

# 采用三重四极杆复合离子阱质谱技术 ( QTRAP® ) 同时定性定量分析果蔬中41种真菌毒素

## Determination of 41 mycotoxins in vegetables and fruits by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole composite linear ion trap mass spectrometry

张小刚<sup>1</sup>, 汪弘康<sup>2</sup>, 王霞<sup>2</sup>, 杨总<sup>1</sup>, 刘冰洁<sup>1</sup>, 郭立海<sup>1</sup>

Zhang Xiaogang<sup>1</sup>, Wang Hongkang<sup>2</sup>, Wang Xia<sup>2</sup>, Yang Zong<sup>1</sup>, Liu Bingjie<sup>1</sup>, Guo Lihai<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SCIEX ( 中国 ), <sup>2</sup> 上海市农产品质量安全中心

<sup>1</sup> SCIEX China, <sup>2</sup> Shanghai Center of Agri-products Quality and Safety

**关键词:** LC-MS/MS, Mycotoxins, QTRAP®, Vegetables and Fruits

### 引言

真菌毒素是真菌在食品或饲料里生长所产生的代谢产物, 具有致癌、致畸、致死的特性, 对人类和动物危害非常大。近年来, 我国乃至世界范围内真菌毒素中毒事件时常发生, 给人们的生命安全带来较大的威胁。据统计, 中国已成为全球最大的水果、蔬菜生产国和消费国, 尤其水果产量占据全球约三分之一, 足见人们对该类产品的喜爱。然而, 果蔬在田间的生长过程以及采摘后的贮存, 运输和加工过程中, 易发生真菌性病害, 不仅可引起腐烂或腐败, 带来严重的经济损失, 部分病原菌还可能产生真菌毒素对人体造成潜在危害, 食品中毒事件也是屡见不鲜。目前真菌毒素检测标准较为分散, 不同的基质检测毒素不尽相同, 建立一种同时检测多个毒素的方法非常有必要。本文主要针对果蔬中真菌毒素检测问题, 在SCIEX液相色谱质谱联用系统上建立了41种真菌毒素的快速测定方法, 为果蔬中真菌毒素的检测提供了简单快速的解决方案。

### 该方法的优势和特点:

- 通量高:** 一针进样10min, 正负同时扫描, 轻松实现蔬菜基质中41种真菌毒素的测定, 种类远超当前的标准
- 方法学经过多次验证:** 方法回收率好, 稳定性好, 抗基质干扰强

- 采用MRM-IDA-EPI扫描, 不仅获得MRM定量数据, 同时得到每个出峰化合物的二级指纹图谱, 结合专门的真菌毒素二级数据库进行匹配, 排除假阳性和假阴性, 保证结果更加准确可靠 ( 图1和图2 )

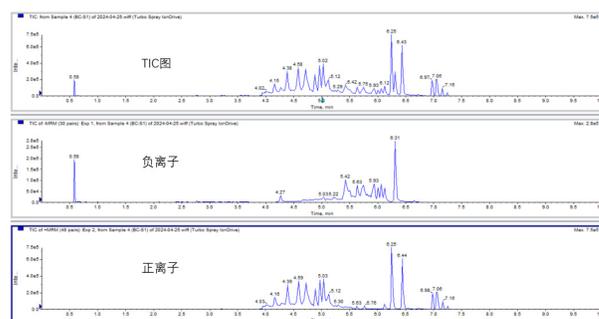


图1. MRM扫描下41种真菌毒素色谱图

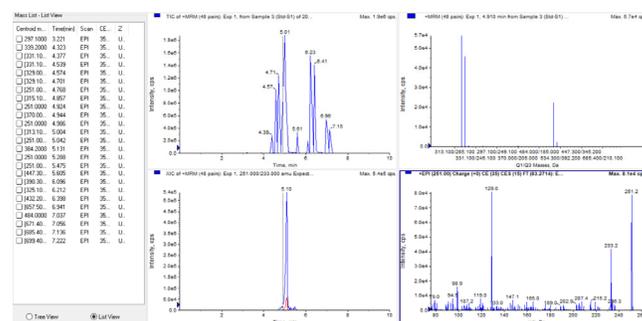


图2. EPI二级增强质谱图

## 1 实验方法

### 1.1 前处理条件

称取10 g试样（精确至0.01 g）于50 mL塑料离心管中，加入10.0 mL 1%甲酸乙腈溶液，剧烈振荡1 min，加入1颗陶瓷均质子、6 g无水硫酸镁、1.5 g氯化钠，剧烈振荡1 min，10000 r/min离心5 min。吸取一定量上清液加入净化材料（每毫升提取液加入10 mg C18，对于颜色较深的试样每毫升提取液另加入1 mg GCB），涡旋混匀1 min，3000 r/min离心5 min。吸取上清液5 mL，40℃氮吹至近干，加入1 mL定容液溶解残渣，过聚四氟乙烯滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。

### 1.2 液相色谱条件

色谱柱：C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)

流动相：A: 5mM 乙酸铵水溶液；B: 甲醇

流速：0.4 mL/min

柱温：40℃

梯度洗脱条件：见表1

表1. 液相梯度洗脱

时间(min)	水相 %	有机相 %
0.00	95	5.0
0.50	95	5.0
6.00	0.0	100
8.00	0.0	100
8.10	95	5.0
10.00	95	5.0

### 1.3 质谱条件

扫描模式：ESI源，正/负离子模式；化合物参数见表2

离子源参数：

气帘气CUR (psi) : 25                      温度TEM (°C) : 450

碰撞气CAD (psi) : High                  雾化气GS1 (psi) : 55

喷雾电压IS (V) : 4500/-4000          辅助雾化气GS2 (psi) : 50

碰撞能CE: 35 ± 15

表2. 化合物参数

名称	Name	简称	CAS号	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)	加和方式
黄曲霉毒素 B1	Aflatoxin B1	AFB1	1162-65-8	313.1	285.1/241.1	95	32/50	[M+H] <sup>+</sup>
黄曲霉毒素 B2	Aflatoxin B2	AFB2	7220-81-7	315.1	287.1/259.1	113	35/41	[M+H] <sup>+</sup>
黄曲霉毒素 G1	Aflatoxin G1	AFG1	1165-39-5	329.1	243.2/214.9	110	33/43	[M+H] <sup>+</sup>
黄曲霉毒素 G2	Aflatoxin G2	AFG2	7241-98-7	331.1	245.1/189.1	115	39/54	[M+H] <sup>+</sup>
黄曲霉毒素 M1	Aflatoxin M1	AFM1	6795-23-9	329.0	273.1/258.9	106	31/33	[M+H] <sup>+</sup>
黄曲霉毒素 M2	Aflatoxin M2	AFM2	6885-57-0	331.1	273.1/285.1	87	31/31	[M+H] <sup>+</sup>
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	DON	51481-10-8	297.1	249.1/231.1	35	15/16	[M+H] <sup>+</sup>
雪腐镰刀菌烯醇(瓜萎镰菌醇)	Nivalenol	NIV	23282-20-4	311.1	281.1/187.1	-80	-14/-29	[M-H] <sup>-</sup>
3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyl Deoxynivalenol	3-AcDON	50722-38-8	339.2	231.1/203.1	60	14/18	[M+H] <sup>+</sup>
15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyl Deoxynivalenol	15-AcDON	88337-96-6	339.2	321.1/137.0	60	10/16	[M+H] <sup>+</sup>
脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷	Deoxynivalenol-3-Glucoside	DON-3G	131180-21-7	457.2	427.2/247.1	-55	-19/-27	[M-H] <sup>-</sup>

表2. 化合物参数 (续)

名称	Name	简称	CAS号	母离子	子离子	去簇电压 (V)	碰撞能量 (eV)	加和方式
玉米赤霉烯酮	Zearalenone	ZEN	17924-92-4	317.1	175.0/131.1	-112	-31/-34	[M-H]-
玉米赤霉酮	Zearalanone	ZAN	5975-78-0	319.2	275.2/205.1	-112	-26/-30	[M-H]-
α-玉米赤霉烯醇	α-zearalenol	α-ZOL	36455-72-8	319.2	160.1/130.0	-110	-36/-40	[M-H]-
β-玉米赤霉烯醇	β-zearalenol	β-ZOL	71030-11-0	319.2	160.1/130.0	-110	-36/-40	[M-H]-
α-玉米赤霉醇	α-zearalanol	α-ZAL	26538-44-3	321.2	277.2/303.2	-112	-28/-25	[M-H]-
β-玉米赤霉醇	β-zearalanol	β-ZAL	42422-68-4	321.2	277.2/303.2	-112	-28/-25	[M-H]-
赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A	OTA	303-47-9	402.1	358.1/166.9	-80	-28/-47	[M-H]-
赭曲霉毒素 B	Ochratoxin B	OTB	4825-86-9	370.0	205.0/103.0	56	33/77	[M+H]+
赭曲霉毒素 C	Ochratoxin C	OTC	4865-85-4	432.2	358.1/239.0	80	23/37	[M+H]+
细交链酮酸	Tenuazonic acid	TeA	610-88-8	196.0	112.0/139.0	-75	-31/-26	[M-H]-
交链孢酚	Alternariol	AOH	641-38-3	257.0	215.2/213.1	-80	-36/-32	[M-H]-
交链孢酚单甲醚	Alternariol Monomethyl Ether	AME	26894-49-5	271.1	256.1/228.1	-80	-30/-40	[M-H]-
细格菌素	Altenusin	ALS	31186-12-6	289.1	245.0/230.0	-60	-22/-28	[M-H]-
腾毒素	Tentoxin	TEN	28540-82-1	413.4	141.0/271.2	-140	-24/-22	[M-H]-
交链孢霉烯	Altenuene	ALT	889101-41-1	291.1	229.0/247.1	-67	-20/-23	[M-H]-
交链孢毒素I	Altetoxins-I	ATX-I	56258-32-3	351.1	315.0/305.0	-110	-19/-26	[M-H]-
杂色曲霉素	Sterigmatocysin	STE	10048-13-2	325.1	310.1/281.0	116	33/50	[M+H]+
HT-2 毒素	HT-2 Toxin	HT-2	26934-87-2	442.3	263.2/215.2	30	16/16	[M+NH4]+
T-2 毒素	T-2 Toxin	T-2	21259-20-1	484.0	185.0/305.0	71	27/19	[M+NH4]+
展青霉素	Patulin	PAT	149-29-1	153.0	109.0/81.0	-40	-12/-16	[M-H]-
桔青霉素	Citrinin	CIT	518-75-2	251.0	233.0/205.0	26	25/34	[M+H]+
震颤真菌毒素(疣孢青霉原)	Verruculogen	VER	12771-72-1	534.3	392.2/191.1	150	17/29	[M+H]+
新茄病镰刀菌烯醇	Neosolaniol	NEO	36519-25-2	400.2	305.2/185.1	70	17/27	[M+NH4]+
二乙酰镰草镰刀菌烯醇(蛇形毒素)	Diacetoxyscirpenol	DIA	2270-40-8	384.2	105.1/307.2	40	60/15	[M+NH4]+
渥曼青霉素	Wortmannin	WOR	19545-26-7	447.3	345.2/285.1	60	24/29	[M+H]+
异烟棒曲霉素C	Roquefortine C	RC	58735-64-1	390.3	193.1/322.2	75	36/27	[M+H]+
恩镰孢菌素 A	Enniatin A	ENNA	2503-13-1	699.4	210.1/555.3	76	43/39	[M+NH4]+
恩镰孢菌素 A1	Enniatin A1	ENNA1	4530-21-6	685.4	210.1/668.3	66	41/25	[M+NH4]+
恩镰孢菌素 B	Enniatin B	ENNB	917-13-5	657.5	196.1/640.3	51	45/25	[M+NH4]+
恩镰孢菌素 B1	Enniatin B1	ENNB1	19914-20-6	671.4	196.0/654.3	81	43/25	[M+NH4]+

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱质谱条件优化

41种真菌毒素在不同流动相条件下峰型及响应值差异较大。本文比较了水-乙腈、2 mmol/L 甲酸铵(含0.01%甲酸)-乙腈、5 mmol/L 乙酸铵(含0.01%氨水)-乙腈、0.1%甲酸-乙腈及5 mmol/L 乙酸铵-甲醇等流动相体系。结果表明,在5 mmol/L 乙酸铵(含0.01%氨水)-乙腈体系下,流动相pH不适宜,TeA结构因碱性条件发生改变,使其在色谱柱上无保留,在死时间出峰,并且PAT在碱性条件下分解,无法检测到。在2 mmol/L 甲酸铵(含0.01%甲酸)-乙腈体系和水-乙腈体系条件下,流动相缓冲体系不佳, $\alpha$ -ZOL、 $\beta$ -ZOL、 $\alpha$ -ZAL、 $\beta$ -ZAL等同分异构体分离度不足,无法达到基线分离,且TeA和DON受溶剂效应影响大,峰型差。0.1%甲酸-乙腈体系和5 mmol/L 乙酸铵-甲醇体系均获得较好峰型,但甲酸会抑制负离子的信号,导致部分化合物响应值低,所以最终选择5 mmol/L 乙酸铵-甲醇溶液作为本实验的流动相体系。

### 2.2 线性回归方程

本实验采用空白基质匹配曲线,结果显示线性良好,回归系数r达到0.999以上(见图3),且各浓度点准确度均在要求范围之内,可保证不同浓度水平样品的准确定量,满足日常检测需求。

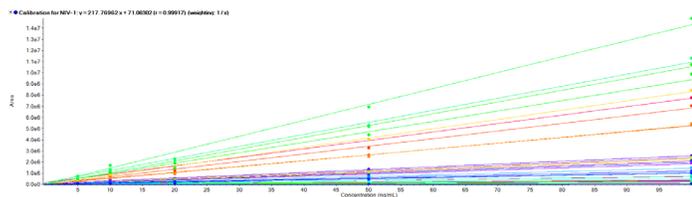


图3. 41种真菌毒素基质匹配线性曲线

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息,请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标,也包括相关的标识、标志的所有权,归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2024 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. MKT-33230-A



#### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](https://www.sciex.com.cn)

### 2.3 回收率与精密度

在各空白基质中分别添加三个不同浓度水平的标样,每个添加水平平行测定6次,做加标回收试验,并计算回收率及精密度。结果表明,本方法回收率在75.8%~116%之间,精密度为0.59%~7.1%,符合检测要求。

### 2.4 实际样本检测

对市售果蔬样本进行测试,在某样品中检测出细交链酮酸(TeA),其色谱图见图4。应用QTRAP EPI功能进行定性确证,二级谱库搜库对比评分为96.0分,进一步阳性确证。

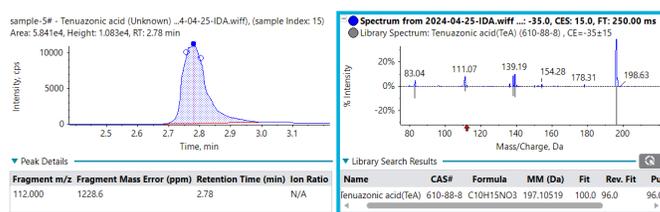


图4. 某样本中细交链酮酸(TeA)的EPI确证图

## 3 小结

本文使用SCIEX液质建立了果蔬中41种真菌毒素的高通量检测方法。一针进样,同时得到高质量的MRM数据和EPI数据,使得定量和定性筛查可以一针完成,省时省力,为果蔬中真菌毒素的日常检测提供参考。