2026 年 4 月 色 谱 Vol.44 No.4
April 2026 Chinese Journal of Chromatography 403~412

研究论文 DOI: 10.3724/SP.J.1123.2025.02014

固相支撑液液萃取结合超高效液相色谱-串联质谱快速检测牧草中 10 种麦角生物碱毒素

任彩霞， 王晓敏， 盛万里， 韩祎陟， 张春艳， 郑书展*

（呼和浩特海关技术中心，内蒙古 呼和浩特 010020）

摘要：基于固相支撑液液萃取技术和超高效液相色谱-串联质谱法，建立了一种快速、灵敏检测牧草中 10 种麦角生物碱毒素的方法。牧草样品使用含 1% 甲酸的乙腈充分提取，取 1.0 mL 提取溶剂过固相支撑液液萃取柱净化，乙酸乙酯洗脱，浓缩后复溶为待测液。使用 Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm）分离，以 0.25 mmol/L 乙酸铵溶液（含 0.5% 甲酸）和乙腈（含 0.5% 甲酸）为流动相进行梯度洗脱。采用电喷雾电离正离子（ESI^+）扫描和多反应监测（MRM）方式检测，基质标准曲线外标法定量分析。结果显示，10 种麦角生物碱毒素在各自线性范围内线性关系良好（r^2>0.995），在苜蓿、羊草、燕麦、玉米青贮等牧草中 10 种麦角生物碱毒素的检出限为 0.1~2.3 μg/kg，定量限为 0.4~7.3 μg/kg，方法的总体平均回收率为 66.3%~116.7%，总体相对标准偏差小于 9.9%，方法基质效应较低，净化效果明显，具有操作简单、结果准确、干扰少的特点，适用于牧草中麦角生物碱毒素的同步筛查和确证检测，可为监控牧草品质提供技术支持，同时拓展了固相支撑液液萃取技术在毒素检测领域的应用。

关键词：麦角生物碱毒素；牧草；固相支撑液液萃取；超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号：O658 **文献标识码**：A

Determination of ergot alkaloids toxins in forage grass by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase supported liquid-liquid extraction

REN Caixia, WANG Xiaomin, SHENG Wanli, HAN Yizhi,
ZHANG Chunyan, ZHENG Shuzhan*

(*Technical Center of Hohhot Customs, Hohhot 010020, China*)

Abstract: Toxic alkaloids, especially ergot alkaloid toxins, present in forage grass and pose serious health hazards to humans and livestock. Hence, a method for simultaneously detecting these dangerous plant toxins is needed. This study established a rapid method for detecting ten ergot alkaloid toxins using solid-phase supported liquid-liquid extraction technology combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Forage samples were extracted with 8.0 mL of acetonitrile containing 1% formic acid. The extraction mixture was vortexed and then centrifuged at 8 000 r/min for 5 min, after which 1.0 mL of the supernatant was mixed with 3.0 mL of water and vortexed for 0.5 min. The entire mixture was transferred to a solid-phase supported liquid-liquid extraction column and allowed to stand for 10 min. The column was eluted with 6.0 mL of ethyl acetate and the collected eluate was evaporated under nitrogen at temperatures below 40 ℃. The residue was dissolved in 1 mL of acetonitrile-water (1∶3, volume ratio, containing 0.5% formic acid), and separated using an Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm). A solution of 0.5% formic acid in water containing 0.25 mmol/L ammonium acetate was used as mobile phase

收稿日期：2025-02-25

* **通信联系人**. E-mail: zhengshuzhan@163.com.

基金项目：海关总署科研项目（2022HK122，2023HK082）.

Foundation item: Scientific Research Project of General Administration of Customs (Nos. 2022HK122, 2023HK082).

A, while 0.5% formic acid in acetonitrile was used as mobile phase B. The following gradient elution program was used: 0-1.0 min, 90%B; 1.0-5.0 min, 90%B-75%B; 5.0-10 min, 75%B-50%B; 10-12 min, 50%B-10%B; 12-14 min, 10%B; 14-16 min, 10%B-90%B. Ten ergot alkaloid toxins (including three pairs of isomers: ergocornine, ergocristine, ergocristinine, ergocryptine, and ergocryptinine) were effectively separated following gradient elution. Positive electrospray-ionization mode and multiple reaction monitoring (MRM) scanning was used for detection, with an external standard curve used for quantification purposes. The ten ergot alkaloid toxins exhibited good linear relationships within their respective linear ranges (r^2>0.995). Alfalfa, *Leymus chinensis*, oats, and silage corn exhibited LODs of 0.1-2.3 μg/kg for the ten ergot alkaloid toxins, with LOQs of 0.4-7.3 μg/kg. The developed method exhibited overall recovery rates of between 66.3% and 116.7%, with relative standard deviations of less than 9.9%. The matrix effect mainly manifested itself in the form of matrix suppression, with silage corn exhibiting a significantly stronger matrix effect than the other three types of forage. Silage corn exhibited a strong matrix effect in more than 50% of samples, while alfalfa, oats, and *Leymus chinensis* showed relatively low matrix effects, with more than 63% being weak. The developed method is simple to operate, provides accurate results, and exhibits minimal interference; hence, it is suitable for simultaneously screening and confirming ergot alkaloid toxins in forage, thereby providing technical support for monitoring forage quality, while also expanding the applicability of solid-phase supported liquid-liquid extraction technology in the toxin-detection field.

Keywords: ergot alkaloid toxins; forage grass; solid-phase supported liquid-liquid extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)

优质牧草是畜牧业发展的基石,而真菌毒素污染是威胁牧草品质的主要风险因素之一[1,2],牧草中的真菌毒素污染种类复杂,除黄曲霉毒素类、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮等常见毒素外,麦角生物碱毒素(如麦角柯宁碱、麦角克碱、麦角生碱、麦角胺等)因麦角菌感染植物而产生,可引发牲畜中枢神经系统损伤、流产、坏疽等严重病症,其污染问题备受关注[3]。Qie 等[4]对内蒙古地区 134 份牧草样品进行了检测,20.19% 的样本检出麦角生物碱毒素,其中检出率较高的项目为麦角克碱、麦角异克碱、麦角异卡里碱和麦角卡里碱。Di Mavungu 等[5]检测了比利时 122 份饲草样本,其中牧草中 70% 检出麦角生物碱毒素,麦角胺最高含量 350 μg/kg。Shi 等[6]分析大麦和小麦中麦角生物碱毒素,麦角克碱为最主要检出物,大麦中检出率 77%,含量最高达 12 416.2 μg/kg。总体上看,麦角生物碱毒素污染比较普遍。尽管鲜有人类麦角毒素中毒的报道,但仍有牛、猪等动物中毒死亡的病例出现[7,8],因此亟需建立高效检测方法以监控牧草安全。

文献报道的麦角生物碱毒素的检测方法主要有薄层色谱-荧光检测法(TLC-FLD)、毛细管电泳法(CE)和超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)等[9,10],其中 TLC 和 CE 由于易受背景干扰,灵敏度和重复性不好,应用较少。UPLC-MS/MS 具有分离速度快和灵敏度高的特点,因此目前真菌毒素残留检测中多采用适当的前处理技术结合 UPLC-MS/MS 的方法[11,12]。涉及牧草中麦角生物碱毒素检测的前处理技术报道较少,主要有液液萃取法(LLE)[5]、固相萃取法(SPE)[13,14]、QuEChERS 法等[4,6,15,16]。Di Mavungu 等[5]使用传统的液液萃取法处理提取液用以分析 6 种麦角生物碱毒素,方法有机溶剂使用量较大,不环保,且样品以谷物和谷

引用本文:任彩霞,王晓敏,盛万里,韩祎陟,张春艳,郑书展. 固相支撑液液萃取结合超高效液相色谱-串联质谱快速检测牧草中10种麦角生物碱毒素. 色谱,2026,44(4):403-412.

REN Caixia, WANG Xiaomin, SHENG Wanli, HAN Yizhi, ZHANG Chunyan, ZHENG Shuzhan. Determination of ergot alkaloids toxins in forage grass by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid-phase supported liquid-liquid extraction. Chinese Journal of Chromatography, 2026, 44(4): 403-412.

物制品为主,牧草仅涉及青贮玉米一种;Qie 等[4]采用 QuEChERS 法检测牧草中的生物碱,15 种生物碱中仅有 4 种显示较弱基质效应,净化效果不够理想。Shi 等[6]和汪薇等[15]均采用 QuEChERS 法分析麦角生物碱毒素残留,但都针对谷物,未涉及牧草样品,也缺少基质效应研究。综上所述,对于牧草中麦角生物碱毒素检测的前处理技术仍亟待拓展。

固相支撑液液萃取法(solid-phase supported liquid-liquid extraction, SLE)在 20 世纪 80 年代作为传统液液萃取方法的改进方法被提出[17],该方法以改性硅藻土作为支撑材料,材料自身的多孔结构能够对水相有较强的吸附,可在表面形成高比表面积的薄液膜,利用薄液膜实现两相间快速高效的液液萃取。与传统液液萃取法相比,SLE 萃取效率显著提高,且不产生乳化现象;与固相萃取法相比,避免了萃取柱活化和杂质淋洗等步骤,仅需要上样、洗脱两步,操作极大简化。SLE 在生物样本中的药物检测和环境污染物分析以及牛奶中农药残留和饲料中兽药检测等方面已有应用[18-23],并显示出了较好的净化效果。麦角生物碱毒素易溶于有机溶剂,适合于 SLE 的前处理净化,将 SLE 前处理技术结合 UPLC-MS/MS 用于牧草中麦角生物碱毒素的检测,能够实现高通量的快速准确测定。

本研究将 SLE 结合 UPLC-MS/MS 用于牧草中风险因子麦角生物碱毒素的快速检测,方法前处理操作简单,净化效果良好,环保节约,拓展了 SLE 方法的应用领域,可为监控牧草品质提供技术支持和保障。

1　实验部分

1.1　仪器与试剂

1260-6495 超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(美国 Agilent 公司),ST16R 冷冻离心机(美国 Thermo 公司),Vortex-Genie2 涡旋振荡器(美国 Scientific Industries),EFGC-11250 氮吹仪(美国 Orgamomatio 公司),Qnintix313 型电子天平(美国 Sartorius 公司)。

标准品双氢麦角汀、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、麦角醇、麦角胺购自阿尔塔公司(天津阿尔塔科技有限公司),纯度均大于 98%。乙腈、甲醇、甲酸(formic acid,FA)、乙酸铵(色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司),二氯甲烷(分析纯,福晨(天津)化学试剂有限公司),乙酸乙酯、正己烷(HPLC 级,武汉弗顿控股有限公司),甲基叔丁基醚(色谱级,上海阿拉丁生化科技股份有限公司)。实验用水为 Milli-Q 超纯水。SLE 柱为 Chem Elut 柱(3 mL,美国 Agilent 公司)。0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司)。

苜蓿(alfalfa)购自美国 Global Corniche International 公司,燕麦(oats)和羊草(*Leymus chinensis*)为内蒙古自治区农牧业质量安全与检测研究所提供,青贮玉米(silage corn)取自鄂尔多斯市奶牛养殖场,其中苜蓿、燕麦和羊草均为干牧草。

1.2　标准溶液的配制

将各标准品用乙腈稀释成 1.0 μg/mL 的标准储备液,于冰箱 4 ℃避光保存。使用时以乙腈-水(1∶3,体积比)混合成所需浓度的混合标准工作液,临用前逐级稀释成低浓度标准工作溶液。

1.3　样品前处理

将牧草样品用四分法缩至 50~100 g,经粉碎机粉碎,通过 1.0 mm 孔径筛,混匀,将 50 g 试样置于 500 mL 广口瓶中密封,-18 ℃冷冻避光保存。准确称取 2.0 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚乙烯具塞离心管中,加入 8.0 mL 乙腈(含 1% 甲酸),涡旋混匀 1 min,振荡提取 20 min,8 000 r/min 离心 5 min,取上清液 1.0 mL,加入 3.0 mL 水涡旋混匀 0.5 min,混合液全部上 SLE 柱,静置 10 min,使用 6.0 mL 乙酸乙酯洗脱,收集全部洗脱液,低于 40 ℃下氮气吹干,用 1 mL 乙腈-水(1∶3,体积比,含 0.5% 甲酸)溶解残渣,涡旋 0.5 min,经 0.22 μm 滤膜过滤后,上机测定。

1.4　色谱-质谱条件

Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm × 2.1 mm,1.7 μm);流动相 A:0.5% 甲酸水溶液(含 0.25 mmol/L 乙酸铵),流动相 B:0.5% 甲酸乙腈溶液;梯度洗脱程序:0~1.0 min,90%B;1.0~5.0 min,90%B~75%B;5.0~10 min,75%B~50%B;10~12 min,50%B~10%B;12~14 min,10%B;14~16 min,10%B~90%B。流速:0.2 mL/min;进样量:10 μL。

电喷雾离子源,正离子扫描模式;检测方式为多反应监测(MRM)模式,干燥气温度为 325 ℃;干燥气流量为 11 L/min;雾化气压力为 137.9 kPa;毛细管电压为 4 000 V。其他参数见表 1。

表 1 10种麦角生物碱毒素的质谱参数

Table 1 MS parameters of the 10 ergot alkaloids toxins

Compound	Retention time/min	Precursor ion (*m/z*)	Product ions (*m/z*)	Collision energies/eV
Dihydroergocristine (双氢麦角汀)	8.94	612.5	350.0*, 271.5	30, 45
Ergocornine (麦角柯宁碱)	8.60	562.3	268.0*, 223.0	40, 45
Ergocorninine (麦角异柯宁碱)	9.11	562.3	305.0*, 223.0	30, 40
Ergocristine (麦角克碱)	8.94	610.0	268.0*, 223.0	30, 40
Ergocristinine (麦角异克碱)	9.42	610.0	268.0*, 223.0	30, 40
Ergocryptine (麦角卡里碱)	8.89	576.3	268.0*, 208.0	40, 50
Ergocryptinine (麦角异卡里碱)	9.31	576.3	268.0*, 223.0	30, 30
Ergosine (麦角生碱)	8.42	548.0	223.0*, 268.0	40, 30
Ergoitol (麦角醇)	6.42	254.8	240.0*, 44.0	20, 30
Ergotamine (麦角胺)	8.52	582.4	223.0*, 208.4	40, 50

* Quantitative ion.

2 结果与讨论

2.1 实验条件考察

2.1.1 质谱条件的确定

将 10 种麦角生物碱毒素(1 μg/mL)的单标溶液在正、负离子模式下进行全扫描确定母离子。10 种麦角生物碱毒素在正离子模式下响应值均高于负离子模式,因此选择扫描模式为正离子模式。对确定的母离子再进行子离子扫描确定子离子。对碰撞电压、干燥气温度、流速等进行优化,最终确定质谱参数(见表 1)。

2.1.2 色谱分离条件的优化

10 种麦角生物碱毒素中含有 3 对同分异构体,分别是麦角柯宁碱和麦角异柯宁碱、麦角克碱和麦角异克碱、麦角卡里碱和麦角异卡里碱。为实现同分异构体的色谱分离,分别对色谱柱和流动相进行了优化。

首先对比了 Acquity UPLC BEH C_{18}(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)、Acquity UPLC BEH Phenyl(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司)、Zorbax SB-C_{18}(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm, 美国 Agilent 公司)、Inertsil ODS-3(100 mm×2.1 mm, 3.0 μm, 日本 GL Science 公司)4 种色谱柱。结果显示,Acquity UPLC BEH C_{18} 柱分离能力优于其他色谱柱,3 对异构体能够基线分离;BEH Phenyl 柱分离效果较差;Zorbax SB-C_{18} 柱和 Inertsil ODS-3 柱分离效果类似,可将麦角卡里碱和麦角异卡里碱分离,但对麦角柯宁碱和麦角异柯宁碱、麦角克碱和麦角异克碱分离效果较差(图 1)。

对比了甲醇-水和乙腈-水两种流动相体系,结果表明用乙腈-水体系分离时,待测物分离度和峰形均优于甲醇-水体系。在电喷雾离子源的正离子扫描模式下,流动相中含有甲酸能够提高化合物的离子化效率,实验对比了水相和有机相中均含有 0.1%~1.0% 甲酸时待测物的响应变化。实验结果显示,0.5% 的甲酸能够使待测物获得最优的响应,再提高甲酸体积分数待测物响应无明显提高。但在仅含甲酸的流动相体系中双氢麦角汀会有拖尾现象,进一步实验显示水相中加入乙酸铵能够抑制双氢麦角汀的拖尾,实验对比了水相中乙酸铵浓度(0.1~0.4 mmol/L)对待测物响应的影响。结果显示,0.25 mmol/L 的乙酸铵能够保证化合物有较好的峰形且未明显降低响应值。因此最终确定流动相水相为 0.5% 甲酸水溶液(含 0.25 mmol/L 乙酸铵),流动相有机相为 0.5% 甲酸乙腈溶液。10 种化合物的色谱分离情况见图 2。

2.1.3 提取溶剂的优化

霉菌毒素类的提取溶剂常采用甲醇、乙腈等,本实验研究了甲醇、乙腈、甲醇-水(7∶3,体积比)和乙腈-水(8∶2,体积比)的提取效率,以苜蓿为基质,添加麦角生物碱毒素标准物质,混匀后静置过夜,按照 1.3 节操作后测定。由图 3a 可见,整体提取效率:乙腈>乙腈-水(8∶2,体积比)>甲醇>甲醇-水(7∶3,体积比),这与乙腈极性较大、穿透能力强的特性有关,乙腈对 10 种组分的提取效率为 61%~94%,因此综合考虑选用乙腈为提取溶剂。文献表明在提取溶剂中添加辅助试剂甲酸,能够增强提取的效果[24],尝试在提取溶剂乙腈中加入 0.5%、1%、2% 甲酸进行提取,比较酸度对提取效率的影响(图 3b)。大部分目标物的提取效率随酸的体积分数提高而

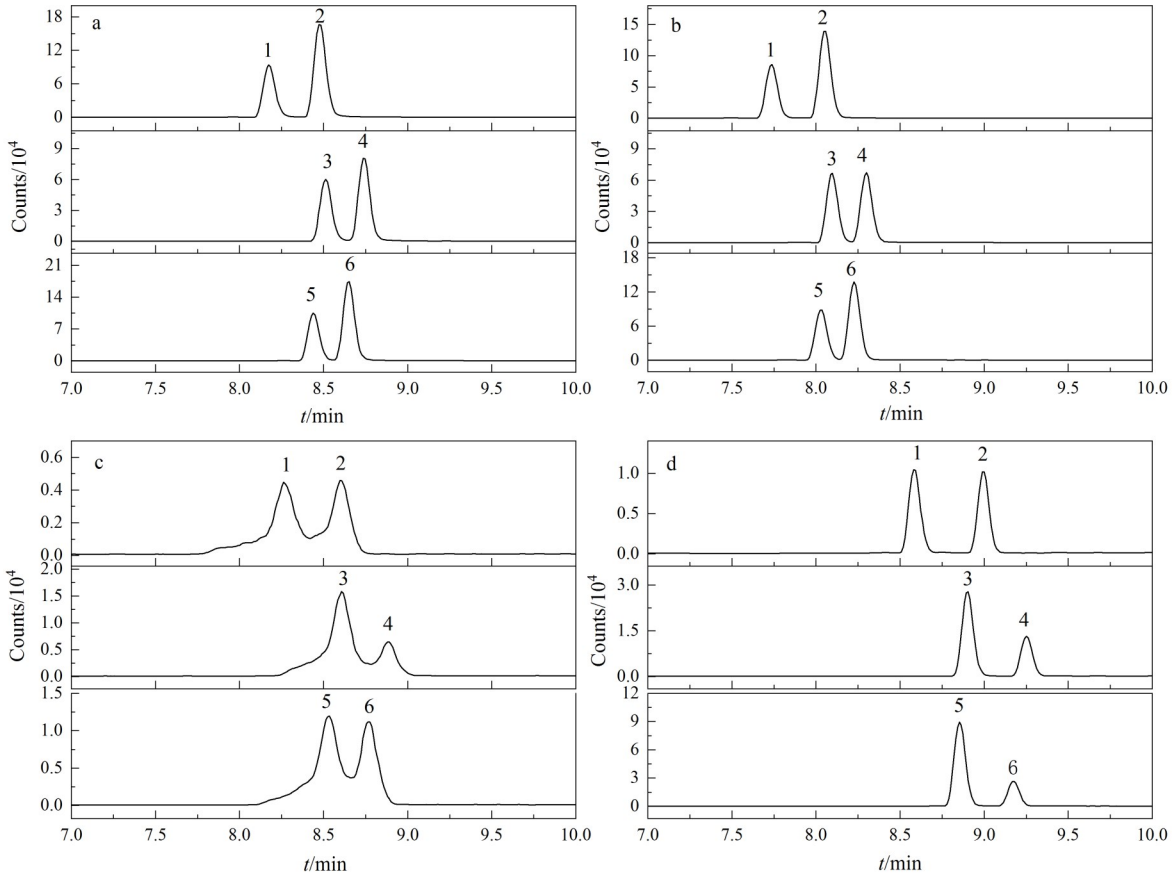


图1　采用不同色谱柱时麦角生物碱毒素异构体的色谱图

Fig. 1　Chromatograms of the ergot alkaloid epimers separated on different chromatographic columns

a. Zorbax SB-C_{18} column; b. Inertsil ODS-3 column; c. Acquity UPLC BEH Phenyl column; d. Acquity UPLC BEH C_{18} column. Peak identifications: 1. ergocornine; 2. ergocorninine; 3. ergocristine; 4. ergocristinine; 5. ergocryptine; 6. ergocryptinine.

提高,但体积分数高于 1% 后再无明显提升,并且其中麦角胺等化合物随甲酸含量的提高有所下降,因此选择 1% 甲酸乙腈为提取溶剂。

2.1.4　洗脱溶剂的选择

SLE 步骤简洁,只需要上样和洗脱两步,洗脱溶剂是方法的关键部分。SLE 与传统液液萃取技术在溶剂选择上遵循相同的原则:首先洗脱溶剂应不与上柱的提取液互溶,从而实现两相间的物质传递,其次洗脱溶剂有合适的极性能够对待测物有良好的溶解性[17]。比较了常用的二氯甲烷、乙酸乙酯、正己烷和甲基叔丁基醚 4 种洗脱溶剂(图 4a)。结果显示,正己烷对 10 种麦角生物碱毒素的萃取效果均较差,萃取效率普遍低于 20%,原因主要在于正己烷极性较低,对麦角生物碱毒素的溶解度低;二氯甲烷对麦角卡里碱、麦角异卡里碱、麦角克碱、麦角胺、麦角异柯宁碱的回收率均低于 50%;甲基叔丁基醚和乙酸乙酯显示了相似的结果,优于正己烷和二氯甲烷。综上选择乙酸乙酯进行洗脱。

进一步通过分段接收的方式对洗脱溶剂的用量进行了考察,分段接收(每 2 mL)洗脱液,测定回收率。结果显示麦角生物碱毒素的洗脱主要在前 6 mL,超过 6 mL 后基本无明显洗脱物,考虑到进一步增加洗脱溶剂用量会导致共洗脱的杂质增多,基质响应增强,因此选择洗脱溶剂用量为 6 mL(图 4b)。

2.2　基质效应

基质效应(ME)主要是化合物在质谱离子源离子化时产生,样品基质中的共流出杂质组分在离子化过程中对目标物的响应值有增强或抑制的作用,这种干扰影响就是基质效应[25,26],基质效应会影响定量分析结果的准确性。ME 定义为[(基质标准曲线线性方程斜率/溶剂标准曲线线性方程斜率)−1]×100%。|ME|≥50% 为强基质效应,20%<|ME|<50% 为中等基质效应,|ME|≤20% 为弱基质效应。

麦角生物碱毒素在牧草中的基质效应研究尚未见报道,本研究选取常见的苜蓿、燕麦、羊草和青贮玉米 4 种牧草种类作为基质,研究了麦角生物碱

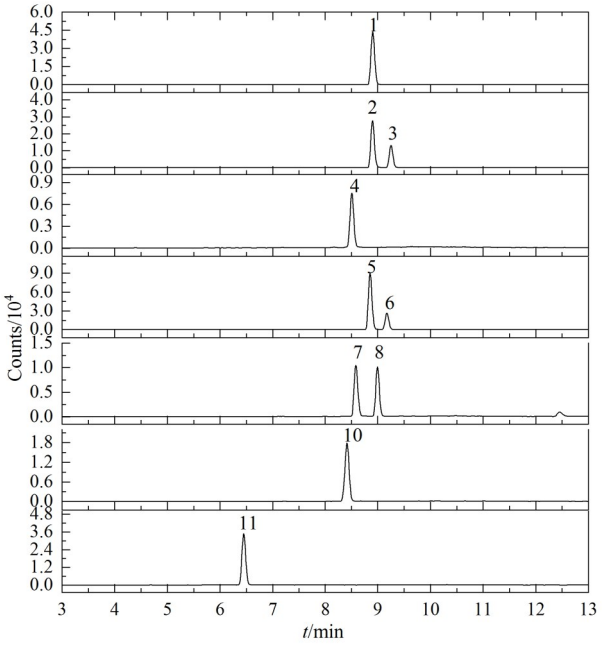


图 2 10种麦角生物碱毒素的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of the 10 ergot alkaloids toxins

Peak identifications: 1. dihydroergocristine; 2. ergocristine; 3. ergocristinine; 4. ergotamine; 5. ergocryptine; 6. ergocryptinine; 7. ergocornine; 8. ergocorninine; 9. ergosine; 10. ergoitol.

毒素在其中的基质效应。结果表明牧草中的基质效应多表现为基质抑制,其中青贮玉米的基质效应显著强于其他 3 种牧草,这可能是由于发酵后基质更为复杂的原因,其中 50% 以上为强基质效应。苜蓿、燕麦和羊草无强基质效应,相对基质效应较弱,以弱基质效应为主,其中弱基质效应占比高于 63%(表 2)。鉴于仍有部分基质无法避免基质效应,因此采用基质标准曲线外标法定量以降低基质效应。

表 2 牧草中麦角生物碱毒素的基质效应

Table 2 Matrix effects for ergot alkaloids toxins in forage

Mycotoxin	Matrix effects/%			
	Alfalfa	*Leymus chinensis*	Oats	Silage corn
Ergoitol	−8.7	−8.5	−0.6	−1.2
Ergosine	−10.2	−28.1	−19.2	−41.2
Ergotamine	−9.4	−26.2	−22.6	−57.6
Ergocornine	−1.3	−16.7	−13.7	−48.7
Ergocryptine	−20.3	−33.5	−33.2	−59.8
Dihydroergocristine	−9.4	−24.8	−26.0	−64.7
Ergocristine	6.6	−9.9	−6.6	−48.9
Ergocorninine	3.3	−9.1	−9.9	−20.6
Ergocryptinine	28.4	−0.7	−19.7	−63.0
Ergocristinine	49.1	32.7	11.2	−55.4

2.3 方法学考察

2.3.1 标准曲线及检出限

将不含待测物的牧草样品按照优化的方法处理得到空白基质提取液,用以配制基质标准工作溶液。以各麦角生物碱毒素的质量浓度为横坐标(x),定量离子峰面积为纵坐标(y),绘制标准曲线,

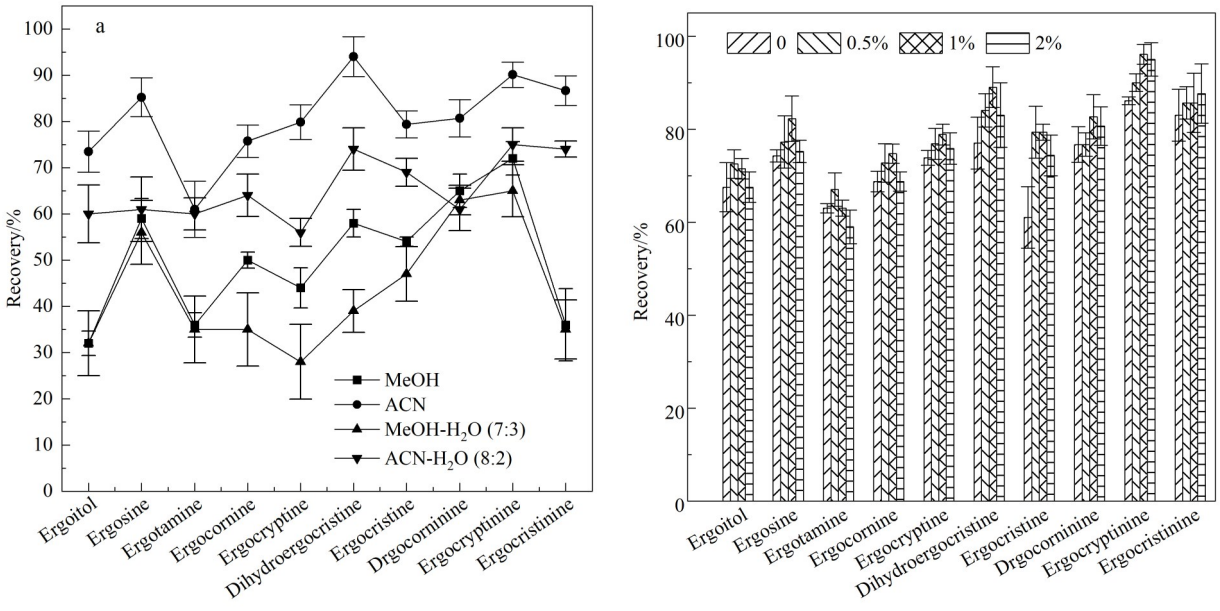


图 3 (a)提取溶剂类型和(b)乙腈中甲酸含量对10种麦角生物碱毒素回收率的影响(n=3)

Fig. 3 Effects of (a) extraction solvent types and (b) volume fractions of formic acid in ACN on the recoveries of the 10 ergot alkaloid toxins (n=3)

MeOH: methanol; ACN: acetonitrile.

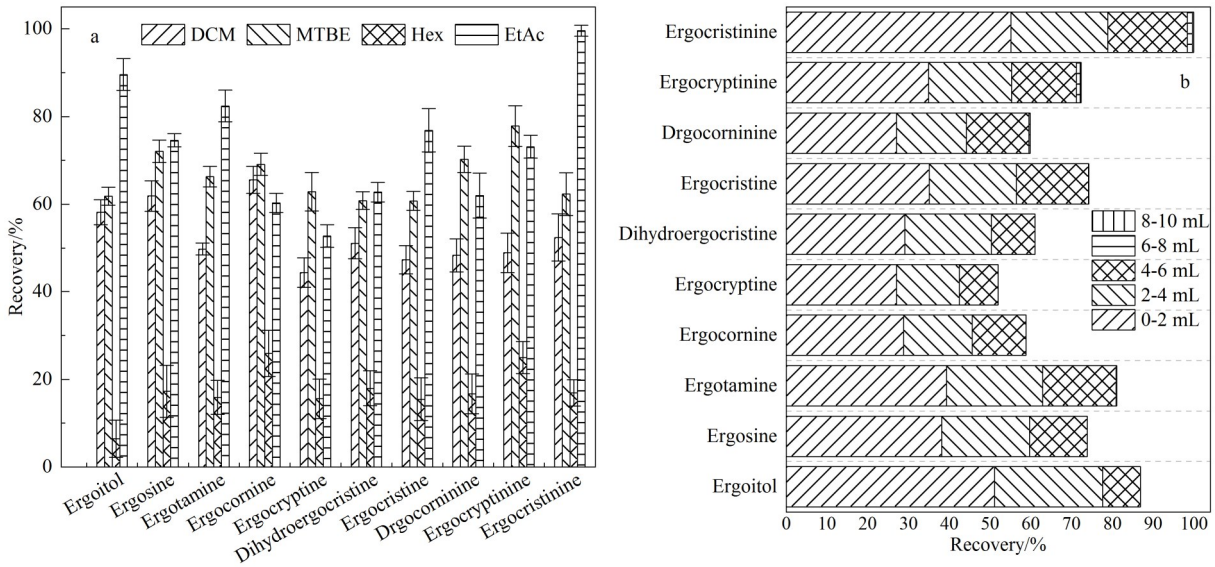


图 4　洗脱溶剂(a)类型和(b)体积对10种麦角生物碱毒素回收率的影响(n=3)

Fig. 4　Effects of (a) types and (b) volumes of eluents on the recoveries of the 10 ergot alkaloid toxins (n=3)

DCM: dichloromethane; MTBE: methyl *tert*-butyl ether; Hex: hexane; EtAc: ethyl acetate.

结果表明,10 种麦角生物碱毒素标准曲线均具有良好的线性关系,线性相关系数(r^2)>0.995(表 3)。根据各目标化合物在谱图上的出峰高度和出峰附近的平均噪声高度计算各化合物的信噪比,以 3 倍信噪比和 10 倍信噪比时目标化合物定量离子峰面积对应的质量浓度为检出限(LOD)和定量限(LOQ)。10 种麦角生物碱毒素的检出限为 0.1~2.3 μg/kg,定量限为 0.4~7.3 μg/kg。

表 3　10种麦角生物碱毒素的线性范围、线性方程、相关系数、检出限及定量限

Table 3　Linear ranges, linear equations, correlation coefficients (r^2), LODs and LOQs of the 10 ergot alkaloids toxins

Analyte	Linear range/(ng/mL)	Matrix	Linear equation	r^2	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)
Ergoitol	0.02–10	A	y=406187.6x−5321.3	0.9983	0.2	0.5
		L	y =407123.8x−3593.5	0.9995	0.3	0.8
		O	y =441943.1x−5575.1	0.9963	0.1	0.5
		S	y =439285.3x−3960.3	0.9995	0.2	0.6
Ergosine	0.02–10	A	y =223583.7x−2592.8	0.9977	0.1	0.5
		L	y =179002.7x+283.8	0.9963	0.1	0.4
		O	y=201027.6x−1034.5	0.9984	0.1	0.5
		S	y=146432.1x−1395.9	0.9978	0.3	0.5
Ergotamine	0.02–10	A	y=17602.2x−1740.4	0.9956	0.2	1.0
		L	y=14351.0x−107.5	0.9974	0.8	2.2
		O	y=15047.4x−227.4	0.9983	0.8	2.0
		S	y=8232.8x+186.7	0.9998	0.6	1.7
Ergocornine	0.05–20	A	y=241847.0x−3757.3	0.9967	0.4	1.0
		L	y=204177.0x−2390.6	0.9990	0.9	3.0
		O	y=211635.7x−858.7	0.9996	0.9	2.3
		S	y=125799.3x−1575.6	0.9994	1.0	2.4
Ergocryptine	0.2–50	A	y=402484.5x−6950.3	0.9956	0.8	1.9
		L	y=335757.6x−1754.8	0.9992	1.3	4.1
		O	y=337455.4x−68.7	0.9999	1.0	3.2
		S	y=202891.5x−2736.9	0.9976	1.8	4.0
Dihydroergocristine	0.2–50	A	y=98988.2x−10794.2	0.9953	1.6	3.3
		L	y=82217.9x−6029.7	0.9954	1.9	4.5
		O	y=80918.5x−4153.9	0.9965	2.0	4.1
		S	y=38582.2x+3290.0	0.9961	2.2	6.2

表 3 （续）
Table 3 （Continued）

Analyte	Linear range/(ng/mL)	Matrix	Linear equation	r^2	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)
Ergocristine	0.05–20	A	y=138974.5x−10782.5	0.9968	0.4	1.8
		L	y=117374.6x−2056.8	0.9984	0.9	4.2
		O	y=121682.2x−4690.4	0.9996	0.6	2.8
		S	y=66665.5x−3204.4	0.9991	2.3	7.3
Ergocorninine	0.05–20	A	y=245674.0x−3245.4	0.9976	0.3	0.9
		L	y=216163.8x−2039.6	0.9990	0.4	0.7
		O	y=214161.6x−2267.5	0.9972	0.3	0.8
		S	y=188711.3x−245.5	0.9978	0.4	0.9
Ergocryptinine	0.05–20	A	y=20416.4x−2344.6	0.9978	0.5	2.1
		L	y=15801.0x−900.0	0.9991	0.6	2.3
		O	y=12773.4x−544.7	0.9963	0.7	2.7
		S	y=5886.7x−338.9	0.9998	1.0	4.5
Ergocristinine	0.2–50	A	y=494653.8x−9909.0	0.9953	1.3	5.5
		L	y=440326.7x−6537.3	0.9974	1.6	4.6
		O	y=368928.4x−3445.5	0.9959	1.3	3.3
		S	y=147932.6x−1244.7	0.9995	1.4	4.9

A: alfalfa; L: *Leymus chinensis*; O: oats; S: silage corn. y: peak areas of analyte; x: mass concentration, ng/mL.

2.3.2 回收率与精密度

依照建立的方法对 4 种空白样品（苜蓿、羊草、燕麦、青贮玉米）进行三水平加标试验，每个添加水平取 6 个平行样，添加水平分别为 1、2、10 倍 LOQ。方法的回收率与精密度数据见表 4。方法的回收率为 66.3%~116.7%，相对标准偏差为 1.1%~9.9%，重复性和稳定性较好，满足残留分析的要求。

表 4 牧草样品中 10 种麦角生物碱毒素的回收率及相对标准偏差（n=6）
Table 4 Recoveries and RSDs of the 10 ergot alkaloids toxins in forage (n=6)

Analyte	Matrix	1-fold LOQ		2-fold LOQ		10-fold LOQ	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Ergoitol	A	76.9	5.4	80.3	3.8	84.3	4.1
	L	88.5	2.7	91.2	3.3	92.3	4.3
	O	77.7	6.6	80.6	5.1	82.8	5.0
	S	72.0	7.6	74.0	6.2	81.9	6.5
Ergosine	A	68.3	8.9	77.6	3.2	81.1	3.1
	L	68.9	7.3	72.4	3.6	80.6	3.8
	O	69.4	7.0	72.0	5.7	76.4	1.2
	S	74.4	4.4	75.0	4.1	76.7	3.7
Ergotamine	A	74.2	8.2	76.7	5.3	85.4	6.4
	L	72.1	8.1	75.4	6.5	86.4	3.4
	O	70.2	7.7	74.5	5.7	77.9	5.1
	S	71.6	7.2	79.3	6.2	75.9	5.9
Ergocornine	A	82.1	9.9	84.3	8.1	85.6	2.8
	L	79.6	9.2	82.4	6.4	88.4	1.4
	O	78.6	5.6	81.9	3.7	84.2	5.5
	S	85.5	4.8	93.1	4.8	99.9	4.1
Ergocryptine	A	73.6	9.1	75.8	9.7	78.9	6.7
	L	70.6	6.8	77.4	3.3	80.6	4.6
	O	72.4	7.1	79.0	5.3	77.7	3.7
	S	70.1	7.6	74.2	7.0	80.0	6.8
Dihydroergocristine	A	66.9	9.6	75.8	3.6	77.5	3.2
	L	66.4	3.3	74.1	3.6	79.8	3.9
	O	74.5	5.3	77.8	6.5	81.0	3.0
	S	70.3	7.3	70.5	7.4	76.1	7.1

表 4 （续）
Table 4 （Continued）

Analyte	Matrix	1-fold LOQ		2-fold LOQ		10-fold LOQ	
		Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%	Recovery/%	RSD/%
Ergocristine	A	78.4	7.9	79.2	5.4	82.3	2.4
	L	70.4	9.2	75.3	6.5	80.2	1.1
	O	70.3	5.8	71.4	4.5	74.8	3.2
	S	74.7	6.1	79.2	7.1	82.1	5.9
Ergocorninine	A	73.7	3.2	73.0	2.8	75.6	1.7
	L	86.1	2.6	90.2	4.5	108.3	1.3
	O	108.6	7.6	111.0	4.9	116.2	2.2
	S	95.9	4.8	97.2	2.8	116.7	3.8
Ergocryptinine	A	66.3	5.6	72.4	5.7	73.5	5.0
	L	73.3	9.2	76.7	6.1	96.5	5.6
	O	76.7	8.4	78.0	5.2	81.9	1.1
	S	72.3	7.0	79.0	5.8	87.7	5.8
Ergocristinine	A	87.1	5.4	89.3	7.3	92.3	5.2
	L	74.5	1.9	78.7	2.4	94.7	4.2
	O	74.4	4.3	80.5	4.7	79.1	3.2
	S	79.3	6.0	86.1	6.1	94.6	5.6

2.4　实际样品检测

采用所建立的方法对 4 批进口苜蓿和两批鄂尔多斯市奶牛饲养场的青贮牧草和混合牧草进行检测,在 1 份混合牧草中检出麦角克碱 11.3 μg/kg (RSD=2.9%,n=3),其他麦角生物碱毒素均未检出,阳性样品按 10.0 μg/kg 加标水平进行加标回收试验,回收率为 87.6%(RSD=1.3%,n=3),符合质控要求,方法可用于实际样品分析。阳性样品色谱图见图 5。

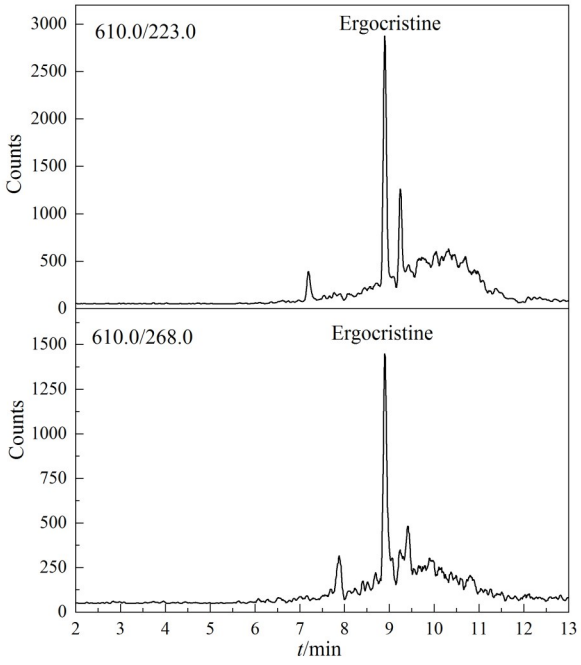


图 5　阳性样品的MRM色谱图
Fig. 5　MRM chromatograms of a positive sample

3　结论

本研究针对牧草样品,采用固相支撑液液萃取技术对样品进行处理,结合超高效液相色谱-串联质谱,建立了 10 种麦角生物碱毒素的快速检测方法。本方法操作简单,结果稳定,基质效应较低,重复性好,适用于多种牧草中麦角生物碱毒素的准确定量。方法兼具简洁高效和环保的特点,可为监控牧草品质提供技术支持,同时拓展了固相支撑液液萃取技术在毒素检测领域的应用。

参考文献:

[1] Buszewska-Forajta M. Toxicon, 2020, 30(182): 34
[2] Cheli F, Campagnoli A. Anim Feed Sci Tech, 2013(183): 1
[3] Bennett J W, Klich M. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3): 497
[4] Qie M, Li S, Guo C, et al. J Chromatogr A, 2021, 27: 1654
[5] Di Mavungu J D, Malysheva S V, Sanders M, et al. Food Chem, 2012, 135: 292
[6] Shi H, Yu P. Food Chem, 2022, 393: 13332
[7] Hogg R A, Yan R Q. Progress in Veterinary Medicine, 1992, 3: 19
Hogg R A, 阎若潜. 国外兽医学. 畜禽疾病, 1992, 3: 19
[8] Meng F S, Wan X. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2008, 44(2): 76
孟凡生, 万雪. 中国兽医杂志, 2008, 44(2): 76
[9] Oellig C. J Chromatogr A, 2017, 1507: 124
[10] Frach K, Blaschke G. J Chromatogr A, 1998, 808: 247
[11] Yang Y, Li G L, Wu D, et al. Trends Food Sci Tech, 2022, 121: 156
[12] Hu W Y, Long M M, Hu Y F, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(3): 307

胡文尧, 龙美名, 胡玉斐, 等. 色谱, 2020, 38(3): 307
[13] Wang R G, Guo L L, Wang P L, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2020, 38(7): 817
王瑞国, 郭丽丽, 王培龙, 等. 色谱, 2020, 38(7): 817
[14] Nam M, Kim D, Kim M S. Food Chem, 2024, 441: 138363
[15] Wang W, Yu T T, Liu D, et al. 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
[16] Zachariasova M, Dzuman Z, Veprikova Z, et al. Anim Feed Sci Tech, 2018, 238: 73
[17] Domínguez-Romero J C, García-Reyes J F, Molina-Díaz A. J Chromatogr A, 2014, 1361: 34
[18] Dong H, Tang H, Chen D, et al. Talanta, 2014, 120: 248
[19] Yoshikawa S, Nagano C, Kanda M, et al. J Chromatogr B, 2017, 1057: 15
[20] Wang C J, Zhu W X, Yang J Z, et al. Chinese Journal of Veterinary Drug , 2012, 46(12): 36
王彩娟, 祝伟霞, 杨冀州, 等. 中国兽药杂志, 2012, 46(12): 36
[21] Chen X L, Li D M, Xu H J, et al. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(3): 270
陈雪蕾, 李冬梅, 徐厚君, 等. 分析测试学报, 2019, 38(3): 270
[22] Bao J M, Ma Z S, Sun Y, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 30(8): 798
包建民, 马志爽, 孙莹, 等. 色谱, 2012, 30(8): 798
[23] Xue Y F, Shang T, Cui J T, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(9): 827
薛钰凡, 商婷, 崔君涛, 等. 色谱, 2024, 42(9): 827
[24] Zhang L X, Huang Z H, Luo S Q, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(1): 66
章璐幸, 黄朝辉, 罗淑青, 等. 色谱, 2023, 41(1): 66
[25] Tong L Y, Xu B Z, Nie X M, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(11): 986
童兰艳, 许博舟, 聂雪梅, 等. 色谱, 2023, 41(11): 986
[26] Song W, Liu K Y, Chen L J, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2024, 42(1): 52
宋伟, 刘开永, 陈莉君, 等. 色谱, 2024, 42(1): 52