

饲料中30种霉菌毒素的LC-MS/MS快速定量和筛查方法

A Rapid Quantification and Screening of 30 Mycotoxins in Feed by LC-MS/MS

Triple Quad™ 3500液相色谱-三重四级杆质谱技术

翟南南 (Zhai Nannan), 贾彦波 (Jia Yanbo), 靳文海 (Jin Wenhai)

SCIEX, 亚太应用支持中心 (北京), 中国

Key Words: Mycotoxins, Triple Quad™ 3500

近年来,我国乃至世界范围内动物霉菌毒素中毒事件时常发生,给养殖业带来巨大经济损失。饲料霉菌毒素污染是一个持续性的全球性问题,严重影响动物健康和生产性能,并带来重大食品安全隐患。控制饲料霉菌毒素污染与危害是行业的共同愿望。

为全面提升我国饲料霉菌毒素研究水平和防控管理能力,为养殖业和饲料行业健康发展保驾护航。2017年10月14日,国家质量监督检验检疫总局和国家标准化委员会发布了《饲料卫生标准》(GB13078-2017)(已于2018年5月1日正式实施),其中规定7项霉菌毒素在饲料中的限量要求。

本文主要针对饲料中霉菌毒素检测问题,在Triple Quad™ 3500液相色谱质谱联用系统上,建立了30种霉菌毒素的快速定量方法,为饲料中霉菌毒素的检测提供了简单快速的解决方案。

本方法具有以下特点:

1. 本方法采用正负同时采集,可实现一针进样同时测定30种霉菌毒素,分析时间仅13分钟,大大提高了通量
2. 本方法的灵敏度完全满足GB13078-2017要求
3. 本方法提供了30种霉菌毒素质谱条件、液相条件以及保留时间,大大节省进行方法开发时间,提高工作效率
4. 本方法提供了饲料中样品前处理方法,提取回收率高,拿来即用,节省样品前处理摸索时间

仪器设备

SCIEX ExionLC™ 液相系统 + Triple Quad™ 3500 质谱系统

样品前处理

样品提取过程

- 称量均质后称取一定量的饲料样品



- 加入乙腈/水溶液,超声提取,涡旋均匀
- 提取液离心
- 取全部上清液备用

样品净化富集过程

方法1: (用于伏马毒素B1、B2、B3和赭曲霉毒素4种毒素)

- 取一定量上清液加入氨水调节pH6~8
- 使用甲醇活化,用水平衡Cleanert SAX柱*
- 将上清液上样,上样完毕后依次使用甲醇/水和甲醇淋洗
- 使用含有乙酸的甲醇洗脱,氮气吹干,最后使用乙腈/水=5/95 (v/v)复溶,进行LC-MS/MS分析

方法2: (用于其他26种毒素)

- 取一定量上清液加入Cleanert MC专用净化柱*净化样品
- 净化液氮气吹干,最后使用乙腈/水=5/95 (v/v)复溶,进行LC-MS/MS分析

备注: *方法中涉及固相萃取柱规格Agela Cleanert MC(400 mg/2 mL)和Agela Cleanert SAX(500 mg/6 mL)

液相方法

色谱柱: Phenomenex Kinetex C18, 100 × 3.0 mm, 2.6 μm

流动相: A: 水 (0.1% 甲酸); B: 甲醇 (0.1% 甲酸)

流速: 0.5 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 20 µL

梯度洗脱:

Time (min)	A (%)	B (%)
0.0	97	3
1.0	97	3
2.0	90	10
4.0	50	50
9.0	20	80
9.1	0	100
11.0	0	100
11.1	97	3
13.0	97	3

质谱方法

离子源: ESI 源, 正负离子模式

离子源参数:

IS 电压: 5500 V/4500

气帘气 CUR: 30 psi

雾化气 GS1: 50 psi

辅助气 GS2: 65 psi

源温度 TEM: 550°C

碰撞气 CAD: Medium

备注: 各化合物质谱参数见附表

实验结果

1. 一针进样, 正负同时采集, 13分钟内测定30种化合物, 分析时间短

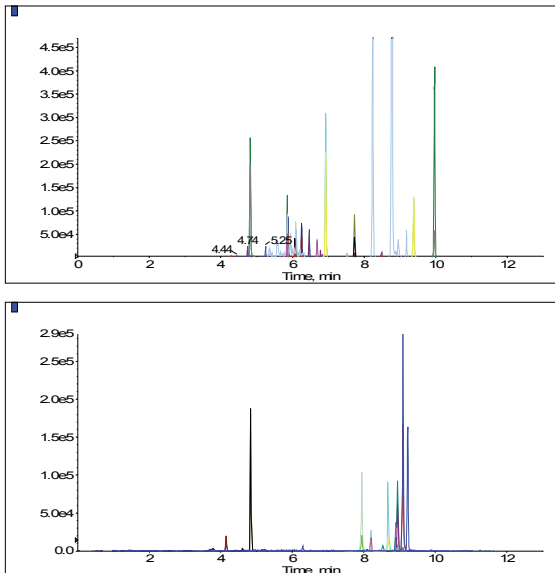


图1. 猪饲料中30种霉菌毒素的典型色谱图。

2. 该方法灵敏度完全满足GB要求, 可用于准确测定饲料中霉菌毒素的含量

表1. 各个化合物LOQ值。

中文名	LOQ (µg/kg)	LOQ of GB (µg/kg)
黄曲霉毒素 B ₁	1	2
黄曲霉毒素 B ₂	1	NA*
黄曲霉毒素 G ₁	0.5	NA*
黄曲霉毒素 G ₂	0.5	NA*
黄曲霉毒素 M ₁	0.5	NA*
黄曲霉毒素 M ₂	0.5	NA*
杂色曲霉毒素	0.5	NA*
T-2 毒素	0.1	2
麦角醇	1	NA*
娄地青霉素	0.1	NA*
蛇形毒素	10	NA*
新茄病镰刀菌烯醇	20	NA*
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	20	100#
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	10	NA*
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	10	NA*
脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷	20	NA*
玉米赤霉烯酮	5	10
α-玉米赤霉烯醇	5	NA*
β-玉米赤霉烯醇	2	NA*
玉米赤霉酮	2	NA*
α-玉米赤霉醇	2	NA*
β-玉米赤霉醇	2	NA*
赭曲霉毒素 A	1	5#
伏马毒素 B1	1	B1+B2=50
伏马毒素 B2	1	
伏马毒素 B3	1	NA*
渥曼青霉素	10	NA*
HT-2 毒素	20	NA*
雪腐镰刀菌烯醇溶液	20	NA*
疣孢青霉原	5	NA*

备注: *: 目前未有国标方法; #: 国标为 HPLC 方法

3. 该方法提取回收率高, 所有化合物的提取回收率均>70%

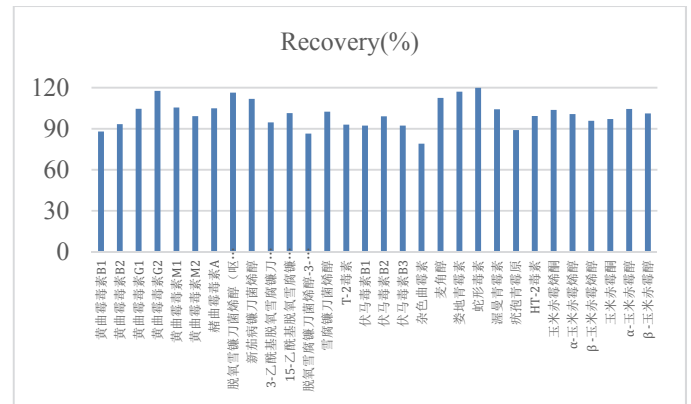


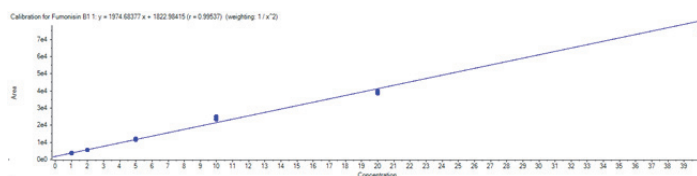
图2. 猪饲料中各化合物提取回收率统计图。

4. 该方法的重现性好, 可放心用于实际样品测定

总结

表1. 伏马毒素B1重现性及线性结果。

Row	Component Name	Actual Concentration	Num. Values	Mean	Standard Deviation	Percent CV	Accuracy
1	Fumonisin B1 1	1.0000	3 of 3	1.0142	0.0397	3.92	101.42
2	Fumonisin B1 1	2.0000	3 of 3	1.8915	0.0266	1.40	94.58
3	Fumonisin B1 1	5.0000	3 of 3	5.1004	0.2222	4.36	102.01
4	Fumonisin B1 1	10.0000	3 of 3	11.3009	0.4347	3.85	113.01
5	Fumonisin B1 1	20.0000	3 of 3	18.9296	0.3081	1.63	94.65
6	Fumonisin B1 1	40.0000	3 of 3	37.7365	0.8932	2.37	94.34



本方法针对饲料中霉菌毒素检测难点热点而开发, 完全可以满足 GB13078-2017 限量要求。基于 SCIEX Triple Quad™ 3500 平台, 快速筛查并且定量测定饲料中 30 种霉菌毒素的。该方法采用正负离子同时测定, 一针进样, 13 分钟内同时检测 30 种霉菌毒素, 高效率高通量。同时, 本方法包含样品前处理方法, 提取回收率高, 重现性好, 可用于实际样品中霉菌毒素的测定。

附表 30种霉菌毒素的质谱参数及保留时间。

Compound	Q1	Q3	DP	CE	RT(min)
黄曲霉毒素B1 Aflatoxin B1	313.1	285.1	95	32	6.69
黄曲霉毒素B2 Aflatoxin B2	315.1	287.1	113	35	6.47
黄曲霉毒素G1 Aflatoxin G1	329.1	243.2	110	33	6.25
黄曲霉毒素G2 Aflatoxin G2	331.1	245.1	115	39	6.06
黄曲霉毒素M1 Aflatoxin M1	329	273.1	106	31	6.09
黄曲霉毒素M2 Aflatoxin M2	331.1	273.1	87	31	5.87
T-2毒素 T-2 toxin	484.2	305.3	40	18	8.5
疣孢青霉原 Verruculogen	534.3	392.3	70	13	7.74
新茄病镰刀菌烯醇 Neosolaniol	400.2	305.2	70	17	4.84
渥曼青霉素 Wor™annin	447.2	345.2	119	25	5.82
杂色曲霉毒素 Sterigmatocysin	325.1	310.1	116	33	5.82
麦角醇 Lysergol	255.3	240.2	60	31	9.97
蛇形毒素 Diacetoxyscirpenol	384.2	105.1	40	60	5.44
HT-2 毒素 HT-2 Toxin	442.1	263.1	66	17	7.73
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol	296.9	249.1	60	12	9.39

附表 30种霉菌毒素的质谱参数及保留时间 (续)。

Compound	Q1	Q3	DP	CE	RT(min)
3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 3-AcetylDeoxynivalenol	339	231	60	12	4.76
	339	203	60	18	4.76
15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 15-AcetylDeoxynivalenol	339.1	321.3	61	13	6.79
	339.1	137.2	61	17	6.79
娄地青霉素 Roquefortine C	390.3	193.1	75	36	7.02
	390.3	322.2	75	27	7.02
伏马毒素B1 Fumonisin B1	722.5	334.3	146	53	7.52
	722.5	352.3	146	49	7.52
伏马毒素B2 Fumonisin B2	706.5	336.3	151	49	8.77
	706.5	318.3	151	51	8.77
伏马毒素B3 Fumonisin B3	706.5	336.3	151	49	8.23
	706.5	318.3	151	51	8.23
玉米赤霉烯酮 Zearalenone	317.1	175	-112	-31	9.1
	317.1	131.1	-112	-34	9.1
α -玉米赤霉烯醇 α -Zearalenol	319.2	160.1	-110	-36	8.89
	319.2	130	-110	-40	8.89
β -玉米赤霉烯醇 β -Zearalenol	319.2	160.1	-110	-36	8.2
	319.2	130	-110	-40	8.2
玉米赤霉酮 Zearalanone	319.2	275.2	-112	-26	8.94
	319.2	205.1	-112	-30	8.94
α -玉米赤霉醇 α -zearalanol	321.2	277.2	-112	-28	8.67
	321.2	303.2	-112	-25	8.67
β -玉米赤霉醇 β -zearalanol	321.2	277.2	-112	-28	7.94
	321.2	303.2	-112	-25	7.94
雪腐镰刀菌烯醇 Nivalenol	357	311	-80	-14	4.19
	357	281	-80	-18	4.19
脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷 Deoxynivalenol-3-Glucoside	503.1	427.1	-101	-29	4.81
	503.1	457.1	-101	-20	4.81
赭曲霉毒素A OchratoxinA	402.1	358.1	-80	-28	9.23
	402.1	166.9	-80	-47	9.23

Answers for Science. Knowledge for Life.™

AB Sciex is doing business as SCIEX.

© 2018 AB Sciex. For research use only. Not for use in diagnostic procedures. The trademarks mentioned herein are the property of the AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8540-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司

地址：北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层

电话：010-5808 1388

传真：010-5808 1390

全国免费垂询电话：800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心

地址：上海市长宁区福泉北路518号
1座502室

电话：021-24197200

传真：021-24197333

网址：www.sciex.com.cn

广州分公司

地址：广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室

电话：020-85100200

传真：020-38760835

微博：@SCIEX