

臭氧降解玉米赤霉烯酮及其降解产物细胞毒性

王轶凡^{1,2,3}, 孙秀兰^{1,2,3}, 张银志^{*1}, 丁小霞⁴

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 食品安全与营养协同创新中心, 江苏 无锡 214122; 4. 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 430062)

摘要: 臭氧处理玉米赤霉烯酮标准溶液后, 产生了 4 种降解产物, 其质荷比分别是 335.184 1、351.190 7、321.186 8 和 367.175 3。应用 CCK-8 法研究细胞生长抑制率发现, 玉米赤霉烯酮经臭氧处理后, 肝癌细胞的增殖抑制率明显下降, 但玉米赤霉烯酮降解产物对肝癌细胞生长仍存在抑制。作者通过超高效液相色谱串联质谱建立了一种在臭氧处理玉米赤霉烯酮过程中, 同时检测玉米赤霉烯酮及其两种主要降解产物的方法。该方法在臭氧处理玉米赤霉烯酮污染的玉米粉中, 能够检测出与臭氧处理玉米赤霉烯酮标准溶液时相同的两种主要降解产物, 并在 90 min 臭氧处理后, 玉米赤霉烯酮质量分数减少 95.1%。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 臭氧; 臭氧降解产物; 超高效液相色谱串联质谱

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2018)04-0369-06

Effects of Ozone on Zearalenone Degradation and Cytotoxicity Assessment of Ozonolytic Products

WANG Yifan^{1,2,3}, SUN Xiulan^{1,2,3}, ZHANG Yinzh^{*1}, DING Xiaoxia⁴

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: An ozonolytic study of zearalenone in acetonitrile solution was conducted under ozone treatment, producing four intermediate compound (m/z for Compound 1=335.184 1, Compound 2 = 351.190 7, Compound 3=321.186 8 and Compound 4=367.175 3). By means of CCK-8 kit, cytotoxicity assessment of the degraded zearalenone products in HepG2 cells indicates continued toxicity, albeit at decreased levels. AUPLC-MS/MS method has been established to detect the two main products of zearalenone ozonolysis. Both products occur in practical process model for detoxifying contaminated corn flour by ozonation and zearalenone was decomposed by 95.1% in 90 minutes.

Keyword: zearalenone, ozone, ozonolytic products, UPLC-MS/MS

收稿日期: 2016-01-05

基金项目: 2015 年度国家农产品质量安全风险评估项目计划(GJFP201500702)。

* 通信作者: 张银志(1975—), 男, 陕西汉中, 高级工程师, 主要从事食品安全监测研究。E-mail: yinzhizhang@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王轶凡, 孙秀兰, 张银志, 等. 臭氧降解玉米赤霉烯酮及其降解产物细胞毒性[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(04): 369-374.

玉米赤霉烯酮(zearalenone, Zen)是一种由禾谷镰刀菌等真菌产生的次级代谢产物,学名为 6-(10-羟基-6-氧基-十一碳烯基) β -雷锁酸内酯^[1-2]。玉米赤霉烯酮是污染粮食谷物最广泛的真菌毒素之一,其在大麦、燕麦、黑麦、高粱和小麦中的污染都有报道。由于玉米赤霉烯酮与 17 β -雌二醇(E₂)在化学结构上存在相似性,玉米赤霉烯酮及其衍生物在哺乳动物中会产生强类雌激素效应,从而导致体内内分泌紊乱^[3-7]。

真菌毒素的脱毒方法主要有物理法、化学法和生物法。而臭氧作为一种强效的氧化剂,其降解黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素等真菌毒素已见诸报道^[8-12]。臭氧处理真菌毒素污染的玉米、花生、大麦、小麦和其他谷物已经开始得到初步应用。200 mg/min 的臭氧经过 92 h 处理黄曲霉毒素污染的玉米后,黄曲霉毒素降解超过 95%^[12]。

臭氧可以由电化学放电产生,具有高效快速、渗透能力强和自身降解产物无毒副作用的优点。但是,经臭氧处理后的真菌毒素降解产物的相关研究鲜有出现在国内外研究中,因此作者研究了臭氧处理玉米赤霉烯酮后的降解产物,并对其降解产物进行了肝癌细胞毒性评价。同时通过超高效液相色谱串联质谱建立了检测玉米赤霉烯酮、玉米赤霉烯酮主要臭氧降解产物和其生物体内转化产物玉米赤霉烯醇的检测方法,探究特定条件下臭氧处理污染谷物时玉米赤霉烯酮及其降解产物变化规律。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米粉:市售;玉米赤霉烯酮, α -玉米赤霉烯醇, β -玉米赤霉烯醇标准品:Sigma 公司产品;臭氧发生器:佳环电器科技有限产品;MTN-2800w 氮吹仪:天津奥特赛思仪器公司产品;Acquity™ 超高效液相色谱仪和 Acquity™ TQD 串联质谱检测器:美国 Waters 公司产品;超纯水制备仪:美国 Millipore 公司产品。HepG2 人肝癌细胞:中国科学院细胞库产品;DMEM 高糖培养基:Hyclone 公司产品。胎牛血清(FBS):Gibco 公司产品;CCK-8 试剂盒,碧云天生物技术公司产品;Infinite 1000 酶标仪:Tecan 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 玉米赤霉烯酮的臭氧处理 在室温下,将 5mL 的玉米赤霉烯酮溶液 (20 μ g/mL) 通入 60mL/min 的臭氧 1 min。将反应后的溶液通过 UPLC-Q-TOF 进行检测。

质谱检测采用电喷雾电离正离子(ESI⁺)的离子化模式,具体参数如下:毛细血管电压,3.5 kV;离子源温度,100 $^{\circ}$ C;脱溶剂气温度,300 $^{\circ}$ C;脱溶剂气流量,700 L/h。

1.2.2 HepG2 人肝癌细胞培养 HepG2 肝癌细胞培养在含质量分数 10% FBS 和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养液中,在 37 $^{\circ}$ C,体积分数 5% CO₂ 条件下恒温培养,每 2~3 天按 1:3 比例传代。

1.2.3 CCK-8 法测定 HepG2 肝癌细胞活力 取对数生长期的肝癌细胞,PBS 洗 3 次,用胰蛋白酶消化适当时间后,用 DMEM 培养液将细胞浓度调整为 1 $\times$ 10⁶/mL。向 96 孔培养板中加入上述细胞悬液 100 μ L,将培养板至于体积分数 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 下培养 12h 后取出,分别加入不同浓度的玉米赤霉烯酮及臭氧处理 1、3、10 min 后的玉米赤霉烯酮 DMEM 培养液各 10 μ L,每个设样品置 6 个复孔。继续在体积分数 5% CO₂、37 $^{\circ}$ C 下培养 24 h 后,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μ L。孵育 2 h 后,用酶联检测仪在 450 nm 波长下进行测定各孔光密度值,计算出 HepG2 人肝癌细胞的活力。

1.2.4 超高效液相色谱串联质谱法测定玉米赤霉烯酮及其降解产物 色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T₃ 柱;梯度洗脱的流动相条件与 1.21 的流动相条件相同。离子化模式:电喷雾电离正离子模式(ESI⁺)和负离子模式(ESI⁻)。玉米赤霉烯酮、 α -玉米赤霉烯酮(α -Zen)、 β -玉米赤霉烯酮(β -Zen)和臭氧降解产物的质谱条件列于表 1。定量方法采用的是多反应监测(MRM)模式。采集的数据通过 MassLynx 4.1 软件进行加工处理。

1.2.5 标准储备溶液的配制 Zen、 α -Zen 和 β -Zen 标准溶液:称取适量 Zen、 α -Zen 和 β -Zen 标准品,以色谱纯乙腈溶解并配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备溶液,于 2~8 $^{\circ}$ C 条件下保存。

通过制备型液相,将臭氧降解玉米赤霉烯酮产物中含量较多的 Compound 2、Compound 4 分离富集,经冻干浓缩后获得固体。再以色谱纯乙腈溶解并配成质量浓度为 100 μ g/mL 的溶液,于 2~8 $^{\circ}$ C 条

件下保存。

1.2.6 玉米赤霉烯酮污染玉米粉的臭氧处理 准确称取 5.00 g 玉米赤霉烯酮污染的玉米粉,分别经过 60 mL/min 的臭氧处理 0、5、15、30、45、60、90 min。每份处理后的玉米粉置于 50 mL 离心管中,加入体积分数 80% 乙腈溶液 20 mL,振荡处理 15 min 后,取过滤后的滤液 5 mL,加入三氯甲烷 5 mL,振荡 1 min,避光静置。待溶液分层后,保留下层。上层再加入 1 mL 的三氯甲烷,振荡 1 min 后,静置分层,保留下层。将两次保留的下层溶液混合,经氮气吹干后,加入 1 mL 的体积分数 80% 乙腈溶液,过 0.22 μm 有机相滤膜后,等待检测。

2 结果与分析

2.1 臭氧处理玉米赤霉烯酮

图 1 显示玉米赤霉烯酮标准溶液 (20 $\mu\text{g/mL}$) 经臭氧处理 1 min 后,经液相检测在保留时间 5.905、7.323、9.035、9.312 min 分别产生了 4 种降解产物 Compound 1、Compound 2、Compound 3 和 Compound 4。同时,未经臭氧处理时在 9.104 min 出峰的玉米赤霉烯酮被完全降解。McKenzie 等人^[16]在

臭氧处理玉米赤霉烯酮 15 s 后并没有发现任何液相色谱仪可检测到降解产物。这可能是由于其臭氧浓度过高,或者玉米赤霉烯酮浓度过低,导致臭氧降解产物短时间内被臭氧完全氧化。经超高效液相色谱串联四级杆飞行时间质谱检测,玉米赤霉烯酮的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 是 319.154 3 (m/z), 而 Compound 1、Compound 2、Compound 3 和 Compound 4 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 分别是 335.184 1、351.190 7、321.186 8 和 367.175 3 (m/z) (图 2)。

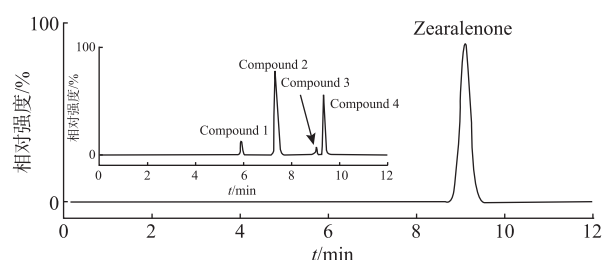


图 1 20 $\mu\text{g/mL}$ 玉米赤霉烯酮臭氧处理前后的总离子色谱图
Fig. 1 Total ion chromatograms of zearalenone standard solutions at 20 ppm in acetonitrile solution and treated by ozone for 1.0 min (inset)

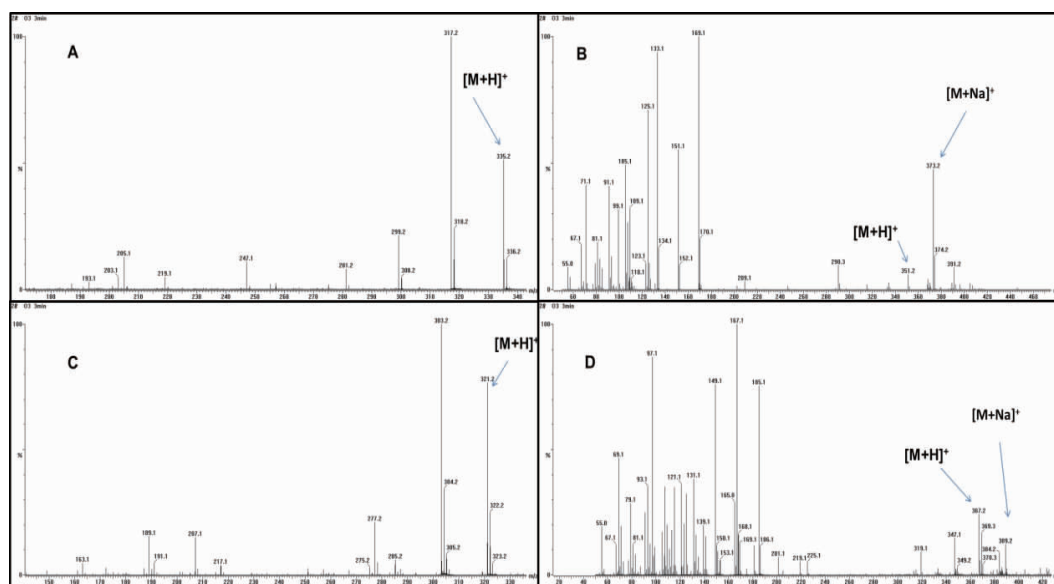


图 2 玉米赤霉烯酮臭氧降解产物的 Q-TOF 质谱图

Fig. 2 UPLC Q-TOF MS spectrum of zearalenone ozonolytic products

2.2 玉米赤霉烯酮降解产物的细胞毒性实验

玉米赤霉烯酮最先在生物体内的肝脏进行初级代谢,且玉米赤霉烯酮对肝脏有损伤作用。因此选择人肝癌细胞 HepG2 对玉米赤霉烯酮的降解产

物进行细胞毒性探究。如图 3 玉米赤霉烯酮对 HepG2 细胞增殖的抑制率呈现剂量相关性,根据试验中玉米赤霉烯酮染毒质量浓度 (0.1~50 $\mu\text{g/mL}$) 对应的细胞增殖率,使用 SPSS 软件进行分析,计算出

玉米赤霉烯酮对 HepG2 细胞的半数抑制浓度 IC_{50} 大约是 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 。以此 IC_{50} 浓度作为后续细胞毒性实验的浓度。将 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 Zen 溶液和臭氧处理 1、3、10 min 的 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的 Zen 溶液通过 CCK-8 试剂盒来测定其对 HepG2 细胞增殖的抑制率。经测定臭氧处理 1、3 min 后,溶液中检测不到 Zen,仅含 Zen 降解产物;处理 10 min 后,溶液中检测不到 Zen 和 Zen 的降解产物。如图 3 所示结果,与未加玉米赤霉烯酮的 Control 组相比,玉米赤霉烯酮臭氧处理时间 0 min 时,玉米赤霉烯酮对 HepG2 人肝癌细胞生长有显著性抑制 ($P<0.05$)。臭氧处理 1 min 和 3 min 组即玉米赤霉烯酮的臭氧降解产物,对人肝癌细胞生长有显著性抑制,但相比于玉米赤霉烯酮臭氧处理 0 min 组,细胞活力显著升高。臭氧处理 10 min 组即玉米赤霉烯酮臭氧降解产物也被氧化后,其对人肝癌细胞生长的影响没有显著性抑制 ($P>0.05$)。这表明玉米赤霉烯酮经臭氧处理后,臭氧降解产物对人肝癌细胞生长存在抑制影响,但低于玉米赤霉烯酮对肝癌细胞的抑制程度。因此臭氧处理污染谷物过程中,足够的臭氧浓度和处理时间对于确保氧化玉米赤霉烯酮及其降解产物是必要的。

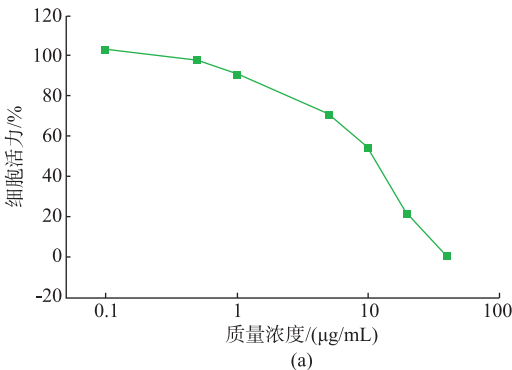


表 1 Zen、Compound 2、Compound 4、 α -Zen 和 β -Zen 的质谱分析参数

Table 1 Analytes and polarity modes,MRM transitions,cone voltages and collision energies used for quantitation and confirmation of zearalenone and ozonolytic products

名称	保留时间	离子源模式	定量离子			定性离子		
			母子离子(m/z)	碰撞能量/V	锥孔电压/eV	母子离子(m/z)	碰撞能量/V	锥孔电压/eV
Zen	9.51	ES ⁻	317.2>175.0	46.0	22.0	317.2>130.9	46.0	38.0
Compound 2	7.77	ES ⁺	373.1>209.1	34.0	18.0	373.1>191.1	34.0	18.0
Compound 4	9.66	ES ⁺	389.1>319.1	28.0	14.0	389.1>225.1	28.0	14.0
α -Zen	8.47	ES ⁻	319.2>174.1	54.0	24.0	319.2>130.0	54	34.0
β -Zen	7.81	ES ⁻	319.2>174.1	50.0	30.0	319.2>159.9	50.0	28.0

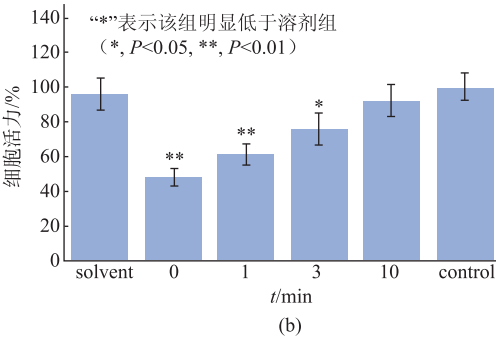


图 3 不同质量浓度玉米赤霉烯酮对 HepG2 细胞活力的影响和玉米赤霉烯酮处理后对 HepG2 细胞活力的影响

Fig. 3 Dose-response curves fitting with logistic function of zearalenone on HepG2 cells and effects of zearalenone solutions treated with diverse levels of ozone on cell viability

2.3 超高效液相色谱串联质谱法测定玉米赤霉烯酮及其降解产物

经过 3 种色谱柱的优化 ACQUITY UPLC HSS T3 柱,ACQUITY UPLC BEH130 C18 柱和 ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 柱,得出 ACQUITY UPLC HSS T3 柱对 Zen、Compound 2、Compound 4、 α -Zen、 β -Zen 分离效果最好。通过对不同流动相配比的优化,得出最佳梯度洗脱的程序如方法所示。针对单个分析物标准品溶液上机分析,得到目标分析物的质荷比。在碰撞诱导解析电离模式下,优化了各目标物的去簇电压和碰撞电压,获得离子丰度较大的碎片离子为该目标物的裂解的主要碎片离子。表 2 为在 ESI 模式下,各目标物的主要碎片离子的质荷比。图 4 为超高效液相色谱串联质谱在 MRM 模式下的各目标物的选择离子流图。

2.4 臭氧处理玉米赤霉烯酮污染的玉米粉

臭氧处理玉米赤霉烯酮污染的玉米粉后,经提取,检测出在臭氧处理玉米赤霉烯酮标准溶液相同的降解产物,Compound 2 和 Compound 4。并没有发现玉米赤霉烯酮的初级代谢物 α -Zen 和 β -Zen。臭氧处理玉米赤霉烯酮污染的玉米粉 90 min 后,玉米赤霉烯酮的降解率达到95.1%。图 6 表明,未进行臭氧处理时,玉米粉中并没有 Compound 2 和 Compound 4,臭氧处理 0~15 min 时,随着玉米赤霉烯酮的减少,Compound 2 和 Compound 4 含量增加。随着臭氧继续处理,臭氧在氧化玉米赤霉烯酮的同时,继续氧化降解产物Compound 2 和 Compound 4,因此,此后 Compound 2 和 Compound 4 持续减少。

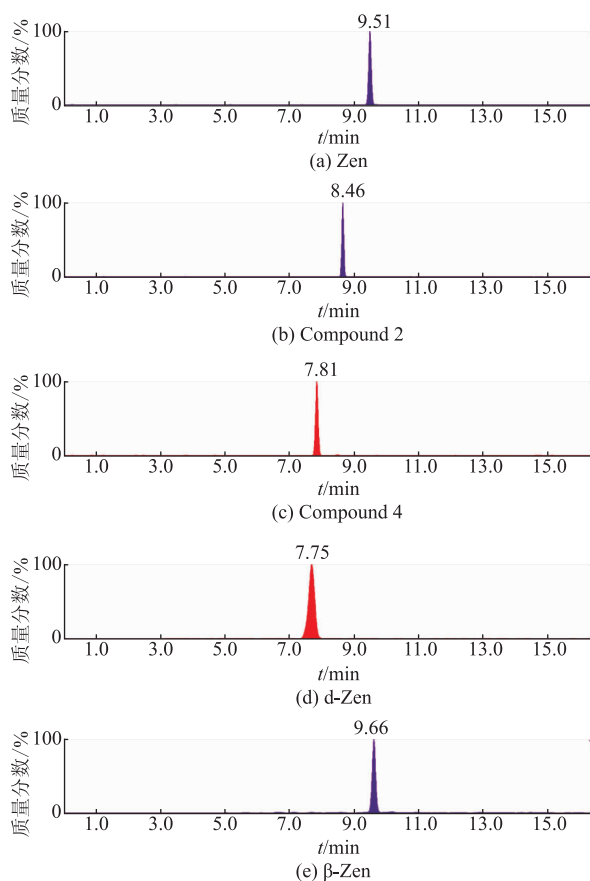


图 4 Zen、Compound 2、Compound 4、 α -Zen 和 β -Zen 的 MRM 图谱

Fig. 4 MRM spectrums of Zen and Zen、Compound 2、Compound 4、 α -Zen 和 β -Zen

参考文献

- [1] PLACINTA C M, D'MELLO J P F, MACDONALD A M C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal

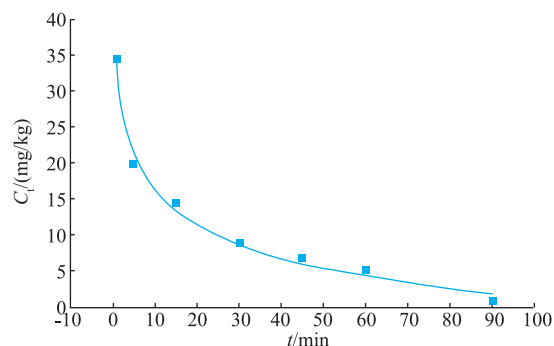


图 5 玉米粉中臭氧降解玉米赤霉烯酮效果

Fig. 5 Changes of zearalenone with the increasing oxidative time in corn flour

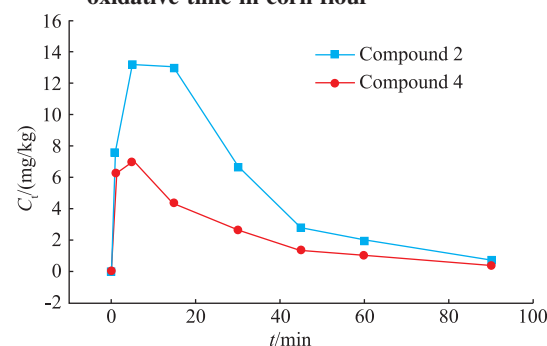


图 6 玉米粉中玉米赤霉烯酮臭氧降解过程中降解产物的变化
Fig. 6 Changes of zearalenone ozonolytic products with the increasing oxidative time in corn flour

3 结 语

臭氧制备简单,高效快捷方便,可能处理的玉米赤霉烯酮污染的粮食或者饲料规模较大。因此,足够的臭氧浓度或臭氧处理时间来降解玉米赤霉烯酮及其降解产物,有助于彻底解决臭氧处理玉米赤霉烯酮过程中,其中间产物依然存在毒性的问题。

作者建立的超高效液相色谱串联质谱检测玉米赤霉烯酮及其降解产物的方法,在臭氧处理玉米赤霉烯酮污染实际谷物和饲料过程中,能够简便快速灵敏准确检测出玉米赤霉烯酮及其降解产物的含量,为实际脱毒生产中臭氧的用量提供参考。

- feed with Fusarium mycotoxins[J]. **Animal Feed Science and Technology**, 1999, 78:21-37.
- [2] ZINEDINE A, SORIANO J M, MOLTO 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: 1-18.
- [3] BENZONI E, MINERVINI F, GIANNOCARO A, et al. Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality[J]. **Reproductive Toxicology**, 2008, 25: 461-467.
- [4] HENEWEER M, HOUTMAN R, POORTMAN J, et al. Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology approach[J]. **Toxicological Sciences**, 2007, 99: 303-314.
- [5] JIANG Shuzhen, YANG Weiren, YANG Zaibin. Metabolism, toxicity and preventive measures of zearalenone [J]. **Chinese Journal of Animal Nutrition**, 2011, 23(2): 196-202. (in Chinese)
- [6] KARACA H, VELIOGLU Y S. Ozone applications in fruit and vegetable processing[J]. **Food Reviews International**, 2007, 23: 91-106.
- [7] SONGSERMSAKUL P, BOEHM J, AURICH C, et al. The levels of zearalenone and its metabolites in plasma, urine and faeces of horses fed with naturally, Fusarium toxin-contaminated oats [J]. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, 2013, 97: 155-161.
- [8] LIU Yang, DU Ming, ZHANG Genyi. Multi-index detection of toxicological interaction between the aflatoxin B1 and sterigmatocystin in HepG2 cells[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(12): 1300-1306. (in Chinese)
- [9] ZHANG Fang, SHAN Xiaohong, SUN Xiulan, et al. Modeling and optimization of ozone treatment degradation of aflatoxin B1 (AFB1) in De-fat peanut powder using response surface methodology [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(5): 494-500. (in Chinese)
- [10] LUO Xiaohu, WANG Ren, WANG Li, et al. Efficiency and kinetics of ozone degradation of aflatoxin B1 in corn [J]. **Food Science**, 2015, 36(15): 45-49. (in Chinese)
- [11] CHEN Zhaobo. Molecular detection of the quality and safety of agricultural produces: advances and trends [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 444-450. (in Chinese)
- [12] DAS C, MISHRA H N. Effect of aflatoxin B-1 detoxification on the physicochemical properties and quality of ground nut meal[J]. **Food Chemistry**, 2000, 70: 483-487.

会 议 消 息

2018 第三届农业科学与生物技术国际会议

2018 第三届农业科学与生物技术国际会议将于 2018 年 7 月 23-25 日在中国成都召开。

2018 第三届农业科学与生物技术国际会议为广大农业科学、生物技术研究领域的学者、专家提供交流平台,会议组委会诚邀全球相关领域的学者、专家参加此次国际会议,就农业科学与生物技术为主题的相关热点问题探讨、交流,共同促进全球农业和生物技术的进步与发展。

会议接受英文和优秀的中文文章,接受摘要或全文投稿,所有录用论文的在线出版时间为收到最终稿后 30-60 天。

会议的合作出版社为美国 Science Publishing Group(<http://www.sciencepublishinggroup.com>),所有录用论文都将根据论文主题于会前在线发表在以下合作期刊中:

Agriculture, Forestry and Fisheries (AFF) ISSN Print: 2328-563X ISSN Online: 2328-5648

网址: <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/aff>

American Journal of BioScience (AJBIO) ISSN Print: 2330-0159 ISSN Online: 2330-0167

网址: <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/ajbio>

Science Discovery (SD) ISSN Print: 2331-0642 ISSN Online: 2331-0650

网址: <http://www.sciencepublishinggroup.com/j/sd>