

# QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法 快速检测玉米中 7 种真菌毒素

张海霞, 杨 静, 刘 畅, 刘志鹏

(哈尔滨市农产品质量安全检验检测中心, 黑龙江 哈尔滨 150070)

**摘要:**建立了 QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)对玉米中的真菌毒素进行检测的方法。样品用 20 mL 乙腈:水:甲酸(50:49:1)震荡提取,离心后取上清液 4 mL 经无水硫酸镁、PSA、C18 分散固相萃取净化,离心,取 2 mL 净化液氮吹至近干。残渣用流动相溶解,以 Waters BEH C18 色谱柱分离,采用多反应检测模式进行检测,外标法定量。根据各个化合物的响应值和限量标准,选择 3 个不同水平添加浓度,回收率在 89.7%~112.9%,相对标准偏差小于 8.7%。7 种真菌毒素在 0.5~1 200.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  时相关系数均大于 0.99。方法的定性限为 0.06~10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,定量限为 0.30~32.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。表明,该方法具有提取效率高,净化效果好,回收率高,准确灵敏等优点,适用于玉米中 7 种真菌毒素的快速检测。

**关键词:**QuEChERS;超高效液相色谱-串联质谱;玉米;真菌毒素

**中图分类号:**O657.63;TS210.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2017)07-0061-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2017.07.0061

真菌毒素(mycotoxin)是一类由真菌产生的具有毒性的二次代谢产物。它广泛污染农作物、食品及饲料等植物性产品<sup>[1]</sup>,研究表明,真菌毒素不仅会对食品有影响,还对人和动物造成极大的危害,抑制其体内 DNA、RNA、蛋白质和各种酶类的合成、破坏细胞结构并引起真菌毒素中毒<sup>[2-3]</sup>。部分真菌毒素具有致癌、致畸、致细胞突变的“三致”作用<sup>[4-6]</sup>。据联合国粮农组织(FAO)统计,每年全球农产品污染率高达 25%,损失达 10 亿 t;我国国家粮食局统计,每年有 3 100 万 t 粮食在生产、储存、运输过程中受到真菌毒素污染,约占粮食年总产量的 6.2%<sup>[7-8]</sup>。

近年来,我国制定并颁布了毒素限量标准,对真菌毒素的检测方法提出了更高的要求,现有的检测方法多采用免疫亲和柱<sup>[9]</sup>、多功能净化柱<sup>[10]</sup>、固相萃取柱<sup>[11]</sup>等净化方法结合高效液相色谱法、气相色谱、液相色谱-串联质谱法。这些方法多数仅应用于检测单一的毒素,应用于对多种毒素同时检测时,检测成本高、检测效率低,不能满足批量样品中多种毒素同时检测的需要。

QuEChERS 方法最先于 2003 年应用于水果和蔬菜中农药残留的检测,具有操作简单、快速便

捷、经济耐用等优点<sup>[12]</sup>,且适用于批量样品的快速检测。液相色谱-串联质谱联用仪具有准确、稳定、可靠的特点,可以对多组分、多类别真菌毒素同时分析检测,是一种灵敏度高和选择性极强的真菌毒素检测方法。本试验通过对样品提取试剂和净化吸附剂的优化,改进了 QuEChERS 方法,结合超高效液相色谱-串联质谱对玉米中的多种真菌毒素进行同时检测,该方法提取效率高,净化效果好,回收率高,准确灵敏,且检测成本低。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试样品玉米,购自当地市场。

超高效液相色谱-串联质谱联用仪 Waters Acquity UPLC-TQD(美国 Waters 公司),配有 ESI 源;超纯水(屈臣氏);往复式振荡器(IKA);高速离心机(日历);涡旋振荡器(IKA);氮吹仪(美国 Organomation);电子天平(感量 0.000 1 g);PSA、C18、GCB 净化吸附剂、氯化钠、无水硫酸镁(艾杰尔);乙腈、甲酸均为优级纯(科密欧);甲醇为色谱纯(美国 Fisher 公司);供试标准品,购自 Dr.

### 1.2 方法

1.2.1 样品的提取与净化 样品经粉碎,过 40 目筛子,称取 5.00 g 试样(精确至 0.01 g),置于 50 mL 离心管,加入 20 mL 的乙腈-水-甲酸(v:v:v, 50:49:1),水平振荡器 30 min,加入 4 g 的  $\text{Mg-SO}_4$ ,1 g NaCl,涡旋振荡 1 min,5 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离

收稿日期:2017-05-30

基金项目:哈尔滨市科技攻关计划资助项目(2016AB3BS063)

第一作者简介:张海霞(1980-),女,黑龙江省大庆市人,硕士,高级农艺师,从事药残检测研究。E-mail: xdsun65@yahoo.com。

心 5 min,提取上清液 4 mL 于 15 mL 离心管,加入 PSA 200 mg,C18 120 mg,MgSO<sub>4</sub> 600 mg,混匀,水平振荡器 20 min,5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,提取上清液 2 mL 于 10 mL 试管中,50 ℃ 氮吹至近干,加 0.5 mL 甲醇溶解后,再用水定容至 1 mL,过膜上机。

1.2.2 仪器条件 超高效液相色谱条件为色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱(1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm);柱温:35 ℃;进样体积:5 μL;流速:0.3 mL·min<sup>-1</sup>;流动相 1:A 为乙腈,流动相 B 为 0.1% 甲酸溶液。具体洗脱程序:0~2.0 min 10~25% A,2.0~3.0 min 25~45% A,3.0~4.0 min 45~90% A,4.0~5.5 min 90% A,5.6~7.0 min 10% A。质谱条件:s。离子源:电喷雾电离源(ESI),正离子模式;源温度:110 ℃;毛细管电压:0.5 kV;脱溶剂温度:400 ℃;脱溶剂气流速(N<sub>2</sub>):800 L·h<sup>-1</sup>;锥孔气速:50 L·h<sup>-1</sup>。采用 MRM 多反应检测模式进行检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 提取试剂的优化

多数真菌毒素是偏酸性的化合物,理论上在碱性溶液中的提取效率较高,但真菌毒素在碱性溶液中的稳定性变差<sup>[1]</sup>,特别是 OTA(赭曲霉毒素)对提取液中 pH 较为敏感,而甲酸-乙腈的酸性环境可抑制真菌毒素的电离,使得目标化合物在乙腈中的分配系数增加,从而提高提取效率<sup>[13]</sup>。并且在后期净化的过程中的 PSA 对酸性化合物有吸附,添加一定量的酸会提高毒素的回收,试验对比了在提取液中加入 0.25%、1.00%、3.00%、5.00% 的甲酸,从图 1 中可以看出,加入甲酸 5.00% 时,各参数的回收率都较低,甲酸浓度为 0.25% 时,赭曲霉毒素(OTA)的回收率仅为 8%,在 1.00% 和 3.00% 的添加浓度时各个参数的回收率为 97.5%~110.2% 相差不明显,选择加入甲酸的量为 1%。

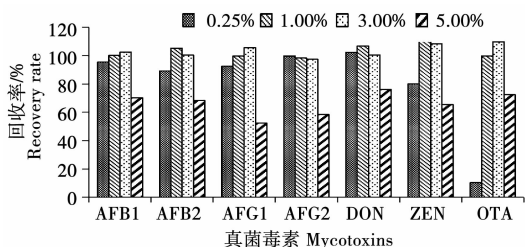


图 1 提取试剂中不同加酸量真菌毒素的回收率

Fig. 1 The recovery rate of mycotoxins with different acid content in extraction reagent

QuEChERS 方法以乙腈、水、酸或乙腈、酸按不同比例混合为提取试剂。试验对比了 A 组乙腈:甲酸(99:1)、B 组乙腈:水:甲酸(80:19:1)、C 组乙腈:水:甲酸(70:29:1)、D 组乙腈:水:甲酸(50:49:1)为提取试剂,各组的加标量为每个化合物的限量限。由图 2 可知,A 组提取试剂提取时,各参数的回收率都显著低于其它 3 组,且赭曲霉毒素没有回收,由于玉米是干性样品,目标物与样品基质结合较紧,加入适量的水会提高提取效率。其余 3 组提取试剂各个参数的回收率差异不明显,但相同做法乙腈含量高,方法的检出限会降低,所以确定 D 组乙腈:水:甲酸(50:49:1)为提取试剂。提取试剂总体积低于 15 mL 时,呕吐毒素的回收率降低,其它参数的回收率变化不明显,为了保证呕吐毒素含量高时的回收率,并且不浪费试剂,确定提取试剂的总体积为 20 mL。提前用水浸泡玉米样品后再加入乙腈、酸提取与直接用乙腈-水-酸提取,各化合物的回收率相差不明显,所以选取直接用乙腈-水提取减少了工作时间。

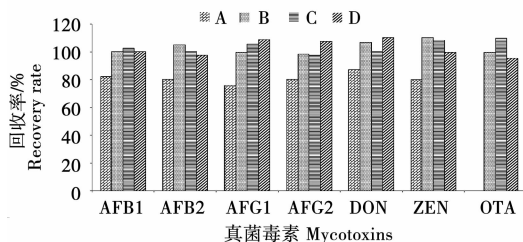


图 2 不同提取试剂真菌毒素的回收率

Fig. 2 The recovery rate of mycotoxins in different extraction reagent

### 2.2 净化条件的优化

为了保证目标化合物的回收,在使用 QuEChERS 方法时只做提取,不经过净化就上机器检测,本试验验证没有进行净化基质干扰较强,降低方法检出限,尤其是使用低灵敏度的 LC/MSMS 检测,不能达到国家标准要求的检出限要求。QuEChERS 方法中通常会选取 PSA、C18、GCB 为净化吸附剂,PSA 吸附基质中的有机酸、脂肪酸、酚类和碳水化合物,C18 去除基质中的脂类和脂肪等非极性干扰物,GCB 去除色素。试验对比了 A:PSA、B:C18、C:C18+PSA、D:C18+PSA+GCB 为净化吸附剂,水分含量高会降低 PSA 的净化效果,选取无水硫酸镁为除水剂。本试验采用回收率和基质效应来评价这四种净化吸附剂组合的净化效果。以空白基质配制标准曲线

的斜率与流动初始比例的试剂配制标准曲线的斜率比值( $\eta$ )来判定基质效应的强弱<sup>[14]</sup>。 $\eta$ 值越接近1,基质效应越弱, $\eta$ 值偏离1越大,基质效应越强。由图3、4可知,D组的基质效应影响最小,但黄曲霉毒素B1、B2和赭曲霉毒素A的回收率为50.30%~58.98%,说明GCB对这几种真菌毒素有吸附作用,其余三组净化吸附剂净化后各参数的回收率差异不明显,但C组的基质效应影响小于A、B两组,为了既保证回收率又保证净化效果,选取C组净化吸附剂。样品经C组净化吸附剂净化后,虽然基质效应影响减少,但依然存在。基质效应是影响液质质仪器定量结果准确性的重要因素,使用内标物和基质标定量是目前最常使

用的去除基质效应的手段,寻找内标物的难度大,并且内标物的价格较为昂贵,提高了检测成本,本试验采用基质标定量方法消除基质效应的干扰。

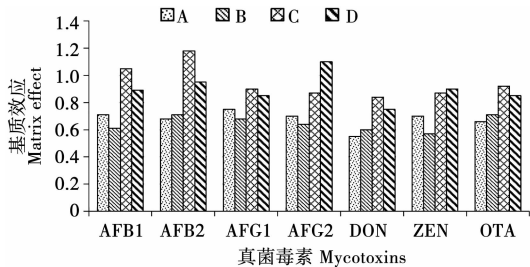


图4 不同净化吸附剂组合净化后真菌毒素的基质效应  
Fig. 4 The matrix effect of mycotoxins purified in different decontamination agents combination

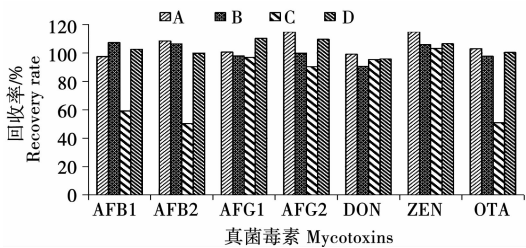


图3 不同净化吸附剂组合净化后真菌毒素的回收率  
Fig. 3 The recovery rate of mycotoxins purified in different decontamination agents combination

### 2.3 质谱方法的优化

以质谱蠕动泵连续进样,根据不同参数在仪器上的响应情况配置不同浓度的标品,进行母离子扫描,同时确定锥口电压,在确定各母离子后,对其母离子进行碰撞扫描,每个化合物再选择2个响应值高的特征离子对作为定量及定性离子,同时对其进行MRM参数优化见表1。7种真菌毒素均是采用正离子模式,图5为各化合物的总离子流图。

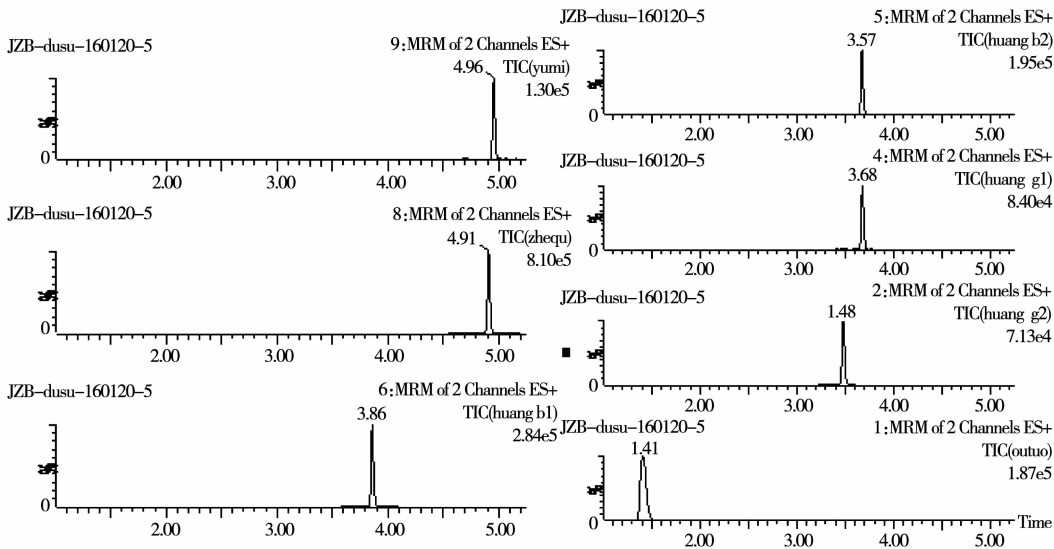


图5 7种真菌毒素的总离子流图  
Fig. 5 Ion flow diagram of the 7 kinds of mycotoxins

### 2.4 方法学验证

2.4.1 线性 按照不同参数的响应值及限量标准配制不同浓度标准溶液。以待检参数的面积(y)为纵坐标,质量浓度(x)( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为横坐标,建立标准曲线,得到线性回归方程。线性范围

及相关系数见表2。各参数在一定的浓度范围内都有较好的线性,相关系数达到0.99以上。  
2.4.2 定性限、定量限 在空白基质中添加一定浓度的标准品,按照1.2前处理方法进行处理后,液质质检测,以目标化合物信噪比(S/N)来获得

检出限和定量限, S/N=3 时对应的含量为定性限(LOQ)。由表 2 可知, 定性限的范围为 0.06~10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , S/N=10 时对应的含量为定量限范围 10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 定量限范围为 0.2~10  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

表 1 7 种真菌毒素多反应监测扫描模式(MRM)的质谱参数

Table 1 The mass spectrometric parameters of 7 fungal toxins in MRM

化合物 Compound	选择离子 Selected ion	锥孔电压/ 碰撞能量/(E·eV <sup>-1</sup> )		化合物 Compound	选择离子 Selected ion	锥孔电压/ 碰撞能量/(E·eV <sup>-1</sup> )	
		(U·V <sup>-1</sup> ) Cone voltage	Collision energy			(U·V <sup>-1</sup> ) Cone voltage	Collision energy
FAB1	313.1/285.3*, 241.2	52	34,23	DON	297.2/249.3*, 231.2	22	15,10
FAB2	315.1/259.2*, 287.3	51	33,30	ZEN	319.2/187.3*, 283.3	26	18,13
FAG1	329.1/243.2*, 283.1	57	23,25	OTA	404.1/239.1*, 385.2	37	24,17
FAG2	331.3/245.2*, 285.3	56	32,23				

选择离子中带\*的为定量离子。  
\* mean quantivative ion in seleted ion.

2.4.3 回收率、精密度 按照不同化合物的检出限和国家规定的限量标准, 每种化合物在样品中添加低、中、高三种水平浓度的标品, 每个水平重

复 6 次, 按照 2.2 的前处理方法进行处理, 计算方法的回收率和精密度。由表 2 可知, 回收率为 89.7%~112.9%, 精密度为 1.5%~8.7%。

表 2 7 种真菌毒素的线性范围、相关系数、检出限、回收率及精密度

Table 2 The linear range, correlation coefficient, detection limit, recovery and precision of 7 fungi toxins

化合物 Compound	线性范围/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	线性方程 Linear equation	相关系数 R <sup>2</sup> Coefficient of association	LOD	LOQ	添加浓度 Fortified concentration	回收率/% Recovery rate	精密度 RSD Precision
	Linear scale							
FAB1	0.5~25	$y=230.617x+309.067$	0.9937	0.06	0.2	1.5	105.0	3.9
						5.0	107.7	1.5
						20.0	100.2	2.4
FAB2	0.5~25	$y=61.0858x-13.8915$	0.9914	0.08	0.3	3.0	99.8	3.0
						10.0	93.7	2.9
						20.0	105.2	1.6
FAG1	0.5~25	$y=0.00715x+0.0064$	0.9946	0.12	0.3	3.0	90.8	8.7
						10.0	100.2	5.3
						20.0	102.3	4.9
FAG2	0.5~25	$y=63.2283x+16.6659$	0.9965	0.11	0.4	3.0	90.4	6.5
						10.0	112.9	5.9
						20.0	94.3	3.0
DON	25~1200	$y=26.2657x+251.331$	0.9949	10	32	150.0	99.4	5.6
						500.0	95.2	2.8
						1000.0	89.7	1.9
ZEN	10~100	$y=116.8724x-36.4402$	0.9989	6.6	18	30.0	105.3	6.7
						50.0	100.2	4.3
						80.0	100.5	2.4
OTA	0.5~25	$y=189.286x+113.5833$	0.9991	0.3	1	3.0	93.7	7.6
						5.0	104.2	3.2
						10.0	98.5	3.0

### 3 结论

本试验通过对提取试剂和净化吸附剂的优化,建立了用乙腈、水、甲酸为提取试剂,无水硫酸镁、PSA、C18为净化吸附剂,超高效液相色谱-串联质谱分析,能一次性检测玉米中7种真菌毒素的方法,通过对方法的检出限、回收率、精密度、线性范围等方法学进行验证,该方法满足对7种真菌毒素同时检测的要求,与国家检测标准方法相比,本方法快速、简单、灵敏、成本低、效率高,更适合实验室进行批量样品的快速检测。

### 参考文献:

- [1] 郭礼强,宫小明,丁葵英,等.基于QuEChERS提取的液相色谱-串联质谱法测定干腌火腿中15种真菌毒素[J].分析测试学报,2015,34(2):141-146.
- [2] 孙利,霍江莲,崔维刚,等.粮食产品中真菌毒素的色谱及质谱检测技术研究进展[J].食品科学,2013,34(19):367-375.
- [3] 喻理,李培武,张奇,等.石墨烯吸附材料及其在真菌毒素检测中的应用[J].分析测试学报,2015,34(10):1204-1212.
- [4] 张巧艳,王钊,陈健文,等.杭州市粮油类农产品真菌毒素快速检测与安全性评估[J].浙江农业学报,2011,2(3):582-587.
- [5] Natalia Arroyo-Manzanares, José F Huertas-Pérez, Ana M García-Campana, et al. Simple methodology for the determination of mycotoxins in pseudocereals, spelt and rice[J]. Food Control, 2014, 36(1):94-101.
- [6] Turner W N, Subrahmanyam S, Pieletsky S A. Analytical

- methods for determination of mycotoxins: A review. [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 632(2):162-180.
- [7] 李磊,李海畅,周贻兵,等.液相色谱-串联质谱测定小麦粉中11种真菌毒素[J].食品研究与开发,2016,37(3):156-160.
  - [8] 崔勇,李青,刘思洁,等.超高效液相色谱-串联质谱测定食品中4种真菌毒素残留量[J].中国卫生工程学,2014,13(1):46-48,51.
  - [9] Lattanzio V M T, Solfrizzo M. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup[J]. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2007, 21(20):3253-3261.
  - [10] 郑翠梅,张艳,王松雪,等.液相色谱-飞行时间质谱同时测定粮食中13种真菌毒素[J].分析测试学报,2012,31(4):383-389.
  - [11] 孟娟,张晶,张楠,等.固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测粮食及其制品中玉米赤霉烯酮类真菌毒素[J].色谱,2010,28(6):601-607.
  - [12] Anastassiades M, Lehota J, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for pesticide residues in produce[J]. Journal of AOAC International, 2003, 86(2):412-431.
  - [13] 孙伟华,杨欢,曹赵云,等.基于分散固相萃取液相色谱-串联质谱法测定大米中8种真菌毒素[J].分析测试学报,2017,36(1):47-53.
  - [14] 曹赵云,马有宁,牟仁祥,等.固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定水稻中17种细胞分裂素[J].色谱,2015,33(7):715-721.

## Rapid Detection of Seven Mycotoxins in Maize by QuEChERS with Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Hai-xia, YANG Jing, LIU Chang, LIU Zhi-peng

(Harbin Examining and Inspection Center for Agricultural Products Safety and Quality, Harbin, Heilongjiang 150070)

**Abstract:** A method for detection of mycotoxins in maize was established using the ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). Samples were extracted with 20 mL of acetonitrile:water:formic acid (50:49:1). The 4 mL upper cleaning fluid obtained from centrifuge was purified with anhydrous magnesium sulfate, PSA and C18. Once again centrifuge, 2 mL purifying fluid was blown by nitrogen. The residue was dissolved by flow phase, separated by the Waters BEH C18 column, and the multi-reaction detection mode was used for detection with super area-external standard method. According to the response value and the limited standard of each compound, the concentration of 3 different levels was selected. The recovery rate was between 89.7%~112.9% and the relative standard deviation was less than 8.7%. The correlation coefficients of 7 mycotoxins were greater than 0.99 in the range of 0.5~1 200.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The qualitative limit of the method was 0.06~10.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and the quantitative limit was 0.3~32.0  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The results showed that the method had high efficiency, good purification effect, high recovery rate and accurate sensitivity, which was suitable for rapid detection of 7 kinds of mycotoxins in maize.

**Keywords:** QuEChERS; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; maize; mycotoxins