

超高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中的九种麦角碱及污染状况分析

汪薇, 余婷婷, 刘迪, 龚蕾, 杨青, 王会霞, 张莉

(湖北省食品质量与安全监督检验研究院, 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心, 湖北武汉 430075)

摘要: 本研究采用超高效液相色谱-串联质谱技术, 建立了同时测定粮谷中双氢麦角汀、麦角柯宁碱、麦角异柯宁碱、麦角克碱、麦角异克碱、麦角卡里碱、麦角异卡里碱、麦角生碱、麦角胺等 9 种麦角生物碱的方法。样品采用乙腈-水溶液 (84+16) 提取, 经分散固相萃取剂 PSA 净化后, 超高效液相色谱-串联质谱仪测定, C18 柱分离, 以 0.1% 甲酸水溶液和乙腈为流动相梯度洗脱, 外标法定量。麦角碱检出限均为 5 $\mu\text{g/kg}$, 定量限均为 20 $\mu\text{g/kg}$, 在 45~375 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度下, 麦角碱的回收率为 50%~90%。同时通过高分辨质谱, 确定麦角碱的一级精确质量数以及二级特征碎片离子, 辅助样本筛查确证。对 20 份市售粮谷样品进行检测, 有一份样本检出了麦角克碱和麦角异克碱, 其含量高于检出限而低于定量限。本研究为粮谷及其制品中麦角碱提供相对有效的检测方法, 保障我国粮谷安全。

关键词: 麦角碱; 粮谷; 超高效液相色谱-串联质谱法; 污染状况

文章编号: 1673-9078(2020)05-277-287

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.037

Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS) Analysis of Nine Ergot Alkaloids in Cereals and Their Contamination Analysis

WANG Wei, YU Ting-ting, LIU Di, GONG Lei, YANG Qing, WANG Hui-xia, ZHANG Li

(Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Wuhan 430075, China)

Abstract: In this study, ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was used to establish a method for simultaneous determination of nine ergot alkaloids in cereals including dihydroergocristine, ergocornine, ergocornine, ergocristine, ergocristinine, ergocryptine, ergocryptinine, ergosine, and ergotamine. The sample was extracted with an acetonitrile-water (84+16) solution, and the extract was purified with dispersive solid phase extraction agent (PSA). The UPLC-MS/MS analysis employed a C18 column for separation, and a mobile phase consisting of 0.1% formic acid aqueous solution and acetonitrile for gradient elution, along with external standards for quantification. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of ergot alkaloids were 5 $\mu\text{g/kg}$ and 20 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The recovery of ergot alkaloids was in the range of 50%~90% at the concentration of 45~75 $\mu\text{g/kg}$. At the same time, high-resolution mass spectrometry (HRMS) was used to determine the accurate mass and the secondary characteristic fragment ions of ergot alkaloids, to assist sample screening and confirmation. Twenty commercially available cereal samples were tested, with ergocristine and ergocristinine were detected in one sample and its content higher than the LOD but lower than the LOQ. This study provides a relatively effective detection method for ergot alkaloids in cereals and their products to ensure the safety of grains in China.

引文格式:

汪薇,余婷婷,刘迪,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定粮谷中的九种麦角碱及污染状况分析[J].现代食品科技,2020,36(5):277-287

WANG Wei, YU Ting-ting, LIU Di, et al. Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) analysis of nine ergot alkaloids in cereals and their contamination analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 277-287

收稿日期: 2019-11-04

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1602302); 湖北省食药局重点科研项目 (201802002)

作者简介: 汪薇 (1989-), 女, 博士, 研究方向: 食品检测与危害物筛查

通讯作者: 余婷婷 (1985-), 女, 博士, 研究方向: 食品检测与危害物筛查

Key words: ergot alkaloids; cereals; UPLC-MS/MS; contamination analysis

麦角菌属(*Claviceps*)的菌种能感染黑麦、小麦、高粱、燕麦等禾本科植物的子房,产生黑硬的菌核(称为麦角),菌核中富含麦角生物碱(Ergot alkaloids)^[1,2],人畜误食麦角后,这些生物碱会转化成麦角酸,使人 和动物产生痉挛、头昏、麻痹、呕吐等症状,急性中毒可造成死亡^[3]。麦角碱的污染在欧洲和北美非常常见,欧洲历史上曾发生过多次人畜麦角中毒事件,严重影响人类健康和畜牧业的发展^[4]。欧盟规定麦角菌核在未加工谷物中的最大限量为 500 $\mu\text{g/kg}$,我国粮食卫生标准中规定小麦中麦角限量为 0.01% (以检出麦角质量占总量百分比)^[5]。英国食品安全局 2011 年调查了婴幼儿食品、谷物食品中真菌毒素的含量,调查发现超过 10%的谷物食品样本含有麦角生物碱,其总浓度从 2 $\mu\text{g/kg}$ 至 169 $\mu\text{g/kg}$ 不等。BRYŁA 对波兰 2015 年的 65 份谷物样本分析,大部分样品中都发现了麦角碱,尤其是黑麦,麦角碱检出最多,占 45.6%,含量 44.7 mg/kg ^[6]。José 调查了 122 份比利时食品和饲料样品,有 104 份含有麦角生物碱,其中麦角生碱检出比例较高,阳性样本中麦角胺、麦角克碱、麦角生碱含量最高,总麦角碱含量从 1-1145 $\mu\text{g/kg}$ ^[7]。我国 2017 年江苏泰州口岸检验检疫人员在对一批自美国进境的 10500 t 小麦进行检验检疫时,检出麦角含量达 0.026%,超出国家标准 2 倍多。2018 上半年霉菌毒素调查报告显示,在我国抽取的 195 份饲料样品中麦角碱检出率达 91.8%,平均污染水平为 25.2 $\mu\text{g/kg}$,可见麦角碱在我国粮谷中存在一定风险,需要引起重视。

麦角生物碱的活性成分主要是以麦角酸为基本结构的一系列生物碱衍生物,目前已经从麦角中提取了 40 多种生物碱,其中对食品安全有重要影响的主要是麦角新碱、麦角柯宁碱、麦角克碱、麦角卡里碱、麦角生碱以及麦角胺^[8]。不同的麦角碱 C-8 被不同的基团取代,由于 C8 位有不对称原子,所以麦角碱可以发生异构化(由 8R 转变成 8S),形成差向异构体^[9],如麦角克碱(ergocristine)和麦角异克碱(ergocristinine)等,不同构型其毒性是不同的,S 构型麦角碱(‘-inine’)较 R 构型(‘-ine’)的生物活性低,毒性较小,在评估消费者接触麦角生物碱的情况时,有必要对 R 和 S 对映体加以区分^[10]。由于麦角生物碱种类繁多,这些差向异构体,有着相同的母离子和子离子,且同分异构体之间会发生转变,给检测造成干扰。麦角碱常规的检测方法有比色分析法、薄层色谱分析法^[11]、液相色谱分析法^[1]及酶联免疫吸附法^[12],这些方法往往不能有效区分麦角生物碱的差向异构体

^[13]。随着检测技术的发展,近年来,液质联用测定麦角生物碱在谷物、食品中的残留越来越广泛^[14,15],也有通过高分辨质谱对麦角碱系列进行筛查^[16,17]。José^[7]利用 LC-MS 法测定黑麦中 6 种麦角碱含量,各麦角碱的定量限为 0.1~1 $\mu\text{g/kg}$,平均回收率在 45%~90% 之间。Crews^[18]采用液相色谱-串联质谱法对英国黑麦类谷物制品中六种主要麦角生物碱进行了分析,该方法可区分-ine 和-inine 异构体,其定量限为 1~3 $\mu\text{g/kg}$,大多数黑麦面包的-ine 与-inines 之比约为 1.5。目前,关于麦角碱的检测标准主要有 GB 2715-2016《食品安全国家标准 粮食》^[5],该标准以染色法测定麦角数量来检测麦角碱,但方法在分析灵敏度和准确性上有待提高;此外还有 SN/T 4524-2016《出口粮谷中 6 种麦角碱的测定》^[19]以及 NY/T 2769-2015《牧草中 15 种生物碱的测定》^[20],这两个标准均是采用液相色谱-质谱/质谱法进行测定,利用分散固相净化剂 PSA 和 MycoSep 150 麦角碱多功能净化柱等方式净化样品,但仍存在麦角碱种类较少且检测流程繁琐、耗时长等问题,因此急需建立快速、高效地检测食品及其原料中麦角碱的方法。

本文拟建立小麦、小米、薏仁和面条中双氢麦角汀、麦角柯宁碱、麦角异柯宁碱、麦角克碱、麦角异克碱、麦角卡里碱、麦角异卡里碱、麦角生碱、麦角胺等 9 种麦角生物碱同时测定的 UPLC-MS/MS 法,用于粮谷中麦角碱的确证分析,并对不同粮谷及其制品的麦角碱分布规律进行初步探讨,旨在为食品安全监督部门提供相对有效的检测手段,完善我国粮谷及其制品中麦角碱的监测方法,对我国粮谷中麦角碱污染情况及潜在危害提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

双氢麦角汀(Dihydroergocristine, CAS 17479-19-5)、麦角柯宁碱(Ergocornine, CAS 564-36-3)、麦角异柯宁碱(Ergocorninine, CAS 564-37-4)、麦角克碱(Ergocristine, CAS 511-08-0)、麦角异克碱(Ergocristinine, CAS 511-07-9)、麦角卡里碱(Ergocryptine, CAS 511-09-1)、麦角异卡里碱(Ergocryptinine, CAS 511-10-4)、麦角生碱(Ergosine, CAS 561-94-4)、麦角胺(Ergotamine, CAS 113-15-5),均为美国 Romer Labs 公司购买,纯度 $\geq 98.0\%$,鉴于麦角碱在室温条件下,易消旋为差向异构体,标准品

需避光处理且尽量缩短处理时间。乙腈、甲醇为色谱纯试剂 (Fisher 公司购买), 水为经 Millipore 净化的超纯水。乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶 PSA, 40~60 μm (Agela Technologies); MycoSep 150 麦角碱多功能净化柱 (美国 Romer Labs 公司); MycoSpin 400 多毒素检测净化柱 (美国 Romer Labs 公司); Oasis PRiME HLB 柱 (60 mg/3cc, 美国 Waters 公司)。20 份黑麦等粮谷样品来源于湖北省武汉市周边市区超市和天猫网购。

1.2 仪器与设备

超高效液相色谱-串联质谱 AB 4500, 美国 SCIEX 公司; 高分辨静电场轨道阱质谱, 美国赛默飞世尔科技公司; SB25-12DTS 双频超声波清洗器, 宁波新芝;

ME204 电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; MS3 digital 涡旋仪, 德国 IKA 公司; Centrifuge 5810 离心机, 艾本德中国有限公司; 0.22 μm 有机相微孔滤膜, 天津津腾公司; Milli-Q 去离子水发生器, 美国 Millipore 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 超高效液相色谱-串联质谱法参数

色谱条件: 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18, 100 mm $\times$ 2.1 mm, 粒径 1.7 μm 。柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量: 5 μL , 流速: 0.3 mL/min, A 为含 0.1% 甲酸的水溶液, B 为乙腈溶液, 流动相梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 The gradient elution program

时间	流速/(mL/min)	A (含 0.1% 甲酸的水溶液)	B (乙腈)
0	0.3	70.0	30.0
1.00	0.3	70.0	30.0
5.50	0.3	30.0	70.0
8.00	0.3	10.0	90.0
9.00	0.3	10.0	90.0
9.01	0.3	70.0	30.0
10.00	0.3	70.0	30.0

质谱条件: 离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 扫描方式: 正离子模式扫描; 检测方式: 多反应监测 (MRM); 喷雾电压: 3.0 kV(+); 加热气温度: 100 $^{\circ}\text{C}$;

鞘气流速: 40 L/hr; 辅助气流速: 20 L/hr; 离子传输毛细管温度: 350 $^{\circ}\text{C}$; 碰撞气压力: 1.5 mTorr。9 种麦角碱的质谱条件见表 2。

表 2 九种麦角碱的定性离子、定量离子、碰撞能量和去簇电压

Table 2 Qualitative ion, quantitative ion, collision energy and declustering potential of ergot alkaloids

化合物名称	电离方式	母离子/(m/z)	定性定量离子/(m/z)	碰撞能量/eV	去簇电压 DP/V
双氢麦角汀	ESI+	612.3	270.3*/350.0	40/35	140
麦角柯宁碱	ESI+	562.3	268.2*/223.2	35/45	140
麦角异柯宁碱	ESI+	562.2	223.0*/305.1	42/35	120
麦角克碱	ESI+	610.4	268.3*/305.0/223.3	35/37/40	140
麦角异克碱	ESI+	610.3	348.2*/305.3/223.4	30/40/45	110
麦角卡里碱	ESI+	576.5	223.1*/305.2/348.2	45/40/30	115
麦角异卡里碱	ESI+	576.5	223.1*/305.2/348.2	45/40/30	115
麦角生碱	ESI+	548.3	223.4*/208.3	42/50	100
麦角胺	ESI+	582.4	208.4*/223.0/268.2	50/45/35	120

注: 表中带*为定量离子。

1.3.2 高分辨静电场轨道阱质谱采集参数

电喷雾离子源 (ESI 源), 正离子模式 (Positive), 喷雾电压 3000 V。鞘气 (Sheath Gas): 40 Arb; 辅助气 (Aux Gas): 10 Arb; 吹扫气 (Sweep Gas): 0 Arb; 离子传输管温度 (Ion Transfer Tube Temp): 325 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器温度 (Vaporizer Temp): 350 $^{\circ}\text{C}$ 。一级全扫描

(MS OT) 分辨率 120000, 扫描范围 m/z 100~1000, RF Lens (%) 60, 自动增益控制目标离子数 (AGC) 为 5×10^5 。二级采用数据依赖扫描 (dd-MS/MS): 达到设定阈值后触发二级碎裂, 四级杆隔离, Orbitrap 检测, 高能碰撞裂解 (HCD) 碎裂能量为 (40 $\pm$ 15) %, 二级分辨率 60000, 起始质量数 50 m/z , 自动增益控

制目标离子数 (AGC) 为 1×10^5 。

1.4 样品处理

将粮谷样品粉碎, 过 20 目筛, 混匀。将制备好的试样于室温保存。准确称取 2 g (精确到 0.01 g) 样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 提取溶剂, 提取溶剂分别为乙腈/200 mg/L 碳酸铵 (84:16 体积比)、乙腈/5% 氨水 (84:16 体积比)、乙腈/水 (84:16 体积比) 和乙腈/水/甲酸 (84:15:1 体积比) 来比较不同提取效果, 用涡旋混合器混匀 1 min, 振荡提取 30 min, 离心 5 min (4500 r/min), 上清液过滤, 待净化。采取不同方式净化样本: (1) 取 5 mL 待净化液加入 15 mL 离心管中, 加入 150 mg PSA 净化, 涡旋 1 min, 4500 r/min 离心 5 min, 取上清; (2) 取 5 mL 待净化液, 缓慢推入 MycoSep150 麦角碱多功能净化柱, 收集滤液; (3) 取 5 mL 待净化液, 加入到 Oasis PRiME HLB 柱净化, 收集滤液; (4) 取 750 μ L 待净化液加入 MycoSpin 400 多毒素检测净化柱, 涡旋 1 min, 4500 r/min 离心 5 min, 收集滤液。上述滤液 35 $^{\circ}$ C 氮气吹干, 准确加入 1 mL 甲醇-水 (50:50 体积比) 复溶, 涡旋 1 min, 微孔滤膜过滤至进样小瓶, 液相色谱-串联质谱测定。

1.5 方法学考察

以空白小麦粉, 按照样品前处理方法进行提取, 得到基质提取液为稀释溶液配制标准曲线, 浓度分别 4.5、9、12.5、25、50、100、250、500、750、1000 ng/mL, 分别以各分析物的峰面积 (Y) 和对应的标准品溶液浓度 (X) 进行线性回归分析, 得到线性方程和相关系数 R^2 。以 3 倍信噪比 (S/N) 为检出限 (Limit of Detection, LOD), 以 10 倍 S/N 为定量限 (Limit of Quantitation, LOQ)。取阴性基质, 分别添加 3 个水平的标准品溶液, 每个加标水平平行制备 6 次, 按上述样品处理步骤 (1.4) 进行提取测定, 计算该方法的平均加标回收率和相对标准偏差 (Relative standard deviation, RSD)。

1.6 数据分析

试验重复 3 次, 应用 SAS 9.0 软件和 GraphPad Prism 5 对实验数据进行分析, 采用最小显著极差法或 Duncan 多重进行各数据之间的显著性对比, 当 $p < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 麦角碱的精确质量数以及二级特征碎片离子

表 3 麦角碱系列毒素高分辨质谱一级和二级精确分子量

Table 3 The parent ion and its characteristic fragment ions of ergot alkaloids by high resolution mass spectrometry

中文名	英文名	分子式	CAS	加电荷方式	预测分子量/ (m/z)	实测分子量/ (m/z)	主要碎片 离子/ (m/z)
双氢麦角汀	Dihydroergocristine	$C_{35}H_{41}N_5O_5$	17479-19-5	[M+H] ⁺	612.31805	612.31866	270.16037
							253.13397
							210.09180
							223.12157
							168.08119
							350.18665
							577.40396
麦角柯宁碱 (麦角考宁)	Ergocomine	$C_{31}H_{39}N_5O_5$	564-36-3	[M+H] ⁺	562.30240	562.30267	268.14346
							223.12228
							208.07504
							305.12735
							348.16940
麦角异柯宁碱	Ergocorninine	$C_{31}H_{39}N_5O_5$	564-37-4	[M+H] ⁺	562.30240	562.30261	223.12321
							227.15457
							305.12863
							208.07596
							192.08104

转下页

接上页

							208.07651
							223.12367
麦角克碱	Ergocristine	C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₅	511-08-0	[M+H] ⁺	610.3024	610.30273	268.14496
							180.08150
							277.13431
							223.12317
麦角异克碱	Ergocristinine	C ₃₅ H ₃₉ N ₅ O ₅	511-07-9	[M+H] ⁺	610.3024	610.30225	192.08099
							243.11295
							223.12248
麦角克普汀 (麦角卡里碱)	Ergocryptine	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	511-09-1	[M+H] ⁺	576.31805	576.31818	268.14371
							208.07524
							305.12766
							348.16968
							558.30609
							208.07581
异麦角克普汀 (麦角异卡里碱)	Ergocryptinine	C ₃₂ H ₄₁ N ₅ O ₅	511-10-4	[M+H] ⁺	576.31805	576.31811	223.12312
							268.14441
							305.12843
							348.17062
							223.12299
麦角生碱 (麦角辛)	Ergosine	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	561-94-4	[M+H] ⁺	548.28675	548.28674	208.07570
							268.14435
							320.13928
							548.28687
							223.12315
麦角异生碱	Ergosinine	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₅	596-88-3	[M+H] ⁺	548.28675	548.28693	208.07590
							249.10243
							263.13913
							208.41891
麦角胺	Ergotamine	C ₃₃ H ₃₅ N ₅ O ₅	113-15-5	[M+H] ⁺	582.27110	582.28014	223.12115
							268.23240

利用高分辨质谱采集了麦角碱毒素的一级和二级质谱图,得到麦角碱的一级精确质量数以及二级特征碎片离子(表3)。通过核对麦角碱一级精确质量数和二级特征碎片离子可以减少样本的假阳性率,进一步提高检测的准确性。各目标物在[M+H]⁺模式有较高的响应,所有麦角碱峰谱均含有特征前体片段223.1 *m/z*。Arroyo-Manzanares 研究了已知麦角生物碱的裂解反应,在所有的麦角胺类、麦角酰胺类化合物中,均发现了 *m/z* 223 和 *m/z* 251 的离子^[16]。从结果可以看出,对于麦角碱类毒素,结构具有一定的相似性,含有共有的特征碎片,基于同类结构物质具有相同质谱裂解规律,为发现新型未知毒素打下基础。

2.2 超高效液相色谱-串联质谱法的优化

各麦角碱的母离子及其定性定量离子、去簇电压、碰撞能量等质谱参数见表2,其母离子和定性定量离子与高分辨二级特征碎片离子吻合(表3)。

由于麦角碱差向异构体的毒性不同,两种构型分离很重要^[21]。九种麦角碱中麦角克碱和麦角异克碱、麦角柯宁碱和麦角异柯宁碱、以及麦角卡里碱和麦角异卡里碱互为差向异构体,有着相同的母离子和子离子,在质谱检测上会产生干扰,因此必须在色谱上实现基线分离才能准确的定性、定量分析。

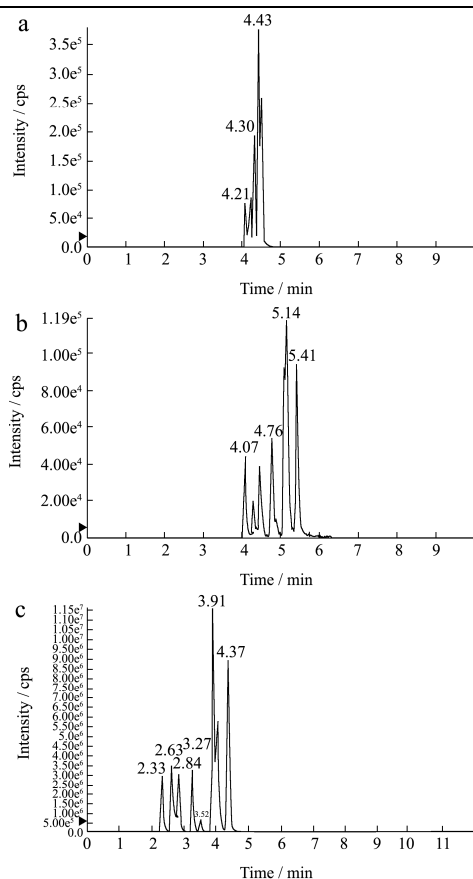
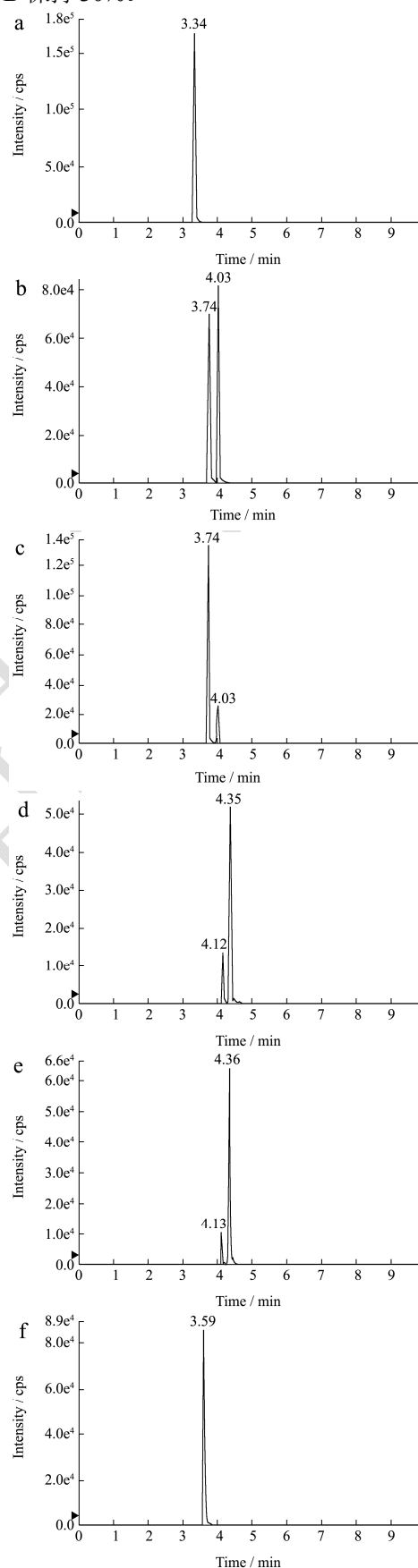


图1 麦角碱在 (a) BEH C18 (50 μm)、(b) BEH C18 (100 μm) 和 (c) HSS T3 (100 μm) 色谱柱上的总离子流图

Fig.1 Total ion current of ergot alkaloids for BEH C18 (50 μm)、BEH C18 (100 μm) and HSS T3 (100 μm)

研究比较了不同类型的色谱柱对差向异构体麦角碱分离效果, 考察了 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm) 三种型号色谱柱对麦角碱和麦角异克碱、麦角柯宁碱和麦角异柯宁碱、以及麦角卡里碱和麦角异卡里碱的分离情况如图1所示。可以看出 50 mm C18 柱对于分离同分异构体效果不理想, 100 mm C18 和 T3 色谱柱对同分异构体达到基线分离、峰形尖锐。选择合适色谱柱的同时也比较不同洗脱梯度对各麦角碱的分离效果, 参照文献^[22]设置了不同的流动相洗脱梯度。在 10 min 的洗脱梯度 (表1) 对九种毒素能够实现较好的分离 (图2), 峰型较好, 因此综合考虑选择 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.7 μm), 按表1设置梯度洗脱, 即 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为乙腈, 流速 0.3 mL/min, 从 0~1 min, B 保持 30%; 1~5.5 min, B 从 30% 增加到 70%; 5.5~8 min, B 从 70% 增加到 90%; 8~9 min, B 保持 90%; 9~9.01 min, B 从 90% 降至 30%; 9.01~10

min, B 保持 30%。



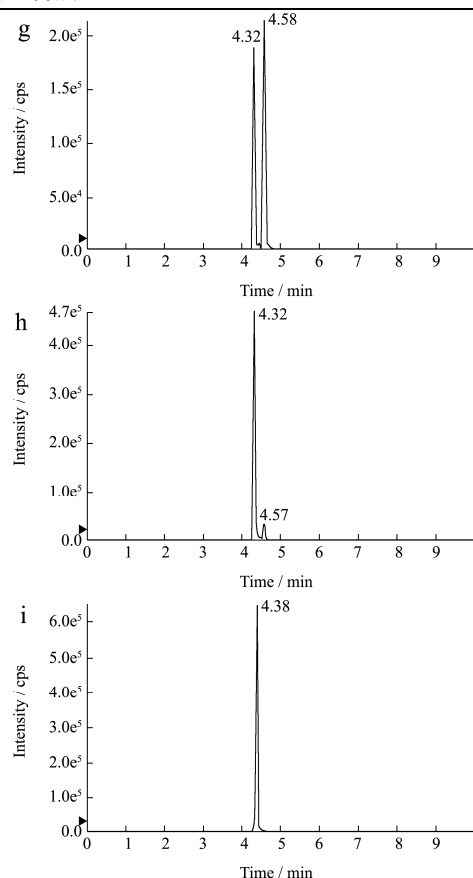


图2 九种麦角碱的提取离子流图

Fig.2 Extracted ion chromatogram of ergot alkaloids

注: a: 麦角生碱; b: 麦角异柯宁碱; c: 麦角柯宁碱; d: 麦角卡里碱; e: 麦角异卡里碱; f: 麦角胺; g: 麦角异克碱; h: 麦角克碱; i: 双氢麦角汀。

2.3 样品提取溶剂对麦角碱回收率的影响

提取溶剂是影响目标物回收率的重要因素,考察了乙腈/200 mg/L 碳酸铵 (84:16 体积比)、乙腈/5%氨水 (84:16 体积比)、乙腈/水 (84:16 体积比) 和乙腈/

水/甲酸 (84:15:1 体积比) 对 9 种麦角碱的提取效率,如表 4 所示。可以看出,酸性乙腈 (乙腈/甲酸水) 不适合麦角碱类毒素的提取,回收率均较低。对于大部分麦角碱,中性乙腈 (乙腈/水) 体系的回收率较碱性乙腈 (乙腈/碳酸铵、乙腈/氨水) 体系略高,提取回收率在 65%~110%之间,但对于麦角生碱回收较差 (46.4%)。考虑到操作的简易性,且氨水乙腈或者碳酸铵乙腈对质谱仪器及柱子的伤害,选择乙腈-水 (84:16 体积比) 作为麦角碱样品的提取液。

麦角碱的同分异构体在酸性或碱性环境中会相互转化,且转化程度取决于麦角碱结构、温度、溶剂类型、pH 值等^[8]。过高过低 pH 值、光、高温会加速麦角碱异构化^[15]。麦角氨酸衍生物麦角新碱 ergometrine 较稳定,不易异构化。麦角胺类如麦角生碱、麦角胺、麦角柯宁碱、麦角卡里碱、麦角克碱等,这类麦角碱在 C9-C10 有一个双键,使得 C8 位比较容易异构化^[15],其中麦角生碱 (Ergosine) 异构化程度最高,20 °C 贮藏 6 周有 43% 样品发生差向异构化。其次溶剂也会影响麦角碱异构化程度,在甲醇中不稳定,在乙腈、氯仿、乙腈/碳酸铵中较稳定,不易发生异构化^[23]。此外有研究表明谷物加工过程中麦角碱差向异构体间会相互转化,黑麦面团在烘焙后,R-构型对映体麦角碱如麦角新碱、麦角柯宁碱、麦角克碱等下降了 29%~55%,而 S-构型对映体如麦角异柯宁碱、麦角异克碱等含量升高了 21%~29%。不同对映体的热稳定性不同,可能解释了各麦角碱水平降低结果的差异^[8],总 R 构型对映体下降了 46%,而 S 构型上升了 21%,说明在食品的热加工过程加速 R 构型 (‘-ine’) 麦角碱分子转化为活性较低的 S 构型 (‘-inine’) 麦角碱分子,降低了毒性,从食品安全角度来说这是个有益的过程^[8,10]。

表4 不同提取溶剂下 9 种麦角碱的回收率 (%)

Table 4 The recovery of ergot alkaloids with different extraction solvents (n=6)

	乙腈/碳酸铵	乙腈/5%氨水	乙腈/水	乙腈/甲酸水
双氢麦角汀	72.36±4.01	86.88±0.78	89.07±1.54	12.71±0.47
麦角柯宁碱	68.25±1.75	64.17±2.36	76.69±2.55	21.34±1.51
麦角克碱	62.40±2.36	62.13±1.58	76.90±1.36	14.16±1.31
麦角生碱	61.08±5.11	70.45±3.44	46.43±1.74	16.93±0.88
麦角异克碱	86.16±2.31	114.51±5.58	111.50±7.56	23.18±1.10
麦角异柯宁碱	69.83±2.22	77.58±1.74	84.41±8.11	20.79±0.85
麦角卡里碱	56.20±3.69	61.72±2.55	65.58±3.28	15.28±0.59
麦角异卡里碱	53.47±0.95	55.23±1.89	65.66±1.86	14.37±0.04
麦角胺	55.73±3.55	38.50±1.11	65.24±1.09	11.48±1.00

2.4 样品净化步骤对麦角碱回收率的影响

表 5 净化方式对麦角碱回收率的影响 (%)

Table 5 The recovery of ergot alkaloids with different purification (n=6)

	直接提取	PSA 净化	MycoSep 150 柱	PRiME HLB 柱	MycoSpin 400 柱
双氢麦角汀	14.52±0.07	57.61±1.01	113.24±0.02	38.76±0.14	13.10±0.13
麦角克碱	35.59±1.01	56.30±2.92	19.82±0.11	68.35±2.04	15.97±0.06
麦角异克碱	8.58±0.02	57.36±2.05	227.57±3.14	16.11±0.03	156.25±3.05
麦角卡里碱	14.96±0.11	55.34±0.94	142.71±5.17	28.57±0.09	32.98±0.06
麦角异卡里碱	13.27±0.06	53.85±1.01	111.52±0.08	25.69±0.02	29.34±0.07
麦角柯宁碱	25.78±0.07	74.20±3.06	33.42±0.05	41.76±0.57	53.75±0.01
麦角生碱	35.12±0.75	75.70±5.09	50.51±0.07	52.67±2.09	62.13±2.02
麦角异柯宁碱	18.14±0.09	70.03±2.01	144.69±7.23	26.35±0.15	111.97±5.07
麦角胺	22.50±0.01	70.37±2.01	50.39±4.05	36.54±0.11	28.08±0.14

为考察净化步骤对麦角碱回收率的影响,比较提取后加净化剂 PSA (N-丙基乙二胺)、MycoSep 150 麦角碱多功能净化柱、MycoSpin 400 多毒素检测净化柱、PRiME HLB 柱净化后检测对 9 种麦角碱的回收率,以直接提取不经过净化步骤作为对照,结果见表 5。样品直接提取后进行质谱检测,各麦角碱回收率均较低,仅 8.5%~36%,说明存在较强的基质效应且对仪器有一定程度损伤,需要对样品进行净化。MycoSep 150 柱是麦角碱专用柱,使用方便,无需活化、上样、洗脱等步骤,但对各麦角碱回收效率差异较大。MycoSpin 400 多毒素检测净化柱处理后,也存在对麦角碱的选择性,回收率低的仅 13.1%,回收率好的可达到 111%。PRiME HLB 柱为通过型净化小柱,可能会导致目标物部分损失,各麦角碱回收率普遍偏低。

提取后加 PSA 净化,回收率在 55%~76%之间,经过净化步骤,基质效应减小,因此选择 PSA 净化样品。综上,称取 2 g 样品,加入 20 mL 乙腈-水 (84:16 体积比) 提取液,混匀后振荡提取 30 min,离心 5 min (4500 r/min)。取 5 mL 上清液,加入 150 mg PSA,涡旋 1 min,4500 r/min 离心 5 min,取上清,35 °C 氮气吹干,加入 1 mL 甲醇-水 (50:50 体积比) 复溶,0.22 μm 微孔滤膜过滤,液相色谱-串联质谱测定。

2.5 方法学考察

表 6 列出了 9 种麦角碱的线性范围、检出限和定量限。在各自的线性范围内,9 种麦角碱线性关系良好,相关系数(R^2)均大于 0.99,检出限(LOD)为 5 μg/kg,定量限(LOQ)为 20 μg/kg,满足限量检测的要求。

表 6 麦角生物碱的线性范围、相关系数、检出限、定量限

Table 6 The linear range, correlation coefficient, detection limit and quantitative limit of ergot alkaloids methods

	线性方程	相关系数/ R^2	线性范围/(ng/mL)	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)
双氢麦角汀	$Y=21917.609x+5.621e^5$	0.99691	25-1000	5	20
麦角柯宁碱	$Y=5896.138x+6.136e^4$	0.99873	25-1000	5	20
麦角克碱	$Y=14773.161x+3.293e^5$	0.99638	25-1000	5	20
麦角生碱	$Y=8565.695x+7.088e^4$	0.99652	25-1000	5	20
麦角异克碱	$Y=23246.020x+3.283e^5$	0.99508	12.5-500	5	20
麦角异柯宁碱	$Y=10217.148x+11168.822$	0.99759	12.5-500	5	20
麦角卡里碱	$Y=7556.576x+4.589e^4$	0.99734	9-360	5	20
麦角异卡里碱	$Y=7763.421x+4.896e^4$	0.99502	9-360	5	20
麦角胺	$Y=2607.411x+3.123e^4$	0.99525	25-1000	5	20

取空白小米、小麦粉和面条样品,分别添加三个浓度水平的混合标准溶液,按样品处理方法进行处理,每个加标水平进行 6 次重复实验,回收率结果见表 7。

九种麦角碱三个添加水平回收率在 50%~90%之间;变异系数在 0.2%~8.7%之间。

表7 小米、小麦粉和面条中9种麦角碱的加标回收率

Table 7 The recovery of ergot alkaloids in millet, wheat flour and noodle

	加标水平/($\mu\text{g/kg}$)	小米 (n=6)		小麦粉 (n=6)		面条 (n=6)	
		回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%	回收率/%	变异系数/%
双氢麦角汀	125	62.66	2.10	77.34	2.67	76.24	2.64
	250	67.49	5.27	77.49	4.93	75.95	8.34
	375	71.03	4.53	81.33	4.80	77.72	2.20
麦角柯宁碱	125	63.83	2.30	67.09	3.74	89.53	2.67
	250	67.55	2.45	69.43	4.40	78.88	4.28
	375	70.68	4.51	67.97	2.10	83.90	4.15
麦角克碱	125	71.91	2.30	65.13	2.48	68.32	4.73
	250	64.09	3.46	72.93	5.20	71.78	4.39
	375	71.64	2.34	66.49	5.53	72.08	8.71
麦角生碱	125	69.74	2.40	71.10	4.97	60.85	0.82
	250	69.98	5.87	71.44	6.70	71.67	2.29
	375	66.95	8.26	76.71	4.15	69.51	4.07
麦角异克碱	62.5	68.68	1.90	64.05	1.94	60.62	2.51
	125	53.33	1.20	64.00	5.03	65.09	4.40
	187.5	50.67	5.95	63.97	5.26	68.87	3.05
麦角异柯宁碱	62.5	39.42	2.10	68.31	1.73	58.54	3.32
	125	53.25	1.43	67.63	4.55	58.24	2.40
	187.5	47.79	4.18	71.59	6.43	60.11	4.86
麦角卡里碱	45	58.07	2.20	71.55	1.15	71.88	1.24
	90	58.57	0.83	79.56	1.40	71.27	0.28
	135	53.74	5.67	82.65	4.15	77.96	2.06
麦角异卡里碱	45	48.11	1.95	56.96	4.45	68.88	4.52
	90	44.56	1.35	65.32	4.40	66.50	3.28
	135	43.61	4.40	62.31	5.22	69.32	3.66
麦角胺	125	64.89	2.20	63.89	4.48	64.83	3.92
	250	67.80	5.81	70.56	6.05	71.54	6.85
	375	68.63	6.80	75.84	5.22	65.82	5.07

2.6 粮谷中麦角碱污染状况分析

按照本文建立的方法,针对麦角碱检出较多的粮谷样本,对黑麦全粉、桂格奇亚籽麦片、黑麦米、薏仁米、小米、面条、东北黑米、大麦仁、燕麦仁、小麦全麦、面粉等20份样品进行检测。20份样本中有一份样本检出了麦角克碱和麦角异克碱,其含量高于检出限而低于定量限,分别为11 $\mu\text{g/kg}$ 、14 $\mu\text{g/kg}$ 。

调研近年来国内外对麦角碱监测结果, Bryła^[24]对2016年和2017年在波兰三个不同地区收获的122个黑麦样品进行了麦角及其生物碱的检测,所有样本均检出麦角菌核,籽粒中麦角菌核的平均含量在0.74~1.06 g/kg之间,麦角生物碱的平均浓度在270.1~580.4 $\mu\text{g/kg}$,麦角量与麦角生物碱浓度之间存

在显著的统计学相关性($R^2=0.6941$),麦角生物碱以R构型麦角蛋白肽为主,如麦角卡里碱、麦角柯宁碱和麦角克碱(分别占样本的31、29和16%)。Crews对英国黑麦类谷物制品中六种主要麦角生物碱进行了分析,在28个样品中有25个样品中检出麦角生物碱,其中11个黑麦薄饼的含量达到340 $\mu\text{g/kg}$,黑麦面包含量高达121 $\mu\text{g/kg}$,小麦面包、面包粉和饼干只含有低水平的生物碱,麦角胺、麦角克碱、麦角生碱检出频率较高^[18]。Grusie对2014年到2016年加拿大西部的谷物检测发现麦角克碱检出率最高(48%),其次麦角卡里碱(17%)、麦角柯宁碱(6%)以及麦角生碱(5%),且菌核中产生的麦角生物碱的种类和浓度会随着地理区域和寄主植物的不同而变化^[25]。本文仅检测到1份麦角碱污染样本,可能是由于所采集样本均

为湖北省武汉市周边市区超市和天猫网购产品, 食品质量已经过严格检验, 有一定保障, 后续可针对田间样本或谷仓样本进一步监测麦角碱含量。

3 结论

本研究利用 UPLC-MS/MS 检测粮谷中九种常见麦角碱, 用分散固相萃取剂代替净化柱, 相对于现有标准, 简化了前处理流程和试剂耗材的使用, 并且能在 10 min 检测时间内有效分离九种麦角碱 (其中包含三对差向异构体), 本方法双氢麦角汀、麦角柯宁碱、麦角异柯宁碱、麦角克碱、麦角异克碱、麦角卡里碱、麦角异卡里碱、麦角生碱、麦角胺的检出限为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 在 45~375 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度下, 麦角碱回收率为 50%~90%, 有助于解决麦角碱种类较少且检测流程繁琐、耗时长等问题, 提高粮谷样品检测、监测效率, 降低成本, 保护环境, 保障从业人员健康安全。本研究对后续标准制定, 以及粮谷污染生物碱的相关科研、标准制定起到较好的指导、参考、促进作用。本文主要针对麦角碱原型及其差向异构体的分析, 对于其隐蔽型如葡萄糖苷结合型麦角碱没有涉及^[26,27]。除粮谷基质外, 有报道从水生生物分离出麦角碱类物质麦角生物碱肽 (ergosinine)^[28], 可进一步深入研究。

参考文献

- [1] Panaccione D G, Ryan K L, Schardl C L, et al. Analysis and modification of ergot alkaloid profiles in fungi [J]. 2012, 515: 267-290
- [2] Schardl C L, Panaccione D G, Tudzynski P. Ergot Alkaloids-biology and Molecular Biology [M]. The Alkaloids: Chemistry and Biology. USA: Academic Press. 2006: 45-86
- [3] 王垠辉, 张峥, 马红梅, 等. 农产品中麦角生物碱分析方法的研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(19): 353-357
WANG Yu-hui, ZHANG Zheng, MA Hong-mei, et al. Research progress in analytical methods for ergot alkaloids in agricultural products [J]. Food Science, 2012, 33(19): 353-357
- [4] Van Dongen P W, De Groot A N. History of ergot alkaloids from ergotism to ergometrine [J]. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 1995, 60(2): 109-116
- [5] GB 2715-2016, 食品安全国家标准 粮食
GB 2715-2016, National Food Safety Standards-Foodstuff
- [6] Bryła M, Szymczyk K, Jędrzejczak R, et al. Application of liquid chromatography/ion trap mass spectrometry technique to determine ergot alkaloids in grain products [J]. Food Technology and Biotechnology, 2015, 53(1): 18-28
- [7] Diana Di Mavungu J, Malysheva S V, Sanders M, et al. Development and validation of a new LC-MS/MS method for the simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their corresponding epimers. Application to some food and feed commodities [J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 292-303
- [8] Bryła M, Ksieniewicz-woźniak E, Waśkiewicz A, et al. Stability of ergot alkaloids during the process of baking rye bread [J]. Lwt, 2019, 110: 269-274
- [9] 卢春霞, 王洪新. 麦角生物碱的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(11): 282-288
LU Chun-xia, WANG Hong-xin. Research progress of ergot alkaloids [J]. Food Science, 2010, 31(11): 282-288
- [10] Tittlemier S, Drul D, Roscoe M, et al. Fate of ergot alkaloids during laboratory scale durum processing and pasta production [J]. Toxins, 2019, 11(4): 195
- [11] Oellig C. Lysergic acid amide as chemical marker for the total ergot alkaloids in rye flour-determination by high-performance thin-layer chromatography-fluorescence detection [J]. Journal of Chromatography A, 2017, 1507: 124-131
- [12] 葛兴华. 检测饲料中主要麦角碱的 ELISA 试剂盒的制备与评价[D]. 天津: 天津商业大学, 2013
GE Xing-hua. Preparation and evaluation of ELISA kit for detection of main ergot alkaloids in feed [D]. Tianjin: Tianjin University of Commerce, 2013
- [13] 李林杰, 李新洲, 肖忠玉, 等. 进口大豆中麦角鉴定方法新研究[J]. 大豆科技, 2017, 5: 29-33
LI Lin-jie, LI Xin-zhou, XIAO Zhong-yu, et al. A new study on the identification method of ergot in imported soybeans [J]. Soybean Science and Technology, 2017, 5: 29-33
- [14] Jarmusch A K, Musso A M, Shymanovich T, et al. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure photoionization liquid chromatography mass spectrometry methods for analysis of ergot alkaloids from endophyte-infected sleepygrass (*Achnatherum robustum*) [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 117: 11-17
- [15] Crews C. Analysis of ergot alkaloids [J]. Toxins, 2015, 7(6): 2024-2050
- [16] Arroyo-manzanares N, Malysheva S V, Vanden Bussche J, et al. Holistic approach based on high resolution and multiple stage mass spectrometry to investigate ergot alkaloids in

- cereals [J]. *Talanta*, 2014, 118: 359-367
- [17] Romera D, Mateo E M, Mateo-castro R, et al. Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC-MS/MS and UPLC-QTOF-MS [J]. *Food Chemistry*, 2018, 267: 140-148
- [18] Crews C, Anderson W A, Rees G, et al. Ergot alkaloids in some ryebased UK cereal products [J]. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 2009, 2: 79-85
- [19] SN/T 4524-2016, 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 出口粮谷中 6 种麦角碱的测定
SN/T 4524-2016, People's Republic of China Entry and Exit Inspection and Quarantine Industry Standards. Determination of Six Ergot Alkaloids in Export Grain
- [20] NY/T 2769-2015, 中华人民共和国农业行业标准 牧草中 15 种生物碱的测定
NY/T 2769-2015, Agricultural Industry Standards of the People's Republic of China. Determination of 15 Alkaloids in Forage
- [21] Coufal-majewski S. Characterising the impact of ergot alkaloids on digestibility and growth performance of lambs [D]. University of Sydney, 2017
- [22] Krska R, Stubbings G, Macarthur R, et al. Simultaneous determination of six major ergot alkaloids and their epimers in cereals and foodstuffs by LC-MS-MS [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 391(2): 563-576
- [23] Hafner M, Sulyok M, Schuhmacher R, et al. Stability and epimerisation behaviour of ergot alkaloids in various solvents [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2008, 1(1): 67-78
- [24] Bryła M, Ksieniewicz-woźniak E, Podolska G, et al. Occurrence of ergot and its alkaloids in winter rye harvested in Poland [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2018, 11(4): 635-646
- [25] Grusie T, Cowan V, Singh J, et al. Proportions of predominant ergot alkaloids (*Claviceps purpurea*) detected in Western Canadian grains from 2014 to 2016 [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2018, 11(2): 259-264
- [26] Ivanova B B, Spiteller M. Derivatives of ergot-alkaloids: Molecular structure, physical properties, and structure-activity relationships [J]. *Journal of Molecular Structure*, 2012, 1024: 18-31
- [27] Berthiller F, Crews C, Dall'asta C, et al. Masked mycotoxins: A review [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2013, 57(1): 165-86
- [28] Wakimoto T, Tan K C, Abe I. Ergot alkaloid from the sea slug *Pleurobranchus forskalii* [J]. *Toxicon*, 2013, 72: 1-4

(上接第 87 页)

- [31] Moze S, Polak T, Gasperlin L, et al. Phenolics in Slovenian bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.) and blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(13): 6998-7004
- [32] Dudonné S, Dubé P, Anhê F F, et al. Comprehensive analysis of phenolic compounds and bbscic acid profiles of twelve native Canadian berries [J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2015, 44: 214-224
- [33] 程巧莺,王笑笑.UPLC-MS/MS法分析3种蜂蜜及其蜜源花中的特征黄酮类组分[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(6): 994-1000
CHENG Qiao-yuan, WANG Xiao-xiao. Analysis of characteristic flavonoids in three kinds of honey and nectar flowers by UPLC-MS/MS [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(6): 994-1000
- [34] Gašić U M, Milojković-opšenica D M, Tešić Ž L. Polyphenols as possible markers of botanical origin of honey [J]. *Journal of Aoac International*, 2017, 100(4): 852-861
- [35] 穆雪峰,徐响,孙丽萍,等.蜂蜜中酚类物质及其抗氧化活性研究进展[J]. *食品科学*, 2011, 32(21): 278-282
- MU Xue-feng, XU Xiang, SUN Li-ping, et al. Research progress of phenolic compounds and antioxidant activity from bee honey [J]. *Food Science*, 2011, 32(21): 278-282
- [36] Bertoncelj J, Ek U K D, Jamnik M, et al. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey [J]. *Food Chemistry*, 2007, 105(2): 822-828
- [37] 曹炜,陈卫军,宋纪蓉.不同种类蜂蜜总酚酸含量测定和抗氧化作用的研究[J]. *食品科学*, 2005, 26(1): 48-51
CAO Wei, CHEN Wei-jun, SONG Ji-rong, et al. The antioxidant activities and total phenolic contents of ten different types of Chinese honey-especially buckwheat honey [J]. *Food Science*, 2005, 26(1): 48-51
- [38] 孙春丽,王紫燕,李春阳.市售洋槐蜜多酚类成分及其抗氧化活性研究[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(4): 321-327
SUN Chun-li, WANG Zi-yan, LI Chun-yang, et al. Polyphenol and antioxidant activities of acacia honey from market [J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2016, 44 (4): 321-327