

液相色谱－串联质谱法测定猪可食性组织中
脱氧雪腐镰刀菌烯醇残留量的方法研究

李维钺, 沈祥广, 刘 戎, 张嘉慧, 余静贤, 谢玉萍, 邓衔柏
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:针对猪可食性组织中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的残留,建立了一种液相－电喷雾质谱检测法.样品用纯水提取,C₁₈柱净化,体积分数为30%的甲醇洗脱后进行LC-MS/MS分析.色谱柱采用Phenomenex Luna 5 μ C₁₈(2),流动相采用体积比为3:7的甲醇－体积分数为0.1%甲酸水溶液.质谱采用电喷雾离子源,正离子多重反应监测模式进行定量和定性分析.方法的最低检测限为25 μ g·kg⁻¹,最低定量限为50 μ g·kg⁻¹;在50、100、500 μ g·kg⁻¹3个水平的回收率为80.2%~99.4%,相对标准偏差为2.47%~9.47%.

关键词:脱氧雪腐镰刀菌烯醇;猪可食性组织;固相萃取;电喷雾串联质谱
中图分类号:S859.84 文献标志码:A 文章编号:1001-411X(2013)01-0101-05

Study on the Determination of Dexynivalenol in Edible Tissues of
Swine by Liquid Chromatography Coupled with
Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

LI Weicheng, SHEN Xiangguang, LIU Rong, ZHANG Jiahui, YU Jingxian, XIE Yuping, DENG Xianbo
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:A method has been developed for the determination of dexynivalenol in edible tissues of swine by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The samples were extracted by pure water and purified by C₁₈ solid phase extraction, and then analyzed by the LC-MS/MS after redissolved by 30% methanol. The chromatographic column was Phenomenex Lu-na 5 μ C₁₈(2), and the flowing phase was comprised with methanol－0.1% formic acid solution (V/V=3:7). The mass spectrometry was run with electrospray ion source and in positive ions multiple reaction monitoring mode for the quantitative and qualitative analyses. Limit of detection (LOD) was 25 μ g·kg⁻¹, and limit of quantitation (LOQ) was 50 μ g·kg⁻¹. The recoveries of dexynivalenol in edible tissues of swine ranged from 80.2% to 99.4% in 50, 100 and 500 μ g·kg⁻¹ concentration levels. The relative standard deviation ranged from 2.47% to 9.47%.

Key words:dexynivalenol; edible tissues of swine; solid phase extraction; electrospray ionization tandem mass spectrometry

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是镰刀菌产生的一种真菌毒素,又称呕吐毒素.分子式为C₁₅H₂₀O₆,相对分子质量为296.3,为无色针状晶体.它的化学性质稳定,一般的加热和蒸煮均不易使其分解^[1-2].

DON 具有广泛的毒性,人和家畜在误食被毒素污染的粮谷类食物后可产生广泛的毒性效应,引起动物呕吐、拒食、体质量减轻,免疫功能和造血功能受到损害,还具有很强的皮肤毒性和细胞毒性,因此危害很大^[3-5].为防止真菌毒素对人类健康的威胁,很多地区和国家都制订了相应的标准来控制粮食及其制品中 DON 的含量,联合国粮农组织规定食用粮食中 DON 的质量比必须 $\leq 1\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,我国国家标准 GB2761—2011 中规定在食用小麦及玉米中 DON 的限量为 $1\,000\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

针对 DON 的检测分析方法主要有薄层色谱法、气相色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附测定法、液相色谱/大气压化学电离质谱(APCI)^[6-10].这些方法主要应用于粮食和饲料方面的检测,有关在猪肉等可食性动物组织中检测毒素残留的报道较少,猪源动物性食品是我国民众的主要肉食来源,随着人们对食品安全问题的重视程度不断提高^[11],当务之急是建立一种灵敏度高、操作简单、准确有效的方法,来检测动物组织中呕吐毒素的残留量,以便对猪源食品的品质进行有效监控.

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 6430 型串联三重四极杆质谱(美国 Agilent 公司),配 Agilent 1 200 型液相色谱仪, C_{18} 固相萃取柱(200 mg-2 mL, Agilent 公司),Milli-Q 去离子水发生器(美国 Milli-Q 公司),内切式均质机及涡旋混合器(均为德国 IKA 公司),高速台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司),pH 计(上海雷磁精密仪器厂),轨道式摇床(德国 IKA 公司).乙腈、甲醇(均为色谱纯, Fisher 公司),磷酸二氢钠(分析纯,广州试剂厂),脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品(CAS 51481-10-8, Sigma 公司),质量分数 $\geq 99\%$.

1.2 试液的配制

DON 标准储备液及工作液:称取脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品 5 mg 置 5 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,准确浓度根据标准品的含量和称取量计算,制得的储备液置 $-20\ ^\circ\text{C}$ 密闭保存.使用时用流动相稀释成适宜浓度的工作溶液,现配现用.

流动相:甲醇与体积分数为 0.1% 甲酸水溶液按体积比 3:7 混匀.

1.3 样品前处理

1.3.1 提取 将猪肌肉、脂肪、肝脏、肾脏切碎,准确称取 2.00 g,置于 50 mL 离心管中,精密加入纯水 10 mL,匀质 1 min,另备 1 支装有 10 mL 纯水的离心

管洗刀头.振荡 30 min, $10\,000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min,上清液倒入另一离心管,用洗刀头的 10 mL 纯水,重复按上述步骤提取 1 次,合并上清液.

1.3.2 净化 C_{18} 柱先用 3 mL 甲醇和 5 mL 水活化,取 5 mL 上清液过柱,液面到柱床时,2 mL 水淋洗,挤干柱子,弃去过柱液,用体积分数为 30% 的甲醇 1 mL 洗脱,收集洗脱液,进行 LC-MS/MS 分析.

1.4 标准曲线的制作

将储备液用流动相稀释成质量浓度分别为 10、25、50、100、250、500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DON 标准溶液,上机检测.以标准液质量浓度(x)为自变量, DON (297.2 $\rightarrow$ 249.1)峰面积(y)为因变量,作线性回归,绘制标准曲线并求出其回归方程和相关系数.

1.5 检测限(LOD)和定量限(LOQ)的测定

称取 2.00 g 空白匀浆组织,依次加入 100 μL 不同质量浓度(0.2、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的标准工作液,漩涡混匀,使样品中 DON 的质量比分别为 0.010、0.025、0.050、0.100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,按“1.3”方法处理后上机检测,定量和定性分析时,以信噪比(S/N)为 3 时的 DON 添加质量比作为检测限,以信噪比(S/N)为 10 时的 DON 添加质量比为定量限.

1.6 回收率和精密度试验

采用在空白样品中加标的方法进行回收率和精密度的测定.将不同质量浓度(1.0、2.0、10.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的标准工作液 100 μL 加入到 2.00 g 匀浆好的猪空白组织中,涡旋混匀,使样品的添加质量比分别为 50、100、500 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,按“1.3”方法处理,进行上机检测.当日内每个质量浓度平行操作 5 次,连续做 3 d,计算变异系数.

1.7 液相色谱与质谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna 5 μC_{18} (2) 100 A 150 mm $\times$ 2.00 mm;柱温:25 $^\circ\text{C}$;流动相: V (甲醇): V (水)为 3:7 的溶液,流速:0.25 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量:5.0 μL .

离子源:电喷雾离子源(ESI);扫描模式:正离子扫描(Positive);检测方式:多反应监测(MRM);干燥气: N_2 ;干燥气温度:350 $^\circ\text{C}$;雾化气压力:206.85 kPa;干燥气流速:9 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$;正模式毛细管电压:3 500 V.

2 结果与分析

2.1 DON 的质谱检测

将 DON 标准溶液用流动相稀释成 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的工作溶液,不接色谱柱(直通连接),采用单级质谱(MS2, Positive 模式)扫描,得到 DON 的主要母离子

质荷比为 297.2,属加 H⁺ 模式;利用仪器的自动优化功能(Optimizer 模式),对 DON 的质谱条件进行优化测试,得到 4 个二级质谱子离子,分别为 249.1、203.1、231.1 和 280.9,其中 249.1 和 203.1 的信号较强,如图 1.

2.2 DON 的色谱行为

在试验选定的液相色谱 - 质谱条件下,测得 DON 的保留时间为 4.02 min,空白组织样品在上述保留时间无干扰峰出现. DON 标准品、空白组织以及 DON 在空白组织中 MRM 色谱图如图 2 所示.

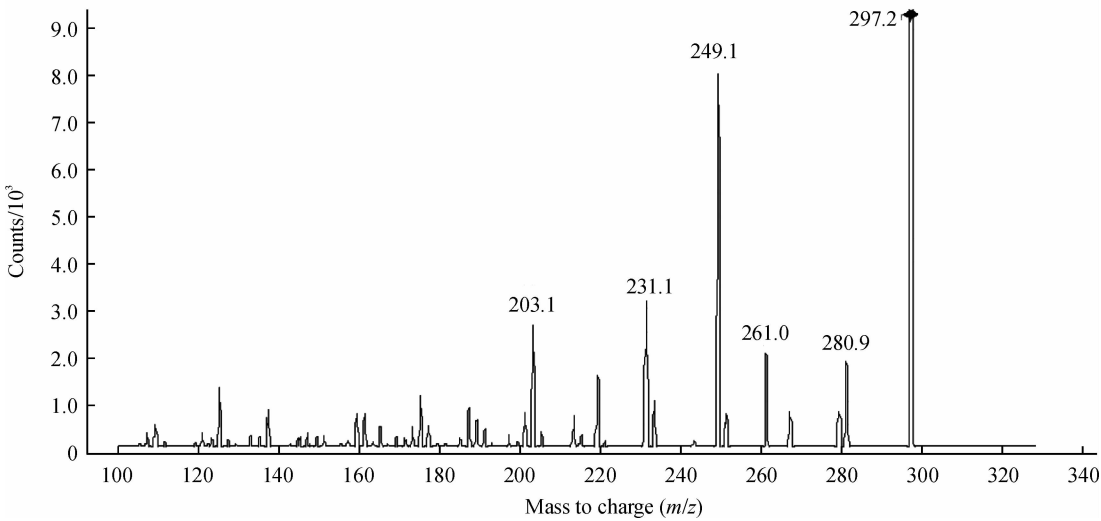


图 1 DON 的二级质谱扫描图
Fig.1 Mass/mass scanning spectrum of DON

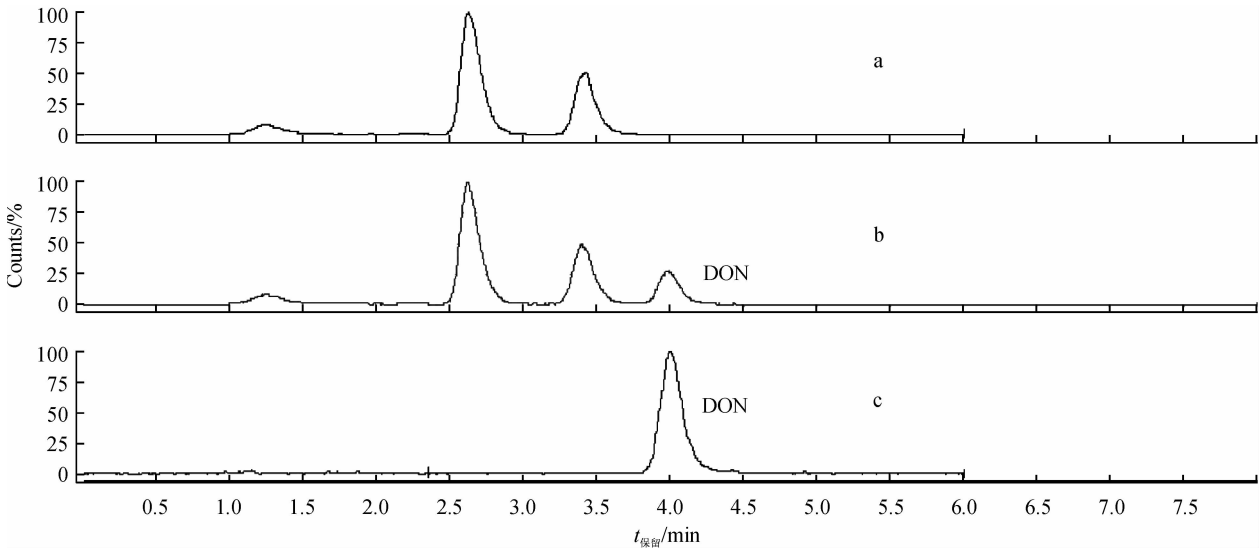


图 2 空白组织样品(a)、空白添加样品(b)、DON 标准溶液(c)的总离子图

Fig.2 The total ion chromatography of blank tissue(a), spiked with 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ of DON(b) and standard solution of DON(c)

2.3 标准曲线绘制

量取适量的工作液,用流动相稀释成质量浓度为 10、25、50、100、250、500 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,每一质量浓度测 5 次,按所得峰面积平均值(y)对相应质量浓度(x)做标准曲线,得回归方程为: $y = 4.9143x - 9.9160, r^2 = 0.9997$.

2.4 检测限与定量限

按峰高法以 3 倍信噪比(S/N)作为最低检测限,10 倍信噪比作为最低定量限进行计算,结果得出此

方法的最低检测限为 $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,最低定量限为 $50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$.

2.5 回收率与精密度

分别以 50、100、500 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 3 个添加水平进行检测,测得回收率为 80.2% ~ 99.4%,批内变异系数为 2.47% ~ 9.47%. 批间变异系数为 6.62% ~ 8.01%,符合 SN/T0001—1995《出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检验方法标准编写的基本规定》. 结果见表 1.

表 1 回收率及相对标准偏差
Tab.1 Recoveries and relative standard deviations

组织	$w(\text{DON})/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	批内						批间	
		回收率($n=5$)/%			CV/%			回收率	CV/
		1	2	3	1	2	3	($n=15$)/%	%
肌肉	50	87.98±6.11	89.18±7.43	90.62±7.82	6.94	8.33	8.63	89.26±6.72	7.53
	100	89.82±7.32	89.74±7.52	90.04±7.23	8.15	8.39	8.03	89.87±6.81	7.58
	500	88.66±7.55	88.76±7.14	89.10±7.12	8.51	8.05	7.99	88.84±6.74	7.59
脂肪	50	88.30±6.85	88.34±8.02	88.12±6.88	7.76	9.08	7.80	88.25±6.73	7.62
	100	89.82±8.51	88.96±7.58	91.72±6.60	9.47	8.51	7.19	90.17±7.14	7.92
	500	88.96±7.45	88.96±6.97	88.56±6.59	8.38	7.83	7.44	88.82±6.50	7.32
肝脏	50	85.80±4.31	89.52±8.05	90.18±7.57	5.03	9.00	8.39	88.50±6.65	7.51
	100	90.76±3.93	87.74±6.79	89.28±7.40	4.33	7.74	8.29	89.26±5.91	6.62
	500	94.34±2.33	90.48±8.83	91.38±6.05	2.47	9.76	6.62	92.07±6.10	6.63
肾脏	50	87.72±6.71	87.40±7.75	89.62±7.38	7.65	8.87	8.24	88.24±6.83	7.74
	100	89.96±8.45	90.04±8.11	92.36±6.57	9.40	9.01	7.10	90.79±7.27	8.01
	500	89.62±8.23	89.64±7.57	89.32±7.38	9.18	8.45	8.26	89.53±7.17	8.00

3 讨论与结论

3.1 样品前处理方法的优化

DON 属于单端孢霉烯族化合物,富含羟基,具有亲水性,易溶于水 and 极性有机溶剂. 目前,应用色谱法分析谷物中 DON 时,通常采用反向原理,以体积比为 86:14 的乙腈水为提取溶剂,用霉菌毒素净化专用柱(MFC,如 MycoSep™ 225)进行样品的净化^[12],使样品提取液中的杂质吸附于 MFC 柱中. GB/T23503—2009 中采用的方法是以聚乙二醇溶液为提取剂,免疫亲和柱进行样品的净化. 由于这两类净化柱的承载量有限,只能少量上样,难以达到富集和浓缩的效果,加之价格均较为昂贵,对于批量样品的测定成本较高. 本试验采用纯水提取组织样品中的 DON,经 C₁₈固相萃取柱富集和净化后,用 1 mL 体积分数为 30%的甲醇溶液洗脱后直接检测,操作简单易行,便于批量样品的处理,大大节省了成本,而且避免了有机溶剂对人身体的伤害,绿色环保.

3.2 净化柱及其洗脱试验

试验发现用 100 mg 规格的柱子进行回收率试验时效果低于 200 mg 规格的柱子. 从 200 mg C₁₈固相萃取柱的洗脱试验发现,加标样品上样时,前 5 mL 的过柱液中未测到有 DON. 淋洗时,第 3 mL 的淋洗液能明显测到的 DON,约为总量的 4%. 因此,方法用提取溶液 5 mL 上样,水 2 mL 淋洗,回收率较高.

3.3 方法检测限及定量限的比较

卢培成等^[13]采用液质联用检测猪胃组织 DON 含量的试验中,确定的检测限和定量限分别为 2 和 5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,高于本试验确立的 25 和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,对

比采用的质谱条件,卢培成等^[13]采用负离子扫描模式,电离离子源电离后进行质谱检测,本试验采用正离子扫描模式,电喷雾离子源,多反应检测模式(MRM)检测,可以看出本试验的质谱方法要灵敏一些. 梁颖等^[14]采用液质联用检测小麦 DON 含量的试验中,确立的检测限为 10 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,比本试验确立的检测限要低一些,对比其试验过程和检测方式,本试验的样品前处理过程中,样品的 DON 浓度稀释了 4 倍,而梁颖等^[14]的样品制备过程中 DON 浓度没有稀释,反而浓缩了 1.25 倍,这有利于降低其检测限,这是值得本试验学习和借鉴的地方.

3.4 结论

本试验建立了猪可食性组织中脱氧雪腐镰刀菌烯醇残留量的液相色谱-串联质谱检测方法. 以纯水为提取溶剂,有效减少了试验过程对环境的污染;样品前处理简单、重现性好,明显降低了批量样品的检测成本;检测的灵敏度高,能有效应用于猪源食用组织品质的日常监控,防止由于 DON 残留引起的中毒事件发生.

参考文献:

[1] LARSEN J, HUNT J, PERRIN I, et al. Workshop on trichothecenes with a focus on DON: Summary report[J]. Toxicology Lett, 2004, 153(1): 1-22.
[2] ANKLAM E, STROKA J, BOENKE A. Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins[J]. Food Control, 2002, 13(3): 173-183.
[3] 李月红. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对机体免疫功能影响的实验研究[D]. 石家庄:河北医科大学, 2003.

- [4] LANGSETH W, RUNDBERGET T. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures[J]. *Chromatogr A*, 1998, 815(1):103-121.
- [5] MATEO J J, MATEO R, HIONJO M J, et al. Liquid chromatographic determination of toxigenic secondary metabolites produced by *Fusarium* strains[J]. *Chromatogr A*, 2002, 955(2):245-256.
- [6] ROSENBERG E, KRSKA R, WISSIACK R, et al. HPLC-APCI-MS as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed[J]. *Chromatogr A*, 1998, 819(1/2): 277-288.
- [7] JIMENZE M, MATEO R. Determination of mycotoxins produced by *fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatogr A*, 1997, 778(1/2): 363-372.
- [8] PALLARONI L, HOLST C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry[J]. *Chromatogr A*, 2003, 993(1/2): 39-45.
- [9] ZOLLNER P, BERNER D, JODLBAUER J, et al. Determination of zearalenone and its metabolites α - and β -zearalenone in beer samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chromatogr B*, 2000, 738(2): 233-241.
- [10] 隋凯, 李军, 卫锋, 等. 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的高效液相色谱检测及质谱确证[J]. *分析化学研究简报*, 2005, 33(11): 1643-1646.
- [11] 陈杖榴, 杨桂香, 曾振灵, 等. 兽药残留的毒性与生态毒理研究进展[J]. *华南农业大学学报*, 2001, 22(1): 88-91.
- [12] BERTHILLER F, SCHUHMACHER R, BUTTINGER G, et al. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chromatogr A*, 2005, 1062(2):209-216.
- [13] 卢培成, 邓衍柏, 邹新华, 等. 猪胃组织中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的液质联用检测[J]. *广东农业科学*, 2011, 114(9):114-116.
- [14] 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):160-162.

【责任编辑 柴 焰, 霍 欢】

(上接第 100 页)

- [3] NAUGLE A L, BARLOW K E, EBLEND R, et al. U. S. Food Safety and Inspection Service testing for *Salmonella* in selected raw meat and poultry products in the United States, 1998 through 2003: Analysis of set results[J]. *J Food Prot*, 2006, 69(11):2607-2614.
- [4] MATARAGAS M, SKANDAMIS P N, DROSINOS E H. Risk profiles of pork and poultry meat and risk ratings of various pathogen/product combinations[J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 126(1/2):1-12.
- [5] OzFoodNet Working Group. Monitoring the incidence and causes of diseases potentially transmitted by food in Australia: Annual report of the OzFoodNet Network, 2008[J]. *Commun Dis Intell*, 2009, 33(4):389-413.
- [6] Centers for Disease Control and Prevention. Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2006[J]. *Morb Mortal Weekly Rep*, 2009, 58(22):609-615.
- [7] OLIVER J D. The viable but nonculturable state in bacteria[J]. *J Microbiol*, 2005, 43(S):93-100.
- [8] SAROJ S, SHASHIDHAR R, BANDEKAR J. Gamma radiation used as hygienization technique for foods does not induce viable but non-culturable state (VBNC) in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium[J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(4):420-424.
- [9] XU H, LEE H Y, AHN J. Cross-protective effect of acid-adapted *Salmonella enterica* on resistance to lethal acid and cold stress conditions[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2008, 47(4):290-297.
- [10] OLIVER J D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2009, 34(4):415-425.
- [11] SUN Fengrong, CHEN Jixiang, ZHONG Linhong, et al. Characterization and virulence retention of viable but non-culturable *Vibrio harveyi* [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2008, 64(1):37-44.
- [12] 李影, 段锐, 孙晓媛. 鸡白痢沙门氏菌 CVCC578 标准株 VBNC 研究模型的建立及鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2010, 32(3):179-182.
- [13] 李影, 段锐, 孙晓媛. 鸡白痢沙门氏菌活的非可培养状态相关基因 *ybbB* 和 *rhIB* 的鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(9):689-693.
- [14] COUTARD F, LOZACH S, POMMEPUY M, et al. Real-time reverse transcription-PCR for but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* after recovery of culturability[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(16):5183-5189.
- [15] ABE A, OHASHIA E, RENB H, et al. Isolation and characterization of a cold-induced nonculturable suppression mutant of *Vibrio vulnificus*[J]. *Microbiol Res*, 2007, 162(2):130-138.
- [16] LAI Chenjiang, CHEN Shuying, LIN Hong, et al. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Int J Food Microbiol*, 2009, 135(2):118-124.

【责任编辑 柴 焰, 霍 欢】