.87	1.09
β-玉米赤霉烯醇	85.88	83.46	82.88	84.08	1.89

表 8 乙腈-水（80+20）对雷琐酸内酯类化合物的提取回收率（单位：%）

化合物名称	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	标准偏差
玉米赤霉酮	90.84	92.44	99.78	94.35	5.05
玉米赤霉烯酮	96.43	97.78	91.61	95.27	3.40
α-玉米赤霉醇	94.99	97.56	98.07	96.87	1.71
β-玉米赤霉醇	92.92	90.74	99.25	94.30	4.69
α-玉米赤霉烯醇	89.20	84.83	89.96	88.00	3.15
β-玉米赤霉烯醇	90.62	91.52	94.35	92.16	2.11

表 9 乙酸乙酯对雷琐酸内酯类化合物的提取回收率（单位：%）

化合物名称	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	标准偏差
玉米赤霉酮	11.02	9.48	10.25	10.25	0.77
玉米赤霉烯酮	7.76	14.23	18.69	13.56	5.50
α-玉米赤霉醇	0.23	—	—	0.08	0.13
β-玉米赤霉醇	12.26	—	—	4.09	7.08
α-玉米赤霉烯醇	0.25	—	—	0.08	0.14
β-玉米赤霉烯醇	0.82	—	—	0.27	0.47

（2）衍生化条件

众多文献中使用硅烷化衍生推荐的温度在60℃左右，时间一般在10-30min左右，我们比较了在不同衍生温度和时间下雷索酸内酯类化合物的响应值，由图2可以明显看出，除玉米赤霉酮外，其它五种化合物的响应值均在衍生温度为60℃、衍生时间为15min时最高，而对于玉米赤霉酮，仅有在衍生温度为70℃、衍生时间为30min时响应值略高，但差异不显著。综合时间成本考虑，选择在60℃下衍生15min作为衍生条件。同时，我们考察了衍生后产物的稳定性，分别在室温和4℃下储存上机液。结果显示（图3-4），在室温条件下，ZAN与ZON储存24 h内响应值没有显著改变，其它几种化合物在室温下储存不超过16 h时，响应值也无显著变化；在4℃储存温度下，48 h内六种化合物的响应值均没有显著变化，说明在低温下保存48 h内六种化合物衍生产物稳定性良好。提示在大量样品同时测定时，预处理好的上机液可保存在4℃下，分批次取出上机测定。

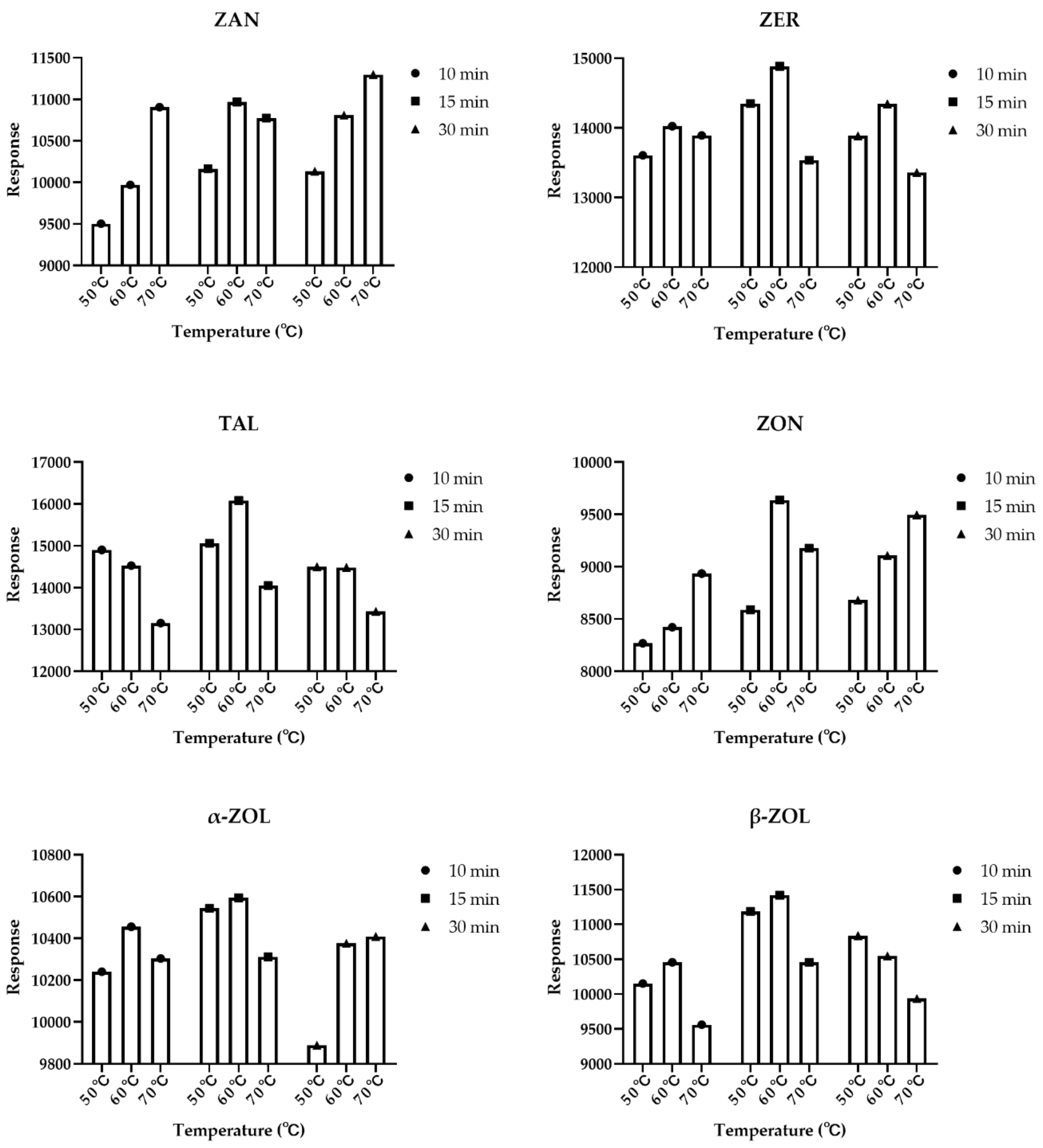

图 2 不同衍生条件下雷索酸内酯类化合物的响应值比较

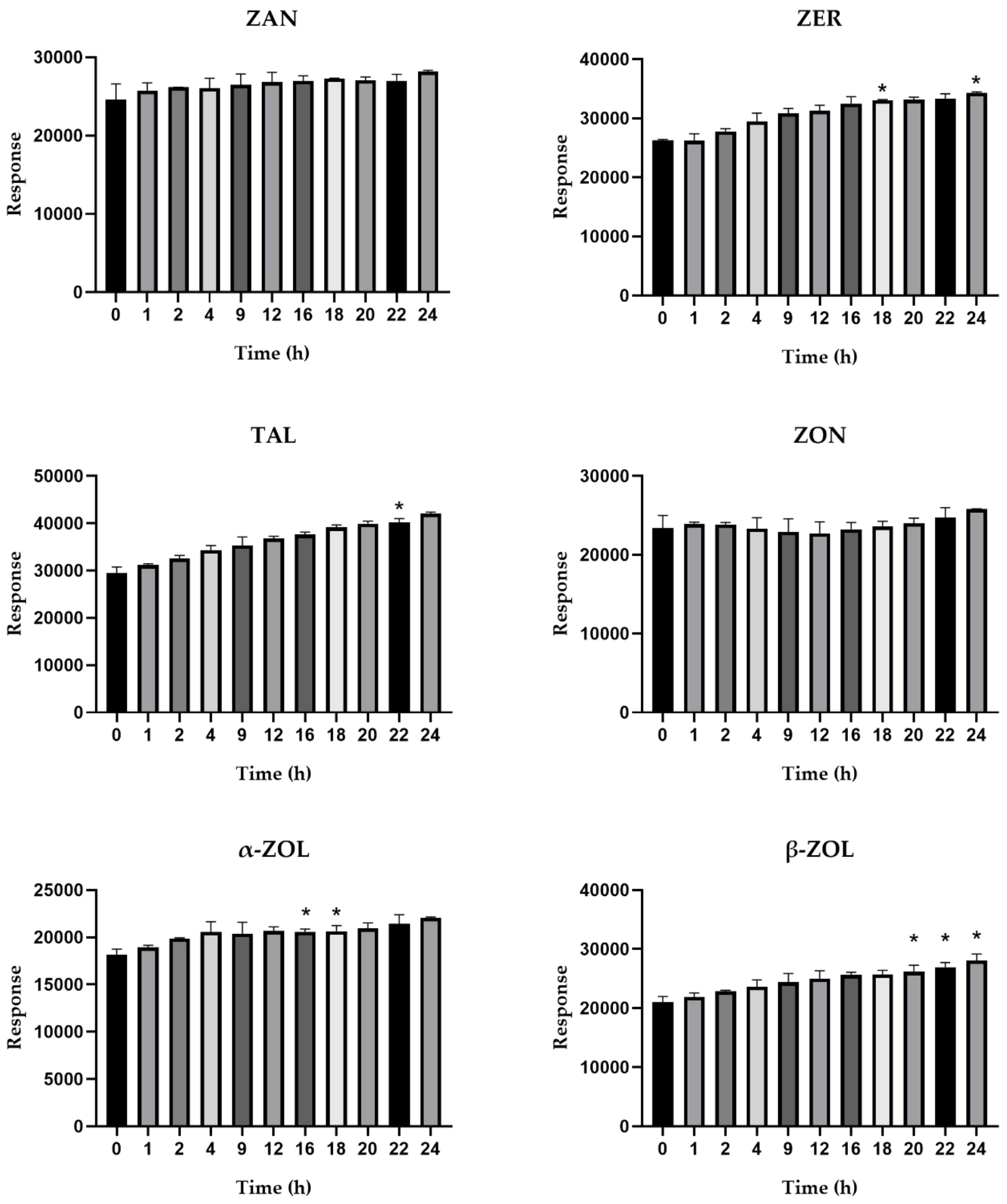

图 3 室温下雷索酸内酯类化合物衍生产物的稳定性

注：*：与 0 h 比较，P＜0.05（Dunnett 检验）

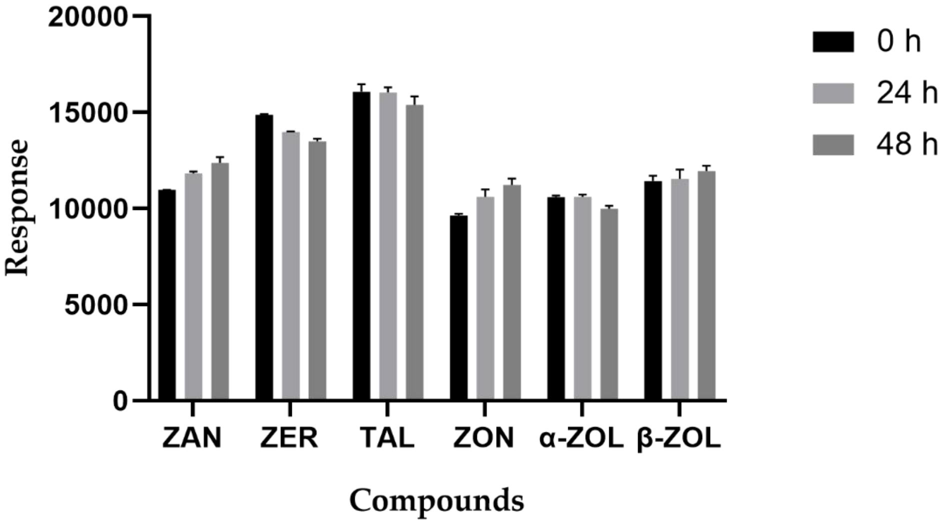

图 4　4℃下雷索酸内酯类化合物衍生产物的稳定性

（3）玉米赤霉烯酮免疫亲和柱

玉米赤霉烯酮免疫亲和柱能够特异性的纯化与浓缩样品中的玉米赤霉烯酮及其类似物。亲和柱方法广泛地应用于食品、饲料、医药等样品的提取，该方法速度快、操作简单、准确性高，对准确灵敏的测定样品中的雷锁酸内酯类化合物起到十分重要的作用。相关应用和文献报道较多。本方法采用玉米赤霉烯酮免疫亲和柱进行样品净化，与原标准方法的 HLB 小柱净化相比，样品前处理过程得到了很大的简化，有效地节省了分析的操作过程和时间。为了验证不同厂家玉米赤霉烯酮免疫亲和柱吸附效果是否存在差异，选择了从三家不同生产商处购买的玉米赤霉烯酮免疫亲和柱，用混合标准工作液分别通过三种玉米赤霉烯酮免疫亲和柱，得到的平均回收率如表 10 所示。结果表明，三家的免疫亲和柱效果均佳，对 6 种化合物的平均回收率都在 95%以上，相对标准偏差均在 2%以内，说明各厂家免疫亲和柱性能相差不大，实验时可自由选择。

表 10　通过不同厂家玉米赤霉烯酮免疫亲和柱后的雷琐酸内酯类化合物平均回收率（单位：%）

化合物名称	厂家 1	厂家 2	厂家 3	标准偏差
玉米赤霉酮	98.70	97.33	98.51	0.76
玉米赤霉烯酮	97.23	96.11	97.25	0.68
α-玉米赤霉醇	95.74	98.16	97.67	1.32
β-玉米赤霉醇	95.94	99.08	97.01	1.64
α-玉米赤霉烯醇	96.68	97.49	98.63	1.00
β-玉米赤霉烯醇	99.01	97.57	97.21	0.97

经过优化，确定了以下样品前处理方法：

（1）样品提取及稀释：准确称取 5 g 样品（精确至 0.0001 g）于 50 mL 离心管中，加入 1.0 g 氯化钠，准确加入 20 mL 乙腈-水（8+2，v/v）溶液，震荡 30 min。然后以 8000 r/min 的转速离心 10 min，准确移取 2.0 mL 上清液并加入 28.0 mL 磷酸缓冲液（pH7.0）溶液稀释，备用。

（2）样品的净化：将上述 30 mL 滤液，以 1-2 滴/秒的流速全部通过玉米赤霉烯酮免疫亲和柱，直至空气进入亲和柱。用 10 mL 纯水以 1-2 滴/秒的流速通过免疫亲和柱，直至空气进入免疫亲和柱。将 3 mL 色谱级甲醇以 1 滴每秒的流速淋洗亲和柱，将淋洗液收集于玻璃试管中。50℃下氮气浓缩吹干，供衍生化用。

（3）衍生：往氮气吹干后的样品中加衍生化试剂 200 μL，涡旋溶解，密封，60℃衍生化 15 min，冷却至室温后加 800 μL 甲苯稀释后供气相色谱-质谱测定。

5. 检测方法技术参数的复核

（1）标准曲线的制备

在给定仪器条件下，对2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL和1000 ng/mL 标准工作液衍生化后进样分析，以标准溶液的浓度为横坐标，峰面积值为纵坐标作标准曲线。测得6种雷琐酸内酯类化合物的标准曲线图见图5，相关方程和线性相关系数见表11-12。结果表明，在2-1000 ng/mL浓度范围内，分析物与峰面积线性关系良好。

表 11 雷琐酸内酯类化合物标准曲线数据（单位：ng/mL）

	2	10	20	50	100	500	1000
玉米赤霉酮	1874	9029	16444	40842	86925	480922	1045216
α-玉米赤霉醇	897	4038	7036	18765	40646	248962	553139
β-玉米赤霉醇	714	3348	7036	13953	32606	203545	453760
玉米赤霉烯酮	1796	8295	15581	39989	83242	503573	1193639
α-玉米赤霉烯醇	1269	5272	10843	31203	65444	414256	943991
β-玉米赤霉烯醇	1498	7562	12935	35219	73117	464603	1070774

表 12 雷琐酸内酯类化合物标准曲线方程

序号	名称	线性方程	相关系数
1.	玉米赤霉酮	y = 449.84x - 5033.3	R^2 = 0.9968
2.	α-玉米赤霉醇	y = 548.41x - 5838	R^2 = 0.997
3.	β-玉米赤霉醇	y = 1034.9x - 6087.5	R^2 = 0.998
4.	玉米赤霉烯酮	y = 1174.5x - 16172	R^2 = 0.9938
5.	α-玉米赤霉烯醇	y = 934.99x - 12707	R^2 = 0.996

6.	β-玉米赤霉烯醇	y = 1058.4x - 14442	$R^2 = 0.9954$

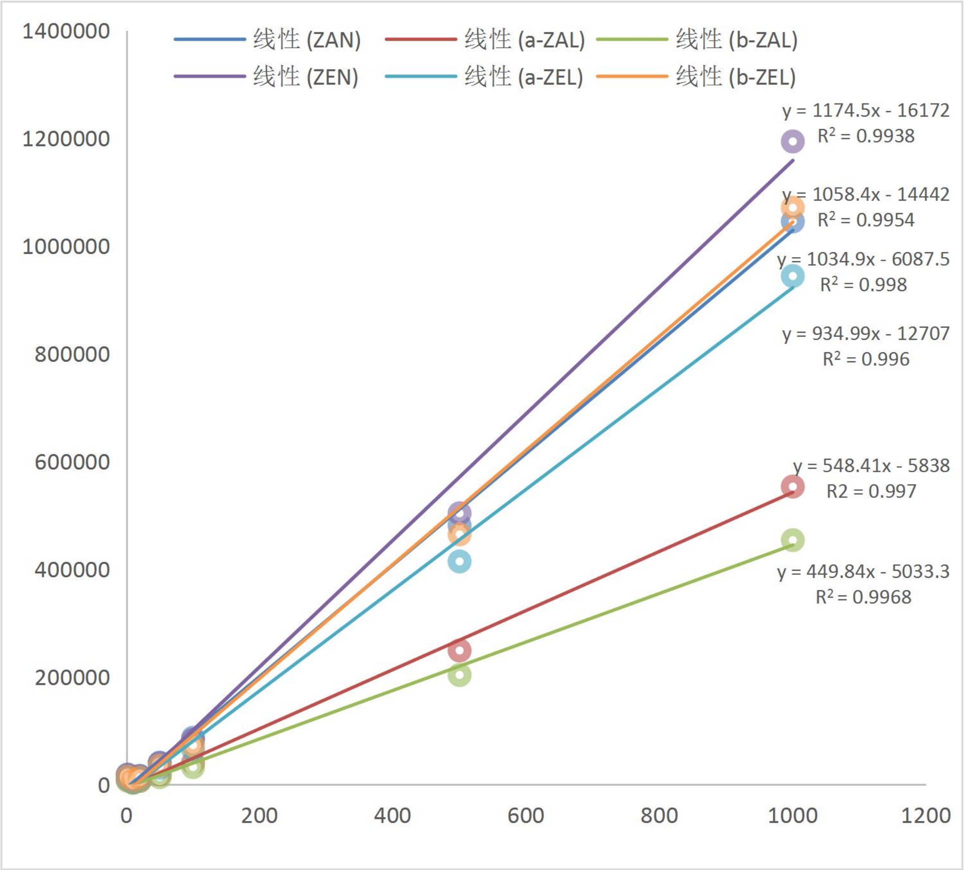

图 5 雷琐酸内酯类化合物标准曲线图

（2） 方法的灵敏度

在试验条件下，以基质添加外标法定量。检测限以空白样品中与基质添加标准品中化合物保留时间相同位置的基线噪声的3倍值为依据，定量限以空白样品在标准品保留时间的基线噪声的10倍值为依据，结果如表13所示，测得配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料和精料补充饲料中6种雷琐酸内酯类化合物的检测限为0.5-1.34 μg/kg，定量限为1.67-4.46 μg/kg，因此确定方法的检测限和定量限分别为2.0 μg/kg和5.0 μg/kg。

表 13 雷琐酸内酯类化合物的检测限和定量限测定（单位：μg/kg）

化合物名称	检测限(n=5)				定量限(n=5)			
	配合饲料	浓缩饲料	预混料	精料补充料	配合饲料	浓缩饲料	预混料	精料补充料
玉米赤霉酮	0.50	0.55	0.50	0.6	1.67	1.83	1.67	1. 99
α-玉米赤霉醇	0.83	0.70	0.89	1.21	2.77	2.33	2.97	4. 02

β-玉米赤霉醇	0.63	0.63	0.60	1.34	2.10	2.10	2.00	4.46
玉米赤霉烯酮	0.63	0.55	0.49	0.61	2.10	1.83	1.63	2.03
α-玉米赤霉烯醇	0.63	0.4	0.54	0.72	2.10	1.33	1.80	2.39
β-玉米赤霉烯醇	0.90	0.57	0.67	0.69	3.00	1.90	2.23	2.29

对鸡的配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料，以及牛精料补充料进行5.0 μg/kg的空白添加回收试验，按前处理方法进行80%乙腈提取和免疫亲和柱净化处理，经衍生化后进GC/MS分析，结果见表14。各化合物的平均回收率水平在75.01-98.43%之间，变异系数在1.48-6.23%之间。该结果表明，定量限添加水平的准确度和精密度均满足痕量分析方法的要求。

表 14　5.0 μg/kg 雷琐酸内酯类化合物的空白添加回收结果（n=3）

化合物名称	饲料	回收率(%)			平均回收率(%)	变异系数（%）
ZAN	配合饲料	85.80	88.78	90.65	88.41	2.77
	浓缩饲料	88.65	89.05	94.72	90.81	3.74
	添加剂预混合饲料	92.50	90.14	92.8	91.81	1.59
	精料补充料	76.53	79.94	80.53	79.00	2.16
ZER	配合饲料	95.69	93.56	93.07	94.11	1.48
	浓缩饲料	82.90	86.60	88.58	86.03	3.35
	添加剂预混合饲料	88.94	89.25	92.08	90.09	1.92
	精料补充料	77.10	72.38	79.55	76.34	3.64
TAL	配合饲料	79.94	85.76	88.91	84.87	5.36
	浓缩饲料	94.55	91.06	88.84	91.48	3.15
	添加剂预混合饲料	96.70	90.43	90.12	92.42	4.02
	精料补充料	71.47	75.66	77.90	75.01	3.26
ZON	配合饲料	86.23	85.37	81.60	84.40	2.92

	浓缩饲料	91.33	85.67	88.30	88.43	3.20
	添加剂预混合饲料	79.05	86.39	89.31	84.92	6.23
	精料补充料	78.82	75.96	80.75	78.51	2.41
α-ZOL	配合饲料	94.55	91.78	88.07	91.47	3.55
	浓缩饲料	92.02	103.50	99.78	98.43	5.95
	添加剂预混合饲料	88.76	94.58	90.07	91.14	3.35
	精料补充料	75.99	73.18	78.85	76.01	2.84
β-ZOL	配合饲料	95.04	85.08	89.50	89.87	5.55
	浓缩饲料	82.38	84.51	89.09	85.33	4.02
	添加剂预混合饲料	76.32	84.50	79.68	80.17	5.13
	精料补充料	77.46	72.95	78.82	76.41	3.07

（3）检测方法的准确度和精密度

准确称取 5 g 空白饲料样品，样品中 ZAN、ZER、TAL、ZON、α-ZOL、β-ZOL 分别设置三个添加水平：配合饲料设 0.01、0.1、0.5 μg/g；浓缩饲料和精料补充饲料设 0.05、0.5、1 μg/g 三个添加水平；添加剂预混合饲料各设 0.5、1、5 μg/g 三个添加回收水平，每个水平 5 个重复，每个重复做 3 次。四种饲料的添加回收结果如表 15-表 21 所示：在不同的饲料基质和化合物添加水平上，各类化合物的添加回收率范围在 70-120%之间，变异系数均小于等于 20%。由此结果可知，对饲料中此 6 类化合物分析的准确度和精密度均符合饲料中污染物检测和饲料化合物添加剂检测的方法要求。

表 15 鸡配合饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

化合物名称	添加浓度（μg/g）	平均回收率（%）	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）
玉米赤霉酮	0.01	87.79	6.64	5.25
	0.1	86.70	7.33	4.77
	0.5	89.51	5.76	3.15
α-玉米赤霉醇	0.01	89.24	4.53	1.45
	0.1	88.94	5.35	7.26

	0.5	90.13	6.93	4.51
β-玉米赤霉醇	0.01	88.86	6.09	8.69
	0.1	91.32	4.39	2.78
	0.5	89.23	6.60	5.99
玉米赤霉烯酮	0.01	86.63	6.94	5.41
	0.1	86.83	5.06	3.18
	0.5	86.44	5.10	5.05
α-玉米赤霉烯醇	0.01	90.71	3.54	6.06
	0.1	90.34	4.93	1.97
	0.5	87.25	5.97	5.64
β-玉米赤霉烯醇	0.01	87.99	5.89	5.17
	0.1	88.76	6.94	6.98
	0.5	92.89	6.56	3.77

表 16 鸡浓缩饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

化合物名称	添加浓度（μg/g）	平均回收率(%)	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）
玉米赤霉酮	0.05	87.13	5.37	7.75
	0.5	87.44	6.35	6.82
	1	91.33	4.69	4.27
α-玉米赤霉醇	0.05	90.78	6.37	5.71
	0.5	85.94	7.42	4.05
	1	90.36	6.72	4.78
β-玉米赤霉醇	0.05	87.36	5.66	7.56
	0.5	87.56	5.65	4.43
	1	87.69	8.18	4.37
玉米赤霉烯酮	0.05	88.92	6.71	3.95
	0.5	90.34	5.58	6.10
	1	88.09	5.81	6.65
α-玉米赤霉烯醇	0.05	85.53	10.77	3.12

	0.5	88.25	7.50	5.69
	1	90.12	5.88	4.58
β-玉米赤霉烯醇	0.05	88.02	4.47	5.26
	0.5	86.20	8.19	4.02
	1	90.77	4.06	8.02

表 17 鸡添加剂预混合饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

饲料	添加浓度（μg/g）	平均回收率(%)	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）
玉米赤霉酮	0.5	88.96	4.05	6.75
	1	89.19	8.41	3.14
	5	86.74	5.88	6.53
α-玉米赤霉醇	0.5	85.65	6.44	9.36
	1	85.64	5.10	10.79
	5	86.93	6.62	4.37
β-玉米赤霉醇	0.5	86.45	6.95	6.63
	1	88.37	5.24	3.68
	5	85.65	4.83	2.78
玉米赤霉烯酮	0.5	92.56	5.08	2.24
	1	90.02	7.98	1.51
	5	84.87	8.63	4.93
α-玉米赤霉烯醇	0.5	90.57	6.45	4.79
	1	87.30	5.66	6.20
	5	88.95	8.12	5.60
β-玉米赤霉烯醇	0.5	89.41	5.51	2.05
	1	82.41	7.70	3.36
	5	85.50	8.20	5.66

表 18 猪配合饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

化合物名称	添加浓度（μg/g）	平均回收率(%)	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）

玉米赤霉酮	0.01	82.42	7.00	7.89
	0.1	82.59	7.09	4.41
	0.5	84.37	10.88	6.18
α-玉米赤霉醇	0.01	85.22	10.56	4.49
	0.1	84.41	8.56	9.98
	0.5	82.87	7.08	10.98
β-玉米赤霉醇	0.01	83.00	7.72	8.97
	0.1	84.91	7.80	8.35
	0.5	83.33	9.55	4.69
玉米赤霉烯酮	0.01	84.59	8.69	7.33
	0.1	83.17	7.05	7.08
	0.5	83.31	7.37	7.21
α-玉米赤霉烯醇	0.01	78.73	7.21	4.19
	0.1	85.01	7.47	5.01
	0.5	81.30	7.43	3.38
β-玉米赤霉烯醇	0.01	87.15	9.30	6.48
	0.1	80.45	7.85	7.28
	0.5	83.02	8.81	3.40

表 19 猪浓缩饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

化合物名称	添加浓度（μg/g）	平均回收率(%)	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）
玉米赤霉酮	0.05	91.31	10.86	2.95
	0.5	89.49	11.18	3.07
	1	82.94	8.87	9.32
α-玉米赤霉醇	0.05	83.28	7.13	6.10
	0.5	86.44	9.25	6.72
	1	83.77	8.50	2.75
β-玉米赤霉醇	0.05	78.07	3.81	2.90
	0.5	82.43	7.65	3.42

	1	81.97	8.38	6.17
玉米赤霉烯酮	0.05	86.14	8.14	4.12
	0.5	85.78	8.73	9.58
	1	78.03	3.63	3.60
α-玉米赤霉烯醇	0.05	85.56	9.98	2.02
	0.5	82.24	8.51	2.35
	1	83.69	10.50	0.82
β-玉米赤霉烯醇	0.05	79.85	5.09	6.14
	0.5	82.00	8.99	3.58
	1	85.45	9.58	7.55

表 20 猪预混混合饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

化合物名称	添加浓度（μg/g）	平均回收率(%)	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）
玉米赤霉酮	0.5	80.23	5.11	2.69
	1	96.71	4.55	2.92
	5	79.25	3.94	3.30
α-玉米赤霉醇	0.5	85.22	10.56	4.49
	1	88.29	11.65	5.76
	5	79.67	6.12	2.42
β-玉米赤霉醇	0.5	95.60	4.68	2.05
	1	79.06	7.81	0.49
	5	83.33	9.55	4.69
玉米赤霉烯酮	0.5	84.59	8.69	7.33
	1	95.11	4.07	2.80
	5	94.98	5.99	2.25
α-玉米赤霉烯醇	0.5	78.73	7.21	4.19
	1	85.01	7.47	5.01
	5	96.34	5.20	0.73
β-玉米赤霉烯醇	0.5	80.63	7.07	2.36

	1	80.45	7.85	7.28
	5	95.93	4.81	2.03

表 21 牛精料补充饲料中雷琐酸内酯类化合物添加回收率和变异系数

化合物名称	添加浓度（μg/g）	平均回收率(%)	批内变异系数（n=5, %）	批间变异系数（n=3, %）
玉米赤霉酮	0.05	79.63	4.93	3.43
	0.5	96.06	4.66	2.10
	1	79.90	5.95	5.32
α-玉米赤霉醇	0.05	77.52	6.77	2.54
	0.5	78.16	5.74	1.65
	1	98.48	5.26	1.21
β-玉米赤霉醇	0.05	79.57	6.26	2.68
	0.5	77.35	6.12	3.34
	1	96.67	4.47	3.96
玉米赤霉烯酮	0.05	88.82	9.76	7.00
	0.5	95.02	5.23	0.38
	1	96.27	3.62	3.02
α-玉米赤霉烯醇	0.05	96.62	4.08	1.57
	0.5	80.95	6.09	2.20
	1	76.82	6.22	2.94
β-玉米赤霉烯醇	0.05	78.75	4.78	4.14
	0.5	95.76	4.70	1.93
	1	95.61	6.14	0.63

（4） 色谱图

以乙腈-水（80+20，v/v）提取试样中的雷琐酸内酯类化合物，经免疫亲和柱净化，衍生化后进气相色谱-质谱检测，基质添加标准溶液外标法定量。该方法的准确度、精密度和灵敏度均达到我国对饲料中雷琐酸内酯类化合物检测的要求。为了清晰地观察和分析杂质对化合物的干扰情况，取 500 μg/kg 饲料添加样品色谱图与空白样品色谱图进行比较，如图 6-26 所示，各色谱图中按出峰位置从左到右顺序排列分别为：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，检测结果表明，在 ZAN、ZER、TAL、ZON、α-ZOL、β-ZOL 出峰位置均无杂峰干扰。为了直观地观察样品中各化合物峰的情况，取 500 μg/kg 饲料添加样品色谱图与 250 μg/L 基质添加标准溶液样品色谱图进行比较，如图 5-25 所示，ZAN、ZER、TAL、ZON、α-ZOL、β-ZOL 的出峰保留时间和峰宽与相同浓度的基质加标溶液差异很小。

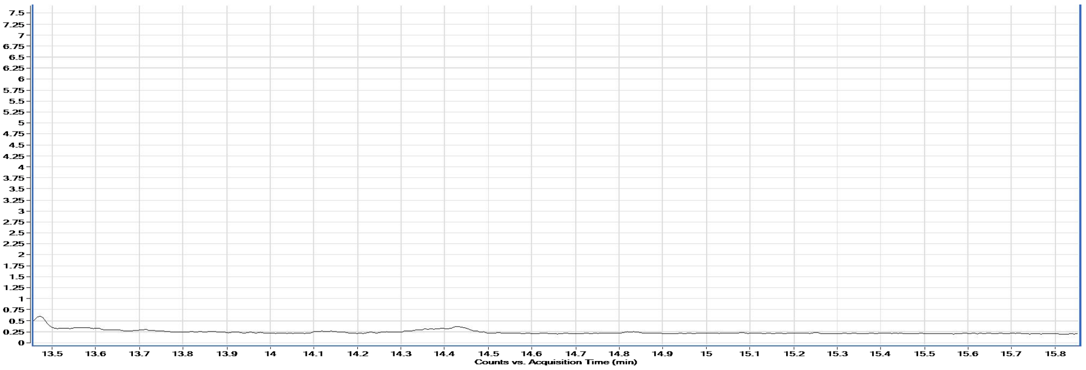

图 6 牛精料补充料空白样品选择离子色谱图

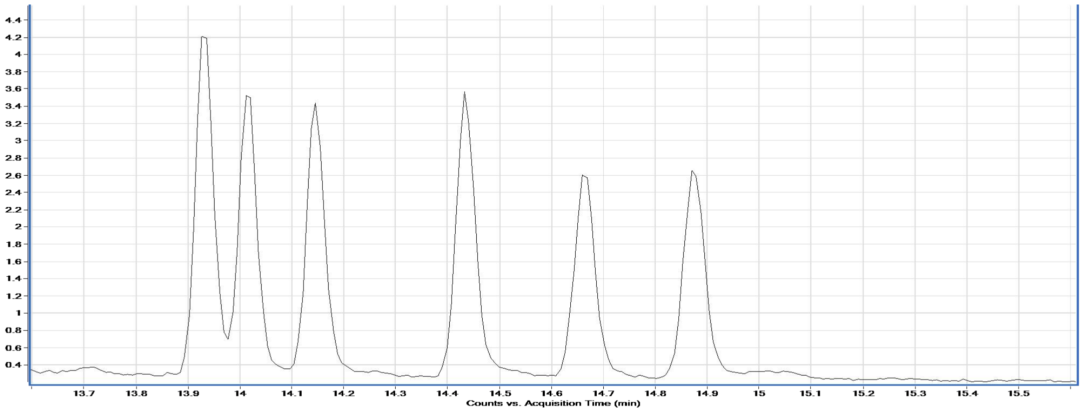

图 7 牛精料补充料空白添加样品 500ppb 选择离子色谱图

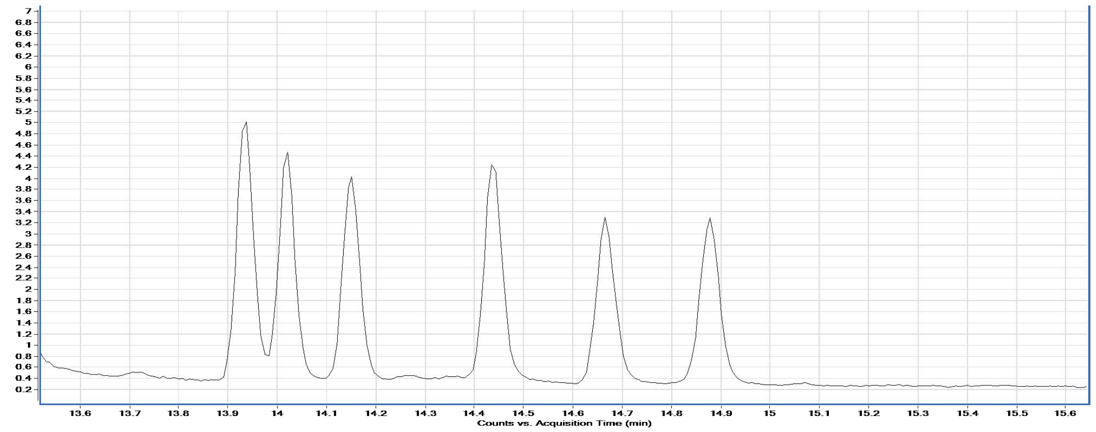

图 8 牛精料补充料 250ppb 基质添加标准溶液选择离子色谱图

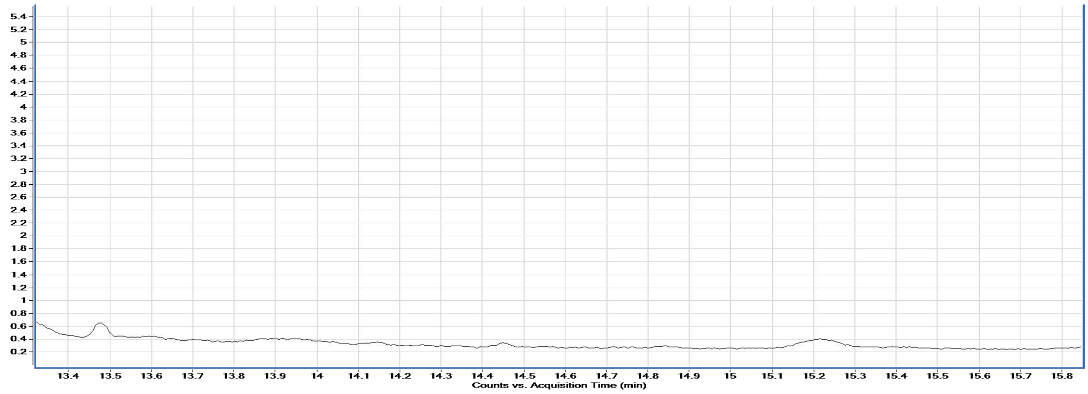

图 9 鸡浓缩饲料空白样品选择离子色谱图

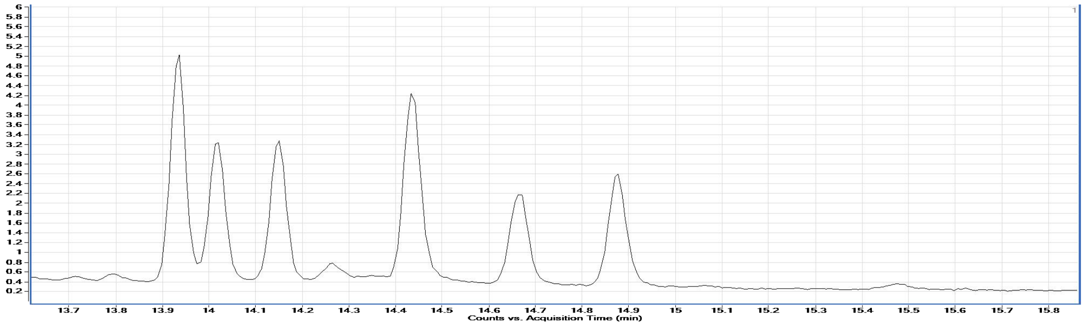

图 10 鸡浓缩饲料化合物添加 500ppb 选择离子色谱图

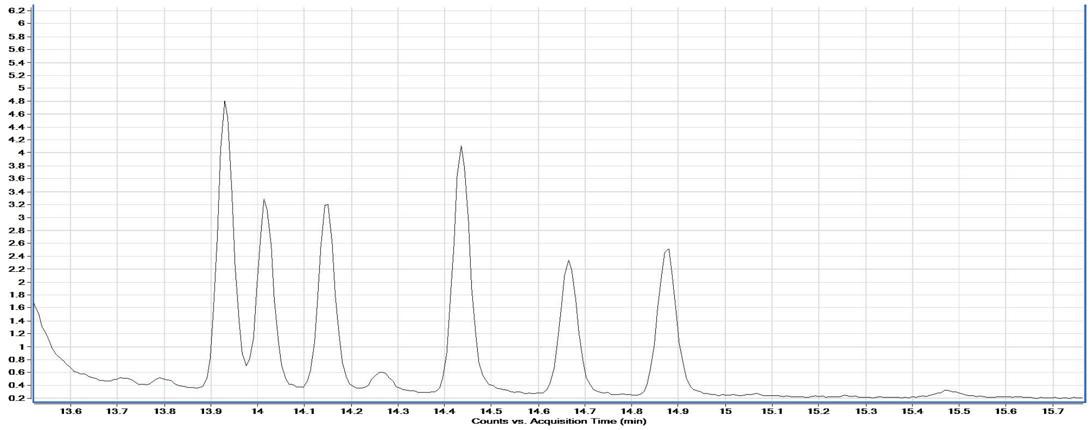

图 11 鸡浓缩饲料基质添加标准溶液 250ppb 选择离子色谱图

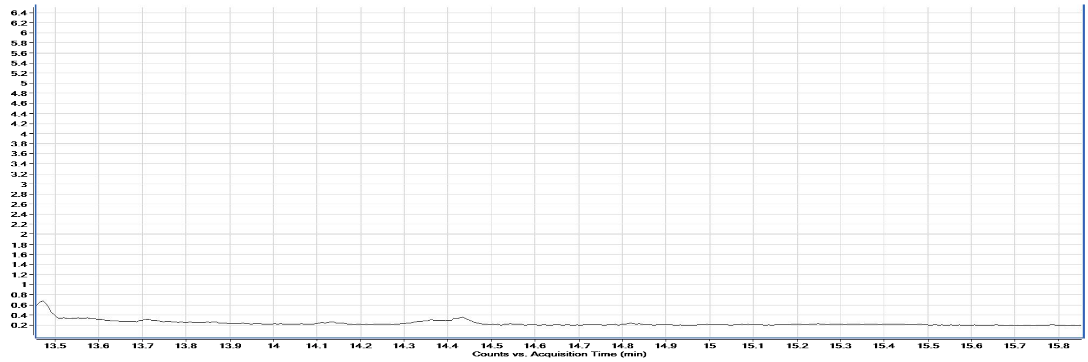

图 12 鸡配合饲料空白样品选择离子色谱

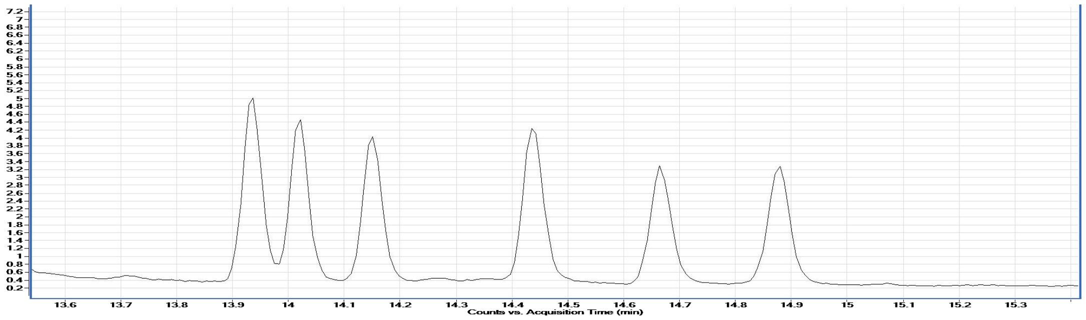

图 13 鸡配合饲料化合物添加 500ppb 选择离子色谱图

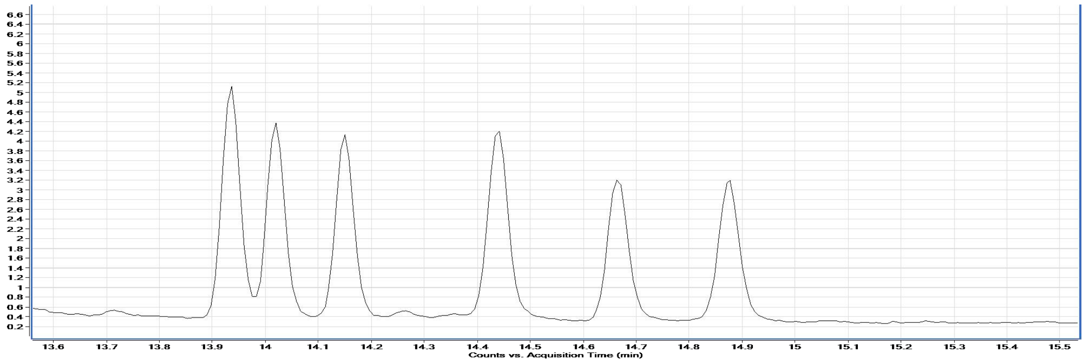

图 14 鸡配合饲料基质添加标准溶液 250ppb 选择离子色谱图

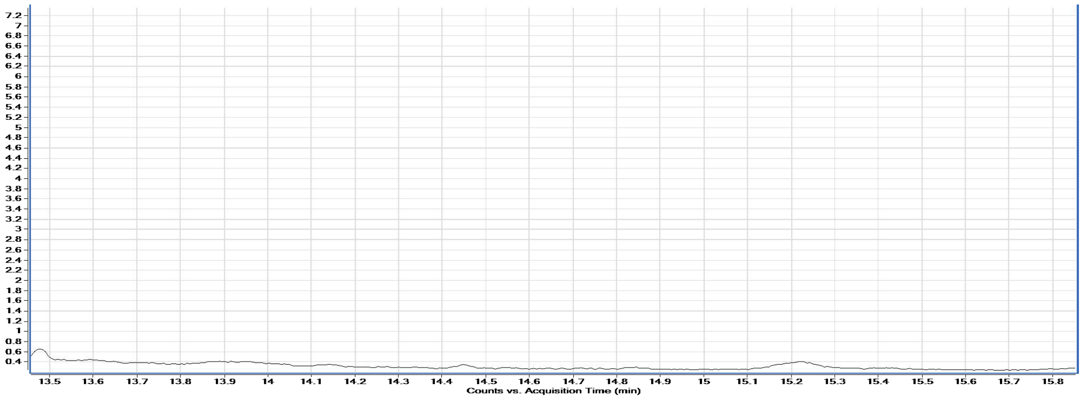

图 15 鸡添加剂预混合饲料空白样品选择离子色谱图

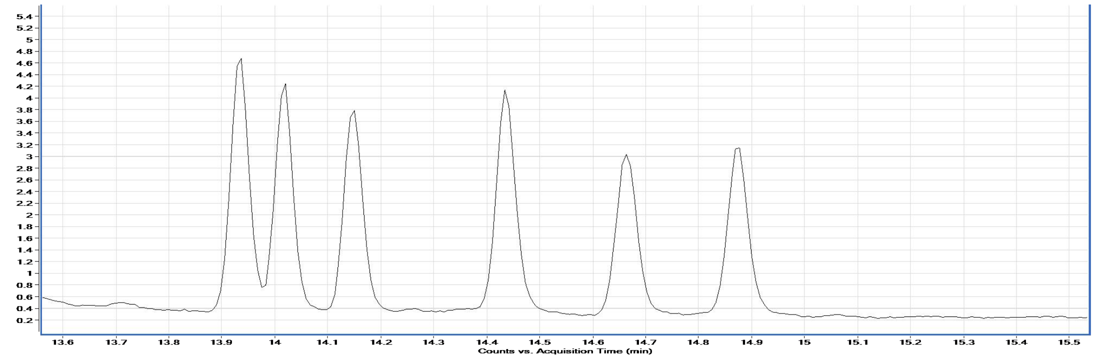

图 16 鸡添加剂预混合饲料化合物添加 500ppb 选择离子色谱图

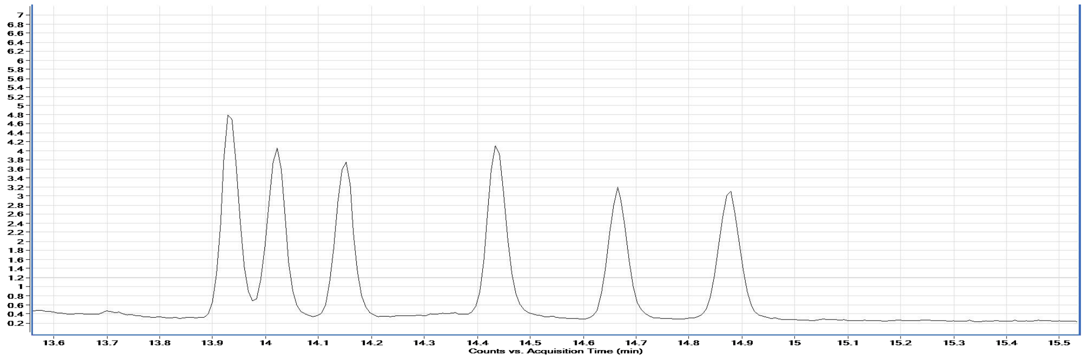

图 17 鸡添加剂预混合饲料基质添加标准溶液 250ppb 选择离子色谱图

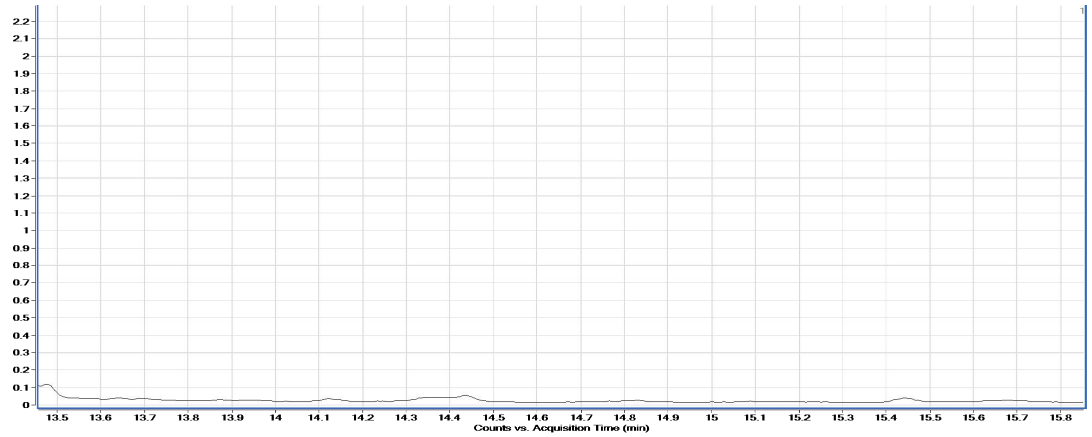

图 18 猪配合饲料空白样品色谱图

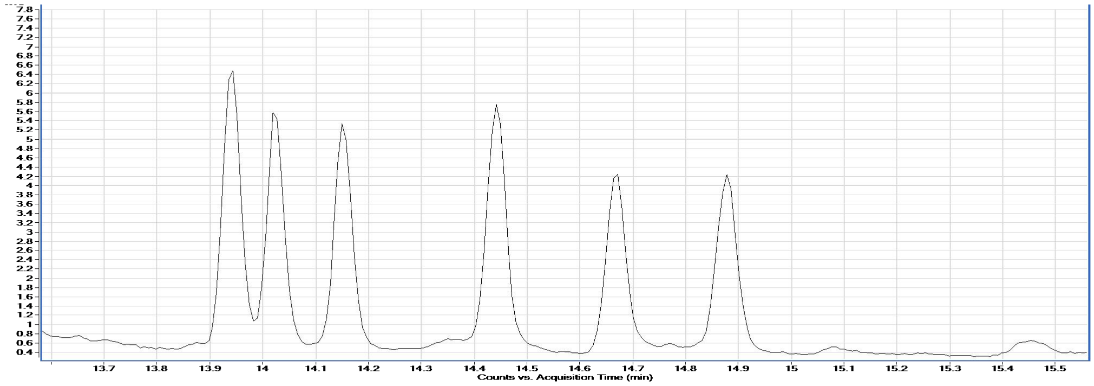

图 19 猪配合饲料化合物添加 500ppb 选择离子色谱图

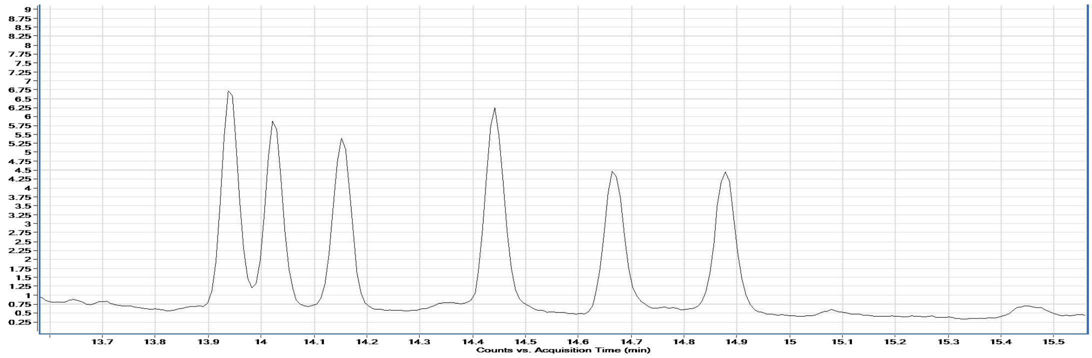

图 20 猪配合饲料基质添加标准溶液 250ppb 选择离子色谱图

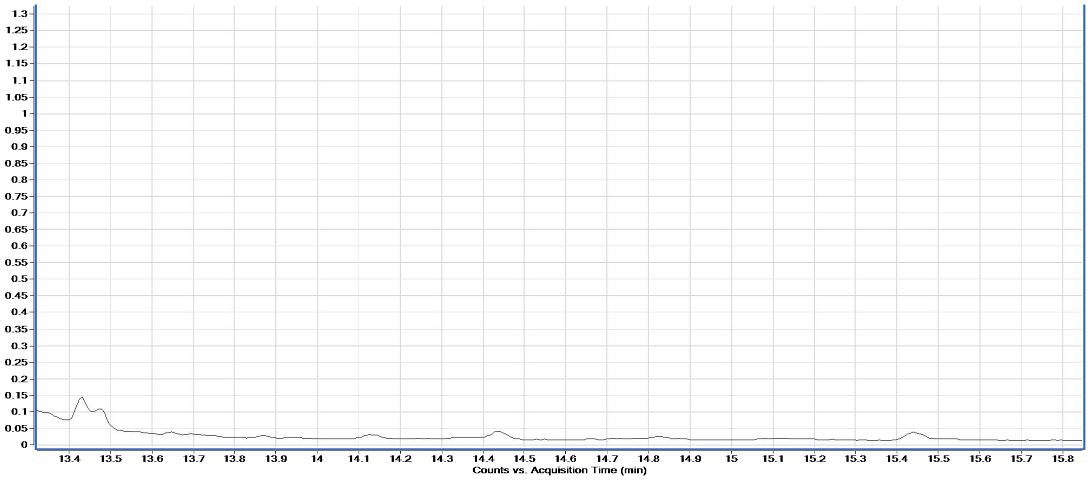

图 21 猪浓缩饲料空白样品选择离子色谱图

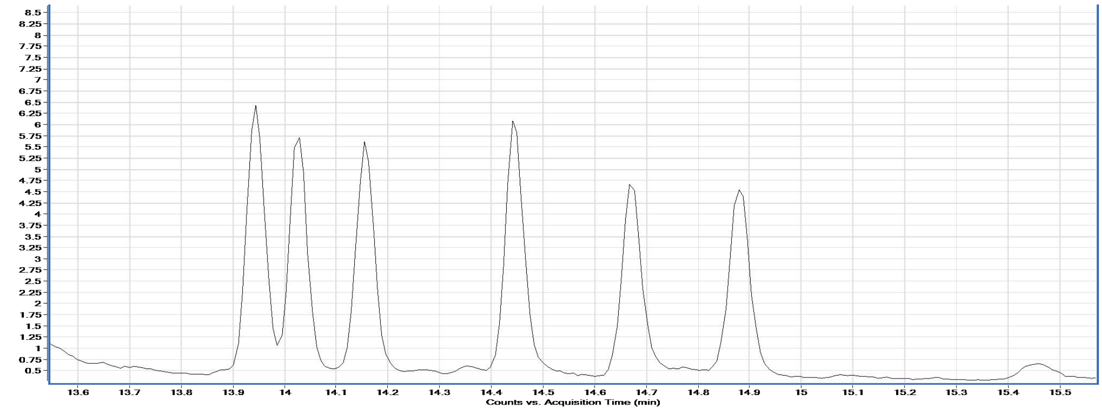

图 22 猪浓缩饲料化合物添加 500ppb 选择离子色谱图

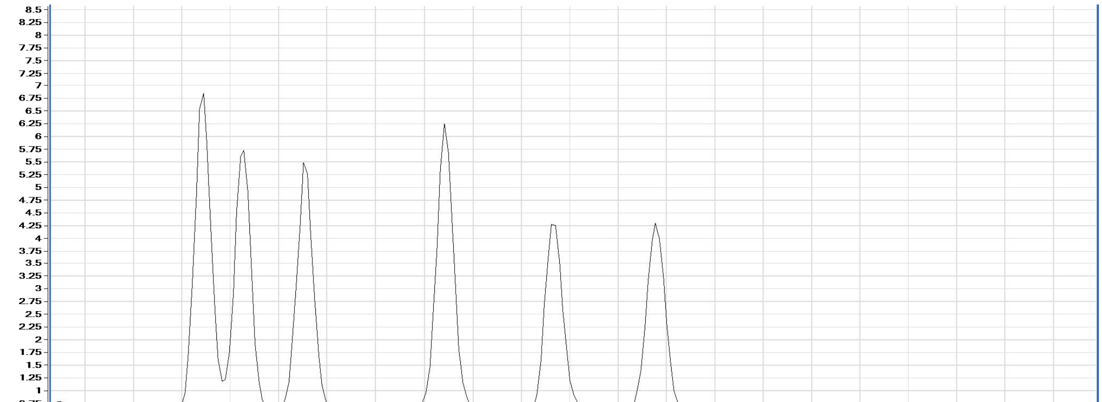

图 23 猪浓缩饲料基质添加标准溶液 250ppb 选择离子色谱图

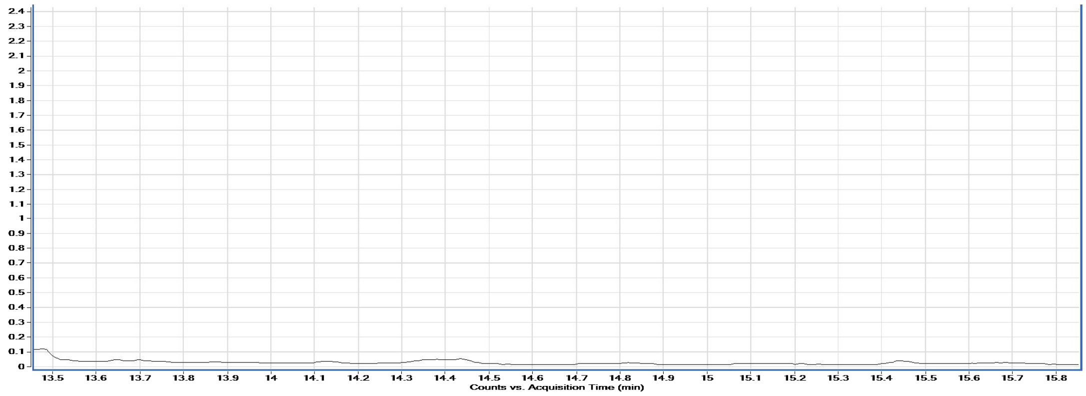

图 24 猪添加剂预混合饲料空白样品选择离子色谱图

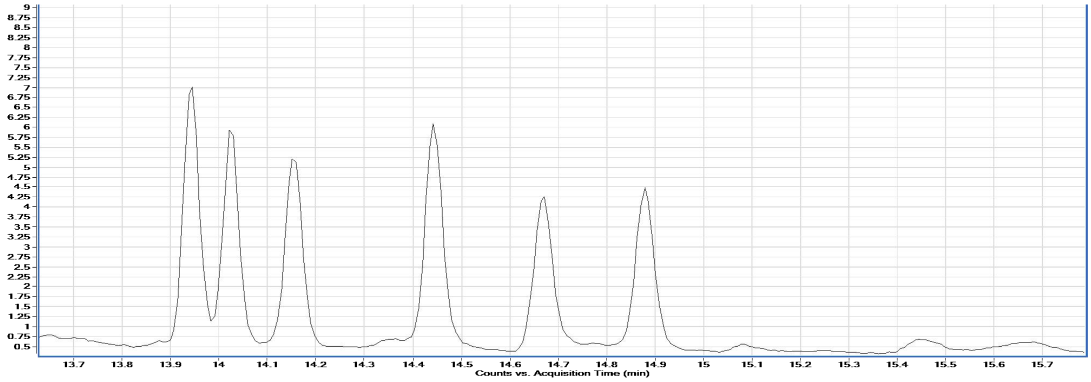

图 25 猪添加剂预混合饲料化合物添加 500ppb 选择离子色谱图

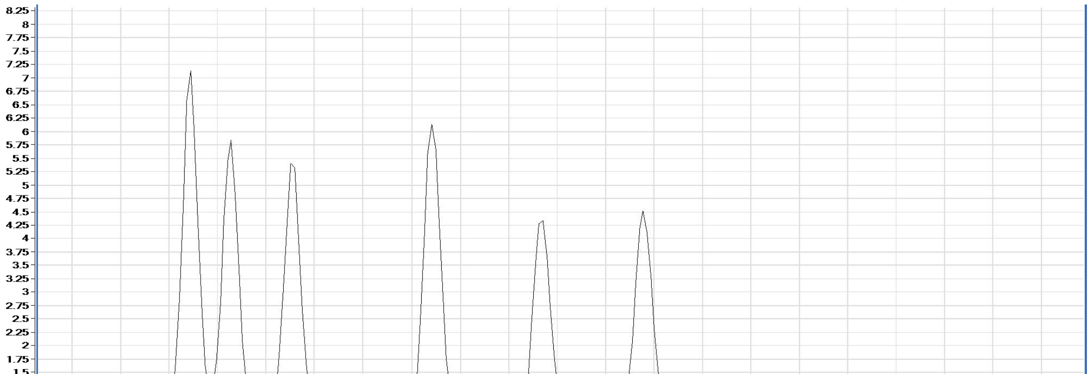

图 26 猪添加剂预混合饲料基质添加标准溶液 250ppb 选择离子色谱表

（5）实际样品检测

收集 10 份实际饲料样本，包括鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、鸡添加剂预混合饲料、猪配合饲料、猪浓缩饲料、猪添加剂预混合饲料和牛精料补充料，按照本方法测定其中玉米赤霉酮、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-玉米赤霉烯醇含量，具体结果如表 22 所示。

表 22 实际样本中雷琐酸内酯类化合物含量测定（单位：μg/kg）

饲料种类	ZAN	ZER	TAL	ZON	α-ZOL	β-ZOL

鸡配合饲料样本 1	＜LOD	＜LOD	＜LOD	19.78	＜LOD	5.76
鸡配合饲料样本 2	5.23	＜LOD	＜LOD	23.92	＜LOD	＜LOD
鸡配合饲料样本 3	8.95	＜LOD	＜LOD	41.15	＜LOD	＜LOD
鸡添加剂预混合饲料样本	＜LOD	＜LOD	＜LOD	147.97	111.44	118.66
鸡浓缩饲料样本	＜LOD	＜LOD	＜LOD	158.05	＜LOD	＜LOD
猪配合饲料样本	7.16	＜LOD	＜LOD	46.26	＜LOD	＜LOD
猪浓缩饲料样本	＜LOD	＜LOD	＜LOD	120.14	＜LOD	17.56
猪添加剂预混合饲料样本 1	＜LOD	＜LOD	＜LOD	620.54	9.77	23.14
猪添加剂预混合饲料样本 2	7.62	＜LOD	＜LOD	205.69	＜LOD	＜LOD
牛精料补充料样本	＜LOD	＜LOD	＜LOD	589.95	9.10	20.36

三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

1 试验验证的分析

本研究完成后，委托农业农村部农产品及加工质量监督检验测试中心(北京)、农业农村部饲料效价与安全监督检验测试中心(北京)和中国农业科学院蜂产品质量监测中心（北京）进行了标准复核实验，对建立的《饲料中雷琐酸内酯类化合物的测定 气相色谱-质谱法》进行了线性范围、检测限和定量限、添加回收率及添加回收结果的相对标准偏差进行了分析，结果表明，采取本实验方法的前处理条件和参考仪器条件，三家单位的复核结果均表现良好。

2 综述报告

本研究建立了饲料中雷琐酸内酯类化合物的气相色谱-质谱检测方法。采用 80%乙腈提取饲料中的雷琐酸内酯类化合物，样品提取液经过免疫亲合萃取柱净化后，GC/MS 检测。该方法的准确度、精密度和灵敏度均达到我国对饲料中雷琐酸内酯类化合物检测的要求。

3 技术经济论证

本研究前处理过程采用饲料中抗生素检测中常用到的乙腈等试剂材料，检测成本较低。净化处理所使用的玉米赤霉烯酮免疫亲合柱性质稳定，在国内外大量被应用于玉米赤霉烯酮及其同类化合物的检测，灵敏度低，方法简单，它比原标准方法的 C18 柱在实验操作过程中需要保持液面不流干相比，以及需要辅以多次液液分配净化步骤，应用更简便，大大减少了工作量，节省了人力成本。

4 预期经济效果

本方法完成后能够为饲料中该类化合物的检测提供有效的技术手段，将从源头控制、市场监管、事后溯源等多个方面保障饲料的质量安全。

本方法还能进一步规范企业生产行为，加强饲料市场监管。企业在生产过程中可以使用本标准制定的方法进行产品自检及饲料原料的入库检测。市场监管部门可借助本标准中的检测方法增加监管手段，完善监管体系。

本方法还为执法提供有力依据，严控农产品投入品品质。有效的标准检测方法将为不合格产品的溯源提供有力的技术手段，为执法行动提供有效的技术保障。

四、采用国际标准

本标准制定过程中，未采用国际标准。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

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，严格执行强制性国家标准和行业标准。与有关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。

六、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。

七、涉及专利的有关说明

本标准不对涉及专利进行判别，若本单位制定相关专利，将在专利中明确表明该专利为本标准应用提供开放使用。

八、作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一。因此，建议将本标准作为推荐性部颁标准颁布实施。

九、贯彻标准的要求和措施建议

（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。这是保证新标准贯彻实施的基础。

（2）发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。

（3）实施的过渡期宜定为 6 个月。

十、与原标准的关系

建议新的标准颁布实施后，旧的标准《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》废止。

十一、其他应予说明的事项

无。

参考文献

[1] Blokland M H, Sterk S S, Stephany R W, et al. Determination of resorcylic acid lactones in biological samples by GC-MS. Discrimination between illegal use and contamination with fusarium toxins[J]. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY, 2006,384(5):1221-1227.

[2] Zhang Y, Dlµgosch M, Juebermann M, et al. Total Syntheses of the Resorcylic Acid Lactone Neocosmosin A and Its Enantiomer[J]. JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY, 2015,80(9):4828-4833.

[3] Dinca O, Tanasuica R, Albu H. Confirmatory method of resorcylic acid lactones in urine and tissue by liquid chromatography tandem mass spectrometry.[J]. Scientific Works. Series C. Veterinary Medicine, 2014,60(2):81-88.

[4] 张小帆, 侯玉泽, 胡骁飞, 等. 动物性食品中玉米赤霉醇残留检测方法的研究进展[J]. 食品科学, 2014(07):286-291.

[5] 张小帆, 侯玉泽, 胡骁飞, 等. 动物性食品中玉米赤霉醇残留检测方法的研究进展[J]. 食品科学, 2014(07):286-291.

[6] Shen J, Zhang S, Wu C, et al. Determination of Six Resorcylic Acid Lactones in Feed by GC-MS[J]. CHROMATOGRAPHIA, 2010,71(1-2):163-165.

[7] 薛勇, 姚学军, 刘洁, 等. 家禽饲料中玉米赤霉烯酮污染情况的检测与分析[J]. 当代畜牧, 2014(03):34-35.

[8] 刘震坤, 陈鲜鑫. 饲料中玉米赤霉烯酮检测技术的研究[J]. 养殖技术顾问, 2014(09):212-213.

[9] 王宏杰, 徐剑宏, 祭芳, 等. 饲料中玉米赤霉烯酮的提纯与测定[J]. 江苏农业学报, 2011(03):663-667.

[10] Amelin V G, Karaseva N M, Tret'Yakov A V. Combination of the QuEChERS method with dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization in the determination of mycotoxins in grain and mixed feed by gas-liquid chromatography with an electron-capture detector[J]. JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, 2013,68(6):552-557.

[11] Wozniak B, Zuchowska I M, Zmudzki J. Determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine, porcine and poultry muscle tissue by liquid chromatography-negative ion electrospray mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation[J]. JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-ANALYTICAL TECHNOLOGIES IN THE BIOMEDICAL AND LIFE SCIENCES, 2013,940:15-23.

[12] Qian Z, Liu Z, Deng W, et al. HPLC-MS/MS determination of zeranols residues in aquatic products.[J]. South

China Fisheries Science, 2011,7(1):62-68.

[13] 彭茂民, 刘丽, 王小飞, 等. 免疫亲和柱净化-HPLC 法测定小麦粉中的黄曲霉毒素 B_1、玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量[J]. 食品科技, 2017(09):305-308.

[14] 万宇平, 韩黎, 吴鹏, 等. 玉米赤霉烯酮残留检测 ELISA 试剂盒的研制[J]. 江苏农业学报, 2013(03):659-663.

[15] 王桂芳, 李培真, 曹阳, 等. 胶体金测试条法对粮食中玉米赤霉烯酮快速定量测定的应用研究[J]. 粮食科技与经济, 2014(01):32-34.

[16] Urusov A E, Petrakova A V, Kuzmin P G, et al. Application of gold nanoparticles produced by laser ablation for immunochromatographic assay labeling[J]. ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, 2015,491:65-71.

[17] Chen Y, Chen Q, Han M, et al. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut[J]. FOOD CHEMISTRY, 2016,213:478-484.

[18] 张伟, 王建平, 沈建忠, 等. 牛肉组织中玉米赤霉醇及相关物残留的气相色谱-质谱法测定[J]. 畜牧兽医学报, 2007(05):513-517.

[19] 中华人民共和国农业部. 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[S]. 2010.

[20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 19540-2004 饲料中玉米赤霉烯酮的测定[S]. 2004.

[21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 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[S]. 2013.

[22] 贾涛. 液质联用法测定饲料中玉米赤霉烯醇的方法研究[J]. 饲料与畜牧, 2016(11):52-56.

[23] 王丽娟, 柯润辉, 安红梅, 等. 固相萃取柱净化-液相色谱-串联质谱法测定糕点中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物和玉米赤霉烯酮[J]. 食品工业科技, 2017(14):31-34.

[24] 周妍 , 张圆圆 , 刁晨曦 , 陆涛峰 , 陈洪岩. 玉米赤霉烯酮检测方法的研究进展. 中国饲料. 2017, 16 : 35-39.

[25] 代荣逵, 吕刚, 王亮. 动物饲料中玉米赤霉烯酮的检测方法. 养殖与饲料. 2017, 6: 50-51.

[26] 姜雪. 玉米赤霉烯酮检测方法的研究进展. 粮食科技与经济. 2015, 40 (增刊) : 30-33.

[27] 韩镌竹, 田晓玲, 丛鑫, 李香珍, 苏崴艺, 李永才, 李欣南. 超高效液相色谱—串联质谱法测定牛奶中 6 种玉米赤霉烯酮类霉菌毒素的残留. 中国畜牧兽医. 2013, 40（增刊）：46-49.

[28] 李丽萍, 范赛, 赵榕, 李兵, 刘伟, 吴国华. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测猪肉中玉米赤霉醇类的残留量. 色谱. 2013, 31(7): 703-708.

[29] 李贤良, 游丽娜, 郗存显, 唐柏彬, 王国民, 张雷, 赵华. 免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法同时测定猪肉中 6 种玉米赤霉醇类化合物残留量. 分析化学。 2013, 41（8）：1147-1152.

[30] 侯月娥, 姜瑞丽, 李旭宁, 田书会. 饲料和原料中玉米赤霉烯酮的危害及检测方法探讨. 当代畜牧. 2014, 30-33.

[31] 谢刚, 王松雪, 崔华, 张艳, 黎睿. 超高效液相色谱法快速检测粮食中玉米赤霉烯酮的含量. 粮油食品科技. 2014, 22(2): 71-75.

[32] 甄玉萍, 裴世春, 王岩, 高建伟, 李妍. 玉米样品前处理方法和掩蔽剂对 ELISA 检测玉米赤霉烯酮的影响. 食品科学. 2015, 36(16): 255-260.

[33] 徐飞, 刘峰, 张亚军, 秦迎旭. 液相色谱-串联质谱法测定粮食中的玉米赤霉烯酮. 中国食品卫生杂志. 2015, 27(2): 124-126.

[34] 李妍, 裴世春, 王岩, 高建伟, 甄玉萍, 马明欣, 张品. 粮食中玉米赤霉烯酮残留的 ELISA 和

UPLC-MS-MS 联合检测法. 食品科学, 2016: 1-9.

[35] Horie M.asakazu, Hiroyuki Nakazawa Determination of trenbolone and zeranol in bovine muscle and liver by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry J.Chromatography A. 2000, 882: 53-62.

[36] Impens S., Courtheyn D., Wasch K.D., et al Faster analysis of anabolic steroids in kidney fat by downscaling the sample size and using gas chromatography-tandem mass spectrometry Analytica Chimica Acta 2003, 483: 269-280.

[37] Jodlbauer, J. Zollner, P. Lindner, W. Determination of zeranol, taleranol, zearalenone, alpha - and beta -zearalenol in urine and tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chromatographia. 2000. 51: 11/12, 681-687.

[38] Launay, F. M. Young, P. B. Sterk, S. S. Blokland, M. H. Kennedy, D. G. Confirmatory assay for zeranol, taleranol and the Fusarium spp. toxins in bovine urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Food Additives and Contaminants. 2004. 21: 1, 52-62.

[39] Medina M.B., Nagdy N., Improved thin-layer chromatographic detection of diethylstilbestrol and zeranol in plasma and tissues isolated with alumina and ion-exchange membrane columns in trandem J.Chromatography. 1993, 614: 315-323.

[40] Roberal J.H., Munns R.K., Morris W.J. et al Determination of zeranol/zeraralenone and their metablites in edible animal tissue by liquid chromatography with electrochemical detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry J.AOAC. 71(1988)263-271.

[41] Wang, S. Wang, X. H. Analytical methods for the determination of zeranol residues in animal products: a review. Food Additives and Contaminants. 2007. 24: 6, 573-582.

[42] Zhang Wei Wang HeJia Wang JianPing Li XiaoWei Jiang HaiYang Shen JianZhong Multiresidue determination of zeranol and related compounds in bovine muscle by gas chromatography/mass spectrometry with immunoaffinity cleanup. Journal of AOAC International. AOAC International. 2006. 89(6):1677-1681.

[43] 涂华莱，齐德生. 玉米赤霉烯酮的危害及其防治. 饲料广角. 2003,8：5-7.

[44] 王雄，王津，程宗佳. 饲料中玉米赤霉烯酮快速定量检测方法的研究. 饲料广角. 2004,18:10-12.

[45] 王鹤佳，何方洋，沈建忠. 玉米赤霉醇及其残留检测. 中国兽药杂志.2003，37(5)：33-35.