

- 研究[J]. 检验检疫学, 2005, 15(4): 4-8.
- [20] Seo K H, Brackett R E. Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay [J]. Journal of Food Protection, 2005, 61(1): 59-63.
- [21] 张霞, 高旗利, 罗茂凰, 等. 实时荧光 PCR 对奶粉中坂崎肠杆菌的检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(2): 214-241.
- [22] 张宏伟, 于佳, 郑文杰, 等. 利用环介导等温扩增技术对奶粉中阪崎肠杆菌进行检测[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(6): 114-117.

实验技术与方法

同位素稀释-液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物

王炼^{1,2}, 王希希^{1,2}, 张新申²

(1. 成都市疾病预防控制中心, 四川 成都 610041; 2. 四川大学, 四川 成都 610041)

摘要:目的 建立动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物残留量的同位素稀释-液相色谱-串联质谱的检测方法。方法 样品加入同位素内标后, 用甲醇提取, 离心后上清液经50℃水浴氮气吹至近干, 乙酸乙酯溶解残渣后, 采用氨基小柱固相萃取, 正己烷-乙酸乙酯(20:80, V/V)和乙酸乙酯两种溶液洗脱后, 氮气吹干, 流动相溶解后, 涡旋混匀过0.22 μm有机滤膜后, LC-MS/MS多反应离子监测(MRM)模式检测, 内标法定量。结果 6种玉米赤霉醇类化合物在3类动物源性食品中的加标回收率为84.8%~103.6%; RSD为3.7%~8.6%; 检出限和定量限分别为0.03~0.07 μg/kg和0.10~0.24 μg/kg。结论 该方法灵敏、准确, 适用于动物源性食品中玉米赤霉醇类物质的检测。

关键词:玉米赤霉醇; 液相色谱-串联质谱法; 动物源性食品; 同位素; 兽药残留; 违禁药物

中图分类号: R155.5; O657.7 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)05-0530-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.05.010

Determination of 6 zearanols residues in animal derived foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution

WANG Lian, WANG Xi-xi, ZHANG Xin-shen

(Chengdu Centre for Disease Control and Prevention, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To establish a method for determination of 6 zearanols residues in animal derived foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution. **Methods** The sample was added isotope internal standard and extracted using methanol. Methanol was nearly dried-up under nitrogen and the residue was dissolved with ethyl acetate. After solid phase extraction of amino cartridge, the eluent was dried-up by nitrogen at 50℃. The analytes were dissolved by the mobile phase and determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results** The recoveries of analytes were 84.8%-103.6%, and the relative standard deviations of detection were 3.7%-8.6%. The limits of detection and quantification were 0.03-0.07 μg/kg and 0.10-0.24 μg/kg. **Conclusion** The method is sensitive, accurate and it can meet the determination requirements of 6 zearanols residues in animal derived foods.

Key words: Zearanol; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; animal derived food; isotope; residue of veterinary drug; forbidden drug

玉米赤霉醇类化合物(zearanols, ZALs)属于同化激素的一种, 有促进细胞的生长与分化、扩增肌肉、

增强骨强度等作用, 常被用于畜牧业养殖中, 以促进动物生长。ZALs通常包括玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZON)、α-玉米赤霉醇(α-zearalanol, α-ZAL)、β-玉米赤霉醇(β-zearalanol, β-ZAL)、α-玉米赤霉烯醇(α-zearalenol, α-ZOL)、β-玉米赤霉烯醇(β-zearalenol, β-ZOL)、玉米赤霉酮(zearalanone, ZAN)

收稿日期: 2015-06-28

基金项目: 中国博士后面上项目资助(2012M521703)

作者简介: 王炼 男 副主任技师 研究方向为有机污染物残留分析

E-mail: septwolvesnjwl@163.com

等6种化合物^[1]。由于ZALs有激素作用,通过食物链被人体吸收后,会引起心血管、肝、生殖系统、免疫系统等方面的病变甚至肿瘤。为了保护人体健康,我国和全球大多数国家都将ZALs作为禁止用于家畜生产的药物。然而,由于ZALs良好的促生长效果,许多不法商贩仍在畜禽养殖过程中使用ZALs,导致其在动物源性食品中的残留。因此,研究和开发动物源性食品中ZALs的检测技术,对于保护食品安全具有重要意义。

目前,针对玉米赤霉醇类化合物的研究国外主要集中在代谢途径、毒性降解规律等方面^[2];检测方法则国内报道较多,主要为薄层色谱法、免疫分析法、高效液相色谱法、气相色谱-质谱法和液相色谱-质谱法等^[3-8]。薄层色谱法简便、成本低,但灵敏度不高,通常只能进行半定量分析;免疫分析法操作简单、速度快,但易出现假阳性,通常用在筛选试验中;高效液相色谱法快速、高效,能同时测定多种物质,但在有复杂基质干扰时,一定程度上存在定性难度;气相色谱-质谱法同样具备多组分同时测定的优点,但由于要衍生,使操作变得繁琐;液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)结合了高效液相色谱高通量、快速和串联质谱定性准确的优点,是目前测定ZALs方法中最为通用的检测手段。本方法采用同位素稀释-液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物残留量,相比文献方法^[8]、农业部1025号公告—19—2008《动物源性食品中玉米赤霉醇类药物残留检测液相色谱-串联质谱法》^[9](以下简称公告方法)和GB/T 21982—2008《动物源食品中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》^[10],采用内标法的液相色谱-串联质谱检测,方法有效性都有所提升。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Thermo Ultimate DGP-3600 高效液相色谱-AB Sciex QTrap3200 串联质谱仪(美国 Thermo Fisher Scientific)、ABSciex GX-274 四通道固相萃取仪(美国 Gilson)、Vortex Genius 3 型涡旋混匀器、氨基固相萃取小柱(Sep-Pak, 3 ml, 500 mg)。玉米赤霉烯酮(ZON)、 α -玉米赤霉醇(α -ZAL)、 β -玉米赤霉醇(β -ZAL)、 α -玉米赤霉烯醇(α -ZOL)、 β -玉米赤霉烯醇(β -ZOL)、玉米赤霉酮(ZAN)6种标准溶液浓度为10 $\mu\text{g/ml}$ (乙腈做溶剂,1 ml装),玉米赤霉烯酮同位素内标(¹³C₁₈-ZON)内标溶液浓度为25 $\mu\text{g/ml}$

(乙腈做溶剂,1.2 ml装)均购自美国 Romer;甲醇、正己烷、乙酸乙酯、甲酸均为色谱纯。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备

将¹³C₁₈-ZON内标溶液用乙腈稀释成500 ng/ml的应用液,6种玉米赤霉醇类化合物分别用乙腈配制5、10、20、50和100 ng/ml的混合标准溶液,其中各标准溶液分别含¹³C₁₈-ZON内标物50 ng/ml。

1.2.2 样品前处理

提取:称取样品5.00 g于50 ml具塞离心管中,加入浓度为50 ng/ml内标溶液100 μl ,加入甲醇15 ml,涡旋混匀1.0 min,10 000 r/min离心5 min,取上清液,重复提取一次,合并提取液。加入20 ml正己烷,摇床混匀2 min,10 000 r/min离心5 min,弃上层正己烷。下层溶液收集于锥形离心管中,50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹扫至近干,加入5 ml乙酸乙酯,涡旋混匀1 min,充分静置后取上清液至固相萃取样品管中,加10 ml正己烷于离心管中,溶解残渣,涡旋混匀1 min,取上清液,再加10 ml正己烷重复提取一次,合并上清液在固相萃取样品管中。

净化:预先活化氨基固相萃取小柱(加无水硫酸钠2 g,玻璃棒混匀,依次用乙酸乙酯、正己烷各5 ml活化);提取后的上清液过柱,控制流速不高于1 ml/min,再依次用正己烷、正己烷-乙酸乙酯(60:40, V/V)各5 ml淋洗后,分别用正己烷-乙酸乙酯(20:80, V/V)和乙酸乙酯各4 ml洗脱,合并洗脱液,50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干;加入0.1%甲酸水-甲醇(90:10, V/V)1 ml溶解残渣,涡旋混匀1 min,过0.2 μm 有机滤膜,供测定。

1.2.3 定性和定量测定方法

保留时间结合质谱信息(1个前体离子+2个产物离子)定性。样品溶液在与标准溶液相同条件下测定,保证其浓度在标准曲线浓度范围内。以最高丰度为基峰,待测物离子与标准物质离子相对丰度变化在以下范围内可以定性确认为与标准物质一致(相对丰度>50%, $\pm 20\%$;相对丰度20%~50%, $\pm 25\%$;相对丰度10%~20%, $\pm 30\%$;相对丰度 $\leq 10\%$, $\pm 50\%$)。确定灵敏度高的产物离子为定量离子,内标法计算定量。

1.2.4 仪器条件

色谱条件:色谱柱:Halo C₁₈液相色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 2.7 μm),柱温40 $^{\circ}\text{C}$,进样体积10 μl ,流速300 $\mu\text{l/min}$,梯度洗脱条件见表1。

质谱条件:电离模式:ESI⁻;气帘气压力(CUR)0.17 Mpa;碰撞气压力(CAD)0.034 Mpa;离子源电压-4500 V;离子源温度550 $^{\circ}\text{C}$;雾化气

表1 梯度洗脱条件

Table 1 Condition of gradient elution

时间/min	甲醇/%	0.1% 甲酸/%
0.00	10	90
10.00	85	15
13.00	85	15
13.01	10	90
18.00	10	90

压力 0.34 MPa; 辅助加热气压力 0.34 MPa; 扫描模式: 多反应离子监测 (MRM), 离子条件见表 2。

表2 玉米赤霉醇类化合物及内标的 MRM 条件

Table 2 MRM condition of zeranols and internal standard

化合物	前体离子	产物离子	去簇电压 /V	入口电压 /V	碰撞池入口电压/V	碰撞能量 /eV	碰撞池出口电压/V
α-玉米赤霉醇	321.1	277.1 ^a	-45	-7	-28	-32	-2
		303.2	-45	-7	-28	-30	-2
β-玉米赤霉醇	321.1	277.1 ^a	-45	-7	-28	-32	-2
		303.2	-45	-7	-28	-30	-2
α-玉米赤霉烯醇	319.1	275.1 ^a	-52	-7	-28	-27	-2
		301.1	-52	-7	-28	-29	-2
β-玉米赤霉烯醇	319.1	275.1 ^a	-52	-7	-28	-27	-2
		301.1	-52	-7	-28	-29	-2
玉米赤霉酮	319.2	275.2 ^a	-48	-7	-28	-27	-2
		205.1	-48	-7	-28	-31	-2
玉米赤霉烯酮	317.2	175.0 ^a	-45	-7	-28	-32	-2
		273.2	-45	-7	-28	-26	-2
¹³ C ₁₈ -玉米赤霉烯酮	335.3	185.2	-50	-7	-28	-32	-2

注: a 为定量离子

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 液相色谱条件的优化

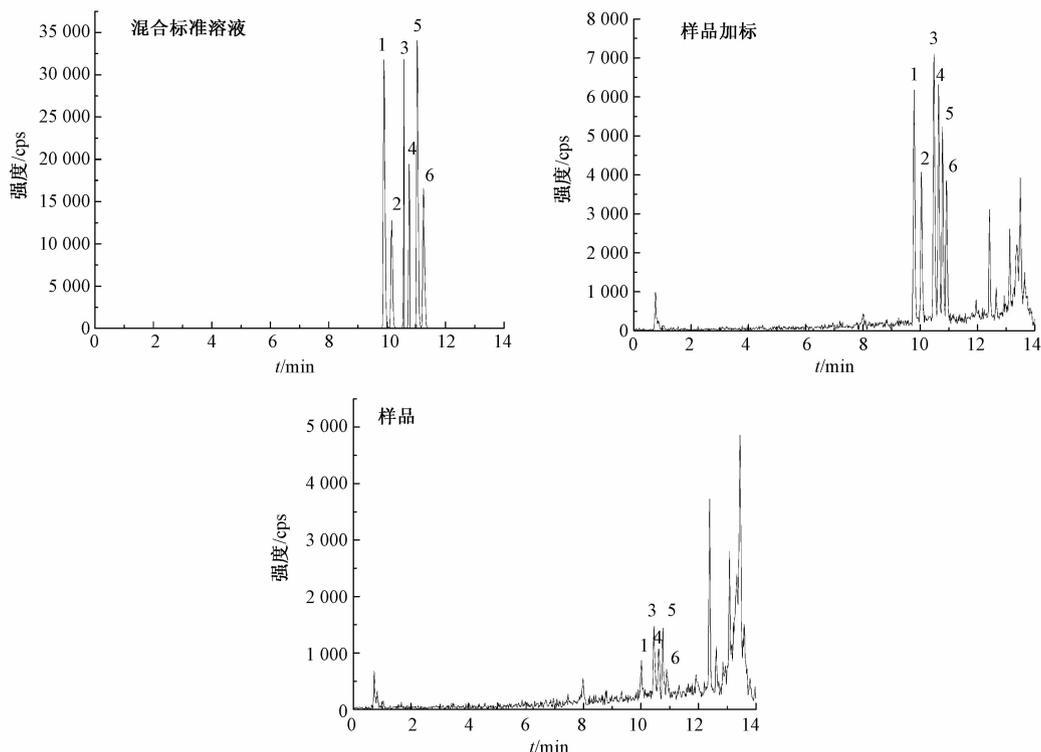
6种 ZALs 彼此理化性质相近, α-玉米赤霉醇与 β-玉米赤霉醇, α-玉米赤霉烯醇与 β-玉米赤霉烯醇互为手性同分异构体, 较难分离; 此外, 动物性食品基质较复杂, 干扰成分多。通过试验发现, 选用 0.1% 甲酸和甲醇作为流动相, 6种 ZALs 在 9.5 ~ 11.5 min 内分离良好, 能有效避开样品基质的干扰, 6种玉米赤霉醇类化合物 (浓度均为 50 ng/ml) 和内标 (浓度为 50 ng/ml) 多反应离子监测 (MRM)、阳性样品加标 (6种物质加标量为 10 μg/kg) 和阳性样品的色谱图见图 1。

2.1.2 质谱条件的优化

首先用浓度为 1.0 μg/ml 的 6种待测物和内标进行全扫描, 得到前体离子; 第二步进行产物离子扫描, 确定两个丰度相对较高的产物离子, 应尽量避免分子量低于 100 的离子; 第三步建立多反应离子监测 (MRM) 扫描模式, 优化去簇电压 (DP), 入口电压 (EP)、碰撞池入口电压 (CEP)、碰撞能量 (CE) 和碰撞池出口电压 (CXP) 等质谱参数, 见表 2。

2.2 净化小柱的优化

单独检测玉米赤霉烯酮的方法中, 多用到多功



注: 1. β-玉米赤霉醇; 2. β-玉米赤霉烯醇; 3. α-玉米赤霉醇; 4. α-玉米赤霉烯醇; 5. 玉米赤霉酮; 6. 玉米赤霉烯酮和 ¹³C₁₈-玉米赤霉烯酮

图1 6种玉米赤霉醇类化合物和内标的 MRM 色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of 6 zeranols and internal standard

能净化柱(Mycosep226),本试验比较了氨基固相萃取小柱与多功能净化柱对待测ZALs药物的净化和吸附效果,发现对玉米赤霉烯酮,多功能净化柱吸附率>90%,但对其他5种ZALs药物吸附率较低。综合考虑,选用对6种ZALs药物吸附率均>84.8%的氨基固相萃取小柱。

表3 方法的线性回归方程、相关系数、检出限、定量限、回收率和精密度

Table 3 Regression equations, correlation coefficient, limits of determination, limits of quantification, recoveries of samples and relative standard deviation of the method

化合物	回归方程	相关系数 r	检出限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/(精密度/%)		
					加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
					0.3	10	60
α -玉米赤霉醇	$y = 0.0241x - 0.00183$	0.999 6	0.04	0.15	91.1(6.1)	94.8(5.0)	99.8(4.9)
β -玉米赤霉醇	$y = 0.0248x - 0.0049$	0.999 5	0.04	0.15	93.8(5.2)	97.3(6.1)	101.2(3.9)
α -玉米赤霉烯酮	$y = 0.0206x + 0.00731$	0.999 4	0.05	0.16	88.9(7.4)	96.5(4.0)	98.2(4.1)
β -玉米赤霉烯酮	$y = 0.0203x + 0.0204$	0.999 7	0.03	0.10	90.5(4.8)	98.9(3.9)	103.6(4.3)
玉米赤霉酮	$y = 0.0189x - 0.00309$	0.998 9	0.07	0.24	84.8(6.9)	90.1(4.4)	96.4(5.1)
玉米赤霉烯酮	$y = 0.0215x - 0.00163$	0.999 6	0.06	0.20	91.0(8.6)	97.8(7.0)	102.4(3.7)

2.4 方法有效性

在优化的色谱和质谱条件下,6种ZALs药物在5~100 ng/ml线性范围有较好的相关性;以3倍信噪比($S/N=3$)所对应的药物浓度为检出限,以10倍信噪比($S/N=10$)所对应的药物浓度为定量限,得到6种ZALs药物检出限在0.03~0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限在0.10~0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$;选择60、10、0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个浓度水平进行加标回收试验^[11],对已制定最高残留限量(MRL)的最大化学残留量,回收率应在方法定量限、MRL、选一合适点进行三水平试验,每个水平平行做6份,得到加标回收率为84.8%~103.6%、相对标准偏差为3.7%~8.6%,见表3。

2.5 方法应用

将方法应用于动物性食品中玉米赤霉醇类化合物残留量的检测,在30份猪肉、5份牛肉、5份羊肉中检测到7份含有玉米赤霉酮,含量在1.5~22.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$;6份含有玉米赤霉烯酮,含量在6.3~13.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$;1份含有1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 β -玉米赤霉烯醇。我国目前尚未对动物性食品中的玉米赤霉醇类化合物残留量进行规定,仅对小麦粉、玉米粉、面粉中的玉米赤霉烯酮有限量指标(60 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

3 小结

本文在公告方法的基础上,建立了同位素稀释-液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物残留量的方法,方法灵敏度高,检出限和定量限约相当于公告方法的1/10;由于内标物的应用,相对于公告方法60%~120%的加标回收率,方法准确度更高,含定量限在内的3个水平加标回收率在84.8%~103.6%。方法适用于食品

2.3 内标物的作用

方法选取了玉米赤霉烯酮的同位素: $^{13}\text{C}_{18}$ -玉米赤霉烯酮作为内标物,在前处理过程中加入,最终通过内标法定量。通过与公告方法外标法测定动物性食品中ZALs药物残留方法的比较,加标回收率优于外标法,见表3。

安全风险监测和日常的玉米赤霉醇类化合物的痕量残留检测工作。

参考文献

- [1] 李丽萍,范赛,赵榕,等.固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测猪肉中玉米赤霉醇类的残留量[J].色谱,2013,31(7):703-708.
- [2] Zinedine A, Soriano J M, Moltó J C, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone; an oestrogenic mycotoxin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2007, 45(1): 1-18.
- [3] 罗雪云,胡霞,李玉伟.小麦、小麦制品及玉米中玉米赤霉烯酮的薄层色谱测定[J].卫生研究,1993,22(2):112-115.
- [4] 李沐洁,张明洲,奚茜,等.玉米赤霉烯酮单克隆抗体制备及免疫分析[J].中国食品学报,2013,13(1):145-152.
- [5] 游丽娜,李贤良,郗存显,等.免疫亲和柱净化-高效液相色谱法同时检测鸡蛋中6种玉米赤霉醇类化合物残留量[J].色谱,2012,30(10):1021-1025.
- [6] 张伟,王建平,沈建忠,等.牛肉组织中玉米赤霉醇及相关物残留的气相色谱-质谱法测定[J].畜牧兽医学报,2007,38(5):513-517.
- [7] 徐飞,刘峰,张亚军,等.液相色谱-串联质谱法测定粮食中的玉米赤霉烯酮[J].中国食品卫生杂志,2015,27(2):124-126.
- [8] 王清,王国民,郗存显,等.复合免疫亲和柱净化-液相色谱-串联质谱法同时测定动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物和氯霉素残留量[J].色谱,2014,32(6):640-646
- [9] 中华人民共和国农业部.农业部1025号公告—19—2008 动物源性食品中玉米赤霉醇类药物残留检测 液相色谱-串联质谱法[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. GB/T 21982—2008 动物源食品中玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮和玉米赤霉烯酮残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱

法[S].北京:中国标准出版社,2008.

化管理委员会.GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检验[S].北京:中国标准出版社,2008.

[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准

实验技术与方法

柱前衍生-超高效液相色谱荧光法同时测定
啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂赵舰,程莉,胡黎黎,何健,周春艳,甘源
(重庆市疾病预防控制中心,重庆 400042)

摘要:目的 建立柱前衍生-UPLC-FLD法测定啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂的方法。方法 样品直接经过乙腈稀释提取,提取液经过离心后,取上清液用多功能柱净化,净化液经氮气吹干、用三氟乙酸衍生后,经定容、微孔滤膜过滤、进液相色谱分析,以 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)分离,荧光检测器检测,外标法定量。结果 4种黄曲霉毒素线性范围较宽,相关系数 r 在 0.999 2 ~ 0.999 6 之间,黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 检出限分别为 0.05、0.02、0.08、0.02 μg/kg。加标回收率 90.47% ~ 108.17% 之间,回收率的 RSD 在 0.97% ~ 8.13% 之间。结论 本法操作简便、准确度高、精密度高,干扰性小,能满足啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的同时测定。

关键词:柱前衍生;超高效液相色谱荧光法;啤酒;黄曲霉毒素;食品污染物;霉菌毒素;食品安全

中图分类号:R155.5;TS262.5; 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0534-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.011

Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in beer by pre-column derivatization ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detector

ZHAO Jian, CHENG Li, HU Li-li, HE Jian, ZHOU Chun-yan, GAN Yuan

(Chongqing Center of Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective A method of pre-column derivatization ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detector was developed for simultaneous determination of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) in beers. **Methods**

The aflatoxins were extracted from beer samples by acetonitrile and cleaned up with multifunctional purification column to remove the matrix interference. The purified solution was concentrated and dried with nitrogen. After derivatized by trifluoroacetic acid, the aflatoxins were separated by reverse liquid chromatography (T3) with gradient elution and detected by fluorescence detector (FLD). **Results** The linear ranges of each compound were wide, and relative coefficients were between 0.999 2 and 0.999 6. The recoveries were within 90.47%-108.17%, and the relative standard deviations (RSDs) were between 0.97%-8.13%. The limits of detected (LODs) of 4 aflatoxins were 0.05, 0.02, 0.08 and 0.02 μg/kg in beers, respectively. **Conclusion** The established method was sensitive, selective, accurate and simple for the simultaneous determination of aflatoxins in beers.

Key words: Pre-column derivatization; ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detector; beer; aflatoxin; food contaminant; mycotoxin; food safety

收稿日期:2015-02-09

基金项目:国家食品安全风险评估中心委托项目:啤酒中黄曲霉毒素监测工作

作者简介:赵舰 男 副主任技师 研究方向为食品理化检验
E-mail:zhaojian2000@sina.com

通讯作者:甘源 女 副主任技师 研究方向为食品理化检验
E-mail:463058983@qq.com

黄曲霉毒素是一种强致癌物质,其危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用。在天然污染的食品如花生、玉米、小麦及其制品中易产生黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂(AFG₂)等^[1],也有报道在一些中药材中易产生黄曲霉毒素^[2-3]。目前测定黄曲霉毒素方法较多,有液相色谱质谱法^[4-5]、液