TECHNICAL NOTE

《食品中多真菌毒素残留的快速分离及LC-MS/MS分析》

概述：

真菌毒素（Mycotoxins）主要是指真菌在其所污染的食品中产生的有毒代谢产物，可通过饲料或食品进入人和动物体内，引起人和动物的急性或慢性毒性，损害机体的肝脏、肾脏、神经组织、造血组织及皮肤组织等。为了确保食品与饲料的安全，许多国家对食品与饲料中的真菌毒素颁布了相关法规限制。因此，可靠且有效的真菌毒素检测方案至关重要。

本方法建立了一种基于 MicroSep® 300 系列多毒素净化柱提取、净化样品，高效液相-串联质谱测定花生米中的 6 种真菌毒素同时检测的方法。该方法适用于食品与饲料中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮单个或多个毒素残留量的测定。

材料和方法：

所有标准品均购自坛墨质检公司；实验中所用的tips（ MicroSep® 305 多毒素净化柱）均由无锡微色谱生物科技有限公司提供。

样品制备：

取花生米若干克，用高速粉碎机将其粉碎，混合均匀后缩分至 100 g，储存于样品瓶中,密封保存，供检测用。

样品提取：

（1）分别称取 5 g 试样，放入 2 个 50 mL离心管中（A 管和 B 管）。
（2）在A管和B管分别加入内标。
（3）加入 20 mL 水至 A 管中，加入 20 mL 乙腈-水溶液（ 84+16 ）至 B 管中。
（4）涡旋混匀，置于超声波、涡旋振荡器或摇床中振荡 20 min
（5）6000 r/min 下离心 10 min（或玻璃纤维滤纸过滤）取上清液备用。
（6）吸取 1 mL B 管中的上清液置于 2 mL 离心管中，于 ≤35 C°下氮气吹干，加入 1 mL 水充分溶解残渣。
（7）取 1 mL A 管中的上清液和（6）步骤中复溶的溶液 B 置于一个玻璃管中，再加入水 10 mL，混合，作为待净化液。

净化：

（1）将实验室通用 5 mL 移液枪刻度调至 5 mL，连接 MicroSep® 305 多毒素净化柱，依次用 2 mL 甲醇、2 mL 水平衡柱子，即反复吸打甲醇 2 次，完全打出后再反复吸打水 2 次，将液体全部排出。
（2）待净化液上柱，将平衡后的柱子浸入待净化液中，每次吸入 3 mL 左右待净化液，再吸入一段空气，混匀，静置 30~60 秒；将液体排出至一干净试管中。
（3）重复操作步骤 2，直至所有待净化液都完成结合。
（4）依次用 1 mL 去离子水，1 mL 10 % 甲醇水溶液，2 mL 正己烷洗涤柱子。
（5）用 3 mL 5%甲酸乙腈溶液进行洗脱。
（6）洗脱液于 ≤35 C° 下氮气吹干，残余物用 0.1% 甲酸-甲醇水溶液（甲醇：水 = 5：95） 100 µL 溶解，涡旋混匀，0.22 µm 滤器过滤，供高效液相色谱-串联质谱仪（LC-MS/MS）测定。

结果:

如表 1 所示，采用 MicroSep® 305 多毒素净化柱结合高效液相色谱-串联质谱法检测 6 种真菌毒素，回收率在 85%~143% 之间，表明方法能够满足真菌毒素残留分析的要求，MicroSep® 305 多毒素净化柱能够有效降低样品的基质效应，获得准确的检出结果，基质效应在-17.54% ~ 25.47% 之间。如图 1 所示，所有化合物均在 3.5 - 10.5 min 之间流出，6 种真菌毒素能被较好地的分离，且各物质峰形良好，保留时间稳定。

表1 真菌毒素加标回收率实验结果

化合物	加标量 (ppb)	回收率 (%)	基质效应 (%)	RT (min)
黄曲霉毒素 B1 Aflatoxin B1	1	143.10	-5.13	8.01
曲霉毒素 B2 Aflatoxin B2		124.92	-1.61	7.68
黄曲霉毒素 G1 Aflatoxin G1		116.13	2.85	7.71
黄曲霉毒素 G2 Aflatoxin G2		95.62	6.49	7.34
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol	250	85.45	-17.54	3.85
玉米赤霉烯酮 Zearalenone	50	107.30	25.47	10.01

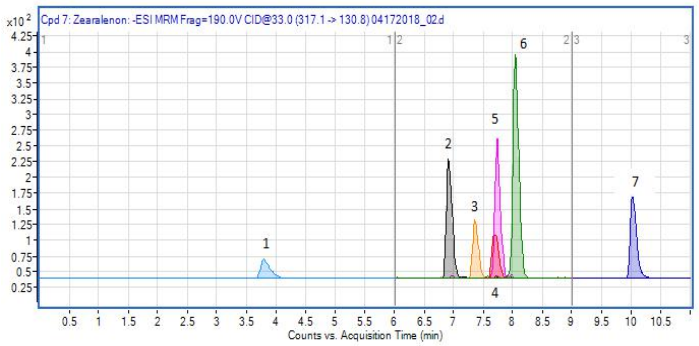


图1真菌毒素混合标准溶液液相色谱-串联质谱质量色谱图

1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol； 2 黄曲霉毒M1 Aflatoxin M1； 3 黄曲霉毒G2 Aflatoxin G2； 4 黄曲霉毒B2 Aflatoxin B2； 5 黄曲霉毒G1 Aflatoxin G1； 6 黄曲霉B1 Aflatoxin B1； 7 玉米赤霉烯酮 Zearalenone；

结论：

本实验建立了 6 种真菌毒素残留量测定的快速萃取及分析的方法。利用高效液相-串联质谱分析，结合 MicroSep® 305 多毒素净化柱对花生中真菌毒素的残留进行定量高精度检测。常见 6 种真菌毒素的回收率在 85% ~ 143% 之间，而MicroSep® 305 多毒素净化柱净化方法简便易行，并且色谱柱重现性良好，表明方法能够满足真菌毒素残留定量分析的要求。