

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1970—2010

饲料中伏马毒素的测定

Determination of fumonisins in feeds

2010-12-23 发布

2011-02-01 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。

本标准包括两个方法：液相色谱串联质谱法和液相色谱法，其中，液相色谱串联质谱法为仲裁法。

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：农业部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)。

本标准主要起草人：吴银良、皇甫伟国、杨挺、孙亚米、王立君、赵健、朱勇、陈国、吕燕。

饲料中伏马毒素的测定

1 范围

本标准规定了饲料中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 含量的液相色谱串联质谱测定方法和液相色谱测定方法。

本标准适用于植物源性饲料原料、精料补充料、配合饲料和浓缩饲料中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 含量的测定。

本标准的方法检出限和定量限：液相色谱串联质谱法的检出限为 0.01 mg/kg，定量限为 0.05 mg/kg；液相色谱法的检出限为 0.01 mg/kg，定量限为 0.05 mg/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 试样制备

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品，按 GB/T 20195 用四分法缩减至 500 g，粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛，混匀后装入密闭容器。

4 液相色谱串联质谱法(仲裁法)

4.1 原理

试样中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 用甲醇溶液提取，提取液经强阴离子固相萃取小柱净化后，用液相色谱—串联质谱仪测定，采用色谱保留时间和质谱碎片离子丰度比定性，基质校准外标法定量。

4.2 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.2.1 甲醇：色谱纯。

4.2.2 甲酸：色谱纯。

4.2.3 乙酸：优级纯。

4.2.4 氢氧化钠溶液(0.2 mol/L)：准确称取 4 g 氢氧化钠于烧杯中，加适量水溶解后，移入 0.5 L 容量瓶中，加水定容至刻度。

4.2.5 盐酸溶液(0.2 mol/L)：准确移取 18 mL 盐酸于 1 L 容量瓶中，加水定容至刻度，混匀后备用。

4.2.6 乙酸甲醇(1%)：准确移取 10 mL 乙酸于 1 L 容量瓶中，加甲醇定容至刻度，混匀后备用。

4.2.7 甲酸甲醇溶液(0.1%)：准确移取 1 mL 甲酸于 1 L 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，混匀后备用。

4.2.8 甲酸溶液(0.1%)：准确移取 1 mL 甲酸于 1 L 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀后备用。

4.2.9 甲醇溶液(75%)：取甲醇 750 mL 加水 250 mL，混匀后备用。

4.2.10 伏马毒素 B₁，纯度≥95.0%。

4.2.11 伏马毒素 B₂，纯度≥97.0%。

4.2.12 伏马毒素标准储备液:分别准确称取适量伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 标准品,用甲醇溶液(4.2.9)溶解并定容至 10 mL,配制成 200 mg/L 的标准储备液,−18℃冰箱中保存,有效期 6 个月。

4.2.13 混合标准储备液:取伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 标准储备液(4.2.12)以 1:1 比例混合,得混合标准储备液,浓度为 100 mg/L,−18℃冰箱中保存,有效期 6 个月。

4.2.14 混合标准中间液:准确移取 10 mL 混合标准储备液(4.2.13)于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶液(4.2.9)定容至刻度,浓度为 10 mg/L,−18℃冰箱中保存,有效期 3 个月。

4.2.15 强阴离子交换固相萃取柱:500 mg,3 mL。使用前依次用 5 mL 甲醇、5 mL 甲醇溶液(4.2.9)活化。

4.2.16 空白试料:含伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 均小于 0.05 mg/kg 的植物源性饲料原料;含伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 均小于 0.25 mg/kg 的精料补充料、配合饲料和浓缩饲料。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱串联质谱仪:配电喷雾离子源。

4.3.2 离心机:最大转速 5 000 r/min 或以上。

4.3.3 分析天平:感量 0.01 mg。

4.3.4 天平:感量 0.01 g。

4.3.5 超声波清洗器。

4.3.6 氮吹仪。

4.3.7 固相萃取装置。

4.3.8 涡旋混合器。

4.3.9 pH 计。

4.3.10 匀质器。

4.4 分析步骤

4.4.1 提取

称取 2 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 甲醇溶液(4.2.9),涡旋 1 min,然后超声提取 5 min,以 5 000 r/min 的速度离心 2 min,移取上清液后同样步骤提取一次,合并上清液。用氢氧化钠溶液(4.2.4)或盐酸溶液(4.2.5)调节 pH 至 5.8~6.5,待净化。

4.4.2 净化

准确移取提取液(4.4.1)2 mL 至固相萃取小柱(4.2.15)中。依次用 3 mL 甲醇溶液(4.2.9)、3 mL 甲醇淋洗小柱,抽至近干后用 10 mL 乙酸甲醇(4.2.6)洗脱。整个固相萃取过程流速控制在 1 mL/min~2 mL/min。洗脱液于 50℃下用氮气吹干,残留物用 1 mL 甲醇溶液(4.2.9)溶解,过 0.22 μm 滤膜后进行液相色谱串联质谱分析。

4.4.3 基质校准标准样品的制备

有空白试料时,分别准确移取伏马毒素混合标准中间液(4.2.14)适量,植物源性饲料原料测定时配制浓度为 0.015 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.20 mg/L、0.50 mg/L 和 2.0 mg/L,其他饲料测定时配制浓度为 0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L 和 10.0 mg/L 的系列标准溶液;取空白试料,按 4.4.1~4.4.2 步骤处理,在洗脱液中分别加入各浓度标准溶液 1.0 mL,氮气吹干后用甲醇溶液(4.2.9)溶解上机测定,以定量离子对峰面积为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制基质校准标准曲线。无法获得空白试料时,直接用测定样品经 4.4.1~4.4.2 步骤处理后洗脱液中加入 1.0 mL 5.0 mg/L 的标准溶液作为基质校准标准样品,吹干后用甲醇溶液(4.2.9)溶解上机测定。

4.4.4 测定

4.4.4.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈柱, 150 mm×2.1 mm, 3.5 μm 或相当者。
 b) 流动相: A: 甲酸甲醇溶液(4.2.7); B: 甲酸溶液(4.2.8)。
 c) 梯度洗脱: 洗脱程序见表 1。
 d) 进样量: 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	A	B	曲线
0	0.2	40	60	1
1.5	0.2	40	60	6
5.0	0.2	100	0	6
11.0	0.2	100	0	6
11.5	0.2	40	60	6
16.0	0.2	40	60	6

4.4.4.2 质谱参考条件

- a) 电离方式: 电喷雾正离子方式。
 b) 检测方式: 多反应监测。
 c) 脱溶剂气、锥孔气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体, 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求。
 d) 毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压优化至最佳灵敏度。
 e) 定性离子对、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量参考值见表 2。

表 2 伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 定性、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量参考值

中文名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
伏马毒素 B ₁	9.30	722.4>334.4	722.4>334.4	50	34
		722.4>352.4			34
伏马毒素 B ₂	9.90	706.4>318.4	706.4>336.4	50	34
		706.4>336.4			34

4.4.4.3 定性测定

在相同试验条件下, 样品中待测物质的保留时间与标准溶液中待测物质对应的保留时间偏差在±2.5%之内, 且样品中各组分的两个子离子相对丰度与浓度接近的标准溶液的相对丰度一致, 偏差不超过表 3 规定的范围, 则可判定为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

4.4.4.4 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, 采用基质校准标准溶液校正, 外标法定量。当采用空白试剂作为基质时, 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, 伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 标准溶液的多反应监测色谱图见附录 A。

4.4.5 平行实验

按以上步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

4.4.6 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

4.5 结果计算

试样中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的含量 X_i,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)分别计算:

$$X_i = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

- A——试样溶液中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的峰面积;
- A_s——标准工作液中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的峰面积;
- C_s——标准工作液中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V——定容体积,单位为毫升(mL);
- m——样品的质量,单位为克(g);
- V₁——用于净化的提取液体积,单位为毫升(mL);
- V₂——提取液体积,单位为毫升(mL)。

平行测定结果用算术平均值表示。
计算结果保留三位有效数字。

4.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

5 液相色谱法

5.1 原理

试样中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 用甲醇溶液提取,提取液经强阴离子固相萃取小柱净化后,经衍生化,用反相液相色谱分离、荧光检测器检测、外标法定量。

5.2 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

- 5.2.1 乙腈:色谱纯。
- 5.2.2 巯基乙醇:优级纯。
- 5.2.3 四硼酸钠。
- 5.2.4 磷酸二氢钠。
- 5.2.5 邻苯二甲醛:优级纯。
- 5.2.6 乙腈溶液(50%):取乙腈 250 mL 加水 250 mL,混匀后备用。
- 5.2.7 四硼酸钠溶液(0.1 mol/L):称取 3.8 g 十水合四硼酸钠于 100 mL 容量瓶中,加水溶解后定容。
- 5.2.8 磷酸二氢钠溶液(0.1 mol/L):称取 15.6 g 二水合磷酸二氢钠于 1 L 容量瓶中,加水溶解后定容。
- 5.2.9 衍生剂:称取 40 mg 邻苯二甲醛,溶于 1 mL 甲醇,再用 5 mL 四硼酸钠溶液(5.2.7)稀释,加入 50 μL 巯基乙醇,混匀后备用,4℃下避光可贮存 7 d。
- 5.2.10 流动相:取 770 mL 甲醇加入 230 mL 磷酸二氢钠溶液(5.2.8),混匀后调节 pH 至 3.3。
- 5.2.11 混合标准工作液:取适量混合标准储备液(4.2.13)于 5 mL 容量瓶中,用乙腈溶液(5.2.6)定容,得伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 浓度为 0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、1.0 mg/L 和 5.0 mg/L 的混合标准工作液,4℃下可贮存 7 d。
- 5.2.12 其他同液相色谱串联质谱法中 4.2。

5.3 仪器和设备

5.3.1 液相色谱仪:配荧光检测器。

5.3.2 其他同液相色谱串联质谱法 4.3。

5.4 分析步骤

5.4.1 提取

同 4.4.1。

5.4.2 净化

准确移取 5.4.1 提取液 2 mL 至固相萃取小柱(4.2.15)中。依次用 3 mL 甲醇溶液(4.2.9)、3 mL 甲醇淋洗小柱,抽至近干后用 10 mL 乙酸甲醇(4.2.6)洗脱。整个固相萃取过程流速控制在 1 mL/min~2 mL/min。洗脱液于 50℃下用氮气吹干,残留物用 200 μL 乙腈溶液(5.2.6)溶解。

5.4.3 衍生化

取样品处理液和标准溶液各 100 μL,各加 100 μL 衍生剂(5.2.9),混匀,过 0.45 μm 滤膜,衍生化后 3 min 内进行液相色谱分析。

5.4.4 测定

5.4.4.1 HPLC 参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈柱, 100 mm×2.1 mm, 1.7 μm 或相当者。
- b) 流动相: 见 5.2.10。
- c) 流速: 0.3 mL/min。
- d) 柱温: 30℃。
- e) 进样量: 10 μL。
- f) 激发波长: 335 nm。
- g) 发射波长: 440 nm。

5.4.4.2 标准曲线的绘制

取 5.2.11 中的混合标准工作液按 5.4.3 步骤进行衍生,按浓度由低到高进样检测,以峰面积—浓度作图,得到标准曲线回归方程。在上述色谱条件下,伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的保留时间分别为 3.7 min 和 9.2 min 左右,标准溶液色谱图参见附录 B。

5.4.4.3 定量测定

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 5.4.2 中的最终样品处理溶液,然后重新衍生后测定。

5.4.5 平行实验

按以上步骤,对同一试样进行平行试验测定。

5.4.6 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

5.5 结果计算

试样中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的含量 X_i,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)分别计算:

$$X_i = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (2)$$

- A——试样溶液中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 的峰面积;
- A_s——标准工作液中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 峰面积;
- C_s——标准工作液中伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V——定容体积,0.4 mL;
- m——样品的质量,单位为克(g);

V_1 ——用于净化的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液体积,单位为毫升(mL)。

平行测定结果用算术平均值表示。

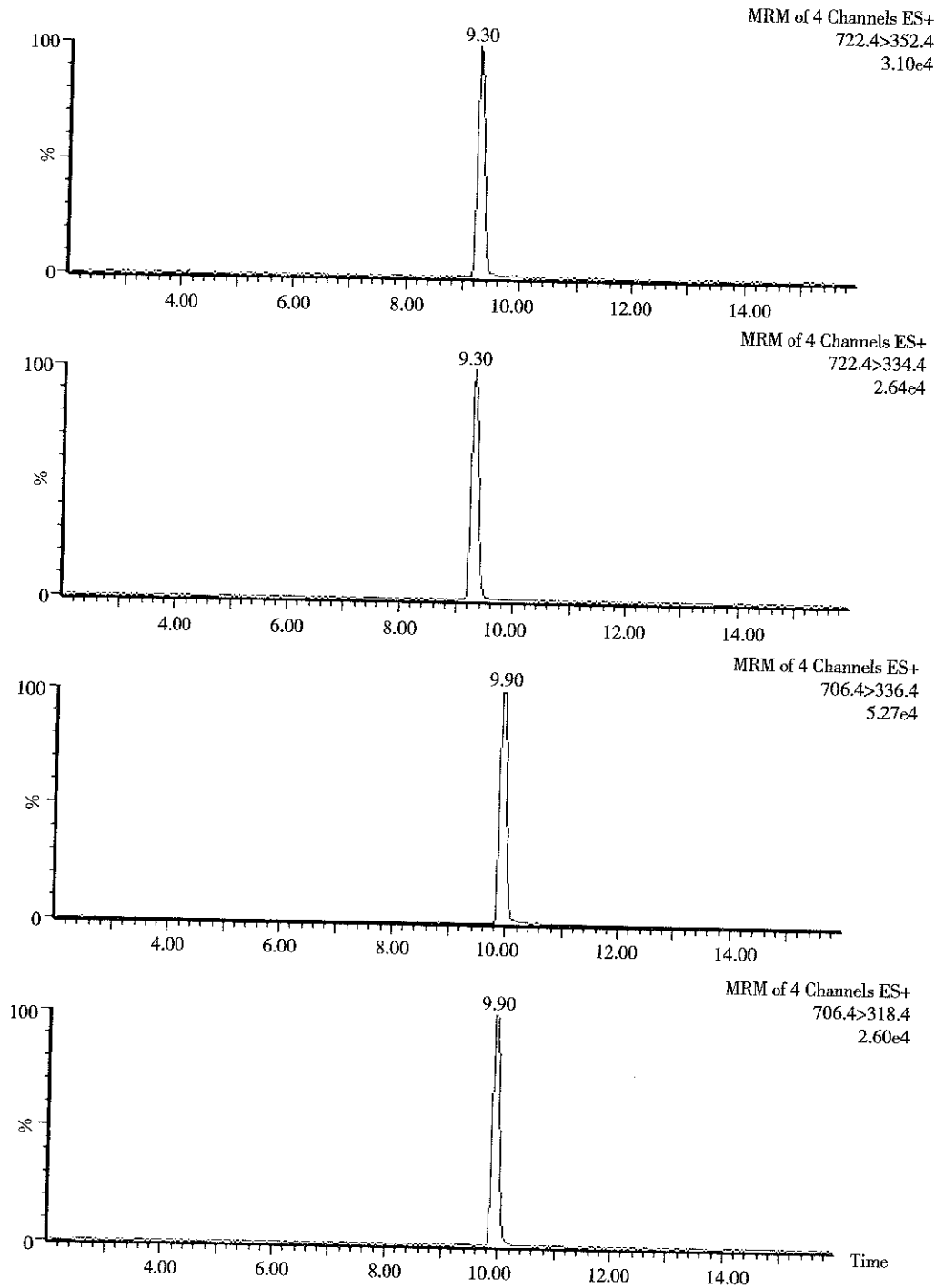
计算结果保留三位有效数字。

5.6 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

附录 A
(资料性附录)

伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 多反应监测(MRM)色谱图

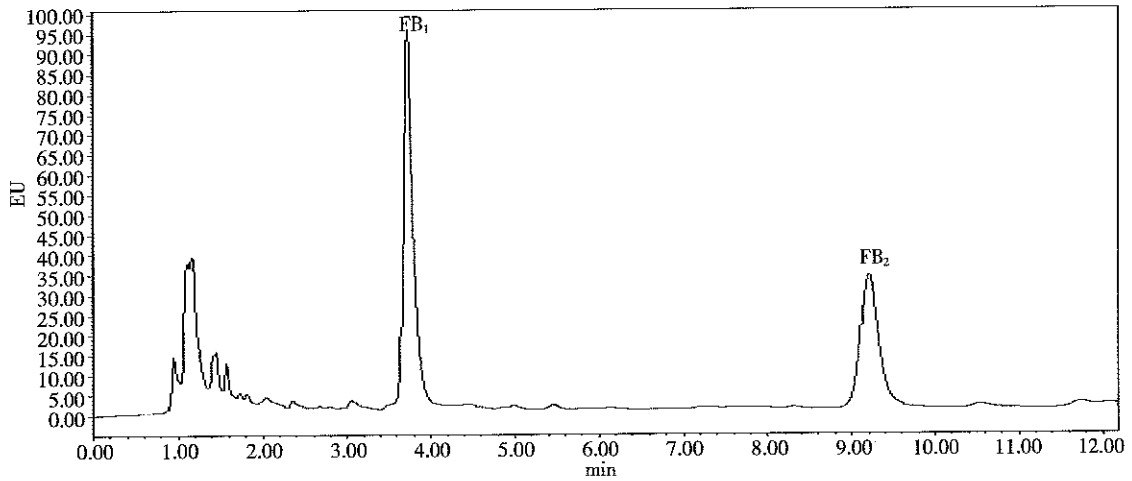


注:图中保留时间(min)9.30和9.90分别为伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂。

图 A.1 伏马毒素标准溶液(0.05 mg/L)MRM 色谱图

附录 B
(资料性附录)

伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂ 液相色谱荧光检测色谱图



注：图中 FB₁ 和 FB₂ 分别为伏马毒素 B₁ 和伏马毒素 B₂。

图 B.1 伏马毒素标准溶液(0.50 mg/L)液相色谱荧光检测色谱图