李文廷, 张瑞雨, 师真, 等. 桑椹中 11 种真菌毒素的检测分析[J]. 环境化学, 2018, 37(1): 185-187.

LI Wenting, ZHANG Ruiyu, SHI Zhen, et al. Analysis of 11 kinds of mycotoxins in Mulberry[J]. Environmental Chemistry, 2018, 37(1): 185-187.

thermo
scientific

桑椹中 11 种真菌毒素的检测分析*

李文廷¹ 张瑞雨¹ 师真¹ 冉亚莉¹ 胡琳² 蒋孟圆^{2**}

(1. 昆明市疾病预防控制中心, 昆明, 650228; 2. 云南民族大学民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 昆明, 650500)

摘 要 为确认新鲜桑椹在存储及食用过程中是否产生 11 种已知的真菌毒素, 本文建立一种用超高效液相色谱-串联质谱法同步、便捷测定桑椹中真菌毒素的分析方法. 桑椹样品以 70% 的甲醇水溶液超声提取, 经多功能净化柱净化, 以乙腈和 0.2% 氨水溶液进行梯度洗脱, 经串联三重四极杆质谱多反应模式的负离子监测方式检测, 综合内标法及外标法定量. 研究表明, 11 种真菌毒素在相应范围内具有良好的线性关系, 相关系数均在 0.998 以上, 通过加标回收实验, 回收率范围 70.6%—104.3%, 相对标准偏差 0.74%—7.27%, 检出限 0.02—0.10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 定量限 0.07—0.33 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 真菌毒素质控样的检测值在参考值允许范围内. 实验桑椹样品在短时间的储藏中均未检出 11 种真菌毒素.

关键词 桑椹, 真菌毒素, 高效液相色谱-串联质谱, 快速检测.

桑椹俗称葇、桑枣、桑椹子等, 是多年生木本植物桑的成熟果实. 日常生活中, 新鲜桑椹在食用过程中放置一段时间后, 就经常容易滋生霉菌, 时间越长现象越严重, 为此, 本研究主要对新鲜桑椹在短时间内食用及存储过程中是否产生真菌毒素进行研究分析.

真菌毒素是由真菌产生的具有毒性的次生代谢物, 近年来在谷物、蔬菜、水果、畜牧产品以及中药材中均发现了真菌毒素的存在. 目前真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法、酶联免疫吸附法、气相色谱法、免疫亲和柱净化高效液相色谱法, 但均只检测单一类的真菌毒素. 超高效液相色谱串联质谱法具有较高的灵敏度及较好准确性, 成为同时检测多种真菌毒素的主要方法.

本研究通过内标法(¹³C-DON, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素内标)和外标法结合定量, 采用负离子扫描模式, 同时测定桑椹中 11 种真菌毒素, 为桑椹的安全健康食用提供科学的实验数据.

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

Ultimate 3000 型超高效液相色谱仪串联质谱仪, 配有电喷雾离子源; KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XS205DU 型分析天平(十万分之一, 瑞士 Mettler Toledo 公司); Arium pro D1 纯水处理终端机(德国 Sartorius 公司); PriboFast M226 多功能净化柱(15 mm×85 mm, 美国 Pribolab 公司); 3H16RI 型智能台式高速冷冻离心机(湖南赫仪器装备有限公司).

1.2 试剂

12 种标准品: 黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂(AFG₂)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-ADON)、15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-ADON)、伏马毒素 B₁(FB₁)、伏马毒素 B₂(FB₂)、伏马毒素 B₃(FB₃)及¹³C-脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素(¹³C-DON)均购自(美国 Pribolab 公司); 质控样购自(美国 Romer Labs Diagnostic Gmbh 公司); 甲醇、乙腈购自(色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 实验室所用水为去离子水.

1.3 实验方法

实验材料 桑椹购自昆明市区内农贸市场及水果店, 提前将 2 份新鲜桑椹冰箱冷藏存储 48 h, 2 份室温敞口放置 48 h, 让其产生较明显的霉菌. 实验分析时另购买桑椹同时进行实验.

标准溶液的配制 用乙腈将 11 种真菌毒素的单标准溶液稀释为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合标准储备液, ¹³C-ADON 稀释

* 2017 年度昆明市卫生计生科研课题(2017-12-06-003).

** 通讯联系人, E-mail: jmy0778@163.com

为 $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 由于各种真菌毒素的响应程度不同, 配制不同浓度的标准系列溶液, 使用时用初始比例的流动相溶液配制标准工作液, 每个标准工作液中含有 $20 \mu\text{L}^{13}\text{C-DON}$ 的内标物质。

样品溶液的制备 分别精确称取经粉碎均匀后的桑椹样品 5.0 g , 置于 50 mL 具塞离心样品管中, 加入 10 mL 70% 甲醇水溶液, 于超声仪上超声提取 1 h , 离心 5 min ($10000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$), 量取 5 mL 上清液通过 M226 多功能净化柱净化。准确量取 2 mL 净化后的样品溶液, 用氮吹仪浓缩至干, 最后用初始比例的流动相溶解并定容至 1 mL , 经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 待测备用。

液相色谱条件 色谱柱为 Waters Acquity uplc hss T3 C_{18} 柱 ($2.1 \text{ mm}\times 100 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$), 流动相 A 为乙腈, B 为 0.2% 氨水溶液, 流速为 $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为 $40 \text{ }^\circ\text{C}$, 进样体积为 $5 \mu\text{L}$, 运行 6.0 min 。

质谱条件 离子源: 电喷雾离子源 (ESI); 离子源温度: $600 \text{ }^\circ\text{C}$; 扫描方式: 负离子扫描; 离子喷雾电压: -4500.0 V ; 气帘气压力: 25 psi ; 雾化气压力: 55 psi ; 辅助气压力: 55 psi ; 检测模式: 多反应监测 (MRM) 模式。由 Q1 MS 全扫描模式确定 12 种化合物的母离子 (M1-) m/z , MS2 碎片离子扫描模式确定各碎片离子的信息, 选取峰值相对较高的 2 个碎片离子作为定量和定性离子, 并通过 MRM 扫描模式优化质谱锥孔电压及碰撞能。具体参数见表 1。

表 1 12 种真菌毒素的 UPLC-MS/MS 测定参数

真菌毒素	保留时间/min	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间/ms	锥孔电压/V	碰撞能/V
DON	1.93	295.0	137.9*	100	60	21
			265.1	100	60	14
3-ADON	2.61	337.0	307.1*	100	55	13
			173.0	100	55	13
15-ADON	2.53	337.0	150.0*	100	61	20
			219.0	100	61	14
$^{13}\text{C-ADON}$	1.92	310.0	279.1	100	59	15
			144.9	100	59	23
FB_1	0.91	720.2	157.0*	100	140	42
			562.3	100	140	35
FB_2	0.91	704.2	546.2*	100	110	34
			157.1	100	110	40
FB_3	0.90	704.2	156.9*	100	110	40
			546.3	100	110	35
AFB_1	3.44	310.9	267.1*	100	50	40
			182.9	100	50	45
AFB_2	3.23	313.0	214.0*	100	70	44
			241.9	100	70	37
AFG_1	3.20	327.0	239.8*	100	40	30
			283.1	100	40	14
AFG_2	3.00	328.9	284.9*	100	42	14
			242.8	100	42	26
ZEN	2.05	317.0	175.0*	100	110	31
			130.9	100	110	36

注: * 为定量离子。

2 结果与讨论

2.1 流动相比例的选择

采用梯度洗脱方式进行分离检测。梯度洗脱程序为: $0-0.5 \text{ min}$, $5\% \text{ A}-30\% \text{ A}$; $0.5-3.0 \text{ min}$, $30\% \text{ A}-60\% \text{ A}$; $3.0-3.5 \text{ min}$, $60\% \text{ A}-95\% \text{ A}$; $3.5-4.5 \text{ min}$, $95\% \text{ A}$; $4.5-5.0 \text{ min}$, $95\% \text{ A}-20\% \text{ A}$; $5.0-6.0 \text{ min}$, $5\% \text{ A}$ 。按照上述最佳条件下得到 11 种真菌毒素的多反应监测 MRM 色谱图。

2.2 方法的线性关系、检出限及定量限

由于 11 种真菌毒素在质谱 MRM 模式下响应程度不同, 将 11 种真菌毒素分别配制不同浓度的混合标准系列溶液, 以定量离子碎片离子峰的峰面积为纵坐标, 标准物质的质量浓度为横坐标, 绘制标准系列曲线, 实验表明, 11 种真菌毒素在负离子模式下均呈良好的线性关系, 具体数据见表 2。各真菌毒素标准溶液线性范围的最低浓度点稀释并进样测定, 以 3 倍信噪比 (S/N) 所对应的浓度计算检出限 (LOD), 以 10 倍信噪比 (S/N) 所对应的浓度计算定量限 (LOQ),

具体结果见表 2.

表 2 11 种真菌毒素的线性方程、线性范围、相关系数、检出限及定量限

真菌毒素	线性方程	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	相关系数	检出限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	定量限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
DON	$Y=2.46\times 10^5 X+2418.58$	0.05—15.00	0.9994	0.05	0.15
3-ADON	$Y=1.62\times 10^5 X+2174.69$	0.05—15.00	0.9996	0.05	0.15
15-ADON	$Y=3.21\times 10^4 X+380.26$	0.05—15.00	0.998	0.05	0.15
FB ₁	$Y=3.96\times 10^3 X-3548.32$	0.1—20.00	0.9994	0.1	0.33
FB ₂	$Y=1.26\times 10^4 X-1578.36$	0.1—20.00	0.998	0.1	0.33
FB ₃	$Y=1.54\times 10^4 X-2426.54$	0.1—20.00	0.998	0.1	0.33
AFB ₁	$Y=2.87\times 10^4 X-7546.32$	0.5—15.00	0.9991	0.05	0.15
AFB ₂	$Y=2.63\times 10^4 X-14875.21$	0.5—15.00	0.9994	0.02	0.07
AFG ₁	$Y=3.54\times 10^5 X-4325.12$	0.5—15.00	0.9993	0.05	0.15
AFG ₂	$Y=3.59\times 10^4 X-1342.32$	0.5—15.00	0.9993	0.02	0.07
ZEN	$Y=4.59\times 10^5 X-1564.32$	0.1—20.00	0.9997	0.05	0.15

2.3 加标回收率和精密度

分别称取 18 份 5.0 g 新鲜桑椹样品, 根据 11 种真菌毒素的标准线性范围, 进行添加 1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 不同浓度的加标回收实验, 每个浓度进行 6 个水平测定, 按照“1.4.2”前处理条件处理并测定, 同时测定相对标准偏差, 加标回收率范围为 70.6%—104.3%, 相对标准偏差范围为 0.74%—7.27%.

2.4 稳定性和准确度

混合标准溶液在放置 0、5、12、28、48 h 后分别进样 5 μL , 由各真菌毒素峰面积计算相对标准偏差, 黄曲霉毒素 B₁ 为 0.79%、黄曲霉毒素 B₂ 为 0.68%、黄曲霉毒素 G₁ 为 0.74%、黄曲霉毒素 G₂ 为 0.81%、玉米赤霉烯酮为 1.76%、脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 1.89%、3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 2.21%、15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 2.34%、伏马毒素 B₁ 为 3.57%、伏马毒素 B₂ 为 3.64%、伏马毒素 B₃ 为 4.21%。实验数据表明 11 种真菌毒素在 48 h 内处于稳定状态。

分别准确称取不同浓度的真菌毒素质控样 5.0 g 各 3 份进行处理并进行检测(结果见表 3)。实验结果表明, 检测值均在质控样标准证书参考值允许范围内, 样品提取效率较高, 实验数据准确度良好。

表 3 准确度实验结果($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

真菌毒素	DON	FB ₁	FB ₂	FB ₃	AFB ₁	AFB ₂	ZEN
检测平均值	791	613	140	90	3.9	9.0	86
参考值 $\pm$ 扩展不确定度	821 $\pm$ 64	667 $\pm$ 78	156 $\pm$ 21	89 $\pm$ 22	4.3 $\pm$ 1.4	8.8 $\pm$ 3.1	87 $\pm$ 7

3 结论

通过对桑椹样品进行实验分析, 均未检测出 11 种真菌毒素, 实验数据表明日常食用的新鲜桑椹在短期储存内不易滋长已知的 11 种真菌毒素, 但亦要做好存储工作。该超高效液相色谱-串联质谱法测定 11 种真菌毒素的线性关系良好, 加标回收率较好, 样品前处理便捷, 准确度及灵敏度较高, 适于桑椹中多种真菌毒素的检测。