

高效液相色谱和高效液相色谱-质谱法测定粮食中 互隔交链孢霉醇、互隔交链孢霉醇单甲醚及玉米赤霉烯酮

罗毅 刘锋 冯建林 张理汉 胡绪英*

(军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850)

摘要 建立了粮食中互隔交链孢霉醇(AOH)、互隔交链孢霉醇单甲醚(AME)和玉米赤霉烯酮(ZEA)三个毒素的HPLC定性定量分析法和粒子束LC-MS/EI⁺鉴定方法。采用反相色谱,以80%的甲醇水溶液作流动相,这三个毒素在C₁₈色谱柱上彼此间均获得较好的分离。方法对粮食中AOH,AME两个毒素的回收率均在79%以上。AOH,AME两个毒素的最低检出限为1×10⁻⁹g。用所建方法对100多个大骨节病区、非病区的粮食样品进行了检测,结果为阴性。对7个互隔交链孢霉菌培养物检测的结果表明这些培养物中不同程度地产生了AOH,AME两个毒素,含量为13.0~95.9mg/kg。并用粒子束LC-MS技术成功地对这两个毒素进行了鉴定。

关键词 高效液相色谱,粒子束液相色谱/质谱,互隔交链孢霉醇,互隔交链孢霉醇单甲醚,玉米赤霉烯酮,玉米,小麦

1 前言

互隔交链孢霉醇(Alternariol,简称AOH)和互隔交链孢霉醇单甲醚(Alternariol Methyl Ether,简称AME)是互隔交链孢霉菌产生的主要有毒代谢产物。除了对植物和动物具有毒性外,已有文献报道它们还具有致突变作用,并可诱发大鼠前胃和食管乳头状瘤^[1-4]。在我国食管癌高发区的粮食中,真菌学检查的结果也表明互隔交链孢霉菌为优势菌^[6]。近

年来,对大骨节病区粮食中真菌调查的结果表明,除镰刀菌外,互隔交链孢霉菌也普遍存在于病区粮食中。焦玉英等^[6]从青海省大骨节病区粮食中检测到AOH。因此,有必要对病区粮食进行检测。检测AOH和AME的方法,文献报道不多,主要采用薄层色谱法和高效液相色谱法(HPLC)^[6-9],而液-质联用法(HPLC-MS)则未见文献报道。因此,本文建立了同时检测粮食中AOH,AME和ZEA的HPLC法,以及鉴定这些毒素的HPLC-MS法(图1)。

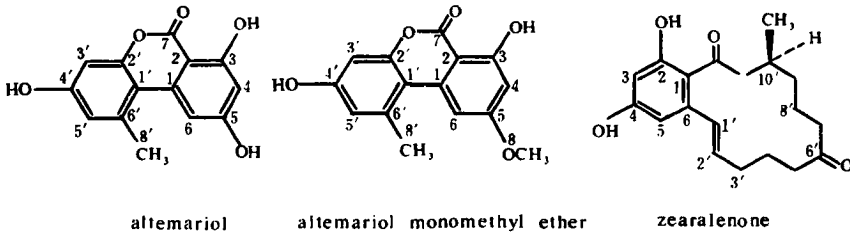


图1 AOH,AME和ZEA的化学结构

2 材料和方法

2.1 仪器和试剂

液相色谱柱:SGE 100GLL-ODS2-8/5液相色谱柱,从SGE公司购进。流动相:80%甲醇水溶液。液相色谱仪:美国SP公司制造,配备Spectra System P2000型二元梯度泵,UV2000型检测器,ISM100型微分记录仪。液相色谱-质谱联用仪:液相

相色谱仪同上,质谱仪为英国VG公司制造 Trio 1000型质谱仪,配备液-质联用 LINC 粒子束接口。

毒素标准品:AOH和AME从上海有机化学所购进;ZEA由北京农业大学李季伦教授赠送。各毒素均配制成1mg/mL的无水乙醇溶液,冰箱储存。

实验中所用有机溶剂均为优级纯试剂。

粮食样品A:病区粮食样品由西安医科大学地

* 作者还有冯翠玲、杨进生和上海农科院植保所的匡开源、史士英
本文收稿日期:1993年11月12日,修回日期:1994年2月8日

方骨病病研究所张失远副研究员提供,均为 1992 年收集的大骨节病病区、非病区的玉米和小麦的样品。-20℃保存至分析。粮食样品 B: 互隔交链孢霉菌培养物由上海农科院植保所匡开源副研究员培养。

2.2 方法

样品提取方法 样品提取方法见参考文献^[10]。

样品分析方法 1)液相色谱分析条件:以 80% 甲醇水作流动相,流速 0.25mL/min,可变波长编程测定,波长设定 237nm 用作测定 ZEA,258nm 用作测定 AOH 和 AME。记录仪纸速 0.2cm/min。外标法测定各毒素的含量。2)液相色谱-质谱联用分析条件:以 80% 甲醇水作流动相,流速 0.5mL/min,解离室温度 60℃,离子源温度 200℃,电离能量 40eV,电离电流 180μA, EI⁺ 电离模型,50~650AMU 全谱扫描,扫描时间间隔 0.1s, He 气用作雾化气,压力保持 137.8952kPa。

3 结果和讨论

3.1 HPLC 条件选择

对 AOH, AME 和 ZEA 三个毒素的 HPLC 分析条件进行了优化。三个毒素的结构中均有一 OH 基团,具有一定的极性,宜采用反相色谱。AOH 和 AME 的最大吸收波长为 258nm, ZEA 的最大吸收波长为 237nm,测定时采用时间编程控制吸收波长。三个毒素在甲醇中均有较好的溶解度。在甲醇-水比例为 80:20 时三个毒素彼此间有较好的分离,因此选用 80% 甲醇水作流动相,流速选择为 0.25mL/min。在上述所选定条件下,三个毒素的 HPLC 保留时间分别为 3.86min (AOH), 4.86min (ZEA), 6.40min (AME)。结果如图 2 所示。



图 2 AOH, AME 和 ZEA 三个毒素的 HPLC 分析图
1. AOH, 2. ZEA, 3. AME。

图中结果表明三个毒素在选定条件下彼此间均有很好的分离。在此基础上对 AOH 和 AME 两个毒素分别用外标法测定其标准曲线,在 AOH, AME 进样量小于 1μg 时,二者的色谱峰面积与进样量呈线性关系,线性方程如下:

$$Y_{\text{AOH}} = 71456645.58X - 126934.18, \gamma = 0.9991,$$

$$Y_{\text{AME}} = 82240480.23X - 2436922.91, \gamma = 0.9985.$$

其中, X = 总进样量, Y = 色谱峰面积。

以 AOH 和 AME 的色谱峰面积与信号噪音比大于 5:1 进行测定,二者的最低检出限均可达到 1×10^{-9} g。

用加入法在 40g 空白玉米、小麦中分别加入 6μg 的 AOH 和 AME,测定其回收率,结果见表 1。

表 1 玉米、小麦中 AOH 和 AME 的回收率

毒素	n	加入量 (μg/g)	回收率(%)±SD	
			玉 米	小 麦
AOH	5	0.15	80.9±3.9	79.7±6.8
AME	5	0.15	83.3±3.4	90.9±5.3

用文中所建方法对这三个毒素进行了粒子束 LC-MS 的研究,得到了这些毒素的多离子色谱图(258+272+318)和相应的 EI⁺ 质谱图,其中 ZEA 的质谱图可用 NBS 质谱数据库进行检索并获得了较高的匹配度。

3.2 大骨节病病区粮食中 AOH 和 AME 的检测

对 143 个从大骨节病病区、非病区采集的玉米、小麦样品中各取 40g 进行了 AOH, AME 和 ZEA 三个毒素的 HPLC 检测,并对检测结果用二极管矩阵(HPLC-DAD)检测器作了进一步确证,根据 HPLC 的色谱保留时间和相应保留时间处的光谱图两个定性参数来鉴定这三个毒素。检测的结果表明在这些粮食样品中均未检出这三个毒素。

3.3 AOH 和 AME 的检测及 HPLC-MS 鉴定

对 7 批互隔交链孢霉菌接种的大米培养物各取 40g,参考样品提取方法^[10],采用文中所建测定方法,进行了 AOH 和 AME 两个毒素的 HPLC 定量测定和 HPLC-MS 结构鉴定,结果如图 3 和表 2 所示。

表 2 培养物中 AOH 和 AME 的分析结果

培养物编号	n	毒素含量(mg/kg)±SD	
		AOH	AME
A-1	3	30.0±5.95	31.2±6.18
A-3	3	27.1±0.09	40.2±1.61
A-4	3	ND*	13.0±0.30
A-6	3	19.4±0.85	35.0±3.47
A-8	3	13.4±0.26	17.2±0.45
A-9	3	25.9±0.78	66.2±3.12
A-10	3	95.5±2.11	94.3±6.49

* 检出结果为阴性。

以上的结果表明,在大骨节病区的粮食中未检测出 AOH, AME 和 ZEA。因此,这些毒素与大骨节病的发生发展是否有关,需作进一步的研究。不过,在用从病区粮食中分离得到互隔交链孢霉菌的产毒

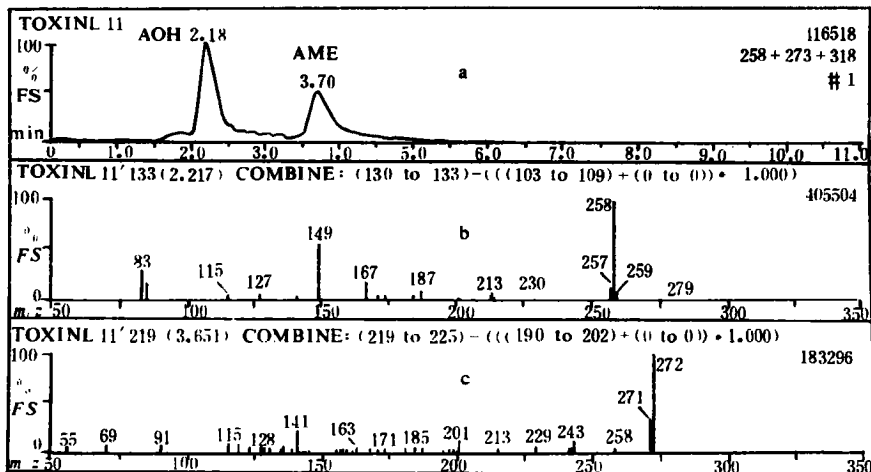


图 3 互隔交链孢霉培养物的 LC-MS 鉴定结果

a: 互隔交链孢霉培养物的粒子束 LC-MS 多离子色谱图, b: AOH 的质谱图, c: AME 的质谱图。

培养物中检测并鉴定出 AOH 和 AME, 表明这一菌株确能产生这两个毒素。对 7 批培养物定量测定的结果表明互隔交链孢霉菌有一定的产毒能力。

用粒子束 LC-MS 鉴定这三个毒素的方法未见文献报道。这一技术的主要优点是所获得的质谱图基本上是 EI⁺ 谱, 可用于检索。因此, 对于难挥发性化合物是一种有力的鉴定手段。其主要不足是检测灵敏度较低, 对浓度在 ng 水平的化合物进行鉴定比较困难。

致谢 西安医科大学地方性骨病研究所张失远副教授提供粮食样品, 在此表示诚挚的谢意。

参 考 文 献

1 刘桂亭, 苗 键, 刘作屏等. 河南医学院学报, 1982, 17 (3): 5

2 安玉会, 赵天增, 苗 键等. 河南医学院学报, 1986, 21 (3): 204

3 徐友梅. 河南医学院学报, 1985, 20(3): 234

4 董伟华. 河南医学院学报, 1985, 20(3): 234

5 甄应中. 中华肿瘤杂志, 1984, 6: 27

6 焦玉英. 中国地方病防治杂志, 1990, 5(1): 37

7 Sydenham E W, Thiel P G, Marasas W F O. J Agric Food Chem, 1988, 36: 25

8 Jelinek C F, Pohland A E, Wood G E. J Assoc Off Anal Chem, 1989, 72(2): 223

9 Seitz L M, Sauer D B, Mohr H E *et al.* J Agric Food Chem, 1975, 23(1): 1

10 罗 毅, 刘 峰, 郑集声等. 军事医学科学院院刊, 1992, 16(1): 20

(下转第 347 页)

《分析化学》重要启事

《分析化学》改由长春邮局发行, 刊号为: 12—6

《分析化学》期刊原在沈阳邮局发行(刊号: 8—187), 自 1995 年起改由长春邮局发行, 刊号改号 12—6, 望广大读者周知, 并请转告有关订户。

《分析化学》系月刊, 每期定价 4.30 元, 全国各地邮局订阅。

《分析化学》编辑部

正己烷作为底剂,用乙醚、氯仿、二氯甲烷作为底面三角形三顶点,构造四面体^[4]。溶剂强度用 P' 计算。

4. 本软件采用模块化设计,菜单选择,结构合理,操作简便易学。

5. 对优化结果不满意时,可以通过改变底面三顶点溶剂的种类重新实验。

参 考 文 献

- 1 Glajch J L *et al.* J Chromatogr, 1980;199:57
- 2 Berridge J C. Techniques for the automated optimization of HPLC separations. New York: John Wiley & Sons, 1986:77
- 3 陈 农.液相色谱谱图库的建立与作用指数定性(博士学位论文),中科院大连化学物理研究所,1991:26
- 4 孙毓庆.薄层扫描法及其在药物分析中的应用.北京:人民卫生出版社,1990:37

The Tetrahedron Method of Optimizing Solvent System in High Performance Liquid Chromatography

Wu Wen, Ban Yundong, Di Xin, Pan Meng and Sun Yuqing

(Shenyang College of Pharmacy, Shenyang, 110015)

In this paper we modified the triangle method proposed by Glajch and developed the tetrahedron method. In this method, after the experimental results of 7 solvent systems were input into a micro-computer, the latter simulated the chromatographic behaviour of 231 solvent systems and gave the optimal system. The tetrahedron method has been successfully applied to the separation of 12 sulfadruugs.

Key words high performance liquid chromatography, mobile phase optimization, the tetrahedron method, sulfa drugs

(上接第 344 页)

Analysis of Alternariol, Alternariol Monomethyl Ether and Zearalenone in Cereals by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Particle Beam Liquid Chromatography/Mass Spectrometry (LC/MS)

Luo Yi, Liu Feng, Feng Jianlin, Zhang Lihan, Hu Xuying,

Feng Cuiling and Yang Jinsheng

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing, 100850)

Kuang Kaiyuan and Shi Shiyang

(Institute of Plant Protection, Academy of Agriculture, Shanghai, 201106)

A qualitative and quantitative method for simultaneously analyzing alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME) and zearalenone (ZMA) in cereals and cultures by HPLC and particle beam LC/MS was established. These three toxins were effectively separated on a C₁₈ reversed-phase column with an 80% aqueous methanol as the eluting agent. The recoveries of the three toxins in corn and wheat were all over 79%. The detection limits for them were 1×10^{-9} g. With this method, about 100 cereal samples collected from the disease and non-disease areas of Kashin-Beck disease were detected. None of the three toxins was found. However, AOH and AME were detected in seven cultures of the genus *Alternaria* by HPLC and were successfully identified by particle beam LC/MS. The contents of AOH and AME in these cultures were in the range from 13.0mg/kg to 95.5mg/kg.

Key words high performance liquid chromatography, particle liquid chromatography/mass spectrometry, alternariol, alternariol monomethyl ether, zearalenone, corn, wheat