



中华人民共和国国家标准

GB/T 46929—2025

饲料中胆汁酸的测定

Determination of bile acids in feeds

2025-12-31 发布

2026-07-01 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。

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：上海海关动植物与食品检验检疫技术中心、四川威尔检测技术股份有限公司、上海海洋大学。

本文件主要起草人：王敏、张凤枰、曹晨、韩雨轩、王鑫、赵勇、杨发树、李明、张璐、吴旭干、刘海泉。

饲料中胆汁酸的测定

1 范围

本文件描述了饲料中胆汁酸的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱测定方法。

本文件液相色谱-串联质谱法适用于配合饲料、浓缩饲料和精料补充料中胆汁酸(猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸)的测定,高效液相色谱法适用于添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中胆汁酸(猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸)的测定。

本文件猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸液相色谱-串联质谱法的定量限均为 0.10 mg/kg;高效液相色谱法添加剂预混合饲料的定量限均为 100 mg/kg,混合型饲料添加剂的定量限均为 1 000 mg/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

4.1 原理

试样中的胆汁酸用乙酸甲醇溶液提取,经固相萃取柱净化,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

除另有说明外,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 正己烷:分析纯。

4.2.4 乙腈:色谱纯。

4.2.5 甲酸:色谱纯。

4.2.6 0.1%乙酸甲醇溶液:移取 1.0 mL 乙酸,用甲醇定容至 1 000 mL,混匀。

4.2.7 50%乙腈溶液:移取 50 mL 乙腈(4.2.4),用水定容至 100 mL,混匀。

4.2.8 0.1%甲酸溶液:移取 1.0 mL 甲酸,用水定容至 1 000 mL,混匀。

4.2.9 0.1%甲酸乙腈溶液:移取 1.0 mL 甲酸,用乙腈(4.2.4)定容至 1 000 mL,混匀。

4.2.10 标准储备溶液(1 mg/mL):称取猪胆酸(CAS号:547-75-1,纯度不低于97.0%)、猪去氧胆酸(CAS号:83-49-8,纯度不低于99.0%)和鹅去氧胆酸(CAS号:474-25-9,纯度不低于95.0%)标准品各10 mg(精确至0.01 mg),分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇(4.2.2)溶解并定容,混匀。-18℃以下保存,有效期6个月。

4.2.11 混合标准中间溶液(10 μg/mL):分别准确移取猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准储备溶液(4.2.10)各1 mL于100 mL容量瓶中,用甲醇(4.2.2)稀释、定容,混匀。临用现配。

4.2.12 亲脂亲水平衡固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

4.2.13 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:带电喷雾离子源(ESI)。

4.3.2 分析天平:精度0.001 g和0.000 01 g。

4.3.3 涡旋振荡器。

4.3.4 离心机:转速不低于10 000 r/min。

4.3.5 超声波清洗机。

4.3.6 氮吹仪。

4.4 样品

按照GB/T 20195规定制备至少200 g样品,粉碎使其全部通过0.425 mm的试验筛,充分混匀,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。称取配合饲料、浓缩饲料、精料补充料试样5 g(精确至0.001 g),置于50 mL离心管中,加入20 mL 0.1%乙酸甲醇溶液(4.2.6),涡旋振荡5 min,超声5 min,10 000 r/min离心5 min,上清液转移至50 mL容量瓶中,残渣中加入20 mL 0.1%乙酸甲醇溶液(4.2.6)重复提取1次,合并上清液,用0.1%乙酸甲醇溶液(4.2.6)定容(V_1),混匀,静置。准确移取5 mL(V_1)上清液,加入5 mL正己烷(4.2.3),涡旋混匀,10 000 r/min离心3 min,除去上层溶液后,加水至10 mL,备用。

4.5.2 净化

固相萃取柱(4.2.12)依次用5 mL甲醇(4.2.2)和5 mL水活化,取备用液(4.5.1)全部过柱,依次用5 mL水淋洗,5 mL甲醇(4.2.2)洗脱,收集洗脱液,40℃氮吹至近干,用50%乙腈溶液(4.2.7)定容至5 mL(V_2),涡旋混合2 min,过微孔滤膜(4.2.13),待测。

4.5.3 基质匹配混合标准系列溶液的制备

取空白样品,按4.5.1和4.5.2处理得到空白基质溶液,准确移取混合标准中间溶液(4.2.11)适量,用空白基质溶液进行逐级稀释,配制成质量浓度分别为5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL基质匹配混合标准系列溶液。

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:

- a) 色谱柱:三官能团 C₁₈烷基键合 (T₃)柱,柱长 100 mm,柱内径 2.1 mm,粒度 1.8 μm,或性能相当者;
- b) 柱温:室温;
- c) 流速:0.4 mL/min;
- d) 进样量:5 μL;
- e) 流动相:A相为 0.1%甲酸溶液(4.2.8),B相为 0.1%甲酸乙腈溶液(4.2.9),梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A %	流动相 B %
0	90	10
3.0	90	10
5.0	10	90
9.0	10	90
10.5	90	10

4.5.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 电离方式:电喷雾电离,负离子模式;
- b) 扫描方式:多反应监测(MRM);
- c) 离子源温度:500 °C;
- d) 电喷雾电压:−3 000 V。

多反应监测(MRM)定性离子对、定量离子对及碰撞能量见表 2。

表 2 多反应监测(MRM)定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞能量

待测物名称	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	去簇电压 V	碰撞能量 eV
猪胆酸	407>389	407>407	−75	−42
	407>407		−75	−11
鹅去氧胆酸	391>391	391>391	−75	−5
	391>355		−75	−13
猪去氧胆酸	391>391	391>391	−75	−5
	391>355		−75	−13

4.5.4.3 混合标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配混合标准系列溶液(4.5.3)和试样溶液(4.5.2)上机测定。基质匹配混合标准溶液中猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的定量离子色谱图见附录 A。

4.5.4.4 定性测定

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混合标准系列溶液(质量浓度相当)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浓度接近的基质匹配混合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 定量测定

以基质匹配混合标准溶液中待测组分的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线,作单点或多点校准,按外标法计算试样中待测组分的含量。基质匹配混合标准溶液与试样溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测组分质量浓度与标准溶液质量浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

样品中待测物含量以 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,多点校准按式(1)计算,单点校准按式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times V_2}{m \times V_1 \times 1\ 000} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

- ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶溶液体积,单位为毫升(mL);
- m ——样品质量,单位为克(g);
- V_1 ——净化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times V \times \rho_{st} \times V_2}{A_{st} \times m \times V_1 \times 1\ 000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的峰面积值;
- V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- ρ_{st} ——猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准品溶液的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶溶液的体积,单位为毫升(mL);
- A_{st} ——猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准溶液的峰面积值;
- m ——样品质量,单位为克(g);
- V_1 ——净化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——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。

胆汁酸的总量为猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸含量的加和,以毫克每千克(mg/kg)表示。

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

试样中的待测物用乙酸甲醇溶液提取,经固相萃取柱净化,高效液相色谱仪测定,外标法定量。

5.2 试剂和材料

除另有说明外,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 正己烷:色谱纯。

5.2.5 0.1%磷酸溶液:移取1 mL磷酸,用水定容至1 000 mL,混匀。

5.2.6 0.1%乙酸甲醇溶液:移取1 mL乙酸,用甲醇定容至1 000 mL,混匀。

5.2.7 流动相:量取500 mL 0.1%磷酸溶液(5.2.5)和500 mL乙腈(5.2.2),混匀。

5.2.8 标准储备溶液(1 mg/mL):准确称取猪胆酸(CAS号:547-75-1,纯度不低于97.0%)、猪去氧胆酸(CAS号:83-49-8,纯度不低于99.0%)和鹅去氧胆酸(CAS号:474-25-9,纯度不低于95.0%)标准品各10 mg(精确至0.01 mg),分别置于10 mL容量瓶中,用甲醇(5.2.3)溶解并定容,混匀。-18℃以下保存,有效期6个月。

5.2.9 混合标准中间溶液(250 μg/mL):分别准确移取猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准储备溶液(5.2.8)各2.5 mL于10 mL容量瓶中,用乙腈(5.2.2)稀释、定容,混匀。临用现配。

5.2.10 混合标准系列溶液:分别准确移取适量混合标准中间溶液(5.2.9),用流动相(5.2.7)稀释、定容,混匀,配制成质量浓度分别为10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、250 μg/mL混合标准系列溶液。临用现配。

5.2.11 亲脂亲水平衡固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

5.2.12 微孔滤膜:0.45 μm,有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱仪:配示差折光检测器。

5.3.2 分析天平:精度0.001 g、0.000 1 g和0.000 01 g。

5.3.3 涡旋振荡器。

5.3.4 离心机:转速不低于10 000 r/min。

5.3.5 旋转蒸发仪。

5.3.6 超声波清洗机。

5.3.7 氮吹仪。

5.4 样品

按照GB/T 20195规定制备至少200 g样品,粉碎使其全部通过0.425 mm的试验筛,充分混匀,装入密闭容器中,备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 添加剂预混合饲料

5.5.1.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 0.1%乙酸甲醇溶液(5.2.6),涡旋振荡 5 min,超声 5 min,10 000 r/min 离心 5 min,取上清液置于 50 mL 容量瓶中,重复提取一次,合并 2 次上清液,混匀,定容(V_1)。准确移取 5 mL(V_1)上清液,用水定容至 10 mL,涡旋混匀,待净化。

5.5.1.2 净化

固相萃取柱(5.2.11)分别用 5 mL 甲醇(5.2.3)和 5 mL 水活化平衡,待净化溶液(5.5.1.1)全部过柱,5 mL 水淋洗,5 mL 甲醇(5.2.3)洗脱。洗脱液 40 °C 氮吹至近干,用流动相(5.2.7)定容至 5 mL (V_2),涡旋 2 min,过微孔滤膜(5.2.12),待测。

5.5.2 混合型饲料添加剂

平行做两份试验。称取试样 0.5 g(精确至 0.000 1 g),置于 50 mL 容量瓶中,加入 70 mL 流动相(5.2.7),超声 20 min,期间振摇 2 次~3 次,取出,冷却至室温。用流动相定容至 100 mL,混匀,过微孔滤膜(5.2.12),待测。

5.6 测定

5.6.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ,或性能相当者;
- b) 柱温:40 °C;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 示差折光检测器:温度 40 °C;
- e) 进样量:20 μL ;
- f) 流动相:5.2.7。

5.6.2 混合标准系列溶液和试样溶液的测定

在仪器的最佳条件下,分别取混合标准系列溶液(5.2.10)和试样溶液(5.5.1.2)或(5.5.2)上机测定。猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准溶液的液相色谱图见附录 B。

5.6.3 定性

以保留时间定性,试样溶液中待测物保留时间应与标准系列溶液(质量浓度相当)中待测物的保留时间一致,其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

5.6.4 定量

以待测物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,应将试样溶液用流动相(5.2.7)稀

释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的质量浓度与标准溶液的质量浓度相差不超过30%。

5.7 试验数据处理

5.7.1 添加剂预混合饲料

样品中待测物含量以 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示,多点校准按式(3)计算,单点校准按式(4)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times V_2}{m \times V_1 \times 1\,000} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶溶液体积,单位为毫升(mL);
- m ——样品质量,单位为克(g);
- V_1 ——净化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times V \times \rho_{st} \times V_2}{A_{st} \times m \times V_1 \times 1\,000} \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- A_i ——试样溶液中猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的峰面积值;
- V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- ρ_{st} ——猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准品溶液的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V_2 ——氮气吹干后复溶溶液的体积,单位为毫升(mL);
- A_{st} ——猪胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸标准溶液的峰面积值;
- m ——样品质量,单位为克(g);
- V_1 ——净化时所用试样提取溶液的体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——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。

胆汁酸的总量为猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸含量的加和,以毫克每千克(mg/kg)表示。

5.7.2 混合型饲料添加剂

样品中待测物的含量以 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。按式(5)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \dots\dots\dots (5)$$

式中:

- ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中胆酸、猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);
- V ——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——换算系数;
- m ——样品质量,单位为克(g);

f ——超出线性范围后试样溶液的稀释倍数。

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。

胆汁酸的总量为猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸含量的加和,以毫克每千克(mg/kg)表示。

5.8 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 10%。

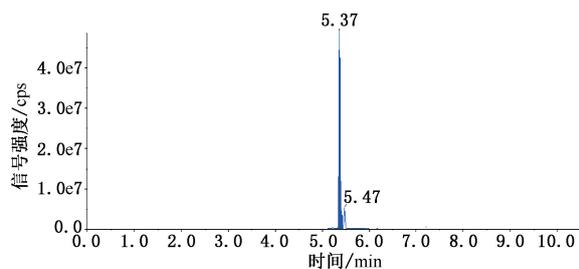


附录 A

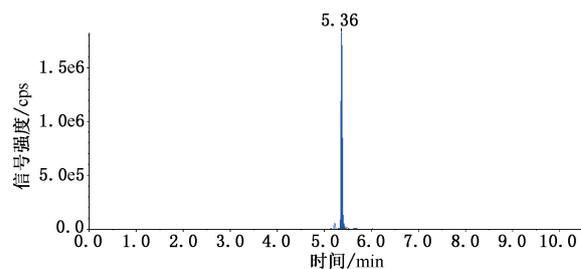
(资料性)

猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸标准溶液多反应监测(MRM)色谱图

猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图分别见图 A.1~图 A.3。

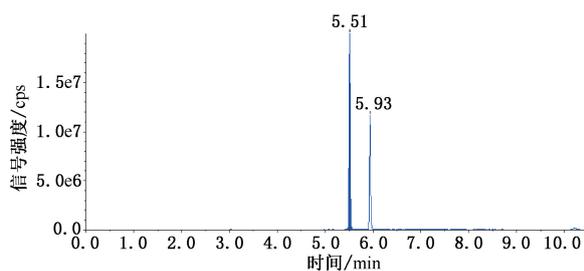


a) 定量离子图

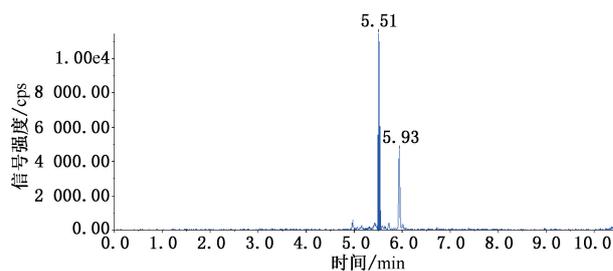


b) 定性离子图

图 A.1 猪胆酸标准溶液(50 ng/mL)多反应监测(MRM)色谱图

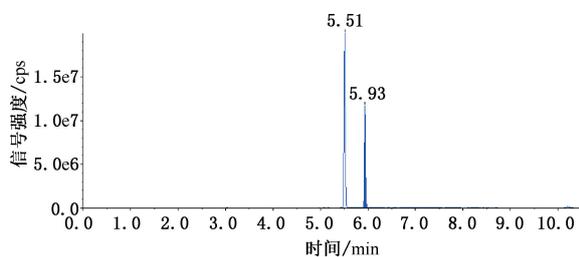


a) 定量离子图

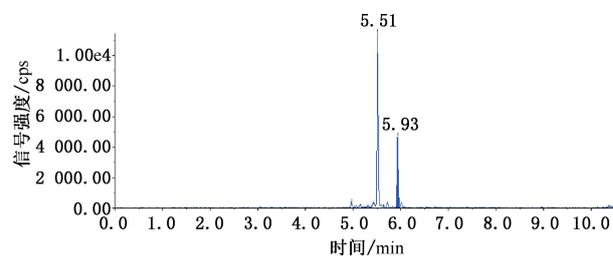


b) 定性离子图

图 A.2 猪去氧胆酸标准溶液(50 ng/mL)多反应监测(MRM)色谱图



a) 定量离子图



b) 定性离子图

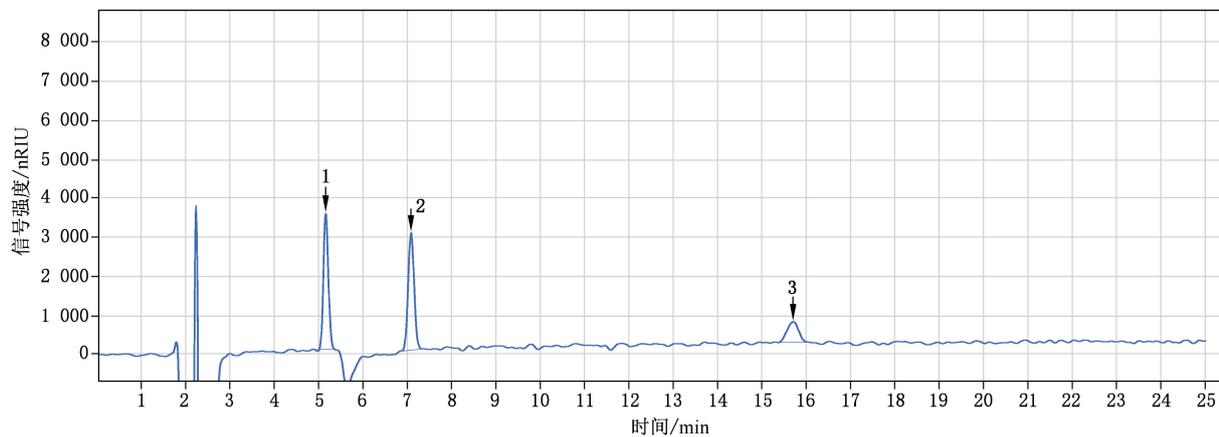
图 A.3 鹅去氧胆酸标准溶液(50 ng/mL)多反应监测(MRM)色谱图

附录 B

(资料性)

猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸标准溶液液相色谱图

猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸标准溶液液相色谱图见图 B.1。



标引序号说明：

1——猪胆酸；

2——猪去氧胆酸；

3——鹅去氧胆酸。

图 B.1 猪胆酸、猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸标准溶液(50 μg/mL)液相色谱图