

# 高效液相色谱-串联质谱法定量检测稻谷中的稻曲病菌毒素 A 和 D

祭芳 曹欢 徐剑宏 殷宪超 史建荣\*

(江苏省农业科学院 江苏省食品质量安全重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地/农业部食品安全监控重点开放实验室, 江苏南京 210014; \* 通讯联系人, E-mail: Shiji@jaas.ac.cn)

## Simultaneous Quantitative Determination of Ustiloxin A and Ustiloxin D in Rice Grains by High Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

Ji Fang, CAO Huan, XU Jian-hong, YIN Xian-chao, SHI Jian-rong\*

(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Jiangsu Province/State Key Laboratory Breeding Base for Jiangsu Province/Key Laboratory of Agro-Food Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; \* Corresponding author, E-mail: Shiji@jaas.ac.cn)

Ji Fang, CAO Huan, XU Jianhong, et al. Simultaneous quantitative determination of Ustiloxin A and Ustiloxin D in rice grains by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chin J Rice Sci*, 2012, 26(2): 246-250.

**Abstract:** A method based on high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry(HPLC-MS/MS) was developed for simultaneous determination of ustiloxin A and ustiloxin D. This method is simple, sensitive and accurate, and can be used for simultaneous quantitative determination of ustiloxin A and ustiloxin D in rice grains.

**Key words:** high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry(HPLC-MS); ustiloxin A; ustiloxin D; rice grain

祭芳, 曹欢, 徐剑宏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法定量检测稻谷中的稻曲病菌毒素 A 和 D. *中国水稻科学*, 2012, 26(2): 246-250.

**摘要:** 建立了稻谷中稻曲病菌毒素 A 和 D 污染物的高效液相色谱-串联质谱的分析方法。该方法简单、灵敏、准确, 可同时定量检测稻谷中稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D。

**关键词:** 高效液相色谱-串联质谱法; 稻曲病菌毒素 A; 稻曲病菌毒素 D; 稻谷

**中图分类号:** S435.111.4<sup>+</sup>9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1001-7216(2012)02-0246-05

稻曲病是一种世界性水稻真菌病害,是由子囊菌纲麦角菌科绿核菌属 *Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak. 侵染水稻穗部引起的真菌病害。近年来,随着水稻栽培模式的改变,稻田氮肥施用量的增加,加上新型高产密穗型杂交稻的大面积推广,稻曲病的发生日趋严重<sup>[1]</sup>,呈现发病范围广、发病频率高、产量损失严重等特点,已从次要病害上升为主要病害<sup>[2-3]</sup>。稻曲病不仅严重影响水稻的产量,更为严重的是稻曲病菌能产生对人畜有害的稻曲病菌毒素,因此,建立快速准确的检测稻曲病菌毒素的方法尤为必要。

稻曲病菌毒素(ustiloxins)是一类抗真核细胞有丝分裂的杂环肽<sup>[4-5]</sup>。Suwa<sup>[6]</sup>首先报道了稻曲球的水提液对兔子的毒性,随后 Koiso 等<sup>[7]</sup>从稻曲球的水溶液中提取到了这类毒素化合物,命名为 ustiloxins。目前已从稻曲球中分离出了稻曲病菌毒素 A~F,其中,稻曲病菌毒素 A 是最主要的毒素<sup>[7]</sup>,而稻曲病菌毒素 D 是同族化合物中结构较简

单且生物活性较高的一种毒素<sup>[8]</sup>。大量研究结果表明,稻曲病菌毒素能够阻止微管蛋白的聚合反应,并且对现有的微管蛋白具有解聚作用,抑制细胞的有丝分裂<sup>[6-9]</sup>,但它或由于不能穿透细胞膜而不具备细胞毒性,因而不会影响细菌或真菌的生长<sup>[10-12]</sup>。Nakamura 等<sup>[13-14]</sup>曾报道稻曲病菌毒素污染的饲料能引起动物严重的肝肾疾病(代谢紊乱)。因此,建立快速、灵敏的毒素检测方法具有重要的现实意义。

Miyazaki 等<sup>[15]</sup>报道了关于稻曲病菌毒素 A 的高效液相色谱检测方法,而关于稻曲病菌毒素的质谱分析方法国内外尚未见报道。针对小分子的快速检测,液相色谱法多采用紫外或者荧光检测器,易产生杂质干扰现象,且样品前处理比较烦琐。质谱分析法是通过对被测样品离子的质荷比的测定来进行分析的一种方法,具有灵敏度高,样品用量少,分析速度快,分离和鉴定同时进行等优点。本

收稿日期: 2011-06-27; 修改稿收到日期: 2011-10-14。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30901006); 国家重大科技专项(2009ZX08011-015B, 2008ZX08011-003); 江苏省科技支撑计划资助项目(BE2010757)

研究通过一步水提法,采用固相萃取(SPE)净化方法,结合高效液相色谱-串联质谱法进行检测,建立了稻谷中稻曲病菌毒素稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D 的定量检测方法,并应用此方法对江苏部分地区的稻米进行了稻曲病菌毒素含量分析,方法简单,操作性强,具有良好的准确度和精密度。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

采用的试剂包括分析纯甲醇(南京宁试化学试剂有限公司)、色谱纯甲醇和甲酸(Sigma)、聚乙二醇 4000(PEG 4000)(Sigma)。标准品稻曲病菌毒素-A 和稻曲病菌毒素-D 由日本东京大学 KOBAYASHI Hisayoshi 博士悉赠。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 样品前处理

提取:将稻谷磨成粉末,过 20 目筛,称取样品 25.0 g 置于 250 mL 具塞三角瓶中,加入 5.0 g PEG 4000,再加入 100 mL 去离子水,室温摇床振荡 30 min,取出后于 10000 r/min 下离心 10 min,将上清液转移至另一离心管中,残渣中加入 20 mL 去离子水重复上述操作,合并两次提取液用去离子水定容至 120 mL。取提取液 50 mL 作为固相萃取净化样液。

净化:取上述提取液 50 mL 加入预先用 3 mL 甲醇、3 mL 去离子水活化的 C18 固相萃取小柱,用 3 mL 去离子水淋洗,5 mL 甲醇-水( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=7:3$ )洗脱,收集洗脱液并用氮气吹至近干,用 1.0 mL 流动相溶解,过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜,滤液用于高效液相色谱-串联质谱分析。

#### 1.2.2 测定条件

##### 1.2.2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C18 柱(30 mm $\times$ 2.1 mm,5  $\mu\text{m}$ );流动相为甲醇-水(含 0.1%甲酸)( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=5:5$ );流速为 0.3 mL/min;进样体积为 3.0  $\mu\text{L}$ ;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

##### 1.2.2.2 质谱条件

离子源:电喷雾离子源(ESI),正离子方式检测;检测模式:多反应监测(MRM);干燥气温度 350 $^{\circ}\text{C}$ ;干燥气流

速 10.0 L/min;雾化气压 276 kPa。其他质谱参数见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理方法的确定

稻曲病菌毒素是一类极性较大的化合物,水溶性较好,故设计时采用了较为简单的水提法。水提法的优点是简便、成本低、杂质少、污染小。在洗脱 C18 小柱吸附毒素时,考查了多种洗脱剂以及梯度洗脱的效果,结果表明水洗可以去除部分杂质而不会将有效成分洗脱;以甲醇-水( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=1:9$ )进行洗脱可以去掉部分色素杂质,但同时也有部分毒素被洗脱下来;甲醇-水( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=7:3$ ),基本上可以将毒素全部洗脱下来。因此,先用水洗去杂质,再用甲醇-水( $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=7:3$ )进行洗脱,这样既保证了去除部分杂质又能充分洗脱所需毒素样品。

### 2.2 HPLC-MS/MS 分析

稻曲病菌毒素 A 和 D 质谱分析表明(图 2),除能检测到准分子离子外,有足够的子离子信息。在一级全扫描质谱中得到 2 种毒素的准分子离子 $[M+H]^+$ (稻曲病菌毒素 A,  $m/z$  674、稻曲病菌毒素 D,  $m/z$  495),再对 $[M+H]^+$ 进行二级质谱分析,通过条件优化,确定稻曲病菌毒素 A,  $m/z$  674 $>$ 209, 674 $>$ 187, 674 $>$ 132; 稻曲病菌毒素 D,  $m/z$  495 $>$ 192, 495 $>$ 291, 495 $>$ 263 各 3 对离子对,但实验发现 $m/z$  674 $>$ 132 和  $m/z$  495 $>$ 263 离子对受基质干扰,非线性关系,而其他离子对受基质干扰较小,所以对于稻曲病菌毒素 A,选择 $m/z$  674 $>$ 209 作为定量离子对, $m/z$  674 $>$ 187 作为辅助定性参比离子对;对于稻曲病菌毒素 D,选择  $m/z$  495 $>$ 192 作为定量离子对, $m/z$  495 $>$ 291 作为辅助定性参比离子对。

### 2.3 方法评价

#### 2.3.1 方法的加标回收率和变异系数

将一定浓度的标准液加到研磨好的 20 g 空白稻谷粉中,经方法 1.2.1 进行样品前处理,按方法 1.2.1 和 1.2.2 进行 LC-MS 分析,以 10、50、100  $\mu\text{g/L}$  3 个浓度测定稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D 的添加回收率和变异系数。每一浓度包括 5 个重复,在不同日期进行 3 个批次测定,计算日内变异系数和日间变异系数。两种毒素的回收率和

表 1 测定稻曲病菌毒素 A 和 D 的质谱参数

Table 1. MS conditions for the determination of ustiloxins A and D.

化合物 Compound	母离子 Precursor ion ( $m/z$ )	子离子 Product ion( $m/z$ )	碎裂电压 Fragmentation voltage/V	碰撞能量 Collision energy/eV
稻曲病菌毒素 A Ustiloxin A	674	209*	150	40
		187		30
		132		40
稻曲病菌毒素 D Ustiloxin D	495	192*	100	20
		291		10
		263		25

\* 为定量离子

\* Quantitative analysis ion

图 1 稻曲病菌毒素 A 和 D 混合标准溶液的 MRM 谱 (50  $\mu\text{g/L}$ )

Fig. 1. Chromatograms of Ustiloxin A and Ustiloxin D in MRM mode(50  $\mu\text{g/L}$ ).

图 2 稻曲病菌毒素 A (A) 和稻曲病菌毒素 D (B) 的碎片离子

Fig. 2. MS<sup>2</sup> spectra for ustiloxin A (A) and ustiloxin D (B).

变异系数结果见表 2。

### 2.3.2 标准曲线与检出限

对于 HPLC-MS 分析,基质效应常常是影响准确量的干扰因素。为消除基质效应对分析结果的影响,用处理过的稻米空白提取液来配置标准曲线,空白稻米提取液选取没有被稻曲病菌污染的的稻米按照样品的处理步骤处理。用空白稻米提取液来制备 2 种毒素的混合标准溶液,其中含有稻曲病菌毒素 A 的质量浓度为 5、10、20、50、100、200、500  $\mu\text{g/L}$ ,含有稻曲病菌毒素 D 的质量浓度为 1、5、10、20、50、100、200、500  $\mu\text{g/L}$ 。按照上述色谱条件进行分析,以毒素的质量浓度  $X(\mu\text{g/L})$  为横坐标,以峰面积  $Y$  为纵坐标绘制标准曲线,得到线性回归方程及相关系数,同时以信噪比(S/N)不低于 10 时的进样浓度为定量限(LOQ),由表 3 可以看出本方法具有较宽的线性范围,线性关系良好。

### 2.4 样品中稻曲病菌毒素含量的测定

通过上述方法,测定了江苏 10 个地区的稻谷样品中稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D 的含量(表 4)。结果表明,样品中的稻曲属菌毒素 A 和 D 的含量与发病情况一致。

## 3 讨论

稻曲病菌毒素的污染情况随着稻曲病发生的日趋严重而变得更为普遍。由于稻曲病菌毒素的标准样品目前尚无供应厂商,采用薄层色谱法或高效液相色谱法等传统方法分析检测谷物饲料中污染的稻曲病菌毒素都需用标准样品进行定性分析,自行分离或合成标准样品费时费力且纯度达不到商品化的标准,给稻曲病菌毒素的定性分析带来诸多不便。电喷雾(ESI)是一种软电离技术,能够有效地收集离子和提供大量的碎片信息,易于与高效液相色谱

谱联用(HPLC/MS)。这种联用技术具有分析速度快、分辨率和灵敏度高的特点,并且具有对分析的样品进行快速定性的能力。本研究所建立的质谱分析方法,为其他研究者提供了很好的定性参考方法。此外,与 Miyazaki 关于稻曲病菌毒素 A 的 HPLC 方法相比,本方法在检测灵敏度方面有了很大的提高,且能够同时检测 2 种毒素并定量分析,为分析此类毒素在谷物中的污染情况提供了技术支持。

样品的提取和前处理应尽可能简单方便。稻曲病菌毒素属于一类强极性物质,因此本研究直接采用水提法,同时加入适量的 PEG4000,有助于增强细胞膜的渗透性,促进毒素的溶出。稻米中含有丰富的淀粉类物质,如果直

接用水提液进样,有明显的基质干扰现象,本研究通过将样品过固相萃取小柱,选择先用水洗去杂,再用 70% 甲醇-水洗脱的方法进行纯化,基质效应大大降低。

利用本研究建立的检测方法,笔者对江苏部分地区的稻谷稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D 的污染情况进行了检测,发现除 3 号和 6 号样品中未检出稻曲病菌毒素 A,其他样品中均检出稻曲病菌毒素 A,且其含量与其发病情况基本一致;2、4、5、7 号样品中只检出稻曲病菌毒素 A 而未检出稻曲病菌毒素 D,可能是由于稻曲病菌所产毒素中以稻曲病菌毒素 A 为主。此外,我们还发现病穗率较高的 8 号和 9 号样品中,稻曲病菌毒素 D 的含量远远高于稻曲病菌毒素 A,而同样高病穗率的 10 号样品中稻曲病菌毒素

表 2 稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D 的回收率和变异系数

Table 2. Recoveries and RSDs of ustiloxin-A and ustiloxin-D in rice grains.

化合物 Compounds	添加浓度 Fortified concentration /(ng · mL <sup>-1</sup> )	回收率 Recovery/%	变异系数 CV/%	
			日内	日间
			Intra-day(n=5)	Inter-day(n=3)
稻曲病菌毒素 A Ustiloxin A	10.0	89.5	5.8	10.3
	50.0	90.0	6.7	9.6
	100.0	91.5	4.6	13.5
稻曲病菌毒素 D Ustiloxin D	10.0	92.5	6.9	8.3
	50.0	91.0	4.8	9.2
	100.0	95.6	8.5	11.6

表 3 2 种稻曲毒素的线性范围和回归方程

Table 3. Rangs of linearity and regression equations of two ustiloxins.

化合物 Compound	母离子/碎片离子 Parention/Fragment (m/z)	线性范围 Linear range /(μg · L <sup>-1</sup> )	线性回归方程 Linear regression equations	相关系数 r <sup>2</sup>	检测限 LOQ /(μg · L <sup>-1</sup> )
稻曲病菌毒素 A Ustiloxin A	674/209	5~500	Y=0.82X-5.85	0.9986	5.0
稻曲病菌毒素 D Ustiloxin D	495/192	1~500	Y=27.34X+14.59	0.9999	1.0

表 4 江苏部分地区水稻稻谷稻曲病菌毒素 A 和稻曲病菌毒素 D 的含量

Table 4. The content of ustiloxin A and D in rice grains from some parts of Jiangsu Province.

样品编号 Number	样品名称 Sample	采集地点 Sampling site	发病级别 Disease grade	稻曲病菌毒素 A 的含量 Concentration of ustiloxin-A /(μg · L <sup>-1</sup> )	稻曲病菌毒素 D 的含量 Concentration of ustiloxin-D /(μg · L <sup>-1</sup> )
1	甬优 8 号 Yongyou 8	吴江 Wujiang, Jiangsu	0	0	0
2	武运粳 23 Wuyunjing 23	吴江 Wujiang, Jiangsu	1	76	0
3	淮稻 5 号 Huaidao 5	先进二场 Second Farm of Xianjin, Jiangsu	0	0	0
4	淮稻 5 号 Huaidao 5	先进三场 Third Farm of Xianjin, Jiangsu	3	1340	0
5	淮稻 5 号 Huaidao 5	先进四场 Fourth Farm of Xianjin, Jiangsu	3	1060	0
6	淮稻 5 号 Huaidao 5	先进五场 Fifth Farm of Xianjin, Jiangsu	0	0	0
7	淮稻 5 号 Huaidao 5	先进六场 Sixth Farm of Xianjin, Jiangsu	1	236	0
8	常优 2 号 Changyou 2	常熟 Changshu, Jiangsu	4	4036	45100
9	甬优 8 号 Yongyou 8	常熟 Changshu, Jiangsu	4	3484	14640
10	甬优 5 号 Yongyou 5	常熟 Changshu, Jiangsu	4	3720	2800

A 的含量又高于稻曲病菌毒素 D,这可能是由于不同的环境对病原菌的产毒条件有一定的影响,或者是两种毒素之间也会有相互的影响。

谢辞:衷心感谢日本东京大学的 KOBAYASHI Kobayashi 博士赠送稻曲病菌毒素标本。

#### 参考文献:

- [1] 陈永永. 我国稻曲病研究概况. 中国农学通报, 1992, 8(4): 15-19.
- [2] 王伟刚, 郑明, 谢春甫, 等. 水稻稻曲病流行危害分析及防治对策. 现代农业科学, 2009, 16(3): 63-165.
- [3] 黄世文, 余柳青. 国内稻曲病的研究现状. 江西农业学报, 2002, 14(2): 45-51.
- [4] Koiso Y, Natori M, Iwasaki S, et al. Ustiloxin: A phytotoxin and a mycotoxin from false smult balls on rice panicles. *Tetr Lett*, 1992, 33(29): 4157-4160.
- [5] Koiso Y, Iwasaki Y, Hanaoka S, et al. Ustiloxins, antimitotic cyclic peptides from false smut balls on rice panicles caused by *Ustilaginoidea virens*. *J Antib*, 1994, 47(7): 765-773.
- [6] Suwa M. Study on Inda-kouji. Part I. *JAMAS*, 1915, 13: 661-686.
- [7] Koiso Y, Morisaki N, Yamashita Y, et al. Isolation and structure of an antimitotic cyclic peptide, ustiloxin F; Chemical interrelation with a homologous peptide, ustiloxin B. *J Antib*, 1998, 51(4): 418-22.
- [8] Evans L P, Wu C D, Cao Y, et al. Evolution of the total syntheses of ustiloxin natural products and their analogues. *J Amer Chem Soc*, 2008, 130(7): 2351-2364.
- [9] Jordan M A. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem - Anti-Can Agen*, 2002, 2(17): 1-17.
- [10] Nakamura K, Izumiyama N, Ohtsubo K, et al. "Lupinosis"-like lesions in mice caused by ustiloxin, produced by *Ustilaginoidea virens*: A morphological study. *Natural Toxins*, 1994, 2(1): 22-28.
- [11] Li Y, Koiso Y, Kobayashi H, et al. Ustiloxins, new antimitotic cyclic peptides; Interaction with porcine brain tubulin. *Biocheml Pharmacol*, 1995, 49(10): 1367-1372.
- [12] Iwasaki S. Chemistry and biological activity of the mycotoxins interfering with tubulin function. *Proc Jpn Assoc Mycot*, 1992, 35: 41-43.
- [13] Hamel E. Interactions of antimitotic peptides and depsipeptides with tubulin. *Biopolymers*, 2002, 66(3): 142-60.
- [14] Nakamura K, Izumiyama N, Ohtsubo K. Apoptosis induced in the liver, kidney and urinary bladder of mice by the fungal toxin produced by *Ustilaginoidea virens*. *Mycotoxins*, 1993, 38: 25-30.
- [15] Miyazaki S, Matsumoto Y, Uchihara T, et al. High-performance liquid chromatographic determination of ustiloxin A in forage rice silage. *J Vet Med Sci*, 2009, 71(2): 239-241.