

液相色谱串联质谱法同时测定饲料中 6 种代表性霉菌毒素

苏秋权^{1,2}, 殷秋妙^{1,2,3*}, 王威利^{1,2,3}, 李亚菲^{1,2,3}, 徐爱平^{1,2,3}, 李初年⁴, 黄晓梅^{1,2,3},
丁晨红^{1,2}, 吴维辉^{1,2,3}, 邓腾浩博^{1,2,3}, 张展^{1,2}

(1. 广东省农业科学院农产品公共监测中心, 广州 510640; 2. 农业部农产品质量安全检测与评价重点实验室(广州),
广州 510640; 3. 广东省农产品质量安全风险评估重点实验室, 广州 510640;
4. 惠州九鼎饲料科技有限公司, 惠州 516100)

摘要: 目的 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)同时检测 4 种代表性饲料(猪、鸡配合饲料、玉米和麸皮)中黄曲霉毒素 B₁(alatoxin B₁, AFB₁)、呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)、T-2 毒素(T-2 toxin, T-2)、赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、伏马毒素 B₁(fumonisin B₁, FB₁)6 种霉菌毒素的方法。**方法** 样品经乙腈-水-甲酸(80:19:1, V:V:V)震荡和超声提取, 取上清液经七水硫酸镁和 C₁₈ 组成的混合型吸附剂-稀释净化, 采用 HR-ODS 色谱柱分离, 以 0.1%甲酸-水和 5mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱, 采用 ESI 正负模式转换多反应监测模式测量, 基质匹配标准曲线外标法进行定量。**结果** 在高、中、低 3 种添加浓度水平下, 6 种霉菌毒素的平均回收率为 83%~113%, 相对标准偏差为 3.1%~18%。**结论** 该方法灵敏度高、精密度好、经济、环保, 适用于饲料中 6 种代表性霉菌毒素的测定。

关键词: 饲料; 霉菌毒素; 液相色谱-串联质谱; 同时测定

Simultaneous determination of 6 representative mycotoxins in feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SU Qiu-Quan^{1,2}, YIN Qiu-Miao^{1,2,3*}, WANG Wei-Li^{1,2,3}, LI Ya-Fei^{1,2,3}, XU Ai-Ping^{1,2}, LI Chu-Nian⁴,
HUANG Xiao-Mei^{1,2,3}, DING Chen-Hong^{1,2}, WU Wei-Yun^{1,2}, DENG Teng-Hao-Bo^{1,2,3}, ZHANG Zhan^{1,2}

(1. Public Monitoring Center for Agro-product, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China; 2. Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment of Agro-product (Guangzhou), Ministry of Agriculture, Guangzhou 510640, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products, Guangzhou 510640, China; 4. Huizhou Jiuding Feed Technology Company, Huizhou 516100, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of alatoxin B₁ (AFB₁), deoxynivalenol (DON), T-2 toxin (T2), ochratoxin A (OTA), zearalenone (ZEN), fumonisin B₁ (FB₁) in 4 representative feeds (pig, chicken compound feed, corn and bran) by liquid chromatography-tandem mass

基金项目: 广东省农业标准化研究(粤农函[2016]533 号序号 5)、广州市科技计划项目(201909020001)

Fund: Supported by the Guangdong Provincial Agricultural Standardization Research Project (No. 5 of Guangdong agricultural letter No. [2016]533), and Science and Technology Planning Project of Guangzhou (201909020001)

***通讯作者:** 殷秋妙, 高级实验师, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术。E-mail: yinqiumiao@gdaas.cn

***Corresponding author:** YIN Qiu-Miao, Senior Experimentalist, Public Monitoring Center for Agro-product, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China. E-mail: yinqiumiao@gdaas.cn

spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted by acetonitrile-water-formic acid (80:19:1, V:V:V) and ultrasonic extraction. The supernatant was purified by a mixture of magnesium sulfate heptahydrate and C_{18} adsorbent-dilution, separated by HR-ODS column using 0.1% formic acid-water and 5 mmol/L ammonium acetate-0.1% formic acid methanol solution as mobile phase for gradient elution, and ESI positive and negative mode conversion multiple reaction monitoring ion mode and matrix matching standard curve external standard method were used for quantitative analysis. **Results** The average recovery rates of the 6 mycotoxins were 83%–113% at the 3 levels of high, medium and low additive concentrations, and the relative standard deviations were 3.1%–18%. **Conclusion** This method has high sensitivity, good precision, economy and environmental protection, and is suitable for the determination of 6 representative mycotoxins in feed.

KEY WORDS: feed; mycotoxins; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; simultaneous determination

1 引言

饲料中霉菌污染及其产生的霉菌毒素是畜禽养殖业中存在的主要危险因素之一。目前在饲料及其原料中,已发现的产毒霉菌种类多达 350 多种,从中已分离出 300 多种霉菌毒素^[1]。霉菌毒素按生活环境可分为田间毒素和仓储毒素 2 类。田间毒素由田间霉菌产生,主要包括玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、伏马毒素(fumonisin)、单端孢霉烯族毒素[如 T-2 毒素(T-2 toxin)和呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)]等;仓储毒素主要由仓储霉菌产生,包括黄曲霉毒素(如黄曲霉毒素 B₁, aflatoxin B₁, AFB₁)、赭曲霉毒素(如赭曲霉毒素 A, ochratoxin A, OTA)等。饲料中常见、且对动物健康危害严重的霉菌毒素主要有 6 种,即黄曲霉毒素 B₁、呕吐毒素、T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮和伏马毒素 B₁。霉菌毒素毒害不仅直接产生,还可通过食物链进行传播,危害食品安全。欧盟已对饲料中主要霉菌毒素的限量值^[2]做了规定并给予严格执行,我国对这 6 种霉菌毒素也已规定了限量值^[3],但生产实践中尚未得到广泛执行,这可能与目前的检测方法效率较低而且检测成本较高有关。

目前,国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)、美国官方农业化学协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)、欧盟标准化委员会(European Committee for Standardization, CEN)等相继对谷物及其制品以及部分动物饲料中常见的数种毒素如黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮等的单个毒素或同类毒素制定了同时测定的检测技术标准,我国也已经建立了饲料中霉菌毒素的数个检测标准^[4-7],除 NY/T 2071—2011《饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》^[7]外,其余标准均为单次单种毒素检测方法。我国尚未建立一次性同时测定饲料中这 6 种主要霉菌毒素的技术标准。

在目前的霉菌毒素检测技术研究^[8]中,液相色谱-串联质谱技术(liquid chromatography-tandem mass

spectrometry, LC-MS/MS)将色谱分离效率高与质谱灵敏度高、选择性好的优点结合起来,是多种霉菌毒素同时测定的主要技术和发展趋势。在包含这 6 种主要霉菌毒素的研究中, Rudolf 等^[9]报道了饲料原料(玉米和小麦)中 39 种霉菌毒素的液相色谱串联质谱法测定,外标法定量,除了 FB₁ 回收率 43%外,其他 5 种毒素回收率在 80%~120%; Sofie 等^[10]使用基质匹配外标和部分目标物同系物内标校正的方法,测定猪饲料和玉米中 23 种霉菌毒素,这 6 种毒素的回收率为 97%~105%,净化方法较为复杂; Zhang 等^[11]用 ¹³C 同位素内标进行全过程校正测定动物饲料中 6 种霉菌毒素,回收率均处于 70%~110%,同位素内标法太过于昂贵,不符合标准制定的普适和经济原则; Zhao 等^[12]用空白基质匹配法测定猪饲料中 30 种霉菌毒素,这 6 种毒素的回收率达 70%~112%; Piotr 等^[1]报道同位素内标法测定饲料中 14 种霉菌毒素的官方认可方法。这些研究中利用液相色谱-串联质谱技术开展了饲料中这 6 种毒素的同时测定,但仍存在着所用的饲料种类较少、技术过程繁琐和昂贵等问题。且霉菌毒素在饲料中呈现出多种类混合污染的特点^[8]。

鉴于此,本研究以易被霉菌毒素污染的 4 种代表性饲料(猪、鸡配合饲料、玉米和麸皮)为材料,通过对提取、净化和 LC-MS/MS 测定条件的技术论证和整体方法性能测试,建立了一个灵敏度高、经济、环保、快捷、准确度符合要求的液相色谱串联质谱法同时测定饲料中 6 种主要霉菌毒素,为制定同时测定饲料中 6 种限量霉菌毒素方法标准奠定坚实基础。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

8040 高效液相色谱--三重四极杆质谱仪、8050 高效液相色谱--三重四极杆质谱仪(日本岛津公司); 5804R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); TGL-20M 台式高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); HY-2 调速多用振荡器(上海比朗仪器有限公司); KQ-250DE 数控超声波清

洗器(昆山舒美超声仪器有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司)。

乙腈、甲醇、乙酸铵和甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); AFB₁ 和 OTA 标准品(纯度≥98%, 上海安谱公司); DON、FB₁、T-2 和 ZEN 标准品(纯度≥98%, 北京百灵威科技公司)。由标准品配制的标准母溶液溶剂为乙腈(伏马毒素 B₁ 的溶剂为 50%乙腈水, 装至半瓶, 防止结冰后溢出), 混合标准储备液由母液配制, 同母液于-20 °C保存。混合标准溶液的配制设计依据饲料霉菌毒素限量值比例, 配制成混合储备液。混合标准储备液浓度依次为: DON、FB₁ 和 T-2 均为 10 µg/mL, ZEN 为 5µg/mL, OTA 为 0.1 µg/mL, AFB₁ 为 0.03 µg/mL。

各生长阶段猪配合饲料共 17 份、各生长阶段鸡配合饲料 16 份、玉米 3 份和麸皮 4 份样品由广东省农业科学院农产品公共监测中心提供。

2.2 样品处理

饲料样品经过粉碎后过 1 mm 孔径筛制成分析样, 于-18 °C保存。

称取分析样品 5.00 g 于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 混合提取液(乙腈:水:甲酸=80:19:1, V:V:V), 涡旋混匀 20 s, 振荡 10 min 后, 置于超声波清洗器中超声提取 30min; 取出, 于 8000 r/min 离心 5 min, 吸取 2 mL 上清液于 15 mL 离心管中, 加入(200±20) mg 七水硫酸镁和(100±20) mg C₁₈, 涡旋混匀 15 s, 静置 5 min 后吸取上清液 0.5 mL 于 2.5 mL 离心管中, 加水 0.5 mL, 涡旋 10 s, 于 15000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 µm 尼龙滤膜, 装瓶上机测定。

选取不含霉菌毒素的饲料用作基质匹配曲线。按照上

述方法提取和净化 5 mL 样液备用; 分取 10~200 µL 混合标准储备液于 2.5 mL 离心管中, 氮吹干后各加 0.5 mL 净化样液, 用水补足至 1.00 mL, 涡旋 10 s, 于 15000 r/min 离心 5 min, 过 0.22 µm 尼龙滤膜, 作为基质匹配标准工作系列, 装瓶待测。

2.3 仪器分析

色谱柱为 Shim-pack HR-ODS 柱(2.0 mm×150 mm, 3.0 µm); 流动相由 A 和 B 组成, A 为 0.1%甲酸水, B 为 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸甲醇; 流动相程序为 0-1 min, B 5%; 3 min, B 50%; 8 min, B 75%; 12 min, B 85%; 13 min, B 90%; 14 min, B 100%; 15 min, B 5%; 19 min, B 5%。

采用多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式检测, ESI 离子源, 离子源温度 400 °C, 脱溶剂温度 250 °C; 脱溶剂气和锥孔气均为 N₂, 脱溶剂气流速 15 L/min; 锥孔气流速 3 L/min。监测离子、碰撞能量、锥孔电压等参数见表 1。

3 结果与分析

3.1 前处理方法的选择

3.1.1 提取剂优化

6 种霉菌毒素化合物的 Log P 最低为-0.7(DON), 最大是 4.7(OTA), 这样大跨度的溶解性特点给样品的提取和净化带来了很大的挑战。本实验对文献中的 3 种提取剂 E1、E2、E3 分别为 50%乙腈水^[11], 74%的乙腈水甲酸(含 1%甲酸)^[13]和 80%乙腈水(含 1%甲酸)^[12]的提取效果做了比较, 并尝试用重量法比较提取剂提取样品后溶液密度的变化(表 2)。可以看出, E1 提取的物质总量相对最高; 随着提取

表 1 MRM 监测模式下 6 种霉菌毒素的质谱优化条件
Table 1 Optimal conditions for mass spectrometry of 6 mycotoxins under MRM monitoring mode

序号	分析物	疏水作用系数	保留时间	母离子	子离子	一级四极杆电压	碰撞能量	三级四极杆电压
			/min	(m/z)	(m/z)	/eV	/eV	/eV
1	DON	-0.7	6.387	297.00[M+H] ⁺	249.20*/203.10/231.10	-11/-11/-20	-11/-14/-12	-17/-21/-16
2	FB1	-0.5	9.042	722.30[M+H] ⁺	334.20/352.20	-20/-20	-39/-39	-16/-17
3	AFB1	1.6	9.359	312.90[M+H] ⁺	285.05/241.00	-20/-10	-24/-40	-30/-24
4	T-2	0.9	11.543	484.20[M+NH4] ⁺	215.10/185.10	-17/-10	-16/-21	-22/-19
5	ZEN	3.6	12.999	317.00[M-H] ⁻	175.20/131.10	14/21	24/29	16/25
6	OTA	4.7	13.181	403.90[M+H] ⁺	239.00/357.95	-14/-14	-24/-13	-25/-18

注: *黑体为定量离子。

剂中水比例的减少和乙腈比例的增大, 配合饲料中提取的物质总量呈现出明显的下降趋势, 只是 E2 和 E3 提取猪配合饲料中提取的物质总量基本无差别; 玉米中提取的物质总量也呈现出明显的下降趋势, 只是 E2 和 E3 提取出的物质总量差别稍明显, 后者稍高一些; 麸皮试验的结果较为特别, 当用 E2 和 E3 提取时, 其提取物重量为负数, 但这并不说明没有提取到物质, 因为进一步的二氯甲烷分层试验分析了提取后样液的溶剂组成, 发现样液的溶剂组成和初始提取剂的组成相比已发生了明显的变化, 水的占比很低, 密度变小, 致使结果为负数。这说明提取剂提取出的物质与饲料的组成密切相关: 配合饲料中水溶性物质相对较多, 鸡配合饲料中的各种水溶性添加剂更多, 玉米的组成主要是玉米淀粉和油脂, 这 3 类饲料对提取剂的组成改变甚小; 麸皮主成分为纤维素, 对水的吸附偏多。因此, 单纯从减少杂质总量而言, E2 对玉米和猪配合饲料来说较好, E3 对鸡配合饲料来说较好。综合考虑后续上机溶液中乙腈最佳含量为 40% 的试验结果和净化-稀释试验流程的操作方便性, 选择 E3 乙腈+水+甲酸(80:19:1, V:V:V)作为提取剂。

表 2 提取剂组成对饲料提取液密度的影响(g/mL)
Table 2 Effect of 3 kinds of extraction solutions on the extract density from feed(g/mL)

饲料/提取剂	E1	E2	E3
猪配合饲料	0.03706	0.01318	0.01329
鸡配合饲料	0.04333	0.02125	0.01759
玉米	0.03206	0.01590	0.01866
麸皮	0.01794	-0.00075	-0.00344

3.1.2 净化方法

本研究以稀释法为基础进行净化。稀释法控制的参数为前处理稀释因子 f , 本项目前期研究认为, 在前处理稀释因子 f 为 10 时, 在合适介质中, 样液可以直接进行仪器测定^[8]。为了减少基质干扰和保护仪器, 在稀释前对样液采用非特异性吸附净化。

吸附剂选用以不改变样品提取液体积、且具有吸附强极性和非极性杂质功能的混合型吸附剂。混合型吸附剂由 190~220 mg 七水硫酸镁和 80~120 mg C₁₈ 组成, 依据饲料样品基质特点可以适当在合适范围内进行微调。

用该混合型吸附剂(200 mg 七水硫酸镁和 100 mg C₁₈)对饲料霉菌毒素提取液中杂质进行了吸附前后样液密度比较(各取 1 mL 称重), 结果见表 3, 混合型吸附剂的确吸附了一些物质, 减少了样液中提取物质的质量, 同时发现, 吸

附后的样液经水再稀释后, 样液的混浊极大地降低, 净化效果明显。

表 3 混合型吸附剂对饲料霉菌毒素提取液中杂质的综合吸附效果
Table 3 Effect of absorbent cleanup on the weight of coexists in the extract from feed

饲料	提取液密度/(mg/mL)	
	净化前	净化后
猪配合饲料	844.36	808.21
	834.66	810.04
	834.81	814.02
鸡配合饲料	826.9	812.12
	831.69	800.22
	832.67	783.39
玉米	845.99	805.31
	829.4	808.67
	831.3	801.32
麸皮	817.88	818.45
	800.14	801.99
	810.59	811.44

3.2 仪器条件优化

3.2.1 溶剂标测试下的质谱条件优化

用溶剂标在 60% 甲醇-0.1% 甲酸水流动相下直接进样, 确定正离子模式下 4 种霉菌毒素 ABF₁、FB₁、OTA 和 T-2 毒素的母离子和正负模式下 2 种毒素 DON 和 ZEN 的母离子, 而后开展了多反应监测条件的优化, 结果是: 负模式下 DON 的质谱参数是母离子为 [M+HCOO]⁻ 型, 质荷比为 341.1, 子离子质荷比分别为 265.25 和 295.2, 一、二和三级电压依次为 17、11 和 18; 正模式下 ZEN 的质谱参数是母离子为 [M+H]⁺ 型, 质荷比为 319, 子离子质荷比分别为 301.15/5 和 283.0, 一、二和三级电压依次为 -11/-11、-7/-11 和 -15/-20; 其他详见表 1。用该多反应监测条件比较了上机溶液中乙腈含量 25%~50% 对 6 种毒素响应值的影响, 发现乙腈从 25% 上升至 40% 时, 响应值是增加的, 而当乙腈含量为 50% 时, DON 峰容易分岔, 因而选择了 40% 乙腈作为上机介质。混合标准溶液的定量离子色谱图 1。

3.2.2 基质标样测试下的质谱条件的再优化和流动相的选择

ZEN 和 DON 的 ESI 模式确定应考虑基质的影响。在确定之前, 本研究在上述优化的质谱条件下, 通过测试基质标下 ZEN 和 DON 的信噪比、溶剂标和基质标下离子丰度比优化了流动相程序, 并对两种流动相组成 [0.1% 甲酸水(A)和 5 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸甲醇(B)流动相体系

(AB)与 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸水(A2)和 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸甲醇(B)流动相组合(A2B)]进行了正模式下基质标 Q3 全扫描比较(数据表略),发现两种流动相组成对加氢母离子响应值的影响方向并非呈单一趋势,猪鸡配合饲料中 DON 和 AFB₁ 在 A2B 流动相条件下的离子化效率和测量母离子响应值较高,FB₁ 和 OTA 则是在 AB 流动相条件下的离子化效率及测量母离子响应值较高;还发现,流动相水中乙酸铵的有无对离子化率和母离子类型均有明显影响,在水相无乙酸铵(AB)条件下,5 种毒素测量母离子较加钠母离子响应值高,而有乙酸铵(A2B)时,部分饲料中 T-2 加钠母离子响应值略高于加铵的测量母离子。由此可见,两种流动相组成各有优势。本研究选择 0.1%甲酸水(A)和 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸甲醇(B)流动相体系(AB)为流动相,流动相程序为 0~1 min, B 5%; 3 min, B 50%; 8 min, B 75%; 12 min, B 85%; 13 min, B 90%; 14 min, B 100%; 15 min, B 5%; 19 min, B 5%。本研究选用的流动相组成与程传民等^[14]和符金华的研究结论^[15]相一致,同时又克服了以往研究中单纯依靠溶剂标来优化仪器条件的弊端。

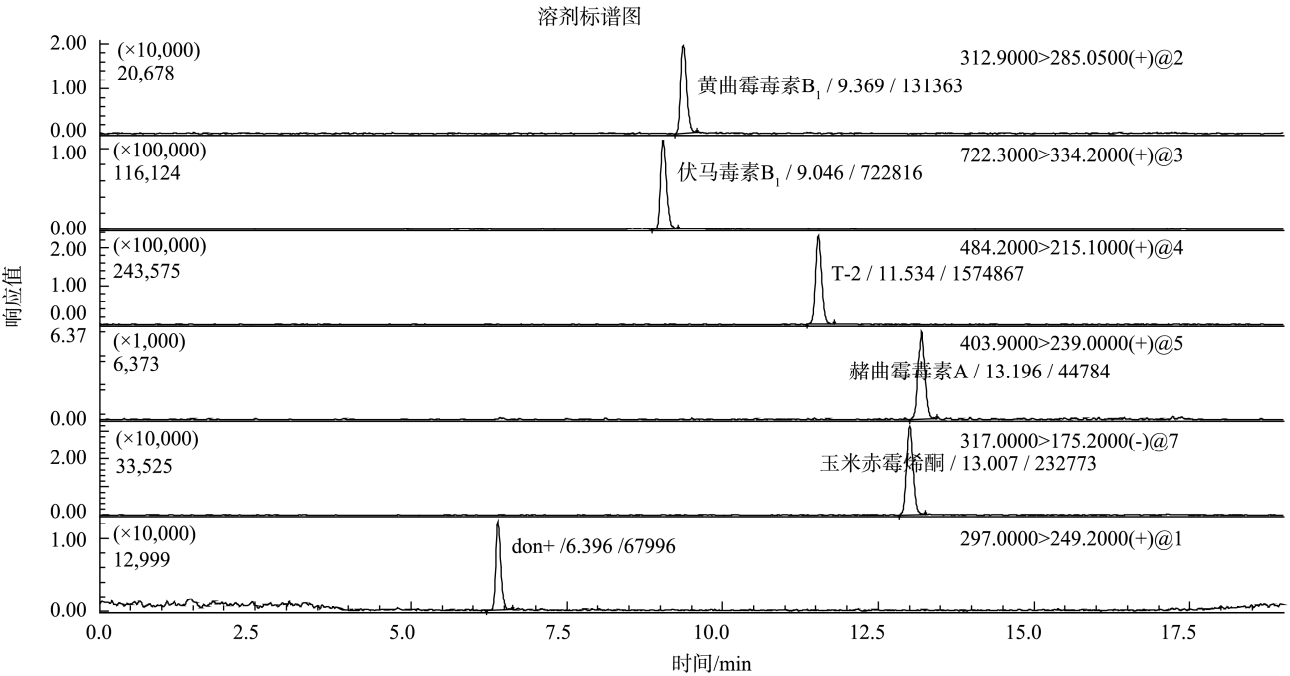
在此条件下,对 ZEN 和 DON 进行 ESI±模式比较,发现 ZEN 在正模式下的绝对响应值较高,但是正模式下周围干扰杂峰较多,因而测定 ZEN 时选择负模式;DON 响应值受基质影响较大,溶剂标时正模式的响应是负模式响应的 14%,基质标时正模式响应值是负模式的 214%,且基线较为平稳,因而测定 DON 时选择正模式。

在上述的优化条件下,对 4 种饲料进行了加标试验和

测定,选择产物离子中信噪比高的离子为定量离子(见表 1),图 2 为猪配合饲料中 6 种霉菌毒素定量离子色谱图,其他 3 种饲料色谱图未列。需要讨论的是 T-2 毒素的测量母离子。在 AB 流动相下,除鸡配合饲料外,其他 3 种饲料都表现为 [T-2+NH₄]⁺ 的响应值高于 [T-2+Na]⁺,而且 [T-2+NH₄]⁺ 的绝对响应值 AB 流动相的高于 A2B 流动相,因而测量 T-2 毒素时,选择 AB 作为流动相、[T-2+NH₄]⁺ 作为测量母离子。这和大多数文献^[8]报道的一致,与国标 NY/T 2071—2011^[7]中 T-2 的测量母离子为加钠准分子离子有所不同。

3.2.3 基质效应和定量方法

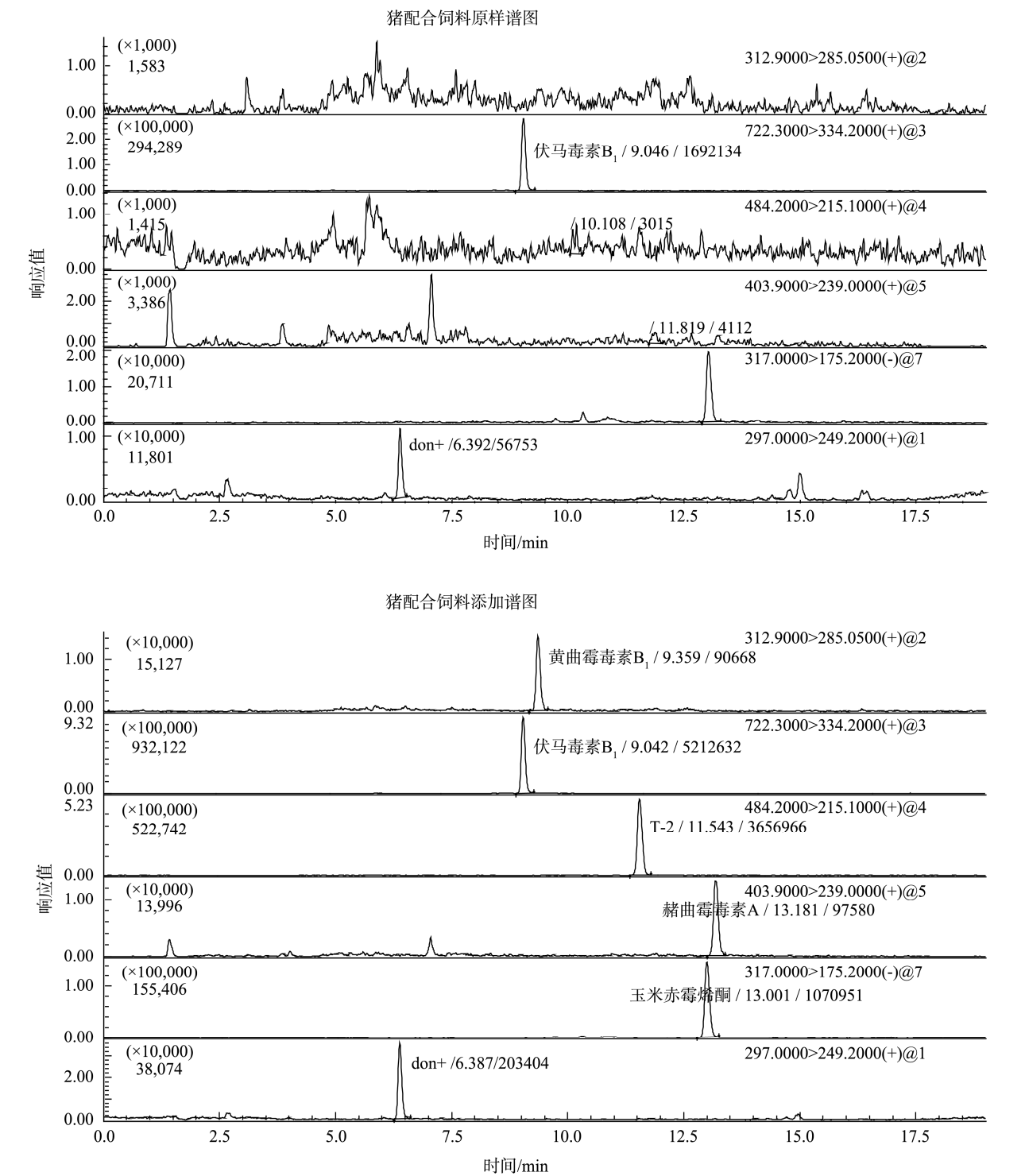
在上述确定好的色谱质谱条件下,进行了 2 种不同型号 LC-MS/MS 仪器即岛津 8040 型和 8050 型对基质效应影响的研究。从 2 种型号仪器测定饲料中 6 种霉菌毒素的基质效应的结果(表 4)可以发现,随着仪器灵敏度的提高,对于 DON 的基质抑制效应呈稍微增强,对于 FB₁ 的基质效应方向由增强转向为抑制,对于 AFB₁ 的基质抑制效应极度增强,对于 T-2 和 OTA 的基质效应方向由增强转向为抑制,基质抑制效应明显;对于 ZEN 的基质增强效应降低。同一台仪器上,6 种毒素基质效应各不相同,最强的为 AFB₁;饲料间基质效应的变异系数最小的为 FB₁(<8%);FB₁、T-2 和 ZEN 3 种毒素的部分饲料基质效应值在 0.8~1.2 之间,可视为无基质效应,而其他 3 种毒素基质效应强烈。综上所述,仪器和饲料种类对于 6 种毒素存在不同程度的基质效应,因此定量方法确定为基质匹配工作曲线法。



注:混合标准溶液各化合物浓度 DON, 40 ng/mL; FB₁, 40 ng/mL; AFB₁, 0.36 ng/mL; T-2, 40 ng/mL; ZEN, 20 ng/mL; OTA, 0.68 ng/mL。

图 1 混合标准溶液的定量离子色谱图

Fig.1 Quantitative ion chromatogram of mixed standard solution



注: 添加浓度: DON, 1000 ng/mL; FB₁, 1080 ng/mL; AFB₁, 9 ng/mL; T-2, 1000 ng/mL; ZEN, 500 ng/mL; OTA, 18 ng/mL。

图 2 猪配合饲料原样及添加 6 种霉菌毒素的定量离子色谱图

Fig.2 Chromatograms of quantification transitions of 6 mycotoxins in pig formula feed

3.3 方法的性能

分别称取猪配合饲料、鸡配合饲料、玉米和麸皮 4 种代表性饲料 4 组, 每组 5 次重复; 第 1 组为原样组, 其余 3 组分别为 3 个浓度梯度添加组。DON、FB₁ 和 T-2 的添加

浓度为 800、1600、2000 μg/kg; AFB₁ 的添加浓度为 7.2、14.4 和 18 μg/kg; OTA 的添加浓度为 13.6、27.2 和 34 μg/kg; ZEN 的添加浓度为 400、800 和 1000 μg/kg。按照 2.2 和 2.3 节所述确定方法, 用 8050 型进行方法准确度、精密度、

线性范围和定量限的性能试验。建立基质匹配工作曲线回归方程时,由于无霉菌毒素的空白样品比较难得,因而运用标准添加法,即需将样品添加的峰面积减去原样峰面积之后再做回归计算求出浓度与相应值方程,计算测定浓度及回收率,根据 10 倍信噪比(S/N)确定化合物的方法定量

限(limit of quantitation, LOQ), 结果见表 5。在高、中、低 3 种添加浓度水平下,6 种霉菌毒素的平均回收率为 83%~113%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 3.1%~18%。方法定量限均低于或远低于限量值,能满足检测评价需要。

表 4 2 种 LC-MS/MS 仪器型号测定饲料中 6 种霉菌毒素的基质效应比较
Table 4 Comparison of matrix effects of 6 mycotoxins in feed determined by 2 models of mass spectrometers

饲料	仪器型号	DON	FB ₁	AFB ₁	T-2	OTA	ZEN
猪配合饲料	8040	0.593	1.1656	0.5741	1.0934	1.4356	1.1489
	8050	0.4807	0.8729	0.1255	0.4843	0.4915	1.1243
鸡配合饲料	8040	0.6527	1.2787	0.5672	1.2341	1.4988	1.6759
	8050	0.4941	0.7882	0.1085	0.5696	0.2653	1.3516
玉米	8040	0.8333	1.3425	0.6943	1.3639	1.7066	1.9699
	8050	0.5281	0.8274	0.162	0.9133	0.2992	1.3913
麸皮	8040	0.5408	1.1453	0.3965	0.9648	1.8242	0.9517
	8050	0.4177	0.7312	0.0827	0.3967	0.5315	0.7816
相对标准偏差/%	8040	19.45	7.60	21.95	14.84	11.17	32.64
相对标准偏差/%	8050	9.62	7.47	27.79	38.27	33.78	24.06

表 5 饲料中 6 种霉菌毒素的定量限、线性范围、回收率及相对标准偏差
Table 5 Quantification limits, linear ranges, recovery rates and relative standard deviations of 6 mycotoxins in feed

分析物	饲料	基质标准范围 (μg/L)	线性方程	相关系数 r^2	回收率 /%	定量限 (μg/kg)	精密度 RSD/%
DON	猪配合饲料	100~1000	Y=1096.9X+7798.1	0.9998	94~104	180	7.98
	鸡配合饲料		Y=1207.2X-10949	0.9999	89~106	190	13.4
	玉米		Y=1541.3+5177	0.9998	99~109	180	10.1
	麸皮		Y=1000.2X-7956.1	0.9997	92~103	300	4.78
FB ₁	猪配合饲料	100~1000	Y=1461.3X-26739	0.9999	70~96	63	10.3
	鸡配合饲料		Y=1603.1X-38255	0.9997	67~110	71	18
	玉米		Y=1683.1X-29367	0.9995	105~120	63	5.2
	麸皮		Y=1435X-7982.4	1.000	99~108	87	3.1
AFB ₁	猪配合饲料	0.9~9	Y=34398X-996.09	0.9999	94~107	2	6.9
	鸡配合饲料		Y=33980X+3834.8	0.9996	77~102	1.8	7.7
	玉米		Y=41598X+2104.9	0.9992	96~108	1.2	4.8
	麸皮		Y=23753X+1021.1	0.9998	101~117	5	6.3
T-2	猪配合饲料	100~1000	Y=12450X+192617	0.9985	88~104	16	6.8
	鸡配合饲料		Y=14051X+220795	0.9994	92~112	14	12
	玉米		Y=15529X+571050	0.9988	78~101	15	5
	麸皮		Y=10985X+25615	0.9994	111~123	26	4
OTA	猪配合饲料	1.7~17	Y=19765X-7687.1	0.9997	99~112	6	5.3
	鸡配合饲料		Y=20635X-3269.2	0.999	96~112	3.4	5.9
	玉米		Y=23496X-5314.6	0.9999	98~115	2.4	4
	麸皮		Y=25116X-4370.5	0.9999	110~124	8	5.5
ZEN	猪配合饲料 feed	50~100	Y=2384.2X-9136	1.000	97~114	24	6
	鸡配合饲料		Y=3477.8X-12435	1.000	102~124	18	10
	麸皮		Y=4087.9X+46597	0.9987	72~98	14	4.9
			Y=1975X-9351	0.9999	100~109	25	4.8

3.4 实际样品分析

应用本方法对猪、鸡配合饲料和玉米、麸皮类饲料原料共 40 个样品分类进行基质匹配工作曲线定量测定了 6 种霉菌毒素含量, 并与饲料卫生标准^[3]进行了比较, 结果是: DON 检出率为 75%, 含量范围配合饲料 180~554 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 玉米 532~2681 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 麸皮 300~1116 $\mu\text{g}/\text{kg}$; FB₁ 检出率为 92.5%, 含量 106~3011 $\mu\text{g}/\text{kg}$; AFB₁ 检出率为 25%, 含量 2~28 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T-2 检出率为 5%, 含量为 90~172 $\mu\text{g}/\text{kg}$; OTA 检出率为 17.5%, 含量在定量限左右。6 种毒素均无超标样品。这些结果也反映出霉菌毒素在饲料中呈现出多种类混合污染的特点。

4 结 论

本研究建立了同时测定猪、鸡配合饲料、玉米和麸皮饲料中国家限量的 AFB₁、DON、T-2、OTA、ZEN、FB₁ 等 6 种霉菌毒素的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法。样品经乙腈-水-甲酸(80:1:1, V:V:V)震荡和超声提取, 取上清液经由七水硫酸镁和 C₁₈ 组成的混合型吸附剂-稀释净化, 上机测定。采用反相 C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1%甲酸-水和 5 mmol/L 乙酸铵-0.1%甲酸甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱, 采用 ESI 正负模式转换多反应监测模式和基质匹配标准曲线外标法进行定量分析。在高、中、低 3 种添加浓度水平下, 6 种霉菌毒素的平均回收率为 83%~113%, 相对标准偏差介于 3.1%~18%之间。方法性能指标满足饲料中兽药及其他化学物检测检验规程^[16]技术要求和饲料卫生标准^[3]评价指标要求。

参考文献

- [1] Piotr J, Katarzyna P, Olga B, *et al.* Development of a UPLC-MS/MS method for determination of mycotoxins in animal feed [J]. *Euroreference*, 2016, 6: 63-69.
- [2] Official Journal of the European Union. Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC) [S].
- [3] GB 13078-2017 饲料卫生标准[S].
GB 13078-2017 Hygienical standard for feeds [S].
- [4] GB/T 30956—2014 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法[S].
GB/T 30956—2014 Determination of deoxynivalenol in feeds-Purification by immunoaffinity column-High performance liquid chromatography [S].
- [5] GB/T 30957-2014 饲料中赭曲霉毒素 A 的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法[S].
GB/T 30957-2014 Determination of ochratoxin in feeds-Purification by immunoaffinity column-High performance liquid chromatography [S].
- [6] NY/T 1970-2010 饲料中伏马毒素的测定[S].
NY/T 1970-2010 Determination of fumonisins in feeds [S].
- [7] NY/T 2071-2011 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法[S].
NY/T 2071-2011 Determination of aflatoxins, zearalenone and T-2 in feeds-Liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [8] 殷秋妙, 吴维辉, 李亚菲, 等. 饲料中主要霉菌毒素液相色谱串联质谱同时测定技术研究进展[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(14): 140-148.
Yin QM, Wu WY, Zhang Z, *et al.* Advances in simultaneous determination of key mycotoxins in feed by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2018, 34(14): 140-148.
- [9] Rudolf K, Michael S, Franz B, *et al.* Mycotoxin testing: From multi-toxin analysis to metabolomics [J]. *Rapid Commun Mass Spectr*, 2006, 20: 2649-2659.
- [10] Sofie M, Christof VP, Christ, *et al.* Occurrence of mycotoxins in feed as analyzed by a multi-mycotoxin LC-MS/MS method [J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58: 66-71.
- [11] Zhang K, Wong JW, Krynitsky AJ, *et al.* Determining mycotoxins in baby foods and animal feeds using stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62: 8935-8943.
- [12] Zhao ZY, Liu N, Yang LC, *et al.* Multi-mycotoxin analysis of animal feed and animal-derived food using LC-MS/MS system with timed and highly selective reaction monitoring [J]. *J Anal Bioanal Chem*, 2015, 407: 7359-7368.
- [13] Annica TÅ, Alexey S, Ulf B. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the quantification of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxin, ochratoxin A and fumonisins B1 and B2 in vegetable animal feed [J]. *J Food Addit Contam: Part A*, 2013, 30(3): 541-549.
- [14] 程传民, 柏凡, 李云魏, 等. 液质联用法测定饲料中 5 种霉菌毒素[J]. *饲料工业*, 2014, 35(20): 48-57.
Cheng CM, Bai F, Li YW, *et al.* Determination of 5 mycotoxins in feed by liquid mass spectrometry [J]. *Feed Ind*, 2014, 35(20): 48-57.
- [15] 符金华, 杨琳芬, 董泽民, 等. 同位素稀释技术结合超高效液相色谱-四极杆/线性离子阱质谱快速精准测定饲料及原料中 16 种霉菌毒素[J]. *中国饲料*, 2017, 21: 25-30.
Fu JH, Yang LF, Dong ZM, *et al.* Rapid and accurate determination of 16 mycotoxins in feed and raw materials by isotope dilution technique combined with ULTRA high performance liquid chromatography (HPLC) and quadrupole/linear ion trap mass spectrometry [J]. *China Feed*, 2017, 21: 25-30.
- [16] GB/T 23182-2008 饲料中兽药及其他化学物检测检验规程[S].
GB/T 23182-2008 Procedure for veterinary drug and other chemicals determination in feeds [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



苏秋权, 助理研究员, 主要研究方向为饲料及动物源产品安全质量检测技术。
E-mail: 792186937@qq.com



殷秋妙, 高级实验师, 主要研究方向为农产品质量安全检测技术。
E-mail: yinqiumiao@gdaas.cn