

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

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

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

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

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：标准编写的结构与起草规则》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：

——更改了样品前处理方法（见8.2，农业部1486号公告-6-2010的7.2）

——改用基质匹配曲线定量（见8.5.5，农业部1486号公告-6-2010的7.4.3.2）

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。

本文件由中华人民共和国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：

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、 $\alpha$ -玉米赤霉醇、 $\beta$ -玉米赤霉醇、玉米赤霉烯酮、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇和 $\beta$ -玉米赤霉烯醇的测定。

本文件的检出限为 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 原理

试样中的雷琐酸内酯类化合物用乙腈溶液提取、免疫亲和柱净化，经衍生化后用气相色谱-质谱联用仪测定，基质匹配标准曲线校准，外标法定量。

## 5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 甲苯：色谱纯。

5.5 乙腈溶液：量取 80 mL 乙腈（5.3）和 20 mL 水，混匀。

5.6 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 值至 7.0, 最后用水稀释至 1 000 mL, 混匀。

5.7 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。

5.8 混合标准储备溶液 (100 µg/mL): 准确称取玉米赤霉酮 (CAS: 5975-78-0, 纯度不低于 99%)、 $\alpha$ -玉米赤霉醇 (CAS: 26538-44-3, 纯度不低于 97%)、 $\beta$ -玉米赤霉醇 (CAS: 42422-68-4, 纯度不低于 98%)、 $\alpha$ -玉米赤霉烯醇 (CAS: 36455-72-8, 纯度不低于 99%)、 $\beta$ -玉米赤霉烯醇 (CAS: 71030-11-0, 纯度不低于 99%) 和玉米赤霉烯酮 (CAS: 17924-92-4, 纯度不低于 99%) 各 10 mg (精确到 0.01 mg) 于 100 mL 容量瓶, 用甲醇 (5.2) 溶解定容。-18 °C 以下保存, 有效期 12 个月。

5.9 混合标准中间液 (5 µg/mL): 准确移取标准储备溶液 (5.8) 1 mL 于 20 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释、定容, 混匀。2 °C~8 °C 保存, 有效期 1 个月。

5.10 混合标准系列工作溶液: 准确移取混合标准储备溶液 (5.9) 适量, 用甲醇 (5.2) 稀释成 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 的标准溶液。2 °C~8 °C 保存, 有效期 1 周。

5.11 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱: 柱容量为 1500 ng。

## 6 仪器设备

6.1 气相色谱-质谱联用仪: 配电子轰击离子源 (EI)。

6.2 天平: 精度 0.01 g 和 0.01 mg。

6.3 pH 计: 精度 $\pm 0.1$ 。

6.4 涡旋混合器。

6.5 电热恒温干燥箱: 精度 $\pm 2$  °C。

6.6 振荡仪。

6.7 离心机: 转速不低于 8 000 r/min。

6.8 氮吹仪。

## 7 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。

## 8 测定步骤

### 8.1 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（5.5），振荡 30 min（200 r/min）。然后以 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（5.6），混匀，备用。

## 8.2 净化

将备用液（8.1）全部过免疫亲和柱（5.11），控制流速 1~2 滴/s，直至空气进入亲和柱，用 10 mL 水淋洗，直至空气进入亲和柱。用 3 mL 甲醇（5.2）洗脱，收集洗脱液于玻璃管中。50℃下氮气吹干，待衍生。

## 8.3 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 8.1 和 8.2 处理后，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 混合标准系列工作溶液（5.10）1 mL 溶解残渣，涡旋混匀，配制成浓度分别为 2 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 的基质匹配标准系列溶液。50℃氮气吹干，供衍生。

## 8.4 衍生化

分别取按 8.2 和 8.3 处理后的玻璃管，加衍生化试剂（5.7）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（5.4）混匀，待测。

## 8.5 测定

### 8.5.1 气相色谱参考条件

气相色谱参考条件如下：

- a. 色谱柱：弱极性，(5%-苯基)-甲基聚硅氧烷毛细管柱，长度：30 m，内径：0.25 mm，膜厚：0.25 μm，或相当者。
- b. 升温程序：起始 120℃，以 15℃/min 速度升至 280℃，保持 5.2 min。
- c. 进样口温度：250℃。
- d. 进样方式：不分流。
- e. 进样量：2 μL。
- f. 流速：1.5 mL/min。

### 8.5.2 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. 电离能量：70 eV。
- g. 检测方式：选择性离子监测（SIM）。
- h. 采集方式：选择离子检测（SIM），间隔 0.3 sec。
- i. 监测离子：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
$\alpha$ -玉米赤霉醇	523, 433, 335, 307	307
$\beta$ -玉米赤霉醇	523, 433, 335, 307	307
玉米赤霉烯酮	462, 429, 333, 305	333
$\alpha$ -玉米赤霉烯醇	536, 431, 333, 305	305
$\beta$ -玉米赤霉烯醇	536, 431, 333, 305	305

### 8.5.3 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（8.4）和试样溶液（8.4）上机测定。基质匹配标准系列溶液中 6 种待测物的总离子流图和定量离子色谱图见附录 A。

### 8.5.4 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（浓度相当）相应组分的保留时间的相对偏差在 $\pm 1\%$ 之内，且试样中待测物定性离子的相对离子丰度与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	$\leq 10$
最大允许偏差（%）	$\pm 20$	$\pm 25$	$\pm 30$	$\pm 50$

### 8.5.5 定量

以浓度为横坐标，定量离子色谱峰面积（响应值）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浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应减少 8.1 中移取上清液的体积，并按 8.2-8.5 重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与基质匹配标准溶液的浓度



相差不超过 30%。

## 9 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：

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_0 \times V_l}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$\rho_i$ ——试样中待测物色谱峰面积对应的质量浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

$V_0$ ——提取液体积，单位为毫升 (mL)；

$V_l$ ——氮吹至干衍生后加甲苯稀释最终复溶体积，单位为毫升 (mL)；

$m$ ——试样质量，单位为克 (g)；

$V_2$ ——提取离心后移取上清液的体积，单位为毫升 (mL)；

1000——单位换算系数

$$w_i = \frac{A \times \rho_s \times V_0 \times V_l}{A_s \times m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

$A$ ——试样中待测组分的峰面积；

$\rho_s$ ——标准工作液浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

$V_0$ ——提取液体积，单位为毫升 (mL)；

$V_l$ ——氮吹至干衍生后加甲苯稀释最终复溶体积，单位为毫升 (mL)；

$A_s$ ——标准工作液峰面积；

$m$ ——试样质量，单位为克 (g)；

$V_2$ ——提取离心后移取上清液的体积，单位为毫升 (mL)；

1000——单位换算系数

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。

## 10 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%。

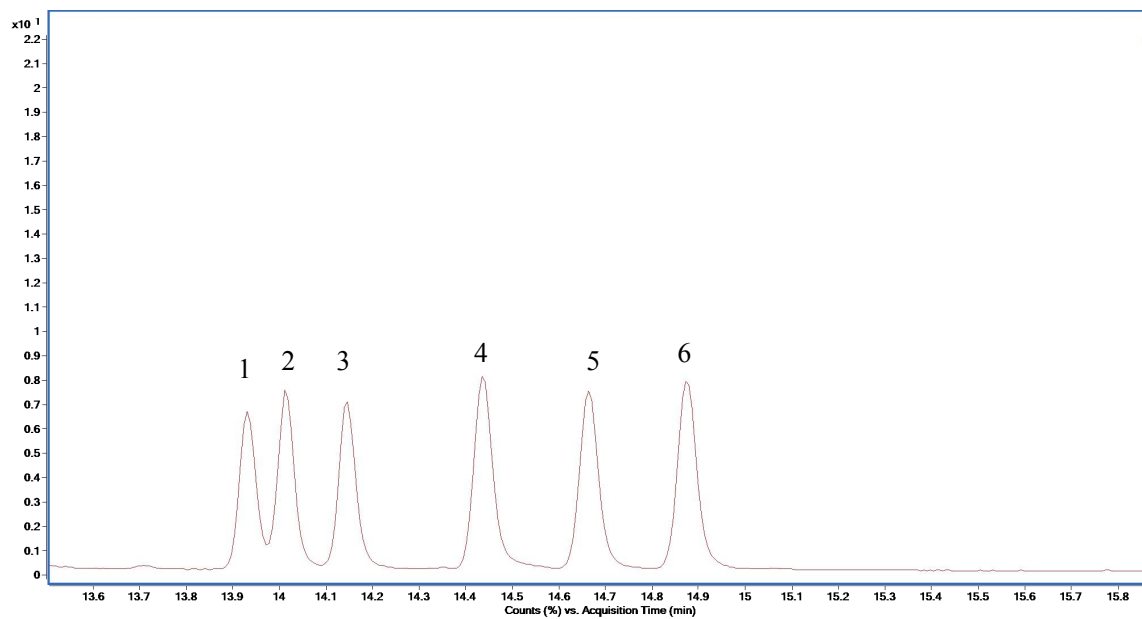
## 附录 A

(资料性)

### 基质匹配标准溶液的总离子流和选择离子色谱图

#### A.1 总离子流图

基质匹配标准溶液的总离子流图见图A.1。



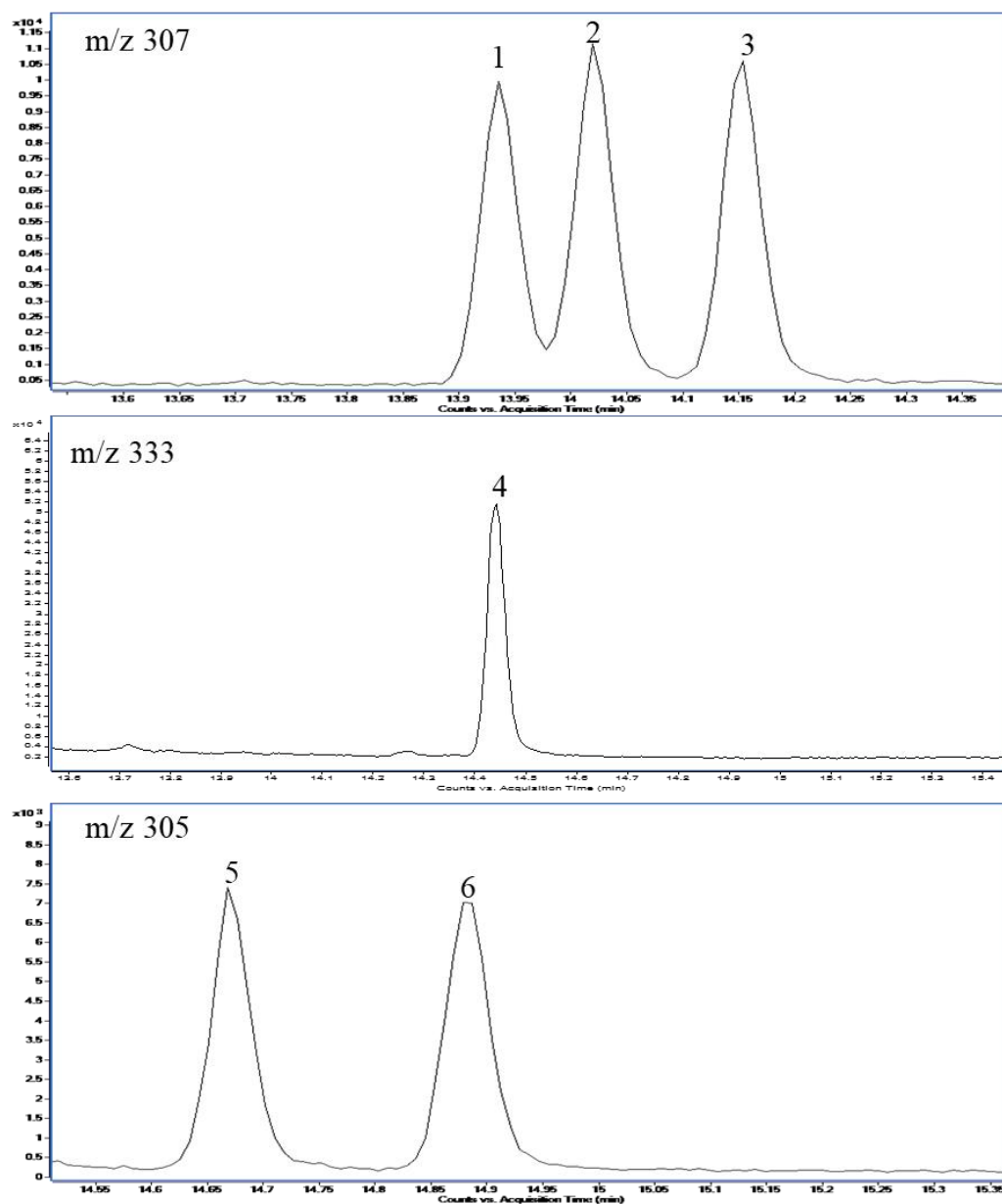
标引序号说明：

- 1——玉米赤霉酮；
- 2—— $\alpha$ -玉米赤霉醇；
- 3—— $\beta$ -玉米赤霉醇；
- 4——玉米赤霉烯酮；
- 5—— $\alpha$ -玉米赤霉烯醇；
- 6—— $\beta$ -玉米赤霉烯醇。

图 A.1 基质匹配标准溶液（50 ng/mL）总离子流图

## A.2 定量离子色谱图

基质匹配标准溶液的定量离子色谱图见图A.2。



标引序号说明：

- 1——玉米赤霉酮；
- 2—— $\alpha$ -玉米赤霉醇；
- 3—— $\beta$ -玉米赤霉醇；
- 4——玉米赤霉烯酮；
- 5—— $\alpha$ -玉米赤霉烯醇；
- 6—— $\beta$ -玉米赤霉烯醇。

图A.2 基质匹配标准溶液（50 ng/mL）定量离子色谱图