

超高效液相色谱-串联质谱法快速测定稻谷和玉米中伏马毒素

肖永华*, 黄常刚, 革丽亚, 李静娜, 梁高道

(武汉市疾病预防控制中心, 武汉 430022)

摘 要: 目的 建立同位素稀释-超高效液相色谱串联质谱法测定稻谷和玉米中伏马毒素(fumonisin, FB)。
方法 样品加入同位素内标后用 50%乙腈水溶液(含 1%甲酸)提取, 采用 ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱分离, 以甲醇-0.1%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 质谱采用电喷雾电离, 负离子模式下, 以多反应监测模式检测, 采用内标法定量。**结果** FB₁、FB₂ 和 FB₃ 在 0.5~100.0 µg/L 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.995, 检出限均为 1.0 µg/kg。在 5.0、50.0、500.0 µg/kg 3 个加标浓度水平下, FB₁、FB₂ 和 FB₃ 的回收率为 82.5%~107.1%, RSDs 为 3.9%~6.2%(n=5)。**结论** 该方法简单快速, 定性定量准确, 有效降低了背景干扰, 可用于粮食中伏马毒素的检测。

关键词: 同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法; 稻谷; 玉米; 伏马毒素。

Rapid determination of fumonisins in paddy and maize by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIAO Yong-Hua*, HUANG Chang-Gang, GE Li-Ya, LI Jing-Na, LIANG Gao-Dao

(Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of fumonisins in rice and corn by isotopic dilution-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted with 50% acetonitrile aqueous solution (containing 1% formic acid) after adding isotope internal standard. The samples were separated by ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ chromatographic column. Methanol-0.1% formic acid aqueous solution was used as mobile phase, gradient elution was performed, electrospray ionization was used for mass spectrometry, and multiple reaction monitoring mode was used for detection under negative ion mode, and internal standard method was used for quantification. **Results** The linear relationship of FB₁, FB₂ and FB₃ were good in the range of 0.5–100.0 g/L, the correlation coefficient was greater than 0.995, and the limit of detection was 1.0 g/kg. The recoveries of FB₁, FB₂ and FB₃ were 82.5%–107.1%, and RSDs were 3.9%–6.2% at 5.0, 50.0 and 500.0 g/kg standard concentrations (n=5). **Conclusion** This method is simple and fast, accurate in qualitative and

基金项目: 武汉市卫健委项目(WG19C07)、武汉市卫计委项目(WG17B03)

Fund: Supported by Wuhan Health Commission Project (WG19C07), and Wuhan Municipal Commission of Health and Family Planning Project (WG17B03)

*通讯作者: 肖永华, 主管技师, 主要研究方向为食品安全。E-mail: xyh_28@163.com

*Corresponding author: XIAO Yong-Hua, Supervising Technician, Wuhan Center for Disease Control and Prevention, Wuhan 430022, China. E-mail: xyh_28@163.com

quantitative analysis, and can effectively reduce background interference. It can be used to detect fumonisins in grain.

KEY WORDS: isotope dilution-ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; paddy; maize; fumonisins

1 引言

伏马毒素(fumonisin, FB)是由串珠镰刀菌和多育镰刀菌等真菌产生的一组水溶性代谢产物, Gelderblom 等^[1]于 1988 年首次在串珠镰刀菌中分离出伏马毒素, 迄今为止, 已发现的伏马毒素多达 10 余种, 其中 FB₁ 为主要成分, 占比达到 70%~80%, 且毒性最强^[2]。伏马毒素广泛存在于世界各地的玉米^[3-5]、小麦、稻谷^[6]等农作物中, 在加工过程中^[4]、仓库、销售市场^[7], 农作物均会被伏马毒素污染, 其中检出最多的 FB 为 FB₁、FB₂、FB₃, 伏马毒素(FB₁、FB₂、FB₃)的结构式见图 1, R₁、R₂ 在 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 结构式中分别为 OH、H、OH 和 OH、OH、H。动物实验表明, 伏马毒素能抑制小鼠肠神经系统的发育^[8], 引起马脑软化症^[9], FB₁ 与小孩的生长发育缺陷具有相关性^[10], 同时, 伏马毒素会对人和动物产生肝毒性、肾毒性以及致癌性等慢性毒性, 世界卫生组织国际癌症研究机构已将伏马毒素 FB₁ 和伏马毒素 FB₂ 列为 2B 类致癌物。

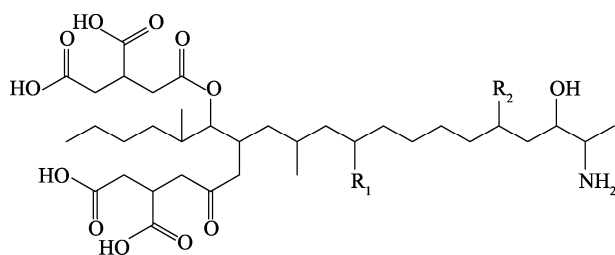


图 1 伏马毒素(FB₁、FB₂、FB₃)结构式

Fig.1 Structural formula of FB₁, FB₂ and FB₃

检测伏马毒素的手段较多, 如 Munawar 等^[11]利用纳米聚合物材料的分子印迹技术分析了玉米中的 FB₁, Silva 等^[12]、钱鸣蓉等^[13]分别采用超高效液相色谱-飞行时间质谱法和高效液相色谱-串联质谱法检测了牛奶中 FB₁ 和 FB₂, 张淑琼^[14]、陈宁周等^[15]分别用高效液相色谱-串联质谱法测定了腐乳及粮食类食品中的真菌毒素。前处理手段主要利用固相分散技术提取^[12], MAX 固相萃取小柱净化技术^[13]等。采用液质联用技术在正离子模式下检测伏马毒素时, 但背景干扰严重, 本研究采用同位素稀释-超高效液相色谱串联质谱法在电喷雾负离子模式下测定玉米和稻谷中的 FB₁、FB₂ 和 FB₃, 以期作为粮食中真菌毒素的检测手段, 为相关检测机

构提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Xevo-TQS 超高效液相色谱-串联质谱仪(配备 ESI 源以及 Masslynx4.1 数据处理系统, 美国 Waters 公司); Z446k 低温冷冻高速离心机(德国 HERMLE 公司); VORTEX3 涡旋振荡器(德国 IKA 公司); Multi Reax 振荡器(德国 Heidolph 公司); BJ-150 拜杰多功能粉碎机(德清拜杰电器有限公司)。

标准溶液 FB₁、FB₂、FB₃、¹³C₃₄FB₁、¹³C₃₄FB₂、¹³C₃₄FB₃(美国 ROMER 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 甲酸(色谱纯, 美国 ROE Scientific 公司); 实验用水为 Milli-Q 纯水机(美国, MILLIPORE 公司)。

2.2 样品处理

将稻谷以及玉米用粉碎机粉碎, 准确称取 2.00 g(精确到 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中, 加入 100 μL 1.00 μg/mL 伏马毒素同位素内标混合溶液, 再加入 10.0 mL 50%乙腈水溶液(含 1%甲酸), 涡旋混匀, 将离心管置于振荡器上振荡提取 30 min, 10000 r/min 低温(4 °C)离心 10 min, 取上清液过 0.45 μm 聚四氟乙烯滤膜后待测。

2.3 标准溶液配制

分别将 FB₁、FB₂、FB₃ 用乙腈配制成浓度均为 1.00 μg/mL 的混合标准溶液, 将 ¹³C₃₄-FB₁、¹³C₃₄-FB₂、¹³C₃₄-FB₃ 用乙腈配制成浓度均为 1.00 μg/mL 的同位素内标混合溶液, 所有标准溶液均-18 °C 避光保存。

2.4 色谱及质谱条件

色谱条件: 色谱柱: ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相: A 为 0.1%甲酸水溶液, B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~2 min 50% B, 2~6 min B 升至 90%, 6~7 min B 保持为 90%, 7~7.5 min B 降至 50%; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 1 μL。

质谱条件: 电离喷雾离子源(ESI); 负离子扫描模式; 毛细管电压: -2.0 kV; 离子源温度: 150 °C; 脱溶剂气温度: 600 °C; 脱溶剂气流速: 1000 L/Hr; 采用质谱直接进样的方式优化伏马毒素的质谱参数, FB₁、FB₂ 和 FB₃ 的质谱条件

参数详见表 1。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的选择

伏马毒素是一类由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的结构类似的双酯型水溶性代谢产物, 易溶于甲醇、乙腈、水等极性溶剂, 本实验比较了 20%乙腈水、50%乙腈水、70%乙腈水、20%乙腈水(含 1%甲酸)、50%乙腈水(含 1%甲酸)、70%乙腈水(含 1%甲酸)、纯乙腈 7 种溶剂的提取效果(图 2), 结果显示在纯乙腈作为提取溶剂时, 伏马毒素均不能被提取, 50%乙腈水(含 1%甲酸)的提取效果最好提取效果详见表 2。因此本研究选择以 50%乙腈水(含 1%甲酸)溶液作为提取溶剂。

3.2 色谱条件的选择

FB₂ 和 FB₃ 为同分异构体, 质谱参数相同, 因而需通过色谱柱有效分离才能对 FB₂ 和 FB₃ 进行定量计算, 同时也可利用保留时间进行定性分析, 本实验比较了甲醇+水、

甲醇+5 mmol/L 乙酸铵溶液、甲醇+0.1%甲酸水溶液、甲醇+5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1 甲酸)4 种流动相体系, 在甲醇+水以及甲醇+乙酸铵流动相体系中, 伏马毒素均无响应, 以甲醇+0.1%甲酸水作为流动相时伏马毒素的响应值较甲醇+5 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1%甲酸)要高, 在梯度洗脱程序下 FB₂ 和 FB₃ 有效的基线分离, 不影响彼此的定量计算, 因而本实验选择甲醇+0.1%甲酸水作为流动相, FB₁、FB₂、FB₃ 的 MRM 总离子流图详见图 3。

3.3 质谱条件的选择

伏马毒素分子结构上既含有氨基, 也含有羧基, 在 ESI 源正离子模式和负离子模式下均有响应, 其在正离子模式下的响应值要高于负离子模式, 但由于在 ESI 正离子模式下伏马毒素的背景干扰较大, 影响低浓度的伏马毒素的定性定量分析, 而在负离子模式下伏马毒素的背景干扰明显降低, 信噪比高, 本实验选择在负离子模式下检测 FB₁、FB₂、FB₃, 伏马毒素在正离子模式和负离子模式下空白样品 MRM 总离子流图见图 3。

表 1 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 的质谱参数
Table 1 Mass spectrum parameters of FB₁, FB₂ and FB₃

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
FB ₁	720.6	157.0	0.1	30	35
		562.5			28
¹³ C ₃₄ -FB ₁	754.7	163.0	0.1	30	35
FB ₂	704.6	157.0	0.1	30	35
		546.5			25
¹³ C ₃₄ -FB ₂	738.7	163.0	0.1	30	35
FB ₃	704.7	157.0	0.1	30	35
		546.5			25
¹³ C ₃₄ -FB ₃	738.7	163.0	0.1	30	35

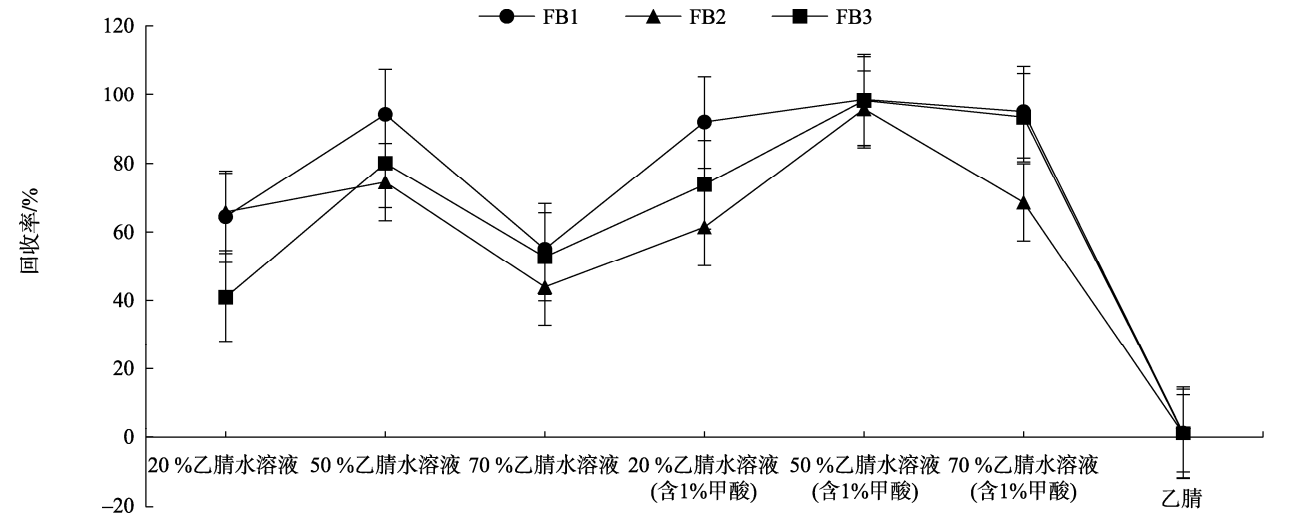


图 2 不同溶剂对伏马毒素的提取效果(n=5)
Fig.2 Extraction efficiency of different solvent (n=5)

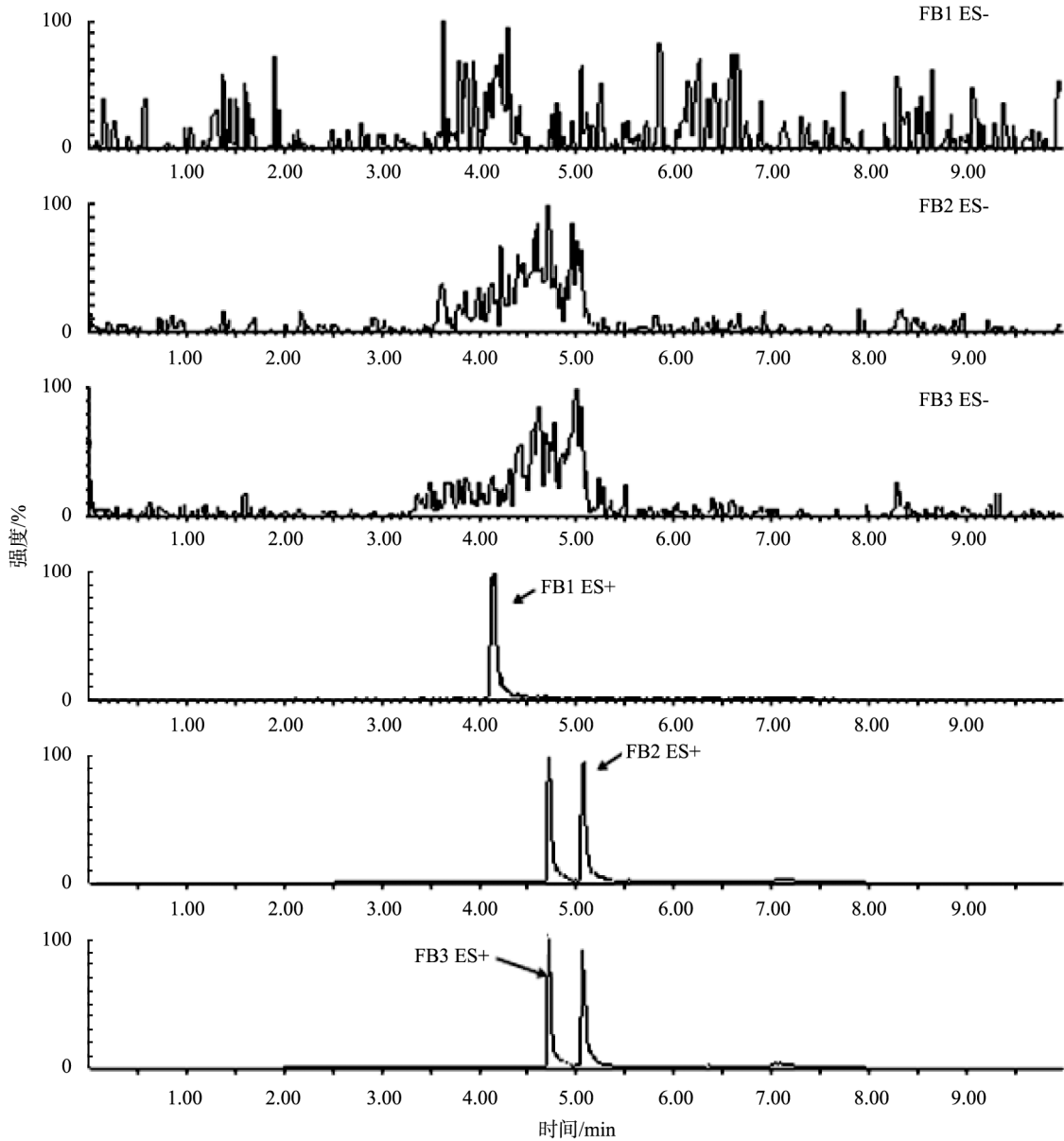


图 3 空白样品在 ESI+和 ESI-模式下 FB1、FB2、FB3 的 TIC 图
Fig.3 Background interference of FB1, FB2 and FB3 in different ESI model

3.4 基质效应

分别用流动相和玉米、稻谷的空白样品提取液配制标准溶液,比较伏马毒素在不同溶剂质地的基质效应,分析结果显示伏马毒素在小麦、玉米和稻谷提取液中均为弱基质效应,同时,本研究进样量为 1 μL,采用同位素稀释的方法能很好地消除伏马毒素基质效应的影响。

3.5 线性范围和检出限

用流动相将 FB₁、FB₂ 和 FB₃ 配制浓度均为 0.5、1.0、10.0、50.0、100.0 μg/L 的标准系列溶液,标准系列溶液中同位素内标 ¹³C₃₄-FB₁、¹³C₃₄-FB₂、¹³C₃₄-FB₃ 的浓度均为

10.0 ng/mL;以空白样品加标实验的 3 倍信噪比(S/N)为方法的检出限;FB₁、FB₂、FB₃ 的线性回归方程、相关系数及检出限详见表 2。

3.6 回收率及精密度

分别用空白样品添加 3 个不同水平伏马毒素的混合标准溶液以及同位素内标混合溶液,按照样品处理方法进行处理平行测定 5 次,计算不同添加水平的回收率以及精密度,结果详见表 2。在 5.0、50.0、500.0 μg/kg 3 个加标浓度水平下,FB₁、FB₂ 和 FB₃ 的回收率为 82.5%~107.1%,RSDs 为 3.9%~6.2%(n=5)。

表 2 方法线性方程、检出限及回收率($n=5$)
Table 2 Linear equation, LOD and recoveries ($n=5$)

化合物	线性方程	相关系数(r)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	本底值 ($\mu\text{g/kg}$)	加标量/($\mu\text{g/kg}$)	检测值/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	RSD/%
FB ₁	$Y=0.6151X+0.0030$	0.9998	1.0	284.1	5, 50, 500	289.2, 331.0, 819.6	93.8~107.1	4.4~5.2
FB ₂	$Y=0.6642X+0.0147$	0.9997	1.0	43.2	5, 50, 500	47.3, 92.2, 560.7	82.5~103.5	4.8~6.2
FB ₃	$Y=0.5934X-0.0242$	0.9989	1.0	53.4	5, 50, 500	57.7, 100.9, 552.4	85.2~99.8	3.9~5.9

3.7 实际样品测定

应用上述方法对 45 件稻谷和 11 件玉米制品中的伏马毒素进行检测, 稻谷中 FB₁、FB₂、FB₃ 的检出率分别为 35.6%、31.1%、2.22%; 玉米制品中 FB₁、FB₂、FB₃ 的检出率分别为 90.9%、81.8%、54.5%。

4 结 论

采用同位素稀释-超高效液相色谱串联质谱法, 在电喷雾负离子模式下可以快速测定玉米和稻谷中伏马毒素, 该方法简单、快速、定性定量准确, 有效降低了背景干扰, 可作为粮食中伏马毒素的检测手段。

参考文献

[1] Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, *et al.* Fumonisin—novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by fusarium moniliforme [J]. Appl Environ, 1988, 54(7): 1806–1811.

[2] 张凡, 姜琳, 李芳芳, 等. 伏马菌素毒性及其毒性机制研究进展[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(10): 617–622.

Zhang F, Jiang L, Li FF, *et al.* Research progress on toxicity and its mechanisms of fumonisin [J]. Chin J Phar, 2018, 15(10): 617–622.

[3] Susca A, Moretti A, Stea G, *et al.* Comparison of species composition and fumonisin production in aspergillus section Nigri populations in maize kernels from USA and Italy [J]. Int J F Microbiol, 2014, 188: 75–82.

[4] Castells M, Marín S, Sanchis V, *et al.* Distribution of fumonisins and aflatoxins in corn fractions during industrial cornflake processing [J]. Int J F Microbiol, 2008, 123(1): 81–87.

[5] Martins HM, Almeida I, Marques MF, *et al.* Fumonisin and deoxynivalenol in corn-based food products in Portugal [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(7): 2258–2585.

[6] Cendoya E, Maria PM, Palacios SA, *et al.* Fumonisin occurrence in naturally contaminated wheat grain harvested in Argentina [J]. Food Control, 2014, 37: 56–61.

[7] Wang JS, Ying Z, Liu WB, *et al.* Fumonisin level in corn-based food and feed from Linxian County, a high-risk area for esophageal cancer in china [J]. Food Chem, 2008, 106(1): 241–246.

[8] Fernando CS, Christiano RS, Sandra SSA, *et al.* Effect of fumonisin-containing diet on the myenteric plexus of the jejunum in rats

[J]. Autonomic Neurosci, 2014, 185: 93–99.

[9] Michael FD. Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects [J]. Pharm Ther, 1996, 70(2): 137–161.

[10] Chen C, Mitchell NJ, Gratz J, *et al.* Exposure to aflatoxin and fumonisin in children at risk for growth impairment in rural Tanzania [J]. Environ Int, 2018, 115: 29–37.

[11] Munawar H, Safaryan AM, Girolamo AD, *et al.* Determination of fumonisin B₁ in maize using molecularly imprinted polymer nanoparticles-based assay [J]. Food Chem, 2019, 298: 125044.

[12] Silva AS, Brites C, Pouca AV, *et al.* UHPLC–ToF–MS method for determination of multi-mycotoxins in maize: Development and validation [J]. Current Res Food Sci, 2019, 1: 1–7.

[13] 钱鸣蓉, 吴俐勤, 章虎, 等. 液相色谱-串联质谱法测定牛奶中伏马菌素 FB₁ 和 FB₂ 及其水解代谢物[J]. 分析化学, 2012, (5): 757–761.

Qian MR, Wu LQ, Zhang H, *et al.* Determination of fumonisins B₁, B₂ and their hydrolysed metabolites in bovine milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2012, (5): 757–761.

[14] 张淑琼. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法同时测定稻谷类食品中的 5 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(5): 1601–1606.

Zhang SQ. Simultaneous determination of 5 kinds of mycotoxins in the grain by ultraperformance liquid chromatography–triple quadrupole massspectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(5): 1601–1606.

[15] 陈宁周, 颜玉婷, 王海波, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定腐乳中 16 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(15): 5169–5179.

Chen NZ, Yan YT, Wang HB, *et al.* Determination of 16 mycotoxins in sufu by high performance liquidchromatography–tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(15): 5169–5179.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



肖永华, 主管技师, 主要研究方向为食品安全。
E-mail: xyh_28@163.com