

LCMS-8050 测定谷物中的十六种真菌毒素

LCMSMS-499

摘要： 本文建立了一种简单净化 - 稳定同位素稀释 - 液相色谱串联质谱联用同时检测谷物中 16 种真菌毒素的方法。该方法在 25 min 内完成 16 种常见真菌毒素的分离，使用内标法定量分析。在小麦和玉米基质中内标法 16 种真菌毒素线性良好，校准曲线相关系数均大于 0.995；峰面积的相对标准偏差在 1.13~9.07% 之间，仪器精密度良好；方法检出限和定量限分别介于 0.004~2.166 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.011~6.563 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间，能够满足日常分析要求。

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《LS/T 6133-2018 粮油检验 主要谷物中 16 种真菌毒素的测定 液相色谱 - 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 LCMS-8050 联用，建立了谷物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

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 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-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 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：UHPLC C₁₈ 2.1 mmI.D.×100 mmL., 1.6 μm

流动相：A 相 - 水 (含 1% 乙酸，5 mM 乙酸铵)；B 相 - 甲醇

流速：0.4 mL/min

进样体积：1 μL

柱温：35 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	10
3.00	Pumps	Pump B Conc.	20
7.00	Pumps	Pump B Conc.	24
10.50	Pumps	Pump B Conc.	30
13.50	Pumps	Pump B Conc.	60

15.00	Pumps	Pump B Conc.	70
18.00	Pumps	Pump B Conc.	75
18.10	Pumps	Pump B Conc.	95
21.90	Pumps	Pump B Conc.	95
22.00	Pumps	Pump B Conc.	10
25.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8050

离子源: ESI, 正负离子同时

接口电压: +4.5 kV; -3.5 kV

雾化气: 氮气 3 L/min

加热模块温度: 400 °C

干燥气: 氮气 5.0 L/min

DL 温度: 250 °C

加热气: 空气 10 L/min

接口温度: 300 °C

接口温度: 300 °C

碰撞气: 氦气

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

MRM 参数: 见表 2

表 2 化合物信息和 MRM 参数

	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)	23282-20-4	357.2	281.2*	13	13	28
					311.2	13	10	30
2	¹³ C- 雪腐镰刀菌烯醇	¹³ C-NIV	-	372.2	295.0	13	13	28
3	脱氧雪腐镰刀菌烯醇 -3- 葡萄糖苷	Deoxynivalenol-3- glucoside(DON-3-G)	131180-21-7	503.0	427.1*	26	20	29
					457.1	26	15	30
4	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol (DON)	51481-10-8	297.1	249.1*	-21	-11	-25
					203.1	-21	-16	-20
5	¹³ C- 脱氧雪腐镰刀菌 烯醇	¹³ C-DON	-	312.0	263.1	-21	-11	-25
6	3- 乙酰基脱氧雪腐镰 刀菌烯醇	3-Acetyldeoxyniva- lenol (3-AcDON)	50722-38-8	339.2	231.1*	-30	-14	-25
					213.1	-30	-19	-22
7	¹³ C-3- 乙酰基脱氧雪腐 镰刀菌烯醇	¹³ C-3-AcDON	-	356.2	245.0	-30	-14	-25
8	15- 乙酰基脱氧雪腐 镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxyniva- lenol (15-AcDON)	88337-96-6	356.2	339.1*	-18	-9	-23
					321.1	-18	-14	-22
9	黄曲霉毒素 G ₂	Aflatoxin G ₂ (AFG ₂)	7241-98-7	331.3	313.1*	-30	-24	-21
					245.0	-30	-30	-25
10	¹³ C- 黄曲霉毒素 G ₂	¹³ C-AFG ₂	-	348.2	259.1	-30	-30	-25
11	黄曲霉毒素 G ₁	Aflatoxin G ₁ (AFG ₁)	1165-39-5	329.1	243.0*	-30	-28	-25
					200.0	-30	-41	-20
12	¹³ C- 黄曲霉毒素 G ₁	¹³ C-AFG ₁	-	346.2	257.0	-30	-28	-25
13	黄曲霉毒素 B ₂	Aflatoxin B ₂ (AFB ₂)	7220-81-7	315.1	287.0*	-30	-26	-30
					259.0	-30	-30	-26

14	¹³ C- 黄曲霉毒素 B ₂	¹³ C-AFB ₂	-	332.1	303.1	-30	-26	-30
15	黄曲霉毒素 B ₁	Aflatoxin B ₁ (AFB ₁)	1162-65-8	313.1	285.0*	-30	-24	-30
16	¹³ C- 黄曲霉毒素 B ₁	¹³ C-AFB ₁	-	330.2	301.0	-30	-24	-30
17	HT-2 毒素	HT-2 toxin	26934-87-2	447.2	345.1*	-23	-19	-24
18	¹³ C- HT-2 毒素	¹³ C- HT-2	-	464.3	285.1	-23	-21	-29
19	T-2 毒素	T-2 toxin	26934-87-2	489.2	245.0*	-18	-28	-25
20	¹³ C- T-2 毒素	¹³ C- T-2	-	508.3	387.0	-18	-22	-27
21	玉米赤霉烯酮	Zearalmonone(ZON)	17924-92-4	317.2	322.1	-30	-14	-21
22	¹³ C- 玉米赤霉烯酮	¹³ C-ZON	-	335.1	175.2*	16	24	29
23	赭曲霉毒素 A	Ochratoxins A(OTA)	303-47-9	404.10	131.1	16	29	22
24	¹³ C- 赭曲霉毒素 A	¹³ C- OTA	-	424.1	185.0	16	24	29
25	杂色曲霉毒素	Sterigmatocystin(ST)	-	325.1	239.0*	-21	-24	-24
26	¹³ C- 杂色曲霉毒素	¹³ C-ST	-	343.1	221.0	-21	-35	-22
27	伏马毒素 B ₁	Fumonisin B ₁ (FB ₁)	116355-83-0	722.4	250.0	-21	-24	-24
28	¹³ C- 伏马毒素 B ₁	¹³ C-FB ₁	-	756.5	281.0*	-30	-40	-30
29	伏马毒素 B ₂	Fumonisin B ₂ (FB ₂)	116355-84-1	706.4	310.0	-30	-30	-30
30	¹³ C- 伏马毒素 B ₂	¹³ C-FB ₂	-	740.4	327.1	-30	-30	-30
					334.2*	-40.0	-420	-23.0
					352.2	-40.0	-38.0	-24.0
					356.4	-50.0	-26.0	-41.0
					336.2*	-40.0	-38.0	-23.0
					318.2	-40.0	-39.0	-22.0
					358.4	-40.0	-38.0	-23.0

注：* 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 0.01 g) 样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈-水-乙酸(70:29:1, 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 min, 然后以 6000 转 / 分的转速下离心 10 min, 准确转移 0.5 mL 上清液于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 水, 旋涡混匀后, 在 4 °C 下以 12000 转 / 分的转速下离心 10 min, 上清液过 0.2 μm 的聚四氟乙烯滤膜。吸取 20 μL 稳定同位素混合溶液(吸取前要先涡旋混匀, 确保毒素内标分散均匀) 于 400 μL 内插管中, 再加 180 μL 滤液(吸取前要先涡旋混匀), 混合后涡旋混匀或者上下摇匀(混匀时防止样品溶液流出) 供上机使用。

标准溶液配制: 用甲醇配制 16 种混合标准溶液的储备液。将配制的标准溶液用乙腈-水-乙酸混合液(35:64.5:0.5, 体积比) 稀释 2 倍、4 倍、10 倍、20 倍、40 倍、100 倍、200 倍, 得到不同浓度的标准曲线溶液。取 180 μL 各浓度溶液, 加入 20 μL 稳定同位素混合溶液。

表 3 16 种真菌毒素混合标准溶液及 14 种稳定同位素内标混合标准溶液浓度

名称	标样浓度 (μg/L)	内标浓度 (μg/mL)	名称	标样浓度 (μg/L)	内标浓度 (μg/mL)
NIV	2000	25	AFB ₁	10	0.5
DON	1500	25	HT-2	100	25
DON-3-G	250	-	T-2	20	25
3-AcDON	400	25	ZEN	200	25
15-AcDON	200	-	OTA	20	10
AFG ₂	3	0.5	ST	10	25
AFG ₁	10	0.5	FB ₁	200	0.5
AFB ₂	3	1.03	FB ₂	100	0.3

结果与结论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

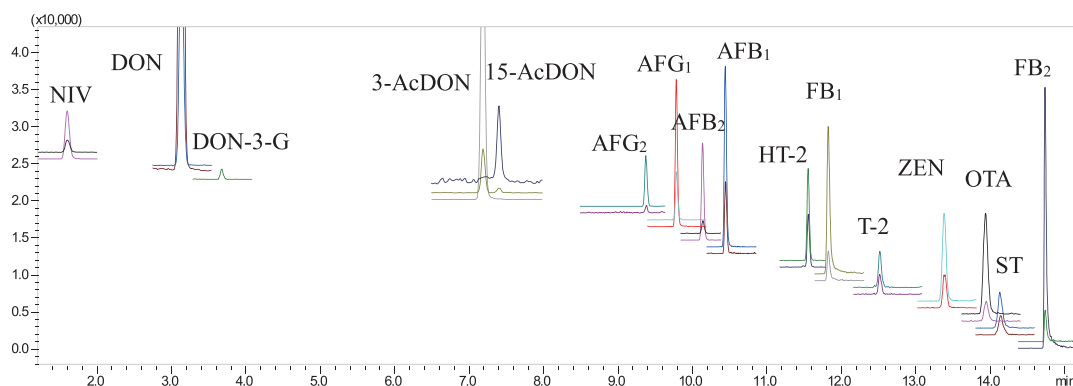


图 1 十六种真菌毒素及内标标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性范围

将 1.3 配制的不同浓度的基质加标样品，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。

表 4 玉米基质匹配标曲中 16 种真菌毒素的校准曲线参数

名称	校准曲线	相关系数 R	线性范围 (g/kg)	检出限 (g/kg)	定量限 (g/kg)
1 NIV	$Y = (0.913976)X + (-0.0120872)$	0.9999	10-2000	2.166	6.563
2 DON	$Y = (0.790915)X + (-0.00863826)$	0.9999	7.5-1500	1.097	3.324
3 DON-3-G	$Y = (0.163878)X + (-0.00288998)$	0.9980	1.25-250	0.220	0.883
4 3-AcDON	$Y = (0.861359)X + (-0.00233138)$	0.9999	2-400	0.200	0.605
5 15-AcDON	$Y = (2.69877)X + (0.0516297)$	0.9999	1-200	0.137	0.452
6 AFG ₂	$Y = (0.850905)X + (0.0343449)$	0.9999	0.015-3	0.004	0.012
7 AFG ₁	$Y = (0.893209)X + (-0.0184882)$	0.9999	0.05-10	0.004	0.011
8 AFB ₂	$Y = (0.899974)X + (0.0141992)$	0.9997	0.015-3	0.004	0.012
9 AFB ₁	$Y = (1.22817)X + (-0.00785653)$	0.9999	0.05-10	0.006	0.019
10 HT-2	$Y = (1.85576)X + (0.0311816)$	0.9999	0.5-100	0.008	0.255

11	T-2	$Y = (1.91762)X + (0.0469539)$	0.9995	0.1-20	0.037	0.084
12	ZON	$Y = (0.930621)X + (0.00760495)$	0.9999	1-200	0.140	0.425
13	OTA	$Y = (0.913616)X + (0.0140328)$	0.9999	0.1-20	0.042	0.127
14	ST	$Y = (3.73664)X + (-0.0745571)$	0.9998	0.05-10	0.011	0.033
15	FB ₁	$Y = (1.22817)X + (-0.00785653)$	0.9999	1-200	0.273	0.826
16	FB ₂	$Y = (0.899974)X + (0.0141992)$	0.9997	0.5-100	0.115	0.328

2.3 灵敏度实验

按照 1.3 中方法, 将储备液用基质稀释 200 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 4 所示。

2.4 精密度和回收率实验

对高低 2 个加标水平下的玉米和小麦样品按照 1.3 处理, 平行 6 次进样, 峰面积的重复性在 2.11~9.07% 之间, 精密度良好, 结果如表 4 所示。小麦和玉米基质的 2 个加标水平的回收率在 88.52~119.77% 之间, 回收率良好, 结果如表 5 所示。

表 5 小麦和玉米基质中峰面积重复性和加标回收率结果 (n=6)

化合物	加标水平 (g/kg)	玉米		小麦	
		回收率 % (n=6)	RSD% (n=6)	回收率 % (n=6)	RSD% (n=6)
DON	36	106.05	2.12	115.83	2.48
	360	102.77	3.45	103.00	2.11
3-AcDON	10	106.67	3.55	101.47	5.59
	100	101.99	3.51	96.50	2.27
T-2	0.5	105.75	5.82	119.77	5.92
	5	98.75	3.78	119.51	3.18
15-AcDON	5	106.03	6.51	94.69	7.36
	50	103.52	5.96	95.04	2.96
HT-2	2.5	114.85	3.99	111.77	3.28
	25	112.03	3.78	114.55	3.22
AFB ₁	0.22	103.66	2.59	111.42	2.78
	2.2	101.24	2.51	110.24	2.20
AFB ₂	0.076	100.55	9.07	114.97	6.32
	0.76	105.32	7.01	116.50	5.79
AFG ₁	0.26	103.78	3.11	112.73	3.47
	2.6	104.97	3.18	111.52	2.55
AFG ₂	0.084	102.89	8.63	115.67	8.75
	0.84	105.39	8.72	116.74	8.31
FB ₁	5	113.79	4.03	88.88	4.35
	50	102.20	5.51	89.66	4.33
FB ₂	2.5	105.42	6.26	93.96	6.18
	25	107.10	5.91	88.52	3.23

OTA	0.5	100.60	6.74	98.33	5.53
	5	102.56	5.33	100.49	3.84
ST	0.25	107.05	3.89	108.92	3.65
	2.5	102.03	4.87	107.13	3.45
NIV	50	96.67	4.14	95.19	6.19
	500	97.16	3.54	95.33	5.56
DON-3-G	6.25	117.84	3.23	98.54	4.60
	62.5	113.43	3.73	98.05	5.50
ZON	5	108.41	2.93	106.16	2.19
	50	100.39	3.30	96.58	3.19

■ 结论

建立了一种简单净化 - 液相色谱串联质谱联用同时检测谷物中 16 种真菌毒素的方法。使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用，该方法在 25 min 内完成十六种真菌毒素的分离。不同浓度的精密度实验结果表明：峰面积的相对标准偏差在 1.13~9.07% 之间，仪器精密度良好；内标法标校准曲线相关系数均大于 0.995，线性良好；方法检出限和方法定量限分别介于 0.004~2.166 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.011~6.563 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。该方法前处理快速、操作简单、重复性好、灵敏度高，适合谷物中真菌毒素的高灵敏度检测。

岛津应用云

