

# 中华人民共和国农业行业标准

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

Determination of aflatoxins, zearalenone and T-2 in feeds—  
Liquid chromatography—tandem mass spectrometry

2011-09-01 发布

2011-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

## 前　　言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:浙江省饲料监察所、浙江大学饲料研究所。

本标准主要起草人:朱聪英、应永飞、韦敏珏、陈慧华、陆春波、陈勇、罗成江、屈健、占秀安、余东游。

# 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

## 1 范围

本标准规定了饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素含量的液相色谱—串联质谱测定方法。

本标准适用于单一饲料、配合饲料、浓缩饲料、添加剂预混合饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素含量的测定。

本标准各黄曲霉毒素与 T-2 毒素的检测限为 1.0 μg/kg, 定量限为 2.0 μg/kg; 玉米赤霉烯酮的检测限为 5.0 μg/kg, 定量限为 10.0 μg/kg。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

## 3 原理

试样中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素经乙腈溶液提取, 正己烷脱脂及霉菌毒素多功能净化柱净化后, 氮气吹干, 甲酸乙腈溶液溶解, 液相色谱—串联质谱法测定。采用色谱保留时间和质谱碎片及其离子丰度比定性, 外标法定量。

## 4 试剂和材料

除特殊注明外, 本法所用试剂均为分析纯, 水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.1 乙腈。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 甲醇:色谱纯。

4.4 正己烷。

4.5 甲酸:色谱纯。

4.6 冰乙酸。

4.7 提取液:准确量取乙腈(4.1)840 mL 和水 160 mL, 摆匀, 即得。

4.8 甲酸溶液(0.1%):准确量取甲酸(4.5)1 mL 加水至 1 000 mL, 摆匀, 即得。

4.9 乙酸溶液(0.02%):准确量取冰乙酸(4.6)0.2 mL 加水至 1 000 mL, 摆匀, 即得。

4.10 甲酸乙腈溶液:取甲酸溶液(4.8)50 mL 加乙腈(4.2)至 100 mL, 摆匀, 即得。

4.11 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素标准品:纯度≥97.0%。

4.12 标准储备液:分别精密称取 6 种霉菌毒素标准品(4.11)至棕色容量瓶中, 用甲醇配成浓度各为

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的霉菌毒素标准储备液,置-20℃保存。

**警告:**由于霉菌毒素毒性很强,试验人员应注意自我保护。操作时,应避免吸入、接触霉菌毒素标准溶液。配置溶液应在通风橱内进行,工作时应戴眼镜、穿工作服、戴医用乳胶手套。凡接触霉菌毒素的容器,需浸入1%次氯酸钠溶液,过夜后清洗。同时,为了降低接触霉菌毒素的机会,本标准鼓励直接购买并使用霉菌毒素的有证标准储备液。

**4.13 混合标准储备液:**分别吸取一定量的6种霉菌毒素标准储备液(4.12),置于棕色容量瓶中,用甲醇稀释成浓度为1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准储备液。保存于4℃冰箱中。

**4.14 基质匹配标准系列工作溶液:**分别吸取一定量的混合标准储备液(4.13),添加空白样品提取液,氮气吹干后,用流动相稀释成浓度为1.0  $\mu\text{g}/\text{L} \sim 200.0 \mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准系列工作溶液,临用新配。

**4.15 霉菌毒素多功能净化柱:** Trilogy TC-M160柱\*,或效果相当者。

## 5 仪器和设备

**5.1 液相色谱—串联质谱仪:**配有电喷雾电离源。

**5.2 离心机:**最大转速8 000 r/min或以上。

**5.3 固相萃取装置。**

**5.4 旋涡混合器。**

**5.5 分析天平:**感量0.000 01 g。

**5.6 天平:**感量0.01 g。

**5.7 氮吹仪。**

**5.8 超声波清洗器。**

## 6 测定步骤

### 6.1 采样和试样制备

按GB/T 14699.1抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取200 g,按照GB/T 20195的规定制备样品,粉碎后过0.45 mm孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

### 6.2 试样提取与净化

称取5 g±0.02 g试样于50 mL离心管中,准确加入25 mL提取液(4.7),涡旋混匀2 min,置于超声波清洗器中超声提取20 min,中间振荡2次~3次;取出,于8 000 r/min离心5 min,倾出上清液至分液漏斗中,加15 mL正己烷,充分振摇。待静止分层后,准确量取下层液5 mL,过多功能净化柱(4.15),控制流速为2 mL/min,收集流出液,在60℃下氮气吹干。用1.0 mL甲酸乙腈溶液(4.10)溶解残渣,涡旋30 s,经0.22  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤后,上机测定。

## 7 液相色谱—串联质谱法测定

### 7.1 液相色谱条件

**7.1.1 色谱柱:** C<sub>18</sub>柱,150 mm×3.0 mm,粒径3.0  $\mu\text{m}$ ;或其他等效色谱柱。

**7.1.2 柱温:**33℃。

**7.1.3 进样量:**20  $\mu\text{L}$ 。

**7.1.4 流动相、流速及梯度洗脱条件见表1。**

\* 此处列出试验用霉菌毒素多功能净化柱的型号仅供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试不同厂家或型号的净化柱。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱参考条件

## a. ESI+源梯度洗脱条件

| 时间, min | 流速, mL/min | 甲酸溶液, % | 甲醇/乙腈(1 : 1) | 曲线(Curve) |
|---------|------------|---------|--------------|-----------|
| 0       | 0.3        | 70      | 30           | 1         |
| 4.0     | 0.3        | 55      | 45           | 6         |
| 14.0    | 0.3        | 0       | 100          | 6         |
| 15.0    | 0.3        | 0       | 100          | 6         |
| 15.1    | 0.3        | 70      | 30           | 6         |

## b. ESI-源梯度洗脱条件

| 时间, min | 流速, mL/min | 乙酸溶液, % | 甲醇/乙腈(1 : 1) | 曲线(Curve) |
|---------|------------|---------|--------------|-----------|
| 0       | 0.3        | 70      | 30           | 1         |
| 8.0     | 0.3        | 10      | 90           | 6         |
| 13.0    | 0.3        | 10      | 90           | 6         |
| 13.1    | 0.3        | 70      | 30           | 6         |
| 20.0    | 0.3        | 70      | 30           | 6         |

## 7.2 质谱条件

- a) 离子源:电喷雾离子源。
- b) 扫描方式:正离子扫描模式和负离子扫描模式。
- c) 检测方式:多反应监测。
- d) 脱溶剂气、锥孔气均为高纯氮气,碰撞气为高纯氩气,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- e) 毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压值应优化至最佳灵敏度。
- f) 定性离子对、定量离子对、保留时间及对应的锥孔电压和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 霉菌毒素 MS/MS 参数设置

## a. ESI+监测模式

| 霉菌毒素名称   | 保留时间<br>min | 定性离子对<br>$m/z$ | 定量离子对<br>$m/z$ | 锥孔电压<br>V | 碰撞能量<br>eV |
|--|-------------|----------------|----------------|-----------|------------|
| 黄曲霉毒素 B <sub>1</sub><br>Aflatoxin B <sub>1</sub> | 13.7        | 313.1>241.1    | 313.1>241.1    | 39        | 32         |
|  |             | 313.1>285.1    |                |           | 20         |
| 黄曲霉毒素 B <sub>2</sub><br>Aflatoxin B <sub>2</sub> | 13.2        | 315.1>259.1    | 315.1>259.1    | 44        | 28         |
|  |             | 315.1>287.0    |                |           | 24         |
| 黄曲霉毒素 G <sub>1</sub><br>Aflatoxin G <sub>1</sub> | 12.6        | 329.0>243.1    | 329.0>243.1    | 40        | 26         |
|  |             | 329.0>283.1    |                |           | 24         |
| 黄曲霉毒素 G <sub>2</sub><br>Aflatoxin G <sub>2</sub> | 12.0        | 331.0>245.1    | 331.0>245.1    | 42        | 32         |
|  |             | 331.0>217.1    |                |           | 20         |
| T-2 毒素<br>T-2 toxin                              | 16.0        | 489.1>245.2    | 489.1>245.2    | 38        | 25         |
|  |             | 489.1>387.1    |                |           | 21         |

## b. ESI-监测模式

| 霉菌毒素名称                | 保留时间<br>min | 定性离子对<br>$m/z$ | 定量离子对<br>$m/z$ | 锥孔电压<br>V | 碰撞能量<br>eV |
|-----------------------|-------------|----------------|----------------|-----------|------------|
| 玉米赤霉烯酮<br>Zearalenone | 13.4        | 317.0>175.1    | 317.0>175.1    | 40        | 26         |
|                       |             | 317.0>273.1    |                |           | 26         |

### 7.3 定性测定

在相同试验条件下,样品中待测物质保留时间与标准溶液保留时间的偏差不超过标准溶液保留时间的±2.5%,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表3规定的范围,则可判定样品中存在对应的待测物。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差(%)

| 相对离子丰度  | >50 | >20~50 | >10~20 | ≤10 |
|---------|-----|--------|--------|-----|
| 允许的最大偏差 | ±20 | ±25    | ±30    | ±50 |

### 7.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,混合标准工作液与试样交替进样,采用基质匹配标准溶液校正,外标法定量。样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内,当样品的上机液浓度超过线性范围时,需根据测定浓度,稀释后进行重新测定。上述色谱和质谱条件下,各霉菌毒素标准溶液的多反应监测色谱图参见附录A。

## 8 结果计算

试样中霉菌毒素*i*的含量(*X*)以质量分数表示(μg/kg),用式(1)计算:

$$X_i = c_s \times \frac{A_i}{A_s} \times \frac{V}{m} \times f = c_i \times \frac{V}{m} \times f \quad \dots \dots \dots \quad (1)$$

式中:

*c<sub>s</sub>*——基质标准溶液中霉菌毒素*i*的浓度,单位为微克每升(μg/L);

*A<sub>i</sub>*——试样溶液中霉菌毒素*i*的峰面积;

*A<sub>s</sub>*——基质标准溶液中霉菌毒素*i*的峰面积;

*V*——样品定容体积,单位为毫升(mL);

*m*——样品质量,单位为克(g);

*f*——稀释倍数;

*c<sub>i</sub>*——样品上机液中霉菌毒素*i*的浓度,单位为微克每升(μg/L)。

## 9 结果表示

平行测定结果用算术平均值表示,结果保留3位有效数字。

## 10 允许差

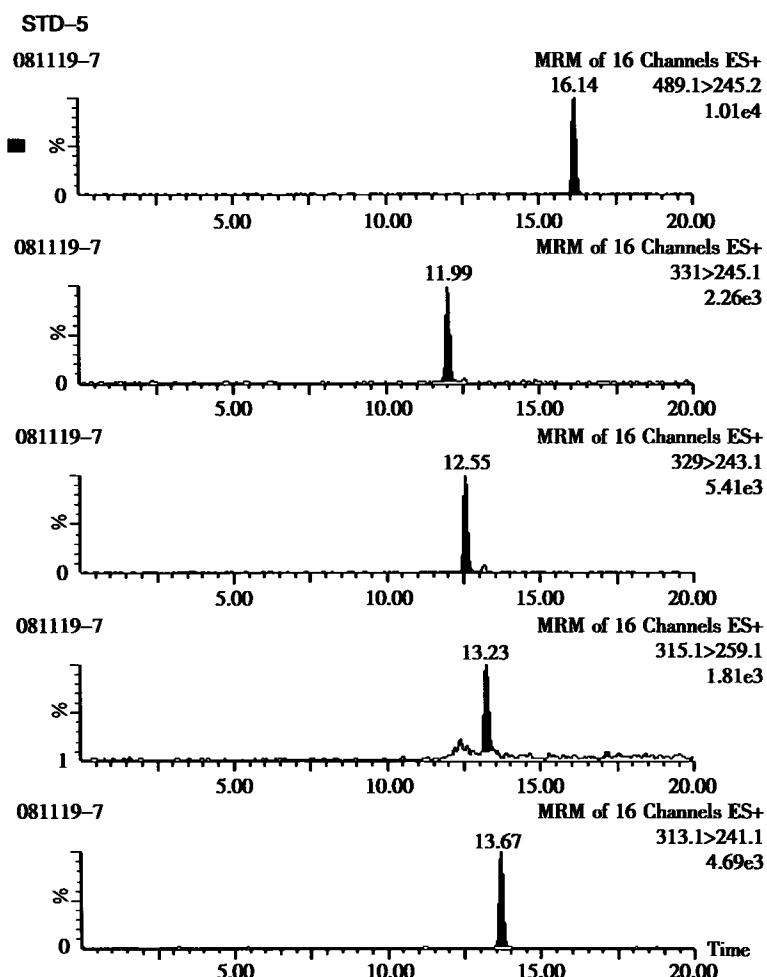
在重复性条件下获得的2次独立测定结果的相对偏差应不大于20%。

## 附录 A

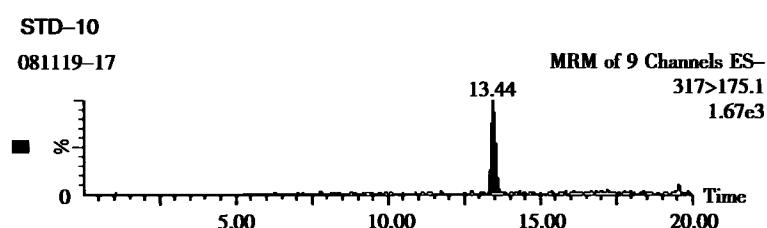
## (资料性附录)

## 霉菌毒素标准品的特征离子质量色谱图(MRM图)

图A.1给出了霉菌毒素标准溶液( $5.0 \mu\text{g/L}$ )的MRM图(ESI+监测模式),图A.2给出了霉菌毒素标准溶液( $10.0 \mu\text{g/L}$ )的MRM图(ESI-监测模式)。



图A.1 霉菌毒素标准溶液( $5.0 \mu\text{g/L}$ )的MRM图(ESI+监测模式)



图A.2 霉菌毒素标准溶液( $10.0 \mu\text{g/L}$ )的MRM图(ESI-监测模式)