

高效液相色谱法检测粮谷及其制品中六种 A, B型单端孢霉烯族真菌毒素

静平^{1*}, 胥璐², 马志勇², 鲍蕾^{1*}, 于冰², 丛海林², 吕宁¹,
吴振兴¹, 梁成珠¹, 汪纪波³

(1. 山东出入境检验检疫局食品农产品中心, 青岛 266002;

2. 青岛大学化学化工与环境学院, 青岛 266071; 3. 罗氏医疗器械有限公司, 北京 100738)

摘要: **目的** 建立粮谷及其制品中六种 A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素的高效液相色谱-串联质谱分析方法。**方法** 样品经乙腈-水溶液(84 : 16, V/V)提取, MycoSep[®]226 或 MycoSep[®]227 多功能柱净化, Waters Atlantis dC18 色谱柱分离, 串联四极杆质谱多反应离子监测模式检测。**结果** 6 种真菌毒素在各自的线性范围内线性关系良好, 相关系数均不低于 0.996, 定量下限为 0.1~20 μg/kg, 低、中、高 3 个加标水平下平均回收率为 60.1%~123%, 相对标准偏差为 7.5%~19.8%。**结论** 该方法具有前处理简单、净化效果好、灵敏度高的优点, 适用于复杂基质样品中 A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素残留的确证和定量检测。**关键词:** A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素; 高效液相色谱-串联质谱; 粮谷及其制品

Determination of six type A and type B trichothecenes by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

JING Ping^{1*}, XU Lu², MA Zhi-Yong², BAO Lei^{1*}, YU Bing², CONG Hai-Lin²,
LV Ning¹, WU Zheng-Xing¹, LIANG Cheng-Zhu¹, WANG Ji-Bo³

(1. Food and Agricultural Testing Agency of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China;
2. Chemical Engineering and Environment, Qingdao University, Qingdao 266071, China;
3. Roche Diagnostics Limited, Beijing 100738, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of six type A and type B trichothecenes by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Method** The homogenized sample was extracted by 84% acetonitrile-water solution (V/V) and further purified by MycoSep[®]226 or MycoSep[®]227. The target compounds were separated by waters Atlantis dC18 column and detected by MS/MS system with electrospray ionization (ESI) under multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** It was shown that the high correlation coefficients ($r > 0.996$) of six mycotoxins were obtained within their respective linear ranges. The LOQ for the six compounds ranged from 0.1~20 μg/kg. The mean recoveries ranged from 60.1%~123% with the relative standard deviations of 7.5%~19.8%. **Conclusion** This method was suitable for the identification and quantification of multi-component mycotoxin contaminants in complex matrixes with advantages of simple pretreatment, good purification and high sensitivity.

基金项目: 山东出入境检验检疫局科研基金资助项目(SK200652), 国家自然科学基金资助项目(21105125)

*通讯作者: 静平, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测。E-mail: jingdaping@gmail.com

鲍蕾, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全检测。E-mail: baoleiqd@yahoo.com.cn

KEY WORDS: type A and type B trichothecenes; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; grain and grain-products

1 引言

近年来单端孢霉烯族真菌毒素(trichothecenes)是危害人类健康、阻碍国际贸易的真菌毒素中非常重要的一类, 主要由镰刀霉菌产生。迄今为止, 已知的单端孢霉烯族真菌毒素有 170 多种, 最常见的几种毒素为 A 类中的 T-2 毒素、HT-2 毒素和二乙酰蕈草镰刀菌烯醇(DAS), B 类中的呕吐毒素(DON)、雪腐镰刀菌烯醇(NIV)、3-乙酰基呕吐毒素(3Ac-DON)等。

流行病学调查显示, 单端孢霉烯族真菌毒素是一种天然污染物, 广泛地存在于各种粮食作物(如小麦、玉米、大麦、燕麦、黑麦等)和加工产品(如麦芽、啤酒和面包)中。镰刀霉菌是温带地区的主要产毒菌, 其产生的单端孢霉烯族真菌毒素主要污染北美、欧洲、亚洲等地区的粮食作物。资料显示, 在美国、加拿大等国家的收割季节, 玉米和小麦的 DON 污染是十分严重的。另外, 在欧洲常常检出谷物中含有 T-2 毒素。动物实验表明, 单端孢霉烯族真菌毒素能够产生多种毒效应: 包括免疫抑制, 损害造血系统、消化系统、肾脏, 造成神经中毒反应乃至致死等, 同时也对家畜和人类产生类似毒作用。中毒症状包括体重减轻、饲料利用率下降、拒食、呕吐、便血、严重的皮炎、出血、产蛋量下降、流产以及死亡^[1,2]。

由于单端孢霉烯族真菌毒素给农产品造成污染及对动物和人类健康具有重大危害, 许多国家已制定了限量标准。目前, 世界上已有 42 个国家规定 DON 的最高残留限量不得超过 300~2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 已有 8 个国家制定了谷物中 T-2 毒素的限量标准, 其最高残留限量在 100~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内; 欧盟自 1999 年起对单端孢霉烯族真菌毒素进行了风险评估, 并在 2004 年制定了 DON, HT-2, T-2 的限量草案, 预计将在近期正式颁布 DON, HT-2, T-2 的限量法令。

近年来, 各国政府对单端孢霉烯族真菌毒素的危害越来越重视, 对单端孢霉烯族真菌毒素的检测方法进行了很多研究。目前, 单端孢霉烯族真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法(TLC), 气相色谱-电子捕获法(GC-ECD), 气质联用法(GC-MS), 液相色谱-紫外检测法(HPLC-UV)或液相色谱-荧光检测法

(HPLC-FLD)。另外, 还有一些免疫学方法, 如酶联免疫法、放射免疫分析等, 基于抗原抗体反应的免疫方法, 具有灵敏度高、不需要净化处理等优点, 但主要缺点是一种方法仅能检测一种毒素, 即一种抗体只能针对一种抗原。近年来, 国际上普遍采用免疫亲和柱作为真菌毒素检测的前处理方法, 净化效果好, 但由于抗体的特异性, 一种方法仅能检测一种毒素^[3-8]。

国内对呕吐毒素(DON)和 T-2 毒素的检测方法研究较多。对于其他毒素, 如 HT-2 毒素、雪腐镰刀菌烯醇(NIV)、3-乙酰基呕吐毒素(3Ac-DON)、二乙酰蕈草镰刀菌烯醇(DAS)的研究尚处于起步阶段。关于多种单端孢霉烯族真菌毒素同时检测的研究, 尚处于空白阶段。我国检验检疫系统尚未开展关于单端孢霉烯族真菌毒素的多毒素检测方法、标准制定等方面的研究。为了完善食品卫生安全监控体系, 保护食品卫生安全, 规避食品进出口风险, 突破国外技术贸易壁垒, 当务之急是研究开发简便快捷的通用型检测方法^[9-14]。

高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测技术已被广泛应用于各种真菌毒素和农兽药残留的检测, 具有灵敏度高、选择性好、可以同时检测多种物质的优点, 同时它可以提供目标化合物的保留时间和分子结构信息, 整个净化过程操作简单。本文采用多功能柱净化结合 LC-MS/MS 方法同时检测粮谷及其制品中 DON, 3Ac-DON, NIV, T-2, HT-2, DAS 等 6 种 A, B 族单端孢霉烯族真菌毒素。

2 材料与方法

2.1 试剂及仪器

液相色谱-串联质谱(Agilent 1200-API 4000, 配电喷雾离子源); 混匀器(MAXI MIX II, Thermolyne); 超纯水系统(MILLIPORE Synergy[®] UV); 移液枪(10 μL , 200 μL , 1 mL, Eppendorf); 氮吹仪(N-EVAP[™] 111, Organomation Associates, Inc.); 称量天平(PM480, METTLER); 高速均质器(ULTRA-TURRAX T-25, IKA); 多功能柱(Mycosep[®]226, Mycosep[®]227, ROMER 公司)。

甲醇、乙腈为色谱纯; 乙酸铵为分析纯; T-2 毒

素、HT-2 毒素、二乙酰蕈镰刀菌烯醇(DAS)、3-乙酰基呕吐毒素(3Ac-DON)、雪腐镰刀菌烯醇(NIV)(1 mg, Fermentek 公司); 呕吐毒素(DON)(1 mg, Sigma-Aldrich)。

标准溶液配制: 用甲醇依次将六种单端孢霉烯族真菌毒素溶解并定容至 10.0 mL 作为标准储备液, 浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 样品前处理

称取粉碎样品 25.0 g(精确至 0.1 g)于 500 mL 具塞锥形瓶中, 加入 100 mL 乙腈/水(84:16, v/v)提取液, 以均质器高速搅拌, 提取 3 min, 过滤, 取 8 mL 滤液, 过 MycoSep[®]226 或者 MycoSep[®]227 多功能柱, 取过柱后液体 4 mL, 吹干、乙腈: 水(1:9)定容至 1 mL。

2.3 高效液相色谱条件

色谱柱: Waters Atlantis dC18 柱(150 mm \times 2.1 mm, 5 μm , 补充公司), 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$, 进样量 20 μL , 进样室保持室温 22 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 。流动相采用乙腈(A)-乙酸铵水溶液(B)体系, 梯度条件: 0~4 min, 流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, A 为 10%; 4~5 min, 流速 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, A 由 10% 提高到 90%; 5.5~7 min, A 由 90%降低到 10%, 流速 300 $\mu\text{L}/\text{min}$; 7~16 min, 流速 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, A 为 10%。

2.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 检测方式: 多反应监测; 离子源温度: 600 $^{\circ}\text{C}$; 气帘气: 40 L/min。正离子模式喷雾电压: 5500 V; 负离子模式喷雾电压: -4500 V。扫描方式、监测离子对(m/z)和其他参数见表 1。

表 1 六种 A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素的质谱参数
Table 1 MS parameters for six type A and type B trichothecenes

Compounds	Ion pairs (m/z)	DP (V)	CE (V)	Model
NIV	371.1/311.2*, 371.1/281.1	-40	-13, -20	ESI ⁻
DON	294.9/264.8*, 294.9/137.8	-26	-15, -22	ESI ⁻
3Ac-DON	337.2/307.0*, 337.2/216.9	-30	-15, -25	ESI ⁻
DAS	384.1/307.2*, 384.1/247.2	29	16, 19	ESI ⁺
T-2	489.1/245.2*, 489.1/327.2	45	38, 34	ESI ⁺
HT-2	447.1/345.1*, 445.1/285.1	35	24, 28	ESI ⁺

*定量离子

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

对各种毒素标准品进行全扫描发现: NIV, DON, 3Ac-DON 可在 ESI⁻模式下生成减氢或者加乙酸根的离子, DAS, T-2, HT-2 可在 ESI⁺模式下生成加钠或者加铵的离子。采用乙腈-水作为流动相时, NIV 离子化效率不高, 在水相中加入 10 mmol/L 乙酸铵后 NIV 离子化效率提高, 其他离子的信号也足够强。由于真菌毒素易溶于甲醇或乙腈, 本实验分别选择甲醇和乙腈作为强洗脱流动相。实验发现, 用乙腈作为流动相, 在正负两种监测模式下的洗脱效果均明显高于甲醇作为流动相时的效果, 因此最终选择乙腈作为强洗脱流动相。

3.2 质谱条件选择

3.2.1 母离子的选择

将六种单端孢霉烯族真菌毒素依次配成 1 g/L 的

标准溶液, 根据各化合物分子的电离性质, 分别选用 ESI⁺和 ESI⁻作为离子化模式, 采用直接进样法, 在优化质谱参数的基础上, 确定各毒素的母离子质量数。结果发现 NIV, DON, 3Ac-DON 在 ESI⁻模式下可获得较高灵敏度; DAS, T-2, HT-2 可在 ESI⁺模式下可获得较高灵敏度。

3.2.2 子离子的选择及碰撞电压优化

欧盟(2002/657/EC)指令规定低分辨率质谱联用检测应在确定母离子的基础上选择两个以上的子离子。在确定各真菌毒素的母离子后, 采用子离子扫描的方式对子离子及碰撞能量进行优化。随着碰撞能量的增加, 选择能产生最高丰度的子离子的碰撞能量作为 CID 最佳碰撞电压。六种单端孢霉烯族真菌毒素及两种内标的监测离子对、去簇电压、碰撞能量、离子化方式见表 1。

3.3 多功能柱选择

采用面粉为空白样品, 进行添加回收率实验,

结果表明对于阴离子, MycoSep[®]226 和 MycoSep[®]227 的回收率接近; 对于阳离子, MycoSep[®]227 的回收效率相对较高。

3.4 方法的线性范围及定量限

以待测化合物与内标的峰面积比值为纵坐标 Y , 待测化合物的标示浓度为横坐标 X 进行回归分析, 得到线性回归方程、线性范围及相关系数(见表 2)。

由表 2 可知, 采用同位素内标法定量, 各化合物的线性关系良好, 相关系数 r 均大于 0.996, 且该方法可较好克服样品提取、净化及上机测定过程造成的误差。

用面粉空白样品作为基质, 添加不同量的真菌毒素标准品后按“2.2”处理后测定, 根据 10 倍信噪比计算定量下限(见表 2)。各真菌毒素的检出限(LOD, $S/N > 3$)和定量下限(LOQ)均远低于欧盟、日本等国家规定的最大残留限量。

表 2 不同多功能柱的回收效率对比表
Table 2 Comparison of recoveries of multifunctional clean-up column

多功能柱	序号	Recovery(%)					
		NIV	DON	3Ac-DON	DAS	HT-2	T-2
MycoSep [®] 226	1	64.3	87.0	103	56.1	33.9	19
	2	53.9	86.0	90.5	55.2	16.2	30
MycoSep [®] 227	1	65.9	96	94.3	66.5	69.8	64.9
	2	86.1	110	120	88.7	68.7	62.2

表 3 A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素的线性方程、线性范围、相关系数、检出限与定量下限
Table 3 Linear equation, linear ranges, correlation coefficients, detection limits and quantitative lower limits of six type A and type B trichothecenes

Compound	Linear equation	Linear ranges ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
NIV	$Y = 1000X + 56400$	2~1000	0.9996	2.0000	10.0000
DON	$Y = 249X + 4200$	5~1000	0.9998	5.0000	4.0000
3Ac-DON	$Y = 592X + 4140$	5~1000	0.9976	2.0000	5.0000
DAS	$Y = 177000X + 15800$	0.1~500	0.9964	0.0100	0.0500
T-2	$Y = 3630X + 62500$	1~500	0.9988	0.1000	0.2000
HT-2	$Y = 243X + 3130$	5~1000	0.9997	5.0000	20.0000

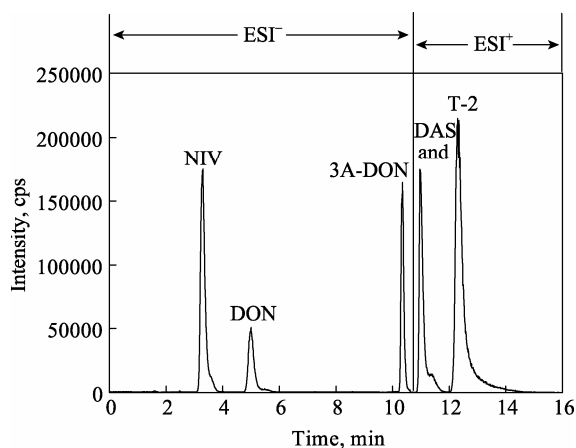


图 1 六种单端孢霉烯族真菌毒素总离子流色谱图
Fig.1 Total ion current chromatograms of six type A and type B trichothecenes

3.5 方法的回收率与精密度

取小麦粉空白样品, 进行加标实验, 每个加标水平平行测定 6 次, 计算各种真菌毒素的回收率和相对标准偏差(RSD), 结果见表 4。结果表明, 方法的回收率为 60.1%~123%, 相对标准偏差为 7.5%~19.8%。

3.6 实际样品的检测

取进出口的大麦、小麦、面粉、黄豆、饼干、豌豆等样品 6 份进行检测, 检出真菌毒素 3 种, 分别为 DON, NIV, DAS。检出的 4 份阳性样品中均含有 DON, 含量在 17.4~443.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。图 2 为 DON 含量为 443.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的阳性样品的多反应监测色谱图。

表4 六种A、B型单端孢霉烯族真菌毒素添加回收率和精密度
Table 4 Recoveries and relative standard deviations of six type A and type B trichothecenes

Compound	Spiked level (μg/kg)	Sample	Recovery (%)	RSD (%)	Spiked level (μg/kg)	Sample	Recovery (%)	RSD (%)	Spiked level (μg/kg)	Sample	Recovery (%)	RSD (%)
NIV	10	1	87.7	19.8	25	1	77.7	8.2	50	1	75.5	12.9
		2	73.9			2	73.9			2	84.8	
		3	70.6			3	82.6			3	72.9	
		4	111.0			4	86.1			4	93.4	
		5	87.1			5	70.7			5	75.4	
		6	101.0			6	78.2			6	69.5	
DON	25.00	1	112.0	15.1	50.00	1	101.0	11.7	125.00	1	86.0	10.1
		2	81.9			2	106.0			2	84.2	
		3	84.5			3	122.0			3	96.1	
		4	85.1			4	113.0			4	81.3	
		5	81.4			5	98.2			5	96.6	
		6	85.5			6	92.3			6	78.2	
3Ac-DON	25.00	1	89.6	11.6	50.00	1	69.1	19.4	125.00	1	103	7.5
		2	113.0			2	85.7			2	90.5	
		3	107.0			3	61.5			3	94.3	
		4	119.0			4	60.1			4	84.5	
		5	102.0			5	87.2			5	93.8	
		6	97.9			6	79.8			6	92.0	
DAS	0.1	1	90.1	16.3	0.25	1	86.5	17.0	0.5	1	74.4	10.2
		2	123.0			2	110.0			2	75.1	
		3	87.8			3	108.0			3	80.9	
		4	89.1			4	88.7			4	72.3	
		5	91.2			5	75.1			5	90.5	
		6	90.5			6	106.0			6	85.2	
T-2	10.00	1	108	9.5	25.00	1	89	13.3	50.00	1	70.5	8.9
		2	106			2	103.0			2	84.3	
		3	90.6			3	86.5			3	73.5	
		4	90.1			4	106.0			4	86.1	
		5	107.0			5	101.0			5	81.6	
		6	104.0			6	78.5			6	78.5	
HT-2	30	1	116.0	18.4	50	1	78.9	13.5	100	1	74.8	9.2
		2	98			2	69.8			2	85.7	
		3	72.1			3	88.6			3	72.7	
		4	104.0			4	69			4	82.9	
		5	114.0			5	87.1			5	89.4	
		6	92.8			6	90.4			6	79.2	

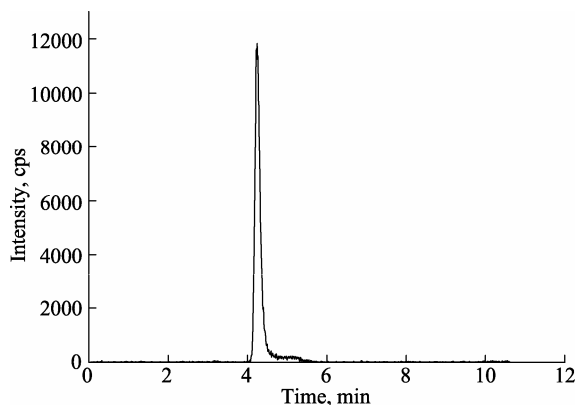


图 2 DON 污染的饼干样品多反应监测色谱图

Fig. 2 Multiple reaction monitoring chromatography of biscuits contaminated by DON

4 结 论

我们建立了粮食及其制品中同时检测 NIV, DON, 3Ac-DON, T-2, HT-2, DAS 六种 A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素的方法。该方法具有灵敏度高、自动化程度高、重复性及净化效果好等优点, 适于六种 A, B 型单端孢霉烯族真菌毒素低含量残留的定量检测与验性确证, 能够满足欧盟、日本等国家和地区对于真菌毒素污染检测的限量要求。

参考文献

- [1] Bennet JW, Klich M, Mycotoxins. Toxic effects of mycotoxins in humans [J]. Clin Microbiol Rev, 2003, 16(3): 497-516.
- [2] Hussein HS, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. Toxicology, 2001, 167(2): 101-134.
- [3] Marianna K, Uwe L, Hans-Ulrich HA new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS [J]. Mol Nutr Food Res, 2006, 50(3): 261-269.
- [4] Lattanzio VMT, Solfrizzo M, Visconti A. Determination of trichothecenes in cereals and cereal-based products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Add Contam, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2008, 25(3): 320-330.
- [5] Berthiller F, Schuhmacher R, Buttinger G, *et al.* Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr, A, 2005, 1062(2): 209-216.
- [6] Tomoyuki K, Makoto K, Satoshi H, *et al.* Development of a simultaneous liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of type B trichothecenes, their derivatives, and precursors in wheat [J]. Rapid Comm Mass Spectr, 2011, 25(23): 3481-3490.
- [7] Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, *et al.* Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs [J]. Rapid Comm Mass Spectr, 2006, 20(9), 1422-1428.
- [8] Di Mavungu JD, Monbaliu S, Scippo M, *et al.* LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements [J]. Food Add Contam, Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2009, 26(6): 885-895.
- [9] 王莉娜. 液相色谱-连续质谱法分析麦芽和啤酒中单端孢霉烯 [J]. 啤酒科技, 2007, (1): 65-67.
- [10] 孔维宝, 赵海锋, 陆健, 等. 用 LC/MS/MS 分析麦芽和啤酒中的单端孢菌毒素(Trichothecene)[J], 啤酒科技, 2005, (7): 59-61.
- [11] 梁颖, 张春晖, 刘邻渭, 等. 液相色谱-质谱测定小麦中 B 类单端孢霉烯族毒素[J], 中国粮油学报, 2006, 21(6): 160-162.
- [12] 应永飞, 朱聪英, 韦敏珏, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中 14 种霉菌毒素及其类似物[J], 分析化学, 2010, 38(12), 1759-1764.
- [13] 牟仁祥, 曹赵云, 金连登, 等. 免疫亲和柱净化-液相色谱质谱法对粮谷中 T-2 与 HT-2 毒素的测定[J], 分析测试学报, 2009, 28, (3): 368-371.
- [14] 宫小明, 任一平, 董静, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中 18 种真菌毒素[J], 分析测试学报, 2011, 30(1): 6-12.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



静平, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测。

E-mail: jingdaping@gmail.com



鲍蕾, 博士, 研究员, 研究方向: 食品安全检测。

E-mail: baoleiqd@yahoo.com.cn