

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

隋凯* 李军 卫锋 赵守成

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘 要 建立了谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON 的高效液相色谱检测和质谱确证方法。样品用水提取, 通过免疫亲和柱进行富集和净化, 以 Hypersil BDS C_{18} 柱为分离柱, 乙腈-水 (10:90, V/V) 混合溶剂为流动相进行高效液相色谱分离和检测, 利用大气压化学电离质谱 (APCI) 进行阳性结果的鉴定和确认。在小麦、大麦和面粉等样品中, 本方法在 0.1 ~ 10 $\mu\text{g/g}$ 添加范围内的回收率为 82.4% ~ 103%, 相对标准偏差 1.4% ~ 7.6%, 检出限 0.1 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词 脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 大气压化学电离质谱, 免疫亲和柱

1 引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, 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。其分子式为 $C_{15}H_{20}O_6$, 分子量 296.3, 结构见图 1^[1]。虽然其毒性与其它真菌毒素相比较低 (小鼠经口 $LD_{50} = 9.2 \text{ mg/kg}$), 但由于它在谷物中最易滋生, 因此中毒发病率较高, 对动物的生长和饮食产生较大的影响。目前一些国家已制订了谷物中 DON 的限量标准, 加拿大规定供人食用小麦中 DON 的限量标准为 2 mg/kg , 婴儿食品为 1 mg/kg , 美国 FDA 建议供人食用小麦制品中 DON 的含量为 1 mg/kg , 我国国家标准 GB16329-1996 中规定供人食用的谷物 DON 含量不得超过 1 mg/kg ^[2]。

DON 的分析方法主要有薄层色谱法、气相色谱法、微柱法、酶联免疫吸附测定法、免疫亲和柱-荧光分光光度计法和高效液相色谱法等^[3~7]。薄层色谱法操作简便曾被广泛应用, 此方法费时, 灵敏度、特异性较差。酶联免疫吸附法快速、灵敏、操作简便, 但复合抗原 (毒素与载体蛋白的结合物) 的制备有一定困难。气相色谱法测定 DON 需进行衍生化, 通过三甲硅烷衍生物, 利用电子捕获检测器进行定量分析, 操作烦琐、重现性较差。微柱法和荧光分光光度法操作简便、快速, 但大多用于农产品中呕吐毒素的快速筛选。本采用水进行样品的提取, 通过 DON 免疫亲和柱进行富集和净化, 建立了利用高效液相色谱检测谷物中 DON 含量的定量方法, 并探讨了利用液相色谱-大气压化学电离质谱 (APCI) 进行阳性结果鉴定和确认的方法。

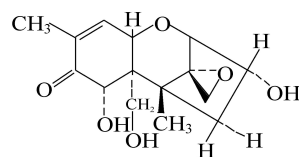


图 1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 的结构

Fig 1 The structure of deoxynivalenol (DON)

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); LCQ Deca XP plus LC/MSn 液/质联用仪 (美国 Finnigan 公司); 高速均质器; N-EVAPTM 112 氮吹仪 (美国 Organomation 公司) 和高速离心机 (北京医用离心机厂); 聚乙二醇 (PEG, MW = 8000) DON Test HPLC 免疫亲和柱 (美国 VICAM 公司)。乙腈、甲醇 (色谱纯, 迪马公司); DON 标准品购自美国 Sigma 公司; 实验用水为 Millipore 制备的超纯水; DON 标准溶液: 准确称取适量的 DON 标准物质溶于甲醇, 配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备溶液。临用前, 取适量体积标准储备溶液用氮气吹干, 再用流动相配制成适当浓度的标准工作溶液。

2004-12-29 收稿; 2005-04-02 接受

2.2 实验方法

2.2.1 提取与净化 准确称取磨碎混匀的测试样品 25.0 g 置于不锈钢高速均质器中,加入约 5 g 聚乙二醇 (PEG) 和 100 mL 水,高速均质 2 min,静置、离心,采用槽纹滤纸过滤,再将滤液通过微纤维滤纸过滤,吸取 1 mL 滤液转移至 DON Test HPLC 柱中,以 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入柱子。再用 5 mL 纯水以 2 滴/s 的流速淋洗柱子,直至空气进入柱子。用 1.5 mL 色谱级甲醇以 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱,将洗脱液收集在玻璃试管中,于 50 °C 下氮吹至干,用 0.3 mL 流动相定容,溶液供液相色谱测定。

2.2.2 色谱质谱条件 色谱柱: Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) (大连依利特公司); 流动相: 乙腈-水 (10:90, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 218 nm。离子化方式: 大气压化学电离 (APCI) 负离子模式; 离子源温度: 200 °C; APCI 探头温度: 450 °C; 选择离子扫描 (SM): m/z 295; 全扫描范围: m/z 150 ~ 500; 二级质谱: m/z 80 ~ 300, C/D 能量 22%。

3 结果与讨论

3.1 免疫亲和柱的吸附特性和吸附容量对回收率的影响

本方法选用免疫亲和净化技术进行样品的预处理。免疫亲和技术是利用免疫化学的反应原理,采用大剂量的单克隆抗体,选择性吸附样液中的抗原物质。DON 是小分子物质,在免疫学上属于半抗原,不能直接产生抗体,需要偶联到大分子物质上,制成人工抗原后才具有免疫性。用此人工抗原免疫动物后,可得到高特异、高效价的单克隆抗体。再将一定量的抗体固定在合适的担体上,即可制成相应的免疫亲和柱。采用免疫亲和净化技术具有灵敏度高、特异性强、回收效果好等特点,并且操作简单、快速,是分析 DON 十分理想的样品净化方法。

由于 DON Test HPLC 免疫亲和柱中含有一定量的单克隆抗体,其选择性吸附的抗原物质是固定的,若通过免疫亲和柱的样品量过大,就无法保证样液中的 DON 被免疫亲和柱完全吸附,从而造成回收率降低。实验考察了 DON Test HPLC 免疫亲和柱对不同含量水平 DON 的吸附情况 (见图 2)。从图 2 可见,免疫亲和柱的最高吸附容量约在 2.5 μg 左右, DON 含量过载时,其吸附容量基本维持不变。因此,在实际检测时应根据 DON 含量的大致水平,对样液进行适当稀释,可取得十分理想的回收效率。

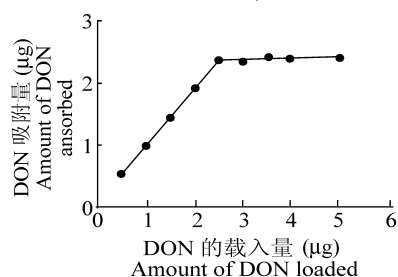


图 2 DON Test HPLC 免疫亲和柱抗体的吸附效率

Fig 2 Binding performance of anti-deoxynivalenol antibodies by the DON Test high performance liquid chromatographic (HPLC) immunoaffinity columns

3.2 净化条件的优化

虽然 DON Test HPLC 免疫亲和柱具有选择性吸附的特异性,但是样品中某些具有生物活性的杂质也有少量吸附。本方法采用水进行杂质的淋洗,消除了杂质对 DON 的测试干扰。通过 DON 淋洗实验发现,水的淋洗体积将直接影响 DON 的回收效率。分别用 5、10 和 15 mL 的水淋洗净化后所得的回收率数据表明,采用 10 和 15 mL 体积淋洗后杂质很干净,但回收率仅在 65% ~ 70% 左右,而采用 5 mL 体积进行淋洗的回收率均在 80% 以上,虽然有少量杂质,但是基本不影响对 DON 的测试。

3.3 线性关系和检出限

配置 DON 标准液浓度分别为 0.5、1.0、3.0、5.0、7.0 和 10.0 mg/L,按上述实验条件进样,以所得峰面积 A 对浓度 C (mg/L) 进行回归分析,结果表明线形关系良好。回归方程为 $A = 5.662 \times 10^3 C + 112$,相关系数为 0.9987。在本实验条件下,将标准溶液连续稀释后进行空白样品的加标回收,根据 2 倍噪音的峰响应值、取样量和进样量,得出方法的检出限为 0.1 mg/kg。

3.4 回收率实验和精密度

在小麦、大麦和面粉样品中,分别以 0.1、2.0、10.0 mg/kg 3 个水平加标,在本实验条件下,测定 3 种样品在 3 个不同浓度水平的回收率和精密度。实验数据见表 1。图 3 是 2.0 mg/kg 添加水平的小麦样

品和空白样品的 HPLC 色谱图。

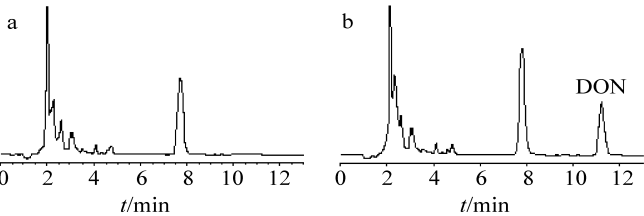


图 3 小麦空白样品 (a)和 2.0 mg/kg水平添加样品 (b)色谱图
Fig 3 Chromatograms of wheat blank sample (a) and spiked with DON at 2.0 mg/kg (b)

3.5 DON的 APC MS及监测离子

采用液相色谱进行分析时,有时一个色谱峰可能包含几种不同的组分。因此,仅仅通过色谱峰的保留时间进行鉴别,有可能给分析结果造成误差。为了消除误差,本实验采用了大气压化学电离质谱 (APCI) 技术,通过一级质谱 (MS) 选择分子量,二级质谱 (MS/MS) 选择子离子,以确认色谱峰没有任何干扰。DON 的结构见图 1。其分子量为 296,在 APCI 电离方式下,一级质谱检测得到的准分子离子峰是 m/z 295,为 $[M - H]^-$,见图 4 (a)。对基峰 m/z 295 进一步做 MS/MS 分析,优化质谱参数后,得到 DON 的碎片离子,结果示于图 4 (b)。根据质谱图可以确定 DON 的主要质谱峰对应的可能子离子为:分子离子峰 m/z 295 为 $[M - H]^-$,特征峰 m/z 277 为 $[M - H - H_2O]^-$; m/z 265 为 $[M - H - CH_2O]^-$; m/z 247 为 $[M - H - CH_2O - H_2O]^-$ 。图 4 (c) 显示的是小麦 DON 的阳性样品 APC MS/MS 质谱图,通过质谱图可以确认没有干扰影响 DON 的定量检测。

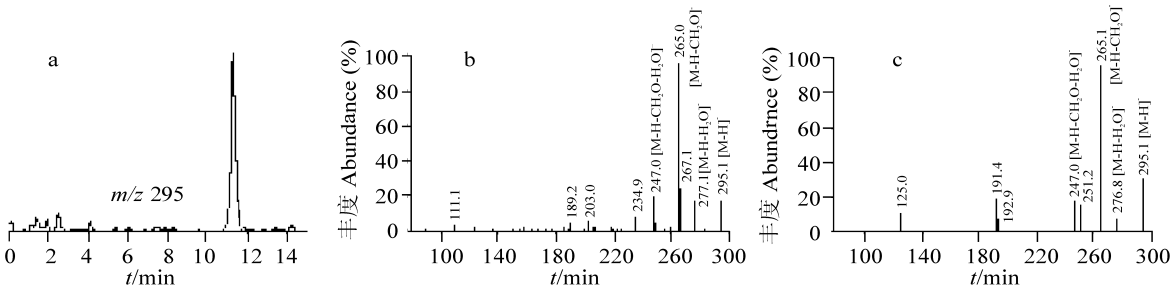


图 4 DON $[M - H]^-$ 离子的质量色谱图 (a)、MS/MS 质谱图 (b) 及小麦阳性样品 MS/MS 质谱图 (c)
Fig 4 Mass chromatograms of DON $[M - H]^-$ (a), MS/MS chromatograms of DON (b) and wheat positive sample (c)

实验表明,采用免疫亲和柱和柱净化 高效液相色谱检测谷物中的呕吐毒素的方法特异性强、方法准确、简便快速,灵敏度高。

References

1 Wu Yongning(吴永宁). *Present Knowledge in Food Safety* (现代食品安全科学). Beijing(北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2003: 310 ~ 319

2 Wang Jing(王 晶), Wang Lin(王 林). *Rapid Determination Technology of Foodstuff Safety* (食品安全快速检测技术). Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2002: 107 ~ 110

3 Deoxynivalenol in Wheat Gas Chromatographic Method, AOAC Official Method 986.18

4 Cahill L M, Kruger S C. *J. Chromatogr. A*, 1999, 859: 23 ~ 27

5 Fazeli E R, Bohm J, Luf W. *J. Chromatogr. A*, 1999, 854: 45 ~ 51

6 Schulmacher R, Weingaertner J, Grasserbauer M. *Fresenius 'J. Anal. Chem.*, 1997, 359: 510 ~ 515

7 Lauren D R, Ringrose M A. *Food Addit Contam.*, 1997, 14: 435 ~ 439

Determination of Deoxynivalenol in Cereal Grains by High Performance Liquid Chromatography and Verified by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

Sui Kai*, Li Jun, Wei Feng, Zhao Shoucheng

(Liaoning Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001)

Abstract A method was developed for the determination of deoxynivalenol (DON) by high performance liquid chromatography (HPLC) and verified by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). Samples were extracted and enriched by water, and purified by immunoaffinity columns. DON was quantified by reversed-phase HPLC with Hypersil BDS C₁₈ column and mobile phase of acetonitrile-water (10:90) was used for assay. The positive results were identified and verified by LC-MS with atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source. Recoveries from the different cereals (wheat, barley, flour) spiked with DON at levels ranging from 0.1 to 10 µg/g were from 82.4% to 103%, and relative standard deviations were from 1.4% to 7.6%, the limit of detection was 0.1 µg/g.

Keywords Deoxynivalenol, immunoaffinity columns, liquid chromatography-mass spectrometry, atmospheric pressure chemical ionization source

(Received 29 December 2004; accepted 2 April 2005)

《岩矿测试》征订启事

《岩矿测试》杂志是中国地质学会岩矿测试专业委员会和国家地质实验测试中心共同主办的分析测试技术科技期刊。国际标准刊号: ISSN 0254-5357; 国际刊名代码 CODEN: YACEDJ; 国内统一刊号 CN 11-2131/TD)。

《岩矿测试》的宗旨是突出服务于地球科学和地质找矿事业以及促进岩矿测试技术的发展; 根据国家地质工作的重点单一资源向资源环境并重的转变, 《岩矿测试》的内容有所拓宽, 主要报道国内与分析科学、资源环境、地质科学相关的新技术、新方法、新理论和新设备等研究成果、动态、评述以及相关实践经验。

《岩矿测试》1982年创刊, 近年来刊物地位不断提高, 是中国科技核心期刊, 中国期刊方阵双效期刊, 目前被国内外多家检索数据库、文摘收录。曾先后被评为国家、原地质部、北京市、中国科协的优秀科技刊物。适于地质、冶金、环保、石油、化工、煤炭等部门从事分析测试的科技工作者及大专院校分析化学、环境资源、地球科学等相关专业的师生阅读。

《岩矿测试》为国内外公开发行人物。国内邮发代号 2—313, 国际书店发行代号 Q4089, 广告经营许可证: 京西工商广字 0227号。本刊 2006年仍为季刊, 定价 10.00元/本, 全年 40.00元。漏订的读者可与编辑部直接联系。

《岩矿测试》编辑部地址 北京阜外百万庄大街 26号, 中国地质实验测试中心

邮政编码: 100037 电话: 010-68999652 传真: 010-68999653 E-mail: ykcs_zazhi@163.com