

超高效液相色谱-串联质谱法测定玉米油中 玉米赤霉烯酮的残留量

王 巍, 崔 勇, 张冠英, 刘思洁*
(吉林省疾病预防控制中心, 长春 130062)

摘 要: **目的** 建立玉米油中玉米赤霉烯酮检测的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)分析方法。**方法** 样品经乙腈超声提取, 经免疫亲和柱进行净化, 采用 Waters ACQUITY BEH (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) 色谱柱分离, 以 0.1% 氨水溶液和乙腈为流动相进行梯度洗脱; 质谱以负离子模式扫描和多反应监测(MRM)模式进行检测, 以内标法定量。**结果** 玉米赤霉烯酮在 2~100 μg/L 浓度范围内呈良好的线性关系, 在 5、20、80 μg/kg 3 个添加水平下, 加标回收率为 90.2%~105.1%, 相对标准偏差为 1.66%~3.50%。玉米赤霉烯酮的检出限为 1.0 μg/kg, 定量限为 3.0 μg/kg。**结论** 本方法灵敏、结果准确可靠, 适用于玉米油中玉米赤霉烯酮的检测。
关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 玉米油; 玉米赤霉烯酮

Determination of zearalenon residue in corn oil by ultra performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry

WANG Wei, CUI Yong, ZHANG Guan-Ying, LIU Si-Jie*

(Jilin Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changchun 130062, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of zearalenon in corn oil by ultra performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry(UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by ultrasonic with acetonitrile, purified with immune affinity column, separated by Waters ACQUITY BEH column (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) with the gradient elution using the mobile phase of acetonitrile and 0.1% ammonia. Negative ion mode scanning and multiple reactions monitoring (MRM) were used in MS, and internal standard method was used for quantification. **Results** Zearalenon had a good linear relationship in the range of 2~100 μg/L. The recoveries were ranged from 90.2% to 105.1% for the zearalenon residues with 3 spiked levels of 5, 20, 80 μg/kg, and the relative standard deviations (RSD) were 1.66%~3.50%. The detection limit was 1.0 μg/kg, and the limit of quantification was 3.0 μg/kg. **Conclusion** The method is accurate, sensitive and reliable, which is suitable for the determination of zearalenon residue in corn oil.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry; corn oil; zearalenon

1 引 言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是由粉红镰刀菌和

其他镰刀菌产生的具有雌激素作用的一类真菌毒素, 会引起玉米、高粱、小麦等农作物病变。动物实验表明^[1], 玉米赤霉烯酮具有生殖发育毒性和免疫毒性, 对肿瘤发生也

*通讯作者: 刘思洁, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测与风险评估的研究。E-mail: 0928lsj@163.com

*Corresponding author: LIU Si-Jie, Chief Technologist, Jilin Provincial for Disease Control and Prevention, No.3145, Jingyang Road, Luyuan District, Changchun, 130062, China. E-mail: 0928lsj@163.com

有一定联系。我国是玉米油的生产大国和消费大国,但目前我国对玉米油中玉米赤霉烯酮还没有规定限量标准^[2-4]。

目前玉米赤霉烯酮检测的方法主要有液相色谱、气相色谱和液相色谱-质谱等。而关于利用免疫亲和净化^[5-9]与超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)^[10-15]检测玉米油中玉米赤霉烯酮残留的方法,国内鲜有报道。本文尝试通过玉米赤霉烯酮免疫亲和柱净化方法对80份玉米油采用UPLC-MS/MS测定玉米赤霉烯酮的含量,实验结果证明该方法灵敏、结果准确可靠。

2 材料与方法

2.1 样 品

玉米油样品分别在吉林省食品安全风险监测点(主要是长春市农贸市场、副食品商店和超级市场)采集。

2.2 仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱联用仪(美国 Waters 公司)、CF16RN 离心机(日本日立公司);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司);

标准品:¹³C 玉米赤霉烯酮(25 μg/mL,美国 Romer 公司)、玉米赤霉烯酮(美国 Romer 公司);玉米赤霉烯酮免疫亲和柱(Clover 公司);玻璃纤维滤纸(直径 11 cm,孔径 1.5 μm,美国 Romer 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 溶液配制

称取玉米赤霉烯酮标准品 10.0 mg,用乙腈溶解并定容至 100 mL,得储备液浓度为 100 mg/L。从储备液中吸取 1.0 mL,用乙腈溶解并定容至 100 mL,得中间液浓度为 1.0 mg/L。分别吸取中间液 10.0、5.0、2.0、1.0、0.5、0.2 mL,再分别加入 40 μL ¹³C 玉米赤霉烯酮于标准系列中,用 0.1%氨水+乙腈(90:10, V/V)定容至 100 mL。

2.3.2 样品前处理

(1)样品提取

称取 25 g 样品,置于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 20 μL ¹³C 玉米赤霉烯酮 25 μg/mL,加入乙腈 100.0 mL,超声提取 5 min,滤纸过滤,移取 10.0 mL 上述滤液置于干净的容器中。用 40 mL 纯水稀释,混匀。将上步稀释液通过玻璃纤维滤纸过滤,滤液收集于注射器中。

(2)样品净化

量取 10 mL 滤液全部通过亲和柱。用 10 mL 纯水淋洗亲和柱 2 次,弃去淋洗液。加入 1.0 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液于干净的玻璃试管中,40 °C 氮气吹至近干,用 0.1%氨水+乙腈(90:10, V/V)定容至 1 mL,注入 UPLC-MS/MS 测定。

2.3.3 仪器条件

UPLC 条件:色谱柱:ACQUITY BEH(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱(美国 Waters 公司)。流动相: A.0.1%氨水,

B.乙腈;液相色谱梯度洗脱程序: 0~3.9 min, 10%~80%B; 3.9~4.0 min, 80%~10%B; 柱温: 30 °C; 流速: 0.3 mL/min。

MS 条件: 离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 负离子扫描; 多反应离子监测; 离子源温度: 110 °C; 离子喷雾电压: 2.7 kV; 脱溶剂气流量: 700 L/min; 特征离子对(锥孔电压和碰撞电压)玉米赤霉烯酮 317.3/175.2(55 V/27 V)、317.3/131.1(55 V/32 V), ¹³C 玉米赤霉烯酮 335.4/185.2(55 V/32 V)、335.4/140.2(55 V/32 V), 其中 317.3/175.2 和 335.4/185.2 为定量离子。

3 结果与分析

3.1 仪器条件的优化

根据玉米赤霉烯酮的结构特征,选择了在负离子模式下电离,形成[M-H]⁻准分子离子。同时对质谱中的毛细管电压、锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气温度和流量及碰撞能量进行了优化,使待测物有良好的信号响应,详见 2.3.3 仪器条件。

3.2 流动相的选择

流动相分别考察了 0.1%氨水-乙腈和 0.1%氨水-甲醇等流动体系,具体色谱图见图 1。通过比较发现,采用 0.1%氨水-乙腈梯度洗脱时,峰型更好,灵敏度更高。

3.3 线性范围和检出限

采用 0.1%氨水+乙腈(90:10, V/V)混合溶液配制一系列不同浓度的标准溶液进行测定,以玉米赤霉烯酮峰面积与其内标峰面积比值为纵坐标,质量浓度为横坐标绘制标准曲线,其线性范围 2~100 μg/L,相关系数 $r=0.99$ 。以 3 倍信噪比对应的空白样品添加质量浓度计算方法的检出限,以 10 倍信噪比对应的空白样品添加质量浓度计算方法的定量限,得到玉米油中玉米赤霉烯酮的检出限为 1.0 μg/kg,定量限为 3 μg/kg,标准色谱图见图 2。

3.4 精密度和回收率

在空白玉米油样品中添加 3 个不同水平的玉米赤霉烯酮标准溶液进行添加回收试验,使样品中玉米赤霉烯酮的含量为 5、20、80 μg/kg,每个添加水平平行测定 6 次,结果见表 1。玉米赤霉烯酮在 5~80 μg/kg 浓度范围内,加标回收率为 90.2%~105.1%,RSD 为 1.66%~3.50%。

3.5 样品测定

抽取长春市市售玉米油样品 80 份,按照“2.3.2”步骤制备供试品溶液,按照“2.3.3”上机测定,结果见表 2。

由表 2 可以看出,80 份玉米油样品中玉米赤霉烯酮检出率为 95%,由于我国尚未颁布玉米油中玉米赤霉烯酮限量指标,按照欧盟委员会法规(EC)No 1881/2006 对玉米油中玉米赤霉烯酮最大限量 200 μg/kg 的规定,超标率为 10%。

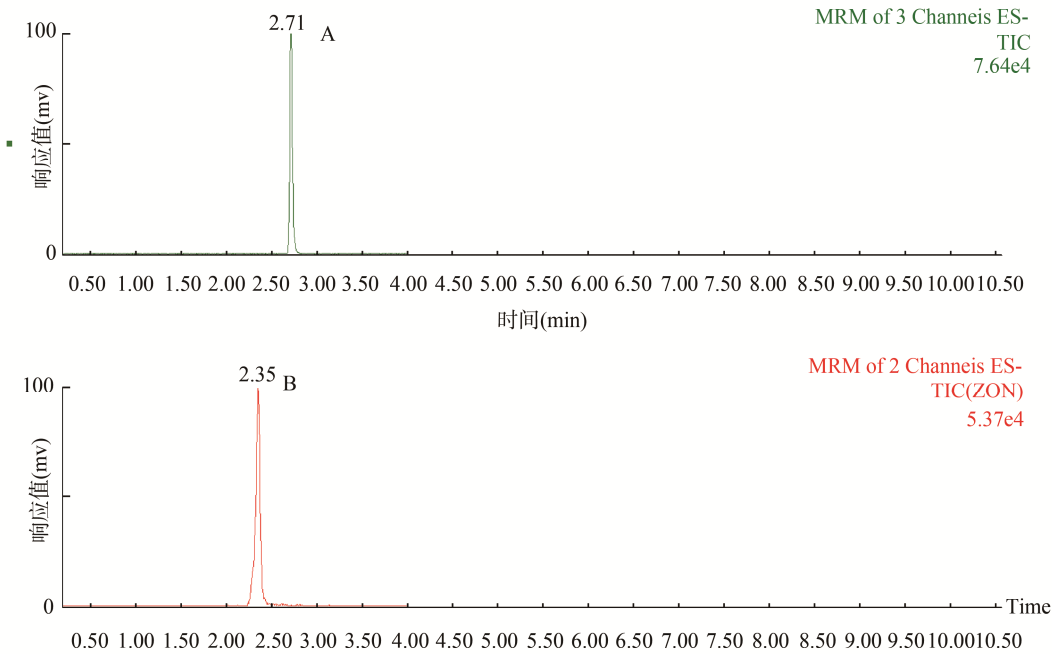


图 1 玉米赤霉烯酮标准色谱图(A: 0.1%氨水-乙腈; B: 0.1%氨水-甲醇)
Fig. 1 Chromatograms of zearalenon standard(A: 0.1%NH₃-acetonitrile; B: 0.1%NH₃-methanol)

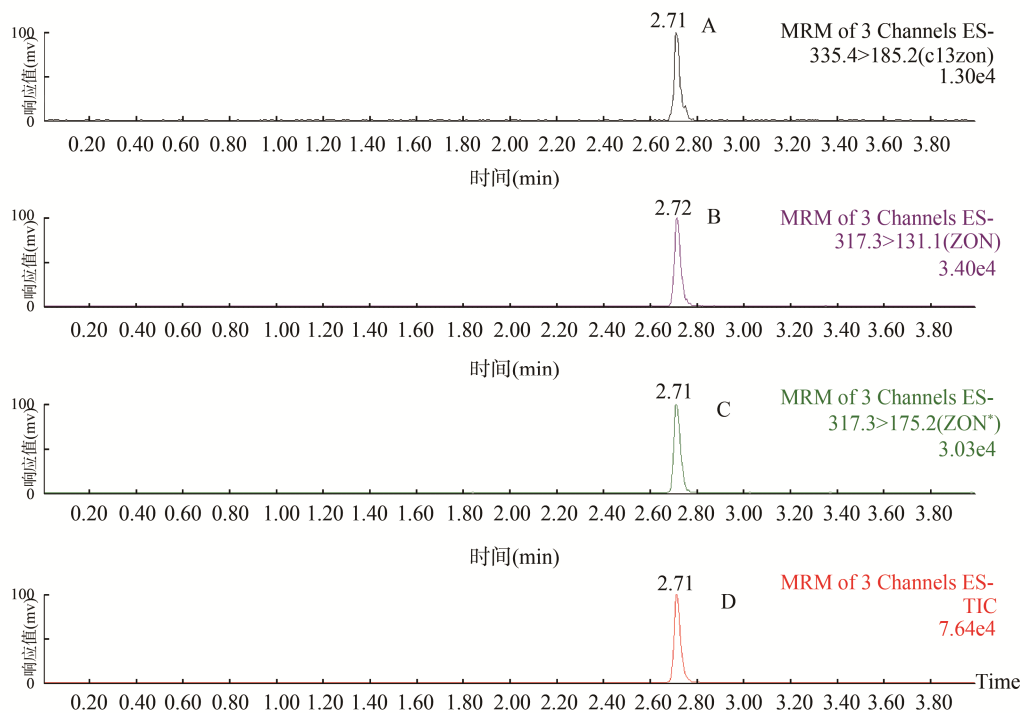


图 2 玉米赤霉烯酮标准色谱图(A: ¹³C 玉米赤霉烯酮定量离子; B: 玉米赤霉烯酮定性离子; C: 玉米赤霉烯酮定量离子; D:总离子流)
Fig. 2 Chromatograms of zearalenon standard(A: ¹³C zearalenon quantitative ion; B: zearalenon qualitative ion; C: zearalenon quantitative ion; D: TIC)

表 1 玉米赤霉烯酮的加标回收率及相对标准偏差(n=6)
Table 1 Recovery, relative standard deviation of zearalenon

项目	本底(μg /kg)	添加浓度(μg /kg)	回收率(%)	相对标准偏差 RSD(%)
玉米赤霉烯酮	0	80	96.3	1.66
		20	105.1	1.96
		5	90.2	3.50

表 2 玉米油样品中玉米赤霉烯酮的测定结果
Table 2 Results of zearalenon in corn oil samples

玉米油样序号	玉米赤霉烯酮含量(μg/kg)	玉米油样序号	玉米赤霉烯酮含量(μg /kg)
1	26.8	16	20.6
2	<1.0	17	17.2
3	<1.0	18	225.2
4	4.3	19	316.3
5	9.6	20	272.6
6	<1.0	21	117.3
7	23.8	22	625.8
8	2.6	23	163.2
9	11.5	24	341.5
10	30.6	25	272.6
11	53.6	26	249.6
12	39.6	27	153.8
13	<1.0	28	232.1
14	25.3	29	112.3
15	3.2	30	5.5

4 结 论

本文通过优化测定条件, 建立了免疫亲和柱净化, 超高效液相色谱和质谱联用测定玉米油中玉米赤霉烯酮的检测方法, 其检出限、精密度和回收率可以完全满足实际检测需要。本方法灵敏度高、定性准确, 可适用于玉米油中低浓度玉米赤霉烯酮含量的检测。通过对 80 份玉米油样品的检测, 提示玉米赤霉烯酮对玉米油的污染不容忽视, 我国应尽快颁布玉米油中玉米赤霉烯酮的限量标准。

参考文献

[1] 王怡净, 张立实. 玉米赤霉烯酮毒性研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(5): 40-43.
Wang YJ, Zhang LS. Research progress on toxicity of zearalenon [J]. Chin J Food Hyg, 2002, 14(5): 40-43.
[2] GB/T 23504-2009. 食品中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和层析净化高

效液相色谱法[S].
GB/T 23504-2009. Determination of zearalenone in food-high performance liquid chromatographic method with immunoaffinity column clean-up [S].
[3] GB/T 5009.209-2008. 谷物中玉米赤霉烯酮的测定[S].
GB/T 5009.209-2008 Determination of zearalenon in cereals [S].
[4] 吴振兴, 鲍蕾, 吕宁, 等. 植物油中多种真菌毒素的液相色谱-串联质谱检测方法建立及污染调查分析[J]. 分析测试学报, 2012, 31: 106-110.
Wu ZX, Bao L, Lv N, *et al.* Investigation and analysis of contamination and foundation of lc-ms /ms determination method of mycotoxins in vegetable oils [J]. J Instrum Anal, 2012, 31: 106-110.
[5] 申红红, 杨美华, 欧阳臻. 高效液相色谱-二极管阵列检测器同时测定中药中玉米赤霉烯酮和 α -玉米赤霉烯醇[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1261-1265.
Shen HH, Yang MH, OU YZ, *et al.* Simultaneous determination of zearalenone and α -zearalenol in traditional Chinese medicines by HPLC-DAD [J]. J Chin Med, 2012, 27(5): 1261-1265.
[6] 崔勇, 刘智, 李青, 等. 高效液相色谱法和超高效液相色谱-串联质谱法测定玉米油中玉米赤霉烯酮的比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(18): 3075-3077.
Cui Y, Liu Z, Li Q, *et al.* The comparison of HPLC and UPLC-MS/MS for the determination of zearalenon in corn oil [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(18): 3075-3077.
[7] 申红红, 仇峰, 杨美华, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定中药中的玉米赤霉烯酮和 α -玉米赤霉烯醇[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(6): 1322-1327.
Shen HH, Chou F, Yang MH, *et al.* Simultaneous determination of zearalenone and α -zearalenol in traditional Chinese medicines by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2012, 21(6): 1322-1327.
[8] GB/T 23504-2009 食品中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法 [S] .
GB/T 23504-2009 Determination of zearalenone in food-High performance liquid chromatographic method with immunoaffinity column clean-up [S].
[9] 吴振兴, 鲍蕾, 吕宁, 等. 植物油中多种真菌毒素的液相色谱-串联质谱检测方法建立及污染调查分析[J]. 分析测试学报, 2012, 31(增刊): 106-110.
Wu ZX, Bao L, Lv N, *et al.* Investigation and analysis of a variety of mycotoxins in vegetable oil by liquid chromatography tandem mass spectrometry based detection method and pollution [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(Suppl): 106-110.
[10] 于村, 韩铮, 潘红锋, 等. 采用同位素稀释法串联质谱的方法同时测定

- 玉米中的多种霉菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(5): 979-986.
- Yu C, Han ZH, Pan HF, *et al.* Simultaneous determination of various fungal toxins in maize by isotope dilution tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2009, 19(5): 979-986.
- [11] 罗松明, 肖付刚. 粮油食品中真菌毒素的 LC-MS 法检测[J]. 粮食加工, 2007, 32(3): 95-99.
- Luo SM, Xiao FG. Grain and oil food mycotoxins in LC-MS method to detect [J]. Grain Process, 2007, 32(3): 95-99.
- [12] 任丹丹, 李少晖, 谢云峰, 等. 高效液相色谱法测定原粮中玉米赤霉烯酮的改进研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1162-1166.
- Ren DD, Li SH, XIE YF, *et al.* Improvement research on determination of zearalenone in grain by high performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(4): 1162-1166.
- [13] 鲍蕾, 吕宁, 吴振兴, 等. 免疫亲和柱同时净化-HPLC 法测定植物油中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 306-309.
- Bao L, Lv N, Wu ZX, *et al.* Determination of zearalenone in edible oil by HPLC-fluorometry with immunoaffinity column clean up [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(9): 306-309.
- [14] 曾红燕, 黎源倩, 敬海泉. 高效液相色谱法测定粮食中玉米赤霉烯酮及其代谢物[J]. 分析化学, 2006, 3: 351-354.
- Zeng HY, Li YQ, Jing HQ. Determination of zearalenone and its metabolites in grains by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 3: 351-354.
- [15] 罗小虎, 包清彬, 杨潇, 等. 高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 食品科技, 2010, (1): 266-270.
- Luo XH, Bao QB, Yang X, *et al.* Determination method of zearalenone by means of high-performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2010, (1): 266-270.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



王 巍, 副主任技师, 主要研究方向为食品理化检测。

E-mail: jlcdezk@sina.com



刘思洁, 主任技师, 主要研究方向为食品安全检测与风险评估的研究。

E-mail: 0928lsj@163.com