Excellence in Science

LC-MS/MS 定量测定玉米中的伏马毒素含量

LCMSMS-127

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、20 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的准确度和峰面积的相对标准偏差分别在 87.6 ~ 104.8% 和 0.97 ~ 10.30% 之间；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分别为 99.01、104.17 和 97.23%；在某玉米样品中检出伏马毒素 FB1、FB2 和 FB3，浓度分别为 42.76、6.30 和 4.89 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，对热稳定，不易被蒸煮破坏，在多数粮食加工处理过程均比较稳定。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。美国食品与药物管理局 (FDA) 规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量为 2 mg/kg；我国食品安全国家标准《GB2761-2011 食品中真菌毒素限量》中还没有规定粮食中伏马毒素的限量。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-20A$_5$ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 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： UHPLC C18 2.0 mmI.D. × 100 mmL.

流动相：A – 0.1% 甲酸水溶液；

B – 乙腈 / 甲醇 （v/v = 1/1）

流速： 0.4 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40℃

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	50
3.20	75
3.50	100
4.00	100
4.20	505
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℃

加热模块温度：400℃

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2 MRM参数

编号	中文名称	英文名称(简称)	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	伏马毒素B1	Fumonisin B1 (FB1)	116355-83-0	722.40	352.30*	-26	-41	-25
					334.15	-26	-43	-25
2	伏马毒素B2	Fumonisin B2 (FB2)	116355-84-1	706.40	336.25*	-26	-42	-26
					318.25	-26	-41	-23
3	伏马毒素B3	Fumonisin B3 (FB3)	136379-59-4	706.40	336.20*	-26	-39	-24
					318.35	-26	-39	-25
4	^{13}C-伏马毒素B1	^{13}C-FB1（内标）	-	756.45	356.35	-22	-47	-26

*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, v/v) 配制为混合标准溶液，然后逐级稀释成低浓度的标准工作液。FB1 浓度为 100、50、20、10、5 ng/mL；FB2 和 FB3 浓度为 50、25、10、5、2.5 ng/mL。内标物 ^{13}C–FB1 的浓度为 10 ng/mL。

样品前处理方法：

提取：准确称取 2 g 样品于 50 mL 离心管中，加入同位素内标 10 ng（100 ng/mL，100 微升），加入 10 mL 乙腈 / 水（50/50，v/v），均质提取 3 min，以 10000 r/min 于 4℃下离心 10 min，将上清液转移至另一离心管中，用 NaOH（0.1 mol/L）溶液调 pH 值到 6 ~ 9。

净化：取 1.5 mL 提取液，加入 35 mL 0.1% 吐温 –20/PBS 缓冲溶液，混合均匀后过免疫亲和柱，流速控制在 1 ~3 mL/min，用 10 mL PBS 缓冲液淋洗免疫亲和柱，用 3 × 1 mL 甲醇 / 乙酸（98/2，v/v）洗脱免疫亲和柱，收集洗脱液，55℃下氮吹至干，乙腈 / 水溶液（20/80，v/v）定容至 1 mL。涡旋 30 s，过 0.22 μm 微孔滤膜后供进样。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 的 FB1、5 ng/mL 的 FB2 和 5 ng/mL 的 FB3 的混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

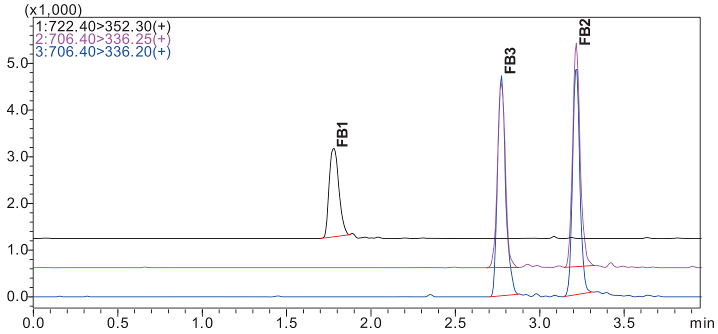

图1 混合标准样品的MRM色谱图

2.2 线性关系

将 1.3 所示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。

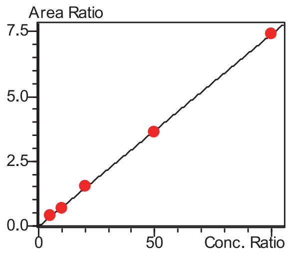

图2 FB1的标准工作曲线

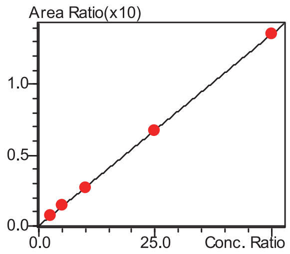

图3 FB2的标准工作曲线

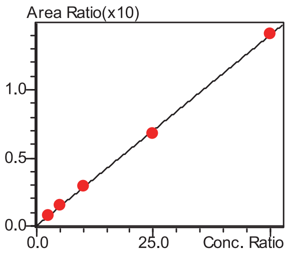

图4 FB3的标准工作曲线

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	FB1	Y = 0.074X -0.0173	0.9998	0.14	0.48
2	FB2	Y=0.270X+0.0297	0.9999	0.09	0.28
3	FB3	Y=0.279X+0.0388	0.9996	0.09	0.28

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的准确度和峰面积的相对标准偏差分别在 87.6 ~ 104.8% 和 0.97 ~ 10.30% 之间。

表4 3种伏马毒素的准确度及峰面积相对标准偏差（RSD%）

Compound	5 ng/ml (n=6)		20 ng/ml (n=6)		100 ng/ml (n=6)	
	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%	Accuracy/%	RSD/%
Fumonisin FB1	104.8	10.30	101.4	1.88	100.0	1.47
Fumonisin FB2	87.6	1.78	101.6	1.96	100.3	2.35
Fumonisin FB3	98.5	4.90	104.6	2.36	101.3	0.97

2.4 回收率考察

以空白玉米样配制加标溶液，FB1、FB2 和 FB3 的加标浓度分为 20、10 和 10 ng/mL，得到色谱图如图 5 所示。3 种伏马毒素 FB1、FB2 和 FB3 加标回收率在分别为：99.01、104.17 和 97.23%。

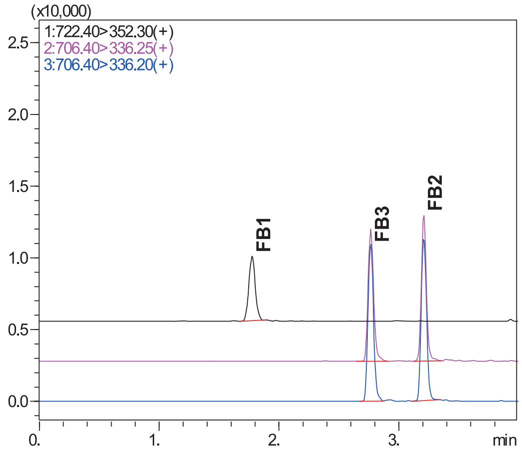

图5 基质加标样品的色谱图

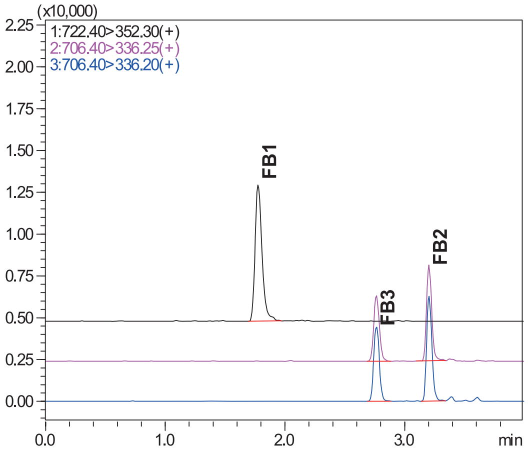

图6 阳性玉米样品的色谱图

2.5 玉米样品分析

考察了市售的玉米样品，在某市场出售的玉米样品中检出了 3 种毒素，浓度见表 5，色谱图见图 6。

表5 阳性样品的检出浓度

阳性样品	FB1	FB2	FB3
浓度（ng/mL）	42.76	6.30	4.89

结论

本文建立了一种快速准确测定玉米中 3 种伏马毒素的方法，该方法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 联用进行测试。该方法测试时间仅有 6 min；低、中、高 3 个浓度标准品的准确度和峰面积的相对标准偏差分别在 87.6 ~ 104.8% 和 0.97 ~ 10.30% 之间; 3 种伏马毒素 FB1 、FB2 和 FB3 加标回收率在分别为: 99.01、104.17 和 97.23%，方法准确度高。