

多组分免疫亲和柱净化/超高效液相色谱-串联质谱检测水产饲料中的黄曲霉毒素

刘文静^{1,2}, 余海霞³, 严忠雍², 张小军^{2*}, 丁国芳¹

(1. 浙江海洋大学 食品与医药学院, 浙江 舟山 316021; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316021; 3. 浙江大学 舟山海洋研究中心, 浙江 舟山 316021)

摘要: 建立了多组分免疫亲和柱净化/超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定水产饲料中黄曲霉毒素 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 及 AFG₂ 含量的方法。饲料样品用 80% 乙腈水超声提取后, 经多组分免疫亲和柱净化, 采用 UPLC-MS/MS 测定, 外标法定量。以 0.1% 甲酸-乙腈为流动相, 梯度洗脱分离, 电喷雾正离子多反应监测模式检测。结果表明, AFB₁、AFG₁ 和 AFB₂、AFG₂ 分别在 2.25~22.5 ng/mL 和 0.75~7.5 ng/mL 质量浓度范围内呈良好线性, 相关系数大于 0.997; AFB₁、AFG₁ 的定量下限均为 0.7 μg/kg, AFB₂、AFG₂ 的定量下限均为 0.2 μg/kg。AFB₁、AFG₁ 在 1.5 μg/kg, AFB₂、AFG₂ 在 0.5 μg/kg 加标水平下的回收率为 78.7%~85.5%, 日内相对标准偏差(RSD)为 6.0%~6.5%, 日间 RSD 为 6.6%~7.0%。该法操作简单, 耗时少, 重复性好, 灵敏度高, 适用于水产饲料中黄曲霉毒素的测定。

关键词: 多组分免疫亲和柱; 超高效液相色谱-串联质谱; 饲料; 黄曲霉毒素

中图分类号: O657.7; S816.17 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2019)03-0323-05

Determination of Aflatoxins in Aquatic Feeds Samples by Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry with Multi-component Immunoaffinity Column Purification

LIU Wen-jing^{1,2}, YU Hai-xia³, YAN Zhong-yong², ZHANG Xiao-jun^{2*}, DING Guo-fang¹

(1. School of Food and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316021, China; 2. Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China; 3. Ocean Research Center of Zhoushan, Zhejiang University, Zhoushan 316021, China)

Abstract: An ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometric (UPLC – MS/MS) method was established for the determination of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) in aquatic feeds based on multi-component immunoaffinity column purification. The samples were ultrasonically extracted with 80% acetonitrile aqueous solution, then purified with a multi-component immunoaffinity column, finally analyzed by UPLC – MS/MS with electrospray ionization in positive ion mode (ESI⁺) under multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by the external standard method. The separation was performed on an Acquity UPLC BEH C₁₈ column by gradient elution with 0.1% formic acid – acetonitrile as mobile phases. Good linear responses were obtained in the concentration ranges of 2.25 – 22.5 ng/mL for AFB₁ and AFG₁, and 0.75 – 7.5 ng/mL for AFB₂ and AFG₂, with their correlation coefficients larger than 0.997, respectively. The limits of quantitation (LOQs) were 0.7 μg/kg for AFB₁ and AFG₁, and 0.2 μg/kg for AFB₂ and AFG₂, respectively. The average recoveries for AFB₁ and AFG₁ at a spiked level of 1.5 μg/kg, and AFB₂ and AFG₂ at a spiked level of 0.5 μg/kg ranged from 78.7% to 85.5%, with intra-day and inter-day relative standard deviations of 6.0% – 6.5% and 6.6% – 7.0%, respectively. The method was simple, rapid, sensitive and reliable, and was suitable for the determination of aflatoxins residues in aquatic feed samples.

收稿日期: 2018-09-11; 修回日期: 2018-10-21

基金项目: 国家重点研发计划项目子课题(2016YFD0400102-03)

* 通讯作者: 张小军, 博士, 工程师, 研究方向: 水产品质量和标准化, E-mail: xiaojun3627@163.com

Key words: multi-component immunoaffinity column; ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry; feeds; aflatoxins

黄曲霉毒素(AFs)由黄曲霉、寄生曲霉两类霉菌代谢产生,是一类结构相似且含多环不饱和香豆素的化合物^[1]。目前已分离出17种AFs,其中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)常见于玉米^[2-5]、水稻^[4]、坚果^[4]、香料^[5]和牛奶^[6]等各类食品和饲料^[7]中。AFs对绝大多数养殖动物具有致死毒性、致畸性和致癌性,并对免疫和生殖系统具有损伤性^[8]。研究表明,AFs普遍存在于水产饲料中,并在水产生物体内累积,显著破坏水产生物的健康和质量,从而对消费者的公共卫生健康产生潜在危害^[9]。因此需要加强对水产饲料中AFs的检测和监控,以进一步提高水产品品质和保障消费者安全。

目前常用的AFs检测方法有薄层色谱法^[10]、酶联免疫法^[11-13]、荧光光度法^[14-15]、高效液相色谱法^[16-19]等。但上述方法的灵敏度相对较低,且易出现假阳性等问题,因此在应用方面受到限制。近年来,超高效液相色谱-质谱联用法(UPLC-MS/MS)^[20-22]由于灵敏度高、定性准确而被广泛应用于饲料检测,但由于水产饲料基质复杂,亟需开发专一性强、净化效果好的前处理方法以获得更好的定性、定量效果。免疫亲和色谱柱净化是利用抗原和抗体特异性结合原理的一种新型高效的前处理方法,近年来在食品检测特别是单一目标物的前处理领域应用广泛^[23],但针对多组分净化的文献少见报道。本研究利用多组分免疫亲和柱净化建立特异性前处理方法,结合UPLC-MS/MS技术建立了水产饲料中AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂的检测方法。该法灵敏度高、快速准确,适用于水产饲料中AFs的检测和监控。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

AFs混合标准品(纯度≥98.0%,美国Supelco公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(分析纯,美国Sigma公司);氯化钠(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);实验用水为Milli-Q纯水器制备的超纯水(电阻率≥18.2 MΩ·cm)。

AcquityTM超高效液相色谱仪、Quattro Premier XE串联四极杆质谱仪(美国Waters公司);MS2旋涡混合器(德国IKA公司);Centrifuge 5810高速离心机(德国Eppendorf公司);电子天平(上海良平仪器仪表有限公司);N-EVAP112氮吹仪(美国Organomation公司);12通道固相萃取装置(美国Supelco公司);AFs总量(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)免疫亲和柱(柱容量1 mL,北京华安麦科生物技术有限公司);超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司);微孔滤膜(0.22 μm,津腾公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的配制 AFs标准溶液:用1 000 μL移液枪准确移取1.0 mL AFs标准品,以甲醇稀释并定容至4 mL,AFB₁、AFG₁的质量浓度为225 ng/mL,AFB₂、AFG₂的质量浓度为75 ng/mL,于4℃避光保存。将标准溶液分别以0.1%甲酸-乙腈(体积比4:1)逐级稀释至所需浓度,制得中间液和使用液。

1.2.2 样品提取 准确称取(2±0.01)g粉碎样品(过1 mm分样筛)于50 mL离心管中,加入2.0 mL水后涡旋混合60 s。加入0.4 g氯化钠与10 mL 80%(体积分数)乙腈水,涡旋混匀,超声提取10 min,6 000 r/min离心3 min。取上清液经滤纸过滤,取2 mL滤液于15 mL离心管中,加入8 mL水稀释,涡旋混合30 s,5 000 r/min离心3 min待净化。

1.2.3 多组分免疫亲和柱净化 免疫亲和柱恢复至室温后去掉亲和柱堵头,待柱内保存液排干后,将上述10 mL上样液以1~2滴/s的流速过柱。上样结束后,用10 mL 24%(体积分数)乙腈水淋洗亲和柱,挤干柱内残留液,弃去全部流出液。用2 mL 1%甲酸甲醇溶液以1滴/s的流速洗脱,洗脱液收集于15 mL离心管,于50℃水浴中氮气吹干,加入1.0 mL初始流动相溶解并涡旋混合30 s,过0.22 μm有机相滤膜后,待测。

1.2.4 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);进样量为10.0 μL;样品室温度为10℃,柱温为40℃;流动相:A为0.1%甲酸溶液,B为乙腈;流速为0.25 mL/min。梯度洗脱程序:0~2 min,80%~20% A;2~3 min,40%~60% A;3~5 min,80% A。

1.2.5 质谱条件 电喷雾离子源,正离子扫描模式(ESI^+);多反应监测(MRM)方式检测;毛细管电压为3.0 kV;离子源温度为120 °C;脱溶剂气温度为380 °C,流速为550 L/h;锥孔气流速为50 L/h,锥孔气与脱溶剂气均为高纯氮气。4种AFs的MRM实验条件如表1所示。

表1 4种AFs的多反应监测条件

Table 1 Conditions of multiple reaction monitoring for four AFs

Analyte	Parent ion(m/z)	Daughter ion(m/z)	Cone voltage/V	Collision energy/eV
AFB ₁	313.2	285.2*, 241.2	40	25, 28
AFB ₂	315.2	259.2*, 287.2	40	28, 28
AFG ₁	329.2	243.2*, 311.2	40	25, 20
AFG ₂	331.2	313.2*, 245.2	40	25, 28

* quantitative ion

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 流动相的优化 在 ESI^+ 模式下,流动相中加0.1%甲酸有利于化合物的离子化,并可改善色谱峰形。AFs易溶于乙腈,且具有较好的响应值,实验通过优化水相(0.1%甲酸)与有机相(乙腈)的比例,发现在“1.2.4”的洗脱梯度下能得到良好的色谱分离效果,出峰时间适中,峰形尖锐对称,且目标峰附近无明显杂峰。故选择0.1%甲酸-乙腈作为流动相,在该条件下饲料样品加标的色谱图见图1,其中AFB₁、AFG₁加标水平为1.5 μg/kg, AFB₂、AFG₂加标水平为0.5 μg/kg。

2.1.2 质谱条件的优化 AFs在 ESI^+ 模式下具有较高的响应强度,将AFs标准溶液(AFB₁、AFG₁质量浓度为225 ng/mL, AFB₂、AFG₂为75 ng/mL)以20 μL/min的流速注入离子源,对质谱参数进行优化。在一级质谱全扫描分析中,选择

丰度最高的离子作为AFs的特征离子,调试优化出最佳锥孔电压和毛细管电压。经过二级碰撞诱导分析收集分析物的子离子信息,并对碰撞能量等质谱参数进行优化,选择响应最强的离子作为定量离子,响应次强的离子作为定性离子。最终确定4种AFs的质谱参数如“1.2.5”所示。

2.2 提取剂的选择

实验发现,饲料样品中先加入2 mL水浸润后再采用有机溶剂提取,能有效避免因饲料吸收提取液导致的提取不充分,可提高方法的回收率。由于高有机相比例的提取剂对饲料样品的效果最好,因此分别考察了70%甲醇水、80%乙腈水和纯乙腈作为提取剂时对4种AFs的提取效果。结果显示,采用70%甲醇水作为提取剂的提取率为28.5%~89%;纯乙腈作为提取剂的提取率为63%~82%;而采用80%乙腈水作为提取剂的效果最好,提取率为72.1%~95.4%。且采用80%乙腈水可使提取液分层明显,有利于后续实验操作,显著提高了实验效率,因此选择80%乙腈水为提取剂。

2.3 免疫亲和柱条件的优化

在多组分残留测定中,淋洗液和洗脱液会影响免疫亲和柱的效果,因此对淋洗液和洗脱液进行了优化。分别比较了纯甲醇、24%甲醇水、24%乙腈水的淋洗效果,发现24%乙腈水的淋洗效果最好,且4种AFs的净化效果随着淋洗体积的增大而逐渐提高,最终确定采用10 mL 24%乙腈水进行淋洗。

文献^[14-16]多采用纯甲醇进行洗脱,本研究考察了纯甲醇、初始流动相、乙腈、1%氨水甲醇、1%乙酸甲醇、1%乙酸乙腈、0.2%甲酸甲醇、0.5%甲酸甲醇、1%甲酸甲醇的洗脱效果,将50 ng/mL的

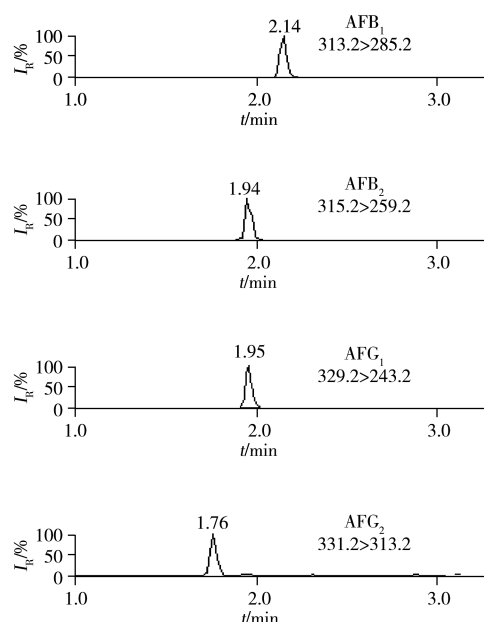


图1 饲料样品加标的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of feed sample fortified with standards AFB₁ and AFG₁ spiked 1.5 μg/kg; AFB₂ and AFG₂ spiked 0.5 μg/kg

AFB₁、AFG₁ 以及 15 ng/mL 的 AFB₂、AFG₂ 标准溶液直接上样, 每 1 mL 洗脱液收集 1 次, 共收集 3 次。结果表明, 对于上述 9 种洗脱液, 第 3 mL 洗脱液中均基本未检出目标物, 表明 2 mL 洗脱液即可将免疫亲和柱上的 AFs 完全洗脱, 因此取 2 mL 洗脱液进行洗脱。相比之下, 以 1% 乙酸甲醇、1% 乙酸乙腈、1% 甲酸甲醇洗脱的效果较好, 4 种 AFs 的回收率分别为 84.8%~91.1%、99.1%~113% 和 97.7%~113%, 由于在浓缩过程中 1% 甲酸甲醇更节约时间, 故选择 2 mL 1% 甲酸甲醇作为洗脱液。

2.4 基质效应的影响

基质效应 (Matrix effect, ME) 是指基质中除分析物以外的其他成分对测定值的影响, 是考察分析方法抗干扰能力的有效指标。实验在空白基质中分别添加一定量的 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂, 采用本方法进行分析, 计算空白基质中目标物响应值与纯溶剂中响应值的比值, 得到本方法的 ME 值为 93.6%~104.3%, 表明不存在明显的基质效应影响。

2.5 线性关系与检出限

准确量取 AFs 标准溶液, 配制 AFB₁、AFG₁ 质量浓度为 2.25、4.5、9.0、10.0、22.5 ng/mL (AFB₂、AFG₂ 质量浓度为 0.75、1.5、3.0、6.0、7.5 ng/mL) 的标准溶液, 采用本方法进行测定, 以定量离子的峰面积 (y) 对质量浓度 (x) 进行线性回归; 以 3 倍信噪比 ($S/N=3$) 时的样品浓度为方法检出限 (LOD), 以 $S/N=10$ 时的样品浓度为方法定量下限 (LOQ)。得到 AFB₁、AFG₁ 和 AFB₂、AFG₂ 分别在 2.25~22.5 ng/mL 和 0.75~7.5 ng/mL 范围内呈良好线性, 相关系数 (r) 大于 0.997; AFB₁、AFG₁ 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$; AFB₂、AFG₂ 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (见表 2), 本方法的 LOQ 低于文献报道值^[24-29]。

表 2 4 种 AFs 的线性关系、检出限、定量下限、回收率及相对标准偏差
Table 2 Linear relationships, detection limits, quantitation limits, recoveries and RSDs of four AFs

Compound	Linear range (ng/mL)	Correlation coefficient (r)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Added ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery (%)	Intra-day RSD ($n=6, \%$)	Inter-day RSD ($n=5, \%$)
AFB ₁	2.25~22.5	0.997 7	0.3	0.7	1.5	82.3	6.5	7.0
AFB ₂	0.75~7.5	0.997 6	0.1	0.2	0.5	80.5	6.0	6.6
AFG ₁	2.25~22.5	0.997 4	0.3	0.7	1.5	85.5	6.4	7.0
AFG ₂	0.75~7.5	0.998 2	0.1	0.2	0.5	78.7	6.1	6.7

2.6 方法回收率与相对标准偏差

称取 30 份饲料样品, 每份 (2 ± 0.01) g, 均添加 80 μL 的 4 种 AFs 混合标准溶液 (AFB₁、AFG₁ 的质量浓度为 225 ng/mL; AFB₂、AFG₂ 的质量浓度为 75 ng/mL)。按照本方法重复测定 6 次, 持续测定 5 d, 并分别计算平均回收率、日内相对标准偏差 (RSD) 和日间 RSD。结果显示, 4 种 AFs 的平均回收率为 78.7%~85.5%, 日内 RSD 为 6.0%~6.5%, 日间 RSD 为 6.6%~7.0% (见表 2)。

2.7 实际样品分析

采用建立的方法对市售鱼、虾等水产饲料各 25 个样品进行检测, 其中 5 个样品检出 AFB₁, 含量为 0.320~1.813 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 1 个香鱼饲料检出 AFB₂, 含量为 0.136 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果表明, 目前水产饲料所含的 AFs 主要为 AFB₁ 和 AFB₂。另对本实验室常规存储的样品每 2 d 检测 1 次, 发现 AFB₁ 和 AFB₂ 的含量均随着贮存时间的延长而增加, 第 10 d 后上述 50 种样品均检出 AFB₁ 和 AFB₂, 典型的阳性样品色谱图如图 2 所示。

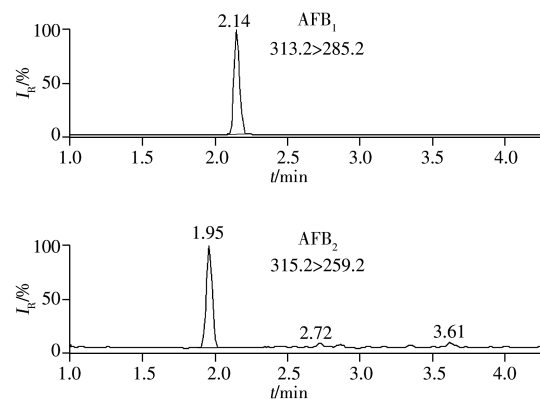


图 2 AFB₁ 和 AFB₂ 阳性样品的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of AFB₁ and AFB₂ positive sample

3 结论

本研究建立了水产饲料中 4 种 AFs 的免疫亲和柱净化/UPLC-MS/MS 检测方法, 在优化条件下方

法的检出限为0.1~0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量下限为0.2~0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率为78.7%~85.5%, 日内RSD为6.0%~6.5%, 日间RSD为6.6%~7.0%。对市售50种水产饲料进行了检测, 检出6个阳性样品, 主要为AFB₁和AFB₂, 其含量为0.136~1.813 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法特异性强、抗干扰能力好, 且灵敏度和精密度较高, 可广泛用于水产饲料等复杂基质中AFs的检测。

参考文献:

- [1] Li P W, Zhang Q, Zhang W. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, **2009**, 28(9): 1115-1126.
- [2] Nyamete F A. *Potential of Lactic Acid Fermentation in Reducing Aflatoxin B₁ and Fumonisin B₁ in Tanzanian Maize - Based Complementary Gruel*. Michigan: Michigan State University, **2013**.
- [3] Medina - Martínez M S, Martínez A J. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48(7): 2833-2836.
- [4] Mwalwayo D S, Thole B. *Toxicol. Reports*, **2016**, 3: 173-179.
- [5] Akiyama H, Goda Y, Tanaka T. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 932(1/2): 153-157.
- [6] Kamkar A, Aliabadi F S, Khaksar R. *J. Veter. Res.*, **2008**, 63(2): 7-12.
- [7] Wu Y N. *Present Knowledge in Food Safety*. Beijing: Chemical Industry Press(吴永宁. 现代食品安全科学. 北京: 化学工业出版社), **2003**: 279.
- [8] Steyn P S. *Toxicol. Lett.*, **1995**, 82/83: 843-851.
- [9] Kong Q, Lin H, Guan B. *Food Sci.* (孔青, 林洪, 管斌. 食品科学), **2013**, 34(15): 324-328.
- [10] Li S G, Chen H, Li X M, Ren Y Y. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*(李书国, 陈辉, 李雪梅, 任媛媛. 粮油食品科技), **2009**, 17(2): 62-65.
- [11] Jiang J Y, Yang X W. *Jiangxi Feed*(蒋建云, 杨学文. 江西饲料), **2006**, (6): 18-19.
- [12] Jia T. *Feed China*(贾涛. 饲料广角), **2013**, (13): 34-35.
- [13] Xing L, Wang R H. *Feed and Husbandry*(邢磊, 王仁华. 饲料与畜牧), **2015**, (7): 55-56.
- [14] Feng T, Qiao K Y, Zhou J. *Mod. Sci. Instrum.* (冯婷, 乔坤云, 周俊. 现代科学仪器), **2005**, 16(1): 115-116.
- [15] Chen X, Rao Z H, Ma D X, Wang X, Wang L. *Chin. J. Animal Sci.* (陈新, 饶正华, 马东霞, 王雄, 王莲. 中国畜牧杂志), **2007**, 43(24): 50-54.
- [16] Wang J R, Lin H, Liu C Y. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*(王江蓉, 林华, 刘纯友. 粮油食品科技), **2012**, 20(2): 34-36.
- [17] Li L, Li R, Xie G, Ye J, Wang S X. *J. Instrum. Anal.* (李丽, 黎睿, 谢刚, 叶金, 王松雪. 分析测试学报), **2017**, 36(6): 800-804.
- [18] Song Y, Chen Y, Bai X. *Pract. Prevent. Med.* (宋月, 陈颖, 白欣. 实用预防医学), **2016**, 23(7): 882-884.
- [19] Zhu W X, Yang J Z, Yuan P, Wang C J, Wei W. *Phys. Test. Chem. Anal. : Chem. Anal.* (祝伟霞, 杨冀州, 袁萍, 王彩娟, 魏蔚. 理化检验-化学分册), **2013**, 49(8): 981-984.
- [20] Wang Q, Hang X Y, Song X. *Chin. J. Health Lab. Technol.* (王芹, 杭学宇, 宋鑫. 中国卫生检验杂志), **2016**, (4): 482-485.
- [21] Liu F, Ren A S, Ge P, Ding N F, Naren Q Q G. *J. Instrum. Anal.* (刘飞, 任安书, 葛萍, 丁年芳, 娜仁·琪琪格. 分析测试学报), **2018**, 37(6): 696-701.
- [22] Li P P, Zhang X J, Mei G M, Yan Z Y, Yu L. *J. Zhejiang Univ. : Sci. Ed.* (李佩佩, 张小军, 梅光明, 严忠雍, 喻亮. 浙江大学学报: 理学版), **2015**, 42(3): 334-338.
- [23] Li P P, Zhang X J, Yan Z Y, Chen S, Lun L L. *Food Sci.* (李佩佩, 张小军, 严忠雍, 陈思, 伦丽丽. 食品科学), **2016**, 37(24): 257-261.
- [24] Pan Y F, Zheng Y L, Fang C J, Chen J Y. *Fujian Anal. Test.* (潘迎芬, 郑育莉, 方成俊, 陈俊玉. 福建分析测试), **2013**, 22(4): 12-17.
- [25] Ma Z F. *J. Food Safe. Qual.* (马占峰. 食品安全质量检测学报), **2012**, 3(3): 209-211.
- [26] Zheng R X, Han D, Zhu H M, Wang Y N, Zheng W B. *Cereals and Oils Processing: Electron. Ver.* (郑睿行, 韩丹, 祝华明, 王怡念, 郑微波. 粮油加工: 电子版), **2014**, (9): 51-53.
- [27] Jiang Z X, Liu Z W, Cao X, Wang Z L, Li Z J. *Feed Ind.* (姜兆兴, 刘振伟, 曹旭, 王智亮, 李智瑾. 饲料工业), **2007**, 28(20): 52-54.
- [28] Shang Q Q, Xiong P W, Liang Q, Rao Z H, Wang X, Guo Q, Yu D Y. *Feed Res.* (尚沁沁, 熊平文, 梁权, 饶正华, 王雄, 果旗, 余东游. 饲料研究), **2015**, (22): 55-60.
- [29] Shi Y H, Xu Z R, Feng J L, Li J S. *Chin. J. Animal Sci.* (史莹华, 许梓荣, 冯建蕾, 李家胜. 中国畜牧杂志), **2005**, 41(11): 40-42.

(责任编辑: 丁岩)