

三重四极杆质谱测定玉米中的 3 种伏马毒素

LCMSMS-098

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 种伏马毒素的方法。样品经乙腈 / 水提取、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。3 种伏马毒素在 5 ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好；对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 50 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 0.15 ~ 0.49% 和 2.03 ~ 4.67% 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 3 种伏马毒素的加标回收率在 86.75%、76.68% 和 86.96% 之间；在某玉米样品中检出伏马毒素 FA1、FA2 和 FA3，浓度分别为 17、16 和 17 ng/mL。

关键词：伏马毒素 玉米 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

伏马毒素 (Fumonisin FB) 是一种霉菌毒素，是由串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme* Sheld) 产生的水溶性代谢产物，是一类由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的结构类似的双酯化合物。动物试验和流行病学资料已表明，伏马毒素主要损害肝肾功能，能引起马脑白质软化症和猪肺水肿等。2001 年美国食品与药物管理局 (FDA) 发布了供人类食用的玉米和玉米产品中伏马毒素最高限量指导性公告，规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量

为 2 mg/kg；同时，FDA 的畜牧医学中心 (CVM) 也发布了动物饲料中伏马毒素的最高限量指导性公告，规定其限量范围为 1~50 mg/kg。目前检测伏马毒素常用方法为免疫亲和柱净化后的荧光仪检测法和 HPLC 法，我国还没有使用 LC-MS/MS 检测伏马毒素的国家标准。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 种伏马毒素的方法，供相关检测人员参考。

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 mm I.D. × 75 mm L., 1.6 μm
 流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液；
 B - 乙腈 / 甲醇 (v/v = 1/1)
 流速：0.35 mL/min
 进样体积：10 μL
 柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 55%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	55
3.20	80
3.30	100
3.80	100
4.00	55
6.00	Stop

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040
 离子源：ESI，正离子扫描
 离子源接口电压：4.5 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°C
 加热模块温度：400°C
 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 驻留时间：50 ms
 延迟时间：3 ms
 MRM 参数：见表 2

表 2MRM 参数

编号	名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	伏马毒素 1(FB1)	722.40	352.30*	50.0	-26.0	-41.0
			334.15	50.0	-26.0	-43.0
2	伏马毒素 2 (FB2)	706.40	336.25*	50.0	-26.0	-42.0
			318.25	50.0	-26.0	-41.0
3	伏马毒素 3(FB3)	706.40	336.20*	50.0	-26.0	-39.0
			318.35	50.0	-26.0	-39.0
4	¹³ C-FB1(内标)	756.45	356.35	50.0	-22.0	-47.0

*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 / 水 (50/50) 配制成 10 mg/L 的混合标准溶液, 用乙腈 / 水 (50/50) 逐级稀释成浓度为 100、50、20、10、5 ng/mL 的标准工作液。内标物 ¹³C-FA1 的浓度为 10 ng/mL。

样品前处理方法:

准确称取固体粉末样品 2.0 g 于 40 mL 的离心管中, 加入 10 mL 乙腈 / 水 (50/50) 溶液。均质 3 分钟, 12000 转, 4℃下离心 15 分钟, 准确吸取上层清液 1 mL 于 10 mL 玻璃试管中, 用 3:1 的甲醇水稀释到 10 mL, 过事先用 5 mL 甲醇和 5 mL 的 3:1 的甲醇水活化的 MultiSep®211 FUM 柱, 用 5 mL 3:1 的甲醇水和 5 mL 甲醇淋洗, 用 10 mL 甲醇乙酸 (99:1) 洗脱, 收集洗脱液于 10 mL 小试管中, 用氮气在 50℃下吹干, 再用乙腈 / 水 (50/50) 定容至 1 mL, 涡旋 30 s, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤于进样瓶中, 以备进样。

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。

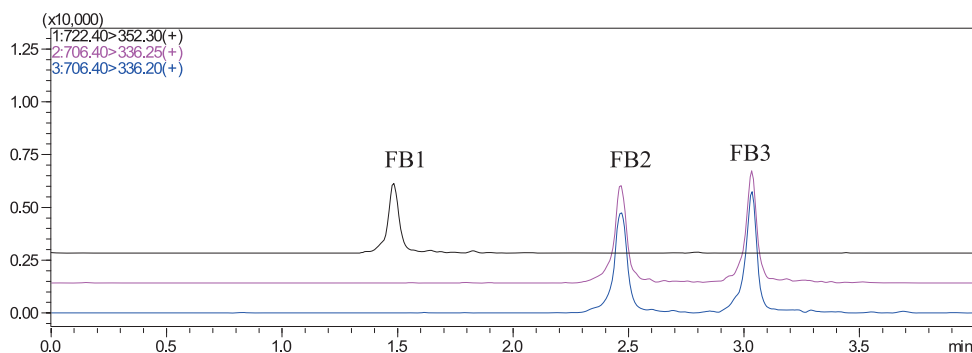


图 1 10ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 5、10、20、50、100 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。3 种伏马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。

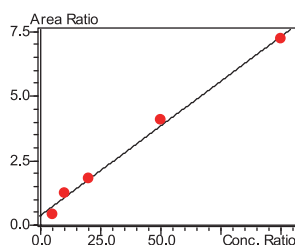


图 2 FB1 的标准工作曲线

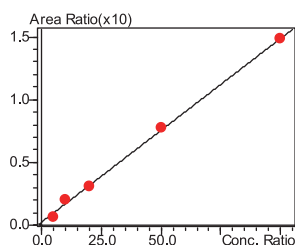


图 3 FB2 的标准工作曲线

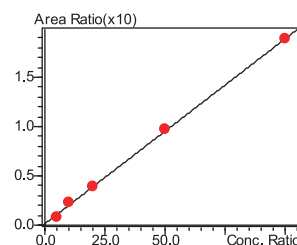


图 4 FB3 的标准工作曲线

表 3 3 种伏马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	FA1	$Y = (0.0694484)X + (0.385874)$	0.9968	0.03	0.09
2	FA2	$Y = (0.146872)X + (0.201620)$	0.9990	0.24	0.73
3	FA3	$Y = (0.187816)X + (0.171904)$	0.9995	0.34	1.04

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 50 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 0.15 ~ 0.49% 和 2.03 ~ 4.67% 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% (5ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
FB1	0.34	4.66	0.22	4.03	0.21	3.61
FB2	0.49	3.94	0.26	4.35	0.12	2.84
FB3	0.16	4.67	0.24	2.03	0.15	3.60

2.4 回收率考察

以空白玉米样配制加标溶液，FA1、FA2 和 FA3 的加标浓度分为 50、10 和 10 ng/mL，得到色谱图如图 5 所示。3 种伏马毒素 FA1、FA2 和 FA3 加标回收率在分别为：86.75、76.68 和 86.96%。

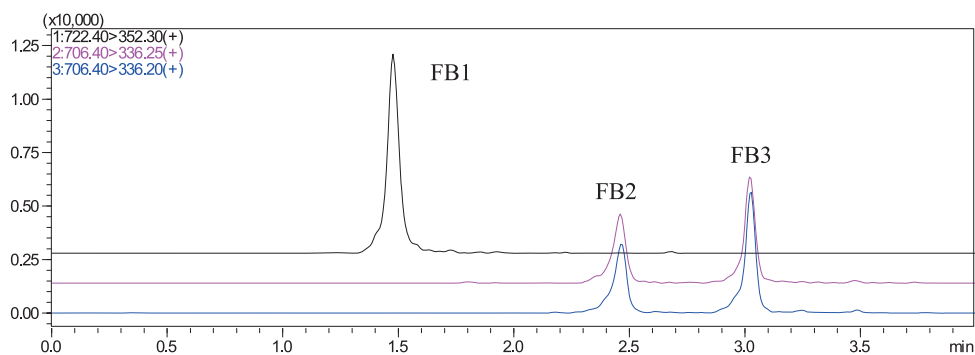


图 5 基质加标样品的色谱图

2.5 玉米样品分析

在某玉米样品中检出 FA1、FA2 和 FA3，浓度分别为 17、16 和 17 ng/mL，色谱图见图 6。

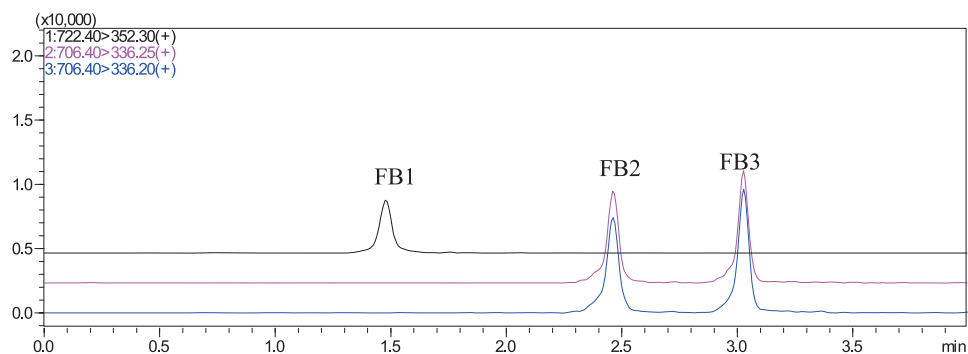


图 6 玉米样品的色谱图

■ 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 种伏马毒素的方法。3 种伏马毒素在 5 ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好，基质加标回收率良好；低、中、高 3 浓度的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.15 ~ 0.49% 和 2.03 ~ 4.67% 之间，仪器精密度良好；在某玉米样品中检出伏马毒素 FA1、FA2 和 FA3，浓度分别为 17、16 和 17 ng/mL。