

液相色谱-串联质谱法测定饲料原料中 26 种霉菌毒素

王瑞国 苏晓鸥* 程芳芳 王培龙 樊霞 张维

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘 要 建立了同时检测玉米、豆粕等饲料原料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇等 26 种霉菌毒素的液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)方法。玉米和豆粕样品经乙腈-水-甲酸(84: 15.9: 0.1, V/V)超声提取 1 h, 取 1 mL 上清液经 Mycospin 400 多功能净化柱净化, 浓缩干燥, 0.25 mL 水-甲醇-甲酸(95: 4.9: 0.1, V/V)复溶, 上机测定。采用反相 C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.1% 甲酸-水和 0.1% 甲酸-甲醇溶液作为流动相进行梯度洗脱, 采用多反应监测离子模式进行定性分析。基质效应考察发现, 样品提取液经 Mycospin 400 多功能净化柱净化后, 大部分毒素仍有较强的基质效应。因此, 采用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, 26 种霉菌毒素的平均回收率为 61.9% ~ 119.5%, 相对标准偏差介于 0.8% ~ 18.6% 之间。针对不同目标物, 本方法的定量限为 0.5 ~ 25 μg/kg。

关键词 液相色谱-串联质谱; 饲料原料; 多功能净化柱; 霉菌毒素

1 引 言

霉菌毒素(Mycotoxins)是由某些霉菌在生长过程中产生的有毒次级代谢产物^[1], 饲料原料特别易于被各种霉菌毒素污染^[2], 从而对动物生产带来各种危害。目前, 已经确认化学结构的霉菌毒素达 400 多种^[3]。其中, 对动物生产影响较大的主要有黄曲霉毒素、呕吐毒素、T-2 毒素和玉米赤霉烯酮等数十种, 导致动物生产性能下降、繁殖力降低、疾病易感性增强和呕吐、腹泻、器官坏死等急性和慢性中毒症状^[4]。世界卫生组织将霉菌毒素纳入食品安全体系重点监测内容^[5], 我国对食品和饲料中黄曲霉毒素 B₁ 等重要毒素规定了最高限量标准^[6~10]。传统的霉菌毒素检测方法主要有薄层色谱法(TLC)、酶联免疫法(ELISA)和高效液相色谱法(HPLC)等。这些方法一般只能针对一种或一类结构类似的毒素进行快速筛选、定性或定量检测^[3]。事实上, 饲料原料中霉菌毒素污染通常是多种霉菌毒素的联合污染^[11]。因此, 开发多种霉菌毒素同步检测方法具有十分重要的现实意义。由于液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法集高效分离和多组分定性与定量检测于一体, 成为近年来霉菌毒素多残留检测技术的主流方向^[12]。如赵孔祥等^[13]建立了在线免疫亲和净化 LC-MS/MS 检测中草药中 10 种霉菌毒素的方法, 应永飞等^[14]建立了多功能净化柱 LC-MS/MS 检测饲料中 14 种霉菌毒素的方法。郑翠梅等^[15]采用 LC-TOF-MS 同时测定粮食中 13 种真菌毒素。但是, 上述方法需要专用的前处理设备 and 成本较高的免疫亲和柱, 或者需要样品脱脂, 正离子和负离子分别检测等较为繁琐的步骤, 而且同时检测霉菌毒素的数量仍然比较有限。本研究采用一种商品化的霉菌毒素多功能净化柱对样品进行一次净化和浓缩, 不需要脱脂程序, 并且通过优化色谱和质谱条件, 实现了正、负离子同时测定, 做到一次前处理和一次进样同时检测饲料原料中 26 种霉菌毒素, 具有操作简单、快速、成本低、定量准确的特点。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-电喷雾电离源-串联质谱仪(美国 Waters 公司); RVC 2-18 台式离心浓缩仪(德国 CHRIST 公司); 3K15 高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司); D37520 高速离心机(美国 Kendro 公司); Mycospin 400 多功能净化柱(ROMER 公司); 霉菌毒素空白玉米和豆粕样品由国家饲料质量监督检验中

2014-08-31 收稿; 2014-11-21 接受

本文系“十二五”农村领域国家科技计划(No. 2011BAD26B0405)资助

* E-mail: suxiaou@caas.cn

心(北京)惠赠。

标准品及由标准品配制的混合标准溶液储备液(溶剂为乙腈)浓度信息见表1。乙腈、甲醇、乙酸铵和甲酸(色谱纯,美国Fisher公司);实验用水为Milli-Q超纯水。混合标准溶液储备液于-20℃保存,使用时分别吸取适量标准储备液,经离心浓缩仪旋干后,用水-甲醇-甲酸(95:4.9:0.1, V/V)溶液溶解,配制成不同浓度的标准系列工作液。

2.2 样品前处理

称取5.00 g ± 0.01 g 试样于50 mL 塑料离心管中,加入20 mL 乙腈-水-甲酸(84:15.9:0.1, V/V)进行提取,涡旋混匀1 min,超声提取1 h,期间每20 min 振荡1次。提取完成后,以10000 r/min 离心10 min,取1 mL 上清液于Mycospin 400 多功能净化柱中,涡旋2 min 使溶液与净化材料充分混合,打开净化柱底部出液口,置于配套收集管中,5000 r/min 离心1 min,收集滤液。将滤液置于离心浓缩仪中,60℃,1500 r/min 真空旋干。用0.25 mL 水-甲醇-甲酸(95:4.9:0.1, V/V)溶解残渣,涡旋1 min,超声5 min,13000 r/min 离心10 min,移取上清液于进样瓶中待测。

2.3 色谱和质谱条件

Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司);柱温40℃,流速0.42 mL/min,进样量10 μL。流动相A为0.1% 甲酸-水,流动相B为0.1% 甲酸-甲醇。梯度洗脱:0~2.0 min,95% A;2.0~4.0 min,95%~90% A;4.0~12.0 min,90%~25% A;12.0~12.1 min,25%~1% A;12.1~14.0 min,1% A;14.0~14.1 min,1%~95% A;14.1~16 min,95% A。

表1 霉菌毒素标准品列表

Table 1 Standard compounds of 26 mycotoxins

序号 Serial	分析物 Analyte	分子式 Formula	CAS number	纯度 Purity (%)	混合储备液浓度 Concentration in stock solution (mg/L)
1	脱氧雪镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol (DON)	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	51481-10-8	99	5
2	雪腐镰刀菌烯醇 Nivalenol (NIV)	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	23282-20-4	99	5
3	黄曲霉毒素 B1 Aflatoxin B1 (AFB ₁)	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	1162-65-8	99	1
4	黄曲霉毒素 B2 Aflatoxin B2 (AFB ₂)	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	7220-81-7	99	1
5	杂色曲霉毒素 Sterigmatocysin (STE)	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	10048-13-2	99	1
6	黄曲霉毒素 G1 Aflatoxin G1 (AFG ₁)	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	1165-39-5	99	1
7	黄曲霉毒素 G2 Aflatoxin G2 (AFG ₂)	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	7241-98-7	99	1
8	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON)	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	88337-96-6	99	5
9	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON)	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	50722-38-8	99	5
10	甲麦角新碱 Methylergonovine (MET)	C ₂₀ H ₂₅ N ₃ O ₂	113-42-8	99	1
11	T2 三醇 T2 Triol (T2 Triol)	C ₁₉ H ₃₀ O ₇	97373-21-2	99	1
12	蛇形毒素 Diacetoxyscirpenol (DIA)	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	2270-40-8	99	1
13	萎地青霉素 Roquefortine C (RC)	C ₂₂ H ₂₃ N ₅ O ₂	58735-64-1	99	1
14	新茄病镰刀菌烯醇 Neosolaniol (NEO)	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	36519-25-2	99	5
15	黄绿青霉素 Citreoviridin (CIT)	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	25425-12-1	99	5
16	HT-2 毒素 HT-2 toxin (HT-2)	C ₂₂ H ₃₂ O ₈	26934-87-2	98	5
17	T-2 毒素 T-2 toxin (T-2)	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	21259-20-1	98	1
18	疣孢青霉原 Verruculogen (VER)	C ₂₇ H ₃₃ N ₃ O ₇	12771-72-1	98	5
19	麦角考宁 Ergomaizeine (ERG)	C ₃₁ H ₃₉ N ₅ O ₅	564-36-3	98	1
20	甲磺酸溴隐亭 2-bromo-α-ergocryptine (BrERG)	C ₃₂ H ₄₀ BrN ₅ O ₅	22260-51-1	95	1
21	玉米赤霉烯酮 Zearalenone (ZEN)	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	17924-92-4	99	5
22	α-玉米赤霉酮 α-Zearalenol (α-ZEL)	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	6455-72-8	98	5
23	β-玉米赤霉酮 β-Zearalenol (β-ZEL)	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	71030-11-0	98	5
24	玉米赤霉酮 Zearalanone (ZAN)	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	5975-78-0	99	5
25	α-玉米赤霉醇 α-Zearalanol (α-ZAL)	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	26538-44-3	97	5
26	β-玉米赤霉醇 β-Zearalanol (β-ZAL)	C ₁₈ H ₂₆ O ₅	42422-68-4	97	5

电喷雾离子源(ESI),离子源温度为 150 °C,脱溶剂温度为 450 °C,脱溶剂气和锥孔气均为 N₂,脱溶剂气流速为 900 L/h,锥孔气流速为 20 L/h。序号 1~20 霉菌毒素采用正离子(ESI⁺)监测,序号 21~26 霉菌毒素采用负离子(ESI⁻)监测方式,毛细管电压为 0.75 kV。采用多反应监测(MRM)方式检测,监测离子、碰撞能量、锥孔电压等参数见表 2。

3 结果与讨论

3.1 仪器条件优化

3.1.1 质谱条件的优化 以甲醇-水(50:50, V/V)为流动相,采用结合(Combine)进样方式,对 26 种霉菌毒素的质谱条件进行优化,在正、负离子模式下进行全扫描,选择合适的准分子离子峰和电离方式。根据化合物的响应,设置不同的扫描模式。其中,正电离模式下获得 [M+H]⁺、[M+NH₄]⁺ 或 [M+Na]⁺,负电离模式下获得 [M-H]⁻。结合基质空白和基质标准液的离子扫描图,进一步优化参数,确定了各种毒素在多反应监测模式(MRM)下信号采集的特征离子对及质谱条件(表 2)。

表 2 MRM 监测模式下 26 种霉菌毒素的质谱优化条件

Table 2 Optimized MS/MS parameters of 26 mycotoxins

序号 Serial	分析物 Analyte	保留时间 Retention time (min)	母离子 Precursor ion (<i>m/z</i>)	子离子 Product ions (<i>m/z</i>)	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞能量 Collision energy (eV)	驻留时间 Dwell time (ms)
1	DON	3.83	296.90 [M+H] ⁺	249.05 [*] /231.08	18/18	12/14	25
2	NIV	1.97	312.5 [M+H] ⁺	175.1 [*] /214.1	25/25	20/22	55
3	AFB ₁	9.11	313.10 [M+H] ⁺	284.86 [*] /241.04	46/46	22/36	12
4	AFB ₂	8.74	315.16 [M+H] ⁺	287.05 [*] /258.98	44/44	26/28	12
5	STE	12.01	324.85 [M+H] ⁺	310.01 [*] /253.09	40/40	22/44	11
6	AFG ₁	8.52	329.10 [M+H] ⁺	242.94 [*] /199.76	38/38	26/40	12
7	AFG ₂	8.14	331.10 [M+H] ⁺	189.00 [*] /244.95	48/48	40/30	18
8	15-AcDON	7.32	338.60 [M+H] ⁺	136.96 [*] /261.07	18/18	18/10	63
9	3-AcDON	7.29	339.02 [M+H] ⁺	231 [*] /203.1	24/30	12/18	63
10	MET	5.46	339.95 [M+H] ⁺	222.94 [*] /207.56	18/18	24/34	25
11	T2 Triol	8.95	383.17 [M+H] ⁺	156.54 [*] /144.99	12/12	26/22	12
12	DIA	8.96	384.15 [M+NH ₄] ⁺	307.16 [*] /105.01	20/20	10/24	12
13	RC	8.79	389.92 [M+H] ⁺	192.99 [*] /108.19	36/36	26/40	12
14	NEO	6.64	400.17 [M+NH ₄] ⁺	184.99 [*] /215.09	18/18	20/16	25
15	CIT	11.67	403.09 [M+H] ⁺	297.12 [*] /285.13	30/30	14/16	11
16	HT-2	10.06	442.20 [M+NH ₄] ⁺	263.12 [*] /215.05	14/14	12/14	17
17	T-2	10.78	484.19 [M+NH ₄] ⁺	305.26 [*] /185.11	18/18	22/12	12
18	VER	12.03	534.02 [M+Na] ⁺	392.11 [*] /435.17	26/26	14/16	11
19	ERG	8.70	562.18 [M+H] ⁺	208 [*] /223.11	32/32	44/36	12
20	BrERG	9.89	654.05 [M+H] ⁺	346.05 [*] /206.97	38/38	26/54	17
21	ZEN	12.12	317.22 [M-H] ⁻	175.06 [*] /187.12	38/38	26/26	11
22	α-ZEL	12.26	319.04 [M-H] ⁻	159.92 [*] /174.18	40/40	30/28	11
23	β-ZEL	11.52	319.04 [M-H] ⁻	159.92 [*] /174.18	38/38	30/24	11
24	ZAN	11.96	319.08 [M-H] ⁻	205.11 [*] /107.02	40/40	26/32	11
25	α-ZAL	11.95	321.15 [M-H] ⁻	277.58 [*] /259.27	40/40	24/24	11
26	β-ZAL	11.27	321.15 [M-H] ⁻	259.27 [*] /161.15	38/38	28/24	11

* : 定量离子(Quantification ions)。

3.1.2 色谱条件优化 考察了 0.1% 甲酸-水/0.1% 甲酸-甲醇(A)、0.1% 甲酸-水/0.1% 甲酸-乙腈(B)、0.2 mmol/L 乙酸铵溶液/甲醇(C)、0.2 mmol/L 乙酸铵溶液/乙腈(D)等 4 种流动相体系对 26 种霉菌毒素的分离效果和峰信号强度。结果表明 26 种毒素在 A 和 B 流动相体系能够全部出峰,并且超过半数的霉菌毒素峰信号在 A 体系中明显高于 B 体系,如 3-AcDON、15-AcDON、HT-2、T-2、VER 等毒素在 A 体系中峰信号响应值超过 B 体系下 5~10 倍;NIV, BrERG 等在 C 和 D 流动相体系中不出峰或有较长拖尾。因此,本研究选择 A 流动相体系。进一步研究发现,洗脱梯度的设定对目标物峰信号强度

有很大影响,如 OTA 和 OTB 保留时间越往后,其峰面积响应值成倍增加,可能与杂质分离度或电离时的溶剂比例有关。在本实验梯度洗脱条件下,分段采集目标物峰信号,16 min 完成 26 种霉菌毒素分离与检测。图 1 为空白玉米加标的定量离子色谱图。

3.2 方法性能

3.2.1 基质效应评价 用水-甲醇-甲酸(95:4.9:0.1, V/V) 配制系列梯度浓度(目标物序号 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 20 为 2, 5, 10, 25 和 100 ng/mL; 目标物序号 1, 2, 8, 9, 14, 15, 16, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26 为 10, 25, 50, 125 和 500 ng/mL) 混合标样,同时称取玉米和豆粕样品,按照前处理步骤进行提取、净化和分析,并对空白样品进行分析,确定不含痕量目标物后,再用空白样品进样液稀释与溶剂标样浓度相同的系列基质匹配标样,分别以标样浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行线性回归分析。溶剂标样和基质匹配标样的斜率和相关系数(R^2)列于表 3。溶剂和基质匹配标样曲线线性良好, R^2 均大于 0.99。基质匹配与溶剂标准曲线斜率的比值可反映出基质效应的强弱。在本实验中,玉米和豆粕基质对此 26 种霉菌毒素均产生了不同程度的基质抑制效应。

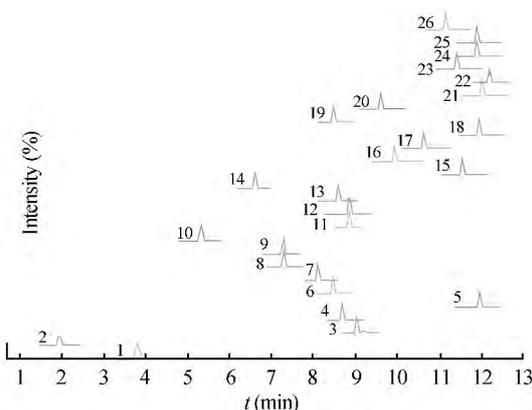


图 1 空白玉米基质匹配标准溶液的定量离子色谱图(3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 20 浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 其它为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

Fig. 1 Chromatograms of quantification transitions of blank maize matrix-matched standard (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 17, 19, 20; 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for others)

表 3 溶剂和基质匹配标准曲线的斜率和 R^2

Table 3 Slope and R^2 of solvent and matrix-matched calibration curves

序号 Serial	分析物 Analyte	溶剂标准溶液 Solvent calibration curves		基质匹配标准溶液 Matrix-matched calibration curves			
		斜率 Slope	R^2	玉米 Maize		豆粕 Soybean meal	
				斜率 Slope	R^2	斜率 Slope	R^2
1	DON	74.05	0.9993	48.04	0.9995	44.05	0.9922
2	NIV	5.21	0.9999	4.06	0.9921	2.15	0.9946
3	AFB ₁	1240.61	0.9985	931.55	0.9977	771.84	0.9910
4	AFB ₂	447.70	0.9999	282.05	0.9971	297.31	0.9973
5	STE	697.42	0.9993	49.08	0.9908	277.18	0.9987
6	AFC ₁	1045.44	0.9986	975.93	0.9989	471.28	0.9907
7	AFC ₂	313.70	0.9998	239.05	0.9985	121.66	0.9941
8	15-AcDON	168.51	0.9986	115.83	0.9990	69.99	0.9909
9	3-AcDON	78.87	0.9991	57.64	0.9990	40.59	0.9980
10	MET	3256.60	0.9991	2970.11	0.9992	2515.87	0.9902
11	T2 Triol	83.85	0.9992	49.88	0.9958	46.74	0.9916
12	DIA	276.22	0.9988	200.56	0.9998	189.95	0.9910
13	RC	4096.63	0.9926	496.62	0.9976	1202.45	0.9947
14	NEO	263.63	0.9996	261.60	0.9998	247.43	0.9991
15	CIT	52.00	0.9961	17.01	0.9959	44.36	0.9939
16	HT-2	223.20	0.9999	126.37	0.9988	83.65	0.9938
17	T-2	808.78	0.9999	268.16	0.9965	256.46	0.9909
18	VER	104.92	0.9969	4.92	0.9941	10.72	0.9936
19	ERG	2069.72	0.9945	787.24	0.9929	1486.00	0.9962
20	BtERG	1029.90	0.9992	239.45	0.9918	133.79	0.9932
21	ZEN	87.90	0.9999	14.34	0.9947	32.09	0.9920
22	α -ZEL	20.61	0.9985	3.81	0.9902	10.66	0.9909
23	β -ZEL	25.40	0.9990	11.52	0.9962	15.04	0.9939
24	ZAN	66.02	0.9990	13.29	0.9907	24.26	0.9932
25	α -ZAL	19.91	0.9997	5.82	0.9924	9.28	0.9968
26	β -ZAL	80.37	0.9982	9.20	0.9946	29.61	0.9901

3.2.2 方法的线性范围与定量限 分别向玉米和豆粕空白样品提取液中添加适量混合标准溶液,按照 2.2 节所述,取 1 mL 经 Mycospin400 净化,真空旋干,用 0.25 mL 水-甲醇-甲酸(95:4.9:0.1, V/V) 溶解,配制浓度为 1~100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (目标物序号为:3,4,5,6,7,10,11,12,13,17,19,20,21)和 5~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (目标物序号为:1,2,8,9,14,15,16,18,22,23,24,25,26)的基质混合标准溶液。根据 10 倍信噪比(S/N)确定化合物的方法定量限(LOQ),以浓度为横坐标,定量离子对峰面积为纵坐标,进行线性回归计算,所得 R^2 均大于 0.99,结果见表 4。

表 4 玉米和豆粕基质中 26 种霉菌毒素的定量限、线性范围、平均回收率及相对标准偏差等方法性能参数
Table 4 Performance parameters of method such as LOQ, linear range, average recoveries and RSD of 26 target mycotoxins in maize and soybean meal

序号 Serial	分析物 Analyte	定量限 LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	线性范围 Linear range ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加水平 Spiked levels ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 Recovery (%)	RSD (%, $n=6$)
1	DON	10	10~500	25, 100, 500	90.0~112.3	2.9~8.9
2	NIV	25	25~500	25, 100, 500	75.6~85.1	1.4~5.9
3	AFB ₁	2	2~100	5, 20, 100	71.8~97.4	2.9~18.6
4	AFB ₂	2	2~100	5, 20, 100	77.4~103.6	2.8~11.8
5	STE	2	2~100	5, 20, 100	83.5~101.3	7.0~14.0
6	AFG ₁	2	2~100	5, 20, 100	73.3~106.8	2.5~17.7
7	AFG ₂	2	2~100	5, 20, 100	78.4~109.2	5.9~15.8
8	15-AcDON	10	10~500	25, 100, 500	81.8~106.3	1.4~5.4
9	3-AcDON	10	10~500	25, 100, 500	98.0~117.1	2.7~12.8
10	MET	0.5	1~100	5, 20, 100	73.8~93.0	1.7~7.3
11	T2 Triol	5	5~100	5, 20, 100	88.7~99.9	9.0~15.2
12	DIA	2	2~100	5, 20, 100	88.4~104.0	4.1~16.6
13	RC	2	2~100	5, 20, 100	61.9~87.5	3.9~12.1
14	NEO	10	10~500	25, 100, 500	93.1~102.4	0.8~11.6
15	CIT	25	25~500	25, 100, 500	99.2~119.5	3.4~11.1
16	HT-2	25	25~500	25, 100, 500	91.5~113.8	1.4~9.6
17	T-2	2	2~100	5, 20, 100	94.2~115.6	2.1~8.1
18	VER	25	25~500	25, 100, 500	87.7~111.1	6.7~7.2
19	ERG	0.5	1~100	5, 20, 100	67.4~84.7	3.2~8.4
20	BrERG	2	2~100	5, 20, 100	76.8~90.8	5.8~18.4
21	ZEN	10	10~500	25, 100, 500	74.6~107.8	4.8~15.1
22	α -ZEL	10	10~500	25, 100, 500	91.7~115.5	4.0~12.2
23	β -ZEL	10	10~500	25, 100, 500	86.6~99.4	4.7~12.2
24	ZAN	10	10~500	25, 100, 500	67.3~107.6	5.5~13.5
25	α -ZAL	10	10~500	25, 100, 500	78.3~98.3	6.3~13.1
26	β -ZAL	10	10~500	25, 100, 500	74.1~94.8	4.3~8.9

3.2.3 回收率和精密度实验 采用玉米和豆粕空白样品,进行添加回收和精密度实验。样品中添加低、中、高 3 个浓度梯度的混合标准溶液,每个添加浓度设 6 个平行,按本实验方法进行样品处理和上机测定,平均回收率为 61.9%~119.5%,相对标准偏差(RSD)为 0.8%~18.6%,结果见表 4。

3.3 实际样品测定

应用本方法对 2013 年采自东北和华北地区的 76 个玉米和 84 个豆粕样品中 26 种霉菌毒素进行检测。对于饲料卫生标准^[7~10]规定了最高限量的 4 种霉菌毒素,AFB₁, T-2, DON 和 ZEN 在玉米样品中检出率分别为 7.9%, 0%, 76.3% 和 39.5%, 在豆粕样品中的检出率分别为 4.8%, 0%, 66.7% 和 38.1%。其中, AFB₁ 和 ZEN 在玉米、豆粕样品中的超标率均为 0。由于饲料卫生标准没有对玉米和豆粕中 DON 作出限量规定,参考配合饲料中 DON 最高限量 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 则 13.1% 的玉米样品和 2.4% 的豆粕样品中 DON 含量超过 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。其它尚没有限量标准的霉菌毒素除 ERG 未检出外,其它毒素均有不同程度的检出。

References

- 1 Cao X Q, Wu S G, Ye Y, Wang S, Wang Y T, Li T, Tian H, Xie J M, Ding H. *J. Chromatogr. B*, **2013**, 942-943: 113 - 125
- 2 Binder E M, Tan L M, Chin L J, Handl J, Richard J. *Anim. Feed Sci. Technol.*, **2007**, 137(3): 265 - 282
- 3 ZHENG Cui-Mei, ZHANG Yan, WANG Xue-Song, XIE Gang, ZHANG Guang-Min, LI Rui. *Grain Science and Technology and Economy*, **2012**, 37(1): 45 - 49
郑翠梅, 张艳, 王雪松, 谢刚, 张广民, 黎睿. *粮食科技与经济*, **2012**, 37(1): 45 - 49
- 4 Marin S, Ramos A J, Cano-Sancho Sanchis G V. *Food Chem. Toxicol.*, **2013**, 60: 218 - 237
- 5 World Health Organization. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. 20 Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland: WHO, **2003**
- 6 GB 2761-2011, *Maximum Levels of Mycotoxins in Foods*, **2011**
GB 2761-2011, 食品中真菌毒素限量. **2011**
- 7 GB 13078-2001, *Hygienical Standard for Feeds*. **2001**
GB 13078-2001, 饲料卫生标准. **2001**
- 8 GB 13078.2-2006, *Hygienical Standard for Feeds-Tolerance of Ochratoxin A and Zearalenone in Feeds*. **2006**
GB 13078.2-2006, 饲料卫生标准—饲料中赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的允许量. **2006**
- 9 GB 13078.3-2007, *Tolerance Limits for Deoxynivalenol in Formula Feeds*, **2007**
GB 13078.3-2007, 配合饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的允许量. **2007**
- 10 GB 21693-2008, *Tolerance Limits for T-2 Toxin in Formula Feeds*, **2008**
GB 21693-2008, 配合饲料中T-2毒素的允许量. **2008**
- 11 Monbaliu S, van Poucke C, Detavernier C, Dumoulin F, van de Velde M, Schoeters E, van Duck S, Averkieva O, van Peteghem C, de Saeger S. *J. Agr. Food Chem.*, **2009**, 58(1): 66 - 71
- 12 Shephard G S, Berthiller F, Burdaspal P A, Crews C, Jonker M A, Krska R, Lattanzio V M T, Macdonald S, Malone R J, Maragos C, Sabino M, Solfrizzo M, Egmond H P, Whitaker T B. *World Mycotoxin J.*, **2012**, 5(1): 3 - 30
- 13 ZHAO Kong-Xiang, GE Bao-Kun, CHEN Xu-Yan, XU Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2011**, 39(9): 1341 - 1346
赵孔祥, 葛宝坤, 陈旭艳, 许泓. *分析化学*, **2011**, 39(9): 1341 - 1346
- 14 YING Yong-Fei, ZHU Cong-Ying, WEI Min-Jue, CHEN Hui-Hua, QU Jian, LU Chun-Bo, LIN Xian-Jun, LUO Cheng-Jiang. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(12): 1759 - 1764
应永飞, 朱聪英, 韦敏珏, 陈慧华, 屈键, 陆春波, 林仙军, 罗成江. *分析化学*, **2010**, 38(12): 1759 - 1764
- 15 ZHENG Cui-Mei, ZHANG Yan, WANG Song-Xue, XIE Gang, ZHANG Guang-Min. *Journal of Instrumental Analysis*, **2012**, 31(4): 383 - 389
郑翠梅, 张艳, 王松雪, 谢刚, 张广民. *分析测试学报*, **2012**, 31(4): 383 - 389

Determination of 26 Mycotoxins in Feedstuffs by Multifunctional Cleanup Column and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

WANG Rui-Guo, SU Xiao-Ou^{*}, CHENG Fang-Fang, WANG Pei-Long, FAN Xia, ZHANG Wei
(Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agricultural Products, Chinese Academy of Agricultural Science, Key Laboratory of Agrifood Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Beijing 10081, China)

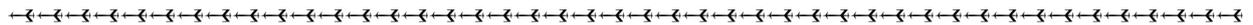
Abstract A rapid high-throughput method for the determination of 26 mycotoxins involving multifunctional cleanup column coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was developed and validated for the determination in feedstuffs. The feedstuff samples were extracted by ultrasonic treatment for 1 hour and the extraction solvent was acetonitrile/water/formic acid (84: 15.9: 0.1, V/V). 1 mL of the supernatant layer was purified by a commercial Mycospin 400 multifunctional cleanup column, then dried and re-dissolved by 0.25 mL water/methanol/formic acid (95: 4.9: 0.1, V/V) in a vial for injection into the LC-MS/MS system. Chromatographic analyses were carried out on a reversed phase C₁₈ column and using a

gradient elution with 0.1% formic acid aqueous solution and 0.1% formic acid methanol solution. The mass spectrometer was operated in a multiple reaction monitoring (MRM) mode that selected one precursor ion and two product ions for each target compound. Validation studies were carried out in maize and soybean meal as representative matrixes. The most target compounds had different level of matrix effects. So, matrix-matched calibration was adopted for quantification. Mean recoveries from spiked samples at three levels ranged from 61.9% to 119.5% with relative standard deviations of 0.8% - 18.6%. Limits of quantification ranged from 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Keywords Liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Feedstuff; Multifunctional cleanup column; Mycotoxins

(Received 31 August 2014; accepted 21 November 2014)

This work was supported by the National Science & Technology Program in Rural Areas during the 12th Five-year Plan Period (No. 2011BAD26B0405)



中国化学会分析化学委员会关于 申请“分析化学基础研究梁树权奖”的通知

分析化学基础研究梁树权奖是以我国著名分析化学家梁树权先生命名的分析化学领域的最高奖项。本奖项旨在鼓励我国中、青年分析化学工作者献身于分析化学学科的基础研究和教育工作,培养优秀人才,促进和推动我国分析化学学科的发展。

本奖项为国内分析化学基础研究成果个人奖。凡年龄在 50 周岁以下,具备下列条件之一者均可申报参加评选:(1) 在分析化学基础研究中确有创新,观点明确、数据完整、结论可靠,并已在国内外刊物上发表或在全国性学术会议上宣读获得好评者;(2) 在解决分析化学基础研究中某一技术难题有独创和革新,并经鉴定确认对国民经济建设有较大经济效益或社会效益者。

中国化学会分析化学委员会将于 2014 年 12 月 1 日至 2015 年 3 月 10 日受理第八届“分析化学基础研究梁树权奖”的申请。申请材料包括申请表、单位推荐书、成果技术资料(论文目录,包括题目、发表时间及刊物,5~10 篇有代表性的论文及对所取得的成就的综述 1000~2000 字),国内外的反映和引用期刊(最好附 SCI 检索),获奖成果及成果推广和应用情况,社会或经济效益,以及有关证明材料。全部申请材料均需打印,一式五份寄长春市人民大街 5625 号中国科学院长春应用化学研究所陈杭亭收(邮编 130022)。材料概不退回,请自留底稿。

申请表格式登录网站 <http://www.analchem.cn> 本刊公告栏查询。

中国化学会分析化学委员会
2014 年 11 月