

Captiva EMR-Lipid 柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法 快速同时测定谷物及其制品中 11 种麦角生物碱

刘柏林^{1,2*}, 张丹², 赵紫微¹, 谢继安¹, 詹子悦¹, 张琪¹, 李卫东^{1,2*}

(1. 安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601; 2. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230000)

摘要: 麦角生物碱 (EAs) 是由麦角菌属 (*Claviceps*) 产生的一类真菌毒素, 当人类摄入被 EAs 污染的谷物及其制品时, 可能会遭受慢性或急性中毒, 从而威胁身体健康。鉴于此, 本文基于超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 建立了谷物及其制品中 11 种 EAs 的灵敏、快速测定方法。采用 20 mL 乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液 (80:20, v/v) 对谷物及其制品中的 11 种 EAs 进行提取, 在 10 000 r/min 下离心 10 min, 用通过式 Captiva EMR-Lipid 净化柱对上清液进行净化。采用 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm×3 mm, 1.8 μm) 分离, 以 1 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱。在电喷雾电离 (ESI) 正离子模式下, 采用多反应监测 (MRM) 模式采集数据, 用基质匹配标准曲线进行外标法定量。方法学验证表明, 11 种 EAs 在各自的线性范围内具有良好的线性关系, 相关系数 (r^2) 为 0.993 3~0.999 9, 检出限为 0.006~0.2 μg/kg, 定量限为 0.02~0.6 μg/kg。以小麦粉、薏苡仁、小麦粉制品和玉米粉为基质样品, 在低、中、高 3 个加标水平下, 11 种 EAs 的回收率为 80.1%~118%, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.2%~13.3%。将所建方法用于市售谷物及其制品 (240 份小麦粉、80 份玉米粉、30 份大米、30 份薏苡仁及 146 份小麦粉制品) 中 EAs 的含量测定。结果表明, 每种样品均有 EAs 检出, 11 种 EAs 的检出率为 0.57%~20.3%。该方法具有简单、快速、准确等优势, 适用于谷物及其制品中多种 EAs 的快速同时测定。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 谷物及其制品; 麦角生物碱; 真菌毒素

中图分类号: O658 文献标识码: A

Rapid and simultaneous determination of 11 ergot alkaloids in cereals and their products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with Captiva EMR-Lipid column purification

LIU Bolin^{1,2*}, ZHANG Dan², ZHAO Ziwei¹, XIE Ji'an¹,

ZHAN Ziyue¹, ZHANG Qi¹, LI Weidong^{1,2*}

(1. Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230601, China;

2. Anhui Medical University, Hefei 230000, China)

Abstract: Ergot alkaloids (EAs) are mycotoxins produced by *Claviceps* and are present in cereals and their products; their residues pose significant threats to human health through food consumption, resulting in ergotism and sickness. Herein, a sensitive and rapid method for the determination of 11 EAs in cereals and their products using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) were developed. Eleven EAs were extracted with 20 mL acetonitrile-200 mg/L ammonium acetate solution (80:20, v/v) for 15 min using the vortex shock method followed by 15 min of ultrasonication. The mixture was subsequently centrifuged at 10 000 r/min for 10 min, and the supernatant was purified by a Captiva EMR-Lipid column. Target analytes were separated on an ACQUITY UPLC HSS T3 chromatography column

收稿日期: 2024-02-27

* 通讯联系人. Tel: (0551) 64383133, E-mail: liubolin087@163.com (刘柏林); Tel: (0551) 63674901, E-mail: ahcdclwd@163.com (李卫东).

(100 mm×3 mm, 1.8 μm) at a column temperature of 40 °C and a flow rate of 0.4 mL/min using an injection volume of 5 μL. Gradient elution was performed using 1 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile as mobile phases. Data were collected in electrospray positive-ion (ESI⁺) and multi-reaction monitoring (MRM) modes, and quantified using matrix-matched standard curves. The 11 EAs exhibited good linearities in their linear ranges, with correlation coefficients (r^2) of 0.993 3–0.999 9, with limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of 0.002–0.2 and 0.006–0.6 μg/kg, respectively. Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the 11 EAs in matrix samples of wheat flour, coix seed, wheat flour products, and corn flour at low, medium, and high spiked levels were 80.1%–118% and 0.2%–13.3%, respectively. The established method was used to determine EAs in 240 wheat flour, 80 corn flour, 30 rice, and 30 coix seed samples, as well as 146 wheat flour products, with the detection rates of the 11 EAs of 0.57%–20.3%. A maximum total content of EAs of 56.7 μg/kg was recorded for a single sample. The sample pretreatment process used in this method is simple and fast, and the detection method is highly sensitive, with accurate and reliable results obtained. This method is suitable for simultaneously determining various EAs in cereals and their products. The results of this study provide valuable information for future EA risk-assessment studies.

Key words: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); cereals and their products; ergot alkaloids (EAs); mycotoxins

麦角生物碱(ergot alkaloids, EAs)是由麦角菌属(*Claviceps*)产生的一类真菌毒素。麦角菌容易寄生在谷物(如小麦、黑麦、燕麦等)的子房内,取代原本的谷粒或种子形成菌核,这种菌核被称为麦角,EAs主要来源于麦角。据报道,加拿大、荷兰和比利时种植的谷物中均检出了EAs^[1-3];意大利和阿尔及利亚生产的以谷物为主要成分的婴儿食品中,EAs含量超出了欧盟规定的限值(20 μg/kg)^[4-6];在斯洛文尼亚,约有17%的谷物被EAs污染^[7]。Shi等^[8]报道称,在牲畜生产商送检的冬季大麦和小麦样品中,有91%的大麦样品和84%的小麦样品中至少检出了一种EAs。同样,我国也有关于粮谷中检出EAs的报道^[9]。由此可见,全球范围内的谷物食品均受到了EAs的污染。

动物试验结果表明,EAs对动物平滑肌细胞具有毒性作用,且随着EAs水平的升高,其对细胞的生长抑制作用也随之增强^[10]。兔子食用含有EAs的饲料后,其尾部会出现局部缺血坏死的现象^[11]。

EAs能够引发血管收缩,进而影响牛中肠的营养吸收^[12]。当EAs的摄入量超过2 447 μg/kg时,绵羊的生长和代谢会受到影响^[13]。EAs会导致处于妊娠期的母羊血管收缩,从而影响胎儿的生长和肌肉发育^[14,15]。当蛋鸡暴露于高水平的EAs时,其产蛋量会显著降低^[16]。此外,EAs也会对仔猪的生产能力产生不利影响^[17]。食用被EAs污染的谷物会使人类面临中毒风险^[18],可能患痉挛性麦角病等疾病。2021年,联合国粮食与农业组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)联合将膳食中EAs的每日可耐受摄入量(TDI)调整为0.4 μg/kg bw;《粮食卫生标准的分析方法》(GB/T 5009.36-2003)^[19]规定粮食中的麦角不能超过0.1 g/kg;《食品安全国家标准粮食》(GB 2715-2016)^[20]规定大米、玉米和豆类中不得检出麦角,小麦、燕麦和大麦等谷物中的麦角含量的质量分数应小于0.01%。上述国家标准中的检测方法均是通过形态特征观察和组织切片技术对麦角进行鉴定,然后采用比色法对EAs进行定性分

引用本文:刘柏林,张丹,赵紫微,谢继安,詹子悦,张琪,李卫东. Captiva EMR-Lipid 柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速同时测定谷物及其制品中11种麦角生物碱. 色谱,2025,43(4):326–334.

LIU Bolin, ZHANG Dan, ZHAO Ziwei, XIE Ji'an, ZHAN Ziyue, ZHANG Qi, LI Weidong. Rapid and simultaneous determination of 11 ergot alkaloids in cereals and their products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with Captiva EMR-Lipid column purification. Chinese Journal of Chromatography, 2025, 43(4):326–334.

析。然而目前尚未有关于谷物及其制品中 EAs 的最大残留限量规定及定量分析的标准检测方法。

目前,液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)已被广泛应用于谷物及其制品中 EAs 的含量检测^[3,21-26],如《出口粮谷中 6 种麦角碱的测定 液相色谱-质谱/质谱法》(SN/T 4524-2016)^[27]和《牧草中 15 种生物碱的测定 液相色谱-串联质谱法》(NY/T 2769-2015)^[28]采用 LC-MS/MS 分别测定了粮谷中的 6 种 EAs 和牧草中的 8 种 EAs。Cherewyk 等^[21]将氘代麦角二乙酰胺(LSD-D₃)作为同位素内标,建立了高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)测定小麦中多种 EAs 含量的方法,该方法的仪器检出限(LOD)为 0.008 93~0.225 μg/kg,在小麦基质中,12 种 EAs 的基质效应为 101%~113%。Huybrechts 等^[3]基于 HPLC-MS/MS,建立了一种婴儿谷物食品中 EAs 总含量的分析测定方法,该方法能够实现 6 种 EAs 的定量测定,所获得的 LOD 为 0.5 ng/g。上述方法大多使用多功能 MycoSep 150 固相萃取柱或 QuEChERS 前处理技术。多功能 MycoSep 150 固相萃取柱是 EAs 的专用萃取柱,其选择性强,但该柱可萃取的 EAs 种类较少且存在处理流程繁琐、耗时长等问题^[9]; QuEChERS 法虽简便、快速,但不同类型的吸附剂在吸附杂质的同时也会吸附待测物,极大地限制了可检测的 EAs 种类。因此,开发一种快速、灵敏、准确的谷物及其制品中多种 EAs 分析测定方法至关重要。

基于上述问题,本研究将 Captiva EMR-Lipid 柱净化与超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)结合,建立了同时测定谷物及其制品中 11 种 EAs(包括 7 种 S 构型和 4 种 R 构型)的方法。该方法具有较高的灵敏度和准确度,样品前处理过程经济、简便,为谷物及其制品中 EAs 的风险评估和残留限值的制定提供了技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

ACQUITY™ UPLC 超高效液相色谱-XevoTQ-S 串联质谱仪(美国 Waters 公司); Heidolph 多点振荡器(德国 Heidolph 公司); Legend Mach1.6R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司); KN295 Knifetec™ 刀式样品磨(丹麦 Foss 公司); BJ-800A 高速粉碎机(中国邦杰公司)。

11 种 EAs 单标储备液:麦角考宁(100 μg/mL,

R 型)、麦角异柯宁碱(25 μg/mL, S 型)、麦角辛(100 μg/mL, R 型)、麦角辛宁(25 μg/mL, S 型)、麦角异卡里碱(100 μg/mL, S 型)、麦角隐亭(100 μg/mL, R 型)、麦角克碱(100 μg/mL, R 型)、麦角异克碱(25 μg/mL, S 型)、双氢麦角汀(100 μg/mL, R 型)、麦角胺(100 μg/mL, R 型)和马来酸麦角新碱(100 μg/mL, R 型)购自奥地利 Romer Labs 公司。甲醇、乙腈、甲酸和乙酸(HPLC 级,德国 Merck 公司); 乙酸铵、甲酸铵、碳酸铵(HPLC 级,美国 Sigma-Aldrich 公司); N-丙基乙二胺(PSA)吸附剂、C₁₈ 吸附剂(50 μm)、Bond Elut EMR-Lipid 净化试剂包和 Captiva EMR-Lipid 净化柱(3 mL, 300 mg)(美国 Agilent 公司); Oasis PRiME HLB 固相萃取柱(3 mL, 150 mg)(美国 Waters 公司); 实验用水均为 Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司)制备的超纯水(18.2 MΩ·cm)。

谷物及其制品(包括小麦粉、大米、薏苡仁、玉米糝、玉米粉、馒头、饺子皮、包子、面条)采集于本省超市和农贸市场。

1.2 实验条件

1.2.1 标准溶液的配制

准确移取适量 11 种 EAs 单标储备液于棕色容量瓶中,用乙腈定容,配制成混合标准使用液,其中麦角异克碱、麦角隐亭、麦角辛宁和麦角异柯宁碱的质量浓度为 100 μg/L,双氢麦角汀、麦角克碱、麦角考宁、麦角异卡里碱和麦角胺的质量浓度为 200 μg/L,麦角辛和马来酸麦角新碱的质量浓度为 1 000 μg/L。用乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)稀释上述混合标准使用液,配制成系列质量浓度的混合标准工作液,其中麦角异克碱、麦角隐亭、麦角辛宁和麦角异柯宁碱的质量浓度均为 5.0 μg/L,双氢麦角汀、麦角克碱、麦角考宁、麦角异卡里碱和麦角胺的质量浓度均为 10.0 μg/L,麦角辛和马来酸麦角新碱的质量浓度均为 100 μg/L。

1.2.2 样品采集与制备

在本省超市和农贸市场采集谷物及小麦粉制品,每份样品均不少于 500 g;其中大米和薏苡仁等颗粒样品均经刀式样品磨打碎,混匀;小麦粉制品样品(如馒头、饺子皮、包子、面条)预先在-20 ℃冰箱中冷冻为硬块,随后采用高速粉碎机打碎,混匀。采用四分法将粉碎后的样品分成两份(用于分析和复测),分别装入食品级保鲜盒中,密封后标记好编号,并置于-20 ℃冰箱中避光保存。

1.2.3 样品前处理

分别准确称取 5.0 g (精确到 0.001 g) 上述试样于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v),涡旋振荡 15 min,再超声提取 15 min,在 4 °C 下以 10 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至新的 50 mL 离心管中;用乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)将上述溶液稀释至 20 mL,混匀后移取 3 mL 上清液过 Captiva EMR-Lipid 净化柱,以 1 滴/s 的速度收集滤液,滤液经再生纤维膜(RC)过滤后,供 UPLC-MS/MS 分析。

1.3 分析条件

1.3.1 色谱条件

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×3 mm, 1.8 μm);流动相 A 为 1 mmol/L 乙酸铵溶液,流动相 B 为乙腈;流速:0.4 mL/min;进样体积:5 μL;柱温:40 °C;样品室温度:10 °C。梯度洗脱程序:0~3.0 min, 40% A~75% A; 3.0~4.0 min, 75% A~10% A; 4.0~5.0 min, 10% A; 5.0~6.0 min, 10% A~40% A; 6.0~8.0 min, 40% A。

1.3.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI)源,正离子扫描模式;毛细管电压:1.5 kV;离子源温度:150 °C;脱溶剂气温度:500 °C;脱溶剂气流量:1 000 L/h;碰撞气流量:0.15 mL/min;检测模式:多反应监测(MRM)。其他质谱参数见表 1。

2 结果与讨论

2.1 UPLC-MS/MS 条件的优化

2.1.1 质谱条件的优化

分别配制系列质量浓度的 11 种 EAs 混合标准

工作液,以乙腈和 1 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相,采用针泵进样方式进样,在 ESI 源下获得高丰度的分子离子。结果表明,11 种 EAs 的[M+H]⁺响应值明显高于[M+NH₄]⁺和[M+Na]⁺,因此,确定分子离子峰[M+H]⁺为母离子;进一步进行二级离子的扫描,选择响应值最高的两个子离子分别作为定量离子和定性离子;利用 IntelliStart 功能进行质谱参数的优化,获得了 11 种待测物的子离子、锥孔电压和碰撞能量,详见表 1。

2.1.2 色谱柱的优化

实验分别比较了 ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×3 mm, 1.8 μm)、CORTECS UPLC C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)和 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)3 种色谱柱对待测物分离效果及响应值的影响。结果表明,除麦角辛和马来酸麦角新碱外,其他 9 种 EAs 在 ACQUITY HSS T3 色谱柱上的响应值均高于 CORTECS UPLC C₁₈柱和 ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱,甚至高出两倍以上。ACQUITY HSS T3 色谱柱的填料颗粒度较大,柱效较高,能够使更多分析物进入孔隙,并且其对极性化合物具有更好的保留效果。因此,实验最终选择 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(100 mm×3 mm, 1.8 μm)作为分析柱。

2.1.3 流动相的优化

实验考察了不同流动相体系(水相:0.1% 甲酸水溶液、1 mmol/L 乙酸铵溶液、1 mmol/L 甲酸铵溶液、1 mmol/L 碳酸铵溶液,有机相均为乙腈)对 11 种 EAs 色谱分离度和检测灵敏度的影响。实验结果表明,当流动相水相为 0.1% 甲酸水溶液时,麦角考宁与麦角异柯宁碱等同分异构体化合物出现了

表 1 11 种 EAs 的保留时间和质谱参数

Table 1 Retention times and MS parameters of the 11 ergot alkaloids (EAs)

Compound	Retention time/ min	Parent ion (<i>m/z</i>)	Product ions (<i>m/z</i>)	CE/eV	CVs/V
Ergometrine maleate (马来酸麦角新碱)	1.01	326.3	223.2*, 208.0	38	24, 28
Ergosine (麦角辛)	1.89	548.4	223.2*, 268.2	34	32, 24
Ergotamine (麦角胺)	2.20	582.4	223.2*, 208.1	36	30, 44
Ergocornine (麦角考宁)	4.59	562.4	268.2*, 208.1	40	26, 44
Dihydroergocristine (双氢麦角汀)	4.70	612.4	270.2*, 168.1	40	30, 60
Ergocryptine (麦角隐亭)	4.79	576.4	223.2*, 268.2	40	35, 26
Ergocristine (麦角克碱)	4.83	610.4	223.2*, 208.1	40	36, 48
Ergosinine (麦角辛宁)	4.97	548.4	223.2*, 277.2	40	32, 26
Ergocorninine (麦角异柯宁碱)	5.17	562.4	277.2*, 223.2	38	26, 34
Ergocryptinine (麦角异卡里碱)	5.30	576.4	223.2*, 305.2	40	36, 28
Ergocristinine (麦角异克碱)	5.34	610.4	305.2*, 325.2	40	28, 28

* Quantitative ion; CE: collision energy; CV: cone voltage.

双峰且分离度较差;当流动相水相为 1 mmol/L 乙酸铵溶液时,11 种 EAs 的响应值明显高于 1 mmol/L 甲酸铵溶液;以 1 mmol/L 碳酸铵溶液为流动相水相时,11 种 EAs 的响应值明显高于 1 mmol/L 乙酸铵溶液。虽然 11 种 EAs 在 1 mmol/L 碳酸铵溶液中具有更高的灵敏度,但马来酸麦角新碱存在色谱峰展宽和拖尾的现象,而在 1 mmol/L 乙酸铵溶液条件下,11 种待测物的色谱峰形尖锐且对称。因此,实验最终选择 1 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相水相。此外,实验考察了不同浓度(0.5、1、2、5、10 mmol/L)的乙酸铵溶液对 11 种 EAs 检测灵敏度的影响。结果发现,当乙酸铵溶液浓度为 0.5 mmol/L 时,马来酸麦角新碱在色谱柱上无保留,保留时间仅为 0.6 min;当乙酸铵溶液浓度增加至 1 mmol/L 时,11 种 EAs 的响应值均有提高,且马来酸麦角新碱的保留时间增加至 1.01 min;当继续增大乙酸铵溶液的浓度分别至 2、5、10 mmol/L 时,11 种 EAs 的响应值逐渐下降,且在乙酸铵溶液浓度为 10 mmol/L 时降至最低。因此,确定乙酸铵溶液的浓度为 1 mmol/L。最后,实验分别比较了甲醇和乙腈对 11 种 EAs 检测灵敏度的影响,结果表明,除麦角辛外,其他 10 种 EAs 在甲醇流动相下的响应值均低于乙腈。综上,确定本实验的最优流动相体系为 1 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈。在最佳实验条件下,11 种 EAs 的 MRM 色谱图如图 1 所示。

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 提取溶剂的选择

《牧草中 15 种生物碱的测定 液相色谱-串联质谱法》(NY/T 2769-2015)^[28]中采用乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(50:50, v/v)提取牧草中的 15 种生物碱;汪薇等^[9]采用乙腈-水(84:16, v/v)提取粮谷中的 9 种麦角碱;Huybrechts 等^[3]和 Poapolathep 等^[22]采用乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(84:16, v/v)分别提取婴儿食品和饲料中的 EAs。研究表明,麦角胺、麦角考宁、麦角隐亭、麦角克碱等化合物在甲醇中不稳定,在乙腈和乙腈-碳酸铵溶液中较稳定,且不易发生异构化^[9,29]。结合 11 种 EAs 的化学性质及常见真菌毒素的提取溶剂,实验以空白基质加标后的玉米粉基质样品为例(其中麦角异克碱、麦角隐亭、麦角辛宁和麦角异柯宁碱的加标含量为 0.4 μg/kg,双氢麦角汀、麦角克碱、麦角考宁、麦角异卡里碱和麦角胺的加标含量为 0.8 μg/kg,麦

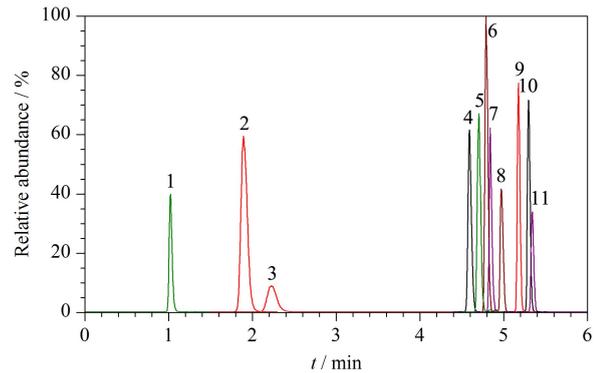


图 1 11 种 EAs 混合标准工作液的 MRM 色谱图
Fig. 1 MRM chromatogram of the mixed standard working solution for the 11 EAs

Peak identifications: 1. ergometrine maleate; 2. ergosine; 3. ergotamine; 4. ergocornine; 5. dihydroergocristine; 6. ergocryptine; 7. ergocristine; 8. ergosinine; 9. ergocornine; 10. ergocryptinine; 11. ergocristinine.

The mass concentrations of compound 1 and 2 were 1.0 μg/L, the mass concentrations of compound 3, 4, 5, 7 and 10 were 0.2 μg/L, the mass concentrations of compound 6, 8, 9 and 11 were 0.1 μg/L.

角辛和马来酸麦角新碱的加标含量为 4.0 μg/kg),分别考察了乙腈-水(80:20, v/v)、乙腈-乙酸铵溶液(80:20, v/v)、乙腈-5%氨水溶液(80:20, v/v)、乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)和乙腈-400 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)对 11 种 EAs 提取效果的影响。实验结果表明,部分 EAs 在乙腈-水(80:20, v/v)、乙腈-乙酸铵溶液(80:20, v/v)、乙腈-5%氨水溶液(80:20, v/v)中均存在回收率较低的现象。当使用乙腈-5%氨水溶液进行提取时,玉米粉样品提取液的颜色偏黄,可能是因为在碱性条件下玉米粉中的色素被共提取,不利于后续的净化处理。因此,实验重点比较了乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)和乙腈-400 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)对 11 种 EAs 的提取效果。结果表明,11 种 EAs 在两种提取溶剂中的回收率分别为 77.0%~118%和 71.0%~117%,几乎不受碳酸铵溶液浓度的影响。结合绿色化学的理念,本文选择乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液进行后续优化实验。

进一步考察了乙腈与 200 mg/L 碳酸铵溶液的体积比(80:20、65:35、50:50)对 11 种 EAs 提取效果的影响。实验结果表明,80:20、65:35 和 50:50 的乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液对 11 种 EAs 的平均回收率分别为 80.3%、55.8% 和 50.9%,相对标准偏差(RSD, n=3)分别为 3.55%、4.28% 和 4.50%。结果表明,使用乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20,

v/v) 进行提取时, EAs 能更容易地从样品基质中提取出来, 因此最终确定提取溶剂为乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v)。

2.2.2 净化方式的选择

为了降低谷物及其制品中 11 种 EAs 的基质效应、提高方法的准确性, 需对样品提取液进行净化处理。本实验以空白基质加标后的玉米粉为基质样品(其中 11 种 EAs 的加标含量同 2.2.1 节), 分别考察了 C₁₈ 吸附剂、PSA 吸附剂、Oasis PRiME HLB 固相萃取柱、Bond Elut EMR-Lipid 净化试剂包和 Captiva EMR-Lipid 净化柱等 5 种净化方式对 11 种 EAs 回收率的影响。其中, C₁₈ 吸附剂、PSA 吸附剂和 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱按照文献[9]报道方法进行净化实验, Bond Elut EMR-Lipid 净化试剂包参照说明书进行净化实验。结果如图 2 所示, 当采用 C₁₈ 吸附剂和 PSA 吸附剂对样品提取液进行净化时, 11 种 EAs 的回收率分别为 56.7%~132% 和 48.3%~101%, RSD 分别为 1.4%~4.5% 和 3.2%~8.2%, 其中麦角辛、麦角考宁、麦角异柯宁碱、麦角异卡里碱和麦角异克碱的回收率偏低, 而马来酸麦角碱的回收率偏高, 净化效果均不理想。当采用 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱和 Bond Elut EMR-Lipid 净化试剂包净化时, 11 种 EAs 的回收率普遍偏低, 分别为 17.2%~73.6% 和 16.7%~54.4%。其中, Bond Elut EMR-Lipid 净化试剂包中的脱水盐包在净化过程中会迅速吸水并释放热量, 导致样品提取液的温度升高, 粉状样品发生结块, 进而将待测物包裹在内, 这会导致后续的反萃取过程无法完全进行; 同时, 高温环境也会导致 EAs 的不稳定性增加, 从而造成 EAs 的大量损失。样品提取液经 Captiva EMR-Lipid 净化柱净化后, 11 种 EAs 的回收率为 83.3%~108%, RSD 为 1.3%~13.2%。因此, 最

终选择 Captiva EMR-Lipid 净化柱用于后续净化实验。

2.3 基质效应的考察

按照 1.2.3 节方法分别对 4 种空白基质样品(小麦粉、薏苡仁、小麦粉制品和玉米粉)进行前处理, 获得相应的空白基质提取液。用上述空白基质提取液配制系列质量浓度的基质匹配混合标准溶液, 并上机分析。同时, 用乙腈-200 mg/L 碳酸铵溶液(80:20, v/v) 配制相同质量浓度的溶剂混合标准溶液, 并上机分析。采用 Besil 等^[30] 报道的基质效应(ME)评价方法($ME = (\text{基质匹配标准曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率} - 1) \times 100\%$), 对 11 种 EAs 的基质效应进行评价。当 ME 为正值时, 表现为基质增强效应; 当 ME 为负值时, 表现为基质抑制效应; 其中 $|ME| > 50\%$ 为强基质效应, $20\% < |ME| \leq 50\%$ 为中等基质效应, $|ME| \leq 20\%$ 为弱基质效应^[30]。结果如图 3 所示, 在 4 种样品基质中, 多种 EAs 存在较强的基质效应, $|ME|$ 为 0.49%~596%。为了降低样品基质效应所带来的干扰, 本实验采用基质匹配混合标准溶液进行后续实验。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围、检出限和定量限

分别用 4 种空白基质样品(小麦粉、薏苡仁、小麦粉制品和玉米粉)提取液对 11 种 EAs 的混合标准工作液进行逐级稀释, 配制系列质量浓度的基质匹配混合标准溶液, 并按照 1.3 节实验条件进行测定。以待测物的峰面积为纵坐标(y), 质量浓度为横坐标(x , $\mu\text{g/L}$), 绘制基质匹配标准曲线。结果表明, 4 种基质样品中 11 种 EAs 在各自的范围内具有良好的线性关系, 线性相关系数(r^2)为 0.993~0.9999。在小麦粉、薏苡仁、小麦粉制品和玉米粉 4 种空白基质样品中分别添加基质匹配标准曲线中

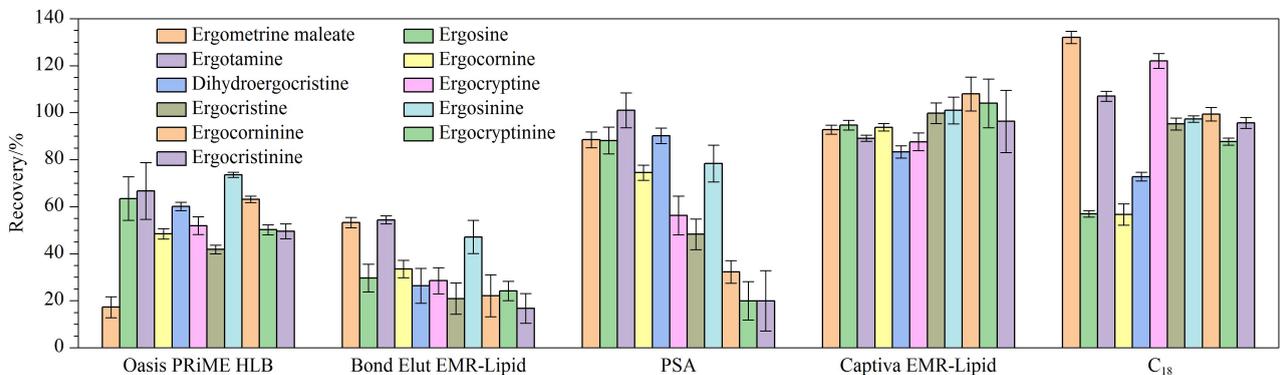


图 2 不同净化方式对 11 种 EAs 回收率的影响 ($n=3$)

Fig. 2 Effects of different purification methods on the recoveries of the 11 EAs ($n=3$)

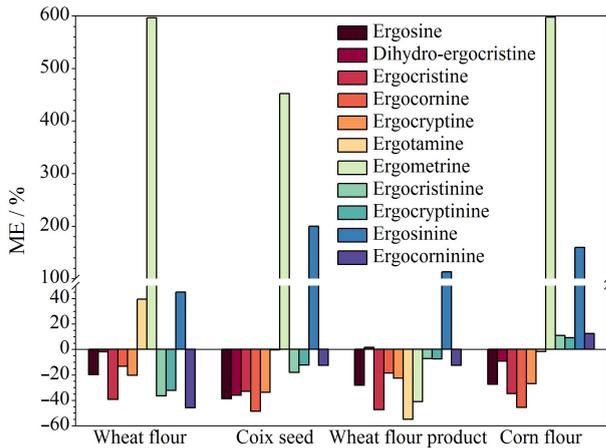


图 3 4 种谷物及其制品中 11 种 EAs 的基质效应
Fig. 3 Matrix effects (MEs) of the 11 EAs in four cereals and their products

最低质量浓度所对应的混合标准工作液,按照 1.2.3 节方法进行样品前处理后上机测定。分别以 3 倍信噪比(S/N)和 10 倍 S/N 对应的含量计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 4 种基质样品中 11 种 EAs 的 LOD 和 LOQ 分别为 0.006~0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.02~0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 小麦粉基质样品的相关数据结果见表 2, 其他数据见附表 1 (<https://www.chrom-China.com>)。以空白小麦粉基质样品为例, 加标前后的 MRM 色谱图见附图 1。目前, 我国《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761-2017)^[31] 中尚未规定谷物及其制品中 EAs 含量及其总量的限量值, 仅在《粮食卫生标准的分析方法》(GB/T 5009.36-2003)^[19] 中规定了粮食中麦角的添加量不得超过 0.1 g/kg。欧盟委员会发布的食品中 EAs 最高残留限量的法规((EU)2023/195)^[4] 规定婴幼儿谷类加工食品中 EAs 的最高残留限量

为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 投放到市场的大麦、小麦、斯佩耳特小麦和燕麦研磨产品中 EAs 的最高残留限量为 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。参照上述国家标准与相关法规, 本方法中 11 种 EAs 的 LOQ 均满足定量分析的要求。

2.4.2 准确度和精密度

为了考察本方法的准确度和精密度, 参考 (EU) 2023/195^[4] 和 GB/T 27404-2008^[32], 在低、中、高 3 个加标水平下, 对空白小麦粉、薏苡仁、小麦粉制品和玉米粉基质样品进行加标回收试验, 每个样品平行测定 6 次, 计算回收率和 RSD。结果如表 3 所示, 4 种基质样品中 11 种 EAs 的回收率为 80.1%~118%, RSD 为 0.2%~13.3%, 表明该方法的准确度和精密度良好。

2.5 实际样品的测定

为了验证本方法的实用性, 采用本方法对 526 份市售谷物及其制品样品中的 11 种 EAs 进行测定。实验结果表明, 每种样品均有 EAs 检出, 11 种 EAs 的检出率为 0.57%~20.3%; 麦角异克碱、麦角克碱、麦角异卡里碱、麦角异柯宁碱和麦角隐亭的检出率最高, 分别为 20.3%、20.0%、16.4%、16.0% 和 10.3%, 检出含量为 0.004~22.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 单份样品中检出的 EAs 总含量最高达 56.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。此外, 有 54.8% 的样本检出单一的 EAs, 20.3% 的样本检出 2 种 EAs, 10.1% 的样本检出 3 种 EAs, 表明谷物及其制品中存在一定程度的 EAs 共污染现象。从样品种类来看, 小麦粉受到麦角异克碱、麦角克碱、麦角异卡里碱和麦角异柯宁碱 4 种 EAs 的污染, 小麦粉制品(馒头、饺子皮、包子、面条)受到麦角克碱与麦角胺的污染, 大米和薏苡仁样品主要受到麦角异克碱的污染, 玉米粉样品主要受到麦角隐亭、麦角异

表 2 小麦粉基质样品中 11 种 EAs 的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r^2), limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) of the 11 EAs in wheat flour matrix sample

Analyte	Linear range/($\mu\text{g}/\text{L}$)	Linear equation	r^2	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Ergometrine maleate	0.01-50	$y = 2.80 \times 10^5 x + 4.18 \times 10^2$	0.9969	0.06	0.2
Ergosine	0.01-50	$y = 9.24 \times 10^4 x + 2.12 \times 10^2$	0.9988	0.06	0.2
Ergotamine	0.002-10	$y = 2.02 \times 10^5 x - 7.54 \times 10^1$	0.9991	0.013	0.04
Ergocornine	0.002-10	$y = 2.99 \times 10^5 x + 1.64 \times 10^2$	0.9998	0.013	0.04
Dihydroergocristine	0.002-10	$y = 3.82 \times 10^5 x + 3.76 \times 10^2$	0.9994	0.013	0.04
Ergocryptine	0.002-10	$y = 4.06 \times 10^5 x + 4.78 \times 10^2$	0.9994	0.013	0.04
Ergocristine	0.002-10	$y = 1.63 \times 10^5 x + 4.98 \times 10^2$	0.9977	0.013	0.04
Ergosinine	0.001-5	$y = 6.89 \times 10^5 x + 2.43 \times 10^2$	0.9998	0.006	0.02
Ergocorninine	0.001-5	$y = 3.88 \times 10^5 x + 4.41 \times 10^2$	0.9993	0.006	0.02
Ergocryptinine	0.001-5	$y = 4.78 \times 10^5 x + 5.23 \times 10^2$	0.9995	0.006	0.02
Ergocristinine	0.001-5	$y = 2.10 \times 10^5 x + 6.04 \times 10^2$	0.9996	0.006	0.02

y : peak area; x : mass concentration, $\mu\text{g}/\text{L}$.

卡里碱和麦角辛宁的污染。据文献[21]报道,加拿大生产的小麦样品中,EAs 的最大污染水平为 942

$\mu\text{g}/\text{kg}$,相比之下,本文测试的 526 份样品中 EAs 的检出含量较低,这可能与当地的气候条件有关。

表 3 4 种不同基质样品中 11 种 EAs 的回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of the 11 EAs in four matrix samples ($n=6$)

Analyte	Spiked level/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recoveries/%				RSDs/%			
		Wheat flour	Coix seed	Wheat flour product	Corn flour	Wheat flour	Coix seed	Wheat flour product	Corn flour
Ergometrine maleate	0.2	91.7	93.9	106	103	2.2	0.7	4.1	7.0
	40	83.5	88.6	90.2	102	1.1	1.3	1.3	1.2
	200	96.3	93.3	91.8	97.5	0.2	1.6	3.2	0.7
Ergosine	0.2	90.7	90.8	81.7	93.0	1.2	0.8	5.8	1.5
	40	98.1	101	95.9	96.8	1.2	1.5	1.4	0.5
	200	94.3	98.8	105	90.7	1.5	1.9	0.9	1.5
Ergotamine	0.04	90.0	95.8	87.3	100	6.2	4.2	4.9	2.0
	8	92.8	99.7	83.7	97.4	0.2	0.4	3.6	0.8
	40	92.3	98.9	102	96.0	1.3	0.3	12.2	0.7
Ergocornine	0.04	89.7	94.7	87.0	92.0	5.5	9.9	1.1	4.7
	8	102	98.5	118	96.7	1.6	1.8	1.6	1.0
	40	101	101	115	92.7	0.7	0.8	0.8	0.5
Dihydroergocristine	0.04	98.7	80.1	102	92.9	1.4	7.0	2.1	3.4
	8	89.1	99.1	103	82.9	0.4	1.0	1.6	1.1
	40	89.4	80.8	97.4	100	0.5	5.4	1.7	1.4
Ergocryptine	0.04	87.3	90.7	86.7	80.3	4.8	5.7	1.3	3.8
	8	95.8	84.8	111	90.5	1.2	2.0	2.2	1.1
	40	91.7	82.9	103	83.1	1.0	1.9	0.4	1.7
Ergocristine	0.04	88.0	82.3	100	96.4	10.8	3.1	2.6	5.6
	8	99.9	93.5	112	95.1	0.7	1.7	3.7	0.9
	40	97.6	88.9	111	90.2	1.4	0.7	1.5	2.9
Ergosinine	0.02	86.7	102	107	85.0	12.5	1.6	2.7	5.1
	4	83.3	95.1	104	89.9	0.9	6.9	1.0	2.9
	20	82.0	87.8	99.4	82.7	2.2	4.8	6.9	1.7
Ergocominine	0.02	110	103	107	82.9	6.6	2.2	1.9	6.7
	4	115	82.0	111	89.1	1.5	10.4	4.2	2.4
	20	114	83.4	105	94.9	3.2	7.2	13.1	1.6
Ergocryptinine	0.02	82.7	94.7	81.7	85.9	13.3	6.5	4.7	6.5
	4	96.1	80.7	97.5	89.1	1.2	7.6	1.4	2.9
	20	100	87.8	112	92.0	7.9	10.2	3.5	0.9
Ergocristinine	0.02	85.3	85.0	85.0	87.3	8.9	5.9	11.8	9.5
	4	102	84.8	97.3	91.6	1.5	3.4	1.6	3.6
	20	103	80.3	108	91.9	2.7	11.8	6.0	0.7

3 结论

本文基于 UPLC-MS/MS 技术和 Captiva EMR-Lipid 净化柱,建立了同时测定谷物及其制品中 11 种 EAs 的方法。该方法的样品前处理过程简便、快捷,准确度与精密度高。将该方法用于 526 份市售谷物及其制品中 EAs 的含量测定,结果发现部分样品存在一定程度的 EAs 共污染现象。该方法为 EAs 的风险评估提供了数据基础,同时也为食品安全风险监测提供了技术支持。

参考文献:

- [1] Tittlemier S A, Drul D, Roscoe M, et al. J Agric Food Chem, 2015, 63(29): 6644
- [2] Veršilovskisa A, Mulder P P J, Pereboom-de Fauw D P K H, et al. Food Addit Contam; Part B, 2020, 13(3): 215
- [3] Huybrechts B, Malysheva S V, Masquelier J. Toxins, 2021, 13(8): 531
- [4] European Commission. Commission Regulation (EU) 2023/915 on Maximum Levels for Certain Contaminants in Food and Repealing Regulation (EC) No 1881/2006. (2023-05-05) [2024-02-27]. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32023R0915&qid=1693556167234>

- [5] Carbonell-Rozas L, Mahdjoubi C K, Arroyo-Manzanares N, et al. *Toxins*, 2021, 13(5): 316
- [6] Lattanzio V M T, Verdini E, Sdogati S, et al. *Toxins*, 2021, 13(12): 871
- [7] Babic J, Tavcar-Kalcher G, Celar F A, et al. *Toxins*, 2020, 12(11): 730
- [8] Shi H T, Yu P Q. *Food Chem*, 2022, 393: 133322
- [9] Wang W, Yu T T, Liu D. *Modern Food Science and Technology*, 2020, 36(5): 277
汪薇, 余婷婷, 刘迪, 等. *现代食品科技*, 2020, 36(5): 277
- [10] Zhang X, Nan Z, Li C, et al. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(30): 7419
- [11] Korn A K, Gross M, Usleber E, et al. *Mycotoxin Res*, 2014, 30(4): 241
- [12] Egert A M, Kim D H, Schrick F N, et al. *J Anim Sci*, 2014, 92: 1768
- [13] Coufal-Majewski S, Stanford K, McAllister T, et al. *Toxins*, 2017, 9(12): 405
- [14] Duckett S K, Andrae J G, Pratt S L. *Front Chem*, 2014, 2: 68
- [15] Klotz J L, Britt J L, Miller M F, et al. *J Anim Sci*, 2019, 97(4): 1891
- [16] Danicke S. *Mycotoxin Res*, 2016, 32(1): 37
- [17] Danicke S, Diers S. *Arch Anim Nutr*, 2013, 67(1): 15
- [18] El-Sayed R A, Jebur A B, Kang W Y, et al. *J Future Foods*, 2022, 2(2): 91
- [19] GB/T 5009.36-2003
- [20] GB 2715-2016
- [21] Cherewyk J, Grusie-Ogilvie T, Blakley B, et al. *Toxins*, 2021, 14(1): 22
- [22] Poapolathep S, Klangkaew N, Zhang Z, et al. *Toxins*, 2021, 13(10): 724
- [23] Carbonell-Rozas L, Gamiz-Gracia L, Lara F J, et al. *Molecules*, 2021, 26(12): 3717
- [24] Kuner M, Lisek J, Mauch T, et al. *Molecules*, 2023, 28(9): 3701
- [25] García-Juan A, Leon N, Armenta S, et al. *Food Res Int*, 2023, 174: 113614
- [26] Carbonell-Rozas L, Alabrese A, Meloni R, et al. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(42): 15821
- [27] SN/T 4524-2016
- [28] NY/T 2769-2015
- [29] Hafner M, Sulyok M, Schuhmacher R, et al. *World Mycotoxin J*, 2008, 1(1): 67
- [30] Besil N, Cesio V, Heinzen H, et al. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(23): 4819
- [31] GB 2761-2017
- [32] GB/T 27404-2008