

高效液相色谱-串联质谱法测定谷物中 呕吐毒素及其衍生物

周鸿艳¹, 黄方取¹, 刘洋²

1. 金华市疾病预防控制中心, 浙江 金华 321000; 2. 浙江尖峰药业有限公司

摘要: **目的** 建立同位素稀释-高效液相色谱-串联质谱法测定谷物中呕吐毒素及其衍生物残留量的方法。 **方法** 样品经 (86+14, v/v) 乙腈水超声提取, HLB 小柱净化, 经 C18 色谱柱分离后, 在质谱负离子多反应监测模式下测定。 **结果** DON 和 3-ADON 在 2.0~500 $\mu\text{g/L}$, 15-ADON 在 10.0~1 000 $\mu\text{g/L}$ 时, 具有良好的线性关系, 相关系数(r)均大于 0.9990。DON 及其衍生物的 LOD 在 0.10~1.6 $\mu\text{g/kg}$ 之间, LOQ 在 0.35~6.0 $\mu\text{g/kg}$ 之间, 加标回收率范围为 80.3%~115.4%, 相对标准偏差(RSD, $n=6$) 在 5.1%~14.6% 之间。 **结论** 该方法快速简便, 定量准确, 可满足谷物中呕吐毒素及其衍生物的残留检测要求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 呕吐毒素; 谷物

中图分类号: R155.3 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2016)10-1269-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.10.038

Determination of vomitoxin and its derivants in cereal grains by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

ZHOU Hong-yan*, HUANG Fang-qu, LIU Yang

* Jinhua Municipal Center for Disease Control and Prevention, Jinhua, Zhejiang 321000, China

Abstract: **Objective** To establish the high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with isotope dilution for the determination of vomitoxin and its derivants in cereal grains. **Methods** The samples were extracted with acetonitrile-H₂O (86+14, v/v), purified with HLB column, separated on a C18, and then analyzed with HPLC-MS under the negative ion multiple reaction monitoring mode. **Results** The linearities of DON and 3-ADON were in the concentration range of 2.0 $\mu\text{g/L}$ ~500 $\mu\text{g/L}$, of 15-ADON in the concentration range of 10 $\mu\text{g/L}$ ~1000 $\mu\text{g/L}$, with the correlation coefficients higher than 0.9990. The limits of detection and the limits of quantitation were 0.10 $\mu\text{g/kg}$ ~1.6 $\mu\text{g/kg}$ and 0.35 $\mu\text{g/kg}$ ~6.0 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The average spiked recoveries ranged from 80.3% to 115.4%, and the relative standard deviation (RSD, $n=6$) ranged from 5.1% to 14.6%. **Conclusions** The high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with isotope dilution is easy, rapid and accurate. It can meet the requirements for the determination of the vomitoxin and its derivants in cereal grains.

Key Words: High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS); Vomitoxin; Cereal grain

呕吐毒素, 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (detryni-valenol, DON), 是一种主要由禾谷镰刀菌和大刀镰刀菌产生单端孢霉烯族化合物^[1]。3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-ADON) 和 15-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-ADON) 为 DON 的乙酰化后的衍生物^[2]。DON 能够抑制蛋白质的合成, 引起呕吐、腹泻、发烧甚至死亡, 苏联曾 1940 年暴发了大规模中毒事件, 造成数十人死亡^[3]。最新的动物研究表明, DON 及其衍生物可以和其他真菌毒素之间产生联合作用, 加剧动物肝、肾脏细胞膜损伤和氧化损伤^[4-5], 导致动物过早死亡。虽然

相比较于其他真菌毒素, DON 及其衍生物的毒素较低, 但是由于它在谷物中极易滋生, 中毒发病率较高, 对食品健康安全影响很大。因此, 许多国家已经对谷物中的 DON 及其衍生物进行监控, 并制定了严格的限量标准。

针对 DON 及其衍生物的检测方法主要有薄层色谱法 (TLC)^[6]、酶联免疫吸附法 (ELISA)^[7]、气相色谱-质谱联用法 (GC-MS)^[8]、液相色谱法 (HPLC)^[10] 和液相色谱-质谱法 (HPLC-MS)^[11-13]。近年来, HPLC-MS 法因具有液相色谱的高效分离和质谱的高抗干扰力双重优势, 已成为 DON 及其衍生物的主要方法。本文结合固相萃取净化手段, 给予 HPLC 分离技术, 建立

作者简介: 周鸿艳 (1988-), 女, 硕士, 工程师, 主要从事食品理化检验工作。

了一种预处理简单、分离效果好、灵敏度高、特异性强的 DON 及其衍生物定量分析方法,适用于多种谷物的检测。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 Agilent 6460 高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Agilent 公司); Allegra 64R 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); T25 高速组织捣碎机(德国 IKA 公司); HLB 固相萃取柱(60 mg, 美国 Waters 公司); MycoSep 226 多功能净化柱(ROMER 国际贸易(北京)有限公司); 乙腈为色谱纯(美国 Honeywell 公司); 甲醇为色谱纯(美国 Honeywell 公司); 实验用水均由 Milli-Q 的超纯水仪制备得到。

标准品:脱氧雪腐镰刀菌烯醇(100.3 μg/ml)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(100.4 μg/ml)、15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(101.1 μg/ml)、¹³C₁₅脱氧雪腐镰刀菌烯醇(¹³C₁₅-DON, 25.3/ml)均购自 ROMER 国际贸易(北京)有限公司。

标准储备液:取上述标准品,用乙腈稀释成质量浓度为 10.0 mg/L 的标准工作液,于-20℃下冰箱保存。使用时,用上述标准储备液混合,再用空白样品液稀释成不同浓度的工作液。

1.2 仪器条件

1.2.1 色谱条件 Agilent ZORBAX Extend- C18 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm); 柱温:40℃; 样品室温度:40℃; 进样体积:10 μl。流动相 A:0.01%氨水,流动相 B:乙腈; 流速:0.3 ml/min; 梯度洗脱程序:0~1 min, 5%~5%B; 1~2 min, 5%~15%B; 2~3 min, 15%~50%B; 3~4.5 min, 50%~100%B; 4.5~5.5 min, 100%~100%B; 5.5~6.0 min, 100%~5%B。

1.2.2 质谱条件 离子源:电喷雾电离源 ESI(-); 干燥器温度:350℃; 干燥器流速:11 L/min; 雾化器压力:45 kPa; 鞘气流温度 450℃; 鞘气流速 12 L/min; 毛细管电压 3.5 kv; 检测方式:多反应监测(MRM)。

1.3 样品前处理 称取样品 5.0 g 样品于 50 ml 离心管中,加入 40 ml(86+14, v/v) 乙腈水,涡旋 30 s,超声提取 30 min, 8 500 r/min 离心 5 min, 取上清液 4.0 ml, 加入 5 ng ¹³C₁₅-DON, 涡旋混匀, 于 50℃氮吹至近干, 用 4 ml 水溶解后作为样液备用。HLB 柱先经 3 ml 甲醇、3 ml 水活化, 然后全部样液上柱, 再用 5 ml 水淋洗, 最后用 5 ml 甲醇洗脱。收集全部洗脱液, 于 50℃氮吹至近干, 用 5% 乙腈/水定容至 1 ml, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤后直接进样。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化 配制 1.0 mg/L 的 DON 及其衍生物标准溶液,在 ESI+和 ESI-模式下进行监测。结果发现, DON 及其衍生物均在 ESI-模式下有更好的响应。再将各物质在 ESI-模式下进行母离子扫描, 分别对锥孔电压、碰撞能量和选择离子等质谱参数进行优化, 选取碰撞后丰度较高的 2 个离子作为定性离子, 其中离子丰度最强的作为定量离子。DON 及其衍生物的质谱参数见表 1, 该条件下的 MRM 色谱图见图 1。

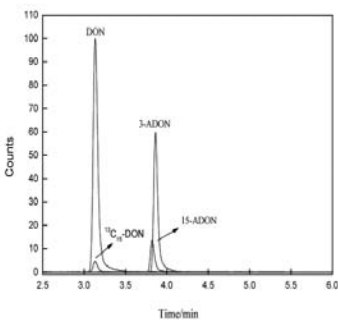


图 1 空白面粉加标样品(加标量 100 μg/kg) MRM 色谱图

表 1 DON 及其衍生物的质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (V)	驻留时间 (ms)	保留时间 (min)
DON	(-)295	265 ^a 138	84	5 10	80	3.158
3-ADON	(-)337	307 ^a 173	80	5 5	80	3.863
15-ADON	(-)337	219 150 ^a	80	5 15	80	3.820
¹³ C ₁₅ -DON	(-)310	279 ^a 145	90	5 25	80	3.155

注:a 为定量离子。

2.2 前处理条件的优化 根据现有文献报道的方法,结合目标物的化学性质,试验比较了乙腈、(90+10, v/v) 乙腈水、(70+30, v/v) 乙腈水、甲醇、(90+10, v/v) 甲醇水、(70+30, v/v) 甲醇水等多种提取溶剂对回收率的影响。结果发现,在有机相比比例相同的情况下,乙腈的提取效果好于甲醇。另外,随着乙腈比例的增加,回收率也明显提高,当采用(90+10, v/v) 乙腈水时,回收率达到 75% 以上。在此基础上,对有机相比比例进一步优化,最终选取(86+14, v/v) 乙腈水作为提取溶剂。同时,比较了 MycoSep 226 多功能净化柱和 HLB 固相萃取柱的净化效果以及对目标物回收率的影响。结果表明,HLB 柱的净化效果优于 226 柱,且回收率均能达到 80% 以上。本文选择 HLB 柱作为净化小柱。

2.3 基质效应、线性范围、检出限及定量限 本文采用相对响应值法^[14]测量基质效应,绝对基质效应

(ME)= 空白基质标准响应值/纯溶剂标准响应值×100%,当 ME 值大于 100%时,表明存在基质增强效应;当 ME 值小于 100%时,表明存在基质抑制效应。用初始流动相配制系列混合标准溶液;同时分别称取阴性面粉、玉米粉、玉米片样品,经过预处理后,用空白样品液分别稀释同溶剂同浓度的标准溶液,制得同等浓度系列的基质标准溶液。上机分析后,得到的 ME 值见表 2。结果表明,ME 值在 65%~113%之间,DON 及其衍生物在谷物中存在不同程度的基质增强或抑制效应。为消除谷物基质对目标化合物的干扰,本试验

采用空白基质标准曲线。
分别配制系列基质标准溶液,以目标物的定量离子峰面积对溶液质量浓度绘制标准曲线,得到的线性回归方程见表 2。结果表明,DON 和 3-ADON 在 2.0~500 μg/L,15-ADON 在 10.0~1 000 μg/L 时,具有良好的线性关系,相关系数(*r*)均大于 0.9990。信噪比 S/N=3 时,对应的样品质量浓度为检出限(LOD);信噪比 S/N=10 时,对应的样品质量浓度为定量限(LOQ),DON 及其衍生物的 LOD 在 0.10~1.6 μg/kg 之间,LOQ 在 0.35~6.0 μg/kg 之间。

表 2 DON 及其衍生物的 ME 值、线性范围、回归方程、检出限和定量限

序号	目标物	浓度范围(μg/L)	样品	回归方程	<i>r</i>	ME(%)	LOD(μg/kg)	LOQ(μg/kg)
1	DON	2~500	面粉	y=1.28x+1.02	0.9991	84	0.10	0.35
			玉米粉	y=1.08x+0.21	0.9990	71	0.15	0.50
			玉米片	y=1.15x+0.58	0.9991	76	0.15	0.50
2	3-ADON	2~500	面粉	y=0.669x+0.022	0.9990	113	0.30	1.0
			玉米粉	y=0.647x-0.065	0.9992	110	0.35	1.2
			玉米片	y=0.596x-0.079	0.9993	101	0.35	1.2
3	15-ADON	10~1000	面粉	y=0.095x+4.04×10 ⁻⁴	0.9996	73	1.3	4.5
			玉米粉	y=0.084x+7.03×10 ⁻⁴	0.9993	65	1.8	6.0
			玉米片	y=0.088x+5.03×10 ⁻³	0.9991	68	1.6	5.5

2.4 方法回收率及精密度 阴性样品进行加标回收率和精密度实验,分别取一定量的面粉、玉米粉、玉米片样品,添加 20、50、100 μg/kg 水平的标准溶液。样品经预处理后上机,每个加标水平进行 6 次平行测定,得

到的回收率和精密度结果见表 3。结果表明,DON 及其衍生物的平均加标回收率范围为 80.3%~115.4%,RSD 在 5.1%~14.6%之间,该法的准确度和精密度都较为满意。

表 3 DON 及其衍生物的方法回收率及精密度(*n*=6)

序号	目标物	添加水平 (μg/kg)	面粉		玉米粉		玉米片	
			回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
1	DON	20	84.6	11.2	83.4	8.9	85.6	9.8
		50	88.6	10.8	90.8	7.8	86.1	7.6
		100	99.4	7.8	99.7	5.1	95.7	6.8
2	3-ADON	20	84.5	9.9	89.5	12.2	87.4	12.6
		50	93.3	5.5	93.4	9.1	91.5	9.3
		100	115.4	6.5	103.7	8.2	111.7	10.5
3	15-ADON	20	92.9	14.6	80.3	10.2	81.2	10.2
		50	98.8	10.8	84.5	11.6	86.4	9.5
		100	103.5	7.2	91.9	8.9	96.8	8.8

2.5 实际样品检测 采用本文建立的方法随机测定了市售面粉、玉米粉、玉米片中 DON 及其衍生物的残留量,其中面粉 30 份、玉米粉和玉米片各 10 份。结果,28 份面粉、9 份玉米粉、8 份玉米片中检出不同浓度水平的 DON,含量在 3.01~613.8 μg/kg 之间,总检出率达到 90.0%,但均未超过国标 GB 2761-2011 中的限量标准;3 份玉米粉、2 份玉米片中检出 15-ADON,含量在 9.8~28.8 μg/kg 之间;除此之外,3-ADON 均未检出。

3 结 论

本文通过优化质谱条件,考察了不同的前处理条件,建立高效液相色谱-串联质谱法测定谷物中 DON 及其衍生物残留量的方法。方法学考察及实际样品检测证明,该法具有前处理简单、有毒试剂使用少、灵敏度高、准确性强等特点,能够满足多种谷物中 DON 及其衍生物残留检测的要求。

参考文献

咨询检测项目的了解很缺乏,应该要加强在流动人口中宣传艾滋病自愿咨询检测项目,对于早期发现感染者具有重要的意义。

采用单因素和多因素 logistic 回归分析发现影响艾滋病知识知晓率的因素有年龄、性别和文化程度,和张崛等^[10]的研究结果基本一致。与男性相比,女性对于艾滋病知识知晓率较低($OR = 0.78, 95\%CI: 0.67 \sim 0.91$)。而相对于年龄大于 40 岁的群体来说,<20 岁者艾滋病知识知晓率较低($OR = 0.47, 95\%CI: 0.34 \sim 0.66$),20~30 岁者艾滋病知识知晓率较低($OR = 0.67, 95\%CI: 0.55 \sim 0.86$),31~40 岁者艾滋病知识知晓率较低($OR = 0.76, 95\%CI: 0.58 \sim 0.99$),随着年龄的增加,对艾滋病知识掌握程度增高,可能是由于年龄大的群体在外打工的时间越长,在经济发达城市的时间越长,接触艾滋病知识宣传的机会和途径多,对于艾滋病知识的掌握程度较高。以大专及以上文化程度为参照,发现文化程度越高者,对于艾滋病知识的掌握程度越好。

通过本次的调查研究也提醒,在今后的艾滋病防治工作的宣传中,对艾滋病相关知识的普及还是首要工作,同时要考虑不同年龄、性别和文化程度等不同特征的人群接受艾滋病知识的途径和需要了解的知识点的不同,采用针对性的宣传教育,针对目前宣传教育中存在的不足进行改善,找到适合不同特征流动人口的

宣传方式,加大流动人口对艾滋病相关知识的了解程度,为后期开展有效的行为干预提供基础。

参考文献

- [1] 虞晨,孙业恒,孙良,等.我国流动人口艾滋病预防干预效果的 Meta 分析[J].中国循证医学杂志,2008,8(5):322-327.
- [2] 乔晓春,黄衍华.中国跨省流动人口状况[J].人口与发展,2013,19(1):15-19.
- [3] 国务院防治艾滋病工作委员会办公室.中国艾滋病防治督导与评估框架(试行)[Z].2007.
- [4] 国务院防治艾滋病工作委员会办公室.中国遏制与防治艾滋病行动计划(2006-2010年)[R].北京:国务院防治艾滋病工作委员会,2006.
- [5] 石福艳,裴鸿波,樊景春.外出务工人员艾滋病知识、态度及影响因素分析[J].中国公共卫生,2008,24(1):5-6.
- [6] Klouman E, Masenga EJ, Klepp KI, et al. HIV and reproductive tract infections in a total village population in rural Kilimanjaro, Tanzania: women at increased risk[J]. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997,14(2):163-168.
- [7] 袁青,魏杏华,陈智聪,等.深圳市宝安区某街道流动人口艾滋病相关知识知晓率调查[J].实用预防医学,2011,18(3):548-550.
- [8] 张昱,么鸿雁,孙瑾芳,等.深圳市新生代农民工艾滋病知信行现状研究[J].中国计划生育学杂志,2010,182(11):667-670.
- [9] 李秋华,褚委丽,田秀红,等.上海某社区流动人口艾滋病自愿咨询检测接受性研究[J].中国健康教育,2009,25(8):586-589.
- [10] 张崛,刘红新,李芬,等.2010年昌平区流动人口艾滋病 KAP 现状及影响因素分析[J].实用预防医学,2011,18(2):239-242.

收稿日期:2016-04-28

(接 1271 页)

- [1] Müller HM, Reimann J, Schumacher U, et al. Fusarium toxins in wheat harvested during six years in an area of southwest Germany [J]. Natural Toxins, 1997, 5(1):24-30.
- [2] 和佳鹭,蒲彦利,徐虹,等. UPLC-MS/MS 测定婴幼儿谷物辅食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物[J].中国卫生检验杂志,2015,25(17):2860-2862.
- [3] Pitt JI. Mycotoxins: deoxynivalenol and other trichothecenes [J]. Encyclopedia of Food Safety, 2014, 2:295-298.
- [4] He JW, Bondy GS, Zhou T, et al. Toxicology of 3-epi-deoxynivalenol, a deoxynivalenol -transformation product by *Deosia mutans* 17-2-E-8 [J]. Food Chem Toxicol, 2015, 84:250-259.
- [5] Liang Z, Ren ZH, Gao S, et al. Individual and combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on mouse kidney [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2015, 40(3):686-691.
- [6] 雷明彦.饲料中常见霉菌毒素对小鼠的联合毒性作用及机制的研究[D].武汉:华中农业大学,2013.
- [7] 魏润蕴,李文艳.小麦中雪腐镰刀菌烯醇(NIV)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的薄层色谱测定方法[J].中国食品卫生杂志,1994,6(1):19-20.
- [8] 肖娟,辛苑,冯莎,等.酶联免疫吸附法测定小麦中脱氧雪腐镰刀

- 菌烯醇[J].食品安全质量检测学报,2013,4(1):224-227.
- [9] 王志元,张思群,陈文锐,等.气相色谱/质谱/质谱测定小麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J].中国卫生检验杂志,2002,12(2):164.
- [10] 隋凯,李军,卫峰,等.多功能柱净化-高效液相色谱法同时检测小麦中雪腐镰刀菌烯醇和脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J].分析测试学报,2006,25(3):56-59.
- [11] 胡文彦,许磊,杨军,等.基于 QuEChERS 提取的快速液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷基辅助食品中的 9 种真菌毒素[J].色谱,2014,32(2):133-138.
- [12] 黄娟,陈国松,张晓燕,等.固相萃取-高效液相色谱-串联质谱法检测粮食及其制品中的呕吐毒素[J].色谱,2012,30(11):1203-1207.
- [13] 李瑞园,刘红河,康莉. HPLC - MS/MS 法同时测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物[J].分析测试学报,2014,33(6):660-665.
- [14] 黄何何,张缙,徐敬明,等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 21 种植物生长调节剂的残留量[J].色谱,2014,32(7):707-716.

收稿日期:2016-03-03