

实验技术与方法

液相色谱-串联质谱法测定粮食中的玉米赤霉烯酮

徐飞,刘峰,张亚军,秦迎旭

(宁夏回族自治区疾病预防控制中心,宁夏银川 750004)

摘要:目的 应用液相色谱-串联质谱法建立粮食中玉米赤霉烯酮的检测方法,并对宁夏市售小麦粉和玉米制品进行分析。方法 样品经乙腈-水(84:16, V/V)提取, PriboFast 226 多功能净化柱净化;以甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相梯度洗脱,用 Atlantis T₃ 色谱柱分离,以电喷雾负离子模式进行质谱测定。结果 分别以小麦粉和玉米制品为加标基质,3个加标水平下玉米赤霉烯酮的平均回收率为85.4%~93.7%, RSD < 9.0%,检出限(S/N = 3)为0.08 μg/kg,定量限(S/N = 10)为0.2 μg/kg。结论 该方法操作快速简单、重现性好,可用于粮食中玉米赤霉烯酮的检测。

关键词:液相色谱-串联质谱;粮食;玉米赤霉烯酮;小麦粉;玉米;真菌毒素;食品污染物

中图分类号:R155; R378.3 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)02-0124-03

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.02.006

Determination of zearalenone in grain and its products by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry

XU Fei, LIU Feng, ZHANG Ya-jun, QIN Ying-xu

(The Ningxia Hui Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention,
Ningxia Yinchuan 750004, China)

Abstract: Objective To develop a rapid method for determination of zearalenone in grain and its products by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and provide analytical methodology for the wheat flour and corn flour in Ningxia. **Methods** Samples of grain and its products were ultrasonically extracted by acetonitrile-water (84:16) solution and cleaned up by PriboFast 226 multifunctional clean-up column. Zearalenone was separated on Atlantis T₃ chromatographic column with mobile phase of methanol-10 mmol/L ammonium acetate on gradient elution. The zearalenone was determined and quantified by mass spectrometry. **Results** The average recoveries of zearalenone in wheat and corn samples at three spiked levels were 85.4%-93.7% with relative standard deviations less than 9.0%. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 0.08 and 0.2 μg/kg respectively. **Conclusion** The method was accurate, reliable, and could be used as a quality control method for zearalenone in grain and its products.

Key words: Liquid chromatography tandem mass spectrometry; grain and its products; zearalenone; wheat flour; corn grits; mycotoxins; food contaminants

粮食在生产、加工、运输和贮存过程中,易发生霉变而污染各种真菌,产生对人体有害的真菌毒素,可引发真菌毒素污染问题。玉米赤霉烯酮(zearalenone,简称ZEA)是由镰刀菌产生的一种雌激素真菌毒素,广泛存在于霉变的小麦、玉米和高粱等谷类作物以及奶类制品中,主要作用于生殖系统,具有较强的生殖毒性和致畸作用,人或动物误食后会引发不孕或流产等现象^[1]。GB 2761—

2011《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》^[2]规定小麦和玉米及其制品中玉米赤霉烯酮的含量不得超过60 μg/kg。目前,国内对玉米赤霉烯酮的检测方法主要采用高效液相色谱法^[3],该方法的灵敏度不能满足检测痕量玉米赤霉烯酮残留量的要求,而液质联用法由于其应用范围广,定性准确和测定效率高等特点,已在玉米赤霉烯酮的检测方面得到广泛的应用^[4-5]。本文建立了玉米赤霉烯酮的超快速液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)检测法,为宁夏地区玉米赤霉烯酮残留的分析和确证工作提供了参考方法,同时也为提高液质联用操作能力提供了技术保障。

收稿日期:2014-08-12

基金项目:宁夏自然科学基金资助项目(NZ14226)

作者简介:徐飞 男 检验师 研究方向为食品安全与农药残留

E-mail:lengyue0524@163.com

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品

小麦粉样品 36 份、玉米制品样品 9 份(玉米糝样品 6 份、玉米粉样品 3 份)为 2014 年宁夏回族自治区食品风险监测项目抽检样品,采样过程符合国家标准要求。其中玉米糝经多功能粉碎机粉碎后,密封备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

LC-20AD 超快速液相色谱仪(日本 Shimadzu)、4000 Q-Trap 三重四级杆质谱系统(美国 AB SCIEX)、PriboFast 226 多功能净化柱(柱压型,北京泰乐祺科技有限公司)、934-AH 玻璃纤维滤纸(直径 110 mm,1.5 μm ,美国 Whatman)、平行样品浓缩仪(瑞士 Buchi)、台式冷冻离心机、超纯水仪、漩渦混合器。

甲醇、乙腈均为色谱纯,购自美国 TEDIA;乙酸铵(天津市科密欧有限公司);玉米赤霉烯酮标准品(编号:012357-09-1ML,规格:50 mg/L,美国 O2si)。

1.2 方法

1.2.1 提取净化

准确称取样品 25.00 g 于 250 ml 具塞三角瓶中,加入 100 ml 乙腈-水(84:16, V/V),充分摇匀,超声提取 30 min,放冷后经玻璃纤维滤膜过滤,取滤液 8 ml,采用 PriboFast 226 多功能净化柱净化。取净化液 5 ml,置于平行样品浓缩仪上 50 $^{\circ}\text{C}$ 蒸至近干,用初始流动相定容至 1 ml,涡旋 30 s,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤到进样小瓶中,供 LC-MS/MS 检测。

1.2.2 空白基质溶液的配制

分别称取与待测样品基质相同且不含待测成分的样品,按 1.2.1 制备方法操作,制备空白基质溶液。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:采用 Waters Atlantis T₃ 柱(2.1 mm \times 150 mm,3 μm);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.3 ml/min;进样体积 10.0 μl ;流动相:A:10 mmol/L 乙酸铵水溶液,B:甲醇,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 以甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液为流动相的梯度洗脱程序
Table 1 Methanol-10 mmol/L ammonium acetate on gradient elution

时间/min	A 水相/%	B 有机相/%
0.1	80	20
0.3	10	90
1.0	10	90
2.5	80	20
7.0	80	20

质谱条件:离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描方

式:负离子扫描(ESI⁻);检测方式:多反应监测(MRM);气帘气(CUR): 1.03×10^5 Pa;电喷雾电压(IS):-4 500 V;离子源温度(TEM):550 $^{\circ}\text{C}$;雾化气(GS1): 3.45×10^5 Pa;辅助气(GS2): 3.45×10^5 Pa。玉米赤霉烯酮的 MRM 检测的相关质谱参数见表 2。

表 2 玉米赤霉烯酮的质谱采集参数

Table 2 Mass parameters for ZEA analysis

物质名称	母离子 Q1 m/z	子离子 Q3 m/z	去簇电 压 DP /V	碰撞能 量 CE/ eV	入口电 压 EP /V	离子电 压 CXP /V
玉米赤霉烯酮	317.0	174.9	-106	-35	-10	-12
		130.9	-140	-40	-10	-12

2 结果与分析

2.1 色谱和质谱条件的优化

选择 Atlantis T₃ 柱作为分析柱,比较了甲醇-水和乙腈-水两个分离体系的效果,发现甲醇-水的分离效果较好。为了进一步改善峰形和灵敏度,本试验考察了不同添加剂(甲酸和乙酸铵)及浓度对流动相的影响。由于玉米赤霉烯酮采用的是电喷雾负离子模式进行质谱测定,当流动相中含有 0.1% 的甲酸时对色谱峰有明显的抑制作用,故不建议使用酸性流动相。通过考察不同浓度的乙酸铵水溶液,发现使用 10 mmol/L 乙酸铵水溶液,灵敏度较高,峰形较好。因此,本试验采用甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相。

玉米赤霉烯酮分子式为 C₈H₂₂O₅,分子量为 318.3。选择在电喷雾负离子模式下测定,先在全扫描模式中获得玉米赤霉烯酮的准分子离子[M-H]⁻, m/z 317.0,随后切换到子离子扫描模式,调节碰撞电压,获得丰度较高的几个碎片离子,其中 m/z 147.9 和 m/z 130.9 是两个强度较大的子离子。

2.2 净化柱的选择

选择 PriboFast 226 多功能净化柱作为净化小柱,其将极性、非极性和离子交换等多类官能基团作为复合吸附填料填充到柱体中,这些填料可以选择性的吸附样品中的脂类、蛋白质和色素等主要杂质,对待测物(玉米赤霉烯酮)无吸附,并将其留在样液中,从而达到净化的目的。梁颖等^[5]使用 Mycosep 226 多功能净化柱的回收率为 93.7%,RSD 为 5.4%;孟娟等^[6]使用 ENVI-Carb 石墨化炭黑固相萃取小柱的回收率为 79.9% ~ 104.0%,RSD 为 2.3% ~ 10.0%;曾宪远等^[7]使用 Zearala Test 免疫亲和柱的回收率为 83.7% ~ 102.5%,RSD 为 2.2% ~ 5.8%;本试验使用 PriboFast 226 多功能净化柱的回收率为 85.4% ~ 93.7%,RSD 为 4.7% ~ 8.1%。结果表明,PriboFast 226 多功

能净化柱具有良好的净化效果。

2.3 标准曲线和相关系数

移取玉米赤霉烯酮的标准品溶液 200 μl 于 10 ml 容量瓶中,再移取 1 ml 置于 10 ml 容量瓶中,浓度为 100.0 ng/ml 混合标准品溶液。精密移取上述标准品溶液适量,用得到的相应的空白基质溶液定容于 1 ml 样品瓶中,配制成浓度分别为 0.25、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0 ng/ml 的标准溶液,用孔径为 0.22 μm 的微孔滤膜过滤,供 LC-MS/MS 检测。以目标组分峰面积 y 为纵坐标,以标准工作液的浓度 x (ng/ml) 为横坐标,进行线性回归,绘制工作曲线,所得工作曲线的相关系数均 > 0.99 ,表明玉米赤霉烯酮在上述质量浓度范围内时具有良好的线性关系。方法检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别以最低加标浓度试样中被分析物质的定性离子 $S/N = 3$ 和 10 时计算所得。当取样量为 25.0 g 时,玉米赤霉烯酮的 LOD = 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ = 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4 方法的回收率及精密度

分别取小麦粉和玉米制品空白样品,进行加标试验,设 0.2、20.0 和 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个加标水平,每个条件平行处理 6 次,上机测定。结果表明,以小麦粉为基质的回收率分别为 88.5%, 93.7% 和 91.1%, RSD 分别为 4.7%, 7.6% 和 6.4%; 以玉米粉为基质的回收率分别为 92.5%, 85.4% 和 90.3%, RSD 分别为 5.7%, 8.1% 和 7.5%。

2.5 实际样品的检测

用本方法对 2014 年宁夏回族自治区食品风险监测项目抽检的 36 份小麦粉样品、9 份玉米制品样品进行了检测。结果表明,10 份小麦粉、5 份玉米制品中玉米赤霉烯酮的含量低于本法检出限 (0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 26 份小麦粉、4 份玉米制品中玉米赤霉烯酮的含量在 0.1 ~ 9.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 均低于国家标准规定的 60.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2]。图 1 (B) 给出了阳性样品的 LC-MS/MS 谱图。

3 小结

本试验采用乙腈水溶液提取, PriboFast 226 多功能净化柱净化,超快速液相色谱-串联质谱直接测定了宁夏市售小麦粉和玉米制品中玉米赤霉烯酮的含量,本方法回收率和精密度符合检测要求。该方法快速简便、灵敏度高、重现性好,对于加强宁夏

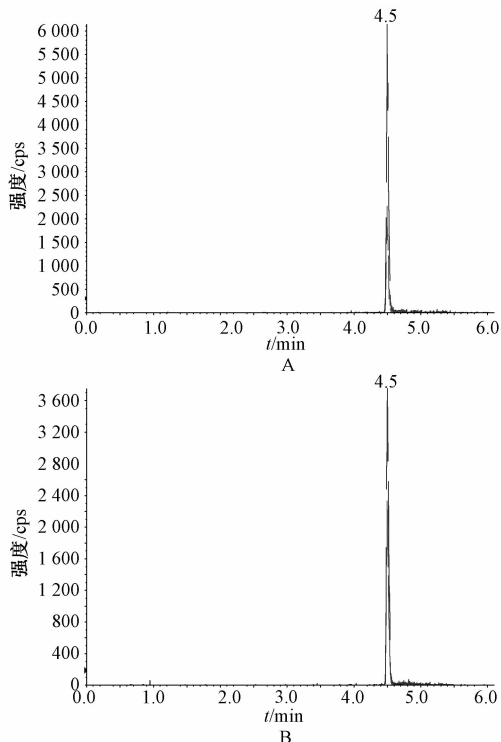


图1 标准溶液(A, 10.0 ng/ml)和阳性样品(B)中玉米赤霉烯酮的 LC-MS/MS 谱图

Figure 1 LC-MS/MS chromatograms of ZEA in a standard sample (A, 10.0 ng/ml) and a poisoning sample (B)

地区该项目的监测工作具有重要意义。

参考文献

- [1] Prelusky D B, Rotter B A, Rotter R G, et al. Mycotoxins in grains-com pounds other than aflatoxins [M]. St. Paul: Eagan Press, 1994: 359.
- [2] 中华人民共和国卫生部. GB 2761—2011 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 杨大进, 李宁. 2013 年国家食品污染和有害因素风险检测手册[M]. 北京: 中国质检出版社、中国标准出版社, 2013: 287-290.
- [4] Pallaroni L, Holst C. Dermination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003(993): 39-45.
- [5] 梁颖, 刘邻渭, 张春晖. 液质联用同时检测小麦中三种镰刀菌毒素[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(6): 160-160.
- [6] 孟娟, 张晶, 张楠, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测粮食及其制品中的玉米赤霉烯酮类真菌毒素[J]. 色谱, 2010, 28(6): 601-607.
- [7] 曾宪远, 宁焕焱, 尹艳, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定花生及制品中的五种真菌毒素[J]. 现代食品科技, 2014, 30(1): 217-221.