

高效液相色谱-串联质谱法测定 不同畜禽配合饲料中伏马毒素的含量

郭文博^{1,2} 杨俊花¹ 韩铮¹ 陈慧英^{1,2} 孙真真^{1,2} 赵志辉^{*1}

¹(上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所,上海 201403)

²(上海海洋大学食品学院,上海 201306)

摘要 为摸清复杂基质中 FB₁ 和 FB₂ 污染的准确水平,本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)测定不同畜禽配合饲料中伏马毒素 B₁(FB₁)和 B₂(FB₂)的分析方法。样品用乙腈-水(50:50, V/V)提取,MAX 强阴离子固相萃取柱富集净化后,以 0.1% 甲酸和甲醇为流动相,经 Thermo C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 5 μm)分离,采用电喷雾正电离(ESI⁺)多反应模式(MRM)监测,外标法定量。结果表明:不同饲料样品中 FB₁ 和 FB₂ 在 1~500 μg/kg 之间线性关系良好,相关系数(R²)均大于 0.9990,定量限分别为 0.098 和 0.197 μg/kg,检出限分别为 0.328 和 0.656 μg/kg;低、中、高浓度加标回收率为 89.7%~95.1%,相对标准偏差(RSD)为 3.2%~8.6%。用本方法对市场采集的 106 份不同畜禽配合饲料中 FB₁ 和 FB₂ 含量进行测定,样品检出率为 98.11%。本方法适用于基质复杂的畜禽配合饲料中伏马毒素 FB₁ 和 FB₂ 的准确、快速、稳定性与定量分析。

关键词 伏马毒素; 阴离子固相萃取柱; 液相色谱-串联质谱法; 畜禽配合饲料

1 引言

伏马毒素是 20 世纪 80 年代末发现,由串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)在一定温度和湿度条件下产生的,以污染玉米及其制品为主的水溶性次级代谢产物^[1],由多羟基与丙三羧酸组成的双酯类化合物,与人或动物机体内神经鞘氨醇结构极为相似,在神经鞘脂代谢过程中能竞争性地结合神经鞘氨醇 N-2 酰基转移酶,从而抑制神经鞘氨醇的生物合成,阻碍鞘脂类代谢,引发各种疾病^[2]。研究证实,伏马毒素能引起马大脑白质软化症(Equine leucoencephalomalacia, ELEM),猪肺水肿综合征(Porcine pulmonary edema, PPE);小鼠实验也表明,伏马毒素对肝脏或肾脏容易造成损伤^[3,4]。此外,伏马毒素还具有很强的细胞毒性及免疫毒性,与人类食道癌的发生密切相关^[5]。因此,国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)将伏马毒素列为 2B 级致癌物作为人类潜在的致癌物质。

伏马毒素主要分布在玉米及玉米制品中,严重威胁畜禽及人类健康^[6]。玉米作为畜禽配合饲料的最主要原料,是畜牧业赖以发展的重要基础。因此,伏马毒素含量水平的准确检测对于畜禽配合饲料中伏马毒素的防控和预警具有重要意义。目前,关于饲料中伏马毒素的检测方法主要有柱前衍生-高效液相色谱法^[7,8]、气相色谱法^[9]、薄层色谱法^[10]、酶联免疫法^[11]等,这些方法前处理复杂且灵敏度较低,不能满足快速痕量检测的要求。我国国家标准中对于玉米及其制品中伏马毒素的检测主要采用高效液相色谱法和荧光光度法^[12],选用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)作为仲裁法^[13],也有采用 LC-MS/MS 测定谷物中的伏马毒素的报道^[14,15],但这些方法都存在前处理复杂、灵敏度低等问题。此外,畜禽配合饲料由玉米、小麦、麸皮、棉粕、豆粕等多种原料混合而成,基质复杂多样,容易产生基质效应,且不同动物饲料随生理性影响组成各有差异,迫切需要一种能适应不同配合饲料基质、快速有效的检测方法,以适应饲料行业监督检查和畜牧业生产的需求。在前人研究的基础上,本研究采用 MAX 阴离子固相萃取柱富集净化,改进流动相洗脱程序,缩短分析时间,有效消除基质效应,并用 LC-MS/MS 进行分析,提高检测灵敏度,可用于大批量畜禽配合饲料中 FB₁ 和 FB₂ 检测分析,为不同畜禽配合饲料中伏马毒素的

2014-09-09 收稿; 2015-01-05 接受

本文系上海市农委科技兴农重点攻关项目沪农科攻字(2013)第 3-8 号,沪农科攻字(2014)第 3-2 号项目资助

* E-mail: zhao9912@hotmail.com

准确定量分析提供技术支撑。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

液相色谱-串联质谱: TSQ Quant 配 Surveyor 液相操作系统(美国 Thermo Fisher scientific 公司); MAX 柱(200 mg 6 mL, 美国 Waters 公司)。Heraeus Multifuge X3 高速离心机(Thermo Fisher Scientific 中国有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 Merck 公司); 甲酸、乙酸(色谱纯, 美国 Aladdin 公司); FB₁、FB₂ 标准品(德国 Sigma 公司); 实验用水由 Millipore Synergy 超纯水仪(美国 Millipore 公司)制备。

2.2 实验方法

2.2.1 液相色谱条件 Thermo C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm 5 μm); 流动相 A 为 0.1% 甲酸; 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱: 0~1.0 min 50% B; 1.0~7.0 min 50%~100% B; 7.0~8.0 min 100% B; 8.0~8.2 min 100%~50% B; 8.2~9.0 min 50% B。流速为 300 μL/min; 进样量 5 μL; 柱温 30 °C。

2.2.2 质谱条件 范围 m/z 300~800; 碎裂电压为 1.5 V; 喷雾电压为 3.5 kV; 雾化气压采用电喷雾 ESI(+) 离子源, 多反应监测模式(MRM)采集; 扫描力 3500 Pa; 毛细管温度为 350 °C; 鞘气压 45 Pa; 辅助气压 15 Pa。质谱检测 FB₁ 和 FB₂ 的参数见表 1。

2.2.3 样品提取净化 将饲料样品充分粉碎, 使其可通过 1 mm 孔径网筛。准确称取 1.0 g ± 0.01 g 饲料样品于 10 mL 离心管中, 加入 5.0 mL 乙腈-水(50:50, V/V) 提取剂^[16,17], 涡旋混合

1 min, 超声 1 h 4500 r/min 离心 10 min。MAX 柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 甲醇-水(3:1, V/V) 活化, 然后加入 2 mL 上清液, 再依次加入 5 mL 甲醇-水(3:1, V/V) 和 5 mL 甲醇淋洗 MAX 小柱, 最后用 10 mL 甲醇-乙酸(99:1, V/V) 洗脱, 收集洗脱液, 在 45 °C 氮气吹干, 残渣用乙腈-水(50:50, V/V) 定容至 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜后待测。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件优化

3.1.1 流动相组分的选择 由于伏马毒素在 ESI(+) 条件下产生的是 $[M+H]^+$ 离子, 而酸性溶液有助于其离子化^[18], 所以本实验选择在弱洗脱溶液中添加易挥发的甲酸, 提高伏马毒素离子化效率。本实验以 0.1% 甲酸和甲醇为流动相, 与 0.05%, 0.2%, 0.5% 甲酸和甲醇相比, 两种伏马毒素的分离度好, 峰形对称且灵敏度高, 如图 1。因此, 本实验最终选择 0.1% 甲酸和甲醇为流动相。

3.1.2 起始流动相比例的选择 分别以 0.1% 甲酸-甲醇(80:20, V/V) 和(50:50, V/V) 作为初始流动相, 结果表明: 初始流动相为 0.1% 甲酸-甲醇(80:20, V/V) 时, 峰形较宽, 出峰时间晚, 灵敏度较

表 1 两种伏马毒素 FB₁、FB₂ 质谱条件参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for fumonisin B₁(FB₁) and fumonisin B₂(FB₂)

名称 Name	保留时间 Retention time (min)	母离子 Precursor ion (m/z)	特征离子 Characteristic ion (m/z)	碰撞能量 Collision energy (eV)
FB ₁	4.49	722.5	352.1*	38
			334.2	42
			704.4	29
FB ₂	5.56	706.5	336.2*	37
			354.2	37
			318.3	40

注: * : 定量离子(Quantitative ion)。

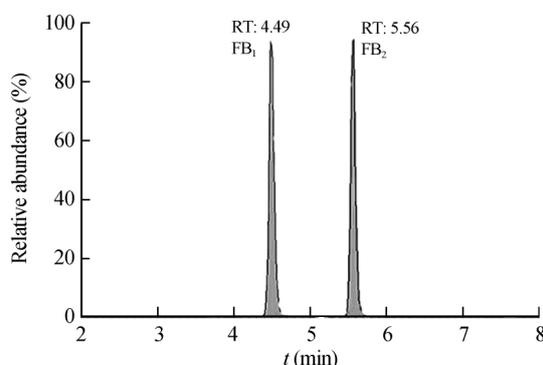


图 1 以 0.1% 甲酸和甲醇为流动相时 FB₁、FB₂ 离子色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of FB₁ and FB₂ with 0.1% formic acid and methanol as mobile phase

低; 初始流动相为 0.1% 甲酸-甲醇(50:50, V/V) 时, FB_1 与 FB_2 分离度好, 出峰时间适中, 峰形对称, 灵敏度高。因此, 选择 0.1% 甲酸-甲醇(50:50, V/V) 作为梯度洗脱的起始流动相。

3.2 不同净化柱的选择

应用高效液相色谱-串联质谱法测定伏马毒素时, 提取液需经过富集净化, 目前用于伏马毒素检测的净化小柱主要是阴离子交换柱, 主要有 Multi-Sep211^[19]、HLB^[20] 及 MAX^[21] 小柱。实验发现, 伏马毒素在 HLB 净化柱上保留性差, 当用甲醇淋洗时, 伏马毒素和杂质同时被洗脱下来, 净化效果不佳; 而 MAX 和 MultiSep211 净化柱在用甲醇-甲酸(99:1, V/V) 洗脱时, 回收率均在 90% 以上, 除去了色素、鞣质、油脂等杂质, 不仅提高了灵敏度, 还延长了色谱柱寿命。实际样品检测色谱图如图 2。MAX 净化柱比 MultiSep 211 过柱速度快, 柱容量大, 且价格便宜。因此, 本实验选择 MAX 作为样品前处理净化柱。

3.3 线性范围和灵敏度

用乙腈-水(50:50, V/V) 将 FB_1 、 FB_2 的标准品溶液稀释成 1, 10, 20, 50, 100, 200 和 500 $\mu\text{g/L}$, 以 FB_1 、 FB_2 浓度为横坐标(X) 峰面积为纵坐标(Y) 作线性回归方程, 见表 2。结果表明: FB_1 和 FB_2 在 1~500 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数(R^2) 均大于 0.999。检出限和定量限分别以信噪比的 3 倍和 10 倍计算, 结果见表 2。

3.4 方法的回收率和精密度

准确称取 1.00 g 粉碎后的饲料样品, 加入适量的 FB_1 和 FB_2 混合标准溶液, 使得饲料基质中 FB_1 、 FB_2 的含量分别为 50, 100 和 200 $\mu\text{g/kg}$, 每个水平做 5 个平行, 按上述条件进行处理和测定, 计算回收率。 FB_1 、 FB_2 在不同添加水平的回收率见表 3, FB_1 、 FB_2 在饲料基质中 3 个加标水平的回收率为 89.7%~95.1%, 符合国际上对玉米及饲料样品中伏马毒素污染残留检测的要求。

表 3 方法添加回收率和精密度($n=5$)

添加水平 Added level ($\mu\text{g/kg}$)	FB_1		FB_2	
	回收率 Recovery (%)	RSD (%)	回收率 Recovery (%)	RSD (%)
50	92.3	3.2	90.5	8.6
100	89.7	7.8	95.1	7.2
200	91.2	5.4	91.2	3.4

3.5 样品分析

采用方法对上海及周边城市随机采集的不同品牌 7 类 106 个畜禽配合饲料样品中的 FB_1 、 FB_2 含量进行测定, 结果如图 3。伏马毒素检出率为 98.11%, 在所有检测样品中, FB_1 总含量在 0~1 mg/kg 之间有 66 个, 占 62.26%; 含量在 1 mg/kg 以上的有 40 个, 占 37.74%, 最高含量

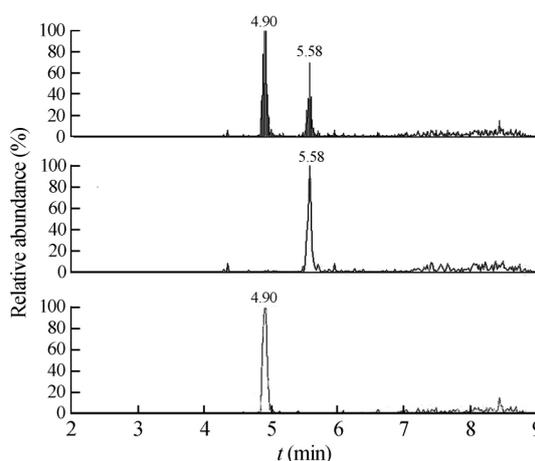


图 2 畜禽配合饲料样品中 FB_1 、 FB_2 离子色谱图

Fig. 2 Ion chromatograms of FB_1 and FB_2 in sample of livestock and poultry formula feeds

表 2 伏马毒素 B_1 、 B_2 线性方程、检出限、定量限

Table 2 Regression equation, LOD and LOQ for fumonisin B_1 and fumonisin B_2

名称 Name	回归方程 Regression equation	回归系数 R^2	检出限 LOD ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 LOQ ($\mu\text{g/kg}$)
FB_1	$Y=58567X-201411$	0.9996	0.328	0.098
FB_2	$Y=140465X-749154$	0.9995	0.656	0.197

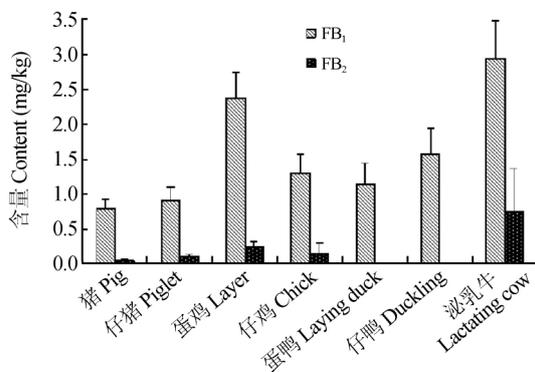


图 3 不同畜禽配合饲料中伏马毒素 B_1 和 B_2 含量检测

Fig. 3 Detection results of FB_1 and FB_2 in different formula feeds for livestock and poultry

达 20.1 mg/kg; FB₂ 含量基本在 0~1 mg/kg。因此, 本方法适合不同种类畜禽配合饲料中 FB₁、FB₂ 样品的检测。

4 结 论

本实验用乙腈-水(50:50, V/V) 作为提取剂, 离心后, 经 MAX 净化柱富集净化, 以 0.1% 甲酸和甲醇为流动相分离, 高效液相色谱-串联质谱法对不同畜禽配合饲料样品中的 FB₁ 和 FB₂ 含量进行检测。结果表明, 本方法前处理简单、重复性好、回收率和灵敏度高, 适用于畜禽配合饲料中伏马毒素的准确定量, 为动物饲料中伏马毒素的风险评估奠定基础。

References

- 1 Gelderblom W C, Jaskiewicz K, Marasas W F, Thiel P G, Horak R M, Vleggaar R, Kriek N P. *Appl. Environ. Microbiol.*, **1988**, 54(7): 1806-1811
- 2 Wang E, Norred W P, Bacon C W, Riley R T, Merrill A H. *J. Biolog. Chem.*, **1991**, 266(22): 14486-14490
- 3 YANG Li-Mei, SU Jian-Ming, LEI Hong-Yu, NING Ling-Zhong, ZHAO Zhi-Min. *Progress in Veterinary Medicine*, **2014**, (3): 97-100
杨李梅, 苏建明, 雷红宇, 宁玲忠, 赵志敏. *动物医学进展*, **2014**, (3): 97-100
- 4 PAN Dong-Chun, LI Jing-Gen, QIAN Gen-Lin, LIU De-Jin. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, **2012**, (5): 56-57
潘冬春, 李敬根, 钱根林, 刘德金. *上海畜牧兽医通讯*, **2012**, (5): 56-57
- 5 WANG Shao-Kang, SUN Gui-Ju. *Journal of Environment & Occupational Medicine*, **2003**, 2(2): 129-133
王少康, 孙桂菊. *环境与职业医学*, **2003**, 2(2): 129-133
- 6 FANG Zao-Ping, PAN Ling. *Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, **2011**, (5): 50-51
方灶平, 潘玲. *上海畜牧兽医通讯*, **2011**, (5): 50-51
- 7 QUAN Ying, WANG Shuo, HAN Ying-Su, ZHANG Yan, WANG Jun-Ping. *Food and Fermentation Industries*, **2005**, 31(8): 87-90
权英, 王硕, 韩英素, 张燕, 王俊平. *食品与发酵工业*, **2005**, 31(8): 87-90
- 8 Ndube N, van der Westhuizen L, Shephard G S. *Mycotoxin Research*, **2009**, 25(4): 225-228
- 9 ZHANG Hao, HOU Hong-Man, LIU Yang, CHEN Li, ZHAO Peng. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, **2007**, 22(4): 137-142
张浩, 侯红漫, 刘阳, 陈莉, 赵鹏. *中国粮油学报*, **2007**, 22(4): 137-142
- 10 Rottinghaus G E, Coatney C E, Minor H C. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **1992**, 4(3): 326-329
- 11 GUO Yun-Chang, LIU Xiu-Mei, LIU Jiang. *Journal of Hygiene Research*, **1999**, 28(4): 238-241
郭云昌, 刘秀梅, 刘江. *卫生研究*, **1999**, 28(4): 238-241
- 12 GB/T25228-2010, *Inspection of Grain and Oils-Determination of Fumonisin in Corn and Its Products by High Liquid Chromatography and Fluorometer with Immunoaffinity Column Cleanup*. National Standards of the People's Republic of China
粮油检验 玉米及其制品中伏马毒素含量测定 免疫亲和柱净化高效液相色谱法和荧光光度法. 中华人民共和国国家标准. GB/T 25228-2010
- 13 NY/T1970-2010, *Determination of Fumonisin in Feeds*. Industry Standards of the People's Republic of China.
饲料中伏马毒素的测定. 中华人民共和国农业行业标准. NY/T 1970-2010
- 14 Gazzotti T, Zironi E, Lugoboni B, Barbarossa A, Piva A, Pagliuca G. *Food Chem.*, **2011**, 125(4): 1379-1384
- 15 LI Zheng-Xiang, CHEN Xiao-Long, CAO Zhao-Yun, CAO Xiao-Lin, GONG Jia-Di, ZHU Zhi-Wei. *Journal of Instrumental Analysis*, **2014**, 33(2): 167-172
李正翔, 陈小龙, 曹赵云, 曹晓林, 巩佳第, 朱智伟. *分析测试学报*, **2014**, 33(2): 167-172
- 16 PAN Hong-Feng, REN Yi-Ping, LAI Shi-Yun, CAI Zeng-Xuan, WANG Li-Li. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, **2009**, 19(3): 467-470
潘红锋, 任一平, 赖世云, 蔡增轩, 王丽丽. *中国卫生检验杂志*, **2009**, 19(3): 467-470

- 17 Cavaliere C , Foglia P , Guarino C , Motto M , Nazzari M , Samperi R , Berardo N. *Food Chemistry* , **2007** , 105 (2) : 700–710
- 18 LIU Cheng-Lan , XU Wen-Na , Andreas Kofoet , LIU Feng-Mao , PAN Can-Ping , XU Yan-Jun , JIANG Shu-Ren. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2005** , 33(11) : 1619–1622
刘承兰 , 许文娜 , Andreas Kofoet , 刘丰茂 , 潘灿平 , 徐彦军 , 江树人. *分析化学* , **2005** , 33(11) : 1619–1622
- 19 MA Jiao-Yue , HU Xiao , SHAO Bing , LIN Xiao-Hui , YU Hong-Xia , LI Feng-Qin. *Journal of Shan Dong University* , **2012** , 50(4) : 115–120
马皎月 , 胡晓 , 邵兵 , 林肖惠 , 于红霞 , 李凤琴. *山东大学学报* , **2012** , 50(4) : 115–120
- 20 Sørensen L K , Elbaek T H. *J. Chromatogr. B* , **2005** , 820(2) : 183–196
- 21 QIAN Ming-Rong , WU Li-Qin , ZHANG Hu , LIU Fei , LI Rui , CHEN Zhi-Min , FANG Li-Zhen. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2012** , 40(5) : 757–761
钱鸣蓉 , 吴俐勤 , 章虎 , 刘飞 , 李锐 , 陈志民 , 方丽珍. *分析化学* , **2012** , 40(5) : 757–761

Determination of Fumonisin B₁ and Fumonisin B₂ in Formula Feeds for Livestock and Poultry by High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry

GUO Wen-Bo^{1,2} , YANG Jun-Hua¹ , HAN Zheng¹ , CHEN Hui-Ying^{1,2} , SUN Zhen-Zhen^{1,2} , ZHAO Zhi-Hui*¹

¹(Institute of Agri-food Standards and Testing Technology ,

Shanghai Academy of Agricultural Sciences , Shanghai 201403 , China)

²(College of Food Science , Shanghai Ocean University , Shanghai 201306 , China)

Abstract A method was developed for the determination of fumonisin B₁ (FB₁) and fumonisin B₂ (FB₂) in livestock and poultry formula feeds by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS). After extracted by acetonitrile–water (50 : 50, V/V) and purified with MAX solid phase extraction column, the fumonisins were separated by Thermo C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 5 μm) column with 0.1% formic acid in water and methanol as the mobile phase. Multiple reaction monitoring (MRM) was used to acquire mass spectrometric data under electrospray positive ionization mode (ESI⁺). The results showed that the linear correlation coefficients (R^2) of fumonisin FB₁ and FB₂ were all greater than 0.999 in the range of 1–500 μg/L. The limits of quantitation (LOQ) were 0.098 and 0.197 μg/L, and the limits of detection (LOD) were 0.328 and 0.656 μg/L, respectively. At different spiked levels, the recoveries of FB₁ and FB₂ were ranged from 89.7% to 95.1%, and the relative standard deviation (RSD) was ranged from 3.2% to 8.6%. Additionally, the detection rate reached 98.11% screening through the established method in the 106 livestock and poultry formula feeds collected from markets. This result indicates that the method is suitable for accurate quantitative analysis of FB₁ and FB₂ in different complicated livestock and poultry formula feeds.

Keywords Fumonisin; Anion exchange solid phase extraction column; High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry; Livestock and poultry formula feeds

(Received 9 September 2014; accepted 5 January 2015)

This work was supported by the Key Project of Developing Agriculture through Science and Technology of Shanghai Municipal Agricultural Commission (No. 3-8 (2013) , 3-2 (2014))