

超高效液相色谱-串联质谱法正、负离子模式测定 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的比较研究

张剑峰, 孙艳芳*, 赵 岚, 高 飞, 李阳春, 任淑艳

(黑龙江省疾病预防控制中心, 哈尔滨 150030)

摘 要: **目的** 通过实验对超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)正离子模式和负离子模式测定脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)结果进行研究比较。**方法** 样品分别经过不同的前处理方法, 再分别用串联四级杆质谱在电喷雾正离子(ESI⁺)和负离子(ESI⁻)模式下测定 DON 含量。**结果** 正离子模式线性范围为 1~900 ng/mL, $r \geq 0.999$, 精密密度为 3.1%~4.2%, 负离子模式线性范围为 2~800 ng/mL, $r \geq 0.995$, 精密密度为 3.5%~4.8%。质控试验结果均在质控样标准值范围内。**结论** 正离子模式灵敏度更高、线性范围更宽、结果更加准确可靠。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 正离子模式; 负离子模式; 超高效液相色谱-串联质谱法

Comparative study of cation and anion ionization modes for detection of deoxynivalenol by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Jian-Feng, SUN Yan-Fang*, ZHAO Lan, GAO Fei, LI Yang-Chun, REN Shu-Yan

(Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China)

ABSTRACT: Objective To compare cation and anion ionization modes for determination of deoxynivalenol (DON) by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Method** Samples were dealt with different pretreatment methods, and DON was detected by UPLC-MS/MS through cation mode and anion mode. **Results** The linear range of cation mode was 1~900 ng/mL with $r \geq 0.999$, and accuracy were 3.1%~4.2%. The linear range of anion mode was 2~800 ng/mL with $r \geq 0.995$, and accuracy were 3.5%~4.8%. Quality control test results were within the scope of the standard values of quality control sample. **Conclusion** The cation mode is better than anion mode, which has higher sensitivity, wider linear range, and is more accurate and reliable.

KEY WORDS: deoxynivalenol; cation mode; anion mode; ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

基金项目: 黑龙江省卫生计生委科研课题(2017-529)

Fund: Supported by Scientific Research Project of Heilongjiang Provincial Health and Family Planning Commission (2017-529)

*通讯作者: 孙艳芳, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全、卫生检验。E-mail: fangzi_2011@163.com

*Corresponding author: SUN Yan-Fang, Associate Chief Technician, Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Harbin 150030, China. E-mail: fangzi_2011@163.com

1 引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivaleno, DON)又称呕吐毒素(vomitoxin),属单端孢霉烯族化合物,广泛存在于小麦、大麦和玉米等谷物之中,是污染粮食的主要真菌性毒素,也是赤霉病麦引起人、畜中毒的主要毒素,人或者家畜误食后,除引起呕吐、腹泻、发烧甚至死亡等急性中毒症状外,还可导致食管癌、贫血、克山病等疾病^[1]。DON 的污染非常广泛,世界各地许多国家都有报道^[2-5],其分子式为 $C_{15}H_{20}O_6$,分子量 296.3,结构见图 1^[6]。我国国家标准 GB 2761-2017 中规定食品中 DON 限量指标为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。目前 DON 的检测方法有酶联免疫法、高效液相色谱法、气相色谱法、薄层色谱法、纳米均相时间分辨荧光免疫法、液相色谱-串联质谱法^[8-15]等,其中酶联免疫法和薄层色谱法使用较普遍,操作简单,但只能测定一种或一类,不能做到准确定量测定,只能用于快速筛查检测,液相色谱法干扰大,灵敏度不高^[1]。

本文使用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测 DON 的含量,通过对样品的前处理方法进行不同的摸索研究,最终找出最优的样品前处理方案,并比较了电喷雾正离子模式和负离子模式对检测 DON 的差异以及各自的优缺点,对流动相的选择和比例进行最优化调试,以期对 DON 的检测找到最合适的检测方法。

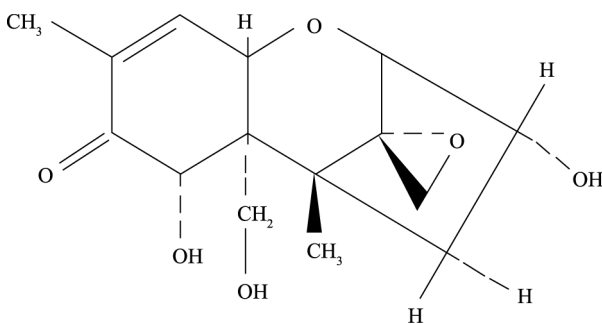


图1 DON 结构图

Fig. 1 Structure diagram of DON

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

标准溶液:脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)(100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、同位素内标 ^{13}C -脱氧雪腐镰刀菌烯醇($^{13}\text{C}_{15}$ -DON, 25.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)(美国 ROMER 公司);乙腈(色谱纯,美国 Merck 公司);甲酸、乙酸铵(色谱纯,迪玛公司);超纯水(美国 Merck 公司)。

2.2 试验设备

Waters 超高效液相色谱串联质谱联用仪(包括 Waters ACQUITY UPLC、Waters Xevo TQD, 美国 Waters 公司); HS501D 型振荡混匀器(德国 IKA 公司); COIAC 5004 型 DON 免疫亲和柱(奥地利 ROMER 公司)。

2.3 试验方法

2.3.1 色谱条件

正离子模式:色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm);柱温:38 $^{\circ}\text{C}$;样品室温度:12 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:8 μL ;流速:0.45 mL/min;流动相 A:0.1%甲酸溶液;流动相 B:乙腈;流动相梯度见表 1。

负离子模式:色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm);柱温:38 $^{\circ}\text{C}$;样品室温度:12 $^{\circ}\text{C}$;进样体积:8 μL ;流速:0.40 mL/min;流动相 A:水,流动相 B:乙腈,流动相梯度见表 2。

表 1 正离子模式液相分离梯度条件

Table 1 Gradient condition of the liquid phase separation by cation mode

时间(min)	A(%)	B(%)
0.00	92	8
1.00	92	8
2.00	20	80
3.00	20	80
4.00	10	90
5.00	92	8

表 2 负离子模式液相分离梯度条件

Table 2 Gradient condition of the liquid phase separation by anion mode

时间(min)	A(%)	B(%)
0.00	92	8
1.00	92	8
2.00	70	30
3.00	70	30
4.00	10	90
5.00	92	8

2.3.2 质谱条件

正离子模式:离子源 ESI⁺;毛细管电压:2.9 kV;离子源温度:150 $^{\circ}\text{C}$;锥孔反吹气流量:50 L/h;脱溶剂气温度:460 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂气流量:800 L/h;质量分析器低质量分辨率

1: 12.0; 高质量分辨率 1: 14.7; 离子能量 1: 0.0; 低质量分辨率 2: 10.5; 高质量分辨率 2: 15.0; 离子能量 2: 0.4。

负离子模式: 离子源 ESI; 毛细管电压: 2.35 kV; 离子源温度: 150 °C; 锥孔反吹气流量: 50 L/h; 脱溶剂气温度: 360 °C; 脱溶剂气流量: 660 L/h; 质量分析器低质量分辨率 1: 11.0; 高质量分辨率 1: 15.0; 离子能量 1: 0.5; 低质量分辨率 2: 9.6; 高质量分辨率 2: 14.9; 离子能量 2: 1.0。

2.3.3 样品前处理

称取 5 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 水, 混匀, 浸泡 60 min, 振荡萃取 60 min, 静置分层, 10000 r/min 离心 10 min, 上清液过玻璃纤维滤纸, 取续滤液 1.00 mL 过 DON 免疫亲和柱, 用 3×0.5 mL 甲醇洗脱, 洗脱液在 50 °C 下用氮气吹干, 正离子模式加 DON 正离子模式同位素内标使用液 100 μL 和乙腈-0.1%甲酸溶液(5:95, V:V)900 μL, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定。负离子模式加 DON 负离子模式同位素内标使用液 100 μL 和乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液(20:80, V:V)900 μL, 涡旋混匀, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定。

2.3.4 标准曲线的配制

DON(ESI⁺)标准使用液(1000 ng/mL): 吸取 DON 标准储备溶液 100 μL, 用水稀释并定容至 10 mL。DON(ESI⁺)同位素内标使用液(254 ng/mL): 吸取同位素内标标准溶液 50 μL, 用水稀释并定容至 5 mL。

DON(ESI⁻)标准使用液(1000 ng/mL): 吸取 DON 标准溶液 100 μL, 用水定容至 10 mL。DON(ESI⁻)同位素内标使用液(254 ng/mL): 吸取同位素内标标准溶液 50 μL, 用水稀释并定容至 5 mL。

正离子模式: 分别吸取 1000 ng/mL 的标准使用液 1、10、100、300、600、900 μL, 加 100 μL DON(ESI⁺)同位素内标使用液, 用水定容至 1 mL, 标液浓度为 1、10、100、300、600、900 ng/mL, 均含 25.4 ng/mL 的内标。

负离子模式: 分别吸取 1000 ng/mL 的标准工作液 2、20、200、400、800 μL, 加 100 μL DON(ESI⁻)同位素内标使用液, 用水定容至 1 mL, 标液浓度为 2、20、200、400、800 ng/mL, 均含 25.4 ng/mL 的内标。

3 结果与讨论

3.1 方法的优化

3.1.1 流动相的选择

文献显示 DON 正离子模式用乙腈-0.1%甲酸溶液做流动相^[16], 负离子模式用水和乙腈作流动相^[17], 使用同一根色谱柱, 均能得到较好的峰型和分离, 对梯度洗脱条件进行优化, 见表 1 和表 2, 获得本次实验理想的 DON 的色谱峰, 如图 2 和图 3 所示。

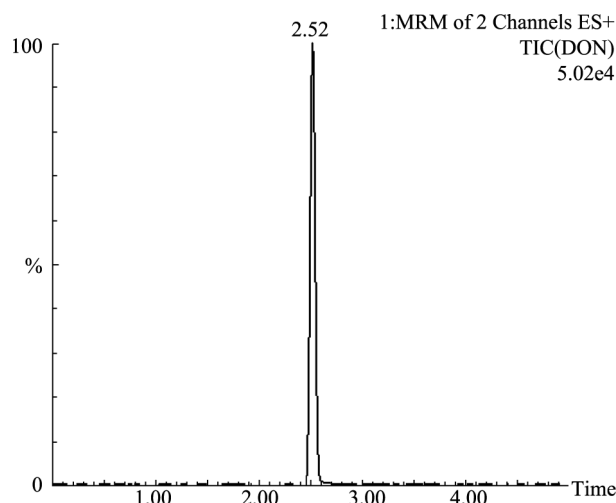


图 2 正离子模式 DON 标准谱图

Fig. 2 Standard spectrum of DON by cation mode

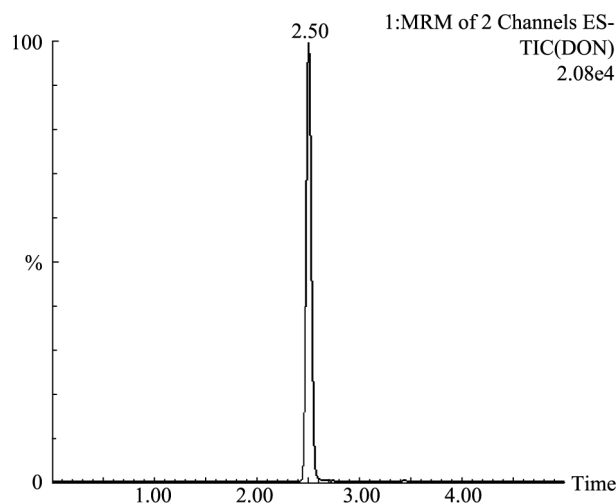


图 3 负离子模式 DON 标准谱图

Fig. 3 Standard spectrum of DON by anion mode

3.1.2 质谱条件的优化

分别在正离子模式和负离子模式下逐一对 DON 和 ¹³C₁₅-DON 进行质谱调谐并进行条件优化, 可使 DON 和 ¹³C₁₅-DON 的总离子流及定量和定性离子的能量达到最高。具体条件详见表 3 和表 4。

3.2 方法学论证

3.2.1 标准曲线的制作

正离子模式: 在正离子模式下对标准序列分别进样, 用内标法作校正曲线, 回归方程为 $Y=0.0373744X-0.0467061$, 线性相关系数为 0.9997。

负离子模式: 在负离子模式下对标准序列分别进样, 用内标法作校正曲线, 回归方程为 $Y=0.907374X+25.2369$, 线性相关系数为 0.998。

表3 正离子模式 DON 和 $^{13}\text{C}_{15}$ -DON 质谱参数
Table 3 DON and $^{13}\text{C}_{15}$ -DON mass spectrometric parameters by cation mode

化合物	母离子(m/z)	锥孔电压(V)	子离子(m/z)	碰撞能量(V)
DON	297.0319	32	249.0168*	10
			203.0266	16
$^{13}\text{C}_{15}$ -DON	312.0952	31	263.1225	12

注: *为定量离子

表4 负离子模式 DON 和 $^{13}\text{C}_{15}$ -DON 质谱参数
Table 4 DON and $^{13}\text{C}_{15}$ -DON mass spectrometric parameters by anion mode

化合物	母离子(m/z)	锥孔电压(V)	子离子(m/z)	碰撞能量(V)
DON	295.0960	32	265.1625*	10
			138.1054	16
$^{13}\text{C}_{15}$ -DON	310.0000	26	261.0000	16

注: *为定量离子

3.2.2 线性范围及检出限

对 DON 标准系列溶液分别进行正离子模式和负离子模式测定, 正离子模式在 1~900 ng/mL 范围内具有良好的线性关系, 以 3 倍信噪比计, 检出限为 0.2 ng/mL, 负离子模式在 2~800 ng/mL 范围内具有良好的线性关系, 以 3 倍信噪比计, 检出限为 0.5 ng/mL。

3.2.3 精密度试验

分别在正、负离子模式下取 DON 标准工作溶液, 分别进样 8 μL , 作 6 次重复试验, 取平均值进行计算。结果见表 5。正负离子的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)分别为 3.1%~4.2%和 3.5%~4.8%。

表5 正、负离子模式精密度试验对比结果($n=6$)
Table 5 Accuracy tests comparison of cation mode and anion mode ($n=6$)

模式	50 ng/mL		500 ng/mL	
	峰面积	RSD(%)	峰面积	RSD(%)
正离子模式	194	4.2	2085	3.1
负离子模式	127	4.8	1353	3.5

3.3 质控试验

称取 6 份质控样品, 每份 5.00 g, 3 份按正离子模式实验方法处理, 3 份按负离子模式实验方法处理, 分别进样 8 μL 。结果见表 6。

表6 DON 正、负离子模式质控结果比较
Table 6 Quality control comparison of cation mode and anion mode of detection of DON

模式	检测结果平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	质控样标准值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
正离子模式	1275	1431 \pm 256
负离子模式	1235	

4 结论

本文在参考文献方法的基础上对食品中 DON 测定方法进行优化, 比较了 DON 的 UPLC-MS/MS 的正、负离子模式。通过结果比对发现 DON 的 UPLC-MS/MS 的正、负离子模式检测效果都比较好, 用户可在实际操作中根据自身的实验室条件进行选择, 但正离子模式的线性范围更宽、灵敏度更高、检出限更低。

参考文献

- [1] 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.
Li RY, Liu HH, Kang L. Determination of six deoxynivalenols in grain by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2014, 33(6): 660-665.
- [2] Mudili V, Siddai CN, Nagesh M, *et al.* Mould incidence and mycotoxin contamination in freshly harvested maize kernels originated from India [J]. J Sci Food Agric, 2014, 94(13): 2674-2683.
- [3] Nordkvist E, Hggblom P. Fusarium mycotoxin contamination of cereals and bedding straw at Swedish pig farms [J]. Anim Feed Sci Technol, 2014, 198: 231-237.
- [4] Brera C, Bertazzoni V, Debegnach F, *et al.* Exposure assessment for Italian population groups to deoxynivalenol deriving from pasta consumption [J]. Toxins, 2013, 5(12): 2293-2309.
- [5] Kimanya ME, Shirima CP, Magoha H. Co-exposures of aflatoxins with deoxynivalenol and fumonisins from maize based complementary foods in Rombo, Northern Tanzania [J]. Food Control, 2014, 41(2): 76-81.
- [6] 吴永宁. 现代食品安全科学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
Wu YN. Modern food safety science [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003.
- [7] GB 2761-2017 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量 [S].
GB 2761-2017 Mycotoxins limit quantity from the national food safety standard [S].

- [8] 李华, 祭芳, 徐剑宏, 等. 赤霉毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)酶联免疫检测方法研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(4): 721-726.
Li H, Ji F, Xu JH, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent-assay for deoxynivalenol(DON) [J]. *Sci Agric Sin*, 2007, 40(4): 721-726.
- [9] 郭健, 王郑平, 曹阳, 等. 高效液相色谱法测定粮食中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. 粮食与食品工业, 2014, 21(6): 87-89.
Guo J, Wang ZP, Cao Y, *et al.* Study on rapid determination of deoxynivalenol in grain by UPLC [J]. *Cere Food Ind*, 2014, 21(6): 87-89.
- [10] 莫晓嵩, 黄伟. 高效液相色谱法测定小麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. 现代面粉工业, 2011, 25(1): 27-29.
Mo XS, Huang W. Determination deoxynivalenol in wheat by high performance liquid chromatography (HPLC) [J]. *Mod Flour Milling Ind*, 2011, 25(1): 27-29.
- [11] 魏润蕴, 王竹天. 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇的气相色谱测定[J]. 卫生研究, 1996(4): 242-245.
Wei RY, Wang ZT. Determination of deoxynivalenol and nivalenol in wheat by gas chromatography [J]. *J Hyg Res*, 1996(4): 242-245.
- [12] 唐吉旺, 周丛, 林源, 等. 毛细管柱-气相色谱法测定谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇含量[J]. 理化检验: 化学分册, 2012, 48(12): 1441-1443.
Tang JW, Zhou C, Lin Y, *et al.* Determination of deoxynivalenol and nivalenol in cereals by capillary column-gas chromatography [J]. *Phys Test Chem Anal Part B-Chem Anal*, 2012, 48(12): 1441-1443.
- [13] 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(1): 19-22.
Wei RY, Li WY. TLC-optical density methods was used to detect NIV and DON in wheat [J]. *Chin J Food Hyg*, 1994(1): 19-22.
- [14] 周彬, 高雷, 金坚, 等. 纳米均相时间分辨荧光免疫法检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇方法的建立[J]. 食品工业科技, 2010, 31(8): 338-342.
Zhou B, Gao L, Jin J, *et al.* Quantitative determination of deoxynivalenol by light initiated chemiluminescence assay [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010, 31(8): 338-342.
- [15] 高蓓, 姜德铭, 杨永坛. 同位素内标-液相色谱-串联质谱法同时测定粮食及其制品中的 5 种真菌毒素[J]. 色谱, 2017, 35(6): 601-607.
Gao B, Jiang DM, Yang YT. Simultaneous determination of five mycotoxins in various grains and their products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope internal standard [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(6): 601-607.
- [16] 国家食品安全风险评估中心. 2016 年国家食品污染和有害因素风险工作手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
China National Center for Food Safety Risk Assessment. Working manual of national food pollution and hazardous factors risk in 2016 [M]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [17] 张剑峰, 孙艳芳, 李健平, 等. 超高效液相色谱-质谱联用法同时测定食品中的 B 类单端孢霉族类真菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014(13): 1856-1858.
Zhang JF, Sun YF, Li JP, *et al.* Detection of type B trichothecene mycotoxins in food by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014(13): 1856-1858.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



张剑峰, 硕士, 主任技师, 主要研究方向为食品安全、卫生检验。

E-mail: 13069887711@163.com



孙艳芳, 副主任技师, 主要研究方向为食品安全, 卫生检验。

E-mail: fangzi_2011@163.com