

# 同位素稀释-超高效液相色谱-线性离子阱串联质谱 分析谷物及其制品中呕吐毒素及其衍生物和代谢物

刘柱<sup>1</sup> 华颖<sup>2</sup> 徐潇颖<sup>1</sup> 陈万勤<sup>1</sup> 赵超群<sup>1</sup>  
梁晶晶<sup>1</sup> 丁宇琦<sup>1</sup> 罗金文<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> (浙江省食品药品检验研究院 杭州 310052) <sup>2</sup> (浙江中医药大学 杭州 310053)

**摘要** 建立了谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、去环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇的同位素稀释-超高效液相色谱-线性离子阱串联质谱 (UHPLC-QTRAP-MS/MS) 定性确证和定量测定方法。样品经乙腈-水 (84:16, V/V) 混合溶液提取, 乙腈饱和的正己烷除脂, HLB 固相萃取柱净化, Waters Atlantis® T3 色谱柱分离, 以乙腈-0.02% 氨水溶液为流动相进行梯度洗脱, 在负离子模式下, 采用多反应监测 (MRM)-信息依赖性采集 (IDA)-增强离子扫描 (EPI) 模式检测, 在线 EPI 谱库定性分析, 同位素内标定量, 在 1 ~ 300  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内, 4 种目标物的线性相关系数均大于 0.999, 检出限为 0.1  $\mu\text{g/kg}$ , 定量限为 0.3  $\mu\text{g/kg}$ , 添加 5, 50 和 200  $\mu\text{g/kg}$  的 3 个浓度水平, 4 种目标物的平均回收率均在 81.3% ~ 101.7% 之间, 相对标准偏差均小于 5%, 将该技术应用于 FAPAS 阳性玉米质控样品和 5 种代表性的样品进行测试, 结果表明, 本方法简单、准确、快速, 适用于谷物及其制品中呕吐毒素及其衍生物和代谢物的快速确证和定量测定。

**关键词** 同位素稀释; 呕吐毒素及其衍生物和代谢物; 超高效液相色谱; 线性离子阱串联质谱

## 1 引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON), 又称呕吐毒素, 其中 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-Ac-DON)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-Ac-DON) 是其乙酰化衍生物<sup>[1]</sup>, 去环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DOM-1) 是 DON 在动物或人体内的代谢产物; 这类毒素耐热、耐酸碱, 化学性质稳定, 在加工储运过程中不易被破坏<sup>[2]</sup>。其毒性表现为急性毒性、免疫毒性、细胞毒性、生殖毒性和三致作用等<sup>[3-5]</sup>, 主要污染小麦、大麦、玉米、大米等谷物<sup>[6,7]</sup>, 间接造成啤酒、酱油、米粉等谷物制品的污染<sup>[8]</sup>, 部分谷物制品中含有动物源性成分, 例如婴幼儿米粉和中老年谷物制品中会添加牛奶、鸡蛋、鸡肉、牛肉等, 因此 DOM-1 也成为该类制品的污染物。食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 将原来针对 DON 的暂定每日容许最大摄入量 (PTMDI) 改为 DON 及其乙酰化衍生物组的 PTMDI 为 1  $\mu\text{g/kg bw}$ <sup>[9]</sup>。

目前, 关于 DON 及其衍生物的检测方法主要有酶联免疫吸附法 (ELISA)<sup>[10,11]</sup>、高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[12]</sup> 和液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS/MS)<sup>[13,14]</sup>, LC-MS/MS 结合了 HPLC 法的快速分离性能和质谱高选择性的优点, 具有高选择性、高分辨率和高灵敏度的特点, 能够同时定性和定量分析多种化合物, 但此法存在基质效应影响, 当样品中目标物残留较低时, 采用四级杆质谱定性时, 化合物的两对 MRM 离子比率偏差较大, 容易造成定性困难<sup>[15]</sup>。四极杆-线性离子阱 (QTRAP) 系统是混合型串联质谱, 既保留了串联四级杆较好选择性与灵敏度, 也可作为线性离子阱增强二级碎片离子定性功能, 其中多反应监测-信息依赖性采集-增强离子扫描 (MRM-IDA-EPI) 模式, 一次进样可得到用于定量的 MRM 色谱图及用于定性的二级谱图, 与常见的三重四级杆扫描模式相比, 增强了二级碎片离子扫描, 更有利于增强复杂介质中微量目标化合物的定性能力<sup>[16]</sup>。

本研究采用固相萃取技术实现对目标物的富集和净化, 应用同位素稀释法消除基质效应, 采用线性离子阱串联质谱 (UHPLC-QTRAP-MS/MS) 的 MRM-IDA-EPI 分析模式进行检测, 并建立多能级检索谱库,

2016-05-27 收稿; 2016-09-13 接受

本文系浙江省科技计划项目 (No. 2015C37054)、浙江省科技厅重大科技专项重大农业项目 (No. 2014C02001)、浙江中医药大学校级科研基金项目 (No. 2015ZR10) 资助

\* E-mail: luojw31@163.com

为呕吐毒素及其衍生物和代谢物的定性和精确定量分析提供更加准确可靠的分析方法。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

AB QTRAP 5500 质谱仪(美国 AB Sciex 公司),搭配 Shimadzu LC-30AD 超高效液相色谱仪(日本岛津公司);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司);高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司);全自动氮吹浓缩仪(美国 Biotage 公司);固相萃取装置、Waters Oasis HLB (200 mg, 6 mL)固相萃取柱和  $C_{18}$  固相萃取柱(500 mg, 6 mL)(美国 Waters 公司)。

甲醇、乙腈(LC-MS 级, Merck 公司);正己烷(HPLC 级, Merck 公司);氨水(HPLC 级, Sigma 公司);水为 Milli-Q 系统纯化水;除已注明外,所用试剂均为分析纯。

DON ( $199.9 \pm 2.78$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (美国 Smart 公司);3-Ac-DON ( $100.5 \pm 0.6$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、15-Ac-DON ( $100.1 \pm 1.4$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、DOM-1 ( $50.5 \pm 1.3$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $^{13}\text{C}_{15}$ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇( $^{13}\text{C}_{15}$ -DON, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和 $^{13}\text{C}_{17}$ -3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇( $^{13}\text{C}_{17}$ -3-Ac-DON, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )均购于 Sigma 公司。

### 2.2 混合标准溶液及内标溶液的配制

混合标准溶液配制:分别精密移取 50  $\mu\text{L}$  DON, 100  $\mu\text{L}$  3-Ac-DON, 100  $\mu\text{L}$  15-Ac-DON 和 200  $\mu\text{L}$  DOM-1 至 10 mL 容量瓶中,以乙腈定容,配制成混合标准储备液(1000  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,  $-18^\circ\text{C}$  保存,有效期 6 个月);准确移取 1.0 mL 混合标准储备液至 10 mL 容量瓶中,以乙腈定容,配制成混合标准工作液(100  $\mu\text{g}/\text{L}$ )。

内标溶液配制:分别准确移取 100  $\mu\text{L}$   $^{13}\text{C}_{15}$ -DON 和  $^{13}\text{C}_{17}$ -3-Ac-DON 同位素内标储备液至 10 mL 容量瓶中,以乙腈定容,得混合同位素内标溶液(1000  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,  $-18^\circ\text{C}$  保存,有效期 6 个月)。

### 2.3 样品前处理

2.3.1 提取 谷物及制品:准确称取 2.0 g (精确至 0.0001 g)样品(粉碎的固体样品或脱气后的液体样品)加入适量内标溶液,混匀放置 5 min,加入 15 mL 乙腈-水(84:16, V/V)混合提取液,超声提取 20 min,再用乙腈-水(84:16, V/V)定容至 20.0 mL,10000 r/min 离心 10 min,取 10.0 mL 上清液,待净化。

2.3.2 净化 向待净化的上清液中加入 10 mL 乙腈饱和的正己烷,剧烈振荡 20 min,5000 r/min 离心 5 min,弃上层正己烷萃取液后,45 $^\circ\text{C}$  用氮气吹至近干,加 5 mL 水复溶,将复溶液经 HLB 固相萃取柱(先后用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化平衡)萃取,控制流速 1~2 mL/min,依次用 5 mL 水和 5 mL 甲醇-水溶液(5:95, V/V)淋洗,抽干后用 5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,45 $^\circ\text{C}$  氮气吹干,用 1.0 mL 初始流动相复溶,超声涡旋溶解 1 min,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜后供 LC-MS/MS 分析。

### 2.4 超高效液相色谱-串联质谱分析条件

2.4.1 超高效液相色谱条件 Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ , 美国 Waters 公司);柱温:35 $^\circ\text{C}$ ;样品温度:15 $^\circ\text{C}$ ;进样体积:5  $\mu\text{L}$ ;流速:0.35 mL/min;流动相:0.02% 氨水溶液(A相),乙腈(B相);梯度洗脱程序 0~5 min 90%~30% A;5~6 min 30% A;6~6.1 min 30%~90% A;6.1~10 min 90% A。

2.4.2 质谱分析条件 电喷雾负离子模式,喷雾电压 4.5 kV,雾化器压力(GS1)50 PSI,辅助气压力(GS2)50 PSI,离子源温度 500 $^\circ\text{C}$ ,气帘气压力(CUR)40 PSI;优化后的母离子、子离子和锥孔电压、聚焦电压、碰撞能量等 MRM 相关参数见表 1。

采用多反应监测 MRM-IDA-EPI 模式检测,在线 EPI 谱库检索辅助定性分析,同位素内标法定量分析,IDA 参数:启动阈值 5000 CPS,采用动态背景扣除模式;EPI 参数:扫描速度 10000 Da/s,扫描范围为  $m/z$  50~400 Da,采用动态填充阱集时间,不大于 1 ms, EPI 碰撞能量(CE):20 和 35 eV。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱条件的优化

选择对极性和弱极性化合物具有较好保留能力的 Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 色谱柱(150 mm $\times$ 2.1 mm, 5.0  $\mu\text{m}$ ),比较了乙腈-水和甲醇-水两种流动相,结果表明,乙腈-水作为流动相时,分离度和灵敏度都明

表 1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物和代谢物的质谱分析条件

Table 1 ESI-MS/MS conditions for deoxynivalenol (DON) and its derivatives and metabolites

化合物名称 Compounds	母离子 Parent ion ( $m/z$ )	子离子 Product ion ( $m/z$ )	锥孔电压 Cone voltage (V)	碰撞电压 Collision energy (eV)
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deoxynivalenol (DON)	295.1	265.1*	-100	-16
		138.1		-20
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 3-Acetyldeoxynivalenol (3-Ac-DON)	337.2	307.0*	-100	-15
		173.1		-15
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 15-O-Acetyl-4-deoxynivalenol (15-Ac-DON)	337.2	150.0*	-100	-21
		219.1		-15
去环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇 Deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1)	279.2	249.0*	-100	-12
		231.0		-19
$^{13}\text{C}_{15}$ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇 $^{13}\text{C}_{15}$ -Deoxynivalenol ( $^{13}\text{C}_{15}$ -DON)	310.2	279.1*	-110	-15
		145.0		-24
$^{13}\text{C}_{17}$ -3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 $^{13}\text{C}_{17}$ -3-acetyldeoxynivalenol ( $^{13}\text{C}_{17}$ -3-Ac-DON)	354.2	323.1*	-110	-16
		230.0		-25

\* 定量离子 (Quantitative ion)

显优于甲醇-水；为进一步提高待测化合物的离子化效率，增加灵敏度，结合目前 LC-MS/MS 法检测呕吐毒素的相关报道<sup>[14, 17]</sup>，在流动相中添加对负离子有增强作用的氨水，通过比较 0.01% ~ 0.04% 氨水浓度对灵敏度的影响，最终确定流动相为乙腈-0.02% 氨水溶液；再优化流动相比例，最终选择线性梯度洗脱，目标物分离度较好、保留时间适中，优化后的多反应监测离子流色谱图见图 1。

### 3.2 MRM-IDA-EPI 扫描模式和 EPI 谱库建立

欧盟规定<sup>[18]</sup>，LC-MS/MS 法检测有机污染物时，定性确证要求每种化合物选用两对 MRM 离子，各定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液谱图相比误差不超过  $\pm 20\%$ ，但当目标物浓度较低时，由于质谱信号的绝对响应低，加之受到基质效应的影响，实际检测目标分析物的离子相对丰度容易超出容许限，从而给确证分析结果的判定带来困难<sup>[19]</sup>。本实验采用 MRM-IDA-EPI 模式，将优化后的 MRM 条件作为 EPI 促发方式，初步设定 IDA 参数，对 10  $\mu\text{g/L}$  混合标准溶液进行分析。结果表明，CE 值为 20 和 35 eV 时，可以获得足够的碎片离子信息，并包含特征碎片离子。综合考虑 4 种化合物 EPI 质谱图的背景强度，确定 MRM-IDA-EPI 模式的参数，进而获得对应 MRM 通道中母离子的增强二级离子全扫描质谱图，4 种目标物在 CE 为 20 eV 的 EPI 的扫描结果如图 2 所示，用于定性分析，同时建立目标物的 EPI 谱库，用于阳性样品定性时的谱库检索，辅助定性分析。同时 MRM 通道采集的信号依然可用于定量分析，与普通 MRM 模式相比，由于 EPI 谱图增强了二级碎片离子全扫描谱图，其灵敏度高于四极杆质谱，确证信息更丰富，而 MRM 通道采集的信号依然可作为定量分析的数据。因而可以有效辅助痕量水平或检出限浓度样品的定性分析，很好地解决了传统四极杆 MRM 模式对低浓度样品的定性检测存在的困难<sup>[15]</sup>。

### 3.3 前处理方法

3.3.1 固相萃取柱的选择和优化 最初采用特异性强的免疫亲和层析净化进行前处理，近年来兴起了特殊填料的多功能净化柱净化，这两种方式虽然净化效果较好，但成本高，应用受到限制<sup>[17]</sup>。本实验采

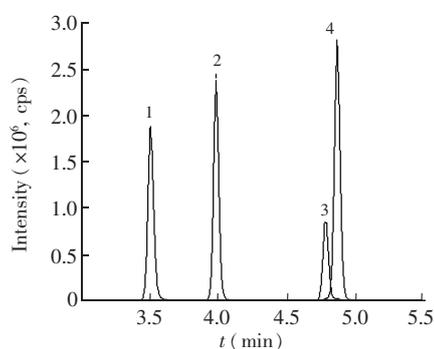


图 1 标准品多反应监测离子流色谱图

Fig. 1 Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms of mixed standards solution

1. Deoxynivalenol (DON);
2. deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1);
3. 15-O-acetyl-4-deoxynivalenol (15-Ac-DON);
4. 3-acetyldeoxynivalenol (3-Ac-DON).

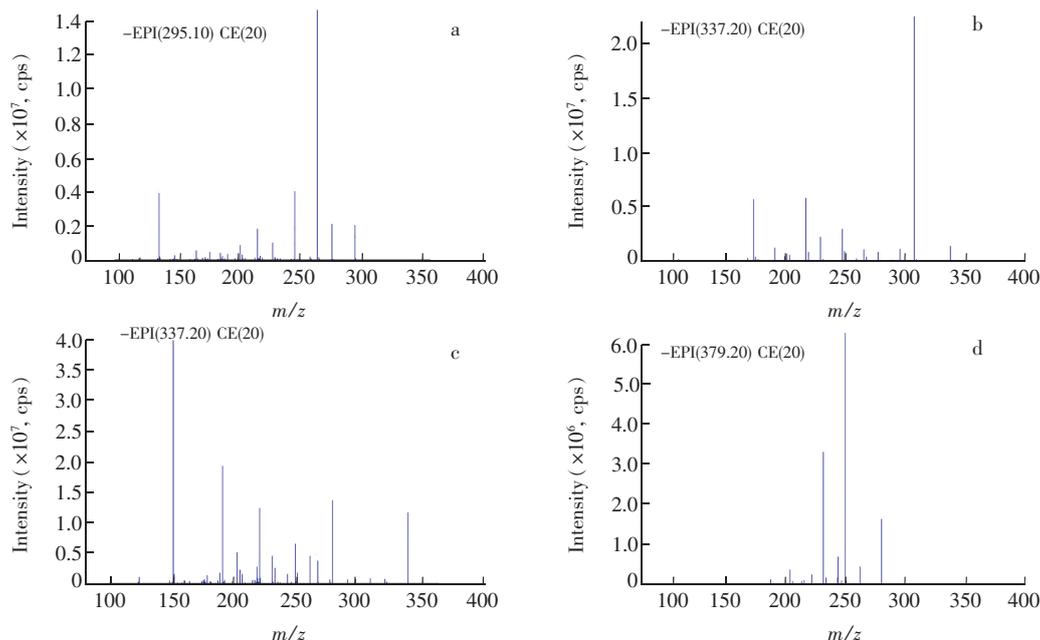


图 2 呕吐毒素及其衍生物和代谢物的标准溶液 (10  $\mu\text{g/L}$ ) 在线增强离子扫描 (EPI) 谱图 (CE : 20 eV)  
Fig. 2 Enhanced product ion (EPI) (CE : 20 eV) spectra of deoxynivalenol and its ramification and metabolite in standard solution (10  $\mu\text{g/L}$ )

a. EPI spectrum of DON , b. EPI spectrum of 3-Ac-DON , c. EPI spectrum of 15-Ac-DON , d. EPI spectrum of DOM-1.

用固相萃取的方式进行样品前处理,可降低成本,简化操作。比较了 Waters 公司的  $\text{C}_{18}$  (200 mg  $\phi$  mL)、HLB (200 mg  $\phi$  mL) 两种固相萃取柱的净化效果和保留行为。结果表明,HLB (200 mg  $\phi$  mL) 对 4 种呕吐毒素的保留性最强;为进一步去除基质干扰,本实验还优化了淋洗液和洗脱液,最终确定淋洗液为 5 mL 水和 5 mL 甲醇-水溶液 (5:95, V/V),洗脱液为 5 mL 甲醇。

**3.3.2 提取溶剂的选择** 由于 DON 及其衍生物和代谢物易溶于水和极性有机溶剂,通过考察各种类型的谷物及其制品发现,纯的谷物(如大米、小麦、小麦粉、玉米、玉米粉等)可以采用纯水提取,但谷物制品种类繁多,一些即食、膨化、冲调后食用的谷物制品加水会变成糊状,无法通过离心等手段进行分离,而一些添加牛奶、鸡蛋、鸡肉、牛肉等成分的谷物制品中蛋白含量高,在水中加入一定比例的乙腈会沉淀蛋白,同时避免糊化现象。本研究结合已有报道和资料<sup>[12,17]</sup>,以及对不同提取溶剂的研究结果,最终确定提取液为乙腈-水 (84:16, V/V)。

### 3.4 方法学验证

**3.4.1 线性范围、检出限和定量限** 采用混合标准溶液和混合标准工作液,用初始流动相配制成 1 ~ 300  $\mu\text{g/L}$  的系列标准溶液,以  $^{13}\text{C}_{15}$ -DON 作为 DON 的内标,  $^{13}\text{C}_{17}$ -3-Ac-DON 作为 3-Ac-DON、15-Ac-DON 和 DOM-1 的内标,以待测物质的峰面积和相应内标的峰面积的比值 (Y) 为纵坐标,质量浓度 (X) 为横坐标绘制标准曲线,线性回归方程及相关系数见表 2。结果表明,各呕吐毒素在 1 ~ 300  $\mu\text{g/L}$  范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999;在 2 g 空白大米基质样品中加入 20  $\mu\text{L}$  混合标准工作液 (100  $\mu\text{g/L}$ ) 理论加标浓度为 1.0  $\mu\text{g/kg}$ ,按照已建立方法检测,结果信噪比均大于 80,根据标准规定  $S/N > 10$  为检测下限,  $S/N > 3$  为检出限,鉴于质谱本身的稳定性、不同仪器间的差异和方法的适用性,确定本方法的检出限 0.1  $\mu\text{g/kg}$ ,定量限 0.3  $\mu\text{g/kg}$ ,如表 2 所示,本方法的检出限与相关报道基本一致<sup>[14]</sup>,可满足检测需求。

**3.4.2 方法的回收率和精密度** 为了验证方法的准确性和可靠性,在阴性样品大米、小麦粉和啤酒中分别加入混合标准溶液和混合标准工作液,加标水平为 5, 50 和 200  $\mu\text{g/kg}$ ,每个浓度水平按照优化后的方法平行测试 6 次,回收率和 RSD 的计算结果见表 3。结果表明, DON 的回收率为 97.5% ~ 101.7%,

表 2 DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON、DOM-I 的标准曲线、线性范围、相关系数、检出限和定量下限  
Table 2 Linear equations, correlation coefficients, LOD and LOQ of DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, DOM-I

化合物 Compound	线性范围 Linear range ( $\mu\text{g/L}$ )	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 LOD ( $\mu\text{g/kg}$ )	定量限 LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )
DON	1 ~ 300	$Y=0.033X+0.00646$	1.0000	0.1	0.3
3-Ac-DON	1 ~ 300	$Y=0.0399X+0.00923$	0.9999	0.1	0.3
15-Ac-DON	1 ~ 300	$Y=0.014X+0.00219$	0.9999	0.1	0.3
DOM-I	1 ~ 300	$Y=0.0347X-0.00579$	0.9999	0.1	0.3

相对标准偏差为 1.4% ~ 3.3% ; 3-Ac-DON 的回收率为 94.1% ~ 101.4% , 相对标准偏差为 1.0% ~ 3.0% ; 5-Ac-DON 的回收率为 95.6% ~ 100.5% , 相对标准偏差为 1.4% ~ 4.4% ; DOM-I 的回收率为 81.3% ~ 93.9% 相对标准偏差为 1.0% ~ 4.3% ; 结果表明, 在 3 个水平下, 本方法的准确度和精密密度良好, 可以满足谷物及其制品中 DON 及其衍生物和代谢物检测的要求。

表 3 方法的精密度和回收率 ( $n=6$ )  
Table 3 Precision and recovery of the method ( $n=6$ )

化合物名称 Compound	加标浓度 Spiked level ( $\mu\text{g/kg}$ )	大米 Rice		小麦粉 Wheat flour		啤酒 Beer	
		Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
DON	5	101.2	3.3	99.3	2.8	97.5	2.2
	50	101.0	1.4	100.1	1.7	100.5	2.5
	200	101.7	2.3	100.4	2.2	100.8	1.8
3-Ac-DON	5	94.1	2.5	98.2	3.0	96.1	2.5
	50	99.0	1.0	98.9	1.6	100.0	1.0
	200	101.4	1.6	99.9	1.3	99.1	1.0
15-Ac-DON	5	96.5	3.8	97.2	2.7	95.6	2.2
	50	99.0	4.4	100.5	3.1	99.0	2.5
	200	96.5	2.5	98.4	2.7	97.9	1.4
DOM-I	5	92.8	4.3	89.6	2.8	81.9	3.8
	50	93.9	3.9	90.4	2.2	82.0	1.6
	200	87.8	1.0	91.5	1.6	81.3	1.5

### 3.5 实际样品验证

**3.5.1 FAPASS 质控样品的验证** 为了进一步验证本方法的准确性和适用性, 对 FAPASS 提供的阳性质控玉米粉进行检测, 结果如表 4 所示, DON、3-Ac-DON、15-Ac-DON 的检测结果均在质控标示值范围内, 且平行测试结果  $RSD \leq 5.0\%$ , DOM-I 未检出, 与 FAPASS 的质控样品的标示值一致, 表明本方法适用于实际阳性样品的检测。

**3.5.2 阳性样品的分析** 应用本方法分析了 10 份在售谷物及其制品 (大米、年糕、玉米粉、酱油、馒头各 2 份), 其中部分样品中有 DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON, DOM 残留, 残留量为 0.2 ~ 5.0  $\mu\text{g/kg}$ , 以阳性可疑大米样品为例, 采用 MRM-IDA-EPI 扫描模式对样品进行分析, 在保留时间 3.5 min, 获得 2 个不同的碰撞能量 EPI 谱图, 将样品的 EPI 谱图在新建的呕吐毒素及其衍生物和代谢物的谱库中进行检索, 得到匹配结果, 其中 Fit 值 (匹配值) 是用标准物质谱图与可疑样品谱图进行对比后获得的相似度值 (满分为 100), RevFit 值 (反相匹配值) 是反相匹配后获得的相似度值; Purity 值 (纯度值) 是综合前两种结果得出的数值<sup>[20]</sup>, 从表 5 可明显看出样品为 DON 阳性。使用 MRM 通道采集的信号进行定量分析, 结果为 1.2  $\mu\text{g/kg}$ , 从而实现了对样品中 DON 的快速确证, 简化了定性分析流程。

表 4 阳性质控样品的检测结果  
Table 4 Detection of positive quality control samples

化合物名称 Compounds	检测结果 Found ( $\mu\text{g/kg}$ )	质控标示值 Quality control indication ( $\mu\text{g/kg}$ )	RSD (%, $n=5$ )
DON	645.9	517 ~ 1032	3.8
3-Ac-DON	139.9	103 ~ 249	1.7
15-Ac-DON	144.4	111 ~ 267	4.7
DOM-I	/	/	/

表5 阳性可疑样品 EPI 谱库检索结果 ( $t=3.5$  min)Table 5 Library search for positive suspicious sample's EPI matching ( $t=3.5$  min)

EPI	Name	Formula	Molecular weight (Da)	Fit	ReFit	Purity	CE
a	DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296.1000	86.804	88.090	82.663	20.000
b	DON	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	296.1000	70.313	79.922	61.360	35.000

## 4 结论

建立了谷物及其制品中呕吐毒素及其衍生物和代谢物的 UHPLC-QTRAP-MS/MS 分析方法,采用 MRM-IDA-EPI 分析模式,利用 QTrap 的线性离子阱功能获得 DON, 3-Ac-DON, 15-Ac-DON 和 DOM-1 的增强全扫描二级质谱图,并建立其多能级全扫描检索谱库,同步实现 MRM 定量检测和在线 EPI 谱库检索定性确证功能,在样品前处理中采用 HLB 固相萃取技术实现对谷物及其制品中 4 种目标化合物的富集和净化,同时在前处理中加入了同位素内标,不但能有效地去除基质效应影响,还能排除前处理过程因样品损失造成的回收率不稳定的问题,与现有标准和已报道的方法相比,本方法检出限更低,定量结果准确,检测成本更低,检测范围更广,分析速度更快,为呕吐毒素及其衍生物和代谢物提供更加准确可靠的定性筛查和定量分析方法。

## References

- 1 WANG Pei, XU Guang-Chao, YIN Li-Mei, LI Rui, XIE Gang. *Science and Technology of Cereals, Oil and Food*, **2015**, 23 (1): 63-66  
王培,徐广超,尹丽梅,黎睿,谢刚. *粮油食品科技*, **2015**, 23 (1): 63-66
- 2 Wolf C E, Bullerman L B. *Food Protection*, **1998**, 61 (3): 365-367
- 3 Pestka J, Pestka. *Toxicol. Lett.*, **2003**, 140: 287-295
- 4 Sprando R L, Collins T F X, Black T N. *Food Chem. Toxicol.*, **2005**, 43 (4): 623-635
- 5 Girish C K, Smith T K, Boermans H J, Kumar P A, Girgis G N. *Food Chem. Toxicol.*, **2010**, 48 (10): 3000-3007
- 6 Voss K A. *Toxicol. Sci.*, **2010**, 113 (2): 281-283
- 7 Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R. *J. Agri. Food Chem.*, **2005**, 53 (9): 3421-3425
- 8 GAO Fei, DU Yuan-Zheng, LU Jian. *Beer Tech*, **2012**, (10): 57-61  
高飞,杜元正,陆健. *啤酒科技*, **2012**, (10): 57-61
- 9 FAO/WHO. *Summary Report of the Seventy-second Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)*. Issued 16th March 2010, Available at [http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72\\_rev.pdf](http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf)
- 10 Dzman Z, Vaclavikova M, Polisenka I, Veprikova Z, Fenclova M, Zachariasova M, Hajslova J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2014**, 406 (2): 505-514
- 11 GB/T5009.111-2003. *Determination of Deoxynivalenol in Cereal and Cereal Products*. National Standards of the People's Republic of China  
谷物及其制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定. 中华人民共和国国家标准. GB/T 5009.111-2003
- 12 LI Rui, XIE Gang, WANG Song-Xue. *Food Science*, **2015**, 36 (6): 206-210  
黎睿,谢刚,王松雪. *食品科学*, **2015**, 36 (6): 206-210
- 13 ZHU Run-Yue, ZHAO Zhi-Yong, YANG Xian-Li, NIE Dong-Xia, XU Fei, WU Ai-Bo, SONG Su-Quan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43 (7): 994-1000  
朱闰月,赵志勇,杨宪立,聂冬霞,徐斐,武爱波,宋素泉. *分析化学*, **2015**, 43 (7): 994-1000
- 14 LI Rui-Yuan, LIU Hong-He, KANG Li. *Journal of Instrumental Analysis*, **2014**, 33 (6): 660-665  
李瑞园,刘红河,康莉. *分析测试学报*, **2014**, 33 (6): 660-665
- 15 GUO Meng-Meng, WU Hai-Yan, LU Li-Na, TAN Zhi-Jin, ZHAI Yu-Xiu, ZHAO Chun-Xia, FU Shu-Lin, LI Zhao-Xin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2015**, 43 (8): 1105-1112  
郭萌萌,吴海燕,卢立娜,谭志军,翟毓秀,赵春霞,付树林,李兆新. *分析化学*, **2015**, 43 (8): 1105-1112

- 16 ZHOU Yan , ZHAO Yong-Gang , ZHANG Bei-Bei , ZHANG Yong , CHEN Guo-Song. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2014** , 42 ( 3 ) : 367–374  
周岩 , 赵永刚 , 张蓓蓓 , 章勇 , 陈国松. 分析化学 , **2014** , 42 ( 3 ) : 367–374
- 17 HUANG Juan , CHEN Guo-Song , ZHANG Xiao-Yuan , SHEN Chong-Yu , LV Chen , WU Bin , LIU Yan , CHEN Hui-Lan , DING Tao. *Chinese Journal of Chromatography* , **2012** , 11 ( 30 ) : 1203–1207  
黄娟 , 陈国松 , 张晓燕 , 沈崇钰 , 吕辰 , 吴斌 , 刘艳 , 陈惠兰 , 丁涛. 色谱 , **2012** , 11 ( 30 ) : 1203–1207
- 18 Commission Decision 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun.* , **2002** , L221 : 8
- 19 ZHANG Hong-Wei , JIAN Hui-Min , LIN Li-Ming , CHEN Liang-Zhen , LIANG Cheng-Zhu , YUAN Tao , TANG Zhi-Xu , CAI Xue , QIN Liang-Yong. *Journal of Instrumental Analysis* , **2012** , 31 ( 7 ) : 763–770  
张鸿伟 , 简慧敏 , 林黎明 , 陈亮珍 , 梁成珠 , 袁涛 , 汤志旭 , 蔡雪 , 秦良勇. 分析测试学报 , **2012** , 31 ( 7 ) : 763–770
- 20 Bueno M J , Agüera A , Hernando M D , Gómez M J , Fernández-Alba A R. *J. Chromatogr. A* , **2009** , 1216 ( 32 ) : 5995–6002

## Analysis of Deoxynivalenol and Related Derivatives and Metabolites in Cereal and Cereal Products by Ultra Performance Liquid Chromatography–Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry with Isotopic Dilution

LIU Zhu<sup>1</sup> , HUA Ying<sup>2</sup> , XU Xiao-Ying<sup>1</sup> , CHEN Wan-Qin<sup>1</sup> , ZHAO Chao-Qun<sup>1</sup> ,  
LIANG Jing-Jing<sup>1</sup> , DING Yu-Qi<sup>1</sup> , LUO Jin-Wen<sup>\* 1</sup>

<sup>1</sup> (Zhejiang Institute for Food and Drug Control , Hangzhou 310052 , China )

<sup>2</sup> (Zhejiang Chinese Medical University , Hangzhou 310053 , China )

**Abstract** A method was established for the qualitative identification and quantitative determination of DON , 3-Ac-DON , 15-Ac-DON , DOM-1 in cereal and cereal products based on solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography–quadrupole linear ion trap mass spectrometry (UPLC–QTRAP–MS/MS) with isotopic dilution. Samples were extracted by the mixture of acetonitrile and water (84 : 16 , V/V) , degreased by hexane saturated with acetonitrile and purified by HLB solid phase extraction cartridge. The target analytes were separated by Waters Atlantis<sup>®</sup> T3 column with gradient elution by mobile phases which consisted of acetonitrile and 0.02% ammonia water. A scheduled multiple reaction monitoring (MRM) in negative mode as survey scan and an enhanced product ion (EPI) scan as dependent scan in an information dependent acquisition (IDA) experiment were adopted in mass spectrometry acquisition. On-line lab-built MS/MS library as well as the isotope internal standards was employed for the identification and qualification. For each analyte , the correlation coefficient was above 0.999 in the linear range of 1–300 µg/L. The limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were 0.1 µg/kg and 0.3 µg/kg , respectively. The mean recovery was 81.3%–101.7% at three spiked levels of 5 , 50 , 200 µg/kg. The relative standard deviation (RSD) was no more than 5%. The proposed method was successfully applied to the analysis of FAPAS's QC samples and five representative samples. This method was simple , fast and precise , and suitable for the determination and confirmation of deoxynivalenol and its derivatives and metabolites in cereal and cereal products.

**Keywords** Isotopic dilution ; Deoxynivalenol and its derivatives and metabolites ; Ultra performance liquid chromatography ; Quadrupole linear ion trap mass spectrometry

(Received 27 May 2016 ; accepted 13 September 2016)