

# LCMSMS 测定饲料中 37 种霉菌毒素的含量

## LCMSMS-566

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用测定饲料中 37 种霉菌毒素的方法。37 种霉菌毒素共分为 A、B 和 C 三组，分别在 0.5~50 ng/mL、5~500 ng/mL 和 10~1000 ng/mL 的浓度范围内线性良好，相关系数  $r$  在 0.998 以上。在高、中、低三个基质标样浓度下，保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.01%~0.86% 和 0.69%~14.97% 之间，仪器精密度良好。即便在标准要求的检测限加标浓度下，83% 以上的化合物回收率在 70%~130% 之间。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，适用于饲料中多种霉菌毒素的测定。

**关键词：**三重四极杆质谱 饲料 霉菌毒素

饲料及农产品中霉菌毒素污染是一个全球性问题，即使微量摄入也可导致严重的动物神经和组织危害，最终给人类的农业生产和食品安全带来严重挑战。霉菌毒素由于种类多、结构差异大以及样品基质复杂等原因，其检测标准多为单一或单类霉菌毒素检测，多类毒素高通量测定一直是检测瓶颈。中华人民共和国农业农村部公告第 357 号发布，2021 年 4 月 1 日，农业行业标准 NY/T3803-2020《饲料中 37 种霉菌毒素的测定 液相色谱串联质谱法》实施，适用于配合饲料、

浓缩饲料、精料补充料和植物性饲料原料中霉菌毒素的检测，这是国内首个饲料中霉菌毒素高通量标准，将扩大我国饲料及畜产品中霉菌毒素监测范围，提升风险发现能力。

本文参考 NY/T3803-2020，使用岛津超高效液相色谱串联质谱仪，建立了 37 种霉菌毒素的测定方法。本方法简便、快速、准确、灵敏度高，结果准确，供相关人员参考。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

输液泵：LC-40DX3×2

质谱仪：LCMS-8050

柱温箱：CTO-40C

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

在线脱气机：DGU-405

### 1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.8  $\mu$ m, 岛津 (上海) 实验器材有限公司, P/N: 227-32001-03)

流动相：A 相 -0.1% 甲酸 +0.1 mmol/L 乙酸铵水溶液，B 相 -0.1% 甲酸 +90% 甲醇水溶液

流速：0.30 mL/min

柱温：40°C

进样体积：0.5  $\mu$ L

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	5
4.00	Pumps	Pump B Conc.	20
12.00	Pumps	Pump B Conc.	95
12.10	Pumps	Pump B Conc.	99
13.00	Pumps	Pump B Conc.	99
13.50	Pumps	Pump B Conc.	5
16.00	Controller	Stop	

#### 质谱条件

离子源：ESI，正离子模式

离子源接口电压：+0.5 kV(Posi), -2.5 kV(Neg)

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

加热气：空气 10 L/min

碰撞气：氩气 (270 kPa)

DL 管温度：250°C

加热模块温度：400°C

接口温度：300°C

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

## ■ 样品前处理方法和标准溶液配制

### 2.1 样品前处理

提取：称取 5 g（精确至 0.01 g）试样于 50 mL 离心管中，准确加入 20 mL 提取液（乙腈：水：甲酸 = 840：159：1，v/v/v），涡旋混匀，振荡提取 20 min，于 8 000 r/min 离心 5 min，立即移取上清液，备用。

净化：将微孔滤膜连接到多重基质吸附型固相萃取柱的出口端，准确移取 1 mL 上清液加载到上述萃取柱上，过柱速度保持在约 1 滴 /s，收集全部滤液于进样小瓶中，待测。

表 2 MRM 参数

组号	No.	中文名称	英文名称	化学式	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
A 组	1	黄曲霉毒素 G2	Aflatoxins G2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	7241-98-7	331.1	189.0	-10	-44	-13
							245.1	-16	-31	-17
	2	黄曲霉毒素 G1	Aflatoxins G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	1165-39-5	329.1	243.1	-10	-28	-12
							200.0	-16	-41	-21
	3	黄曲霉毒素 B2	Aflatoxins B2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	7220-81-7	315.1	287.0	-16	-26	-14
259.0							-12	-31	-19	
4	黄曲霉毒素 B1	Aflatoxins B1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	1162-65-8	313.0	285.2	-12	-23	-14	
						241.0	-16	-37	-16	
5	杂色曲霉毒素	Sterigmatocystin	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	10048-13-2	325.0	309.9	-16	-26	-15	
						281.0	-24	-37	-20	
B 组	6	赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>6</sub>	303-47-9	404.1	239.0	-15	-24	-16
							221.0	-14	-37	-25
	7	赭曲霉毒素 B	Ochratoxin B	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub>	4825-86-9	370.1	205.0	-13	-22	-14
							103.0	-27	-55	-20

组号	No.	中文名称	英文名称	化学式	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
	8	T-2 三醇	T-2 Triol	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>	97373-21-2	405.1	303.0 124.9	-12 -14	-18 -19	-11 -23
	9	T-2 毒素	T-2 toxin	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	21259-20-1	484.1	185.0 305.0	-17 -11	-22 -15	-13 -11
	10	HT-2 毒素	HT-2 toxin	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>	26934-87-2	442.1	263.0 245.0	-10 -15	-15 -13	-13 -12
	11	麦角醇	Lysergol	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O	602-85-7	255.1	197.0 44.0	-18 -13	-28 -15	-13 -16
	12	麦角柯宁碱	Ergocornine	C <sub>31</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub>	564-36-3	562.3	208.1 223.1	-20 -20	-46 -35	-14 -15
B 组	13	β- 玉米赤霉醇	β-zearalanol	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	42422-68-4	321.1	277.2 303.1	12 10	23 23	19 14
	14	β- 玉米赤霉烯醇	β-Zearalenol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	71030-11-0	319.1	275.1 301.1	16 16	20 21	24 13
	15	α- 玉米赤霉醇	α-zearalanol	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> O <sub>5</sub>	26538-44-3	321.1	277.2 303.1	12 10	23 23	19 14
	16	玉米赤霉酮	Zearalenone	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	5975-78-0	319.1	275.1 301.1	12 15	22 21	19 14
	17	α- 玉米赤霉烯醇	α-Zearalenol	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>	36455-72-8	319.1	275.1 301.1	12 12	22 21	30 14
	18	玉米赤霉烯酮	Zearalenone	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	17924-92-4	317.1	131.1 175.1	16 12	31 25	27 11
	19	展青霉素	Patulin	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	149-29-1	155.0	71.1 81.0	-13 -12	-12 -15	-27 -17
	20	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	51481-10-8	297.1	249.0 203.0	-20 -17	-13 -17	-18 -15
	21	青霉酸	Penicillic Acid	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	90-65-3	171.0	97.0 82.0	-11 -13	-17 -25	-19 -15
	22	镰刀菌烯醇 -X	Fusarenon X	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	23255-69-8	355.0	246.9 175.1	-13 -10	-14 -21	-18 -20
C 组	23	新茄病镰刀菌烯醇	Neosolaniol	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>	36519-25-2	400.1	185.0 215.0	-14 -14	-20 -20	-13 -24
	24	15- 乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyl-deoxynivalenol	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	88337-96-6	339.0	137.0 321.0	-12 -12	-12 -10	-14 -23
	25	3- 乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyl-deoxynivalenol	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>7</sub>	50722-38-8	339.0	231.0 203.2	-18 -18	-15 -17	-16 -10
	26	胶霉毒素	Glotoxin	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	67-99-2	326.9	263.0 245.0	-17 -17	-11 -18	-13 -17

组号	No.	中文名称	英文名称	化学式	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
	27	蛇形毒素	Diacetoxyscirpenol	C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	2270-40-8	384.1	307.1 105.0	-26 -14	-13 -39	-22 -21
	28	渥曼青霉素	Wortmannin	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>	19545-26-7	428.9	354.9 313.0	-23 -20	-10 -15	-25 -16
	29	娄地青霉素 C	Roquefortine C	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	58735-64-1	390.1	193.1 108.1	-14 -14	-22 -44	-13 -21
	30	伏马毒素 B1	Fumonisin B1	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>15</sub>	116355-83-0	722.3	352.2 334.2	-20 -20	-38 -40	-13 -17
	31	腾毒素	Tentoxin	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	28540-82-1	415.2	312.1 256.2	-26 -15	-22 -31	-22 -18
C 组	32	霉酚酸	Mycophenolic acid	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	24280-93-1	321.0	207.0 159.0	-12 -16	-18 -35	-14 -11
	33	伏马毒素 B3	Fumonisin B3	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	1422359-85-0	706.3	336.2 354.2	-20 -20	-36 -34	-17 -13
	34	伏马毒素 B2	Fumonisin B2	C <sub>34</sub> H <sub>59</sub> NO <sub>14</sub>	116355-84-1	706.3	336.2 354.2	-20 -20	-37 -35	-17 -13
	35	黄绿青霉素	Citreoviridin	C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>6</sub>	25425-12-1	403.0	297.0 285.1	-20 -26	-16 -16	-14 -14
	36	疣孢青霉原	Verruculogen	C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	12771-72-1	534.1	392.2 435.1	-26 -34	-14 -16	-14 -22
	37	青霉震颤素 A	Penitrem A	C <sub>37</sub> H <sub>44</sub> ClNO <sub>6</sub>	12627-35-9	634.1	558.1 616.1	-22 -36	-21 -14	-20 -24

## 2.2 标准溶液的配制

各组的混合标准储备溶液 (100 µg/mL): 按照 MRM 参数表的分组称取适量的标准品, 置于 10 mL 容量瓶中, A 组和 B 组用乙腈, C 组用乙腈 - 甲醇溶液 (50:50, v/v) 溶解、定容, 分别配制成浓度为 100 µg/mL 的混合标准储备溶液。

各组的混合标准中间溶液 (4 µg/mL): 分别准确移取 400 µL 各组的混合标准储备溶液置于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容, 混匀。

全混合标准系列工作溶液: 分别准确移取适量的各组的混合标准中间溶液, 用乙腈配制成全混合标准系列溶液, 其中 A 组待测物浓度分别为 0.5、2、5、10、20 和 50 ng/mL; B 组待测物浓度为 5、20、50、100、200 和 500 ng/mL; C 组为 10、40、100、200、400 和 1000 ng/mL。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 标准样品的 MRM 色谱图

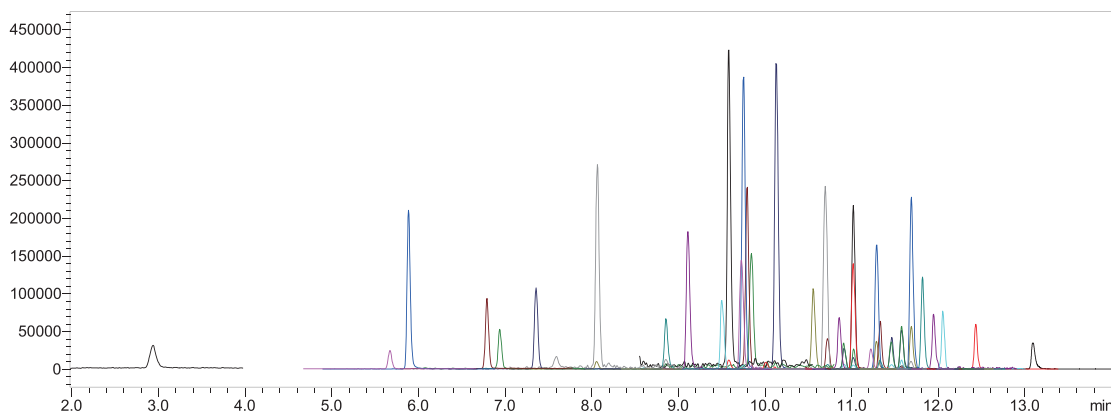


图 1 37 种霉菌毒素基质标样 MRM 色谱图 (A、B 和 C 组浓度分别是 0.5、5 和 10 ng/mL)

### 3.2 线性范围与检测限

取空白样品，按 2.1 提取方法得到空白基质提取溶液。准确移取 1 mL 全混合标准系列工作溶液，于 60°C 真空浓缩或氮吹至近干，加入 1 mL 空白样品提取溶液，涡旋混匀。再按 2.1 净化方法，得到基质匹配混合标准系列溶液，外标法制作标准曲线。37 种化合物线性相关性系数均大于 0.998。以下是部分化合物的标准曲线图。

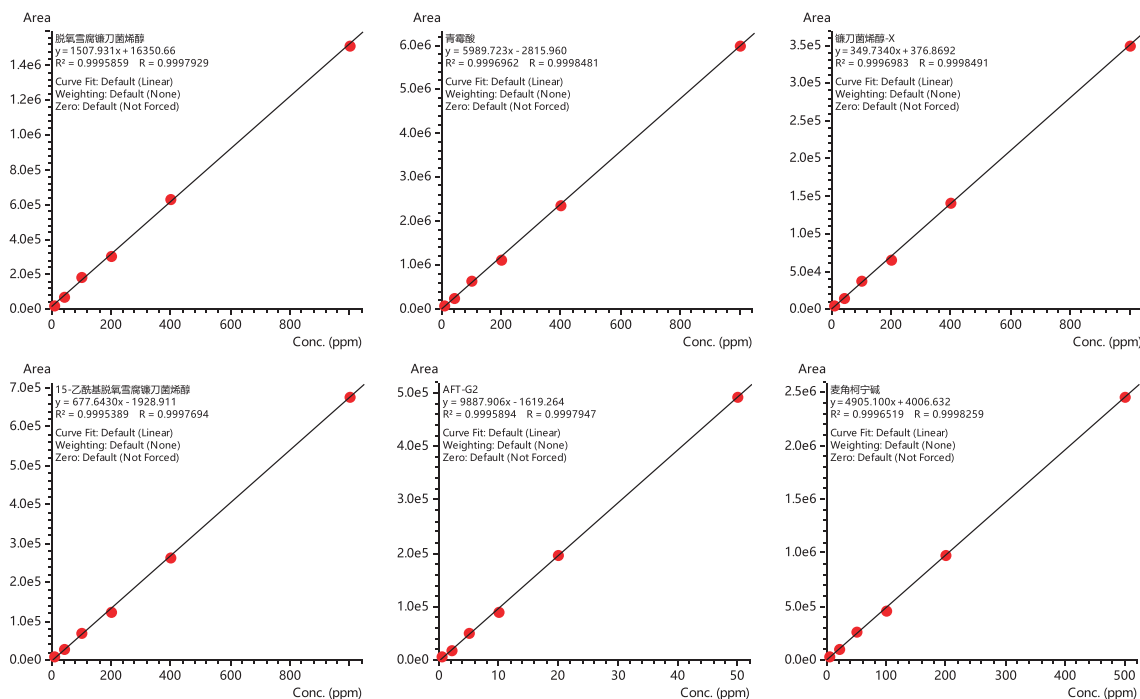


图 2 部分化合物校准曲线

表 3 37 种霉菌毒素标准曲线及检测限、定量限、准确度

编号	化合物	标准曲线	相关性系数 R	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	展青霉素	$Y = (254.333)X + (3431.18)$	0.9991	3.68	11.14
2	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y = (1507.93)X + (16350.7)$	0.9998	0.28	0.85
3	麦角醇	$Y = (36688.1)X + (629834)$	0.9984	0.04	0.14
4	青霉素	$Y = (5989.72)X + (-2815.96)$	0.9998	0.69	2.09
5	镰刀菌烯醇-X	$Y = (349.734)X + (376.869)$	0.9998	2.89	8.75
6	新茄病镰刀菌烯醇	$Y = (8857.76)X + (-137321)$	0.9990	0.49	1.50

编号	化合物	标准曲线	相关性系数 R	检测限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
7	15- 乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y = (677.643)X + (-1928.91)$	0.9998	0.78	2.37
8	3- 乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y = (1928.60)X + (2295.57)$	0.9999	2.44	7.38
9	AFT-G2	$Y = (9887.91)X + (-1619.26)$	0.9998	3.61	10.94
10	AFT-G1	$Y = (25798.0)X + (-1571.45)$	0.9998	0.66	2.01
11	AFT-B2	$Y = (15036.2)X + (-7635.36)$	0.9994	6.02	18.25
12	麦角柯宁碱	$Y = (4905.10)X + (4006.63)$	0.9998	0.10	0.33
13	胶霉毒素	$Y = (3813.90)X + (188.108)$	0.9999	8.31	25.18
14	AFT-B1	$Y = (25116.9)X + (-9133.15)$	0.9995	0.50	1.52
15	蛇形毒素	$Y = (5745.18)X + (-49844.2)$	0.9994	0.56	1.69
16	T-2 三醇	$Y = (4632.49)X + (61740.9)$	0.9989	0.31	1.04
17	渥曼青霉素	$Y = (114.846)X + (878.214)$	0.9998	3.39	10.26
18	娄地青霉素 C	$Y = (25449.6)X + (237031)$	0.9999	0.08	0.23
19	HT-2 毒素	$Y = (1551.47)X + (-2166.99)$	0.9999	5.90	17.89
20	伏马毒素 B1	$Y = (1709.85)X + (8759.80)$	0.9998	0.74	2.23
21	腾毒素	$Y = (5143.87)X + (-32119.0)$	0.9995	0.20	0.62
22	赭曲霉毒素 B	$Y = (1934.40)X + (-7981.10)$	0.9995	3.71	11.24
23	霉酚酸	$Y = (15276.9)X + (-106407)$	0.9995	1.42	4.32
24	T-2 毒素	$Y = (3570.09)X + (-5638.64)$	0.9998	1.50	4.54
25	伏马毒素 B3	$Y = (2305.83)X + (-3306.12)$	0.9997	0.35	1.18
26	伏马毒素 B2	$Y = (3392.47)X + (9527.97)$	0.9998	0.50	1.51
27	赭曲霉毒素 A	$Y = (16181.0)X + (-43328.7)$	0.9996	0.28	0.85
28	黄绿青霉素	$Y = (1028.61)X + (-3034.12)$	0.9997	7.21	21.84
29	杂色曲霉素	$Y = (872.510)X + (-2575.89)$	0.9998	1.41	4.28
30	疣孢青霉原	$Y = (3100.80)X + (43091.5)$	0.9996	1.72	5.71
31	青霉震颤素 A	$Y = (2740.95)X + (-16655.5)$	0.9997	0.93	2.80
32	$\beta$ - 玉米赤霉醇	$Y = (1089.69)X + (-4724.66)$	0.9993	2.93	8.88
33	$\beta$ - 玉米赤霉烯醇	$Y = (653.302)X + (-1763.47)$	0.9991	0.54	1.78
34	$\alpha$ - 玉米赤霉醇	$Y = (1665.12)X + (-11366.5)$	0.9988	0.38	1.25
35	玉米赤霉酮	$Y = (968.297)X + (-2311.05)$	0.9996	0.48	1.61
36	$\alpha$ - 玉米赤霉烯醇	$Y = (1174.61)X + (13581.4)$	0.9994	0.42	1.39
37	玉米赤霉烯酮	$Y = (1384.35)X + (-2040.34)$	0.9996	2.95	8.95

### 3.3 精密度实验

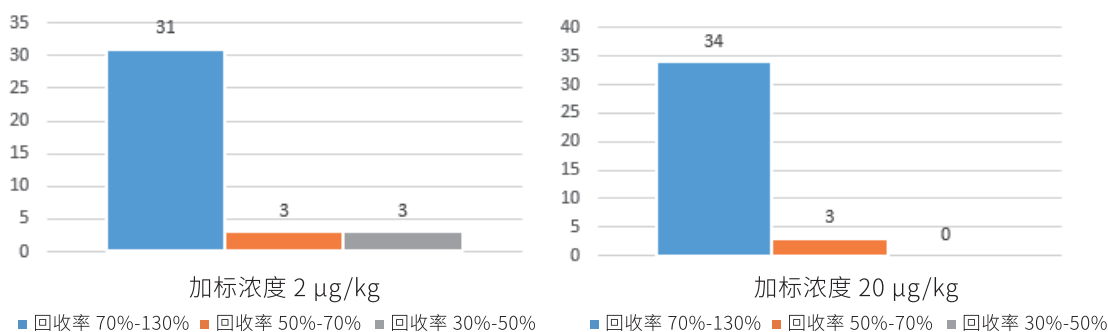
浓度为 0.5、5 和 50  $\mu\text{g/L}$  (以组 A 成分浓度计) 的基质标准工作液连续测定 6 次, 考察仪器的精密度。不同浓度样品中待测物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.01%~0.86% 和 0.69%~14.97% 之间, 仪器精密度良好。

表 4 基质中各化合物分析重复性结果

编号	化合物	RSD% (0.5 µg/L)		RSD% (5 µg/L)		RSD% (50 µg/L)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	展青霉素	0.86	7.22	0.32	1.75	0.28	3.91
2	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.12	2.36	0.06	1.08	0.05	0.97
3	麦角醇	0.07	2.64	0.04	1.14	0.05	0.87
4	青霉酸	0.05	2.12	0.04	1.35	0.04	0.81
5	镰刀菌烯醇-X	0.06	7.58	0.05	2.72	0.03	0.88
6	新茄病镰刀菌烯醇	0.03	2.79	0.04	3.77	0.04	0.97
7	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.03	3.32	0.04	3.77	0.03	0.82
8	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.04	5.95	0.04	1.43	0.03	1.43
9	AFT-G2	0.05	14.31	0.03	4.12	0.03	2.89
10	AFT-G1	0.06	4.78	0.03	3.73	0.03	1.50
11	AFT-B2	0.07	8.85	0.03	4.52	0.03	3.10
12	麦角柯宁碱	0.02	7.30	0.02	2.04	0.03	1.75
13	胶霉毒素	0.03	8.01	0.02	3.97	0.03	2.17
14	AFT-B1	0.06	8.78	0.02	4.79	0.03	1.28
15	蛇形毒素	0.04	5.25	0.03	2.07	0.03	2.17
16	T-2 三醇	0.03	4.10	0.03	1.80	0.03	2.50
17	渥曼青霉素	0.07	14.97	0.03	7.97	0.02	5.14
18	娄地青霉素 C	0.03	3.98	0.03	1.24	0.03	1.38
19	HT-2 毒素	0.05	14.47	0.02	3.90	0.02	3.13
20	伏马毒素 B1	0.01	5.05	0.03	3.76	0.03	3.21
21	腾毒素	0.03	2.66	0.03	2.43	0.02	1.93
22	赭曲霉毒素 B	0.03	2.44	0.03	2.23	0.02	1.56
23	霉酚酸	0.02	3.92	0.02	2.21	0.02	1.77
24	T-2 毒素	0.02	5.64	0.02	2.76	0.02	3.65
25	伏马毒素 B3	0.05	5.55	0.02	2.57	0.02	2.87
26	伏马毒素 B2	0.04	5.29	0.03	2.43	0.02	2.28
27	赭曲霉毒素 A	0.04	3.81	0.02	1.51	0.02	0.80
28	黄绿青霉素	0.05	9.32	0.03	3.59	0.02	1.43
29	杂色曲霉素	0.07	5.37	0.02	4.16	0.02	2.24
30	疣孢青霉原	0.04	2.42	0.03	1.47	0.03	1.68
31	青霉震颤素 A	0.03	3.02	0.02	0.75	0.02	0.69
32	β-玉米赤霉醇	0.04	13.44	0.02	4.82	0.02	3.51
33	β-玉米赤霉烯醇	0.06	14.38	0.02	4.89	0.02	2.69
34	α-玉米赤霉醇	0.03	13.72	0.03	4.36	0.02	3.51
35	玉米赤霉酮	0.06	8.16	0.02	4.53	0.02	1.99
36	α-玉米赤霉烯醇	0.03	8.79	0.02	4.30	0.02	1.56
37	玉米赤霉烯酮	0.04	8.00	0.03	3.15	0.02	1.80

### 3.4 回收率实验

取空白样品，加入混合标准溶液，使得加标浓度分别为 2 和 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （以组 A 成分浓度计）按 2.1 提取和净化方法后，测定待测物的加标回收率。在这两个加标浓度下，加标回收率结果见图 3，可见即便在标准要求的检测限加标浓度下，83% 以上的化合物回收率在 70%~130% 之间。



## ■ 结论

本文根据 NY/T3803-2020《饲料中 37 种霉菌毒素的测定 液相色谱串联质谱法》，建立了使用岛津超高效液相色谱 LC-40 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用测定饲料中 37 种霉菌毒素的检测方法。该方法可在 16 min 内完成对待测物的检测，37 种霉菌毒素分为三组，分别在 0.5~50  $\text{ng}/\text{mL}$ 、5~500  $\text{ng}/\text{mL}$  和 10~1000  $\text{ng}/\text{mL}$  的浓度范围内线性良好，相关系数  $r$  在 0.998 以上。且精密度和回收率实验结果良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于饲料中多种霉菌毒素的定量检测。

岛津应用云

