

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

刘印平¹, 路 杨¹, 王丽英¹, 常凤启¹, 杨立新^{1,2}, 张永茂^{1*}

(1. 河北省疾病预防控制中心, 河北省食品安全风险监测重点实验室, 石家庄 050021;

2. 北京大学环境科学与工程学院, 北京 100871)

摘 要: **目的** 建立液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)以同时测定玉米中3种伏马菌素(FB₁, FB₂ and FB₃)。 **方法** 试样经50%乙腈/水溶液超声提取, 离心, 多功能柱净化后液相色谱/串联质谱仪直接测定, ¹³C₃₄-FBs内标法定量。 **结果** 加标回收率范围为75.9%~108.2%, 方法检测限在0.39~0.58 μg/kg之间。将本方法用于实际样品分析, 67%的玉米面中同时检出3种伏马菌素(FB₁, FB₂ and FB₃)。 **结论** 此方法简便快速, 灵敏度较高, 可以用于准确定量检测粮食中的伏马菌素。

关键词: 伏马菌素; 玉米面; 液相色谱-串联质谱法; 同位素稀释; 多功能柱

Determination of fumonisins in corn by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution method

LIU Yin-Ping¹, LU Yang¹, WANG Li-Ying¹, CHANG Feng-Qi¹, YANG Li-Xin^{1,2}, ZHANG Yong-Mao^{1*}

(1. Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hebei Provincial Key Laboratory of Food Safety Risk Monitoring, Shijiazhuang 050021, China; 2. College of Environmental Sciences and Engineering, Peking University, Beijing 100871, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simple and rapid method for the determination of fumonisin (FB₁, FB₂ and FB₃) in corn by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Homogenized samples were sequentially extracted by 50% acetonitrile-water, centrifuge, multifunction columns cleanup, evaporate, re-dissolve and filtration before analysis. Quantification of fumonisin was based on the use of ¹³C₃₄-fumonisin. **Results** The present method showed adding standard recoveries of 75.9%~108.2%, with limit of detections (LODs) of FB₁, FB₂ and FB₃ ranging from 0.39 to 0.58 μg/kg. Analysis of 18 corn samples by the current method was successfully performed. The simultaneous occurrence of FB₁, FB₂ and FB₃ was observed in 67% of samples. **Conclusion** This quantitative method is demonstrated to be rapid, simple, and high sensitive, which can be applied in the accurate determination of fumonisin in corn.

KEY WORDS: fumonisin; corn; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotope dilution; multifunction columns

*通讯作者: 张永茂, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 18832185618@163.com

*Corresponding author: ZHANG Yong-Mao, Senior Technical Personnel, Hebei Provincial Center for Disease Control and Prevention, No.97, Huai'an East Road, Shijiazhuang 050021, China. E-mail: 18832185618@163.com

1 引言

伏马菌素是一组重要的霉菌毒素,主要有3种类型: B₁(FB₁)、B₂(FB₂)、B₃(FB₃)。伏马菌素主要污染粮食及其制品,对人类和动物健康造成潜在威胁^[1-3]。伏马毒素的毒理试验结果表明,它可对某些家畜产生急性毒性及潜在的致癌性,并被怀疑可引发人类的食道癌和肝癌,已成为继黄曲霉毒素之后的又一研究热点^[4,5]。其中FB₁是其主要组分。FB₁对食品污染的情况在世界范围内普遍存在,主要污染玉米及玉米制品。由于玉米是我国最重要的粮食作物之一,主要用于人类和动物的直接食用。因此,我国玉米中伏马菌素的污染已受到广泛关注。

在许多国家如肯尼亚、土耳其、美国、巴西和韩国已有报道在玉米和玉米为主的食物和饲料检测到FB₁、FB₂和FB₃^[6-10]。2001年,美国食品与药物管理局(FDA)发布了食品(2 mg/kg)和动物饲料(1~50 mg/kg)中伏马菌素最高限量的指导性公告。欧盟规定伏马菌素最大允许限量为1 mg/kg。

目前,常用液相色谱质谱法分析伏马菌素。在大多数情况下,免疫亲和柱(immuno-affinity chromatography, IAC)用于提取和净化程序^[11-13]。但是高效液相色谱法通常都需要进行衍生后再用荧光检测器检测,操作繁杂。本研究采用多功能净化柱(MultiSep[®]211 FUM),此柱价格相对较便宜,净化效果好,操作简单。同时,应用液相色谱-串联质谱法结合¹³C₃₄-FBs 同位素内标可校正样品制备和仪器测定过程中所有潜在的损失,达到精确定量。本研究方法简单、快速、检出限低、灵敏度高,对于测定玉米中伏马菌素是一种较好的确证方法。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

液相色谱-串联质谱联用仪(TSQ, 美国热电公司); TDL-5-A 型离心机(上海安亭); AE200 分析天平(瑞士 METTLER 公司); Atlantis T3 色谱柱(15 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(Waters, Ireland); MultiSep[®]211 FUM 净化柱购自 Romer Labs (Tulln, Austria)。

标准物质: FB₁、FB₂、FB₃ (50 μg/mL)及同位素内标¹³C₃₄-FB₁ (25 μg/mL)、¹³C₃₄-FB₂ (10 μg/mL)、¹³C₃₄-FB₃ (10 μg/mL) 均购自 Sigma-Aldrich Laborchemikalien

GmbH (Steinheim, Germany)。甲醇、乙腈(色谱纯, Fisher 公司); 冰乙酸(分析纯, 天津科密欧化学试剂有限公司)。整个分析过程全部使用 Milli-Q 超纯水(Millipore, Bedford, MA, USA)

2.2 样品前处理

准确称取2.0 g 样品于50 mL 聚丙烯离心管中,加入已知量的同位素内标混合溶液(¹³C-FB₁, ¹³C-FB₂, ¹³C-FB₃), 用10 mL 乙腈-水溶液(5:5, V:V)充分混合后,振荡萃取3 min, 4000 r/min 离心10 min(温度4 °C), 将上清液转移至10 mL 聚丙烯离心管中,用甲醇-水溶液(3:1, V:V)定容至刻度。多功能净化柱先后用5 mL 甲醇-水溶液(5:5, V:V)和5 mL 甲醇淋洗,再用10 mL 甲醇/乙酸(99:1, V:V)洗脱下目标物。洗脱液在氮气流下吹干,用1 mL 乙腈-水溶液(5:5, V:V)复溶。过0.22 μm 滤膜后用于液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)测定。

2.3 液相色谱条件

色谱柱: Atlantis T3 柱(15 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。

流动相: A: 0.1%甲酸水溶液; B: 乙腈/甲醇(5:5, V:V)。

梯度淋洗条件见表1, 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 25 °C; 进样体积: 20 μL。

表1 液相色谱梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution of liquid chromatography

时间(min)	A(%)	B(%)
0	30	70
8	70	30
13	70	30
17	100	0
19	100	0
20	30	70
30	30	70

2.4 串联质谱仪操作条件

电离模式下(ESI+); 毛细管电压: 3.5 kV; 源温度: 100 °C; 脱溶剂气(高纯氮, >99.999%)温度: 320 °C; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气体流量: 600 L/h; 锥孔反吹气60 L/h; 鞘气压力40 kPa, 辅助气压力6 kPa, 碰

撞气: 高纯氩 Ar。

2.5 标准储备液和标准工作溶液的配制

将伏马菌素各标准溶液, 分别用 50%乙腈水溶液稀释, 配制成一定浓度的标准储备液。

将以上各标准储备液进一步稀释, 配成混合标准工作溶液(1、5、10、20、40、100、200、400、800 ng/mL), 其中内标浓度为 5 ng/mL。

3 结果与讨论

3.1 质谱条件优化

通过直接进样法确定目标物的母离子和特征子离子。保留时间及主要质谱优化参数见表 2, 色谱图见图 1。

3.2 方法的线性范围和检出限

在优化的条件下, 对所配制的 1、5、10、20、40、100、200、400、800 ng/mL 系列浓度的混合标准溶液进行测定, 以目标物质的色谱峰面积对其质量浓度进行线性回归拟合。如表 3 所示, 发现 3 种目标物

质在相应浓度范围内, 线性相关关系良好, 相关系数均大于 0.995, 定量限为 1.4~1.9 $\mu\text{g/kg}$ 。

3.3 回收率和精密度

在确定的实验条件下, 向空白样品中添加 2、10、100、500 $\mu\text{g/kg}$ 4 个水平的混合标准溶液, 每个添加水平重复 6 次, 进行加标回收率和精密度的测定。结果见表 4, 加标回收率范围为 75.9%~108.2%, 相对标准偏差(RSDs)在 2.1%~9.4%之间, 说明方法准确可靠, 重现性好。

3.4 实际样品测定

对石家庄超市和市场随机购买的 18 份玉米面进行测定, 其中 16 份样品中检出 FB₁, 检出率最高, 含量范围为 4.8~486 $\mu\text{g/kg}$ 。12 份样品中检出 FB₂, 含量范围为 1.9~42.3 $\mu\text{g/kg}$ 。14 份样品中检出 FB₃, 含量范围为 2.2~111.6 $\mu\text{g/kg}$ 。另外, 在 12 份样品中同时检测到了 FB₁、FB₂、FB₃。Wang 等^[14]检测饲料中 FB₁ 的污染情况, 96.1%的饲料样品中检出 FB₁, 检出结果在 20~6568 $\mu\text{g/kg}$ 范围内, 均值为 2878 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 2 LC-MS/MS 测定伏马菌素的主要参考质谱参数
Table 2 Parameters for the LC-MS/MS analysis of fumonisins

化合物	保留时间(RT, min)	母离子(<i>m/z</i>)	特征离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV
FB ₁	13.03	723.0	353.5	42
			705.3	28
			337.2	36
FB ₂	14.20	707.0	354.2	26
			337.2	39
FB ₃	14.87	707.0	354.2	26
			374.2	42
			356.3	37
¹³ C ₃₄ -FB ₁	13.01	756.2	358.2	36
¹³ C ₃₄ -FB ₂	14.21	740.3	376.2	45
			358.2	39
¹³ C ₃₄ -FB ₃	14.86	740.3	376.2	45

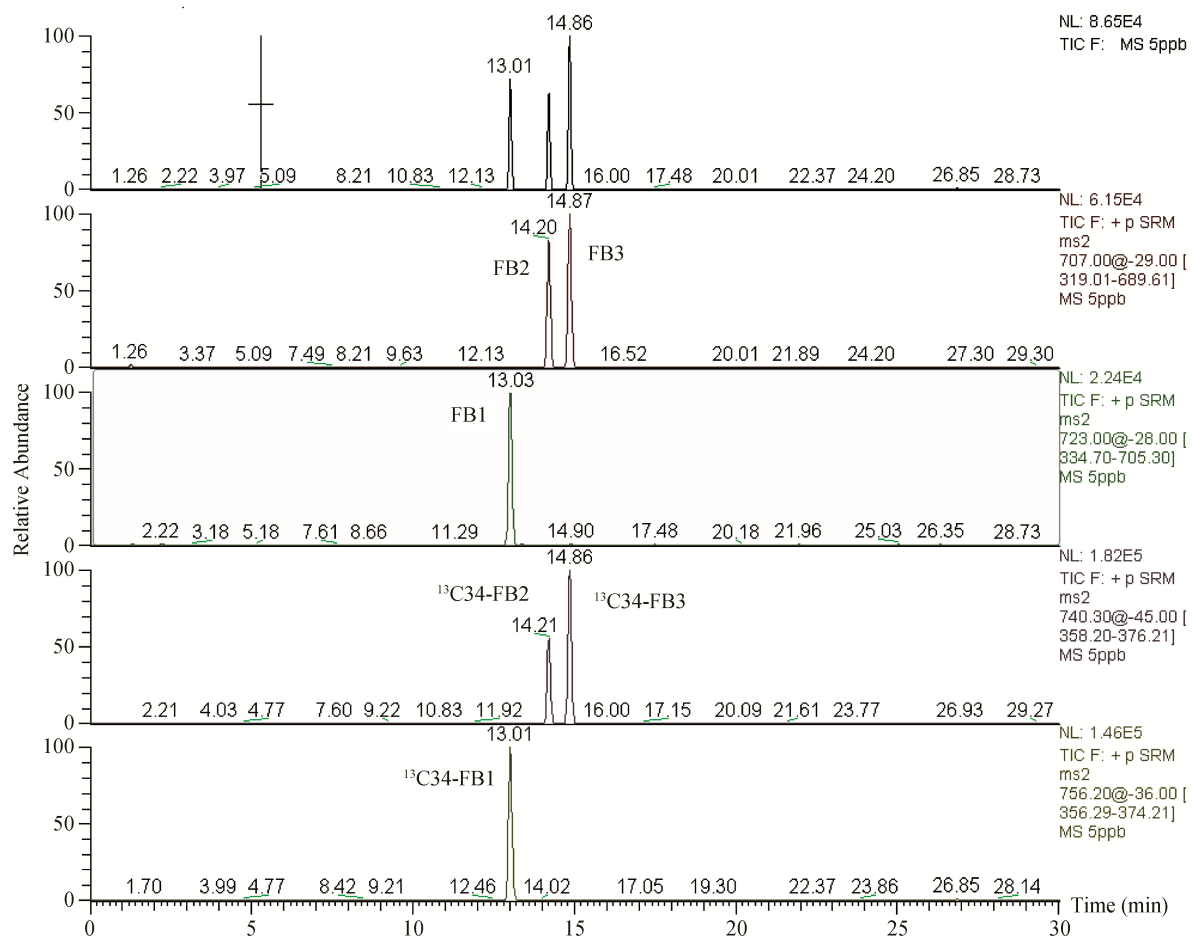


图 1 伏马菌素标准色谱图(ESI+电离模式下, 5 ng/mL)
Fig. 1 The chromatogram of fumonisins standard solution (5 ng/mL, ESI+)

表 3 线性回归方程和方法检出限, 定量限
Table 3 Equation of linear regression, limit of detection (LOD, S/N=3), limit of quantification (LOQ, S/N=10) and linearity (r^2) of fumonisins

FBs	线性回归方程	r^2	LOD($\mu\text{g/kg}$)	LOQ($\mu\text{g/kg}$)
FB ₁	$Y=0.0362X+0.1097$	0.9950	0.58	1.9
FB ₂	$Y=0.0541X+0.2096$	0.9971	0.50	1.6
FB ₃	$Y=0.0491X+0.2939$	0.9975	0.39	1.4

表 4 LC/ESI(+)-MS/MS 方法测定伏马菌素的准确度和精密度
Table 4 Accuracy and precision of the LC/ESI(+)-MS/MS method for total fumonisins

FBs	回收率 $\pm$ RSD(% , n=6)			
	2 $\mu\text{g/kg}$	10 $\mu\text{g/kg}$	100 $\mu\text{g/kg}$	500 $\mu\text{g/kg}$
FB ₁	83.3 $\pm$ 5.2	75.9 $\pm$ 4.3	104.3 $\pm$ 5.7	108.2 $\pm$ 2.1
FB ₂	81.9 $\pm$ 4.9	81.0 $\pm$ 3.1	107.5 $\pm$ 2.8	105.5 $\pm$ 2.9
FB ₃	90.5 $\pm$ 8.0	80.3 $\pm$ 9.4	104.3 $\pm$ 5.2	108.1 $\pm$ 3.3

4 结论与讨论

本研究建立的同位素稀释液相色谱-串联质谱联用法测定玉米面中 3 种伏马菌毒素, 方法简单快速, 灵敏度高, 可用于准确确证和定量, 在食品安全风险监测中发挥了重要作用。然而, 由于真菌毒素种类繁多, 目前已知的有 300 多种, 真菌毒素已经构成重要的食品安全问题。因此, 建立适合不同基质中多种真菌毒素的同时检测的方法, 迫在眉睫。

参考文献

- [1] Hartl M, Humpf HU. Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay [J]. *Food Chem Toxicol*, 2000, 38: 1097–1102.
- [2] Kwon OS, Slikker JW, Dacies DL. Biochemical and morphological effects of fumonisin B1 on primary cultures of rat cerebellum [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2000, 22: 565–572.
- [3] Gumprecht LA, Smith GW, Constable PC, *et al.* Species and organ specificity of fumonisin-induced endothelial alterations: potential role in porcine pulmonary edema [J]. *Toxicology*, 2001, 160, 1–3, 71.
- [4] Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 1626–1629.
- [5] Shephard CS, Snijman PW. Elimination and excretion of a single dose of the mycotoxin fumonisin B2 in a non-human primate [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37: 111–116.
- [6] Kedera CJ, Plattner RD, Desjardins AE. Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B1 in maize in western Kenya [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 41–44.
- [7] Omurtag GZ. Determination of fumonisin B1 and B2 in corn and corn-based products in Turkey by high-performance liquid chromatography [J]. *J Food Prot*, 2001, 64: 1072–1075.
- [8] Gutema T, Munimbazi C, Bullerman LB. Occurrence of fumonisins and moniliformin in corn and corn-based food products of U.S. origin [J]. *J Food Prot*, 2000, 63: 1732–1737.
- [9] Seo E, Yoon Y, Kim K, *et al.* Fumonisins B1 and B2 in agricultural products consumed in South Korea: an exposure assessment [J]. *J Food Prot*, 2009, 72: 436–440.
- [10] Caldas ED, Silva AC. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 7974–7980.
- [11] Visconti A, Solfrizzo M, De Girolamo A. Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2001, 84: 1828–1837.
- [12] Solfrizzo M, De Girolamo A, Gambacorta L, *et al.* Determination of fumonisins B1 and B2 in corn-based foods for infants and young children by LC with immunoaffinity column cleanup: interlaboratory validation study [J]. *J AOAC Int*, 2011, 94: 900–908.
- [13] Brera C, Debegnach F, Minardi V, *et al.* Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxin B1 in corn samples: interlaboratory study [J]. *J AOAC Int*, 2007, 90: 765–772.
- [14] Wang Y, Liu SL, Zheng H, *et al.* T-2 toxin, zearalenone and fumonisin B1 in feedstuffs from China [J]. *Food Add Contam: Part B*, 2013, 6: 116–122.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



刘印平, 硕士, 中级技师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: liuyinping0930@163.com



张永茂, 副主任技师, 主要研究方向为预防医学与食品安全检测。
E-mail: 18832185618@163.com