

三重四极杆质谱测定玉米中的 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法。样品经超声提取、SPE 净化后,液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。4 种毒素在 5 ~ 150 ng/mL 浓度范围内线性良好;对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样,3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08 ~ 1.2% 和 0.67 ~ 4.98% 之间,仪器精密度良好;同时考察了空白玉米基质加标结果,结果显示 4 种毒素 10 ng/mL 的加标回收率在 104.38 ~ 117.71% 之间;在某玉米样品中检出呕吐毒素 DON 和 15-ADON,浓度分别为 16 ng/mL 和 92 ng/mL。

关键词: 呕吐毒素 玉米赤霉烯酮 玉米 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

呕吐毒素 (Vomitoxin), 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON), 属单端孢霉烯族化合物, 在自然界中广泛存在。由于它们具有很高的细胞毒素及免疫抑制性质, 因此, 对人类及动物的健康构成了威胁, 特别是对免疫功能具有明显的影响。当人摄入了被 DON 污染的食物后, 会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状, 严重时损害造血系统造成死亡。1998 年, 在国际癌症研究机构公布的评价报告中, 呕吐毒素被列为 3 类致癌物。欧盟要求呕吐毒素要小于 1.0 mg/kg, 中国饲料要求低于 1 mg/kg。玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZON) 又称 F-2 毒素, 具有雌激素样作用, 能造成动物急慢性中毒, 引起动物繁殖机能异常甚至死亡。2011 年, 我国颁布了《食品中真菌毒素限量》国家标准, 规定谷物及其制品限量指标为 60 mg/kg。目前为止, 我国还没有使用 LC-MS/MS 检测上述毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用, 建立了快速准确测定玉米中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法, 供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30AC 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器： LC-30A 系统

色谱柱： Shimadzu Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mmI.D.×75 mmL., 1.6 μm

流动相： A—10 mM NH₄Ac 水溶液；

B—乙腈

流速： 0.3 mL/min

进样体积： 10 μL

柱温： 40℃

洗脱方式： 梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Con.
2.00	60
4.00	95
4.50	100
5.50	100
5.70	10
8.00	Stop

质谱条件

分析仪器： LCMS-8040

离子源： ESI，负离子扫描

离子源接口电压： -3.5 kV

雾化气： 氮气 3.0 L/min

干燥气： 氮气 15 L/min

碰撞气： 氩气

脱溶剂管温度： 250℃

加热模块温度： 400℃

扫描模式： 多反应监测（MRM）

驻留时间： 20 ms

延迟时间： 3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	英文名称 (简称)	中文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	Zearalmone (ZON)	玉米赤霉烯酮	17924-92-4	317.05	131.20*	20.0	15.0	30.0
					175.25	20.0	15.0	24.0
2	Deoxynivalenol (DON)	脱氧雪腐镰刀 菌烯醇	51481-10-8	295.05	265.05*	20.0	20.0	12.0
					138.00	20.0	20.0	17.0
3	3-Acetyldeoxynival enol (3-ADON)	3-乙酰基脱氧 雪腐镰刀菌烯 醇	50722-38-8	337.05	307.20*	20.0	23.0	11.0
					173.20	20.0	23.0	11.0
4	15-Acetyldeoxyniv alenol (15-ADON)	15-乙酰基脱氧 雪腐镰刀菌烯 醇	88337-96-6	337.05	150.15*	20.0	24.0	18.0
					219.15	20.0	24.0	11.0
5	¹³ C-DON (内标)	¹³ C-脱氧雪腐 镰刀菌烯醇	-	310.10	279.15	20.0	14.0	11.0
6	¹³ C-ZON (内标)	¹³ C-玉米赤霉 烯酮	-	335.10	140.15	20.0	23.0	31.0
7	¹³ C-3-ADON (内标)	¹³ C-3-乙酰基脱 氧雪腐镰刀菌 烯醇	-	354.10	323.10	20.0	17.0	11.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

取适量单标储备液，用乙腈配制成 1000 ng/mL 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 150、100、75、50、25、10、5 ng/mL 的标准工作液。内标物 ¹³C-DON、¹³C-ZON 和 ¹³C-3-ADON 的浓度均为 20 ng/mL。

样品前处理方法：

准确称取玉米样品 2.5 g 于 40 mL 的离心管中，再加入 10 mL 乙腈-水（86+14）溶液。超声波超声 1 h，15000 rpm 下离心 15 min。准确吸取上层清液 5 mL 过自制新型混合柱，用 5 mL 甲醇洗脱混合柱，抽干后合并洗脱液于 10 mL 小试管中，用氮气在 40℃ 下吹干。用乙腈/水（10 mM 的醋酸铵水溶液）(v/v=50/50)，定容至 1 mL，涡旋 30 s，用 0.22 μm 微孔滤膜过滤，进样测试。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

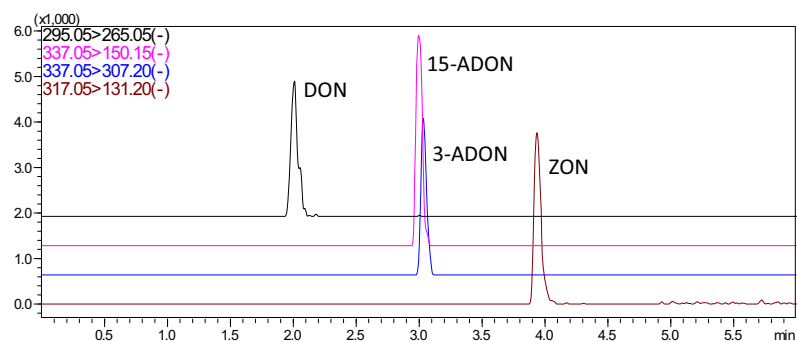


图 1 10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 5、10、25、50、75、100、150 ng/mL 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2~5 所示。4 种毒素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

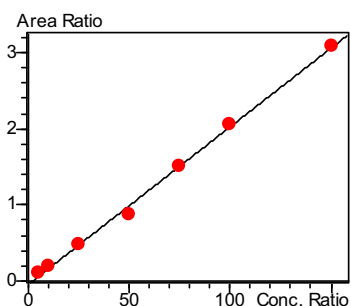


图 2 DON 的标准工作曲线

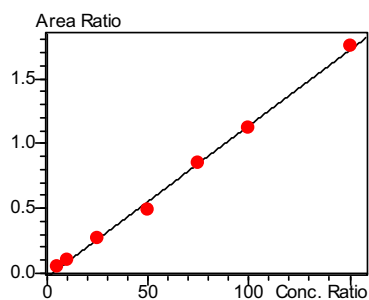


图 3 15-ADON 的标准工作曲线

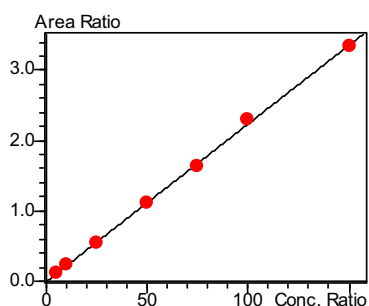


图 4 3-ADON 的标准工作曲线

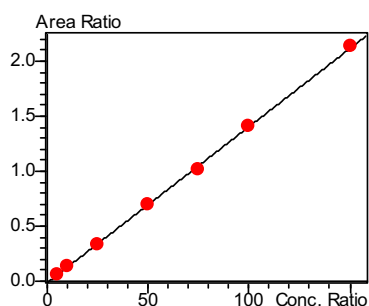


图 5 ZON 的标准工作曲线

表 3 4 种毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限(ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	DON	$Y = (0.0206871)X + (-0.0430373)$	0.9987	0.31	0.94
2	15-ADON	$Y = (0.0116655)X + (-0.0280959)$	0.9987	0.51	1.53
3	3-ADON	$Y = (0.0223806)X + (-0.00177429)$	0.9995	0.02	0.06
4	ZON	$Y = (0.0141913)X + (-0.0141720)$	0.9998	0.29	0.88

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.08 ~ 1.2%和 0.67 ~ 4.98%之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=3)

名称	RSD% (5 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
DON	1.20	1.83	0.71	0.67	0.27	2.27
15-ADON	0.41	4.89	0.44	2.10	0.10	1.47
3-ADON	0.50	4.85	0.36	1.45	0.16	2.94
ZON	0.38	2.09	0.08	3.49	0.15	2.17

2.4 回收率考察

以空白玉米样配制加标溶液，加标浓度为 10 ng/mL，得到色谱图如图 6 所示。4 种毒素 DON 、15-ADON 、3-ADON 和 ZON 加标回收率在分别为：114.71、117.71、104.38、和 116.41%。

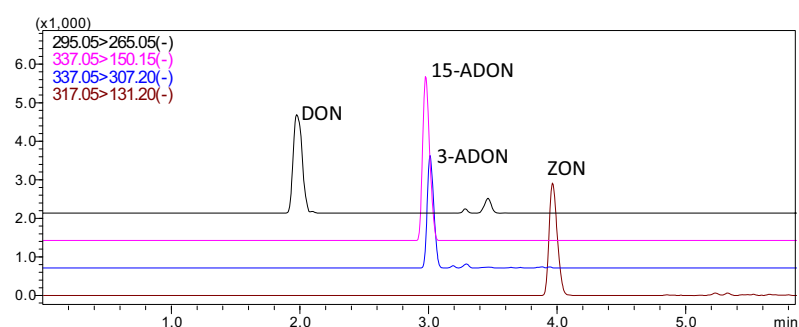


图 6 基质加标 10 ng/mL 样品的色谱图

2.5 玉米样品分析

在某玉米样品中检出 DON 和 15-ADON，浓度分别为 16 ng/mL 和 92 ng/mL，色谱图见图 7。

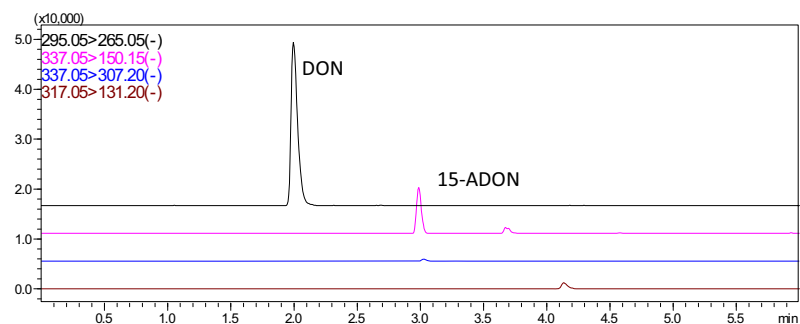


图 7 玉米样品的色谱图

3. 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法。4 种毒素在 5 ~ 150 ng/mL 浓度范围内线性良好，10 ng/mL 基质加标样品的回收率良好；低、中、高 3 浓度的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.10 ~ 1.2% 和 0.67 ~ 5.85% 之间，仪器精密度良好；在某玉米样品中检出呕吐毒素 DON 和 15-ADON，浓度分别为 16 ng/mL 和 92 ng/mL。