

高效液相色谱-三重四级杆质谱法同时测定大米中的伏马毒素 B₁、B₂、B₃

陈丽惠, 蔡伟鹏, 白艳艳, 朱宝平, 贾玉珠

厦门市疾病预防控制中心, 福建 厦门 361021

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-三重四级杆质谱法同时测定大米中的伏马毒素 B₁、B₂、B₃。**方法** 大米样品经乙腈:水=50:50 提取,以 Multistep@ 211 Fum 柱进行净化,将洗脱液氮吹至干,加 1.0 ml 0.2% 甲酸/乙腈=65:35 溶解并定容,用 LC-MS/MS 检测。**结果** 待测组分在 5~800 ng/ml 范围内呈现良好的线性关系,相关系数均大于 0.9996,检测限介于 0.045~0.10 ng/ml。以空白大米粉样品进行加标水平分别为 20、100、400 ng/g 的回收率实验,回收率在 94.5%~110.5% 之间。**结论** 该方法快速、准确,适用于大米中伏马毒素的测定。

关键词: 伏马毒素; 高效液相色谱; 三重四级杆质谱; 大米

中图分类号: R155.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2017)03-0375-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.03.035

Simultaneous determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in rice by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry

CHEN Li-hui, CAI Wei-peng, BAI Yan-yan, ZHU Bao-ping, JIA Yu-zhu

Xiamen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Xiamen, Fujian 361021, China

Corresponding author: JIA Yu-zhu, E-mail: jiayuzhu64@163.com

Abstract: **Objective** To establish a method for simultaneous determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in rice by high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry (HPLC-TQMS). **Methods** The fumonisins were extracted with 50% acetonitrile in a water bath, and purified by Multistep@ 211 Fum extraction cartridge. The eluate was concentrated to dryness, and dissolved with 1.0 ml 0.2% formic acid /acetonitrile=65:35, and then detected by HPLC-TQMS.

Results Target compounds presented a good linear relationship in the range of 5~800 ng/ml. The correlation coefficients were larger than 0.9996 and the limits of detection were in the range of 0.045~0.10 ng/ml. The recoveries of standard addition for spiked samples in 20 ng/g, 100 ng/g, and 400 ng/g were between 94.5%~110.5%. **Conclusions** The proposed method is rapid, accurate and suitable for determining fumonisins in rice.

Key words: fumonisin; high performance liquid chromatography; triple quadrupole mass spectrometry; rice

伏马毒素(fumonisins, FBs)是串珠镰刀菌繁殖产生的一类真菌毒素。流行病学研究结果表明,摄入受到伏马毒素污染的谷物可诱发人类食管癌和胎儿神经管畸形等疾病,并可能引发食道癌和肝癌^[1]。伏马毒素主要分布在玉米、大米、小麦中,以大米的污染率最高^[2]。因此,建立大米中伏马毒素的检测方法具有重要意义。

伏马毒素的检测方法主要有酶联免疫吸附法^[3]、气相色谱法^[4]、高效液相色谱法^[5-6]、液相色谱-串联质谱法^[7-8]等。其中酶联免疫吸附法假阳性率高,适

合作为伏马毒素的初步筛查办法。气相色谱法需要对伏马毒素进行衍生后方能检测,过程相对繁琐、检测流程耗时长。而液相色谱-串联质谱法具有较高的选择性和灵敏度,无需水解和衍生,和能够提供相对分子量信息与结构信息等优点,在测定大米中的 FB₁、FB₂、FB₃ 具有良好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 美国 Agilent 公司 6460 Triple Quad 液质联用仪(配电喷雾离子源和 MassHunter 数据分析系统)、美国 Agilent 公司 1200 高效液相色谱仪(配 DAD 检测器、在线脱气机、自动进样器和二元泵)、美国 OA 公司 N-EIAP3 氮吹仪、J2 SCIENTIFIC 公司的半自动固相萃取仪、SIGMA 公司的冷冻高速离心机、

基金项目: 2016 年福建省科技项目(NO. 2016D022)

作者简介: 陈丽惠(1985-),女,福建厦门人,硕士,研究方向:食品理化检测。

通信作者: 贾玉珠, E-mail: jiayuzhu64@163.com。

昆山市超声仪器有限公司的 KQ-500E 型超声波清洗机、上海沪西分析仪器厂有限公司的 WH-2 微型漩涡混合仪、美国 Romer 公司的 Multisep 211 Fum 净化柱; FB_1 、 FB_2 、 FB_3 标液由新加坡 PriboLa 公司提供; $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1 、 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_2 、 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_3 标液由美国 Romer 公司提供; 美国 Tedia 公司的乙腈和甲醇 (HPLC 级)、Sigma 公司的乙酸铵。

1.2 仪器条件

1.2.1 高效液相色谱仪条件 色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6×50 mm, 1.8 μm; 流动相 A 为 0.2% 甲酸溶液, B 为乙腈, 洗脱梯度为: 35%~60% B/0~5 min, 98% B/5.1~7.5 min, 98%~35% B/7.5~7.6 min, 35% B/7.6~11 min; 流速为 0.4 ml/min; 进样量为 5 μl; 柱温为 30 ℃。

1.2.2 三重四级杆质谱仪条件 ESI(+), 气流温度 (℃): 350; 气流速度 (L/min): 10; 雾化气 (psi): 30; 鞘气 N_2 温度 (℃): 350; 鞘气 N_2 流速 (L/min): 12; 毛细管电压 (V): 4 000; 喷雾电压 (V): 500, 其他质谱参数见表 1。

1.3 样品处理

1.3.1 提取 称取粉碎均质样品 2.00 g 于 50 ml 聚四氟乙烯离心管中, 加入 200 μl 0.1 μg/ml 的 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1 、 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_2 、 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_3 混合内标溶液, 加入 10 ml 乙腈: 水 = 50:50, 高速匀质提取 5 min, 10 000 r/min 离心 8 min, 取上层清液于另一个聚四氟乙烯离心管中, 用 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 6~8, 待净化。

1.3.2 净化 预先用 5 ml 甲醇和 5 ml 甲醇/水 = 75/25 活化柱子。取 5 ml 滤液于 50 ml 聚四氟乙烯离心管中, 加入 14 ml 甲醇/水 = 75:25, 混匀。将此溶液全量通过净化柱, 流速控制在 1~2 ml/min, 再分别用 10 ml 甲醇/水 = 75:25 和 3 ml 甲醇淋洗净化柱。用 10 ml 甲醇/甲酸 = 98:2 洗脱净化柱, 收集的洗脱液于 60 ℃ 下氮吹至干, 加入 1.0 ml 0.2% 甲酸/乙腈 = 65:35 溶解, 漩涡混匀 10 s, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待进样。

2 结果与讨论

2.1 高效液相色谱分离条件优化 通过优化梯度洗脱比例来实现 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 快速分离, 待测物在 4 min 内实现基线分离, FB_1 、 FB_2 、 FB_3 及其相应内标的质谱图见图 1、图 2。

2.2 质谱条件优化 伏马毒素为两性结构, 实验结果表明 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 在电喷雾正离子模式下能够较好的离子化, 并对比了正离子模式下, 水-乙腈, 0.2% 甲酸-乙腈对离子化效率的影响, 实验结果表明, 流动

相为 0.2% 甲酸-乙腈时 3 种伏马毒素响应较好。在正离子模式下进行一级质谱扫描, 得到各组分子离子, 再选定各个母离子进行二级质谱扫描, 得到碎片离子, 响应高的选定为定量离子, 响应次高的为定性离子, 再分别对定量离子和定性离子的碎裂电压和碰撞能量进行优化。质谱参数见表 1。

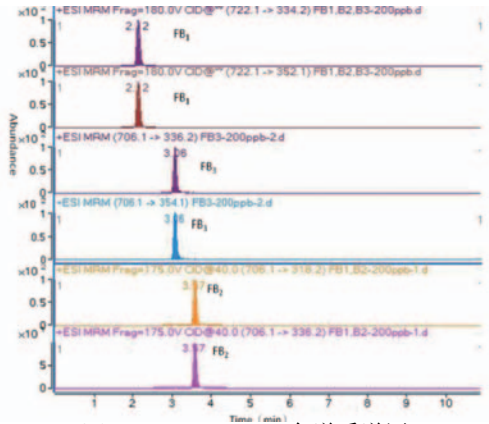


图 1 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 色谱质谱图

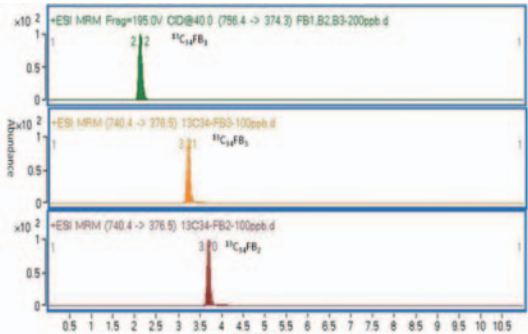


图 2 伏马毒素内标物 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1 、 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_2 、 $^{13}\text{C}_{34}$ - FB_3 色谱质谱图

表 1 FB_1 、 FB_2 、 FB_3 及其内标物的主要质谱参数

化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ms (Dwell)	碎裂电压/V (Fragmentor)	碰撞能量/eV (CE)
FB_1	2.12	722.1	352.1	50	180	35
		722.1	334.2 *	50	190	40
FB_2	3.57	706.1	336.2 *	50	175	40
		706.1	318.2	50	175	40
FB_3	3.06	706.1	354.1	50	190	35
		706.1	336.2 *	50	190	40
$^{13}\text{C}_{34}$ - FB_1	2.12	756.4	374.3	50	195	40
$^{13}\text{C}_{34}$ - FB_2	3.57	736.5	376.5	50	155	40
$^{13}\text{C}_{34}$ - FB_3	3.06	740.4	376.5	50	150	35

注: * 为定量离子。

2.3 净化柱的选择 与大米中的碳水化合物、脂肪酸和蛋白质相比, 样品中的伏马毒素含量非常低。选择合适的净化柱, 能够将真菌毒素与其他杂质分离, 有利于对痕量的真菌毒素进行准确定量。目前用于净化伏马毒素的固相萃取小柱主要有复合毒素 Myco6in1 免疫亲和柱 (美国 Vicam 公司)^[9], Multistep@ 211 Fum^[10], MAX 固相萃取小柱^[11], SAX 固相萃取小

柱^[12]等。实验对比了 Mycosep 266 Aflozon 多功能净化柱(美国 Romer 公司)、Myc6in1 免疫亲和柱(美国 Vicam 公司)、Multisep 211 Fum 净化柱(美国 Romer 公司)三种小柱的净化效果。其中 Mycosep 266 Aflozon 多功能净化柱对伏马毒素有保留作用,回收率较差。Myc6in1 免疫亲和柱对伏马毒素的吸附作用不明显,回收效果较 Multisep@ 211 Fum 净化柱差,因此选用美国 Romer 公司的 Multisep@ 211 Fum 作为伏马毒素的净化柱。

2.4 标准曲线和线性范围 准确移取适量的 FB₁、FB₂、FB₃ 混合标准溶液和混合同位素内标溶液,用 0.2%甲酸/乙腈=65/35 配制成混合标准序列,每份中含有 10 ng/ml 混合同位素内标。检测结果表明,FB₁、FB₃ 在 5~800 ng/ml,FB₂ 在 2~800 ng/ml 范围内线性良好,相关系数均大于 0.9996,见表 2。

表 2 FB₁、FB₂、FB₃ 的回归方程和相关系数

组分	浓度范围(ng/ml)	回归方程	相关系数
FB ₁	5~800	y=0.8031x-0.2339	0.9998
FB ₂	2~800	y=2.5634x-0.4603	0.9999
FB ₃	5~800	y=1.8109x-0.6764	0.9996

2.5 精密度与准确度实验 分别称取 9 份伏马毒素阴性大米样品于 50 ml 的塑料具塞离心管中,加入一定量的混合标准溶液及内标混合溶液,配成低、中、高 3 个水平(20、100、400 ng/g)的加标样品,进行提取和净化,测得方法回收率和精密度见表 3。FB₁、FB₂、FB₃ 均具有较好的回收率和精密度,回收率为 94.5%~110.5%,RSD 为 1.2%~4.5%。以信噪比(S/N=3)计算得检出限,检测限介于 0.045~0.10 ng/ml。

表 3 方法的回收率和精密度

化合物	添加值 (ng/g)	测定值 (ng/g, $\bar{x}\pm s$)	RSD (%) (n=3)	回收率 (%)
FB ₁	20	22.10±1.10	4.5	110.5
	100	97.87±3.95	4.0	97.9
	400	393.83±4.74	1.2	98.4
FB ₂	20	20.20±1.10	4.0	101.3
	100	97.87±3.95	1.6	98.1
	400	393.83±4.74	3.1	94.5
FB ₃	20	21.33±0.72	3.4	106.7
	100	94.47±2.90	2.9	94.5
	400	388.63±4.03	4.0	97.2

2.6 大米中伏马毒素的测定结果 从不同商店采购 27 份不同品牌大米样品,按照 1.3 方法进行前处理,测得 1 份大米受到伏马毒素污染,其中 FB₁ 含量为 7.79 ng/g,FB₂ 含量为 1.90 ng/g,FB₃ 含量为 1.78 ng/g。

其它样本均未检出伏马毒素。

3 结 论

建立了高效液相色谱-三重四级杆质谱法同时测定三种伏马毒素的方法。对液相分离条件和质谱参数进行优化,并分别考察了 Mycosep 266 Aflozon 多功能净化柱、Myc6in1 免疫亲和柱、Multisep@ 211 Fum 三种小柱的净化效果。所建立的方法具有操作简单、分析速度快、选择性佳等优点,并通过加入伏马毒素混合内标,提高测定的准确度和回收率,为测定食品中的伏马毒素含量提供方法借鉴。

参考文献

[1] Shephard CS, Snijman PW. Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B₂ in a non-human primate [J]. Food Chem Toxic, 1999, 37(2-3):111-116.

[2] 李军. 3 种粮食中伏马菌素污染状况调查[J]. 实用预防医学, 2001, 8(1):49.

[3] 王雨晨, 王君, 王元凯, 等. 伏马毒素 B₁ 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法的建立[J]. 上海交通大学学报, 2011, 29(2): 69-74.

[4] Sydenham EW, Gelderblom WCA, Thiel PG, et al. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B₁, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn [J]. J Agric Food Chem, 1990, 38(1):285-290.

[5] 王军淋, 胡玲玲, 蔡增轩, 等. 超高压液相色谱法同时检测玉米中的伏马毒素 B₁、B₂、B₃ [J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 2(1): 215-223.

[6] 李正翔, 陈小龙, 曹赵云, 等. 液相色谱-串联质谱法测定粮谷中的伏马毒素[J]. 分析测试学报, 2014, 33(2):167-172.

[7] 周贻兵, 吴坤, 李磊, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定啤酒中伏马毒素的含量[J]. 中国酿造, 2016, 35(1):152-155.

[8] Paepens C, Saeger SD, Poucke CV, et al. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in cornflakes [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2005, 19(14):2021-2029.

[9] 赵孔祥, 葛宝坤, 陈旭, 等. 在线免疫亲和净化-液相色谱-串联质谱快速测定中草药及中成药中 10 种真菌毒素[J]. 分析化学, 2011, 39(9):1341-1346.

[10] 刘印平, 路杨, 王丽英, 等. 液相色谱串联质谱-同位素内标法快速测定玉米面中的伏马菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 10(6):3817-3821.

[11] 郭文博, 杨俊花, 韩铮, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定不同畜禽配合饲料中伏马毒素的含量[J]. 分析化学, 2015, 43(3):414-418.

[12] 刘承兰, 许文娜, Andreas Kofoet, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定食品中的伏马菌素[J]. 分析化学, 2005, 33(11):1619-1622.