

ICS 65.120

CCS B 46

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—20××

饲料中 T-2 和 HT-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of T-2 and HT-2 toxins in feeds—
Liquid chromatography - tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

(公开征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：河南省兽药饲料监察所。

本文件主要起草人：吴宁鹏、杨洁、吴志明、张发旺、司慧民、李新、高平、马俊、舒畅、王克然、马锋超、常守海、董俊伟、朱和风。

饲料中T-2和HT-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了饲料中T-2毒素和HT-2毒素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、预混合料、精料补充料、植物性饲料原料和宠物饲料中T-2和HT-2毒素的测定。

本文件T-2和HT-2毒素的检出限为2 μg/kg，定量限为5 μg/kg。

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于本文件；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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中T-2和HT-2毒素经80%乙腈溶液提取，免疫亲和柱净化后，用液相色谱-串联质谱仪检测，基质匹配标准曲线校准，外标法定量。

5 试剂或材料

警告——T-2/HT-2毒素具有细胞毒性，为了安全，试验人员操作时应戴手套口罩等防护工具，在通风橱内操作。凡接触T-2和HT-2毒素的容器，需浸入4%次氯酸钠溶液，过夜后清洗。同时，为了减少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。

除另有规定外，所用试剂均为分析纯。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 甲醇：色谱纯。

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 80%乙腈溶液：取乙腈（5.2）800 mL加水稀释至1 000 mL，混匀。

NY/T ××××—××××

- 5.6 2%甲酸甲醇溶液：取甲酸（5.4）2 mL 加甲醇（5.3）稀释至 100 mL，混匀。
- 5.7 0.1%甲酸溶液：取甲酸（5.4）1 mL 加水稀释至 1 000 mL，混匀。
- 5.8 标准储备液（100 μg/mL）：T-2 和 HT-2 毒素有证标准溶液（T-2 毒素 CAS：21259-20-1，HT-2 毒素 CAS：26934-87-2；），于 0℃~4℃ 保存。
- 5.9 混合标准工作液（1 μg/mL）：分别准确吸取 T-2 和 HT-2 毒素标准储备液（5.8）各 100 μL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用乙腈（5.2）稀释定容，0~4℃ 保存，有效期为一个月。
- 5.10 T-2/HT-2 毒素免疫亲和柱：柱容量 2 000 ng，或性能相当者。
- 5.11 玻璃纤维滤纸：孔径 1.6 μm。
- 5.12 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。
- 5.13 注射器：规格 20 mL。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱—串联质谱仪：配有电喷雾离子源。
- 6.2 分析天平：感量 0.01 g、0.01 mg。
- 6.3 离心机：转速不低于 8 000 r/min。
- 6.4 旋涡振荡器。
- 6.5 涡旋混合器。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 真空泵。

7 样品

按 GB/T 20195 制备样品，至少 200 g，粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，避光保存（需要避光时写明），备用。选取类型相同，均匀一致、且在待测物保留时间处，仪器响应值小于方法定量限 30% 的饲料样品，作为空白样品。

8 试验步骤

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 5 g，精确至 0.01 g，置于 50 mL 离心管中，准确加入 25.0 mL 80% 乙腈溶液（5.5），涡旋混匀，振荡提取 10 min，于 8 000 r/min 离心 5 min。移取上清液 5.0 mL，加入 35.0 mL 水稀释混匀，玻璃纤维滤纸过滤，移取 20.0 mL 滤液，备用。

8.2 净化

将免疫亲和柱连接于 20 mL 注射针管下，移取备用液（8.1）至注射器针筒中。将真空泵与固相萃

取装置连接，调节压力，使溶液以 1~2 滴/秒的速度通过免疫亲和柱，用 20 mL 水淋洗，抽干，用 1.0 mL 2%甲酸甲醇溶液（5.6）洗脱，收集洗脱液，挤干，取全部洗脱液过微孔滤膜，待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白样品，按8.1和8.2处理得到空白基质溶液，分别取混合标准工作液（5.9）适量，以空白基质溶液进行稀释，配制成浓度为1.0 ng/mL、2.5 ng/mL、5.0 ng/mL、10.0 ng/mL、25.0 ng/mL、50.0 ng/mL和100.0 ng/mL基质匹配标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C₁₈柱，柱长100 mm，柱内径2.1 mm，粒度1.7 μm，或性能相当者。

柱温：35℃；

流速：0.3 mL/min；

进样量：5 μL。

流动相：A：甲醇（5.3）；B：0.1%甲酸溶液（5.7），梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	15	85
0.5	15	85
3.0	98	2
3.9	98	2
4.0	15	85
6.0	15	85

8.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

喷雾电压：3.0 kV；

鞘气：15 Arb；

辅助气：0 Arb；

离子迁移管温度：325℃；

雾化温度：300℃；

定性离子对、定量离子对及对应的锥孔电压和碰撞能量见表2。

表2 T-2 和 HT-2 毒素的多反应监测（MRM）离子对、射频电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (<i>m/z</i>)	射频电压 (V)	碰撞能量 (eV)
T-2 毒素	489.3 >245.1 ^a	110	26
	489.3 >327.1		21
HT-2 毒素	447.3 >345.1 ^a	92	18
	447.3 >285.1		20

^a为定量离子。

8.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取基质匹配标准溶液（8.3）和试样溶液（8.2）上机测定，T-2 和 HT-2 毒素标准溶液的定量离子色谱图参见附录 A。

8.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液（8.2）与基质匹配标准系列溶液（8.3）中待测物的保留时间相对偏差应在 ±2.5% 之内。根据表2 选择的定性离子对，比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液（8.3）中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为样品中存在对应的待测物。

表3 T-2/HT-2毒素定性测定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
最大允许偏差/ (%)	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以 T-2 或 HT-2 毒素的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应用 2%甲酸甲醇溶液（5.6）稀释（n 倍）后，重新测定分析。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

9 试验数据处理

试样中T-2和HT-2毒素的含量以质量分数 w_i 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，多点校准按式 (1)计算；单点校准，外标法按公式（2）：

w_i

$\dots\dots\dots (1)$

式中:

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中T-2或HT-2毒素的质量浓度,单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V ——提取液的体积,单位为毫升 (mL);

V_1 ——稀释所用提取液的体积,单位为毫升 (mL);

V_2 ——稀释后溶液的体积,单位为毫升 (mL);

V_3 ——净化时所用的试样稀释液的体积,单位为毫升 (mL);

V_4 ——洗脱液的体积,单位为毫升 (mL);

m ——试样的质量,单位为克 (g);

n ——上机测定的试样溶液超出线性范围后,进一步稀释的倍数。

$$\omega_j = \frac{A \times \rho_s \times V \times V_2 \times V_4}{A_s \times m \times V_1 \times V_3 \times 1000} \times n \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

A ——试样溶液中T-2或HT-2毒素色谱峰面积;

A_s ——标准溶液中T-2或HT-2毒素的峰面积;

ρ_s ——标准溶液中T-2或HT-2毒素的质量浓度,单位为纳克每毫升 (ng/mL);

V ——提取液的体积,单位为毫升 (mL);

V_1 ——稀释所用提取液的体积,单位为毫升 (mL);

V_2 ——稀释后溶液的体积,单位为毫升 (mL);

V_3 ——净化时所用的试样稀释液的体积,单位为毫升 (mL);

V_4 ——洗脱液的体积,单位为毫升 (mL);

m ——试样质量,单位为克 (g);

n ——上机测定的试样溶液超出规定范围后,进一步稀释的倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留3位有效数字。

10 精密度

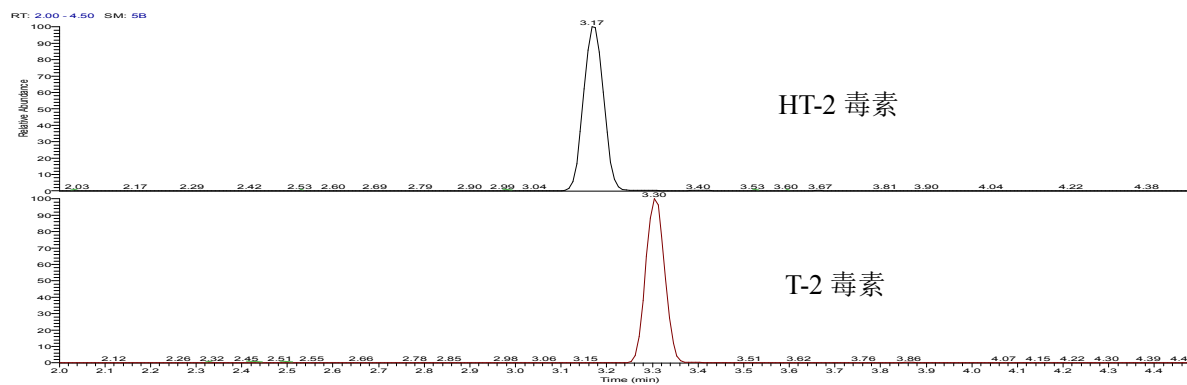
在重复性条件下,两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该平均值的20%。

附录A

(资料性)

T-2和HT-2毒素标准溶液定量离子色谱图

T-2和HT-2毒素标准溶液的定量离子色谱图见图 A.1。



图A.1 T-2和HT-2毒素标准溶液（2.5 ng/mL）定量离子色谱图

中华人民共和国农业行业标准

《饲料中 T-2 和 HT-2 毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

(公开征求意见稿)

起草单位：河南省兽药饲料监察所

2020 年 8 月

一、标准制定背景及任务来源

T-2毒素与HT-2毒素属于一类具有相类似化学结构的真菌次级代谢产物，称为单端孢霉稀族毒素。根据该族毒素C₃和C₁₅之间是否存在大环，以及羟基和乙酰基的数量，被分为A、B、C及D类，T-2毒素是A类单端孢霉稀族毒素中毒性最强且常见的一种真菌毒素，HT-2毒素为T-2

毒素在体内与体外最为主要的代谢产物，两者化学结构及毒性均十分相似。T-2毒素分子式为C₂₄H₃₄O₉，分子量为466.52，具体化学结构见图1。T-2毒素为白色结晶、熔点为151℃~152℃，不易挥发，不溶于水和石油醚，但易溶于甲醇、乙腈、乙酸乙酯及氯仿等溶剂，化学结构十分稳定，对热和紫外线抵抗力很高，普通的饲料加工及一般的高压灭菌均难以将其破坏。HT-2毒素分子式为C₂₂H₃₂O₈，分子量为424.5，其化学结构与理化性质与T-2毒素极为相似，具体化学结构见图1。

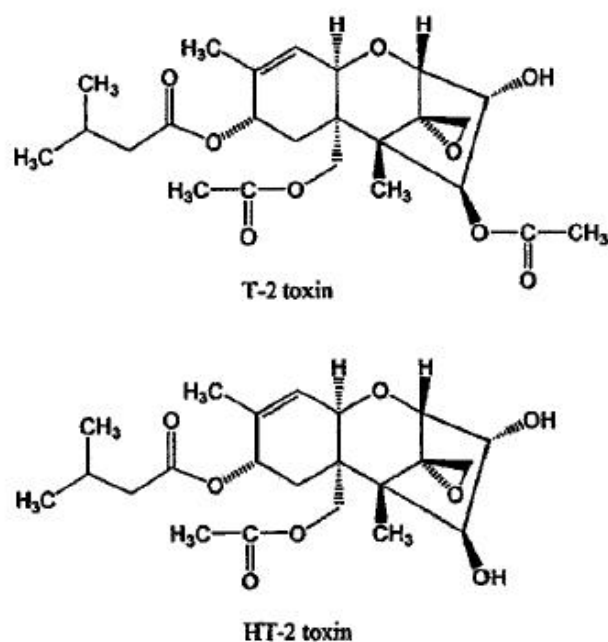


图 1 T-2 毒素和 HT-2 毒素的化学结构

T-2毒素广泛分布于自然界，是常见的污染田间作物和库存谷物的主要毒素，对人、畜危害较大。迄今还没有对T-2毒素中毒的特异性防治办法。目前唯一有效的预防办法是避免接触或减少接触。唯一的治疗是对症和支持疗法。家禽、牛、羊、猪都对T-2毒素敏感，家畜中，猪为最易感动物，反刍动物对T-2毒素的耐受性较强，因为有瘤胃微生物的降解。T-2毒素经口、皮肤、注射等接触方式都可引发造血、淋巴、胃肠组织以及皮肤的损害，并且损害生殖器官的功能，降低抗体、

免疫球蛋白和其他体液因子的水平。严重威胁了畜禽健康，影响我国畜牧业的发展，所以本研究旨在建立一种高效、快速、灵敏的检测方法应用在饲料检测行业中，从而有效监测饲料中T-2和HT-2毒素的污染情况。

T-2和HT-2毒素的常用分析方法包括气相色谱法、气相色谱/质谱法、液相色谱法以及液相色谱/质谱法等。我国目前已发布实施的国家标准(GB/T 28718-2012)《饲料中T-2毒素的测定免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》、农业标准(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》。气相色谱和液相色谱分析方法需要对T-2和HT-2毒素进行衍生化处理，化学衍生过程受人为因素和外界环境因素较多，衍生效果参差不齐，给检测结果造成较大影响，且液相方法的衍生试剂毒性很强。农业标准(NY/T 2071-2011)未包括HT-2毒素的检测。液相色谱-质谱联用灵敏度较高，不需要进行衍生化处理，因而液相色谱-质谱联用是检测T-2和HT-2毒素比较理想的方法。目前报道比较多的方法为单极质谱选择离子技术。然而，对于饲料等复杂基质样品，采用多级串联质谱技术可以更为有效地去除基质的干扰，保证痕量物质分析的准确性。本标准采用免疫亲和固相萃取小柱对饲料样品提取液净化后，以液相色谱-三重四极杆串联质谱对样品中的T-2和HT-2毒素进行分析。所建立的方法灵敏度高、便于操作，可以实现饲料中的T-2和HT-2毒素的快速测定。

因此，本研究采用液相色谱-串联质谱法对饲料中T-2和HT-2毒素进行检测，建立不同种类饲料产品检测方法标准，保障了畜牧养殖业的健康发展并从源头上保证食品安全。

本标准的制定任务来源于农财发[2017]38号文件《农业部关于支付2017年农产品质量安全监管专项经费等项目资金的通知》，项目编号100，任务名称：《饲料中T-2毒素类的测定 液相色谱-质谱/质谱法》。因此我们参考国内相关检测方法基础上结合实验结果起草本标准。

二、主要工作过程

本标准由河南省兽药饲料监察所负责制定工作。技术归口单位是全国饲料工业标准化技术委员会。工作流程：立项—成立工作组—查阅国内外资料—收集样品并进行试验—起草标准文本—标准复核—征求意见—预审—送审—报批。

我单位2017年6月接到标准制定任务后，成立了工作组负责标准的起草工作。在2017年7月至10月期间通过大量查阅国内外有关文献，熟练掌握了T-2和HT-2毒

素的化学结构、理化特性等，于2017年11月至2018年5月参考已有的文献资料，针对饲料中真菌毒素的检测方法、仪器条件、方法线性、灵敏度和精确度等进行探索，并在实验室进行了多次实验，建立了T-2和HT-2毒素在八种基质中的前处理方法，结果发现本方法能很好满足饲料中T-2和HT-2毒素的检测要求，然后在2018年7月到2019年1月批量处理样品并起草标准文本。

2019年2月至4月分别委托四川省饲料工作总站、上海市兽药饲料检测所、浙江省兽药饲料监察所三个单位进行了复核试验，不同实验室间两种药物的平均回收率均在60%~120%范围内，检测结果的相对标准偏差（RSD）均小于20%，线性范围、检出限及定量限也与标准文本一致。2019年4月至5月期间，完成了标准文本并广泛征求了多位专家意见，然后对意见进行汇总处理，进一步对标准文本和编制说明进行了修改。

2019年12月27日，河南省兽药饲料监察所组织专家对该单位负责起草的农业行业标准《饲料中T-2和HT-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿）进行了认真的审查。专家组由李俊玲、常碧影、黄士新、杨秀玉、贺平丽、于家丰、张明森七位专家组成，与会专家认为：标准数据可靠，标准预审稿可行。专家组提出进一步修改意见如下：1.建议标准名称改为《饲料中T-2和HT-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》，并在编制说明中说明理由。2.适用范围中增加“浓缩饲料，精料补充料”，并在编制说明中补充浓缩饲料、精料补充料、水产配合饲料的添加回收试验数据。3.建议增加实际样品测定数据。4.按GB/T1.1和GB/T-20001.4规范标准文本，并进一步补充完善编制说明。

三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》^[1]、GB/T 5009.1-2003《食品卫生检验方法 理化部分 总则》^[2]和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则第4部分：试验方法》^[3]的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

3.1 液相色谱-串联质谱法试验条件的研究

3.1.1 液相色谱实验条件的确定

由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态下电离，因此流动相的种类和比例不仅

影响目标化合物的保留时间和峰形，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度。本实验分别考察了乙腈-水、甲醇-水作为流动相，发现以甲醇-水为流动相时，响应值高，分离效果好，故选择甲醇-水作为流动相。然后，以甲醇-水为流动相连续进样时，发现样品平行性差，故又考察了甲醇-0.1%甲酸水为流动相，结果显示，连续进样时平行性好，峰形尖锐对称，因此最终选择甲醇-0.1%甲酸水作为流动相。最终色谱条件如下：

色谱柱：C₁₈柱，柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm，粒度 1.7 μm，或性能相当者。

柱温：35 °C。

流动相：A 相：甲醇；B 相：0.1%甲酸溶液，梯度洗脱，见表 1。

进样量：5 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.3	15	85
0.5	0.3	15	85
3.0	0.3	98	2
3.9	0.3	98	2
4.0	0.3	15	85
6.0	0.3	15	85

3.1.2 质谱实验条件的确定

NY/T 2071-2011^[5]和 SN/T 3136-2012^[6]中 T-2 和 HT-2 毒素均采用正离子模式，因此本方法选择 ESI+ 进行分析，且获得较高的灵敏度。采用 Waters 公司 TSQ Quantiva 液相色谱-串联质谱仪，在 ESI 正离子模式进行全扫描。经过优化的条件为：

离子源：电喷雾正离子源 (ESI+)；

检测方式：多反应监测 (MRM)；

喷雾电压：3.0 kV；鞘气：15 Arb；

辅助气：0 Arb；

离子迁移管温度：325°C；

雾化温度：300°C；

定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量参考值见表 2。

表 2 T-2 和 HT-2 毒素毒素的定性、定量离子的保留时间、射频电压和碰撞能量

药物名称	保留时间 (min)	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	射频电压 (V)	碰撞能量 (eV)
T-2 毒素	3.85	489.3 >245.1	489.3 >245.1	110.8	26.1
		489.3 >387.1			21.1
HT-2 毒素	3.73	447.3 >345.1	447.3 >345.1	92.0	18.1
		447.3 >285.1			20.1

3.1.3 提取净化条件的选择

从配合饲料及植物性原料样品中提取 T-2 和 HT-2 毒素的最常用溶剂组合是乙腈-水, Ren^[12]等及宫小明^[13]均采用 84%乙腈-水溶液作为提取液, 本试验考察了不同比例乙腈-水提取液(40%、60%、80%、84%、90%和 100%)的提取效果。具体见图 2。结果发现, 随着乙腈-水体积比逐渐增大, T-2 毒素提取回收率逐渐提高, 而 HT-2 毒素提取回收率在 80%乙腈-水达到最高后又下降, 在 90%和 100%乙腈-水时, 回收率甚至低于 10%, 综上当乙腈-水比例为 80%和 84%时, 回收率相当, 且达到最大。因此, 最终选择 80%乙腈-水溶液作为提取液。

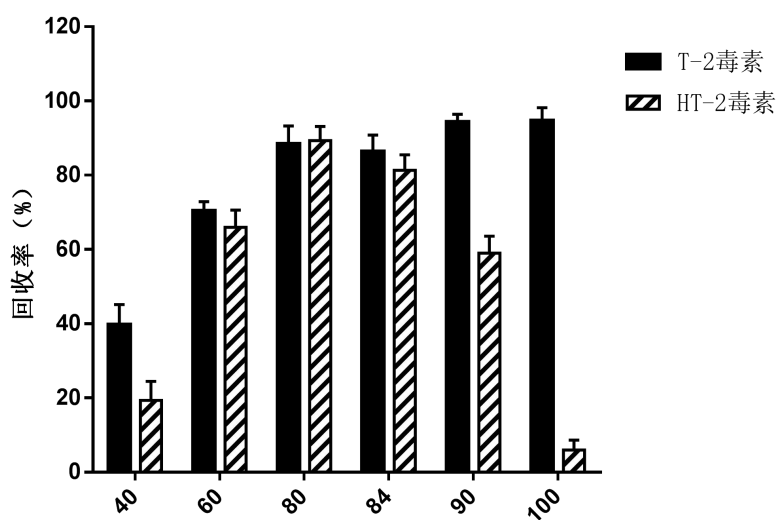


图 2 不同比例乙腈水下 T-2 和 HT-2 毒素的回收率

3.1.4 净化柱和净化方法的确定

由于液相色谱-串联质谱法需对样品提取液进行净化, 因此比较了 PRiME HLB 固相萃取柱和免疫亲和柱。PRiME HLB 是新一代的反相固相萃取吸附剂, 利用了 HLB 的水可浸润性和保留特性, 更简单, 更快速, 更洁净, 可用于酸性, 中性和碱性化合物的通用型吸附剂, 高吸附容量。免疫亲和柱(IAFC)是利用抗原抗体特

异性可逆结合的原理，将抗体与凝胶共价结合，然后填充柱子，当样品提取溶液过免疫亲和柱时，非目标化合物则沿柱流下，最后用洗脱缓冲液洗脱抗原，从而得到纯化的抗原。

PRiME HLB 固相萃取柱是将提取液直接过柱后洗脱上机进行检测，而免疫亲和柱(IAFC)是基于抗原抗体反应，柱子内的抗体有活性的，提取液中的乙腈含量太高会导致抗体失活而失去特异性吸附作用，所以需将提取液用去离子水进行稀释后再过柱，本试验对样品进行 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的加标回收率检验，结果显示，免疫亲和柱的回收率符合要求范围在 60~120%，而使用 PRiME HLB 柱回收率低于 60%，具体见图 3。又根据 GB/T 28718-2012 [3]、SN/T 3136-2012[6]和文献[8-10]，试验也均选择了免疫亲和柱，故最终选择 T-2 和 HT-2 毒素毒素免疫亲和柱进行净化。

图 3 不同固相萃取柱对 T-2 和 HT-2 毒素的回收率

而后又比较了不同浓度的甲酸甲醇溶液（1%、2%和 3%）洗脱液对免疫亲和柱回收率的影响，发现用 2%甲酸甲醇洗脱时样品回收率最高，故最终选择 2%甲酸甲醇为洗脱液。具体见图 4。

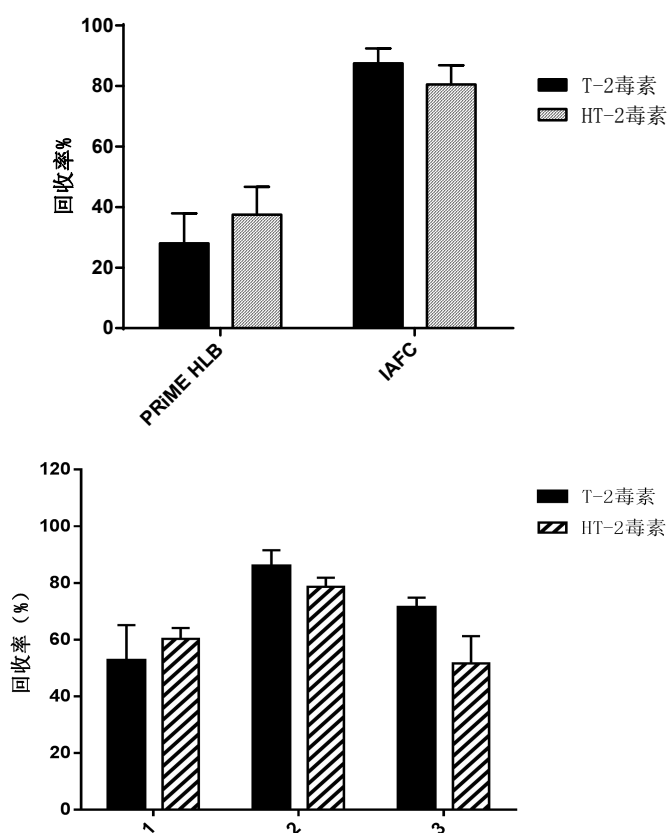


图 4 不同比例（%）甲酸甲醇对 T-2 和 HT-2 毒素的回收率

3.2 稳定性考察

准确吸取T-2和HT-2毒素标准储备液各100 μL 于10 mL棕色容量瓶中，用乙腈稀释定容，配成浓度为1000 ng/mL的标准工作液，0~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下密封保存。分别在配制后7 d、14d、21d、30 d，用乙腈稀释成浓度100 ng/mL的待测液，5个平行，测定其响应值。每次配制新的混合标准工作液，测定其响应值。将放置后样品测定的响应值与新配制的样品测定的响应值相比，考察0~4 $^{\circ}\text{C}$ 的储存条件下储备液的稳定性。混合标准工作液稳定性如图1所示，因此我们将T-2和HT-2毒素药物混合标准工作液（1000 ng/mL）的有效期定为1个月。

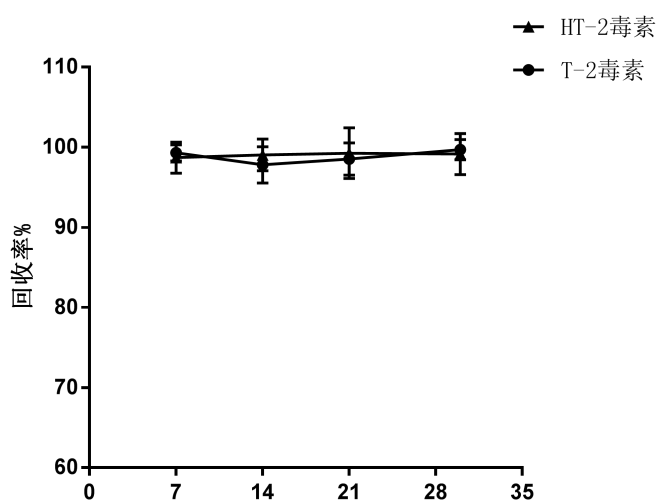


图5 混合标准工作液在0~4 $^{\circ}\text{C}$ 放置30天的稳定性

3.3 方法学考察

3.3.1 基质匹配标准曲线

本标准涉及猪配合饲料、猪浓缩料、鸡配合饲料、鸡浓缩料、鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、猫粮、犬粮、豆粕、DDGS、小麦和玉米十三种基质，在有基质存在的情况下，T-2毒素在猪配合饲料、鸡配合饲料、猫粮、犬粮和小麦基质中表现基质不同程度增强，在猪浓缩料、鸡浓缩料、鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、玉米、豆粕、DDGS基质中表现减弱；HT-2毒素在猪配合饲料、猪浓缩料、鸡浓缩料、鸡配合饲料、猫粮基质中表现增强，在鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、犬粮、豆粕、DDGS、小麦和玉米基质中表现减弱，因此采用基质标曲矫正。取基质空白试样，经处理得到空白基质溶液，取混合标准工作液适量，以空白基质溶液进行稀释，配制成1.0 ng/mL，2.5 ng/mL，5.0 ng/mL，10.0 ng/mL，25.0 ng/mL，50.0 ng/mL和100.0 ng/mL基质匹配标准系

列溶液待测，由低浓度到高浓度供液相色谱-串联质谱仪测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标，基质匹配标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。各种基质匹配标准曲线及相关系数见表3，从表中可以看出 T-2 和 HT-2 毒素在各种基质中线性良好，相关系数均大于等于 0.99。

表3 T-2和HT-2毒素毒素药物基质匹配标准曲线及相关系数

基质	待测物名称	线性方程	相关系数 (R ²)
猪配合饲料	T-2 毒素	Y=154300X+101000	0.9987
	HT-2 毒素	Y=90670X+37220	0.9998
猪浓缩料	T-2 毒素	Y=33290X-1286	0.9999
	HT-2 毒素	Y=29020X+22210	0.9998
鸡配合饲料	T-2 毒素	Y=103200X+70820	0.9990
	HT-2 毒素	Y=61440X-57180	0.9978
鸡浓缩料	T-2 毒素	Y=42324X+41574	0.9991
	HT-2 毒素	Y=13481X+1673	0.9985
鸡预混合料	T-2 毒素	Y=25680X-11070	0.9999
	HT-2 毒素	Y=15790X+14170	0.9998
牛精料补充料	T-2 毒素	Y=28410X-20250	0.9987
	HT-2 毒素	Y=17860X-3169	0.9989
羊精料补充料	T-2 毒素	Y=55840X-34900	0.9982
	HT-2 毒素	Y=25200X-15830	0.9998
豆粕	T-2 毒素	Y=74490X+101200	0.9965
	HT-2 毒素	Y=46140X-102.2	0.9996
DDGS	T-2 毒素	Y=84110X+57300	0.9980
	HT-2 毒素	Y=45890X-16790	0.9998
小麦	T-2 毒素	Y=104900X+60570	0.9991
	HT-2 毒素	Y=55310X+6865	0.9996
玉米	T-2 毒素	Y=74910X+50780	0.9975
	HT-2 毒素	Y=48300X+3623	0.9995
猫粮	T-2 毒素	Y=93400X+56600	0.9996
	HT-2 毒素	Y=62800X-3180	0.9989
犬粮	T-2 毒素	Y=11520X+8120	0.9981
	HT-2 毒素	Y=53100X+6130	0.9993

3.3.2 方法的灵敏度

空白试样按相同的步骤处理后，测定结果表明：在相应的保留时间，空白饲料对所测 T-2 和 HT-2 毒素无干扰。

检出限（LOD）：添加适量混合标准溶液于 5 g 空白饲料中，经提取后测定，依据信噪比 $S/N > 3$ （按 PtP 算），确定 T-2 和 HT-2 毒素类药物在猪配合饲料、猪浓缩料、鸡配合饲料、鸡浓缩料、鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、猫粮、犬粮、豆粕、DDGS、小麦和玉米十三种基质的检出限 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

定量限（LOQ）：添加适量混合标准溶液于 5 g 空白饲料中，经提取后测定，依据信噪比 $S/N > 10$ （按 PtP 算），确定 T-2 和 HT-2 毒素类药物在猪配合饲料、猪浓缩料、鸡配合饲料、鸡浓缩料、鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、猫粮、犬粮、豆粕、DDGS、小麦和玉米十三种基质的定量限 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.3.3 方法的准确度和精密度考察

本方法采用液相色谱法-串联质谱法考察了 T-2 和 HT-2 毒素在猪配合料、猪浓缩料、鸡配合料、鸡浓缩料、鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、猫粮、犬粮、豆粕、DDSS、小麦和玉米中的添加回收情况。根据《饲料卫生标准》^[4]中植物性饲料原料和猪、禽配合饲料中 T-2 毒素限量 0.5 mg/kg ，确定猪配合料、猪浓缩料、鸡配合料、鸡浓缩料、鸡预混合料、牛精料补充料、羊精料补充料、豆粕、DDSS、小麦和玉米的添加浓度，分别为定量限、限量、四倍限量，在空白基质中添加适量混合标准工作液，配制成添加浓度分别为 0.005 mg/kg 、0.5 mg/kg 和 2 mg/kg 三个浓度的阳性添加样品；根据《宠物饲料（宠物食品）卫生标准》中全价宠物食品和补充性宠物食品-猫粮、全价宠物食品和补充性宠物食品-犬粮中 T-2 和 HT-2 毒素限量分别为 0.05 mg/kg 、0.25 mg/kg ，确定猫粮、犬粮的添加浓度，分别为定量限、限量、五倍限量，在空白基质中添加适量混合标准工作液，猫粮配制成添加浓度分别为 0.005 mg/kg 、0.05 mg/kg 和 0.25 mg/kg ，犬粮配制成添加浓度分别为 0.005 mg/kg 、0.25 mg/kg 和 1.25 mg/kg 三个浓度的阳性添加样品；各浓度进行 5 个样品平行试验，重复 3 次，求批内、批间相对标准偏差，计算结果见表 4-表 9。

表 4 猪配合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	92.5	107.9	102.2	103.6	105.1	102.3	5.1	
		II	85.2	92.7	87.6	98.6	105.6	93.9	7.9	7.7
		III	103.5	104.3	98.5	87.6	92.7	97.3	6.6	
	HT-2 毒素	I	101.0	101.0	99.3	103.0	98.4	100.5	1.6	
		II	87.6	110.5	98.6	87.6	94.6	95.8	8.9	9.6
		III	78.9	86.5	87.9	107.3	84.8	89.1	10.8	
0.5	T-2 毒素	I	90.6	101.1	105.4	104.5	105.7	101.5	5.6	
		II	88.5	94.5	98.1	85.8	106.5	94.7	7.7	8.2
		III	104.2	92.3	97.6	84.5	87.6	93.2	7.6	
	HT-2 毒素	I	78.7	90.6	94.6	81.3	96.2	88.3	8.0	
		II	72.3	68.5	89.6	94.6	86.2	82.2	12.3	12.2
		III	94.2	84.9	94.8	68.9	71.2	82.8	13.3	
2	T-2 毒素	I	84.0	92.9	96.2	97.0	103.9	94.8	9.5	
		II	78.5	89.6	94.7	105.8	94.5	92.6	7.8	8.6
		III	98.6	87.6	89.3	104.8	105.6	97.2	7.5	
	HT-2 毒素	I	71.8	76.3	79.6	82.8	85.1	79.1	6.0	
		II	86.5	84.3	74.9	71.3	79.5	79.3	7.1	9.7
		III	74.9	84.9	94.2	98.6	74.6	85.4	11.5	

表 5 猪浓缩饲料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	89.2	84.5	77.4	74.2	77.6	80.6	7.6	
		II	66.2	75.0	89.0	88.4	84.4	80.6	12.2	7.7
		III	74.0	78.9	74.8	83.6	72.7	76.8	5.8	
	HT-2 毒素	I	76.7	82.0	87.3	80.2	80.0	81.3	4.8	
		II	81.6	81.4	82.0	79.2	77.3	80.3	2.5	4.8
		III	81.4	80.3	84.3	82.8	81.8	82.1	1.9	
0.5	T-2 毒素	I	87.4	96.4	87.3	91.9	81.9	89.0	6.1	
		II	97.1	90.7	83.6	95.9	91.0	91.7	5.8	6.0
		III	90.7	93.1	95.8	87.2	85.1	90.4	4.8	
	HT-2 毒素	I	110.6	90.0	102.8	89.0	86.0	95.7	11.0	
		II	106.7	93.1	108.5	94.9	100.5	100.7	6.8	10.8
		III	91.5	90.4	90.1	92.4	109.5	94.8	8.7	
2	T-2 毒素	I	81.3	87.8	96.7	100.9	86.7	90.7	8.8	
		II	91.5	82.0	101.2	98.0	87.0	92.0	8.5	8.8
		III	91.7	82.6	101.9	90.4	76.0	88.5	11.1	
	HT-2 毒素	I	89.2	86.6	88.9	98.1	89.4	90.4	4.9	
		II	88.5	86.9	95.1	94.7	91.7	91.4	4.0	4.8
		III	94.3	90.6	88.6	92.7	94.5	92.1	2.7	

表 6 鸡配合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	108.0	114.3	91.2	105.2	107.3	105.2	7.3	15.8
		II	75.1	81.9	107.2	76.5	92.1	86.6	13.8	
		III	75.3	85.3	97.6	74.6	76.3	81.8	10.7	
	HT-2 毒素	I	104.2	95.2	86.9	95.3	94.5	95.2	5.8	12.7
		II	86.7	87.5	81.6	76.9	87.7	84.1	5.0	
		III	78.6	68.9	74.3	69.5	71.5	72.6	4.9	
0.5	T-2 毒素	I	89.5	91.5	104.0	100.6	118.5	100.8	11.5	11.8
		II	84.3	85.3	86.9	101.4	79.3	87.4	8.5	
		III	79.3	84.3	97.6	84.6	98.6	88.9	8.7	
	HT-2 毒素	I	101.5	100.3	108.5	110.9	103.7	105.0	3.9	12.5
		II	109.6	97.6	94.5	86.3	78.5	93.3	11.3	
		III	78.6	74.3	98.6	87.6	87.6	85.3	9.9	
2	T-2 毒素	I	85.6	74.7	81.0	82.7	67.2	78.2	8.4	11.4
		II	76.8	84.9	94.6	101.3	89.3	89.4	9.3	
		III	86.4	74.3	89.6	71.2	94.3	83.2	10.7	
	HT-2 毒素	I	77.0	81.5	83.3	78.9	82.0	80.5	2.8	8.4
		II	76.3	98.6	92.5	97.3	89.6	90.9	8.8	
		III	87.6	84.3	79.3	84.9	94.3	86.1	5.7	

表 7 鸡浓缩饲料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	95.2	89.0	87.9	90.0	83.9	89.2	4.6	4.8
		II	84.0	75.0	88.9	87.4	88.2	84.7	6.8	
		III	72.6	80.7	80.8	89.5	89.8	82.7	8.7	
	HT-2 毒素	I	73.1	80.2	87.6	79.9	81.3	80.4	6.4	6.1
		II	81.8	80.4	89.4	80.0	81.6	82.6	4.7	
		III	99.3	80.8	88.9	79.1	89.9	87.6	9.3	
0.5	T-2 毒素	I	85.0	91.7	86.0	81.6	85.7	86.0	4.2	4.2
		II	88.3	94.5	80.4	85.9	76.4	85.1	8.2	
		III	88.1	91.3	95.0	83.6	85.1	88.6	5.2	
	HT-2 毒素	I	93.1	87.7	99.5	83.0	99.8	92.6	7.9	8.1
		II	88.1	93.5	76.4	92.3	100.9	90.2	10.0	
		III	99.2	92.3	77.5	87.6	87.7	88.9	8.9	
2	T-2 毒素	I	80.4	97.6	92.3	97.6	87.0	91.0	8.1	8.3
		II	88.5	79.7	87.1	97.1	81.0	86.7	8.0	
		III	90.2	80.9	93.4	96.2	85.9	89.3	6.8	
	HT-2 毒素	I	97.5	89.5	88.2	97.6	76.8	89.9	9.5	9.4
		II	87.1	88.5	97.7	81.4	91.2	89.2	6.7	
		III	100.4	87.6	92.0	93.5	96.4	94.0	5.1	

表 8 鸡预混合饲料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	85.9	93.0	79.6	72.3	80.0	82.2	9.4	9.5
		II	95.0	68.2	90.1	77.3	84.1	82.9	12.7	
		III	77.0	76.0	79.5	87.5	77.0	79.4	5.9	
	HT-2 毒素	I	81.5	79.9	81.4	80.1	82.4	81.1	1.3	1.3
		II	80.0	81.3	89.7	80.1	73.2	80.9	7.2	
		III	88.6	78.2	85.4	82.6	81.2	83.2	4.8	
0.5	T-2 毒素	I	97.3	92.7	91.8	81.4	82.5	89.1	7.7	7.9
		II	84.8	85.3	94.5	86.9	83.1	86.9	5.1	
		III	90.7	85.0	90.8	85.7	80.0	86.4	5.2	
	HT-2 毒素	I	111.8	95.9	86.7	86.1	99.6	96.0	11.0	11.1
		II	86.8	90.5	87.2	92.8	105.6	92.6	8.3	
		III	102.9	91.6	101.4	86.9	95.8	95.7	7.0	
2	T-2 毒素	I	85.5	89.8	99.5	99.4	87.7	92.4	7.2	7.3
		II	98.6	83.7	97.1	96.3	85.2	92.2	7.8	
		III	89.6	84.6	99.1	96.1	81.5	90.2	8.2	
	HT-2 毒素	I	98.8	90.7	87.2	98.3	86.2	92.3	6.5	6.4
		II	95.5	92.2	96.2	87.1	101.6	94.5	5.7	
		III	90.8	94.5	97.9	97.6	97.4	95.7	3.2	

表 9 牛精料补充料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	92.1	87.0	100.1	83.8	84.1	89.4	7.6	10.1
		II	89.2	85.3	80.2	84.7	84.5	84.8	3.8	
		III	107.8	100.9	107.1	81.3	91.0	97.6	11.6	
	HT-2 毒素	I	95.5	98.1	100.2	91.2	75.2	92.0	10.9	9.1
		II	86.3	96.1	86.7	99.6	96.8	93.1	6.6	
		III	76.7	83.1	100.0	91.9	99.1	90.2	11.2	
0.5	T-2 毒素	I	91.4	96.9	89.2	95.0	102.8	95.1	5.5	5.5
		II	99.6	102.2	97.1	98.6	93.8	98.2	3.2	
		III	83.7	90.7	96.5	96.6	89.5	91.4	5.9	
	HT-2 毒素	I	95.9	98.6	98.8	95.7	101.6	98.1	2.5	4.6
		II	90.3	94.6	92.6	91.4	89.1	91.6	2.3	
		III	90.6	90.0	87.2	97.1	89.4	90.8	4.1	
2	T-2 毒素	I	98.6	87.2	101.3	95.8	101.7	96.9	6.1	5.6
		II	87.2	91.9	92.2	100.6	90.5	92.5	5.4	
		III	86.9	89.8	91.8	97.6	90.6	91.3	4.3	
	HT-2 毒素	I	95.9	98.5	92.5	91.4	93.8	94.4	3.0	3.9
		II	97.0	96.0	88.2	90.5	101.1	94.6	5.5	
		III	98.8	97.8	97.5	90.7	94.7	95.9	3.4	

表 10 羊精料补充料添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	94.7	79.1	88.4	79.7	83.1	85.0	7.7	9.5
		II	79.3	83.3	88.8	105.2	101.4	91.6	12.3	
		III	79.9	94.1	80.6	92.6	92.0	87.9	8.0	
	HT-2 毒素	I	82.9	79.2	87.9	81.0	88.6	83.9	5.0	8.5
		II	97.6	93.1	76.1	83.2	79.7	85.9	10.6	
		III	73.6	87.0	80.0	91.2	96.4	85.6	10.5	
0.5	T-2 毒素	I	101.0	84.4	90.6	90.7	89.8	91.3	6.6	6.3
		II	97.7	83.3	94.1	97.2	88.1	92.1	6.8	
		III	99.0	99.3	91.1	92.1	101.9	96.7	4.9	
	HT-2 毒素	I	97.2	101.0	88.9	101.4	100.2	97.7	5.3	5.9
		II	95.5	92.1	89.0	87.4	86.5	90.1	4.1	
		III	101.3	87.1	92.3	91.4	92.4	92.9	5.6	
2	T-2 毒素	I	94.7	79.1	88.4	79.7	83.1	85.0	7.7	9.5
		II	79.3	83.3	88.8	105.2	101.4	91.6	12.3	
		III	79.9	94.1	80.6	92.6	92.0	87.9	8.0	
	HT-2 毒素	I	82.9	79.2	87.9	81.0	88.6	83.9	5.0	8.5
		II	97.6	93.1	76.1	83.2	79.7	85.9	10.6	
		III	73.6	87.0	80.0	91.2	96.4	85.6	10.5	

表 11 豆粕添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	76.3	92.1	103.4	110.1	111.5	98.7	13.3	14.3
		II	84.9	81.3	74.9	98.3	104.6	88.8	12.4	
		III	108.3	89.6	84.3	86.2	74.3	88.5	12.6	
	HT-2 毒素	I	118.5	109.2	113.0	116.6	120.8	115.6	4.1	11.6
		II	102.3	98.6	86.9	87.9	94.5	94.0	6.0	
		III	94.5	97.8	91.2	87.4	107.6	95.7	6.9	
0.5	T-2 毒素	I	98.6	82.5	88.8	90.3	103.7	92.8	8.1	8.3
		II	86.9	97.6	84.3	89.6	104.6	92.6	8.1	
		III	87.6	92.6	94.5	87.6	77.8	88.0	6.6	
	HT-2 毒素	I	110.5	107.0	114.2	116.6	118.1	113.3	4.1	9.1
		II	106.8	98.4	94.6	107.3	101.4	101.7	4.9	
		III	94.5	84.6	97.4	104.4	94.5	95.1	6.4	
2	T-2 毒素	I	83.1	85.9	94.2	96.2	92.0	90.3	5.5	9.6
		II	73.8	91.6	105.3	78.9	86.3	87.2	12.5	
		III	94.5	85.6	76.9	81.2	83.2	84.3	6.9	
	HT-2 毒素	I	104.7	102.4	101.4	104.3	105.7	103.7	1.5	7.3
		II	98.6	104.6	81.4	105.6	108.6	99.8	9.7	
		III	91.6	94.6	99.6	107.4	109.5	100.5	7.0	

表 12 DDGS 添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	74.4	87.3	97.2	99.7	103.2	92.3	11.3	10.3
		II	89.3	94.5	97.6	104.5	78.9	93.0	9.2	
		III	78.9	86.9	101.7	85.3	89.5	88.5	8.5	
	HT-2 毒素	I	99.4	86.6	92.8	94.0	98.3	94.2	4.9	7.7
		II	94.5	87.6	92.4	104.5	108.6	97.5	8.0	
		III	87.6	89.6	84.5	97.8	105.3	93.0	8.2	
0.5	T-2 毒素	I	97.6	98.4	109.3	104.9	107.1	103.4	4.5	9.1
		II	104.3	103.8	101.2	89.6	94.3	98.6	5.8	
		III	76.9	84.3	95.6	91.6	95.6	88.8	8.2	
	HT-2 毒素	I	111.0	98.4	104.1	104.9	107.1	105.1	3.9	9.2
		II	103.8	95.1	78.6	104.8	98.1	96.1	9.8	
		III	108.4	98.4	89.4	84.6	94.6	95.1	8.6	
2	T-2 毒素	I	73.1	70.3	74.8	99.0	88.2	81.1	13.4	12.7
		II	86.9	94.5	97.3	101.8	89.6	94.0	5.7	
		III	103.6	94.6	74.3	78.5	84.6	87.1	12.3	
	HT-2 毒素	I	102.3	96.5	100.2	102.0	106.1	101.4	3.1	10.0
		II	104.5	109.4	94.5	86.5	84.3	95.8	10.2	
		III	78.6	108.6	104.4	86.1	106.4	96.8	12.5	

表 13 小麦添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	67.3	71.1	85.0	81.6	80.9	77.2	8.8	11.0
		II	70.8	78.6	87.6	91.5	97.5	85.2	11.1	
		III	70.5	81.5	94.2	84.6	81.2	82.4	9.2	
	HT-2 毒素	I	90.4	77.6	86.7	88.3	91.5	86.9	5.7	9.7
		II	75.6	97.6	71.6	85.3	98.6	85.7	12.9	
		III	84.6	94.5	98.6	78.6	89.3	89.1	7.9	
0.5	T-2 毒素	I	79.6	72.5	78.4	76.6	98.4	81.1	11.0	9.0
		II	72.8	82.6	87.6	81.6	91.5	83.2	7.6	
		III	84.3	94.6	82.3	84.4	78.9	84.9	6.2	
	HT-2 毒素	I	103.5	90.6	95.3	97.2	98.7	97.1	4.3	10.9
		II	97.5	108.3	74.6	86.3	78.3	89.0	14.0	
		III	84.3	94.3	83.4	76.8	91.4	86.0	7.2	
2	T-2 毒素	I	80.7	73.5	78.2	77.2	88.3	79.6	6.2	8.3
		II	77.6	72.6	86.9	84.2	92.3	82.7	8.4	
		III	76.5	89.5	84.3	94.3	78.3	84.6	7.9	
	HT-2 毒素	I	104.4	95.3	101.6	103.0	102.4	101.3	3.1	10.3
		II	71.4	87.6	87.6	94.5	87.3	85.7	8.9	
		III	89.6	104.5	110.8	98.6	94.2	99.5	7.5	

表 14 玉米添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	85.9	88.7	101.0	104.8	103.3	96.7	8.1	7.5
		II	92.5	95.6	104.5	102.3	87.6	96.5	6.4	
		III	105.3	101.8	92.5	87.2	91.5	95.7	7.1	
	HT-2 毒素	I	92.5	83.9	92.1	91.1	92.1	90.4	3.6	9.1
		II	75.9	71.9	104.6	86.9	94.5	86.8	13.8	
		III	87.6	94.6	86.5	94.8	95.3	91.8	4.2	
0.5	T-2 毒素	I	96.4	81.9	93.6	97.3	95.0	92.8	6.0	7.3
		II	87.3	94.5	104.3	87.6	104.5	95.6	7.9	
		III	86.5	83.5	98.6	94.8	94.6	91.6	6.2	
	HT-2 毒素	I	104.4	97.1	106.3	108.2	104.8	104.2	3.6	11.6
		II	84.9	94.5	75.6	101.9	84.6	88.3	10.3	
		III	86.3	91.5	87.6	76.9	104.3	89.3	10.1	
2	T-2 毒素	I	83.5	84.1	88.7	90.6	97.3	88.8	5.6	6.8
		II	84.6	79.8	92.6	97.3	94.8	89.8	7.3	
		III	84.9	97.8	93.5	96.4	97.3	94.0	5.1	
	HT-2 毒素	I	98.7	100.5	104.0	106.0	103.4	102.5	2.6	12.3
		II	73.6	87.6	84.6	81.3	94.5	84.3	8.2	
		III	86.2	97.8	91.2	74.6	75.8	85.1	10.5	

表 15 猫粮添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	89.1	84.0	93.4	95.2	89.3	90.2	4.8	6.5
		II	92.3	91.4	95.9	91.6	88.4	91.9	2.9	
		III	97.7	102.5	106.3	103.2	93.9	100.7	4.8	
	HT-2 毒素	I	89.2	84.6	92.0	80.9	91.6	87.7	5.5	9.3
		II	89.6	84.2	92.4	96.2	79.9	88.4	7.3	
		III	74.5	92.3	75.5	100.7	100.6	88.7	14.7	
0.05	T-2 毒素	I	92.5	103.0	100.3	97.9	98.5	98.4	3.9	6.0
		II	88.1	84.9	92.8	96.9	87.5	90.1	5.3	
		III	96.6	99.7	101.5	95.3	87.3	96.1	5.7	
	HT-2 毒素	I	95.4	96.2	96.9	84.1	83.2	91.2	7.5	5.8
		II	100.9	91.5	89.6	95.6	93.0	94.1	4.6	
		III	101.6	88.4	91.0	93.1	89.8	92.8	5.6	
0.25	T-2 毒素	I	90.3	102.0	101.8	97.5	92.2	96.8	5.6	5.4
		II	86.8	101.9	98.6	97.9	96.9	96.4	5.9	
		III	86.0	98.9	94.4	92.2	97.7	93.8	5.5	
	HT-2 毒素	I	90.4	96.1	91.1	98.3	93.7	93.9	3.5	4.8
		II	101.1	95.0	91.3	83.7	90.6	92.4	6.9	
		III	88.2	96.3	97.2	90.9	97.6	94.0	4.5	

表 16 犬粮添加回收率试验结果

添加浓度 mg/kg	待测 药物	测定 批次	回收率 (%)					平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
			1	2	3	4	5			
0.005	T-2 毒素	I	86.1	76.1	75.8	79.5	79.1	79.3	5.2	6.9
		II	84.5	84.3	76.6	92.4	90.7	85.7	7.3	
		III	86.7	90.8	87.4	78.1	87.9	86.2	5.5	
		I	86.5	90.4	84.1	91.3	92.3	88.9	3.9	
0.25	HT-2 毒素	II	88.5	97.1	102.7	99.8	98.2	97.2	5.5	6.8
		III	101.5	96.1	98.2	83.1	88.9	93.6	7.9	
		I	92.6	88.7	85.4	101.0	88.9	91.3	6.5	
	T-2 毒素	II	86.6	89.9	103.0	85.9	99.9	93.1	8.4	6.6
		III	92.2	96.5	83.3	88.2	90.9	90.2	5.4	
		I	89.7	94.7	102.2	98.1	99.9	96.9	5.0	
1.25	HT-2 毒素	II	87.8	95.4	90.2	92.8	87.6	90.8	3.7	4.9
		III	98.7	90.0	89.1	92.6	94.8	93.0	4.2	
		I	86.3	93.2	94.1	98.2	96.2	93.6	4.8	
	T-2 毒素	II	87.4	92.9	97.7	96.9	90.7	93.1	4.6	4.3
		III	98.6	97.8	98.7	98.7	97.7	98.3	0.5	
		I	93.2	90.4	101.6	86.3	92.3	92.8	6.1	
HT-2 毒素	II	86.3	89.7	92.2	96.1	99.7	92.8	5.7	5.9	
	III	90.8	87.0	101.0	98.3	101.0	95.7	6.7		
	I	93.2	90.4	101.6	86.3	92.3	92.8	6.1		

表 17 实际样品检测结果

序 号	样品类型	检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		序 号	样品类型	检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
		T-2	HT-2			T-2	HT-2
1	5%产蛋鸡期符合预混合料	/	/	10	肉羊精料补充料	/	/
2	5%产蛋后备鸡后期符合预混合饲料	/	/	11	乳猪配合饲料	/	/
3	种鸡产蛋期高峰配合饲料	/	/	12	小麦次粉	/	/
4	肉用仔鸡中期配合饲料	/	/	13	DDGS	/	/
5	生长猪配合饲料	/	/	14	小麦麸	/	1.107
6	生长肥育猪浓缩饲料	/	/	15	豆粕	/	/
7	哺乳母猪配合饲料	/	/	16	喷浆玉米皮	/	/
8	生长肥育猪浓缩饲料	/	/	17	膨化玉米粉	0.587	1.285
9	肉牛精料补充料	/	/				

注：“/”表示未检出

从表 4~表 17 中可以看出，本方法在空白饲料中进行 0.005 mg/kg~2 mg/kg 的添加，平均回收率为 72.6%~115.6%，批内、批间相对标准偏差均小于 15.8%。说明该方法对不同饲料样品中，不同含量的测定均有较好的准确度。各种基质的空白色谱图、空白基质添加色谱图和样品定量限添加色谱图见图 6~图 44，实际样品图见图 45、图 46。

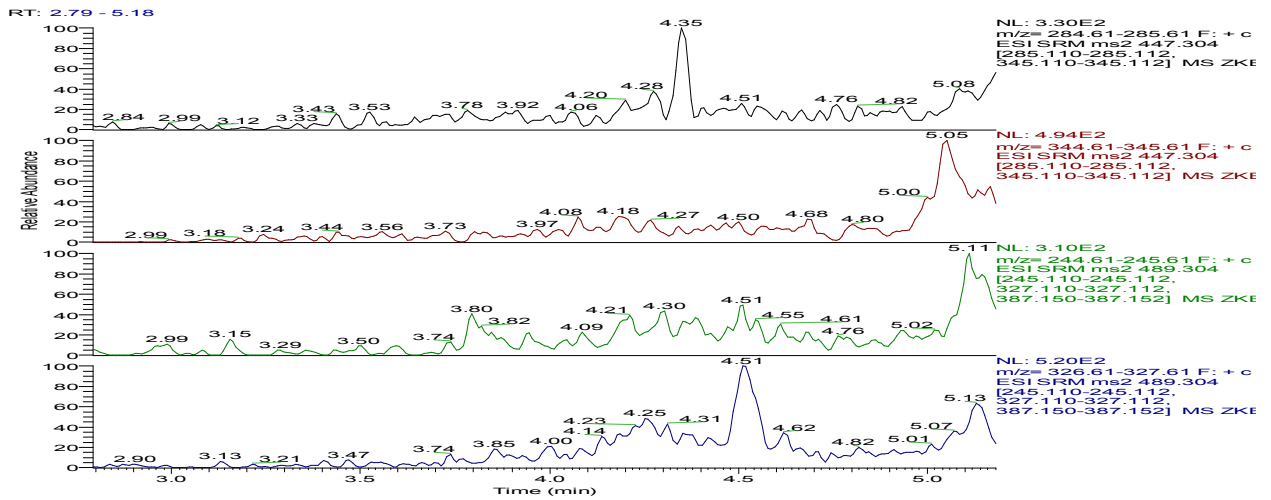


图 6 猪配合饲料基质空白特征离子色谱图

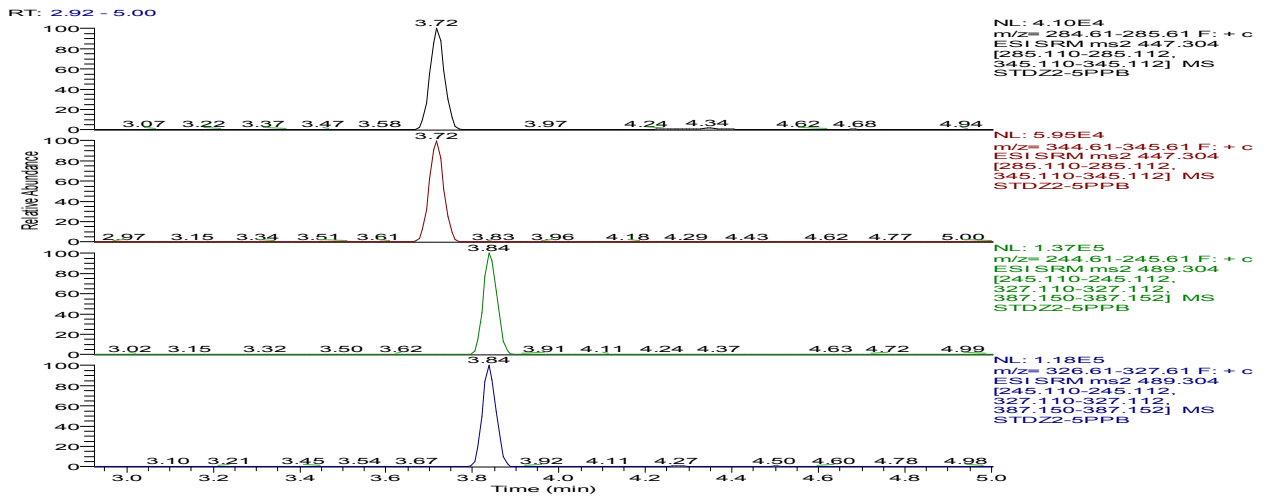


图 7 猪配合饲料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

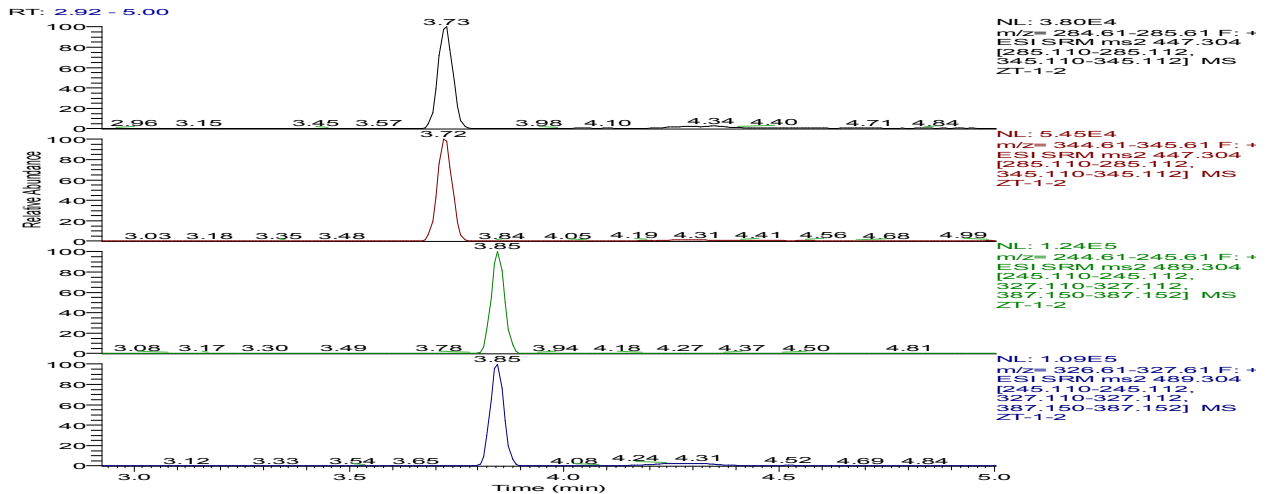


图 8 猪配合饲料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 μg/kg)

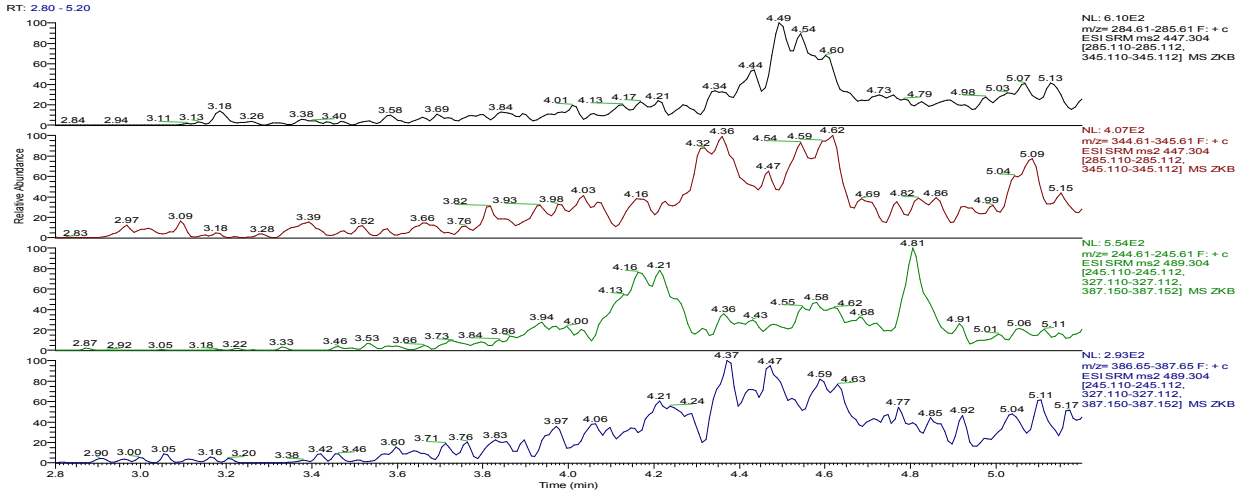


图9 猪浓缩饲料基质空白特征离子色谱图

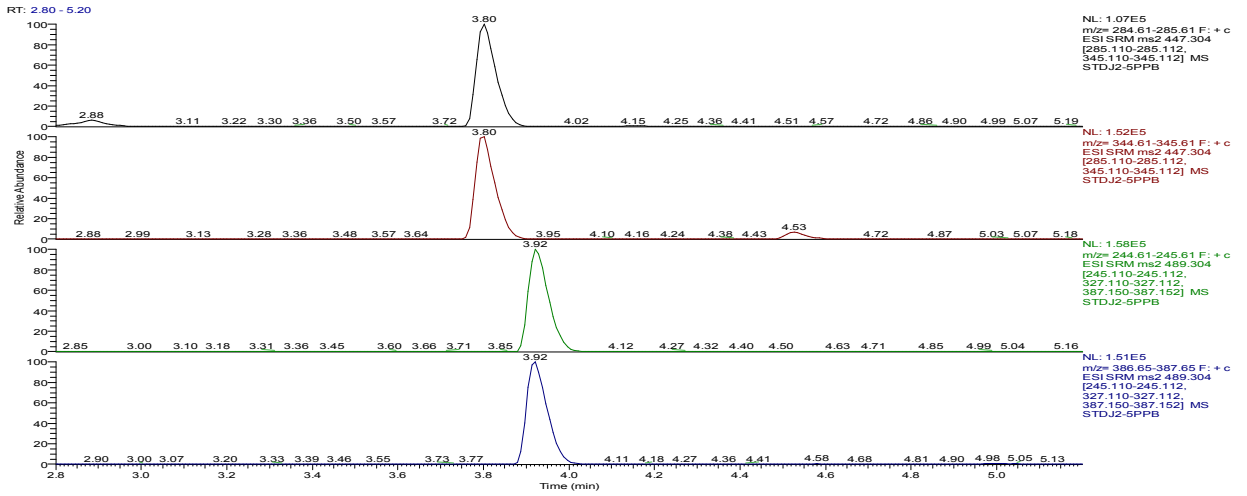


图10 猪浓缩饲料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

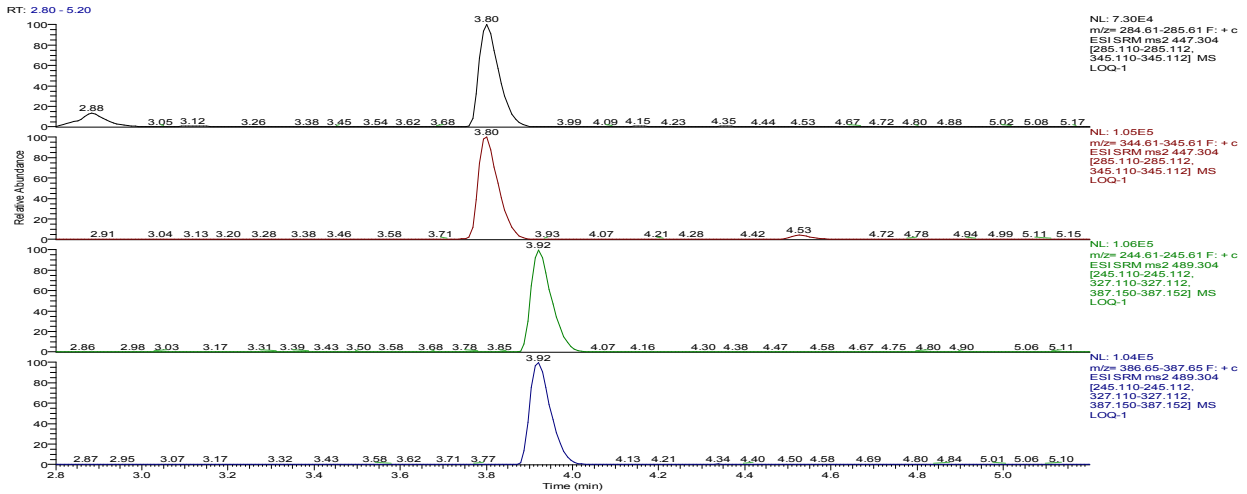


图11 猪浓缩饲料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 μg/kg)

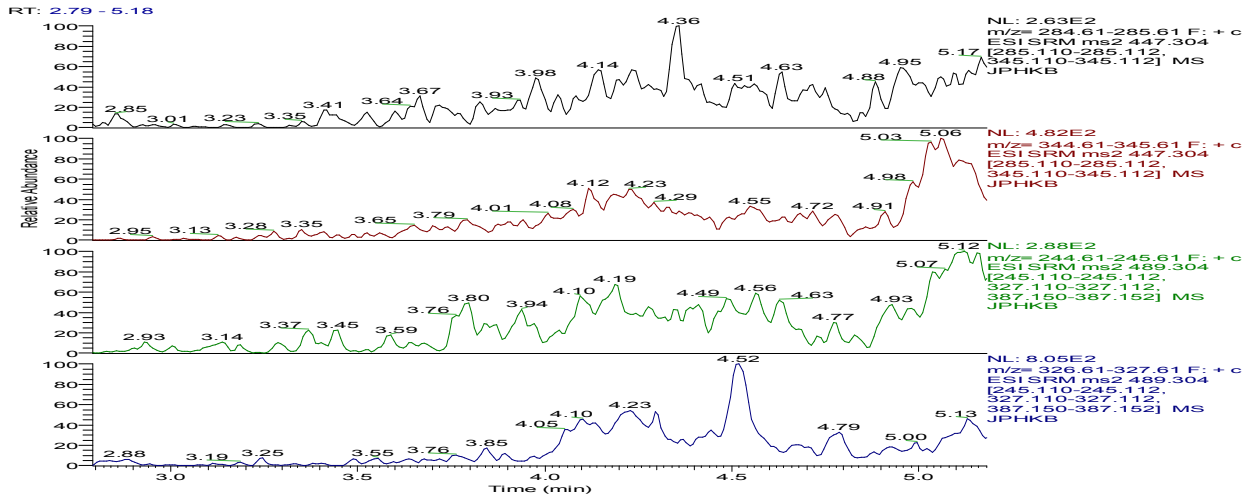


图 12 鸡配合饲料基质空白特征离子色谱图

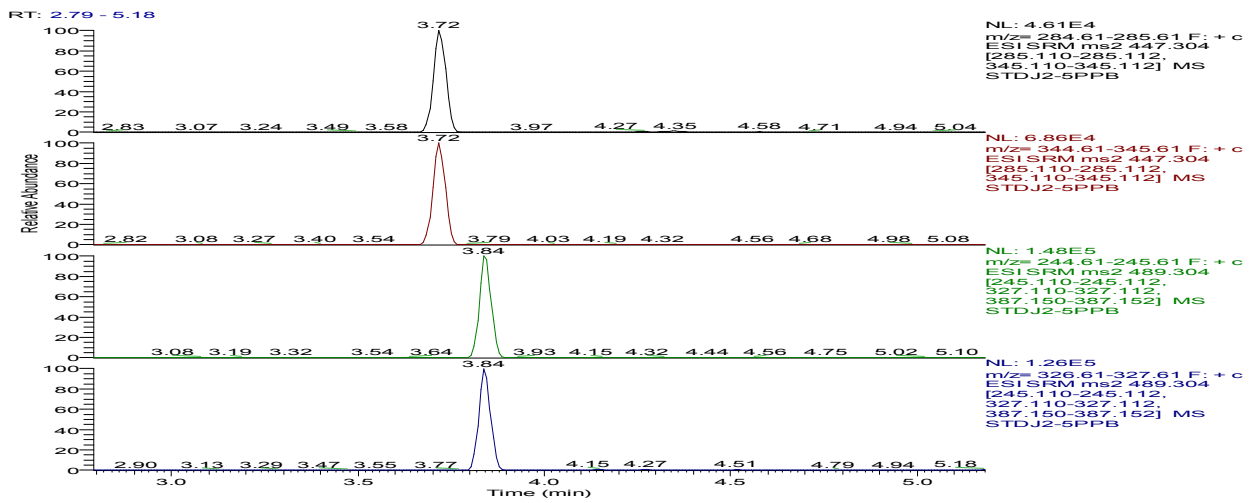


图 13 鸡配合饲料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

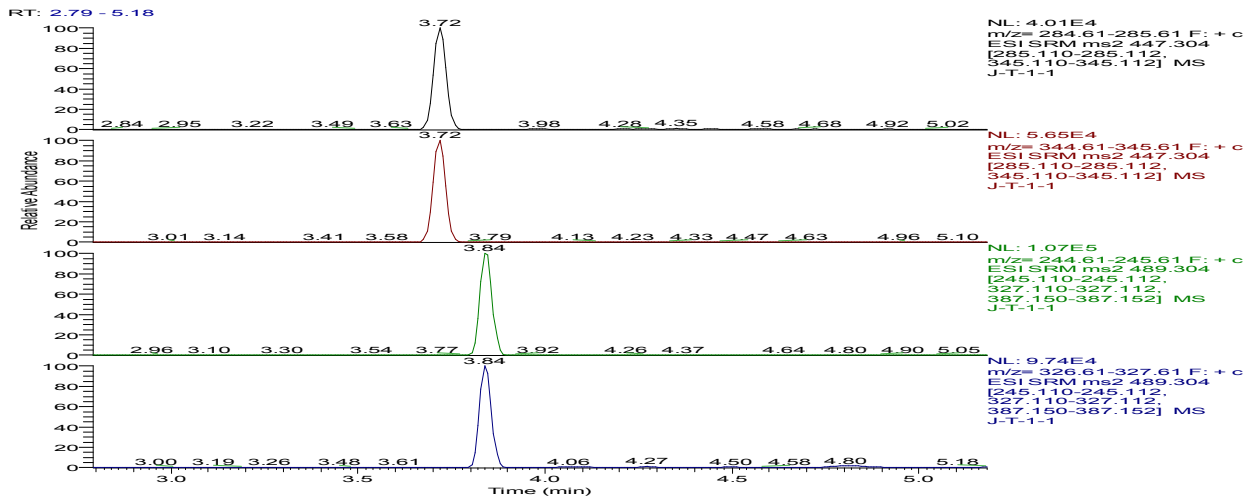


图 14 鸡配合饲料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素药物特征离子色谱图 (5 μg/kg)

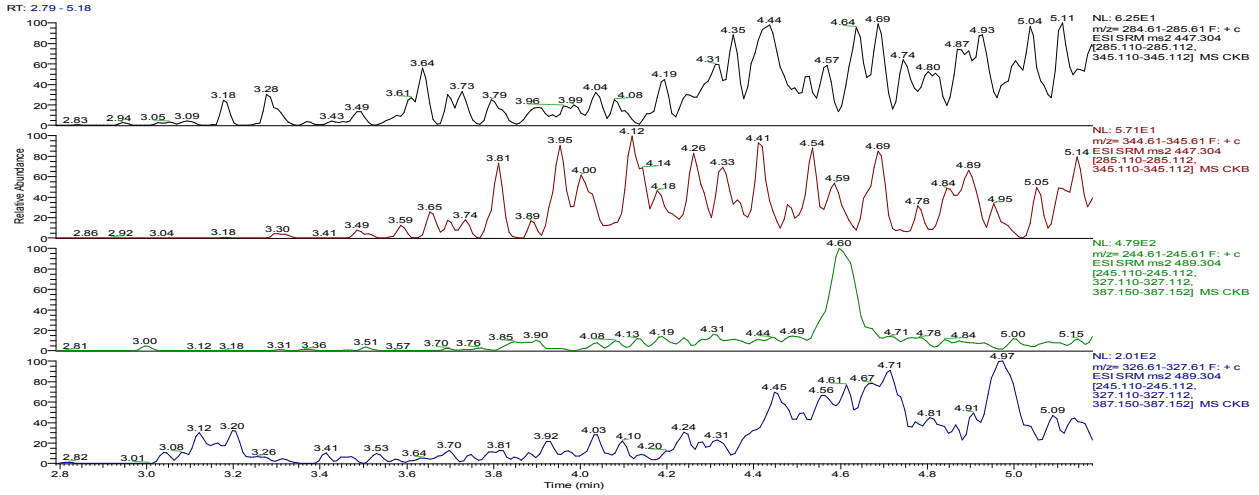


图 15 鸡浓缩饲料基质空白特征离子色谱图

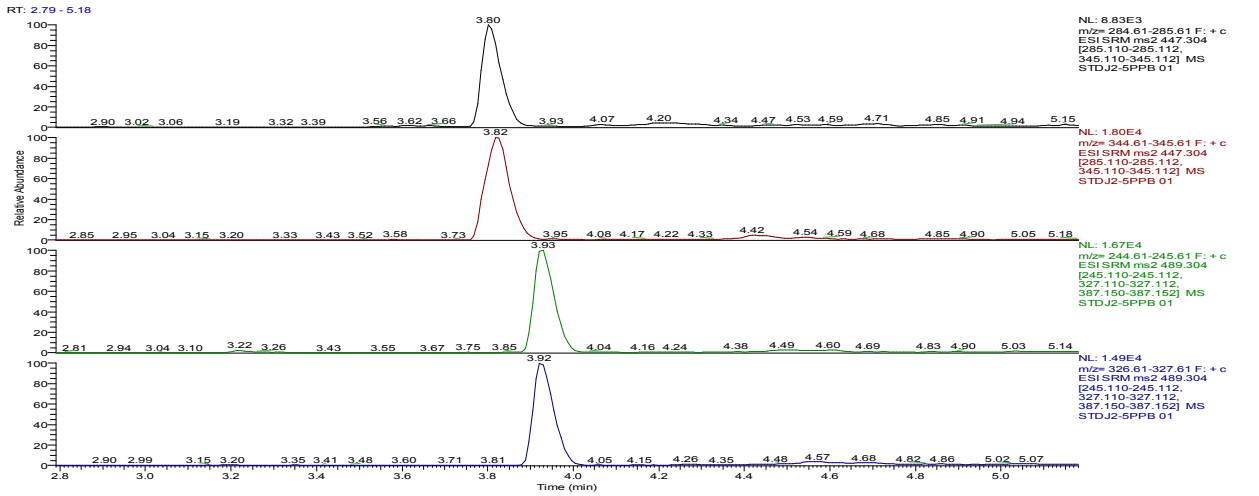


图 16 鸡浓缩饲料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

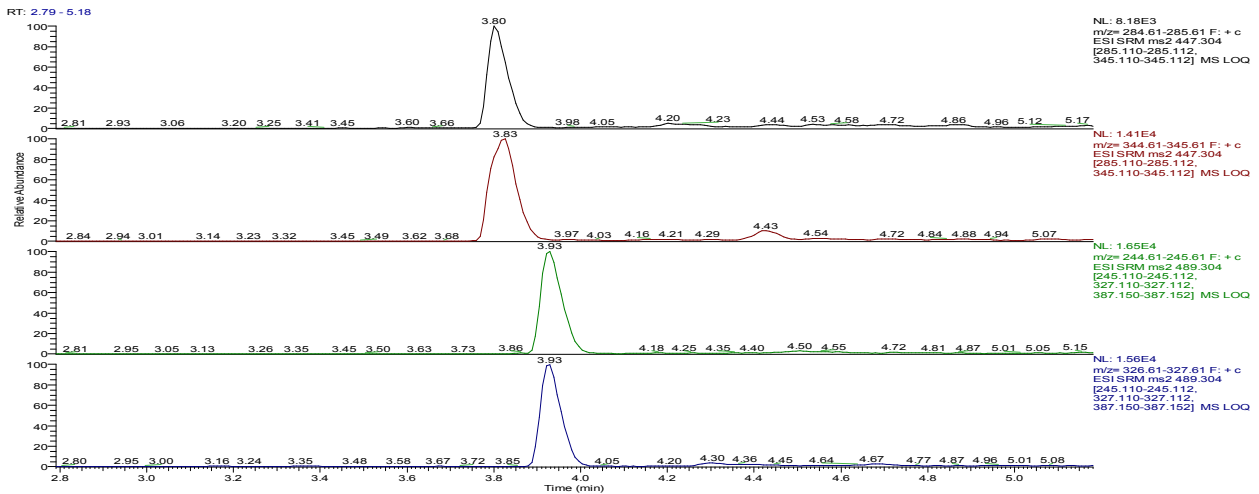


图 17 鸡浓缩饲料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素药物特征离子色谱图 (5 µg/kg)

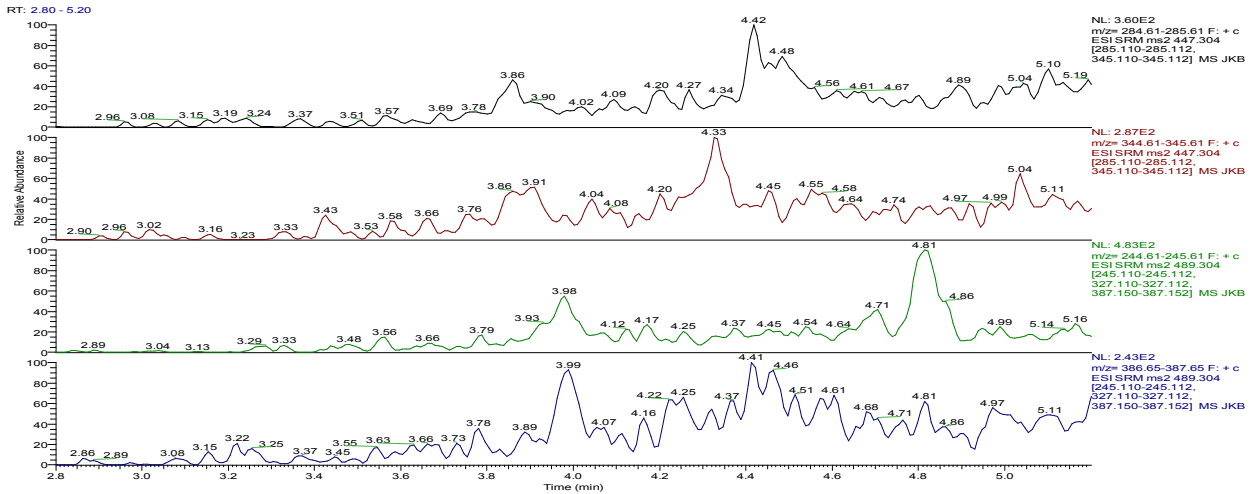


图 18 鸡预混合饲料基质空白特征离子色谱图

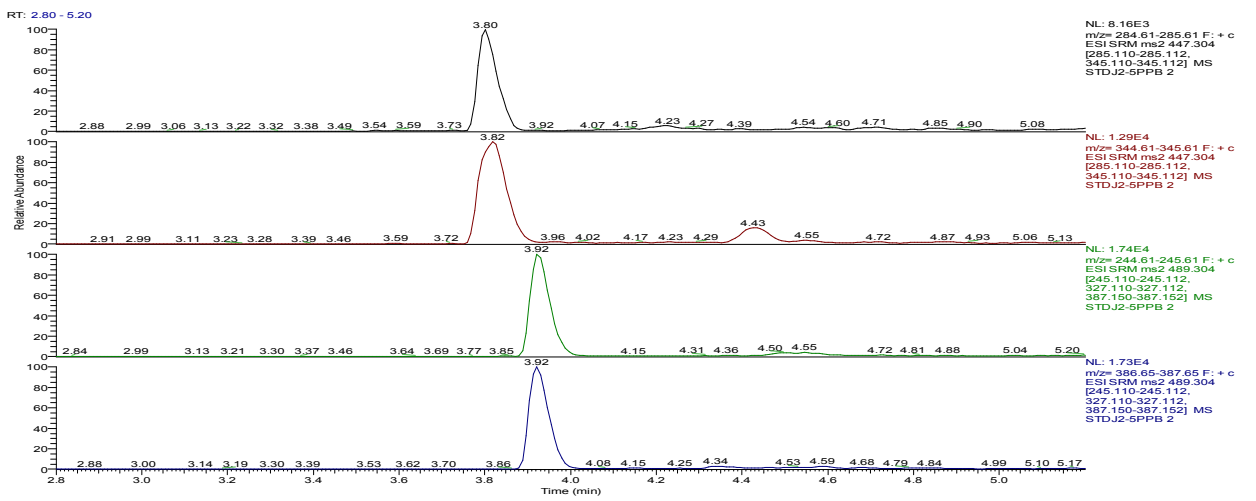


图 19 鸡预混合饲料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

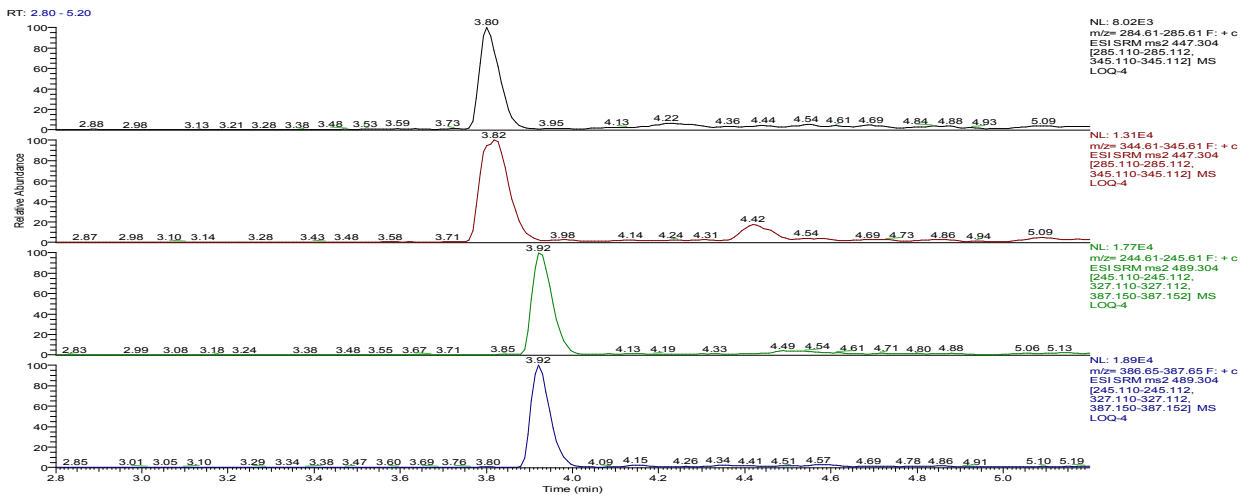


图 20 鸡预混合饲料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素药物特征离子色谱图 (5 μg/kg)

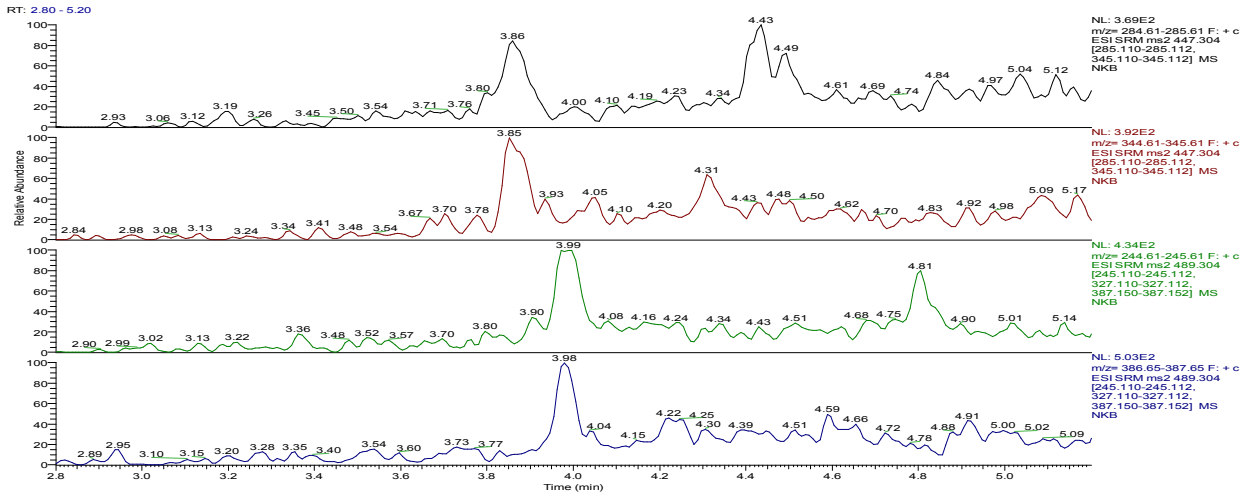


图 21 牛精料补充料基质空白特征离子色谱图

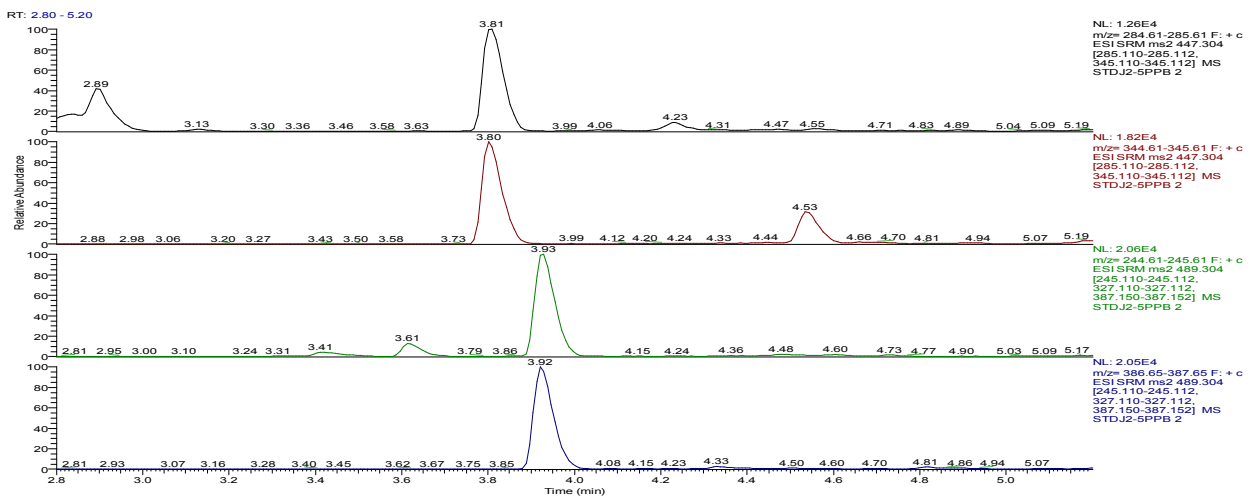


图 22 牛精料补充料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

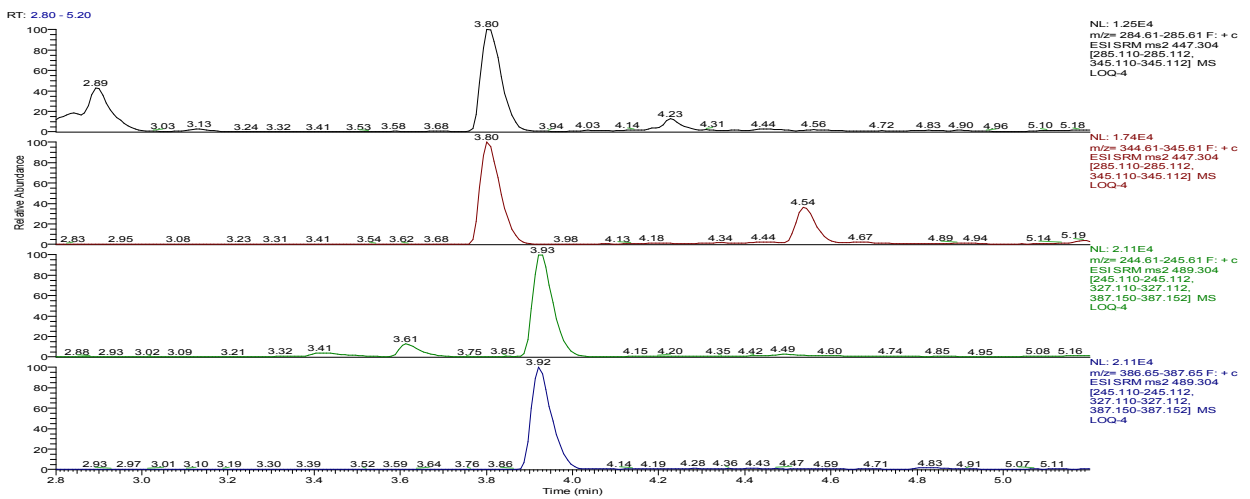


图 23 牛精料补充料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素药物特征离子色谱图 (5 μg/kg)

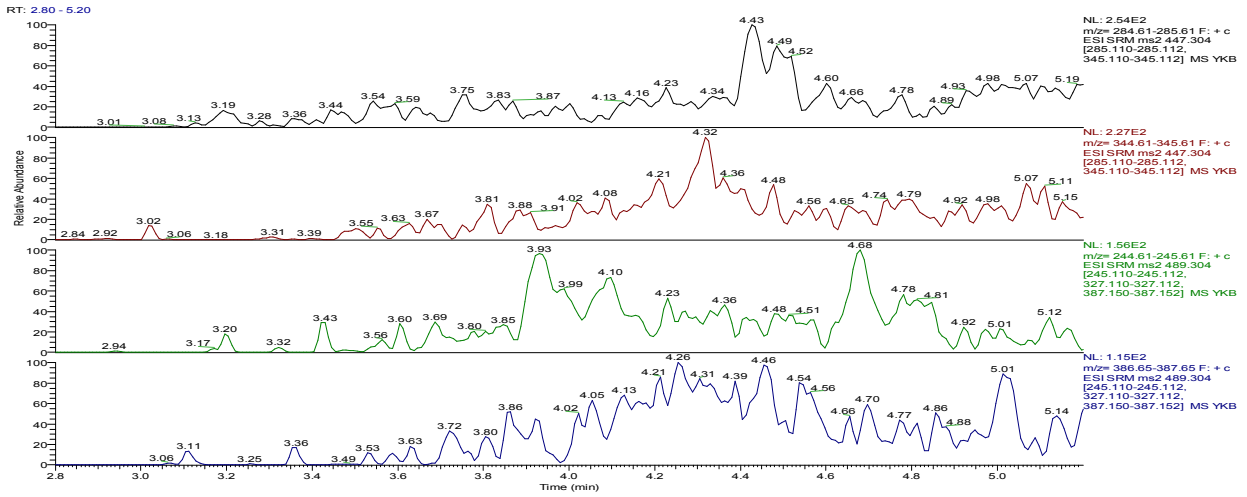


图 24 羊精料补充料基质空白特征离子色谱图

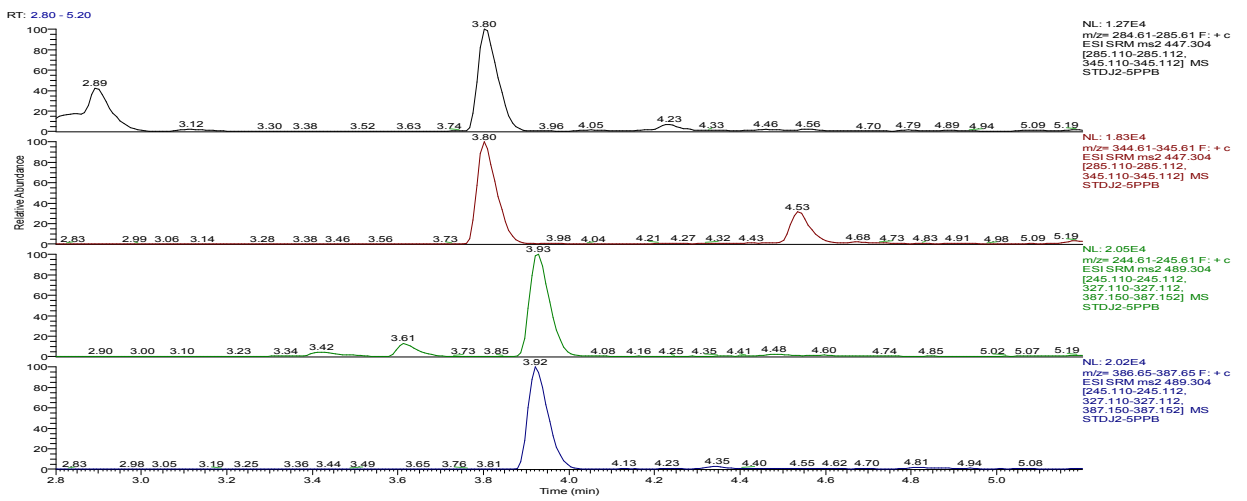


图 25 羊精料补充料空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

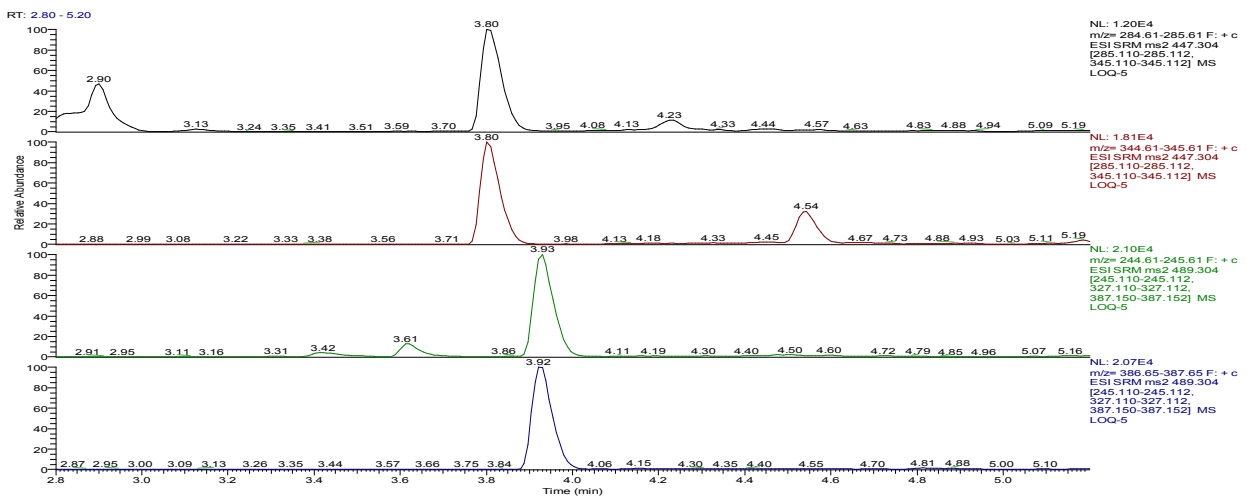


图 26 羊精料补充料样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素药物特征离子色谱图 (5 μg/kg)

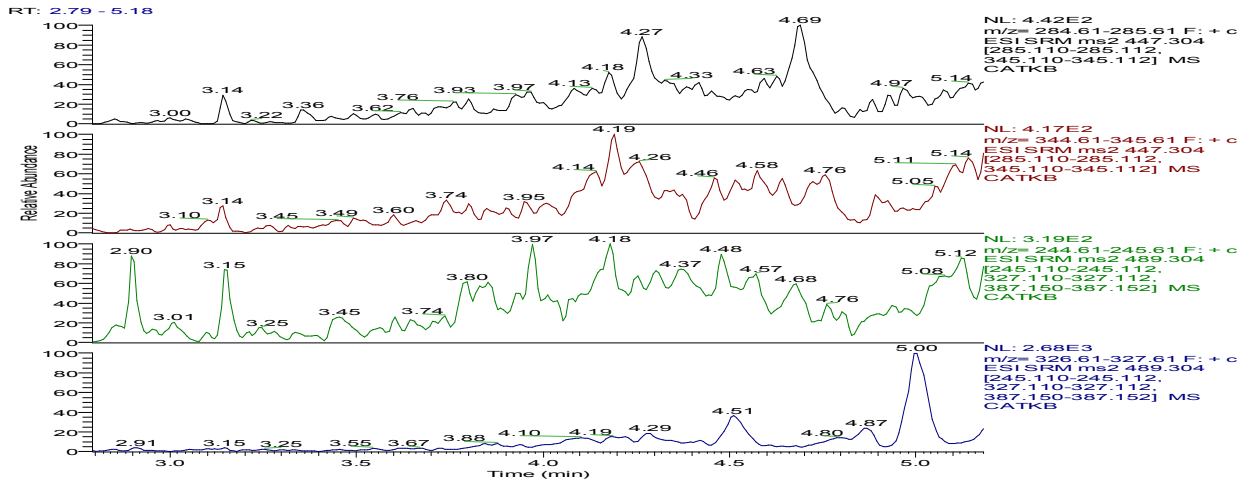


图 27 猫粮基质空白特征离子色谱图

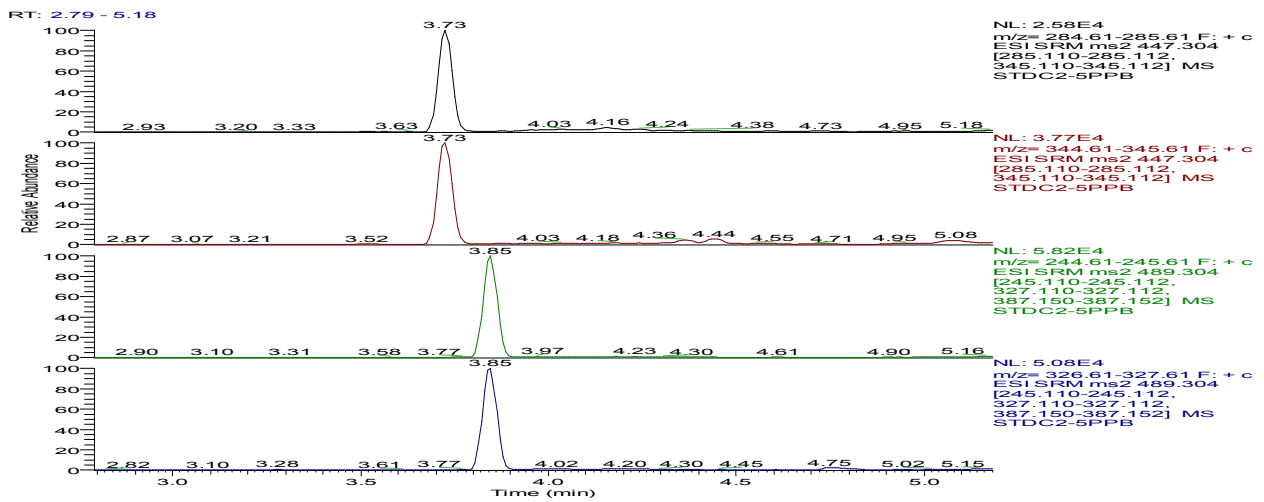


图 28 猫粮空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

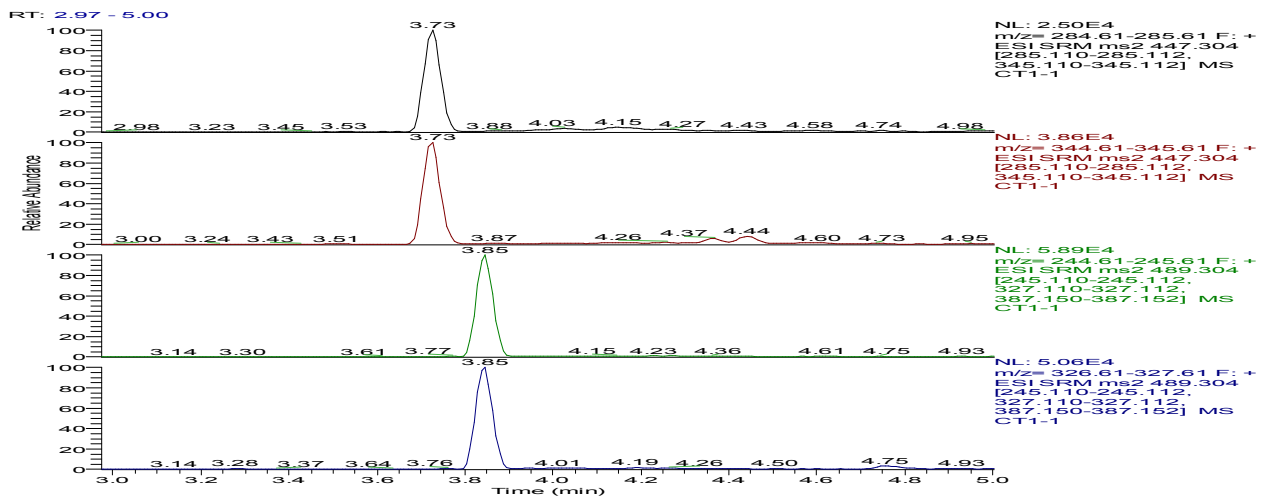


图 29 猫粮空白样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 μg/kg)

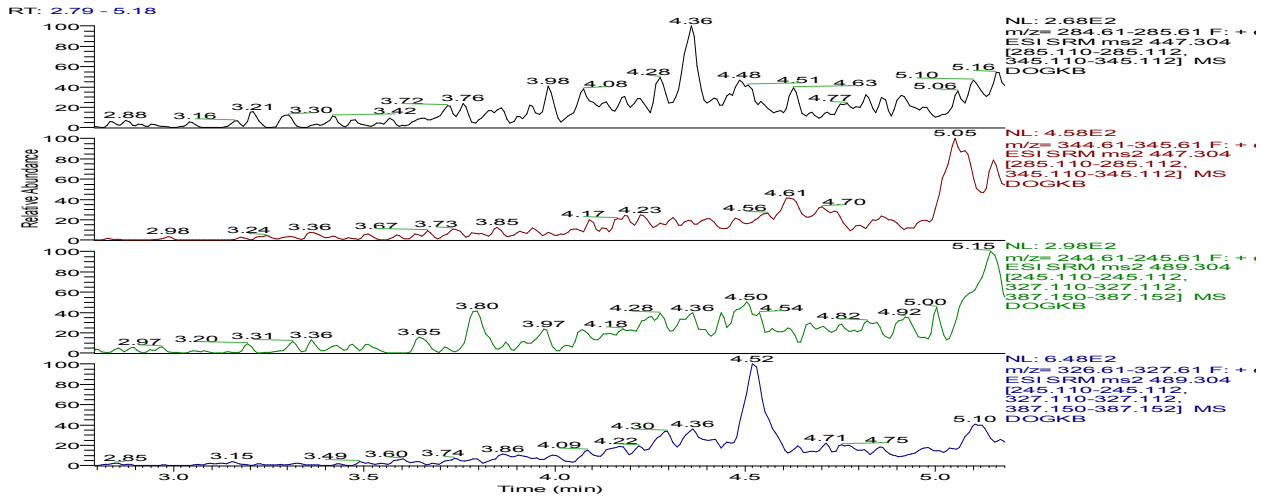


图 30 犬粮基质空白特征离子色谱图

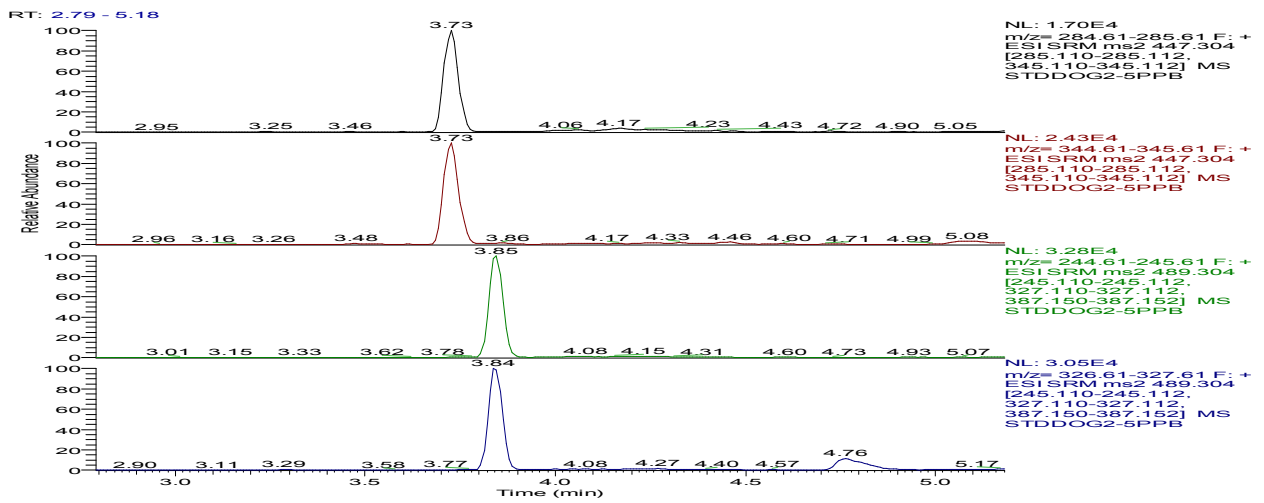


图 31 犬粮空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

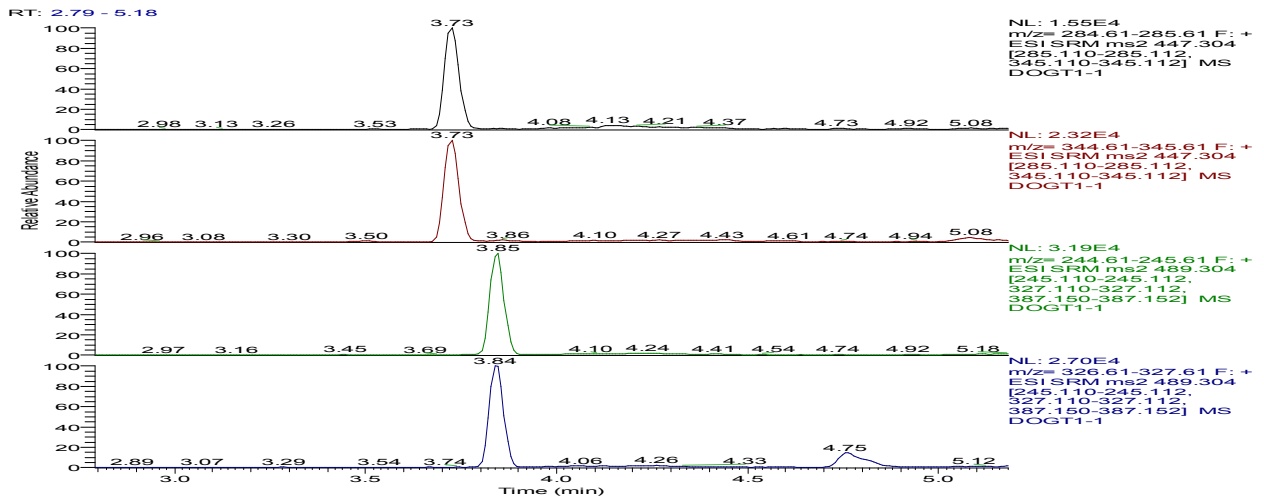


图 32 犬粮空样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 µg/kg)

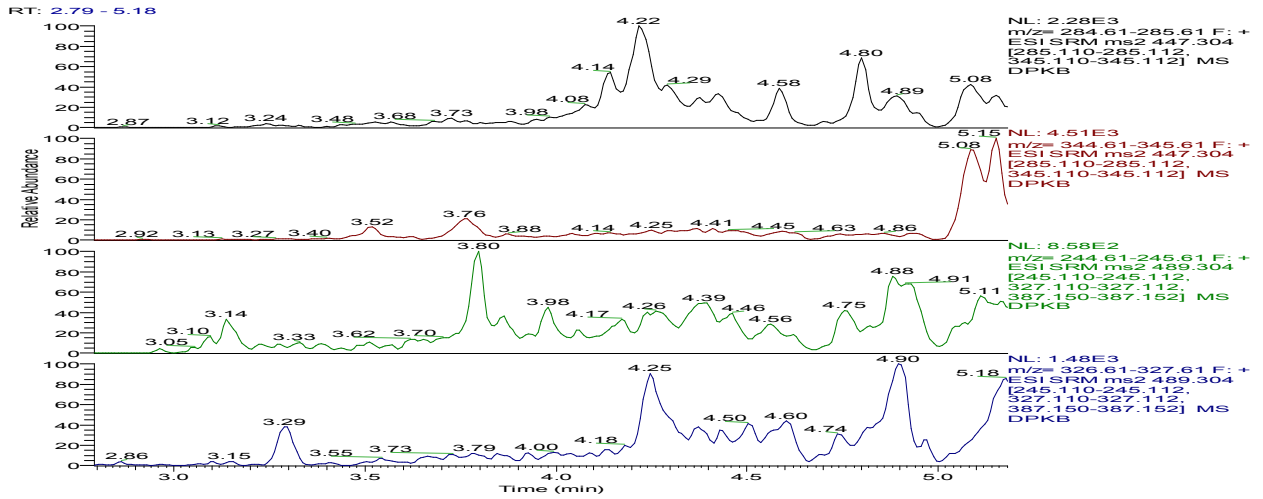


图 33 豆粕基质空白特征离子色谱图

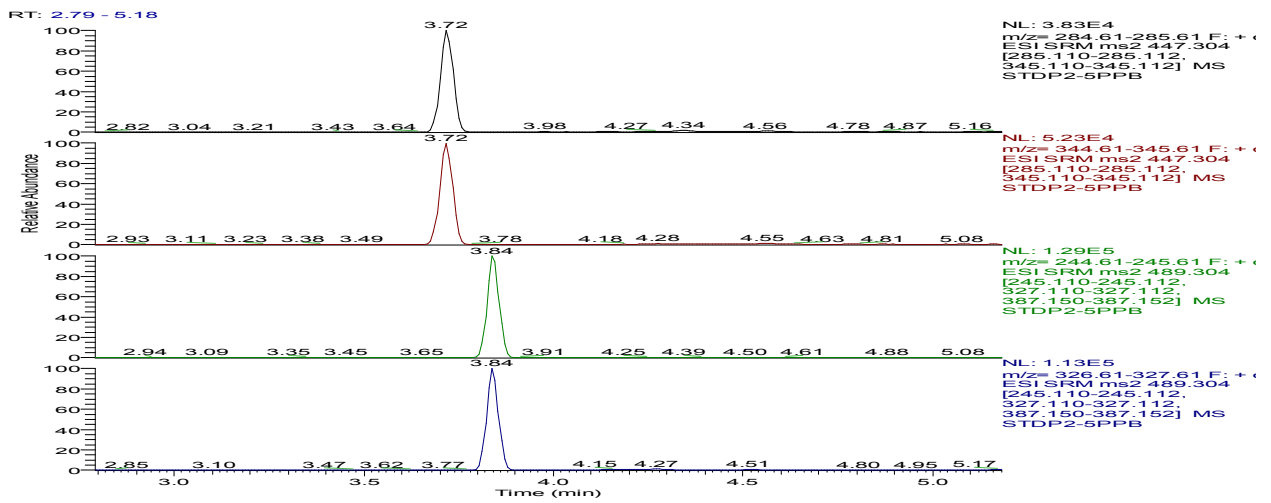


图 34 豆粕空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

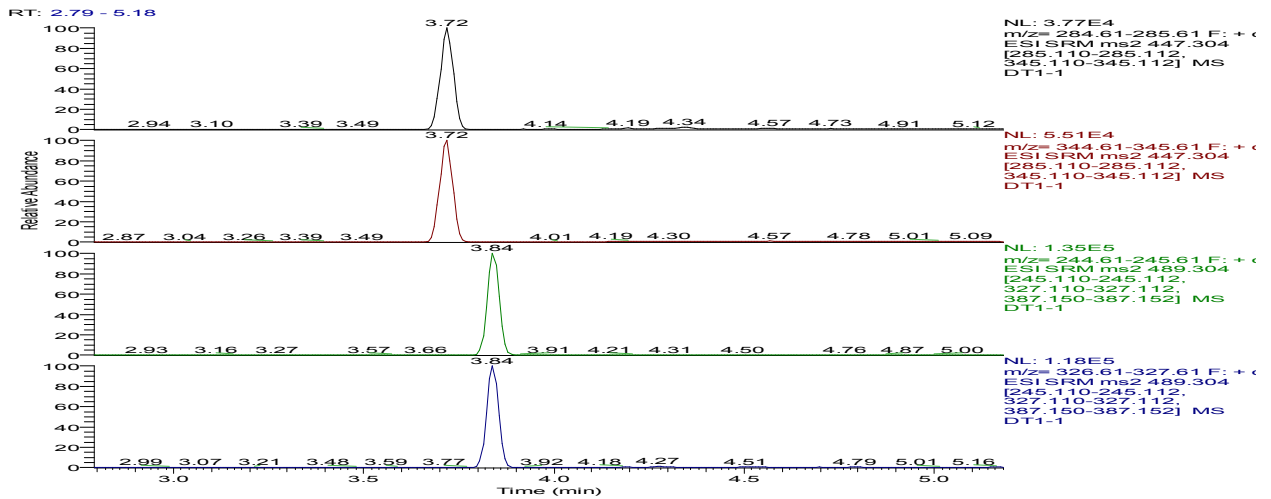


图 35 豆粕空样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 µg/kg)

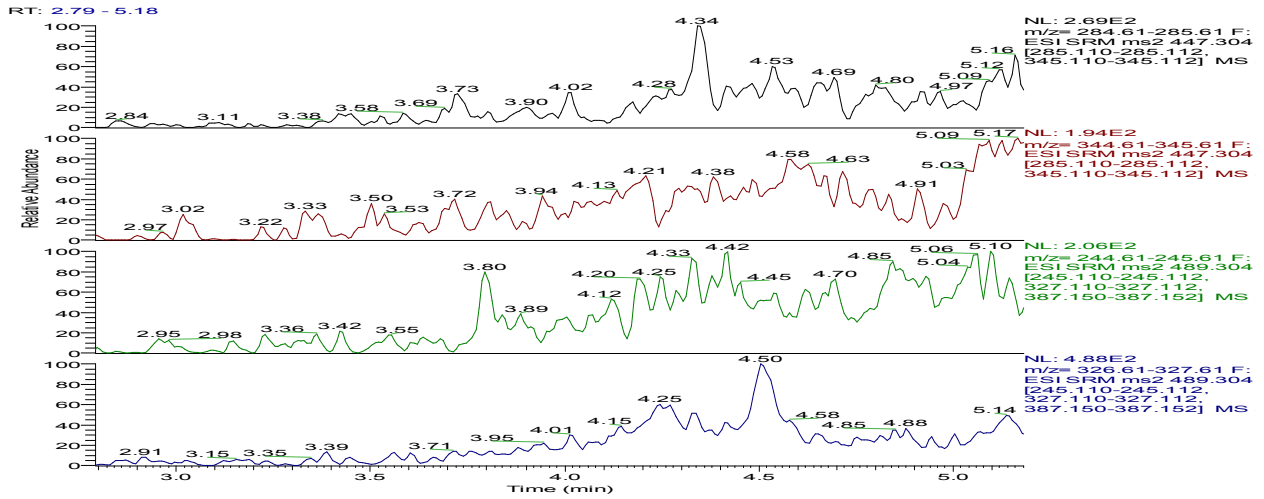


图 36 DDGS 基质空白特征离子色谱图

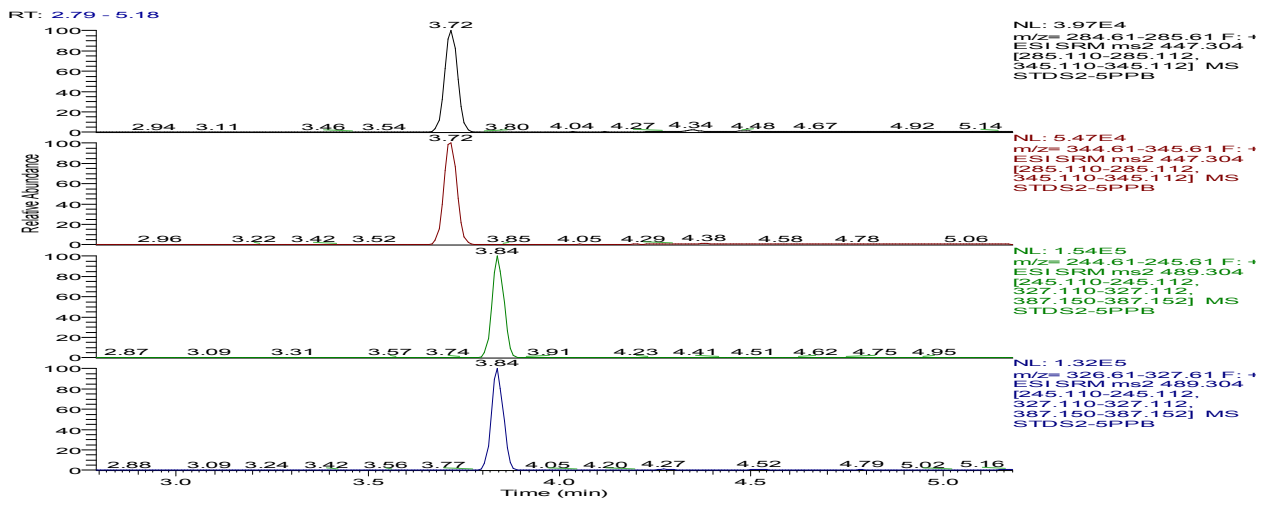


图 37 DDGS 空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

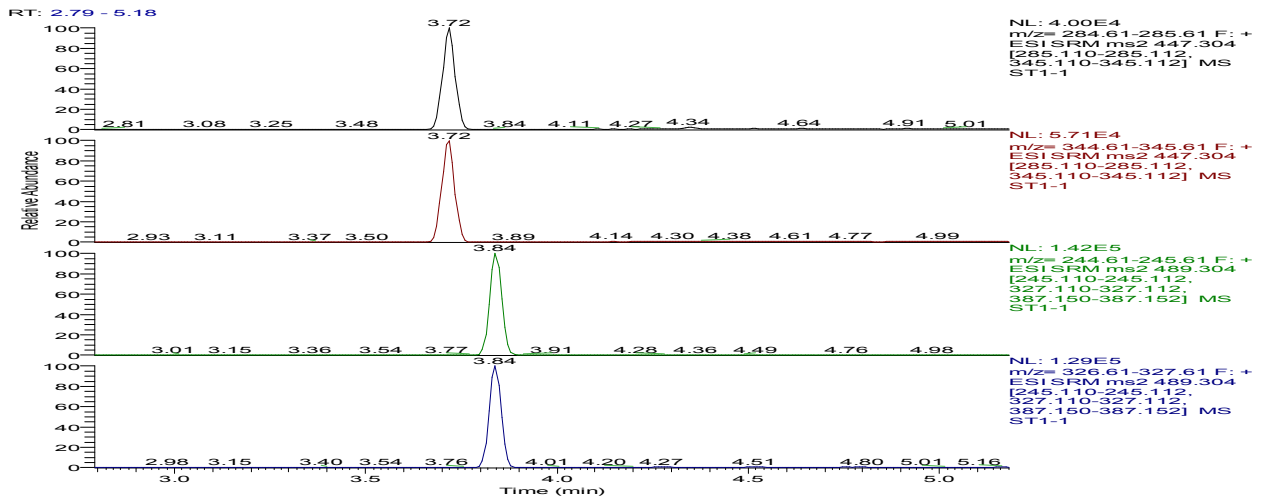


图 38 DDGS 样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 μg/kg)

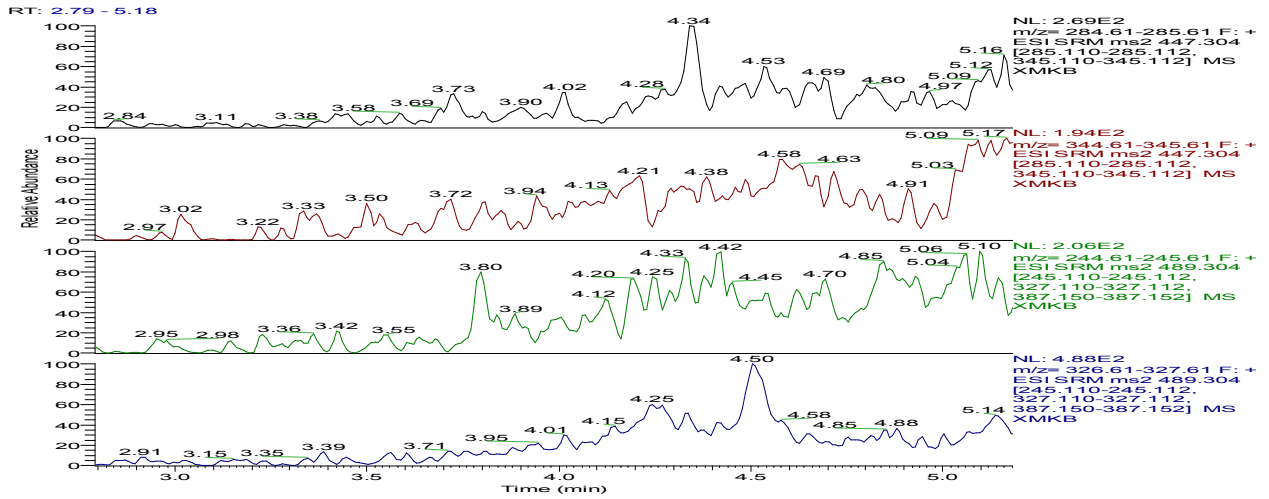


图 39 小麦基质空白特征离子色谱图

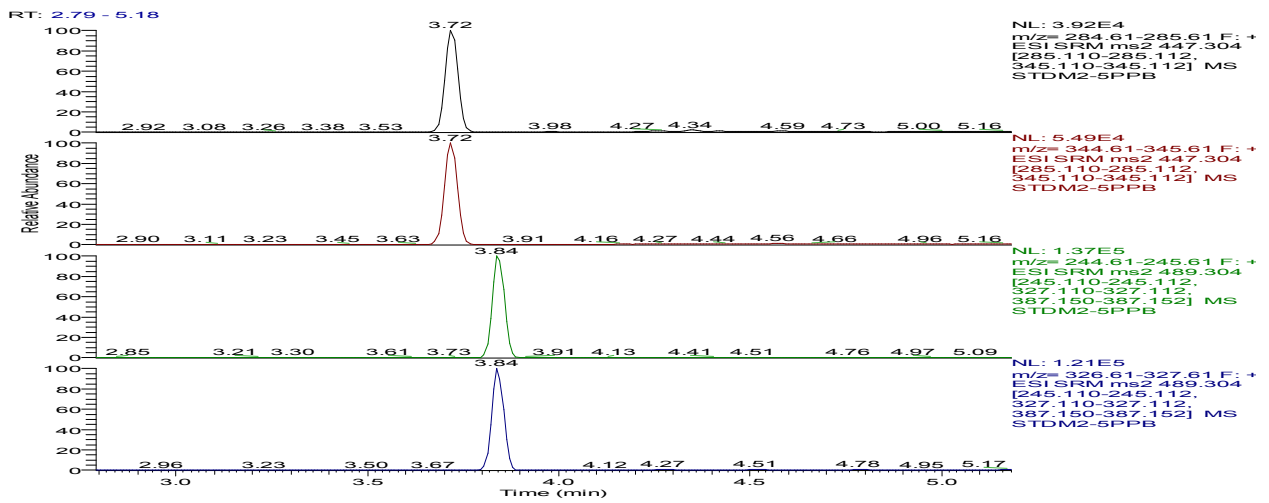


图 40 小麦空白基质添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

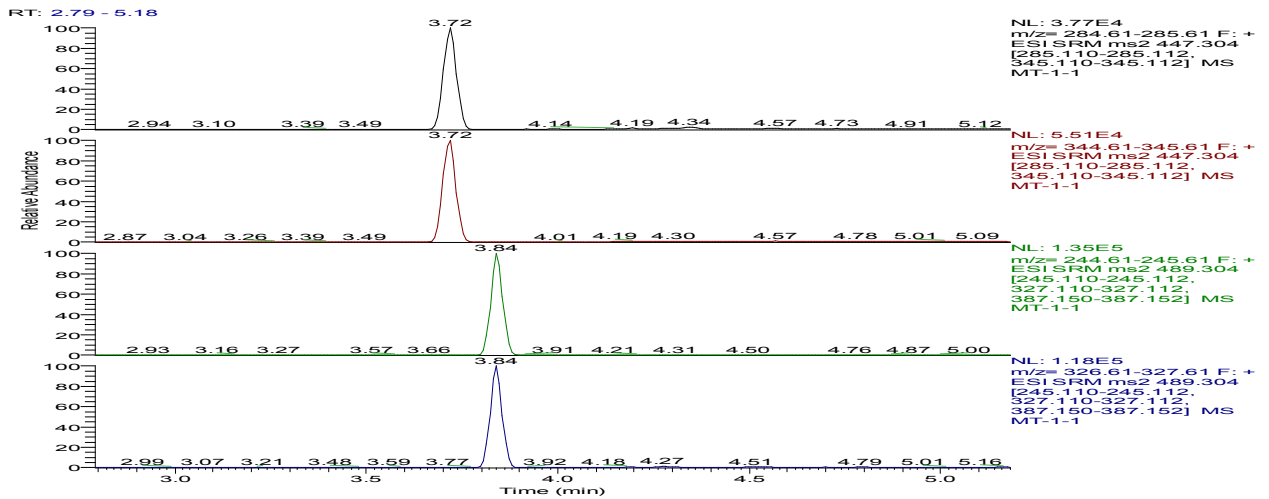


图 41 小麦样品添加 T-2 和 HT-2 毒素毒素特征离子色谱图 (5 µg/kg)

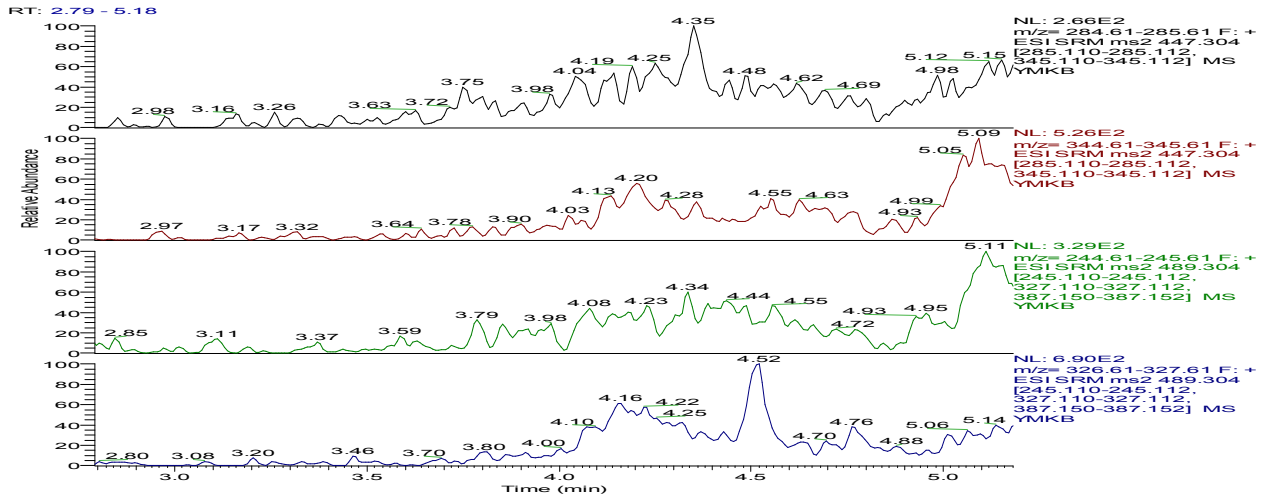


图42 玉米基质空白特征离子色谱图

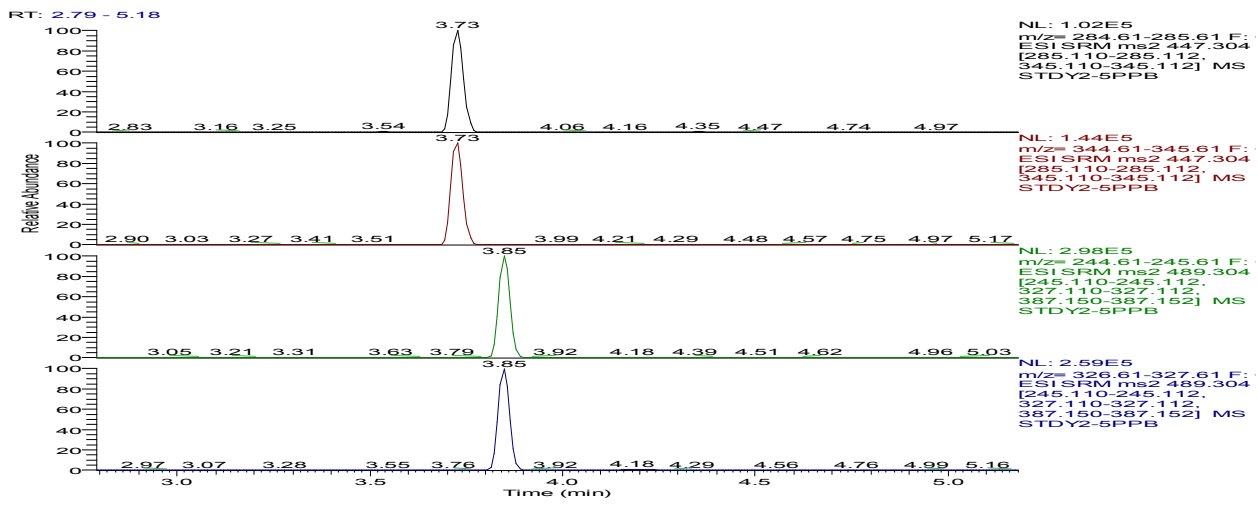


图43 玉米空白基质添加T-2和HT-2毒素毒素类特征离子色谱图 (2.5 ng/mL)

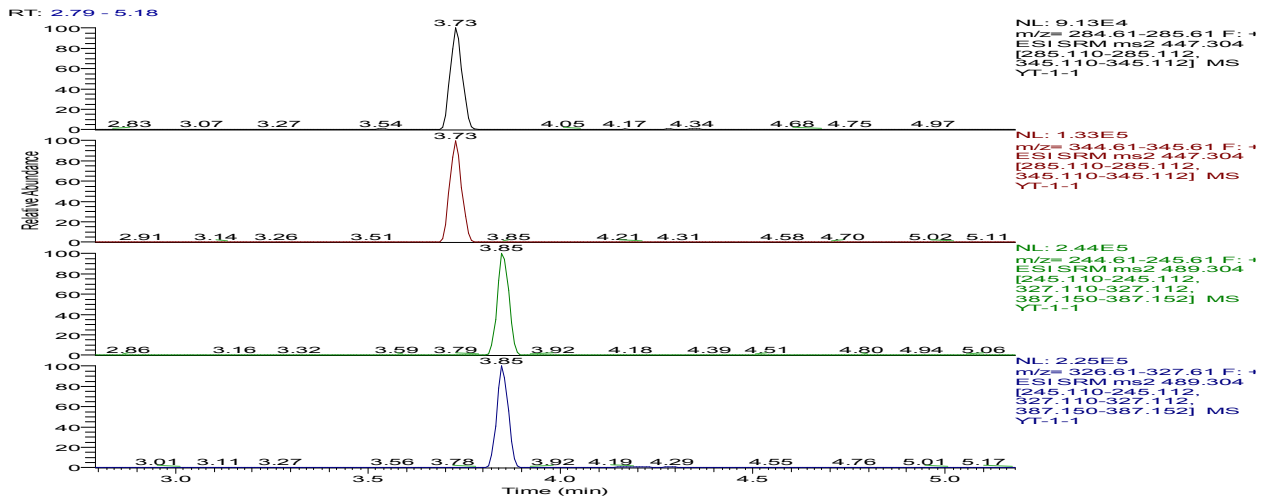


图44 玉米样品添加T-2和HT-2毒素毒素类特征离子色谱图 (5 µg/kg)

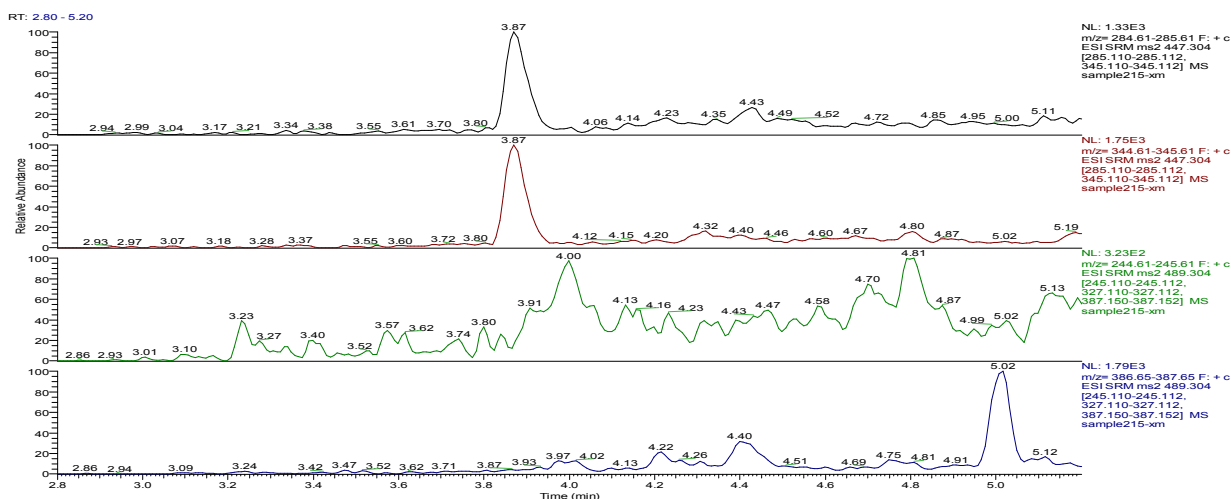


图45 实际样品--小麦麸

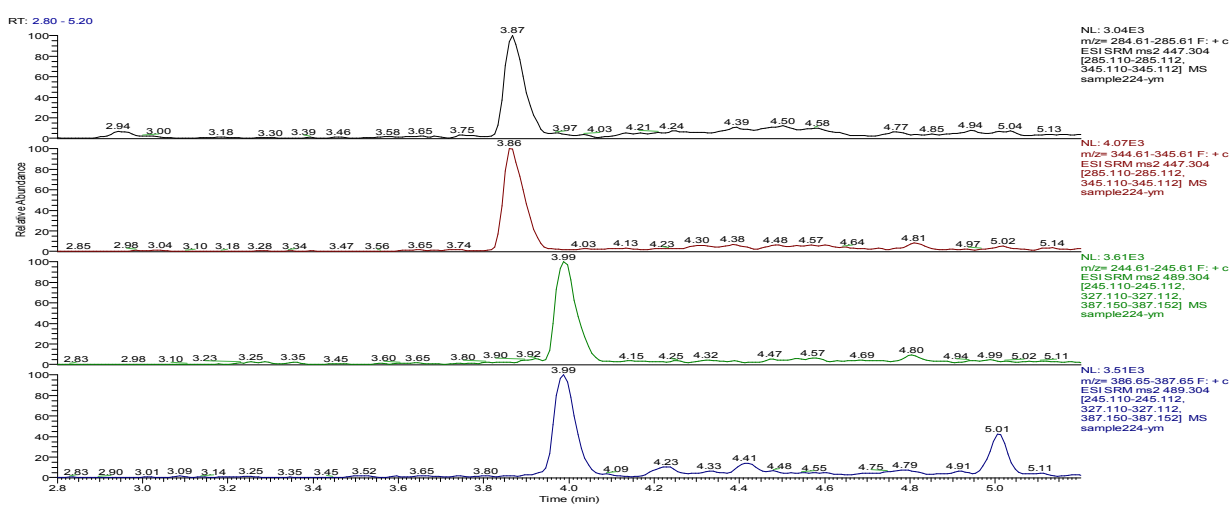


图46 实际样品--膨化玉米粉

3.4 标准内容说明

3.4.1 检测方法基本原理

用 25 mL 的 80%乙腈水提取液提取样品中的 T-2 和 HT-2 毒素，提取液经免疫亲和柱净化，1 mL 2%甲酸甲醇洗脱，用液相色谱-串联质谱法测定，外标法定量。

3.4.2 准确度结果

对 T-2 和 HT-2 毒素类药物检测方法不同添加浓度的回收率原则要求，三个复核单位的液相色谱-串联质谱法回收率范围也都在 60%~120%之间，批内批间变异系数也都小于 20%。因此本方法将回收率范围定在 60%~120%之间。

3.4.3 结论

采用高效液相色谱法/液相色谱-串联质谱法测定饲料中 T-2 和 HT-2 毒素的方法标准，明确规定了适用范围、确定了检测波长、提取净化等方法以及高效液相

色谱条件、质谱条件等，具有较好的灵敏度、准确度和精密度。

四、采用国际标准

经查阅国际标准，未查到饲料中 T-2 毒素、HT-2 毒素测定的行业标准。故未进行与国际标准的对比分析。

五、与现行法律法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。本方法的灵敏度满足了现行《饲料卫生标准》和《宠物饲料（宠物食品）卫生标准》中对T-2毒素、HT-2毒素的限量要求，与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。本标准与现行法律、法规、规章和政策以及有关基础和强制性标准不矛盾。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集了国内外相关信息资料，组织技术专家对标准内容的制定，进行了详细研讨，并达成统一制定方案。标准编制过程中没有重大意见分歧。

七、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一，因此建议将其作为推荐性标准颁布实施。

八、贯彻标准的要求和措施建议

本标准在实施前，每个使用者应得到有效的电子和纸质文本，保证新标准贯彻实施的基础。发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传。实施的过渡期宜定为6个月。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

下达任务名称为《饲料中T-2毒素类的测定 液相色谱-质谱/质谱法》，HT-2毒素与T-2毒素属于一类具有相类似化学结构的真菌次级代谢产物，且为T-2毒素在体内与体外最为主要的代谢产物，两者化学结构及毒性均十分相似，因此选择T-2和HT-2毒素作为待测物，并根据预审会专家意见，将标准名称更改为《饲料中T-2和HT-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》。

根据预审会专家意见，本标准补充了猪浓缩饲料、鸡浓缩饲料、鸡预混合饲料、牛羊精料补充料、水产配合饲料的添加回收试验，但水产配合饲料回收率只有30%左右，不满足试验需求，因此本标准适用范围未涵盖水产配合饲料。

《饲料中T-2和HT-2毒素的测定液相色谱-串联质谱法》课题组

二〇二〇年八月

参考文献

- [1] GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第一部分：标准化文件的的结构和起草规则》。
- [2] GB/T 20001.4-2015 《标准编写规则第4部分：试验方法》
- [3] GB/T 28718-2012《饲料中 T-2 毒素的测定免疫亲和柱净化-高效液相色谱法》
- [4] GB 13078-2017《饲料卫生标准》
- [5] 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》
- [6] SN/T 3136-2012《出口花生、谷类及其制品中黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素 B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素、HT-2 毒素的测定》
- [7] 符小杏, 杨信, 李强, *et al.* 饲料中 T-2 毒素对家禽的危害及其脱毒研究进展[J]. 饲料研究, 2013(10):21-23.
- [8] 孙娟, 李为喜, 张妍, *et al.* 用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物中 12 种真菌毒素 [J]. 作物学报, 2014, 40(4):691-701.
- [9] 王小博, 施琦, 王雅玲, *et al.* 高效液相色谱-串联质谱法测定 3 种水产品中的 T-2 毒素与 HT-2 毒素 [J]. 食品科学, 2016(24):164-169.
- [10] 王晓春, 汤奇峰, 李鹏飞. 高效液相色谱-三重四极杆串联质谱测定谷物中 T-2 毒素和 HT-2 毒素[J]. 分析试验室, 2011, 30(9):62-65.
- [11] 杨凌宸, 赵志勇, 周振雷, *et al.* T-2 毒素的理化特性及其对家禽的毒害作用[J]. 畜牧与兽医, 2013(4).
- [12] Ren Y , Zhang Y , Shao S , *et al.* Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1143(1-2):48-64.
- [13] 宫小明, 任一平, 董静, *et al.* 超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中 18 种真菌毒素[J]. 分析测试学报, 2011, 30(1).