

超高效液相色谱三重四极杆质谱联用法 测定粮食中的十六种真菌毒素

LCMSMS-154

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定粮食中 16 种真菌毒素的方法。该方法在 24 min 内完成 16 种常见真菌毒素的分离，使用内标法定量分析。在糙米基质中 16 种真菌毒素线性良好，在不同浓度下精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.06~0.45 % 和 1.06~4.96 % 之间，结果表明仪器精密度良好；方法检出限和方法定量限分别介于 0.01~22.8 μg/L 和 0.03~68.4 μg/L 之间。

关键词：高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪粮食真菌毒素

真菌毒素 (Mycotoxins) 是产毒真菌在一定环境条件下产生的次级代谢产物，广泛污染农作物、食品及饲料等植物源性产品。可引起人类和动物急性或慢性中毒，部分已被证实具有致癌、致畸、致细胞突变的“三致”作用。目前已知的真菌毒素有 200 多种，按其主要产毒菌种可分为曲霉毒素 (如黄曲霉毒素、棕曲霉毒素等)、青霉菌毒素和镰刀菌毒素 (如 T-2 毒素、HT-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等) 等几大类。我国、

欧盟以及美国对粮食中各种毒素的限量和检测手段趋于严格。

本文参考粮油系统《粮油中多种真菌毒素的测定液相色谱 - 三重四极杆串联质谱法》行标验证中的要求，使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了粮食中十六种常见真菌毒素的超高效液相色谱 - 三重四级杆串联质谱联用的分析方法，供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为：LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×75 mm L, 1.6μm 粒径

流动相：A 相 -0.02 % 甲酸和 2mM 乙酸铵水溶液；
B 相 - 甲醇

流速：0.3 mL/min

进样体积：3 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20 %，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.0	Pumps	Pump B Conc	20
11.0	Pumps	Pump B Conc	35
13.0	Pumps	Pump B Conc	50
14.0	Pumps	Pump B Conc	50
18.0	Pumps	Pump B Conc	95
20.0	Pumps	Pump B Conc	95
20.1	Pumps	Pump B Conc	10
21.0	Pumps	Pump B Conc	10
21.1	Pumps	Pump B Conc	20
24.0	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正负离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV; -3.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250°C

加热模块温度: 450°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 10 ms

延迟时间: 1 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 化合物信息和MRM参数

编号	中文名称	英文名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	雪腐镰刀菌烯醇	Nivalenol (NIV)	-	357.2	281.1*	16	15	19
					311.3	16	10	21
2	¹³ C-雪腐镰刀菌烯醇	¹³ C-NIV	-	372.2	295.1	16	15	19
3	脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷	Deoxynivalenol-3 -glucoside (DON-3-G)	131180-21-7	476.2	297.1*	-23	-13	-20
					459.1	-23	-7	-22
4	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol (DON)	51481-10-8	297.0	249.1*	-30	-11	-16
					203.1	-30	-16	-13
5	¹³ C-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	¹³ C-DON	-	312.0	263.1	-30	-11	-16
6	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyldeoxynivalenol (3-AcDON)	50722-38-8	339.0	231.1*	-16	-14	-25
					203.0	-16	-18	-21
7	¹³ C-3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	¹³ C-3-AcDON	-	356.0	245.1	-16	-14	-25
8	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxynivalenol (15-AcDON)	88337-96-6	339.0	321.0*	-16	-8	-22
					137.1	-16	-11	-26
9	黄曲霉毒素G2	Aflatoxin G2 (AFG2)	7241-98-7	331.1	313.1*	-17	-21	-27
					245.0	-17	-28	-26
10	¹³ C-黄曲霉毒素G2	¹³ C-AFG2	-	348.1	330.1	-17	-21	-27
11	黄曲霉毒素G1	Aflatoxin G1 (AFG1)	1165-39-5	329.1	243.1*	-16	-26	-25
					311.1	-16	-22	-21
12	¹³ C-黄曲霉毒素G1	¹³ C-AFG1	-	346.1	257.1	-16	-26	-25
13	黄曲霉毒素B2	Aflatoxin B2 (AFB2)	7220-81-7	315.1	287.1*	-16	-25	-19
					259.0	-16	-31	-26
14	¹³ C-黄曲霉毒素B2	¹³ C-AFB2	-	332.1	303.1	-16	-25	-19
15	黄曲霉毒素B1	Aflatoxin B1 (AFB1)	1162-65-8	313.1	241.0*	-30	-38	-23
					213.0	-30	-44	-21
16	¹³ C-黄曲霉毒素B1	¹³ C-AFB1	-	330.1	255.0	-30	-38	-23

17	HT-2毒素	HT2 toxin	26934-87-2	442.3	263.1*	-17	-12	-28
					215.1	-17	-12	-22
18	¹³ C-HT-2毒素	¹³ C-HT-2	-	464.3	278.1	-17	-12	-28
19	T-2毒素	T-2 toxin	26934-87-2	484.3	185.1*	-18	-20	-19
					189.1	-18	-14	-21
20	¹³ C-T-2毒素	¹³ C-T-2	-	508.3	322.1	-18	-20	-19
21	玉米赤霉烯酮	Zearalmonone (ZON)	17924-92-4	326.2	175.2*	14	24	17
					273.1	14	19	30
22	¹³ C-玉米赤霉烯酮	¹³ C-ZON	-	335.1	185.1	14	24	17
23	赭曲霉毒素A	Ochratoxins A (OTA)	303-47-9	404.10	238.9*	-20	-25	-24
					358.1	-20	-15	-24
24	¹³ C-赭曲霉毒素A	¹³ C-OTA	-	424.1	250.0	-20	-25	-24
25	杂色曲霉毒素	Sterigmatocystin (ST)	-	325.1	310.1*	-23	-25	-21
					281.1	-23	-40	-30
26	¹³ C-杂色曲霉毒素	¹³ C-ST	-	343.1	327.1	-23	-25	-21
27	伏马毒素B1	Fumonisin B1 (FB1)	116355-83-0	722.4	352.3*	-50.0	-26.0	-41.0
					334.2	-50.0	-26.0	-43.0
28	¹³ C-伏马毒素B1	¹³ C-FB1	-	756.5	356.4	-50.0	-26.0	-41.0
29	伏马毒素B2	Fumonisin B2 (FB2)	116355-84-1	706.4	336.3*	-50.0	-26.0	-42.0
					318.3	-50.0	-26.0	-41.0
30	¹³ C-伏马毒素B2	¹³ C-FB2	-	740.4	358.4	-50.0	-26.0	-42.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

样品前处理方法：准确称取 5 g (精确到 0.001 g) 样品于 50mL 离心管中，加入 20 mL 乙腈 - 水 - 乙酸 (80:19:1, 体积比) 溶液，并用旋涡混合器混匀，置于旋转摇床上振荡提取 30 分钟，然后以 3500 g 离心 10min，准确转移 0.5 mL 上清液于 2 mL 离心管中，加入 0.5 mL 水，旋涡混匀后，在 10℃ 下以 12000 转/分的转速下离心 15 min，液体过 0.2 μm 的聚四氟乙烯膜。取 180 μL 滤液，加入 20 μL 稳定同位素混合溶液，供超高效液相色谱 - 三重四极杆串联质谱测定时使用。

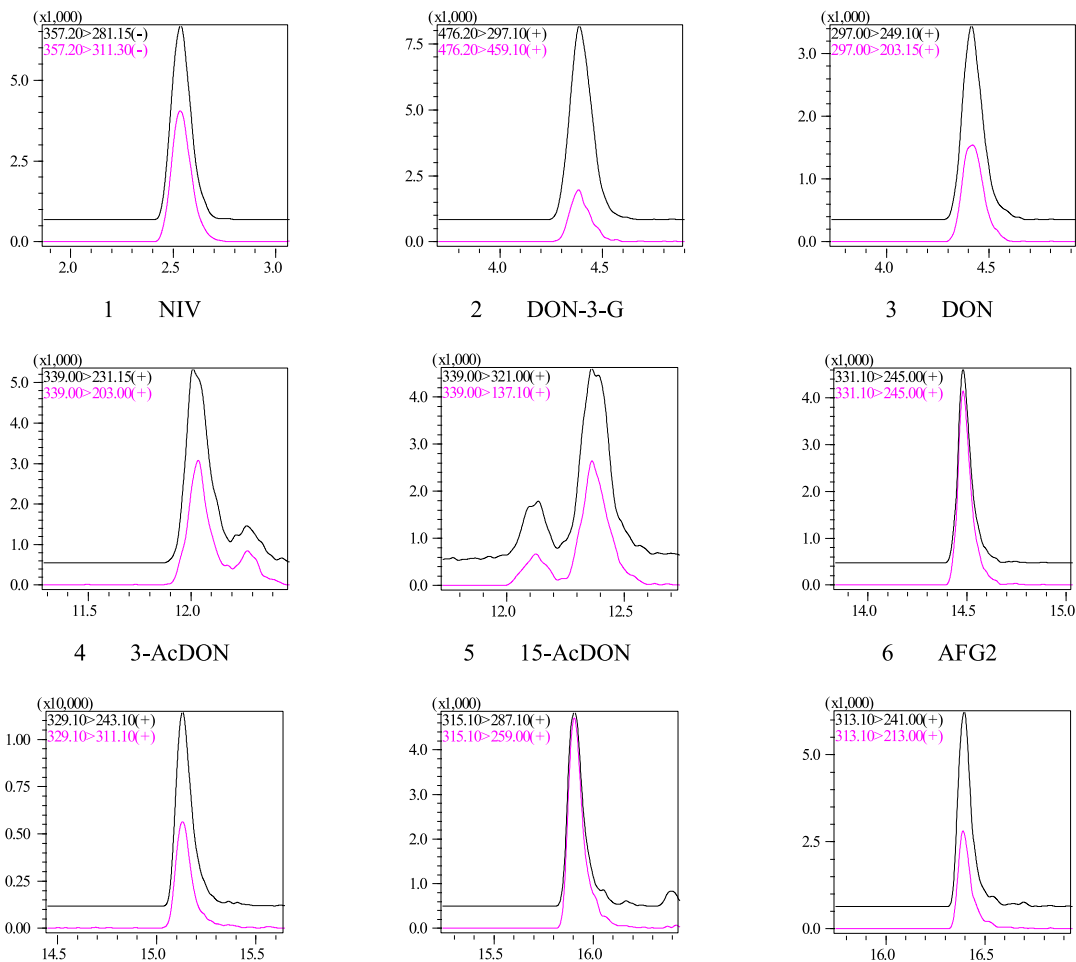
标准溶液配制：用甲醇配制如表 3 所示浓度的 16 种混合标准溶液的储备液。再用上述前处理方法处理的空白基质溶液稀释 5 倍、10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍，得到不同浓度的基质加标样品。取 180 μL 各浓度溶液，加入 20 μL 稳定同位素混合溶液。

表3 16种真菌毒素储备液浓度

毒素	标样浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	内标浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	毒素	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	内标浓度 ($\mu\text{g/mL}$)
NIV	40	20	AFB1	0.08	0.0893
DON	1.5	1.5	HT-2	0.5	1
DON-3-G	1.5	1.5	T-2	0.5	0.2
3-AcDON	4	4	ZEN	0.6	2
15-AcDON	2	2	OTA	0.05	0.1
AFG2	0.06	0.0334	ST	0.05	0.1
AFG1	0.08	0.1046	FBI	1	2
AFB2	0.04	0.0304	FB2	1	1

结果讨论

2.1 标准样品的MRM色谱图



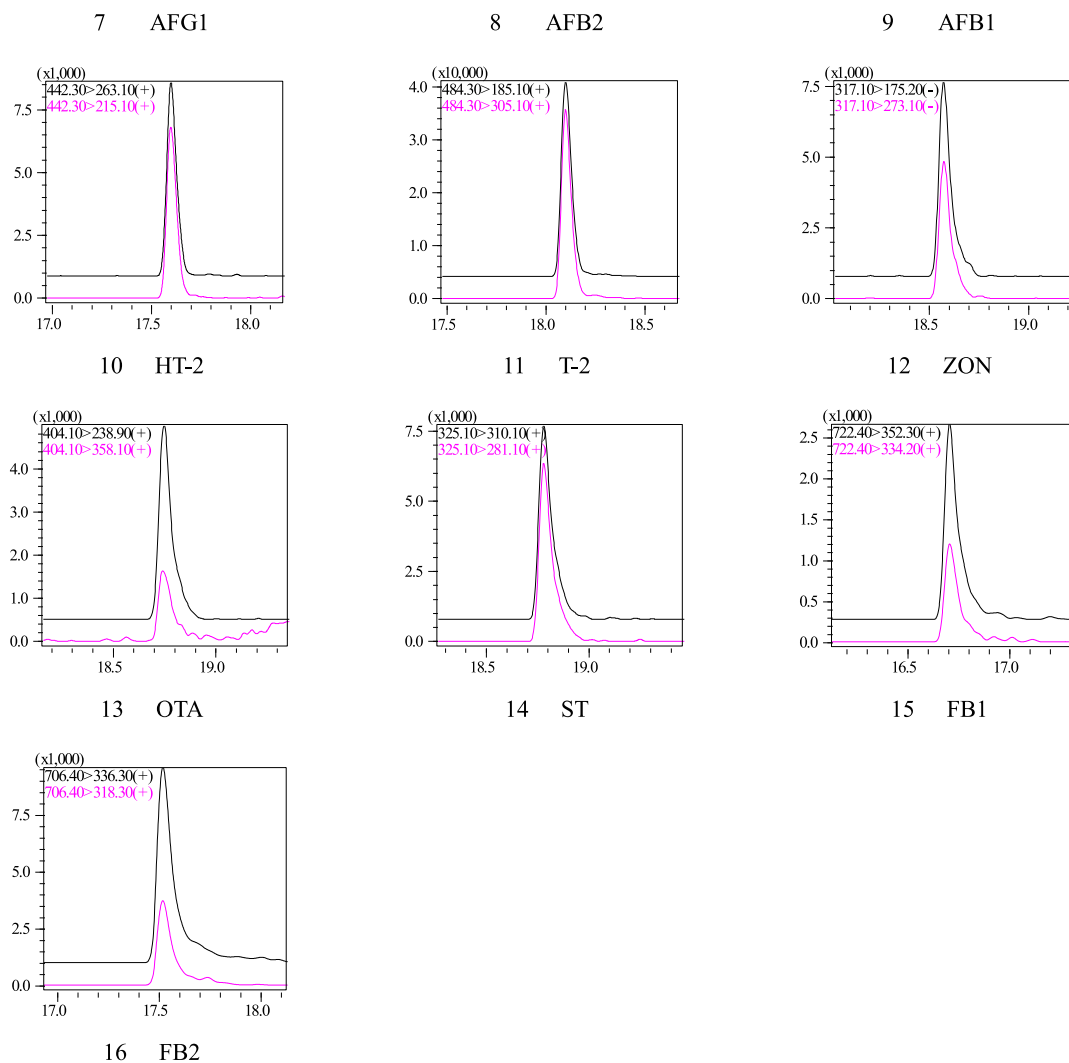
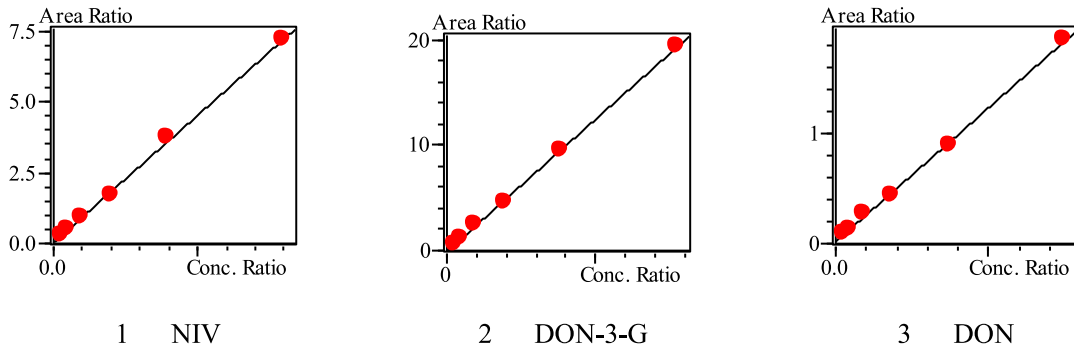


图 1 十六种真菌毒素标准样品的 MRM 色谱图 (20 倍稀释液)

2.2 线性关系

将配制的储备液用空白样品基质稀释 5 倍、10 倍、20 倍、40 倍、80 倍、160 倍，得到不同浓度的基质加标样品。取 180 μ L 各浓度溶液，加入 20 μ L 稳定同位素混合溶液。按 1.2 中的分析条件进行测定，内标法制作校准曲线，如下图所示线性良好。线性方程、相关系数和线性范围见表 4。



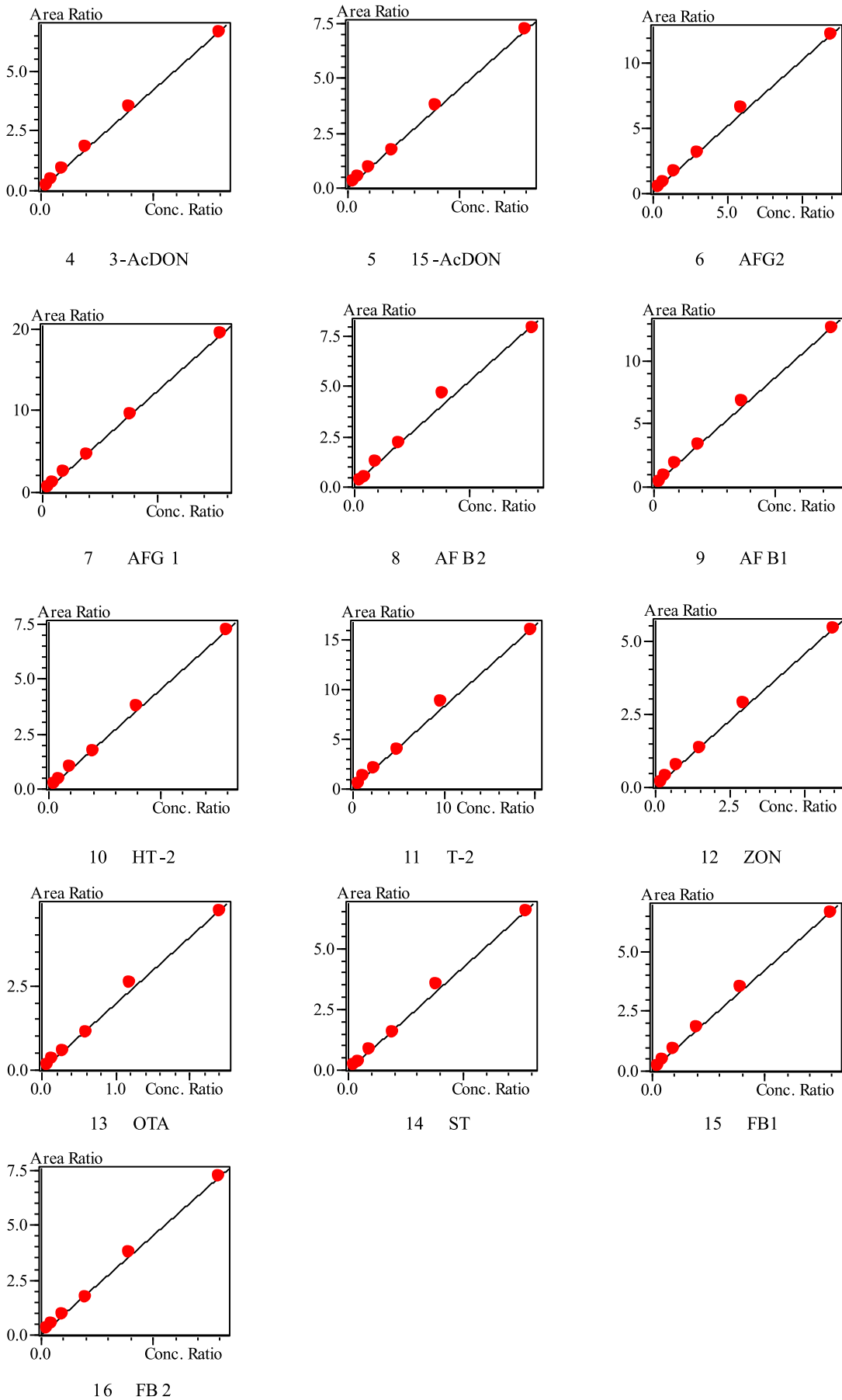


图2 十六种真菌毒素标准工作曲线

表 4 十六种真菌毒素的校准曲线参数

编号	名称	校准曲线	相关系数 R	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
1	NIV	$Y = (190823)X + (0.0082715)$	0.9986	22.80	68.40
2	DON	$Y = (1.21726)X + (0.0159579)$	0.9989	0.70	2.10
3	DON-3-G	$Y = (130170)X + (0.0524506)$	0.9980	2.00	6.00
4	3-AcDON	$Y = (0.829012)X + (0.0838775)$	0.9993	2.30	6.90
5	15-AcDON	$Y = (1.79807)X + (0.0382715)$	0.9997	3.00	9.00
6	AFG2	$Y = (1.01146)X + (0.143447)$	0.9997	0.40	1.20
7	AFG1	$Y = (1.25170)X + (-0.0722204)$	0.9998	0.20	0.60
8	AFB2	$Y = (1.01826)X + (0.181433)$	0.9981	0.02	0.06
9	AFB1	$Y = (0.849061)X + (0.197427)$	0.9977	0.01	0.03
10	HT-2	$Y = (0.898864)X + (0.0225015)$	0.9994	0.24	0.72
11	T-2	$Y = (0.817340)X + (0.142064)$	0.9991	0.11	0.33
12	ZON	$Y = (0.905326)X + (0.0268996)$	0.9993	0.18	0.54
13	OTA	$Y = (1.97356)X + (0.00257385)$	0.9991	0.21	0.63
14	ST	$Y = (1.69538)X + (-0.0130911)$	0.9991	0.05	0.15
15	FB1	$Y = (0.927354)X + (0.0164916)$	0.9997	0.98	2.95
16	FB2	$Y = (0.895026)X + (0.0248592)$	0.9995	1.02	3.06

2.3 精密度实验

对 1.3 中配制的不同浓度混合标准溶液连续 6 次进样, 考察仪器的精密度, 保留时间和峰面积的重复性结果如表 5 所示。2 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.45 % 和 1.06~4.96 % 之间, 仪器精密度良好。

表 5 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	样品名称	RSD% (10倍稀释液)		RSD% (80倍稀释液)	
		R.T	Area	R.T	Area
1	NIV	0.45	3.90	0.18	3.70
2	DON	0.42	4.96	0.13	3.77
3	DON-3-G	0.15	3.05	0.12	3.29
4	3-AcDON	0.18	2.14	0.09	4.18
5	15-AcDON	0.08	2.84	0.08	3.64
6	AFG2	0.07	3.74	0.09	3.40
7	AFG1	0.15	4.82	0.09	4.27
8	AFB2	0.11	3.03	0.08	3.91
9	AFB1	0.17	2.10	0.08	1.06
10	HT-2	0.06	3.87	0.07	3.71
11	T-2	0.17	2.52	0.09	2.47
12	ZON	0.15	3.27	0.08	2.13
13	OTA	0.13	3.75	0.08	1.85
14	ST	0.19	2.73	0.12	1.40
15	FB1	0.20	2.78	0.17	2.47
16	FB2	0.22	3.12	0.12	3.12

2.4 灵敏度分析

按照 1.3 中方法，将储备液用基质稀释 80 倍后进样分析，16 种真菌毒素的最低检出限（S/N=3，LOD 表示）、最低定量限（S/N=10，LOQ 表示）结果如表 5 所示。

2.5 基质加标实验

用完全空白糙米基质按照 1.3 进行处理后加混标至浓度为 80 倍稀释液浓度，平行 3 份样品测定回收率和 RSD。具体结果如表 6，样品加标回收率在 91.3~107.9 % 之间。

表6 加标样的回收率结果 (n=3)

No.	样品名称	回收率 (%)	RSD%
1	NIV	95.1	4.37
2	DON	93.7	3.87
3	DON-3-G	96.2	3.40
4	3-AcDON	107.9	3.54
5	15-AcDON	106.3	4.47
6	AFG2	91.3	4.81
7	AFG1	92.4	3.94
8	AFB2	94.6	2.52
9	AFB1	95.6	3.30
10	HT-2	103.2	5.07
11	T-2	106.6	4.66
12	ZON	106.2	5.18
13	OTA	105.3	3.40
14	ST	105.0	4.85
15	FB1	91.8	3.02
16	FB2	95.0	3.67

■ 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定粮食中十六种真菌毒素的方法。该方法在 24 min 内完成黄曲霉毒素、呕吐毒素、付马毒素等十六种真菌毒素的分离。不同浓度的精密密度实验结果表明：保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.45 % 和 1.06~4.96 % 之间，仪器精密密度良好；基质加标校准曲线相关系数均大于 0.995，方法检出限和方法定量限分别介于 0.01~22.8 μg/L 和 0.03~68.4 μg/L 之间。该方法分析速度快、重复性好、灵敏度高，适合粮食中真菌毒素的高灵敏度检测。