

# QuEChERS样品前处理结合LC-MS/MS 测定粮谷中的12种真菌毒素

彭倩, 金琦芸, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

## 关键词

真菌毒素, 食品, HyperSep, QuEChERS, Accucore aQ

## 摘要

本文采用QuEChERS样品前处理, 结合液相色谱串联三重四极杆质谱平台建立了粮谷中12种真菌毒素的快速检测方法。前处理净化方法, 操作简单, 重复性好, 回收率高。使用Accucore aQ表面多孔增强核色谱柱, 增强了对极性化合物的保留及选择性, 峰形良好。采用LC-MS/MS方法, 15min内快速完成低浓度真菌毒素的分析, 并获得较好的回收率, 回收率范围60-110%, LOD为 0.1-2 ug/kg, 该方法完美适合于粮谷中多种真菌毒素的分析。

## 1. 引言

真菌毒素是真菌在适宜条件下产生的有毒次级代谢产物, 能够引发人类、动物各种急、慢性疾病。我国高度重视真菌毒素污染问题, GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量 规定了食品中黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、展青霉素、赭曲霉毒素A及玉米赤霉烯酮的限量指标。据报道我国每年有3100万吨粮食在生产、储存、运输过程中被真菌污染, 约占粮食年总产量的6.2%。为了保证我国粮食质量安全, 避免不必要的经济损失, 及时快速监测调查真菌毒素污染种类、水平及其风险尤为重要。

由于真菌毒素种类多样, 且存在协同污染, 为确保全面、快速的了解粮食中真菌毒素的污染情况, 迫切需要一种简单、快速、灵敏、同时准确测定粮食中多种真菌毒素的方法。目前真菌毒素的前处理检测方法主要有酶联免疫吸附法、免疫亲和柱

方法等。基于抗原抗体相互作用的酶联免疫吸附法虽有较高的选择性, 但无法准确定量, 同时由于前处理简单, 没有有效的净化, 易受基质干扰, 产生假阳性。免疫亲和柱前处理净化方法由于其特异性吸附, 净化效果好, 但是一方面操作复杂, 另外一方面成本较高, 不适合大规模检测。

本文使用QuEChERS作为前处理净化方法, 操作简单, 重复性好, 回收率高。采用Accucore AQ HPLC 色谱柱分离, 表面多孔增强核技术的运用, 兼容100%水相, 同时增强了对极性化合物的保留及选择性。采用LC-MS/MS方法, 15min内快速完成低浓度真菌毒素的分析, 该方法完美适合于粮谷中多种真菌毒素的分析检测。

## 2. 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000

2.1.2 三重四极杆质谱仪

2.1.3 乙腈(色谱纯, 美国Thermo Fisher公司); 实验用水为超纯水(18.2 mΩ); 甲酸(LCMS纯, 美国Thermo Fisher公司)

2.1.4 12种真菌毒素标准品均购自有信誉的标准品公司

### 2.2 化合物信息及溶液配制

2.2.1 储备液: 分别精确所有标准品适量, 甲醇溶解, 配制储备液 100 µg/mL。

2.2.2 工作液: 以2% 甲酸乙腈为溶剂, 配制成一定浓度标准溶

液 (0.25 ng/mL – 100 ng/mL)

### 2.3 色谱条件

色谱柱: Accucore aQ, 100 × 2.1 mm, 2.6 μm

(P/N 17326-102130)

柱温: 35 °C;

进样量: 10 μL;

流动相: A:0.1% 甲酸水 B:0.1% 甲酸乙腈

梯度洗脱程序 (表1)

表1. 梯度洗脱程序

时间min	A %	B %	流速 mL/min
Initial	95	5	0.3
0.8	95	5	0.3
10	50	50	0.3
10.2	5	95	0.3
12.2	5	95	0.3
12.5	95	5	0.3
15	95	5	0.3

### 2.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源。

质谱扫描方式: 多重反应监测模式 (MRM)。

锥孔电压: 3.0 kV。

加热气温度: 500°C。

离子源温度: 150°C。

脱溶剂气: 800 L/H

选择反应监测离子对信息见表2。

表2. 化合物及质谱采集参数

化合物名称	英文名称	缩写	母离子	锥孔电压	子离子	碰撞能量	离子化模式
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	DON	297.15*	20	297.15	16	ESI+
			297.15	20	203.15	10	
15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxynivalenol-D3	15-AcDON	339.19*	18	137.07	9	ESI+
			339.19	18	321.14	7	
3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyldeoxynivalenol	3-AcDON	339.12*	17	203.1	13	ESI+
			339.12	17	231.1	13	
黄曲霉毒素G2	Aflatoxin G2	AFG2	330.93*	36	244.9	25	ESI+
			330.93	36	313	25	
HT-2毒素	HT-2	HT-2	425.2*	45	245.1	12	ESI+
			425.2	45	263.1	12	
黄曲霉毒素B2	Aflatoxin B2	AFB2	315.09*	42	259.06	30	ESI+
			315.09	42	287.09	24	
黄曲霉毒素G1	Aflatoxin G1	AFG1	329.06*	36	243.1	28	ESI+
			329.06	36	311.1	20	
黄曲霉毒素B1	Aflatoxin B1	AFB1	313.07*	37	241.1	35	ESI+
			313.07	37	285	20	
T2-毒素	T2	T2	484.26*	15	185.12	17	ESI+
			484.26	15	305.17	15	
玉米赤霉烯酮	Zearalenone	ZEN	319.15*	17	187.06	19	ESI+
			319.15	17	283.13	11	
杂色曲霉毒素	sterigmatocystin	ST	325.09*	33	281.08	31	ESI+
			325.09	33	310.06	25	
赭曲霉毒素A	Ochratoxin A	OTA	404.12*	21	239.04	27	ESI+
			404.12	21	358.12	13	

注: \*表示定量离子

### 2.5 样品前处理

#### 2.5.1 样品提取:

- 1) . 称取5g均质后的样品放入50mL离心管中, 加入10 mL 水, 震荡15 min
- 2) . 再加入 10 mL 2%甲酸乙腈, 旋涡混合1min
- 3) . 加入 HyperSep 萃取盐包 (P/N 60105-332-B: 4g MgSO<sub>4</sub>, 1g NaCl), 快速震荡1 min.
- 4) . ≥ 3000 g 离心5 min

#### 2.5.2 样品净化:

- 1) . 移取 1 mL 上清液到HyperSep 净化管中 (P/N: 60105-204-B: QUECHERS 2mL 离心管 带150mg MgSO<sub>4</sub>, 50mg PSA 50mg C18 ), 震荡30 s, ≥ 3000 g 离心5 min
- 2) . 移取 500 μL 净化液, 使用纯水稀释4倍, 过0.2 μm 滤膜后上机检测。



### 3. 实验结果与讨论

#### 3.1. 样品谱图

#### 3.1.1 纯标准品色谱图（见图1）：

#### 3.1.2 玉米加标色谱图（见图2）：

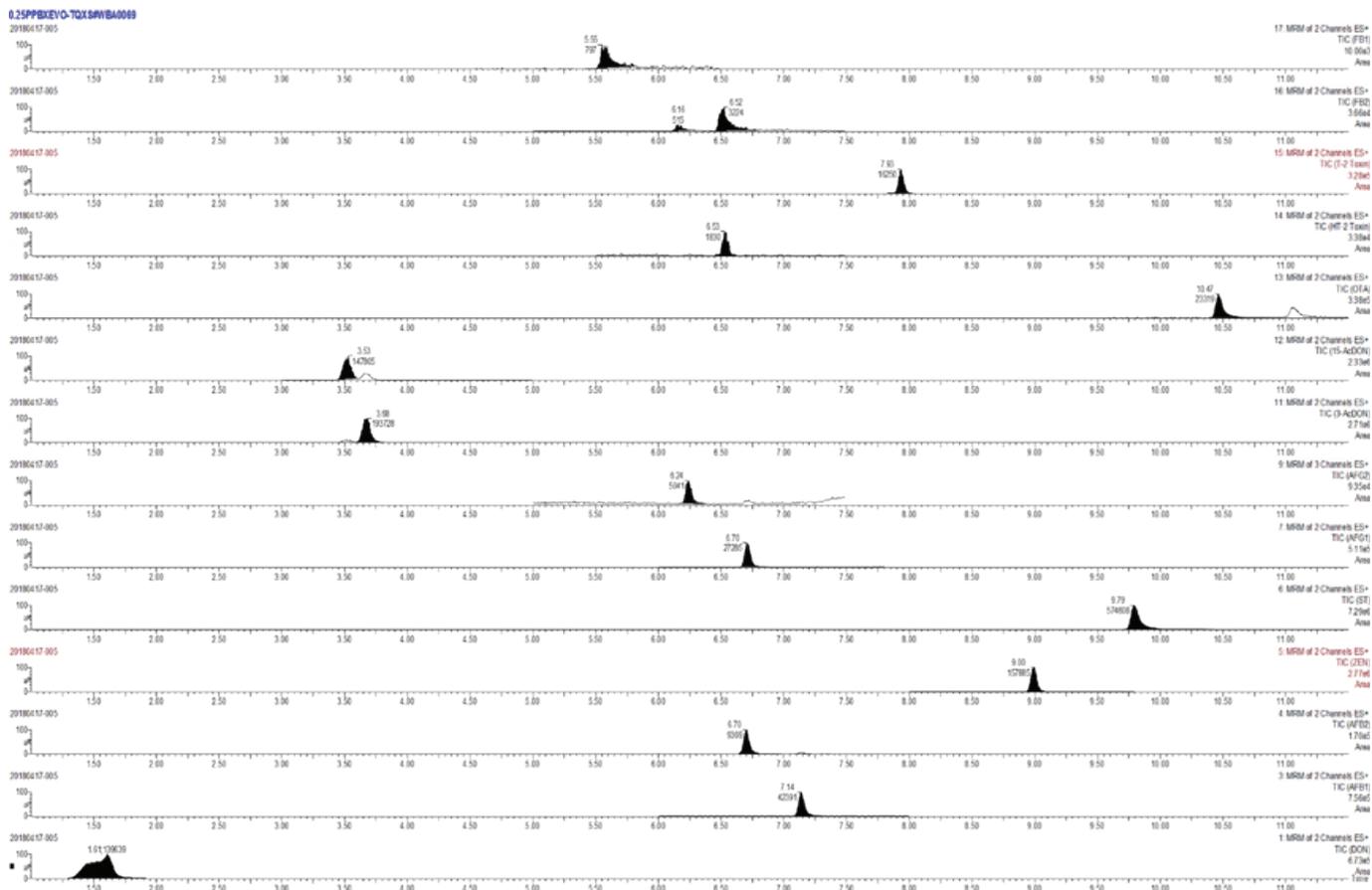


图1. 12种真菌毒素标准溶液图谱（浓度见表3）

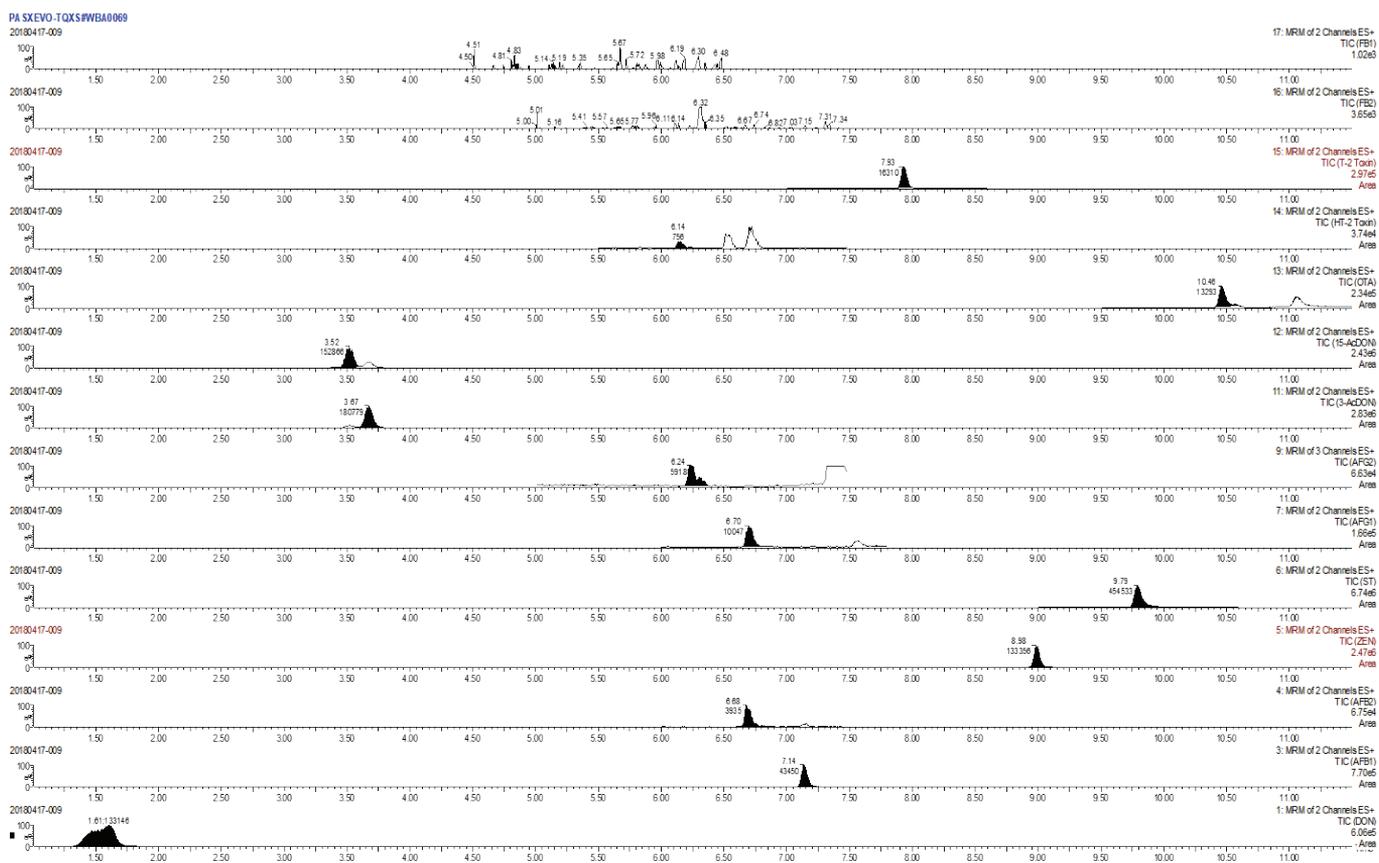


图2. 玉米中12种真菌毒素加标图谱（加标浓度见表3）

## 3.2. 结果与讨论

### 3.2.1 玉米中12种真菌毒素回收率数据及LOD详见表3

表3. 12种真菌毒素回收率数据及LOD

序号	化合物名称	英文名称	缩写	浓度 (ng/ml)	回收率 %	RSD (n=6)	LOD (ug/kg)
1	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	DON	100	94	10	1
2	15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxynivalenol	15-AcDON	100	102	8	2
3	3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyldeoxynivalenol	3-AcDON	100	100	9	2
4	黄曲霉毒素G2	Aflatoxin G2	AFG2	0.25	88	11	0.1
5	HT-2毒素	HT-2	HT-2	100	91	10	2
6	黄曲霉毒素B2	Aflatoxin B2	AFB2	0.25	64	15	0.1
7	黄曲霉毒素G1	Aflatoxin G1	AFG1	1	61	14	0.1
8	黄曲霉毒素B1	Aflatoxin B1	AFB1	1	97	7	0.1
9	T2-毒素	T2	T2	25	102	10	1
10	玉米赤霉烯酮	Zearalenone	ZEN	25	87	12	2
11	杂色曲霉毒素	sterigmatocystin	ST	10	84	13	2
12	赭曲霉毒素A	Ochratoxin A	OTA	1	68	15	0.5

### 3.2.2 试样溶液的测定

取2.5.2处理得到的待测溶液进样，外标法计算待测液中目标物质的质量浓度，然后计算样品中待测物的含量。

【注】试样中毒素含量超过GB 2761限量值时，需采用相应的单一毒素检测的标准方法进行确证。

### 3.2.3 定量方法选择

本文选择外标法定量，使用正离子模式监测；可以选择同位素内标进行定量，如果对化合物有干扰，可以选择负离子模式检测。

### 3.2.4 QuEChERS前处理优化

1) 样品前处理考虑了两种净化方式（包含GCB填料和不包含GCB填料），分别对纯标液进行处理，两种净化方式对DON、3-AcDON、15-AcDON、T-2、HT-2 均无吸附作用，可进行进一步样品净化实验。

2) 含GCB净化方式对AFB1、AFG2、ST、ZEN、AFG1、AFB2、OTA、ZEN、AFG1、AFB2、OTA、FB3、FB1、FB2 有很强的吸附性，不适合做多组分净化。

3) 最终选用不含GCB的净化方式，对DON、3-AcDON、15-AcDON、T-2、HT-2、AFB1、AFG2、ST、ZEN检测净化效果和回收率较好，适合多组分净化。

### 3.2.5 灵敏度测试

采用上述分析方法，12种真菌毒素在15 min内均可获得良好的

色谱峰，图1为12种真菌毒素标准溶液图谱（浓度见表3），各化合物灵敏度测试结果见表3，LOD在0.1-2ug/kg之间。

### 3.2.6 相对标准偏差RSD 测试

采用上述分析方法，对12种真菌毒素进行相对标准偏差测试（浓度见表3，n=6），实验结果证明，12种真菌毒素相对标准偏差RSD%均小于15%（见表3）

## 4. 总结

开发了一种快速简单的QuEChERS前处理方法用于粮谷中16种典型真菌毒素的分析，使用Accucore aQ表面多孔增强核色谱柱，增强了对极性化合物的保留及选择性，峰形良好。采用LC-MS/MS方法，15min内快速完成低浓度真菌毒素的分析，并获得较好的回收率，回收率范围60-110%，LOD为0.1-2 ug/kg，该方法完美适用于粮谷中多种真菌毒素的分析。

## 5. 参考文献

- 1 Determination of Multiple Mycotoxins in Grain Using a QuEChERS Sample Preparation Approach and LC-MS/MS Detection
2. GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量



赛默飞  
官方微信

热线 800 810 5118  
电话 400 650 5118  
www.thermofisher.com

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC