

团体标准

T/ NAIA×××-××××

青贮饲料中 9 种真菌毒素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of 9 Mycotoxins in silage

Liquid chromatography-mass spectrometry

2023-××-××发布

2023-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所，宁夏回族自治区吴忠市利通区农业服务中心，宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：刘霞、赵子丹、王晓静、李冬、王晓菁、苟春林、开建荣、牛艳、吴燕、杨静、陈翔、李彩虹、陈嘉龙、张锋锋、纪立香、王芳、张艳、张小飞。

本文件为首次发布。

青贮饲料中 9 种真菌毒素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本文件规定了青贮饲料中伏马毒素 FB1、伏马毒素 FB2、伏马毒素 FB3，脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 AFB1、黄曲霉毒素 AFB2 共 9 种真菌毒素测定的液相色谱-质谱/质谱分析方法。

本文件适用于青贮技术处理的饲料，如青贮玉米、青贮苜蓿、青贮农作秸秆等。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用本文件；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

3 原理

试样用 0.1%甲酸乙腈溶液提取，经混合净化材料萃取净化后，取适量上清液经氮气吹干后乙腈水溶液定容，经超高效液相色谱—串联质谱法测定，外标法定量。

4 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

4.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

4.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

4.3 氯化钠（NaCl）：分析纯。

4.4 混合净化材料：2g 无水硫酸镁、0.5g 柠檬酸钠、0.5g 柠檬酸二钠盐。

4.5 0.1%甲酸 80%乙腈溶液（8+2，体积比）：取 20mL 水加入 80mL 乙腈中混匀，加入 0.1%甲酸。

4.6 50%乙腈溶液（5+5，体积比）：取 50 mL 水加入 50mL 乙腈中混匀。

4.7 毒素标准品：伏马毒素 FB1（CAS 号 116355-83-0，纯度≥98 %）、伏马毒素 FB2（CAS 号 116355-84-1，纯度≥97.9 %）、伏马毒素 FB3（CAS 号 136379-59-4，纯度≥98.5 %）、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（CAS 号 51481-10-8，纯度≥99.38 %）、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇（CAS 号 50722-38-8，纯度≥99.0 %）、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇（CAS 号 88337-96-6，纯度≥99.8 %）、玉米赤霉烯酮（CAS 号 17924-92-4，纯度≥99.7 %）、黄曲霉毒素 AFB1（CAS 号 1162-65-8，纯度≥99.0 %）、黄曲霉毒素 AFB2（CAS 号 7220-81-7，纯度≥99.0 %）。

4.8 标准溶液配制：根据需要分别吸取适量 9 种真菌毒素标准溶液，用乙腈稀释成 1.0 μg/mL

混合标准溶液，-18℃下保存。

5 仪器与设备

5.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

5.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。

5.3 高速万能粉碎机：10000 r/min。

5.4 振荡器。

5.5 离心机：4000 r/min。

5.6 涡旋混合器。

5.7 氮吹仪。

5.8 离心管：50 mL，塑料。

5.9 滤膜：0.22 μm，有机相。

6 分析步骤

6.1 试样的制备

青贮饲料样品于-18℃冷冻冰箱中保存。试验时将青贮样品取出，用高速万能粉碎机粉碎，分别置于样品袋中，-18℃冷冻备用。

6.2 试样提取与净化

称取青贮饲料样品 2.00 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 离心管，加入 20.00 mL 提取液（4.5），振荡提取 40 min，于 4000 r/min 离心 3 min，吸取 6.00 mL 上清液于盛有混合净化材料的 15 mL 离心管中，涡旋净化 1min，于 4000 r/min 离心 3 min，吸取 3.00 mL 于 15 mL 离心管中，经氮气吹干后，用 1.5mL 定容液（4.6）溶解，涡旋 30 s，过 0.22 μm 滤膜后，上机测定。

7 液相色谱—串联质谱法测定

7.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：T3 柱，100 mm×2.1 mm，粒径 1.8 μm，或性能相当者。

b) 柱温：40℃。

c) 进样量：2 μL。

d) 流动相、流速及梯度洗脱条件见表 1。

流动相 A：水溶液（含 0.1%甲酸+5mmol/L 乙酸铵）；

流动相 B：甲醇（含 0.1%甲酸）。

表 1 流动相、流速及梯度洗脱参考条件

时间, min	流速, mL/min	流动相 A, %	流动相 B, %
0	0.4	90	10
1.0	0.4	85	15
2.0	0.4	80	20
6.0	0.4	40	60
10.0	0.4	17	83
11.0	0.4	90	10
13.0	0.4	90	10

7.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源。
- b) 扫描方式：正离子模式和负离子模式。
- c) 离子源喷雾电压：正离子模式 5500V、负离子模式 4500V。
- d) 离子源温度：550℃。
- e) 雾化气、气帘气、碰撞气、辅助加热气均为高纯氮气，使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
- f) 检测方式：多反应监测，参数详见表 2、表 3。

表 2 ESI+监测模式分析参数

名称	保留时间/min	定性离子对/m/z	定量离子对/m/z	碰撞能量/eV
伏马毒素 FB1	8.45	722.4/334.4	722.4/334.4	54
		722.4/352.4		50
伏马毒素 FB2	9.69	706.4/336.51	706.4/336.51	50
		706.4/318.61		54
伏马毒素 FB3	9.15	706.4/336.50	706.4/336.50	50
		706.4/318.60		50
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3.82	297.1/249.1	297.1/249.1	16
		297.1/203.2		21
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	6.07	339.2/203.2	339.2/203.2	21
		339.2/231.1		18
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	6.07	339.3/321.2	339.3/321.2	12
		339.3/137.1		19
黄曲霉毒素 B1	7.42	313.1/285.1	313.1/285.1	33
		313.1/241.1		50
黄曲霉毒素 B2	7.19	315.1/287.1	315.1/287.1	35
		315.1/259.1		40
玉米赤霉烯酮	9.74	317.1/175.0	317.1/175.0	-32
		317.1/273.0		-27

7.3 色谱测定与确证

根据试样中被测物的含量情况，选取响应值适宜的标准工作液进行色谱分析。标准工作液和待测样液中毒素的响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述仪器条件下，伏马毒素 FB1、伏马毒素 FB2、伏马毒素 FB3，脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2 的保留时间分别约为 8.45、9.69、9.15、3.82、6.07、6.07、7.42、7.19、9.74min，多反应离子监测色谱图参见附录 A。按照上述条件进行样品测定，若检测样品的色谱峰保留时间与标准品一致，且与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度允许偏差不超过表 4 规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表 4 定性确证相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	20%至 50%	10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.4 空白试验

除不称取试样外，均按上述操作步骤同时进行。

8 结果计算和表达

用色谱数据处理或按式（1）计算试样中各真菌毒素的含量，计算结果需将空白值扣除。

$$X = \frac{A \times C_S \times V_1 \times V_3}{A_S \times m \times V_2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X —— 试样中真菌毒素的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- A —— 试样中真菌毒素的峰面积；
- V_1 —— 试样中加入的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 —— 分取溶液体积，单位为毫升（mL）；
- V_3 —— 定容溶液体积，单位为毫升（mL）；
- C_S —— 标准工作液中真菌毒素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；
- A_S —— 标准工作液中真菌毒素的峰面积；
- m —— 试样的质量，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定值算术平均值的 15%。

10 定量限和回收率

10.1 定量限

本方法的定量限伏马毒素 FB1、伏马毒素 FB2、伏马毒素 FB3、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2 为 0.001 mg/kg，脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 0.005 mg/kg。

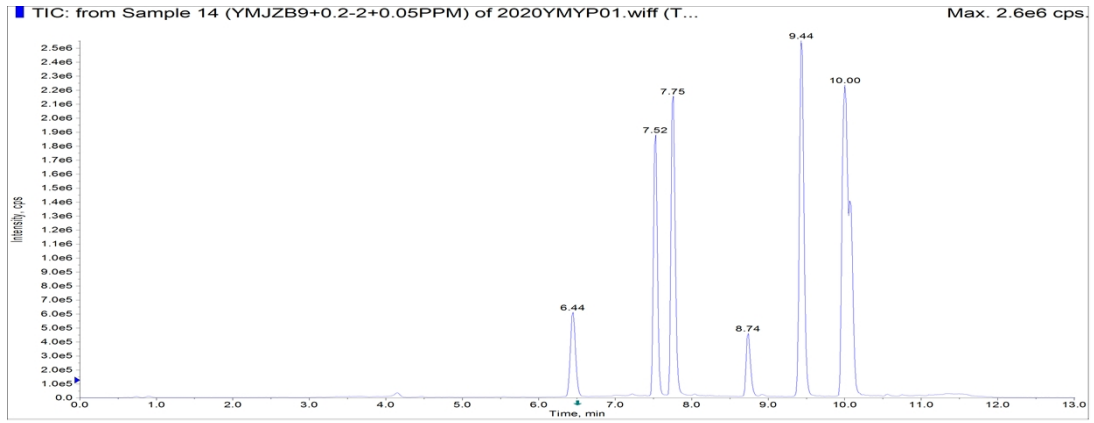
10.2 回收率

本方法的添加浓度和回收率范围见附录 B。

附录 A
(资料性)

9种真菌毒素标准溶液在青贮饲料基质中选择离子监测LC-MS图

A.1 9种真菌毒素标准溶液在青贮饲料基质中选择离子监测LC-MS图，见图A.1。



图A.1 9种真菌毒素标准溶液在青贮饲料基质中选择离子监测LC-MS图

附录 B

(资料性)

青贮饲料样品中添加浓度及回收率范围的实验数据

表B.1 9种真菌毒素在青贮饲料中的添加浓度及回收率范围（%）

名称	添加浓度（mg/kg）	回收率范围（%）	RSD(%)
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON	0.5	73~90	8.4
	1.0	91~102	3.6
	2.0	93~105	1.5
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.5	87~104	5.8
	1.0	90~101	2.6
	2.0	99~104	3.4
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.5	91~100	3.5
	1.0	93~102	3.6
	2.0	95~101	1.8
玉米赤霉烯酮	0.01	75~88	2.0
	0.06	86~103	3.4
	0.3	86~92	1.5
黄曲霉毒素 AFB1	0.05	82~102	4.5
	1	75~89	3.7
	2	80~93	2.0
黄曲霉毒素 AFB2	0.05	75~85	4.5
	1	75~86	2.6
	2	79~90	2.8
伏马毒素 FB1	0.05	75~97	6.8
	1	78~93	5.9
	2	85~95	6.7
伏马毒素 FB2	0.05	76~89	5.2
	1	80~87	5.6
	2	88~93	1.4
伏马毒素 FB3	0.05	79~89	5.3
	1	82~98	3.7
	2	87~99	1.8
