

中华人民共和国国家标准

《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》

编制说明

(征求意见稿)

四川威尔检测技术股份有限公司

2019年7月

目 录

一、标准制定背景及任务来源.....	3
1. 标准制定背景.....	3
2. 任务来源.....	7
二、主要工作过程.....	8
1. 成立标准编制小组.....	8
2. 技术路线和项目方案的制定.....	8
3. 开展方法学研究、实际样品检测.....	9
4. 编写标准草案和编制说明征求意见稿.....	9
5. 征求意见和方法验证.....	10
6. 标准的预审、终审和报批.....	11
三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	11
1. 标准编制原则.....	11
2. 修订内容的说明.....	12
3. 主要技术内容确定的依据.....	18
3.1 白芥子酶的选择、制备和酶解效果试验.....	18
3.1.1 白芥种子样品筛选.....	18
3.1.2 白芥子酶的制备.....	19
3.1.3 酶解效果试验.....	20
3.1.4 白芥子酶有效期考察.....	24
3.2 试样前处理条件的确定.....	24
3.3 内标物标准溶液稳定性考察.....	25
3.4 气相色谱条件的选择和优化.....	26
3.4.1 色谱条件的选择和优化.....	26
3.4.2 色谱条件的选择性、专属性和稳定性考察.....	28
3.5 线性范围考察.....	30
3.5.1 标准溶液的配制.....	30
3.5.2 测定.....	31
3.6 方法精密度考察.....	32
3.7 回收率试验.....	32
3.8 检出限和定量限的确定.....	35
3.8.1 检出限 (LOD)	36
3.8.2 定量限 (LOQ)	36
3.9 试验数据处理.....	37
3.10 精密度.....	39
3.11 实际样品检测.....	39
3.12 关于删除银量法的说明.....	41
四、采用国际标准.....	42
五、与现行法律法规和强制性标准的关系.....	42
六、重大分歧意见的处理经过和依据.....	42
七、标准作为强制性或推荐性标准的意见.....	42
八、贯彻标准的要求和措施建议.....	43
九、废止现行有关标准的建议.....	43
十、其他应予说明的事项.....	43
参考文献.....	44

中华人民共和国国家标准

《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》

编制说明

一、标准制定背景及任务来源

1. 标准制定背景

异硫氰酸酯 (isothiocyanates, ITCs) 是一类含有 $R-N=C=S$ 结构的化合物, 是十字花科植物及其近缘植物白花菜科中 (如西兰花、甘蓝、芥兰、卷心菜等) 大量存在的硫代葡萄糖苷的酶解产物^[1]。在食物或饲料加工及其摄入的过程中植物组织被破坏, 植物中的芥子酶或肠道微生物产生的芥子酶与硫代葡萄糖苷接触, 在水分存在的条件下, 酶解生成许多代谢产物。首先, 硫代葡萄糖苷水解生成糖苷配基 (thiohydroximate-O-sulfonate) 和等摩尔的葡萄糖及硫酸氢钾 ($KHSO_4$)。随后, 由于糖苷配基极不稳定, 进一步反应生成异硫氰酸酯、乙烯基噁唑烷硫酮 (vinylloxazolidinethione, VOT)、腈 (RCN) 或硫氰酸酯 (SCN)。在中性 pH 条件下, 糖苷配基生成异硫氰酸酯, 当母体硫代葡萄糖苷在 C-2 上有一个羟基 (OH) 时, 则形成不稳定的异硫氰酸酯, 快速反应生成噁唑烷硫酮^[2]。

由芸苔属植物 (包括油菜、芥菜、甘蓝等) 制作的饼粕是优良的饲料蛋白质资源, 同时芸苔属饲草和种子饼粕也是饲料中硫代葡萄糖苷的主要来源, 硫代葡萄糖苷的含量限制了芸苔属植物的有效利用。

硫代葡萄糖苷的不利影响与其在饲料中的浓度有关，摄入大量的硫代葡萄糖苷对动物健康和生产会产生不利影响。长期以来，硫代葡萄糖苷被认为可以降低动物的采食量，诱发碘缺乏及甲状腺、肝和肾肿大，高剂量甚至可以引起死亡。不同动物对硫代葡萄糖苷有不同的耐受力，死亡常见于采食高剂量硫代葡萄糖苷的猪、鼠、兔中。反刍动物对饲料中的硫代葡萄糖苷不敏感，而单胃动物较反刍动物敏感，年幼动物较成年动物和老龄动物敏感。反刍动物、猪、兔、家禽和鱼对饲料中硫代葡萄糖苷总量的耐受量分别为 1.50~4.22、0.78、7.00、5.40 和 3.60 $\mu\text{mol/g}$ 。高水平硫代葡萄糖苷可使家禽死亡率升高，产蛋率和蛋重下降，也可引起鱼生长抑制和甲状腺功能受损。猪对硫代葡萄糖苷更为敏感，有时甚至是致命的^[3]。事实上，硫代葡萄糖苷本身并没有生物活性，其抗营养作用由降解产物异硫氰酸酯、噁唑烷硫酮、硫氰酸酯和腈等诱发。硫代葡萄糖苷降低采食量是由于异硫氰酸酯和噁唑烷硫酮等苦味物质引起的。烯丙基异硫氰酸酯可引起胃肠绞痛和胃肠黏膜局部坏死^[4]，异硫氰酸酯和噁唑烷硫酮可引起甲状腺代谢功能改变和甲状腺肿大^[5]，长期摄入含硫代葡萄糖苷的植物可造成生殖功能受损^[6]，异硫氰酸酯可引起行动障碍和定向障碍^[7,8]。此外，异硫氰酸酯可引起急性肠胃炎，如绞痛、腹泻、口吐泡沫、呼吸障碍，还可能引起光敏症状。乙烯基噁唑烷硫酮抑制三碘甲腺原氨酸（T3）和四碘甲腺原氨酸（T4）的合成，引起甲状腺形态和功能改变，最终导致甲状腺功能减退和甲状腺肿大^[2]。

为保证养殖动物健康和生产、人类健康及环境没有危险，欧洲议

会和欧盟理事会第 2002/32/EC 指令（第 14 版）《动物饲料中的不良物质》附件 1“第三部分 内源性植物毒素”规定了饲料原料和饲料产品中乙烯基 thioxazolidone (5-vinyloxazolidine-2-thione) 和挥发芥子油限量标准（表 1）。GB 13078-2017《饲料卫生标准》规定了饲料原料和饲料产品中的异硫氰酸酯限量和检测标准方法（表 2）。

表 1 欧盟第 2002/32/EC 指令关于饲料中噁唑烷硫酮和挥发性芥子油限量规定

项目	产品名称	限量 (mg/kg)
乙烯基 thioxazolidone (5-vinyloxazolidine-2-thione)	全价饲料	300
	不包括： -用于猪的全价饲料	200
	-用于狗，兔，马和毛皮动物的全价饲料	50
挥发芥子油	全价饲料	300
	不包括： -用于猪的全价饲料	200
	-用于狗，兔，马和毛皮动物的全价饲料	50

表 2 GB 13078-2017 饲料中异硫氰酸酯和噁唑烷硫酮限量和试验方法

项目	产品名称		限量 (mg/kg)	试验方法
异硫氰酸酯 (以丙烯酸基 异硫氰酸酯 计)	饲料 原料	菜籽及其加工产品	≤4000	GB/T 13087
		其他饲料原料	≤100	
		犊牛、羔羊精料补充料	≤150	
	饲料 产品	其他牛、羊精料补充料	≤1000	
		猪（仔猪除外）、家禽配合饲料	≤500	
		水产配合饲料	≤800	
噁唑烷硫酮 (以 5-乙烯基-噁唑-2-硫 酮计)	饲料 原料	菜籽及其加工产品	≤2500	GB/T 13089
	饲料 产品	产蛋禽配合饲料	≤500	
		其他家禽配合饲料	≤1000	
		水产配合饲料	≤800	

近年来，在动物蛋白资源紧张、环境保护、低碳养殖及无抗养殖的大趋势下，饲料行业对植物及其副产物包括十字花科植物饲料资源的开发和利用日渐活跃。我国是世界上油菜籽产量最大的国家，年产量为 1150 万吨，油菜籽制油后产生大约 700 万吨的菜籽饼粕，其含粗蛋白质 30%~40%、赖氨酸 1.0%~1.8%、色氨酸 0.3%~0.5%，蛋氨酸 0.5%~0.9%，同时其钙、磷及锌、铁、锰、硒等微量元素含量丰富，是一种理想的、潜在的、相对价廉优质蛋白资源，具有很高的开发利用价值。但由于其含有大量硫代葡萄糖苷，硫代葡萄糖苷的酶解产物异硫氰酸酯、噁唑烷硫酮、硫氰酸酯和腈等抗营养因子限制了菜籽饼粕的高效利用。异硫氰酸酯结构式为 $R-N=C=S$ ，常见的 R 基团有甲基、烯丙基、丁基、3-丁烯基，4-戊烯基、苜蓿基等。硫代葡萄糖苷酶解的异硫氰酸酯主要有丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯、戊烯基异硫氰酸酯。

异硫氰酸酯的快速准确定量检测对于菜籽饼粕安全高效利用、保障饲料质量安全具有非常重要的意义，ISO 于 1983 年发布了 ISO 5504 《含油种子及其去油后的饼粕中异硫氰酸酯和乙烯基噁唑烷硫酮的测定》，并于 1992 年进行了修订，标准名称改为《菜籽饼粕中总异硫氰酸酯含量和乙烯基噁唑烷硫酮含量的测定》，但于 1998 年被废除，未见有新的替代标准发布。我国目前现行有效的异硫氰酸酯国家标准检测方法为 GB/T 13087-1991，第一法规定了填充柱气相色谱法测定饲料中异硫氰酸酯的含量检测方法，第二法为银量法，规定采用蒸馏滴定法测定总异硫氰酸酯的含量。农业部标准 NY/T 1596-2008

规定了硫脲比色法测定菜粕中异硫氰酸酯的含量，该法使用紫外分光光度计，测定规定检测波长下硫脲的吸光值，再折算出异硫氰酸酯的含量。由于填充柱气相色谱法已基本被毛细管气相色谱法取代，且毛细管柱拥有更好的分离性能，能够更加准确测定各种异硫氰酸酯的含量。同时，GB/T 13087-1991 芥子酶的制备方法非常繁琐、酶活性无法控制，芥子酶用量太低，对于高含量样品会出现酶解不完全、检测结果偏低，异硫氰酸酯的测定结果重复性差，采标率非常低，因此亟需对 GB/T 13087-1991 进行修订。需要从芥子酶原料的选择和制备、酶解效果比较研究、色谱条件的选择和优化、重复性实验、回收率实验、检出限和定量限的确定等方面进行系统研究，并根据 GB 13078-2017《饲料卫生标准》规定，采集主要饲料原料和各种饲料产品，开展实际样品检测，对该检测标准方法进行修订，旨在为加强饲料安全监管提供国家标准检测方法，对于保障我国养殖畜禽和水产品的质量安全具有重要意义。

2. 任务来源

该国家标准修订项目原由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所承担，10 多年来，中国农业科学院北京畜牧兽医研究所投入了大量的人力、物力和财力开展该标准的修订工作，但由于种种原因，一直未能如期完成，2018 年 7 月中国农业科学院北京畜牧兽医研究所主动向全国饲料工业标准化技术委员会秘书处提出，鉴于通威股份有限公司长期开展该项目的检测，建议改由四川威尔检测技术股份有限公司、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所和通威股份有限公司承担

《GB/T 13087-1991 饲料中异硫氰酸酯的测定方法》标准修订工作。全国饲料工业标准化技术委员会秘书处经与国家标准化管理委员会沟通，2018年9月29日秘书处口头通知四川威尔检测技术股份有限公司、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所和通威股份有限公司承担该标准的修订工作。本标准修订项目由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口，项目编号为 20061685-T-469。

二、主要工作过程

1. 成立标准编制小组

2018年9月30日，四川威尔检测技术股份有限公司、中国农业科学院北京畜牧兽医研究所和通威股份有限公司接到《GB/T 13087-1991 饲料中异硫氰酸酯的测定方法》国家标准修订项目任务后，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，组建了标准编制小组，制定工作计划，落实人员与分工，详见表 3。

表 3 标准主要起草人员和任务分工

人员	职称	承担任务
张凤枰	教授级高工	项目主持人，负责项目的全面工作
佟建明	研究员	标准研究方案制定，标准文本和编制说明编写和完善
张艳红	工程师	检测方法研究、样品检测、标准文本和编制说明编写
李德祥	助理工程师	检测方法研究、样品检测
杨发树	高级工程师	标准文本和编制说明编写和完善、方法验证、征求意见

2. 技术路线和项目方案的制定

2018年10月，标准编制小组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定指导思想，制定了标准制定技术路线和

试验方案。

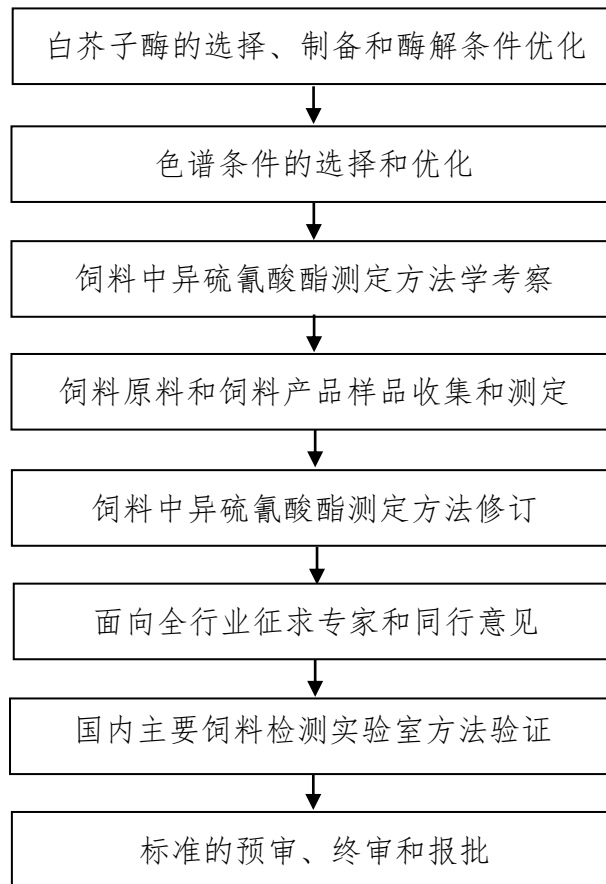


图 1 标准修订技术路线

3. 开展方法学研究、实际样品检测

2018 年 11 月~2019 年 1 月，标准编制小组开展了色谱条件的选择和优化、白芥子酶的选择、制备和酶解条件的优化、方法学考察等方法学研究工作，收集配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料样品，开展实际样品测定。

4. 编写标准草案和编制说明征求意见稿

2019 年 2 月，标准编制小组完成了标准草案、编制说明征求意见稿的编制工作。

5. 征求意见和方法验证

2019年3月，标准编制小组将起草完成的国家标准《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》标准草案和编制说明征求意见稿发送给国家饲料质检中心、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委员等相关的质检机构、科研院所、高校、企业等单位的专家征求意见，详细情况见表4。

表4 标准意见征求情况

序号	单位属性	发函数量	反馈数量
1	高校、科研院所	9	4
2	质检机构	24	17
3	饲料企业	13	7

本次发函征求意见1个月，共发函单位46个，回函单位28个、未回函单位18个，提出意见单位26个，无意见单位2个；共提出意见126条，采纳92条，部分采纳或不采纳34条。2019年4月，标准编制小组根据征求得到意见和建议，对标准草案和编制说明进行认真的修改、完善，并补充相关数据。

2019年5月，标准编制小组分别委托国家饲料质量监督检验中心（武汉）、农业农村部饲料质量监督检验测试中心（成都）、农业农村部饲料质量监督检验测试中心（南昌）等3家检测机构开展国家标准《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》方法验证工作。

2019年5月20日-22日，标准主要起草人员张凤枰、张艳红参加了全国饲料工业标准化技术委员会在西安组织的“2019年畜牧业饲料工业标准编制培训班”培训，标准编制小组对标准草案和编制说明

进一步修改、完善，于 2019 年 6 月形成国家标准《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》预审稿。

6. 标准的预审、终审和报批

在全国饲料工业标准化技术委员会的指导下，标准编制小组组织常碧影、李俊玲、郭吉原、李宏、刘小敏、符金华、赵立军、曹莹、王威利等九位专家于 2019 年 6 月 15 日在成都进行了预审，共提出 16 条意见。标准编制小组根据预审会专家组的意见和建议，进一步补充有关数据、修改完善标准草案和编制说明，形成国家标准《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》征求意见稿，送全国饲料工业标准化技术委员会秘书处审核，按照国家标准管理规定要求，挂国家标准化管理委员会网站公开征求意见 2 个月。

2019 年×月×日，全国饲料工业标准化技术委员会组织完成了本标准的终审，标准编制小组最后根据终审会的审查意见，进一步修改完善标准文本和编制说明，于 2019 年×月×日向全国饲料工业标准化技术委员会秘书处提交《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》报批稿。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

1. 标准编制原则

本标准的结构、技术要素和表达方法按照 GB/T 1.1-2009《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《标准编制规则第 4 部分：试验方法标准》的规定和要求进行编写。

作为 GB 13078-2017《饲料卫生标准》配套检测标准方法，本次修订要全力满足 GB 13078-2017《饲料卫生标准》规定要求，结合我

国饲料行业现状，须涵盖饲菜籽及其加工产品、其他饲料原料，牛、羊精料补充料，猪、家禽配合饲料，水产配合饲料和其他配合饲料，力求修订后的标准方法简单、快速、灵敏、成本低、实用性强。

2. 修订内容的说明

本次修订除按照 GB/T 1.1-2009 和 GB/T 20001.4-2015 对标准进行编辑性修改外，主要针对 GB/T 13087-1991 存在的问题，结合饲料行业实际样品检测情况，根据 GB 13078-2017《饲料卫生标准》规定要求，修改了标准方法适用范围、pH7.0 缓冲溶液的配制、白芥子酶的制备和用量、测定结果计算公式和精密度等，详见表 5。

表 5 标准技术内容修订说明

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
1	1 范围	本标准规定了配合饲料和菜籽饼粕中异硫氰酸酯的测定方法	本标准规定了饲料中异硫氰酸酯的气相色谱测定方法。	银量法操作繁琐、重复性差，无法准确对 3 种不同结构的异硫氰酸酯定量，目前基本不采用该方法。
2	1 范围	本标准适用于配合饲料(包括混合饲料)和菜籽取油后的饼粕中异硫氰酸酯的测定。	本标准适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料中异硫氰酸酯的测定。	按照 GB 13078-2017 规定和饲料行业检测需要修订。
3	1 范围	无检出限和定量限	本标准的检出限为 2 mg/kg，定量限为 5 mg/kg。	按照 GB/T 1.1-2009 和 GB/T 20001.4-2015 规定要求。
4	2 规范性引用文件	无	GB/T 5520 粮油检验 籽粒发芽试验 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	按照 GB/T 1.1-2009 和 GB/T 20001.4-2015 规定要求。
5	3 原理	配合饲料中存在的硫葡萄糖苷，在芥子酶作用下生成相应的异硫氰酸酯，用二氯甲烷提取后再用气相色谱进行测定。	饲料中的硫葡萄糖苷在 pH7.0 缓冲液中，在白芥子酶作用下生成相应的异硫氰酸酯，用二氯甲烷提取，脱水、过滤后供气相色谱仪测定，内标法定量。	规范表述

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
6	4 试剂或材料	pH7 缓冲液：市售或按下法配制。量取 35.3 mL 0.1 mol/L 柠檬酸(C ₆ H ₈ O ₇ ·H ₂ O)溶液，置入 200 mL 定容瓶中，用 0.2 mol/L 磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O, GB 1263)稀释至刻度，配制后检查 pH 值。	pH7.0 缓冲溶液：量取 140 mL 柠檬酸溶液(4.5)于 1 000 mL 容量瓶中，加入 800 mL 磷酸氢二钠溶液(4.6)，摇匀，用盐酸溶液(4.7)或氢氧化钠溶液(4.8)调整 pH 至 7.0。临用现配。	规范试剂配制过程，易于准确调整缓冲溶液 pH 值。
7	4 试剂或材料	3.5 白芥子酶：将白芥(<i>Sinapis alba</i> L.)种子(72 h 内发芽率必须大于 85%，保存期不超过两年)粉碎后，称取 100 g，用 300 mL 丙酮(3.2)分 10 次脱脂，滤纸过滤，真空干燥脱脂白芥子粉，然后用 400 mL 水分两次提取脱脂粉中的芥子酶，离心，取上层混悬液体，合并，于合并混悬液中加入 400 mL 丙酮(3.2)沉淀芥子酶，弃去上清液，用丙酮(3.2)洗沉淀 5 次，离心，真空干燥下层沉淀物，研磨成粉状，装入密闭容器中，低温保存备用，此制剂应不含异硫氰酸酯。	4.10 白芥子酶：取白芥(<i>Sinapis alba</i> L.)种子(按照 GB/T 5520 测定白芥种子的发芽率，72 h 内发芽率必须大于 85%，保存期不得超过 2 年)100 g，粉碎后用石油醚(4.3)脱脂，每次 200 mL，脱脂 10 次，使脂肪含量不大于 2%，操作环境温度保持在 30℃ 以下，置通风橱内于室温下使溶剂挥发，然后再粉碎一次使全部通过 0.28 mm 试验筛，装在密闭容器中，置于 4℃ 冰箱保存，有效期为 6 周。应做空白试验，确保白芥子酶不含异硫氰酸酯。或选购商品白芥子酶(Thioglucosidase from <i>Sinapis alba</i> (white mustard) seed, 200UN)。	简化白芥子酶制作过程；规定白芥子酶不含异硫氰酸酯；增加商品白芥子酶选项。
8	4 试剂或材料	丁基异硫氰酸酯内标溶液：配制 0.100 mg/mL 丁基异硫氰酸酯(CH ₃ (CH ₂) ₃ NCS)二氯甲烷或氯仿(3.1)溶液，贮于 4℃，如试样中异硫氰酸酯含量较低，可将上述溶液稀释，使内标丁基异硫氰酸酯峰面积和试样中异硫氰酸酯峰面积相接近。	4.11 丁基异硫氰酸酯内标溶液(0.1 mg/mL)：准确称取 50 mg(精确至 0.000 01 g)丁基异硫氰酸酯[CH ₃ (CH ₂) ₃ NCS](CAS号：592-82-5，纯度≥99%)于 500 mL 棕色容量瓶中，用二氯甲烷溶解并定容，混匀，于 -18℃ 以下保存，有效期为 3 个月。	规范丁基异硫氰酸酯内标溶液的配制过程。

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
9	4 试剂或材料	无异硫氰酸酯混合标准溶液配制方法	<p>4.12 异硫氰酸酯混合标准溶液 (1.0 mg/mL)：分别准确称取 10 mg (精确至 0.00001 g) 丙烯基异硫氰酸酯 [CH₂=CHCH₂NCS] (CAS 号：57-06-7, 纯度≥99.7%)、丁烯基异硫氰酸酯 [CH₂=CHCH₂CH₂NCS] (CAS 号：3386-97-8, 纯度≥95.0%)、戊烯基异硫氰酸酯 [CH₂=CHCH₂CH₂CH₂NCS] (CAS 号：18060-79-2, 纯度≥95.0%) 于 10 mL 棕色容量瓶中，用丁基异硫氰酸酯内标溶液 (4.11) 溶解并定容，混匀，于 -18 °C 以下保存，有效期 3 个月。</p> <p>4.13 异硫氰酸酯混合标准系列工作溶液：精确移取适量异硫氰酸酯混合标准溶液 (4.12) 于 10 mL 容量瓶中，用丁基异硫氰酸酯内标溶液 (4.11) 稀释定容配成标准系列工作溶液，丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的浓度分别为：0 mg/mL、0.001 mg/mL、0.02 mg/mL、0.05 mg/mL、0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL。丁基异硫氰酸酯内标浓度为 0.1 mg/mL。临用现配。</p>	规范异硫氰酸酯混合标准溶液配制过程，用于各种异硫氰酸酯的定性和内标法定量。
10	6 样品	采集具有代表性的配合饲料样品，至少 2 kg，四分法缩分至约 250 g，磨碎，过 1 mm 孔筛，混匀，装入密闭容器，防止试样变质，低温保存备用。	按照 GB/T 20195 规定制备试样，至少 200 g，粉碎使其全部过 0.42 mm 分析筛，混合均匀，装入密闭容器中，备用。	规范样品制备过程。

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
11	7.1 试样溶液制备	称取约 2.2 g 试样于具塞锥形瓶(4.7)中, 精确到 0.001 g, 加入 5 mL pH7 缓冲液(3.3)、30 mg 酶制剂(3.5)、10 mL 丁基异硫脲酸酯内标溶液(3.6), 用振荡器(4.6)振荡 2h, 将具塞锥形瓶(4.7)中内容物转入离心试管(4.9)中, 离心机(4.8)离心, 用滴管吸取少量离心试管(4.9)下层有机相溶液, 通过铺有少量无水硫酸钠(3-4)层和脱脂棉的漏斗过滤, 得澄清滤液备用。	平行做两份试验。称取 2.2 g (精确至 0.000 1 g) 试样置于 150 mL 具塞三角瓶中, 加入 0.5 g 白芥子酶(4.10)、5.0 mL pH7.0 缓冲溶液 (4.9)、10 mL 丁基异硫脲酸酯内标溶液 (4.11), 于室温下 200 次/min 振荡提取 2 h, 将具塞三角瓶中内容物全部转入离心试管中, 5 000 r/min 离心 10 min, 取下层溶液, 用在滤纸上铺有 2 g~3 g 无水硫酸钠层的漏斗过滤, 滤液备用。	规范表述; 增加白芥子酶用量, 保证饲料中硫葡萄糖苷酶解完全; 过滤不使用脱脂棉。
12	7.2 气相色谱参考条件	6.2-1 色谱柱: 玻璃, 内径 3 mm, 长 2 m; 6.2.2 固液: 20% FFAP (或其他效果相同的固定液); 6.2.3 载体: Chromosorb W, HP, 80-100 目 (或其他效果相同的载体); 6.2.4 柱温: 100 °C。6.2.5 进样口及检测器温度: 150 °C; 6.2.6 载气(氮气)流速: 65 mL/min	色谱柱: 聚乙二醇 (FFAP) 毛细管柱, 30 m×0.32 mm×0.25 μm, 或性能相当者; 色谱柱温度: 起始温度 100 °C, 保持 10 min, 以 10 °C/min 升到 200 °C, 保持 2 min; 进样口温度: 220 °C; 检测器温度: 230 °C; 载气: 高纯氮; 载气流速: 1.0 mL/min; 氢气流速: 35 mL/min; 空气流速: 400 mL/min; 尾吹流速: 20 mL/min; 进样量: 1 μL; 分流比: 5:1。	气相色谱分析技术突飞猛进, 目前已基本采用毛细管色谱柱, 不再使用填充柱。
13	7.3 测定	用微量注射器(4.3)吸取 1-2 μL 上述澄清滤液, 注入色谱仪, 测量各异硫脲酸酯峰面积。	7.3.1 标准溶液和试样溶液测定 在仪器的最佳条件下, 分别取异硫脲酸酯混合标准溶液 (4.12) 和试样溶液 (7.1) 上机测定。各异硫脲酸酯标准溶液的气相色谱图参见附录 A。 7.3.2 定性和定量 以保留时间定性, 试样溶液中各异硫脲酸酯保留时间应与标准溶液中各异硫脲酸酯的保留时间一致, 其相对偏差在 ±2.5% 之内, 内标法定量。	增加混合标准溶液测定, 确保各异硫脲酸酯定性、定量准确。

No.	章条编号	原标准	修订后	修订原因
14	8 试验数据处理	试样中异硫氰酸酯的含量 (mg/kg) $X = \frac{m_c}{m \times S_c} \times (1.15S_a + 0.98S_b + 0.88S_p) \times 1000$	试样中异硫氰酸酯(以丙烯基异硫氰酸酯计)的含量以质量分数 w 计, 数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示, 按下列公式计算: $w = w_a + w_b \times \frac{113.18}{99.15} + w_p \times \frac{127.21}{99.15}$	测定结果以丙烯基异硫氰酸酯计, 和 GB 13078-2017 一致。
15	精密度	同一分析者对同一试样同时或快速连续地进行两次测定, 所得结果之间的差值: 在异硫氰酸酯含量小于或等于 0.50 mg/g 时, 不得超过平均值的 20%; 当异硫氰酸酯含量大于 0.50 mg/g 而小于 1.00 mg/g 时, 不得超过平均值的 15%; 在异硫氰酸酯含量等于或大于 1.00 mg/g 时, 不得超过平均值的 10%。	在重复性条件下, 应符合下述规定: 当异硫氰酸酯含量小于等于 100 mg/kg 时, 两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 15%; 当异硫氰酸酯含量大于 100 mg/kg 时, 两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的 10%	根据实际样品测定结果统计得出。

3. 主要技术内容确定的依据

3.1 白芥子酶的选择、制备和酶解效果试验

3.1.1 白芥种子样品筛选

2018年10月标准编制小组主要成员到成都国际商贸城中药材批发市场购买了8批白芥种子，按照GB/T 5520-2011开展了白芥种子发芽率试验，每批次白芥种子随机选取4组样品，每100粒为一组，均匀放置于铺有2层滤纸的培养皿中（试验用的发芽床和一切用具均已消毒），在20℃培养箱中连续培养72h，每天按时添加适量蒸馏水，筛选发芽率大于85%的白芥种子作为酶源。发芽状态见图2，发芽率结果见表6。结果表明，除181004、181007批次白芥种子平均发芽率分别为40%、58%外，其他6批次白芥种子平均发芽率均不低于94%，符合标准试验要求。



图2 白芥种子发芽时间为1天、2天、3天（从左至右）发芽状态

表6 白芥种子发芽率结果

批次	发芽率 (%)				平均发芽率 (%)
	平行1	平行2	平行3	平行4	
181001	99	98	100	99	99
181002	100	98	99	99	99
181003	95	95	92	93	94
181004	40	38	39	42	40

批次	发芽率 (%)				平均发芽率 (%)
	平行1	平行2	平行3	平行4	
181005	96	97	95	95	96
181006	100	100	100	97	99
181007	60	59	55	58	58
181008	99	99	99	98	99

3.1.2 白芥子酶的制备

选取 3.2.1 中发芽率试验合格的白芥种子，比较两种白芥子酶的制备方法，具体制备方法如下：

方法一（GB/T 13087-1991 白芥子酶制备方法）：将 181001 批次白芥种子粉碎后，称取 100 g，用 300 mL 丙酮分 10 次脱脂，滤纸过滤，真空干燥脱脂白芥种子粉，然后用 400 mL 水分 2 次提取脱脂粉中的芥子酶，离心，取上层混悬液体，合并两次混悬液，再向其中加入 400 mL 丙酮沉淀芥子酶，弃去上清液，用丙酮洗涤沉淀 5 次，离心，真空干燥下层沉淀物，研磨成粉状，装入密闭容器中，贮存于 4 °C 冰箱备用。

方法二：取 181001 批次白芥种子，粉碎后用石油醚（30-60 °C）脱脂（脱脂 10 次），使脂肪含量不大于 2%，操作环境温度保持在 30 °C 以下，置于通风橱内于室温下使溶剂挥发，然后再粉碎一次使全部通过 0.28 mm 试验筛，装入密闭容器中，贮存于 4 °C 冰箱备用。

选用异硫氰酸酯含量高的菜粕样品作为试验对象，白芥子酶的添加量分别为 15 mg、30 mg、50 mg、80 mg、100 mg 和 250 mg，对采用方法一、方法二制备的白芥子酶和商品白芥子酶（Sigma 公司，批号：T4528-200UN）开展白芥子酶的酶解效果比较实验，试验结果见

表 7。

表 7 不同白芥子酶酶解效果试验结果

酶添加量 (mg)	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计） / mg/kg		
	芥子酶（方法一）	芥子酶（方法二）	商品芥子酶（Sigma）
15	3529	3498	3390
30	5078	5126	5596
50	8756	8645	8873
80	11254	11193	11639
100	12398	12287	12374
250	12287	12325	12374

结果表明，采用方法一、方法二制备的白芥子酶和商品白芥子酶（Sigma）的酶解后异硫氰酸酯测定结果基本一致。方法一制备过程繁琐、耗时长，操作要求高，且要使用大量丙酮，不环保；方法二制备过程简单、耗时短，操作要求低；而商品芥子酶采购价格昂贵、成本高，且订货期长、货源不稳定。因此，选用方法二作为芥子酶的制备方法。

3.1.3 酶解效果试验

选取 181001 和 181002 批次白芥种子，按 3.1.2 中第二法制备白芥子酶，选取异硫氰酸酯含量高的菜粕开展酶解效果试验，白芥子酶的添加量分别为 15 mg、30 mg、50 mg、80 mg、100 mg、250 mg、500 mg、750 mg、1000 mg。样品前处理步骤为：称取 2.2 g（精确至 0.000 1 g）试样置于 150 mL 具塞三角瓶中，加入 0.5 g 白芥子酶、5.0 mL pH7.0 缓冲溶液、10 mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液，于室温下 200 次/min 振荡提取 2 h，将具塞三角瓶中内容物全部转入离心试管中，5

000 r/min 离心 10 min, 用滴管吸取下层有机相溶液, 通过在定性滤纸上铺有少量无水硫酸钠层的漏斗过滤, 得澄清滤液作为试样溶液。按照上述色谱条件进行气相色谱分析, 白芥子酶的酶解效果试验结果见表 8 和图 3。结果表明, 白芥子酶添加量为 15 mg~100 mg 时, 菜粕样品异硫氰酸酯测定结果随着添加量的增多呈增长趋势, 测定结果 RSD 在 7.23%~32.00% 之间, 可能白芥子酶添加量不够、酶解不完全, 不能将菜粕中硫葡萄糖苷全部转换为异硫氰酸酯; 白芥子酶添加量为 100 mg~1000 mg 时, 菜粕样品异硫氰酸酯测定结果基本一致, 测定结果 RSD 均小于 10%, 白芥子酶添加量可能已足够、酶解完全, 菜粕中硫葡萄糖苷已完全转换为异硫氰酸酯, 因此白芥子酶的添加量应大于 100 mg。另外, 181001、181002 两批次白芥子酶的酶解效果基本一致, 表明第二法制备的白芥子酶的酶解效果重复性好; 对于高含量菜粕样品, 添加 250 mg 已能把样品中硫葡萄糖苷全部转换为异硫氰酸酯, 且 181001、181002 两批次白芥子酶测定结果一致。

表 8 不同批次、不同添加量白芥子酶酶解试验结果

批次	添加量 (mg)	异硫氰酸酯 (以丙烯基异硫氰酸酯计) / mg/kg				RSD (%)
		1	2	3	平均值	
181001	15	4043.1	3653.5	3523.3	3740	7.23
	30	4746.2	4767.1	7567.8	5694	28.51
	50	5633.2	10805.6	10300.8	8913	32.00
	80	10389.8	12437.2	12675.5	11834	10.62
	100	12389.5	12248.3	12262.1	12300	0.63
	250	12410.9	12287.0	12339.2	12346	0.50
	500	11514.9	12479.3	12208.7	12068	4.12
	750	12425.0	12544.1	12257.4	12409	1.16
	1000	11859.7	12473.7	11750.3	12028	3.24

批次	添加量 (mg)	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计） / mg/kg				RSD (%)
		1	2	3	平均值	
181002	15	3023.2	3893.6	3171.7	3363	13.85
	30	4295.6	3820.9	3573.7	3897	9.41
	50	9441.2	7322.9	10387.7	9051	17.34
	80	12296.8	8739.7	12393.8	11143	18.69
	100	12436.8	12335.6	12329.6	12367	0.49
	250	12467.9	12144.7	12338.9	12317	1.32
	500	12390.7	12396.0	12158.8	12315	1.10
	750	12372.8	12347.1	12024.2	12248	1.59
	1000	12045.5	12532.6	12248.1	12275	1.99

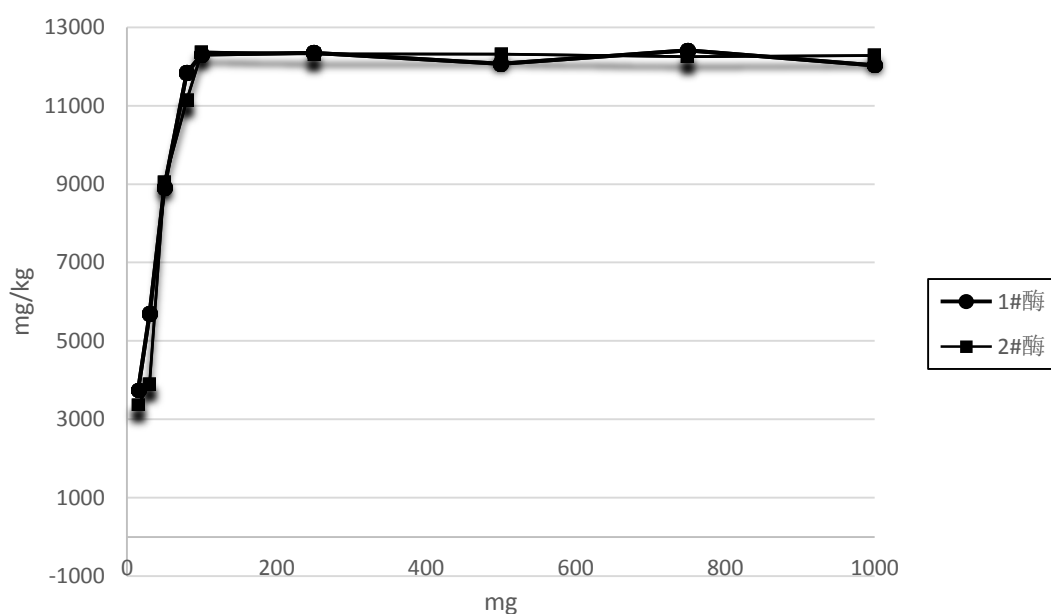


图3 181001和181002批次白芥子解酶解效果试验结果比较

在高含量异硫氰酸酯菜粕酶解试验结果基础上，选择中、低含量异硫氰酸酯的菜粕和水产配合饲料样品开展酶解试验，白芥子酶的添加量分别为 50 mg、100 mg、250 mg 和 500 mg，试验结果见表 9 和表 10。结果表明，181001、181002 两批次白芥子酶使用量在 50 mg~500 mg 范围内时，菜粕和水产配合饲料样品的异硫氰酸酯测定结果基本一致，且 RSD 均小于 10%，样品酶解效果好，已把样品中硫葡萄糖

苷全部转换为异硫氰酸酯。

表 9 181001 批次白芥子酶酶解试验结果

样品	添加量 (mg)	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计） / mg/kg				RSD (%)
		1	2	3	平均值	
菜粕	50	2084.0	2241.6	2206.8	2177	3.80
	100	2108.8	2126.6	2057.8	2098	1.70
	250	2118.8	1981.3	2101.8	2067	3.63
	500	2104.6	2013.5	2063.5	2061	2.21
菜粕	50	256.3	254.2	285.8	265	2.66
	100	276.4	268.2	258.2	268	3.40
	250	270.3	250.5	271.0	264	4.41
	500	266.3	301.4	310.5	293	7.98
水产配合饲料	50	160.5	166.2	160.2	162	2.06
	100	154.7	147.1	147.0	150	2.93
	250	157.2	159.2	159.7	159	0.82
	500	144.2	156.0	162.1	154	5.90

表 10 181002 批次芥子酶酶解试验结果

样品	添加量 (mg)	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计） / mg/kg				RSD (%)
		1	2	3	平均值	
菜粕	50	2102.5	2031.7	2068.2	2067	1.71
	100	2005.9	2035.2	2037.4	2026	0.87
	250	1992.3	2010.0	2016.7	2006	0.63
	500	2004.1	1981.7	1936.1	1974	1.76
菜粕	50	290.9	291.0	280.4	287	2.12
	100	292.0	282.8	292.4	289	1.88
	250	305.2	282.5	295.2	294	3.86
	500	294.4	294.7	314.0	301	3.74
水产配合饲料	50	164.7	147.5	154.9	156	5.55
	100	161.8	162.7	161.0	162	0.51
	250	163.6	161.7	161.3	162	0.77
	500	160.3	161.2	166.6	163	2.09

以上芥子酶的酶解试验结果表明,样品中硫代葡萄糖苷含量不同,若要酶解完全,所需要芥子酶添加量不同,含量越高、所需芥子酶的添加量越大。为保证不同硫代葡萄糖苷含量的菜粕、饲料等样品酶解完全,选择采用方法二制备的芥子酶,同时考虑到不同来源的白芥种子的酶活性有一定差异,确定白芥子酶添加量为 500 mg,确保样品酶解完全、样品中硫代葡萄糖苷可全部转换为异硫氰酸酯,以保证各种饲料原料、饲料产品异硫氰酸酯测定结果的准确性。

3.1.4 白芥子酶有效期考察

选取 181006、181008 两批次白芥种子,按 3.2.2 中第二法制备白芥子酶,按照上述方法和条件连续 6 周测定菜粕中异硫氰酸酯含量,结果见表 11。结果表明,连续测定 5 周,2 批白芥子酶测定结果一致。

表 11 白芥子酶有效期考察

白芥子酶	异硫氰酸酯(以丙烯基异硫氰酸酯计) / mg/kg							平均值 mg/kg	RSD (%)
	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周		
181006	10068	10195	10039	10097	10132	10141		10112	0.55
181008	10075	10016	10129	10046	10117	10185		10095	0.61

3.2 试样前处理条件的确定

GB/T 13087-1991 规定:称取 2.2 g 试样于具塞锥形瓶中,精确到 0.001 g,加入 5.0 mL pH7 缓冲溶液,30 mg 粗白芥子酶,10 mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液,用振荡器振荡 2 h,将具塞三角瓶中内容物全部转入离心试管中,离心机离心,用滴管吸取少量试管下层有机相溶液,通过铺有少量无水硫酸钠层和脱脂棉的漏斗过滤,得澄清溶液备用。

本次标准修订，除修改白芥子酶外，明确了在室温下进行酶解、提取 2 h，规定 5000 r/min 离心 10 min，为防止脱脂棉吸附试样溶液，过滤用铺在定性滤纸的无水硫酸钠脱水，不再使用脱脂棉。

修订后的样品前处理步骤如下：平行做两份试验。称取 2.2 g（精确至 0.000 1 g）试样置于 150 mL 具塞三角瓶中，加入 0.5 g 白芥子酶、5.0 mL pH7.0 缓冲溶液、10 mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液，于室温下 200 次/min 振荡提取 2 h，将具塞三角瓶中内容物全部转入离心试管中，5 000 r/min 离心 10 min，用滴管吸取下层有机相溶液，通过在定性滤纸上铺有少量无水硫酸钠层的漏斗过滤，得澄清滤液作为试样溶液，备用。

3.3 内标物标准溶液稳定性考察

配制 0.1 mg/mL 丁基异硫氰酸酯内标物标准溶液，每 7 天进行一次稳定性考察，连续考察 8 周，每次考察都采用临用现配的内标物标准溶液的的响应值来计算所考察的丁基异硫氰酸酯内标标准溶液含量，每次做 3 平行试验，8 次丁基异硫氰酸酯内标溶液稳定性结果如图 10 所示。结果表明，丁基异硫氰酸酯内标物标准溶液 28 天内较稳定，确定丁基异硫氰酸酯内标物标准溶液有效期为 4 周。

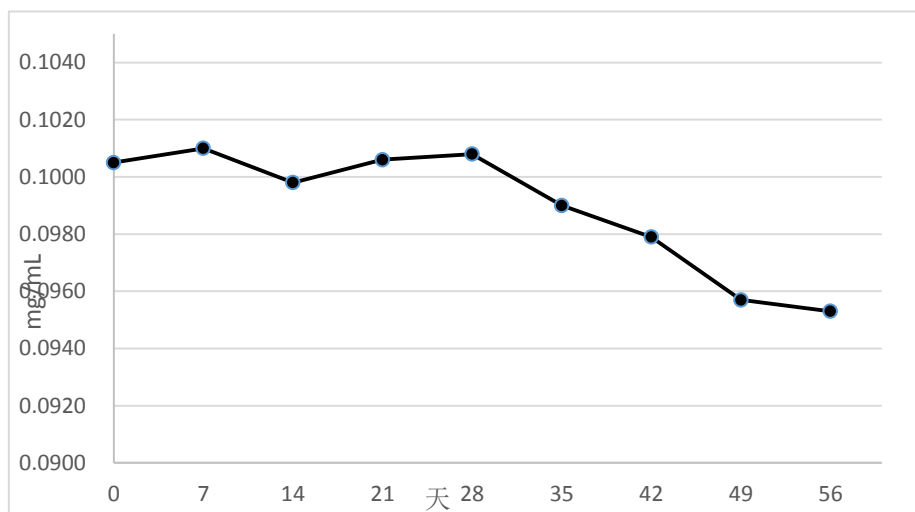


图4 丁基异硫氰酸酯内标物标准溶液 (0.1 mg/mL) 稳定性考察

3.4 气相色谱条件的选择和优化

3.4.1 色谱条件的选择和优化

GB/T 13087-1991 规定色谱柱为玻璃填充柱，固定液为 20%FFAP、载体为 Chromosorp W。随着气相色谱分析技术进步，国内外检测行业目前已基本采用毛细管色谱柱，根据相似相溶原理，鉴于异硫氰酸酯的极性较强，参考 GB/T 13087-1991 和有关文献^[9]，选择 FFAP 毛细管色谱柱 (30 m×0.32 mm×0.25 μm)；为保证丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯、戊烯基异硫氰酸酯和内标物丁基异硫氰酸酯分离良好，基线平稳，确保目标化合物定量准确，对色谱柱、进样口、检测器的条件进行选择 and 优化，经反复试验，最终采用程序升温、分流进样方式，优化后的色谱条件如下：

色谱柱：FFAP毛细管柱，30 m×0.32 mm×0.25 μm；

色谱柱温度：起始温度100 °C，保持10 min，以10 °C/min升到200 °C，保持2 min；

进样口温度：220 °C；

检测器温度：230 ℃；

载气：高纯氮；

载气流速：1.0 mL/min；

氢气流速：35 mL/min；

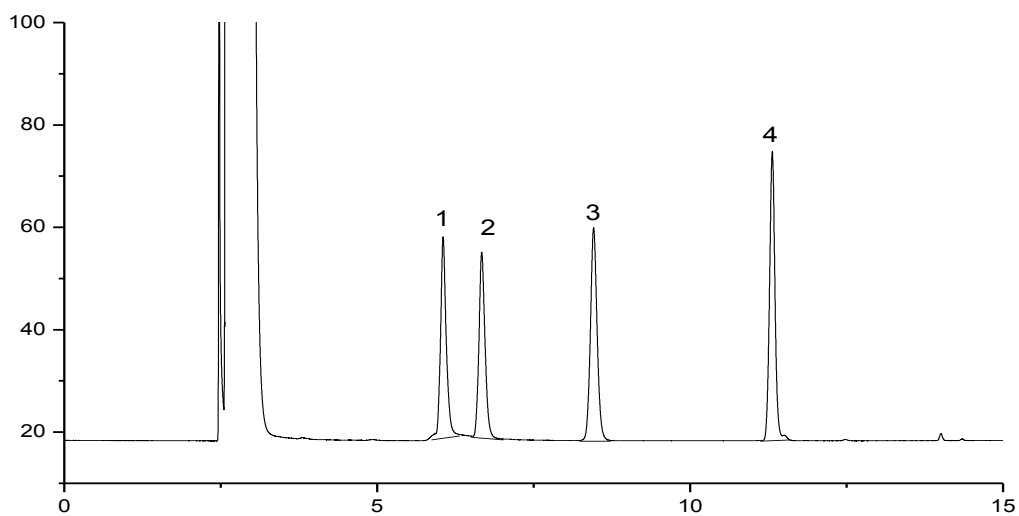
空气流速：400 mL/min；

尾吹流速：20 mL/min；

进样量：1 μL。

分流比：5：1；

该条件可满足目标化合物分离度的需求，各异硫氰酸酯标准溶液气相色谱图见图 2。



注：

1 —— 丙烯基异硫氰酸酯； 2 —— 丁基异硫氰酸酯（内标物）；
3 —— 丁烯基异硫氰酸酯； 4 —— 戊烯基异硫氰酸酯；

图5 各异硫氰酸酯标准溶液（0.1 mg/mL）气相色谱图

3.4.2 色谱条件的选择性、专属性和稳定性考察

在上述选择的色谱条件下,考察异硫氰酸酯混合标准溶液各异硫氰酸酯的保留时间、峰面积的精密度和稳定性考察,试验结果见表12。结果表明,四种异硫氰酸酯保留时间的RSD值均小于0.13%,峰面积的RSD值均小于0.98%。考察了菜粕、菜籽、水产配合饲料、精料补充料、浓缩饲料等实际样品色谱分析的选择性,色谱图见图6~图10。结果表明,在规定的色谱条件下,实际样品中的色谱图中除了丙烯基异硫氰酸酯、丁基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯外,没有其他色谱峰。

以上试验结果表明,在所选择的色谱条件下,该各异硫氰酸酯的分离度、稳定性和专属性满足定性和定量测定要求,该方法选择性、专属性和稳定性高。

表 12 异硫氰酸酯标准混合标准溶液精密度实验

异硫氰酸酯	保留时间 (min)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
丙烯基异硫氰酸酯	6.031	6.031	6.027	6.02	6.031	6.012	0.13
丁基异硫氰酸酯	6.65	6.649	6.645	6.637	6.648	6.629	0.13
丁烯基异硫氰酸酯	8.422	8.423	8.42	8.413	8.424	8.405	0.09
戊烯基异硫氰酸酯	11.282	11.283	11.281	11.276	11.281	11.269	0.05
异硫氰酸酯	峰面积 (pA*s)						RSD (%)
	平行 1	平行 2	平行 3	平行 4	平行 5	平行 6	
丙烯基异硫氰酸酯	232.673	230.035	229.370	233.023	234.199	232.454	0.80
丁基异硫氰酸酯	354.543	351.981	352.282	358.668	355.437	359.827	0.91
丁烯基异硫氰酸酯	619.227	614.156	610.110	625.602	610.866	612.014	0.98
戊烯基异硫氰酸酯	533.457	528.543	525.003	532.791	529.322	526.244	0.64

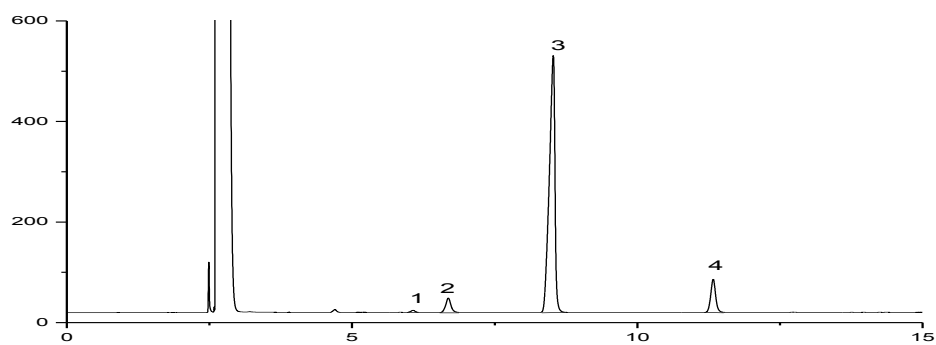


图6 菜粕异硫氰酸酯气相色谱图

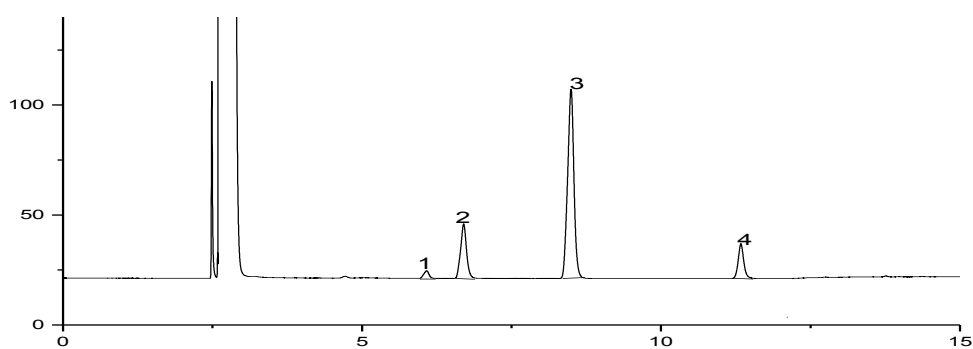


图7 菜籽异硫氰酸酯气相色谱图

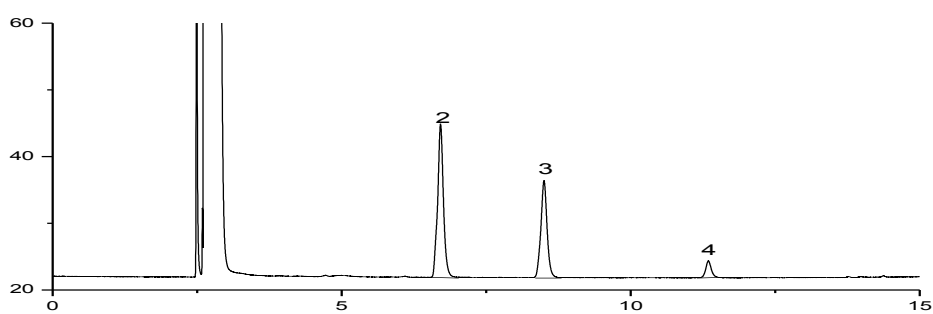


图8 水产配合饲料异硫氰酸酯气相色谱图

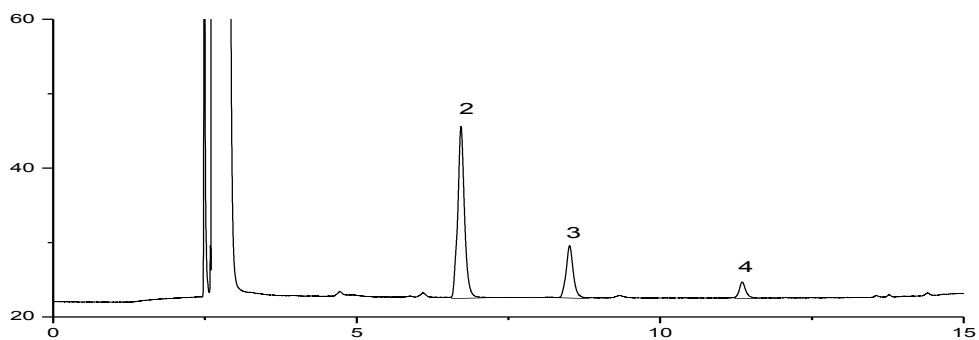


图9 精料补充料异硫氰酸酯气相色谱图

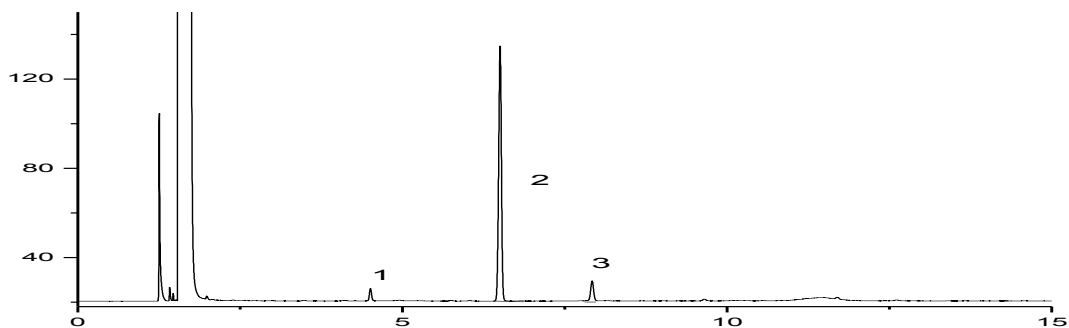


图10 浓缩饲料异硫氰酸酯气相色谱图

注:

- 1——丙烯基异硫氰酸酯； 2——丁基异硫氰酸酯（内标）；
3——丁烯基异硫氰酸酯； 4——戊烯基异硫氰酸酯；

3.5 线性范围考察

3.5.1 标准溶液的配制

丁基异硫氰酸酯内标溶液（0.1 mg/mL）准确称取 50 mg（精确至 0.00001 g）丁基异硫氰酸酯 $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{NCS}]$ （纯度 $\geq 99\%$ ，CAS 号：592-82-5）于 500 mL 棕色容量瓶中，用二氯甲烷溶解并定容，混匀，于 0~4 °C 保存。

异硫氰酸酯混合标准溶液（2.0 mg/mL）分别准确称取 10 mg（精确至 0.00001 g）丙烯基异硫氰酸酯 $[\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{NCS}]$ 、丁烯基

异硫氰酸酯[CH₂=CHCH₂CH₂NCS]、戊烯基异硫氰酸酯[CH₂=CHCH₂CH₂CH₂NCS]适量，用 0.1 mg/mL 丁基异硫氰酸酯内标溶液配制浓度分别为 2.0 mg/mL 的异硫氰酸酯混合标准工作溶液，混匀，于 0~4 °C 保存。

异硫氰酸酯混合工作标准溶液系列 准确移取适量异硫氰酸酯混合标准溶液，用丁基异硫氰酸酯内标溶液逐级稀释浓度分别为 0、0.001、0.02、0.05、0.1、0.5、1.0、2.0 mg/mL 异硫氰酸酯混合工作标准溶液系列，临用现配。

3.5.2 测定

在上述色谱条件下进行分析测定。以各异硫氰酸酯标准溶液与内标物标准溶液质量浓度比为横坐标（x），相对应的丙烯基异硫氰酸酯]、丁烯基异硫氰酸酯、戊烯基异硫氰酸酯与内标物峰面积比为纵坐标（y），进行线性回归，试验结果见表 13。结果表明，丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯、戊烯基异硫氰酸酯在 0~2.0 mg/mL 范围内，相关系数均在 0.9999 以上，说明在所选择的浓度范围内，FID 的响应与各异硫氰酸酯的质量浓度成线性相关。

表13 3种异硫氰酸酯线性范围、回归方程和相关系数

异硫氰酸酯	线性范围 (mg/mL)	回归方程	相关系数
丙烯基异硫氰酸酯	0~2.0	Y=0.74507x-0.0086307	0.99999
丁烯基异硫氰酸酯	0~2.0	Y=1.08402x-0.023104	0.99999
戊烯基异硫氰酸酯	0~2.0	Y=1.13099x-0.0275238	0.99998

3.6 方法精密度考察

按照上述确定的试样前处理和气相色谱条件,开展了菜粕、青枯、菜饼、水产配合饲料和水产膨化饲料异硫氰酸酯精密度试验,每个样品进行6平行测定,并重复3次,结果见表14。结果表明,按照上述方法和条件,菜粕、青枯、菜饼、水产配合饲料和水产膨化饲料样品异硫氰酸酯测定结果批内、批间的相对标准偏差在1.53%~9.96%之间,均小于10%,测定结果重复性好。

表14 方法精密度试验结果

样品	批次	异硫氰酸酯(以丙烯基异硫氰酸酯计) / mg/kg						平均值 mg/kg	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
菜粕	I	11064.3	9984.2	9967.3	11119.2	9370.6	9313.8	10137	7.53	3.62
	II	11300.9	9851.7	11423.8	11190.5	10616.2	10055.5	10740	6.06	
	III	9579.9	10600.2	10260.0	9621.5	10404.2	9871.3	10056	4.63	
青枯	I	2185.9	2157.4	2097.4	2119.2	2143.4	2149.8	2142	1.59	1.53
	II	2258.5	2222.2	2189.0	2237.0	2139.6	2200.1	2208	2.10	
	III	2243.1	2304.1	1934.0	2221.9	2204.1	2092.3	2167	6.62	
菜饼	I	317.2	278.4	271.3	250.9	277.6	297.3	282	8.52	4.11
	II	277.6	280.8	289.9	284.0	292.3	285.8	285	2.15	
	III	305.9	302.7	334.2	331.8	259.2	287.5	304	9.96	
水产配合饲料	I	290.6	283.3	286.0	301.4	272.4	268.6	284	3.37	2.71
	II	275.9	268.4	276.6	257.1	258.3	280.2	269	3.46	
	III	272.2	260.4	281.7	282.6	281.5	283.2	277	3.44	
水产配合饲料	I	187.4	184.8	183.6	202.2	207.6	204.8	195	5.65	2.75
	II	174.5	182.2	188.1	189.1	187.7	193.7	186	3.29	
	III	174.5	184.7	189.6	182.6	195.8	190.9	186	4.27	

3.7 回收率试验

按照上述确定的试样前处理和气相色谱条件,开展了空白饲料、水产配合饲料、猪配合饲料、鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、低含量菜粕和中含量菜粕异硫氰酸酯回收率试验,每个样品进行

3梯度加标、3平行测定，并重复测定3次，结果见表15。结果表明，按照上述方法和条件，空白饲料、水产配合饲料、猪配合饲料、鸡配合饲料、鸡浓缩饲料、牛精料补充料、低含量菜粕和中含量菜粕异硫氰酸酯平均回收率在83.6%~112.0%之间，批内相对标准偏差在0.26%~8.67%之间，批间相对标准偏差在0.71%~6.45%之间，说明该方法对不同类型、不同含量样品、不同时间测定均有较好的准确度。

表15 空白饲料、菜粕、水产配合饲料和回收率试验结果

样品	加标量 (mg/kg)	测定 批次	回收率 (%)			平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
空白饲料	5.0	I	99.4	103.4	87.3	96.7	8.67	2.63
		II	108.5	94.0	103.2	101.9	7.20	
		III	103.8	93.5	101.9	99.8	5.50	
	20.0	I	95.0	97.3	100.2	97.5	2.67	0.71
		II	99.9	99.2	97.5	98.9	1.25	
		III	98.7	98.5	97.4	98.2	0.71	
	50.0	I	97.8	95.6	96.0	96.5	1.21	4.34
		II	89.9	91.3	89.5	90.2	1.05	
		III	89.1	90.4	87.9	89.1	1.45	
水产配合 饲料	80.0	I	91.6	93.6	89.7	91.6	2.13	6.45
		II	105.6	96.0	106.9	102.8	5.79	
		III	106.3	96.2	105.0	102.5	5.36	
	160.0	I	95.7	89.4	94.3	93.1	3.55	3.82
		II	92.6	86.6	98.8	92.7	6.58	
		III	87.1	81.4	92.3	86.9	6.27	
	320.0	I	95.0	91.2	92.6	92.9	2.07	2.55
		II	99.2	97.1	96.4	97.6	1.49	
		III	98.3	96.1	94.7	96.4	1.88	
猪配合饲 料	50.0	I	89.0	88.5	87.8	88.4	0.70	3.04
		II	87.7	86.8	86.3	86.9	0.80	
		III	92.4	93.7	92.4	92.8	1.20	
	100.0	I	96.0	94.8	96.1	95.6	0.74	3.01
		II	91.6	91.9	91.9	91.8	0.20	
		III	89.3	89.5	89.2	89.3	0.15	
	250.0	I	94.6	93.6	94.9	94.4	0.69	2.29
		II	95.7	96.2	96.5	96.1	0.41	
		III	91.5	91.0	91.4	91.3	0.30	
鸡配合饲 料	100.0	I	104.8	103.6	103.9	104.1	0.57	2.52
		II	99.7	98.7	99.1	99.2	0.50	
		III	103.0	105.1	104.5	104.2	1.04	
	200.0	I	94.5	94.9	99.9	96.4	3.09	2.59
		II	92.5	93.3	91.9	92.6	0.74	
		III	93.8	92.7	92.4	93.0	0.76	
	500.0	I	96.8	96.4	96.0	96.4	0.43	0.82
		II	96.5	97.7	96.9	97.0	0.61	
		III	98.2	97.8	98.0	98.0	0.18	
鸡浓缩饲 料	20.0	I	93.4	100.8	93.9	96.0	4.29	4.43
		II	95.2	95.4	102.1	97.5	4.05	
		III	92.8	97.9	88.3	93.0	5.16	

样品	加标量 (mg/kg)	测定 批次	回收率 (%)			平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
鸡浓缩饲料	40.0	I	95.3	96.2	96.4	96.0	0.60	5.36
		II	90.2	87.3	88.1	88.5	1.70	
		III	87.3	83.6	85.6	85.5	2.19	
	100.0	I	93.2	93.2	93.6	93.3	0.26	1.01
		II	92.4	91.9	91.7	92.0	0.35	
		III	91.9	90.6	92.1	91.6	0.86	
牛精料补充料	20.0	I	93.4	105.7	94.3	97.8	7.02	5.43
		II	94.9	95.5	102.3	97.6	4.19	
		III	93.3	98.8	88.3	93.5	5.61	
	40.0	I	95.4	96.9	96.2	96.2	0.76	5.01
		II	90.0	87.8	88.3	88.7	1.28	
		III	87.9	83.7	89.0	86.9	3.24	
	100.0	I	93.2	94.2	93.5	93.6	0.53	0.96
		II	92.6	93.2	91.9	92.6	0.70	
		III	91.8	92.2	91.6	91.9	0.30	
低含量菜粕	200.0	I	92.0	102.6	86.7	93.8	8.63	4.64
		II	98.3	103.1	99.2	100.2	2.55	
		III	107.5	106.5	94.2	102.7	7.21	
	400.0	I	85.9	98.2	96.3	93.5	7.08	4.31
		II	101.5	104.3	95.2	100.3	4.65	
		III	102.5	101.5	100.0	101.3	1.24	
	800.0	I	91.0	89.9	91.5	90.8	0.90	1.98
		II	95.6	93.1	90.9	93.2	2.52	
		III	93.6	96.1	93.5	94.4	1.56	
中含量菜粕	400.0	I	101.9	103.4	112.0	105.8	5.15	5.49
		II	96.3	93.7	97.5	95.8	2.03	
		III	97.3	95.9	97.7	97.0	0.97	
	800.0	I	96.2	94.4	95.0	95.2	0.96	4.65
		II	91.6	96.1	83.3	90.3	7.19	
		III	86.9	89.6	83.9	86.8	3.29	
	1600.0	I	98.3	93.4	91.1	94.3	3.90	3.36
		II	101.3	96.7	97.1	98.4	2.59	
		III	105.1	100.1	97.4	100.8	3.87	

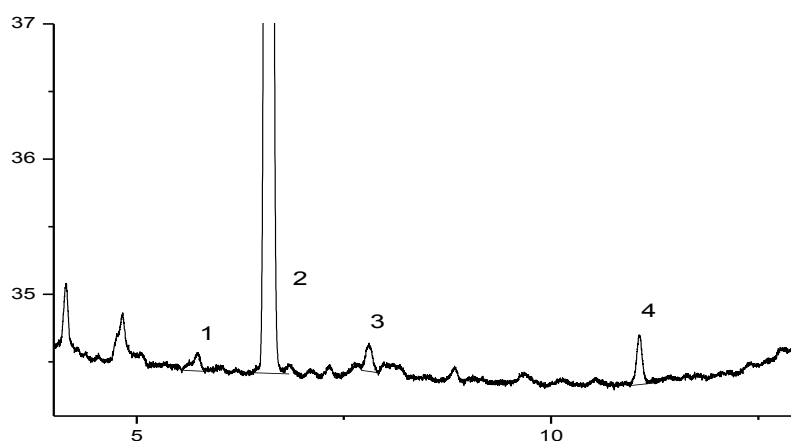
3.8 检出限和定量限的确定

根据 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》

5.4 检出限和定量限“信噪比法”规定要求，按照下述方法确定方法的检出限和定量限。

3.8.1 检出限 (LOD)

添加 4 μg 丙烯基异硫氰酸酯于 2.2 g 空白配合饲料中, 按照上述条件和方法测定, 信噪比 $S/N > 3$ 色谱图如图 11 所示。依据信噪比 $S/N > 3$ (按 PtP 算), 确定本标准方法异硫氰酸酯的检出限为 2.0 mg/kg, 图谱见图 11。



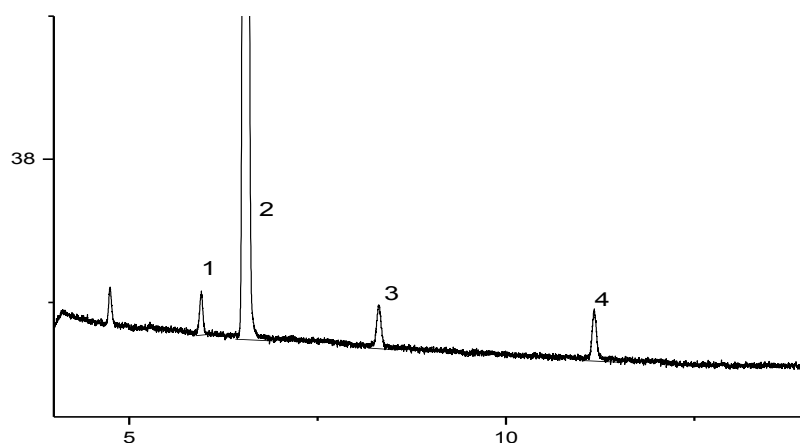
注:

- 1 —— 丙烯基异硫氰酸酯; 2 —— 丁基异硫氰酸酯 (内标物);
3 —— 丁烯基异硫氰酸酯; 4 —— 戊烯基异硫氰酸酯;

图 11 异硫氰酸酯检出限气相色谱图 (加标 2.0 mg/kg)

3.8.2 定量限 (LOQ)

添加 10 μg 丙烯基异硫氰酸酯于 2.2 g 空白配合饲料中, 按照上述条件和方法测定, 信噪比 $S/N > 10$ 色谱图如下图所示。依据信噪比 $S/N > 10$ (按 PtP 算), 确定本标准方法异硫氰酸酯的定量限为 5.0mg/kg, 图谱见图 12。



注：
 1 —— 丙烯基异硫氰酸酯； 2 —— 丁基异硫氰酸酯（内标物）；
 3 —— 丁烯基异硫氰酸酯； 4 —— 戊烯基异硫氰酸酯；

图 12 异硫氰酸酯气相色谱图（加标 5.0 mg/kg）

3.9 试验数据处理

GB/T 13087-1991 测定结果是以丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的总和计，为满足 GB 13078-2017《饲料卫生标准》规定要求，本次计算公式修订是在 GB/T 13087-1991 计算公式基础上，按照内标法先计算丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯对丁基异硫氰酸酯内标的相对响应因子，再计算丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的含量，最后把丁烯基异硫氰酸酯、戊烯基异硫氰酸酯含量换算成丙烯基异硫氰酸酯，结果以异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计）表示。具体如下：

试样中异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计）的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，按公式（1）计算：

$$w = w_a + w_b \times \frac{113.18}{99.15} + w_p \times \frac{127.21}{99.15} \dots\dots\dots (1)$$

w_a 、 w_b 、 w_p —试样中丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

99.15、113.18、127.21—丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的分子量。

试样中各异硫氰酸酯的含量以质量分数 w_i 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示按公式（2）计算：

$$w_i = \frac{A_i \times m_e}{A_e \times RRF_i \times m} \times 1000 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

m_e —10 mL内标溶液中丁基异硫氰酸酯的质量，单位为毫克（mg）；

m —试样的质量，单位为克（g）；

A_e —试样溶液丁基异硫氰酸酯的峰面积；

A_i —试样溶液各异硫氰酸酯的峰面积；

RRF_i —各异硫氰酸酯对丁基异硫氰酸酯内标的相对响应因子；

RRF_i 按照公式（3）计算：

$$RRF_i = \frac{S_i \times c_e}{S_e \times c_i} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

S_i —目标化合物的峰面积；

c_e —定量内标的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

S_e —定量内标的峰面积；

c_i —各异硫氰酸酯的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

在系列标准溶液中，丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的RRF值相对标准偏差（RSD）应小于20%。

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。

3.10 精密度

根据GB/T 20001.4-2015附录B要求，结合实际样品测定结果，精密度表示方法修改为：

在重复性条件下，应符合下述规定：

当异硫氰酸酯含量小于等于100 mg/kg时，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的15%；当异硫氰酸酯含量大于100 mg/kg时，两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不超过该算术平均值的10%。

3.11 实际样品检测

根据 GB 13078-2017《饲料卫生标准》，标准适应范围必须覆盖饲料原料、配合饲料、浓缩饲料和精料补充料。从市场上收集饲料原料25批次，配合饲料、浓缩饲料和精料补充料等共15批次实际样品，按照上述确定的条件和方法测定异硫氰酸酯含量，结果见表16、表17。结果表明，所建立的标准方法适应配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和饲料原料。

表 16 饲料原料实际样品测定结果

No.	样品名称	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计） / mg/kg
1	菜粕	12300±78
2	菜粕	3740±71
3	青枯	2127±46
4	菜饼	165±18
5	200 型菜粕	363±7
6	菜粕	1424±18
7	菜饼	1372±14
8	200 型菜粕	111±6
9	青枯	9053±75
10	菜籽	284±7
11	菜籽	345±20
12	菜籽	420±14
13	50%棉粕	ND
14	国产 DDGS	ND
15	进口 DDGS	ND
16	玉米蛋白粉	ND
17	喷浆玉米皮	ND
18	玉米胚芽粕	ND
19	46%棉粕	ND
20	发酵豆粕	ND
21	43%大豆粕	ND
22	米糠	ND
23	芝麻粕	ND
24	花生粕	ND
25	进口鱼粉	ND
26	国产鱼粉	ND
27	猪肉粉	ND
28	鸡肉粉	ND

表 17 配合饲料、浓缩饲料和精料补充料等实际样品测定结果

No.	样品名称	异硫氰酸酯（以丙烯基异硫氰酸酯计） / mg/kg
1	鱼膨化配合饲料	10±0.2
2	鲤鱼成鱼配合饲料	65±2.5
3	南美白对虾配合饲料	ND
4	乳猪配合饲料	ND
5	中猪配合饲料	ND
6	育肥猪配合饲料	ND
7	肉鸡配合饲料	39±1.9
8	产蛋鸡高峰期配合饲料	41±1.0
9	小鸭配合饲料	ND
10	肉大鸭配合饲料	ND
11	小龙虾专用配合饲料	26±1.2
12	仔猪浓缩饲料	56±2.2
13	鸡浓缩饲料	ND
14	牛精料补充料	ND
15	羊精料补充料	ND

注：“ND”为未检出

3.12 关于删除银量法的说明

GB/T13087 -1991第二法为银量法，该方法是把菜籽饼粕中的葡萄糖苷在芥子酶的作用下生成相应的异硫氰酸酯，用水蒸气蒸馏后再用硝酸银-氢氧化铵溶液吸收而生成相应的衍生硫脲，过量的硝酸银在酸性条件下以硫酸铁铵为指示剂用硫氰酸铵回滴，再计算出总异硫氰酸酯的含量。由于该方法要蒸馏、滴定，操作繁琐，影响因素多，检测结果重复性差，无法分别定性测定丙烯基异硫氰酸酯、丁烯基异

硫氰酸酯和戊烯基异硫氰酸酯的含量，目前饲料行业基本不采用该方法测定饲料中的异硫氰酸酯含量，本次标准修订删除该方法。

四、采用国际标准

未采用任何国际标准和国外先进标准。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾，是与 GB 13078-2017《饲料卫生标准》配套的检测方法国家标准。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准修订过程中，标准编制小组查阅了国内外相关文献资料，向国家和省部级饲料检测实验室、主要大中型饲料企业实验室、全国饲料工业标准化技术委员会委员等相关的科研院所、高校、检测机构、企业等单位有关专家充分征求意见，并按照征求的意见、预审和终审专家意见进行修改、完善，无重大分歧意见。

七、标准作为强制性或推荐性标准的意见

异硫氰酸酯是十字花科植物及其近缘植物白花菜科中硫代葡萄糖苷的酶解产物，可以降低养殖动物采食量，诱发碘缺乏及甲状腺、肝和肾肿大，高剂量甚至可以引起死亡。修订本标准，对于 GB 13078-2017《饲料卫生标准》实施、加强饲料安全监管、保障我国养殖畜禽和水产品的质量安全具有重要意义，建议本标准以推荐性标准颁布、实施。

八、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，建议全国饲料工业标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。

九、废止现行有关标准的建议

该标准发布、实施后，建议废除 GB/T13087 -1991 《饲料中异硫氰酸酯的测定方法》。

十、其他应予说明的事项

无。

参考文献

- [1] 李鲜, 陈坤松, 张明方, 等. 十字花科植物中硫代葡萄糖苷的研究进展[J]. 园艺学报, 2006, 33 (3) : 675-679.
- [2] 董晓芳, 佟建明. 饲料中硫代葡萄糖苷、异硫氰酸酯和噁唑烷硫酮生物作用及其检测方法[J]. 动物营养学报, 2013, 25 (3) : 469-478.
- [3] MARTLAND M F, BUTLER E J, FENWICK G R. Rapeseed induced liver hemorrhage reticulolysis and biochemical changes in laying hens: the effects of feeding high and low glucosinolate meals [J]. Research in Veterinary Science, 1984, 63: 298-309.
- [4] SPIEGEL C, BESTERTTI G E, ROSSI G L, et al. Normal circulating triiodothyronine concentration are maintained despite severe hypothyroidism in growing pigs fed rapeseed presscake meal [J]. The Journal of Nutrition, 1993, 123: 1554-1561.
- [5] TALJAARD T L. Cabbage poisoning in ruminants [J]. Journal of South African Veterinary Association, 1993, 64: 96-100.
- [6] AHLIN K A, EMANUELSON M, WIKTORSON H. Rapeseed products from double-low cultivars as feed for dairy cows: effects of long term feeding on thyroid function, fertility and animal health [J]. Acta Veterinaria Scandinavia, 1994, 35: 37-53.
- [7] SCHMID A, SCHMID H. Rapeseed poisoning of wild herbivores [J]. Tierarztl Prax, 1992, 20: 321-325.
- [8] RODRIGUEZ R A, MACIEL M G, DE OCHOTECO M B. Blindness

in Holando argentine calves due to ingestion of turnip (*Brassica campestris*) [J]. *Veterinario Argentina*, 1997, 14: 601-605.

[9] 气相色谱法测定菜粕异硫氰酸酯不确定度评定[J]. 张凤枰*, 杜雪莉, 赵艳, 李应东, 刘耀敏. *中国粮油学报*, 2014, 29(6): 112-117.