

使用 LC/MS/MS 测定食品中的黄曲霉素

应用

食品安全

作者

Masahiko Takino
Agilent Technologies
9-1 Takakura-Cho
Hachioji-Shi, Tokyo
Japan

Toshitsugu Tanaka
Kobe Institute of Health
Department of Food Chemistry
4-6 Minatojima-nakamachi
Chuo-ku, Kobe
Japan

摘要

使用安捷伦 G6410AA LC/MS 三重串联四极杆质谱仪开发了一种灵敏度高而且选择性强的分析方法，用于谷类食物中黄曲霉素 G1、G2、B1 和 B2 残留量的测定。该方法使用了简单的样品预处理，然后进行 LC/MS/MS 检测。谷类食品中所有黄曲霉素的检测限均低于 1 ng/mL。

引言

黄曲霉素 (AFs) 属于真菌的次级代谢产物，是一类结构非常类似的化合物。这类霉菌毒素主要是由 *Aspergillus flavus* 和 *A. parasiticus* 产生的毒性非

常强的代谢产物，人畜接触后可能致癌[1]。根据流行病学证据，世界卫生组织和美国环境保护署将黄曲霉素划分为人类肝脏致癌物。因此，为了避免接触黄曲霉素使人致病，并且提高世界范围的食物监督水平，有必要对其进行准确测定。对食品中黄曲霉素的常规检测是通过薄层色谱法 (TLC) 和液相色谱法 (LC)，以荧光检测 (FD) 结合柱前衍生化和柱后衍生化进行的。由于这类方法的高选择性和灵敏度，LC/FD 技术得到了常规使用。此外，联用技术在食品的残留量分析方面得到了开发和应用，如 LC 与质谱 (MS) 检测器联用技术。质谱检测的高选择性和灵敏度与液相色谱法的分离能力相结合，对较大分子量范围的物质在痕量水平进行定性和定量分析具有决定性的优势。一些阐述不同类型的质谱方法用于黄曲霉素分析的论文已有发表[2-4]。

实验部分

样品预处理

待测样品 (花生、玉米、肉豆蔻和红椒) 来自当地市场并且不含任何黄曲霉素。按 Tanaka[5] 报道的经过验证的方法进行了黄曲霉素的提取和清洗步骤。简单地说，取样品细粉 20g，置 200mL 锥形瓶中，对于玉米和谷类，加乙腈-水 (9:1, v/v) 40mL。振摇 30 分钟后，取该混合溶液以 1,650 g 离心 5 分钟。取上



Agilent Technologies

清液，用 GF/B 级玻璃微纤维滤器（Whatman Internation Ltd, Maidstone, 英国）滤过。取滤液 5 mL，用 MultiSep 228 号卡套柱进行样品净化。以 1 mL/min 的流速过柱后，收集最初的 2 mL 洗脱液。将洗脱液置 40 °C 以温和的氮气流进行干燥。取残渣，用含有 10 mM 醋酸铵的甲醇-水（4:6 v/v）1 mL 溶解。

标准溶液制备

取黄曲霉素 G₂ (AFG₂)、黄曲霉素 G₁ (AFG₁)、黄曲霉素 B₂ (AFB₂) 和黄曲霉素 B₁ (AFB₁) 等标准试剂，分别用乙腈溶解并制成 1 mg/mL 的溶液，置暗处于 4 °C 保存备用。等量吸取上述各种贮备液至一样品瓶中，以流动相稀释并制成 LC/MS 分析用工作标准溶液。每种黄曲霉素的最终浓度为 1 ng/mL。

化学品

标准物质 AFG₂、AFG₁、AFB₁ 和 AFB₂ 来自 Sigma Aldrich Japan（东京，日本）。这些化合物的纯度大于 99%。醋酸铵、甲苯、HPLC 级乙腈和 HPLC 级甲醇来自 Wako Chemical（Osaka, Japan）。水为实验室内部以 Milli-Q 系统（Millipore, Tokyo, Japan）纯化而得。MultiSep 228 号卡套柱购自 Showa Denko（Kanagawa, Japan）。

LC/MS 仪器

本文中使用的 LC/MS/MS 系统包括 Agilent 1200 系列真空脱气机、二元泵、多孔板自动进样器、柱温箱、带有电喷雾离子源（ESI）的 Agilent G6410 三重串

联四极杆质谱仪。方法研究的目的是为了获得测定食品中黄曲霉素的快速而且灵敏度高的定量分析方法。对不同的试剂和色谱柱进行了优化，以获得最佳的色谱分离度和灵敏度，发现使用水、甲醇、醋酸铵的一种简单溶剂系统和 1.8- μ m 粒径的 C18 柱有很好的效果。

LC 条件

仪器:	Agilent 1200 HPLC
色谱柱:	ZORBAX Extend C18, 100 mm x 2.1 mm, 1.8 μ m (部件号 728700-902)
柱温:	40 °C
流动相:	A = 10 mM 醋酸铵水溶液 B = 甲醇 40% A/60% B
流速:	0.2 mL/min
进样量:	5 μ L

MS 条件

仪器:	Agilent 6410 LC/MS 三重串联四极杆
离子源:	正离子模式 ESI
干燥气流速:	10 L/min
喷雾器:	50 psig
干燥气温度:	350 °C
V _{cap} :	4000 V
扫描范围:	m/z 100 - 550
碰撞诱导解离电压:	可变的 100 V
MRM 离子:	见表 1
碰撞能量:	见表 1

LC/MS/MS 方法

使用 MRM 方式进行定量分析。MRM 的参数见表 1。

表 1. 各种黄曲霉素的 MRM 的数据采集参数

No	霉菌毒素	保留时间 (min)	分子量	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
1	黄曲霉素 G ₂	5.21	330	331	245	30
2	黄曲霉素 G ₁	6.61	328	329	243	30
3	黄曲霉素 B ₂	8.44	314	315	259	30
4	黄曲霉素 B ₁	10.89	312	313	241	30

结果与讨论

MRM 的优化

通过使用单级 MS 全扫描模式及随后的子离子扫描模式对 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄曲霉素标准混合液进行分析, 实现了对每种黄曲霉素最佳 MRM 的测定。这些标准混合液在全扫描模式和子离子扫描模式下的质谱见图 1 和图 2。全扫描模式下, 各种黄曲霉素的质谱均显示质子化分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 为基峰离子。选择这些离子作为

MRM 模式的母离子。各个化合物的最佳碰撞能量不同。为了确定最佳碰撞能量, 将该参数从 5 V 变化至 40 V, 间隔为 5 V。如图 2 所示, 观察到 30 V 时, 各种黄曲霉素的子离子强度明显最佳。各种强度最大的子离子分别为 m/z 245 (AFG_2), 243 (AFG_1), 259 (AFB_2) 和 241 (AFB_1)。在上述结果的基础上, 碰撞能量设定为 30 V。

表 1 显示每种黄曲霉素 MRM 模式的参数。

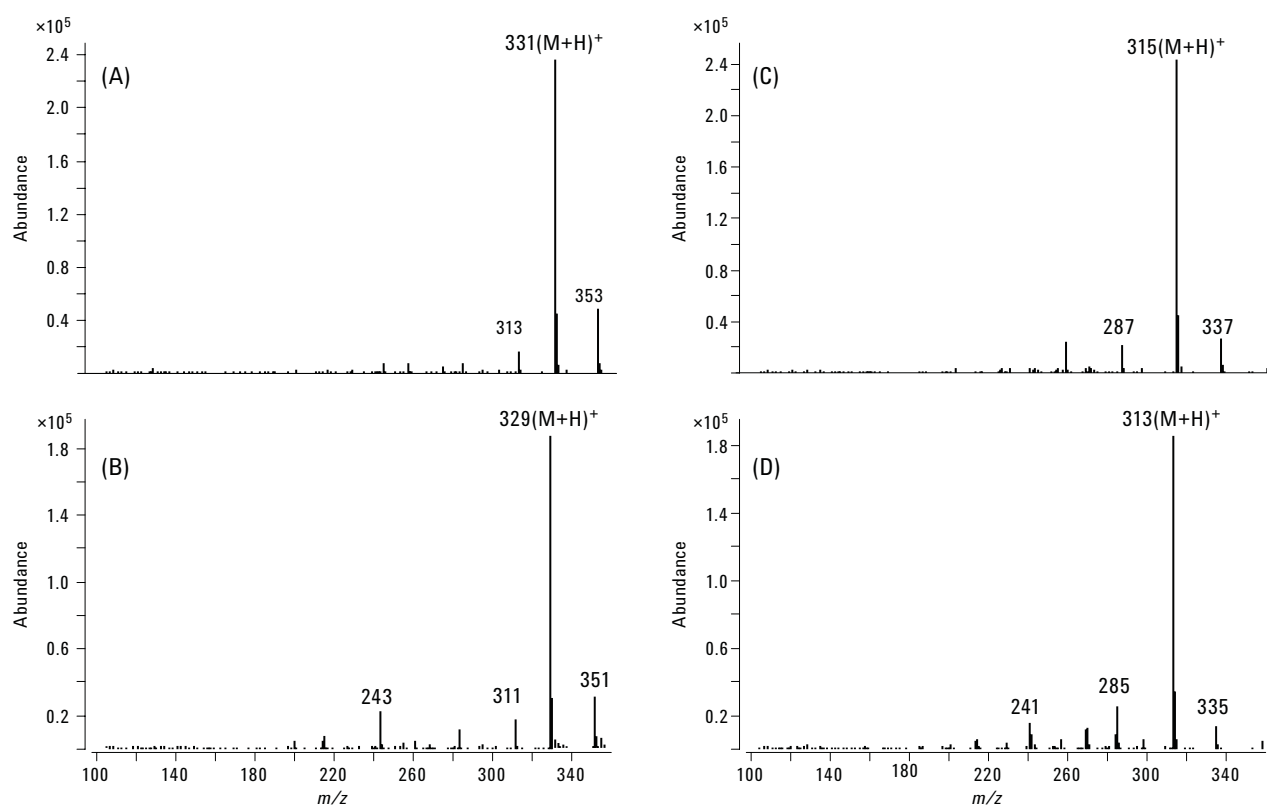


图 1. 单 MS 全扫描模式中四种浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄曲霉素标准品的质谱图, AFG_2 : (A); AFG_1 : (B); AFB_2 : (C); AFB_1 : (D)

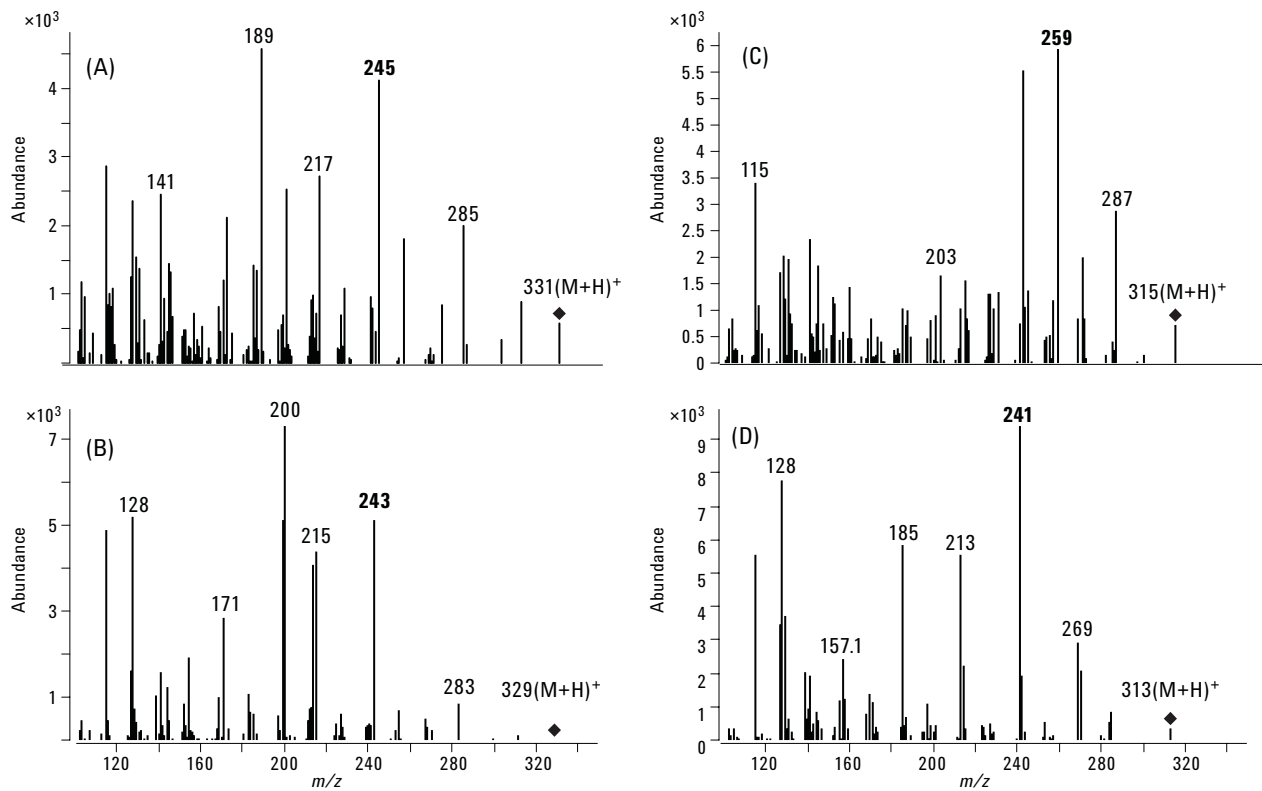


图2. 子离子扫描模式下四种浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的黄曲霉素的质谱图, AFG₂: (A); AFG₁: (B); AFB₂: (C); AFB₁: (D)

各种 $0.1 \text{ ng}/\text{mL}$ 黄曲霉素的 MRM 色谱图如图 3 所示。这些色谱图显示了所有黄曲霉素均具有出色的信噪比 (S/N)。各种黄曲霉素的检测限以该 MRM 色谱图信噪比的 3 倍测得, 如表 2 所示。为评价校正曲线的线性, 对从 $0.1 \text{ ng}/\text{mL}$ 到 $100 \text{ ng}/\text{mL}$ 不同浓度的黄曲霉素标准溶液进行了分析。如图 4 和表 2 所示, 所有黄曲霉素的线性均非常好, 相关系数 (r^2) 均大于 0.999。

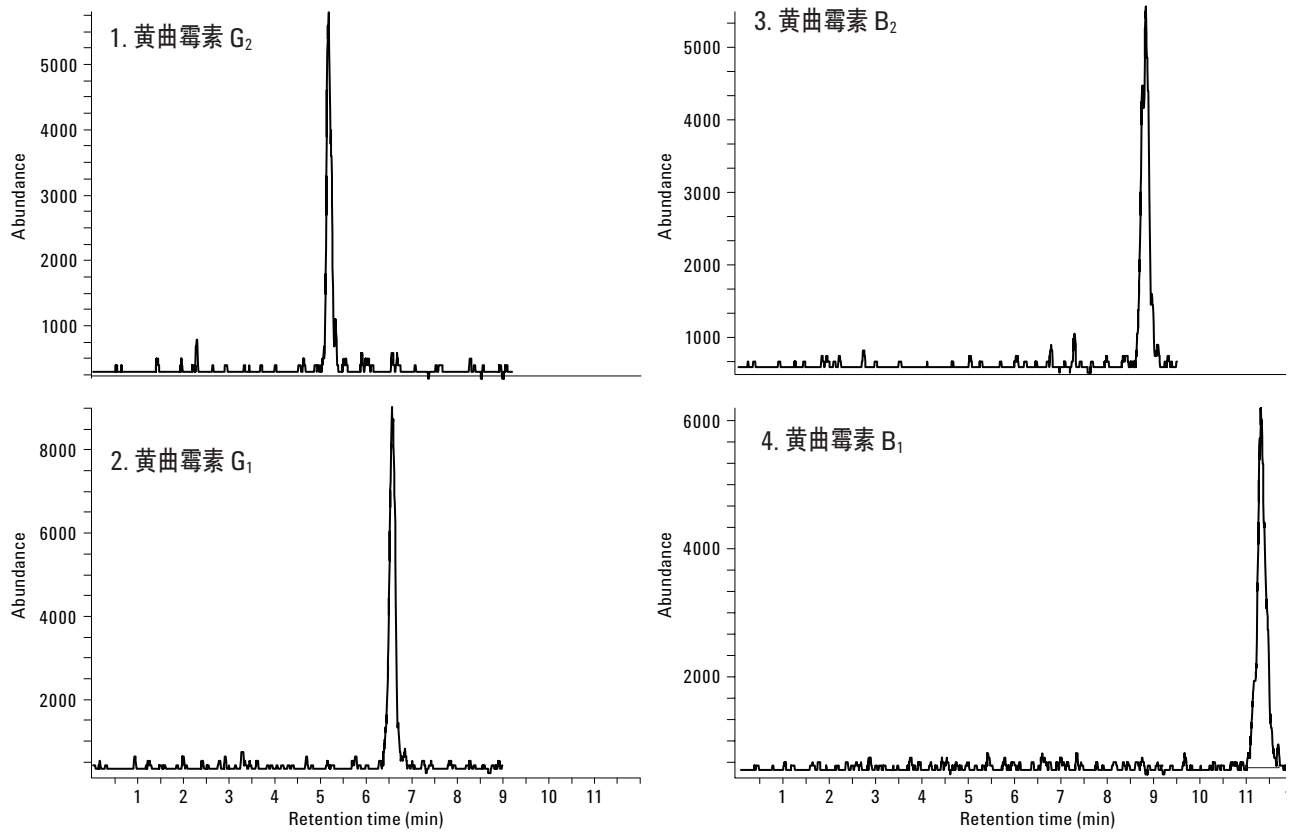


图3. 四种 0.1 ng/mL 黄曲霉素在MRM 模式下的MRM 色谱图

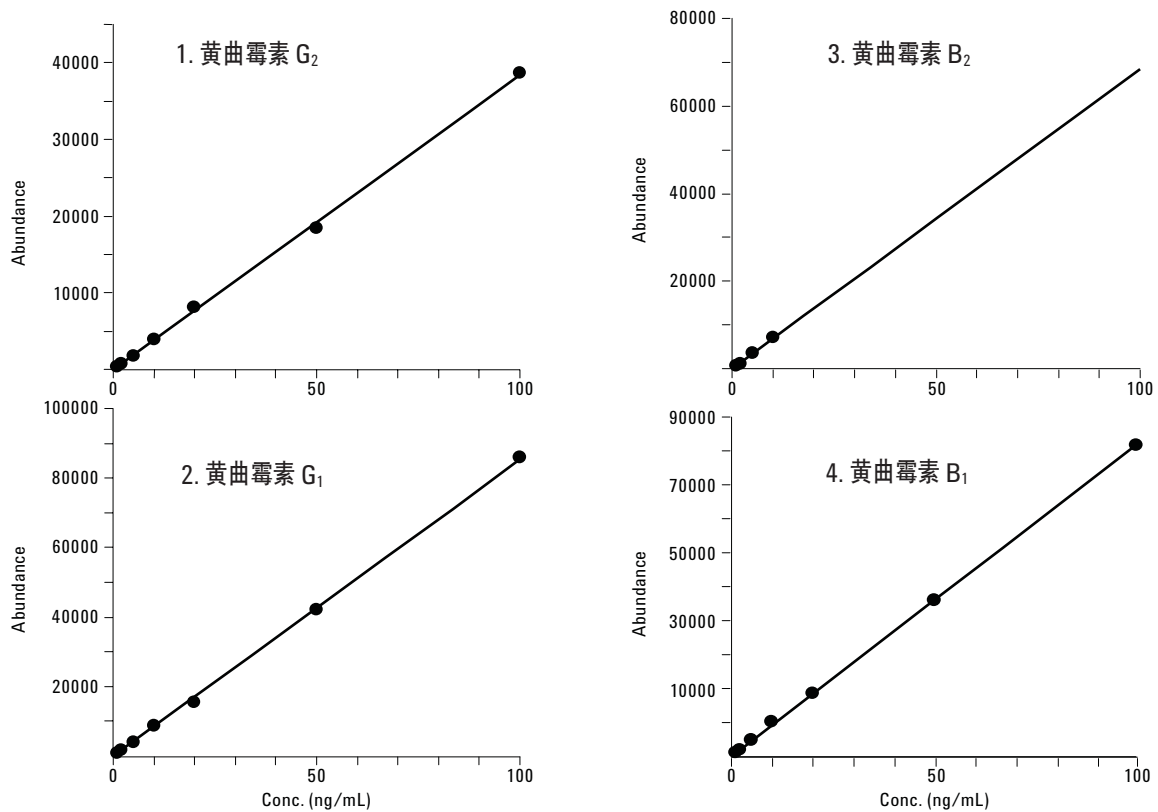


图4. 四种黄曲霉素从 0.1 ng/mL 到 100 ng/mL 的校正曲线

表 2. 四种黄曲霉素的线性和检测限

No	霉菌毒素	相关系数 (r^2)	检测限 (ng/mL)
1	黄曲霉素 G ₂	0.9999	0.025
2	黄曲霉素 G ₁	0.9992	0.020
3	黄曲霉素 B ₂	0.9999	0.025
4	黄曲霉素 B ₁	0.9993	0.020

通过在谷类和玉米提取物中注入 0.2 ng/mL 的霉菌毒素标准品，对本方法的基质效应进行了考察。谷类和玉米提取物的典型 MRM 色谱图分别如图 5 和图 6 所示。与霉菌毒素标准品混合溶液相比，未见两种食品样品基质带来的其它色谱峰。这些结果显示，MRM 模式具有非常高的选择性。

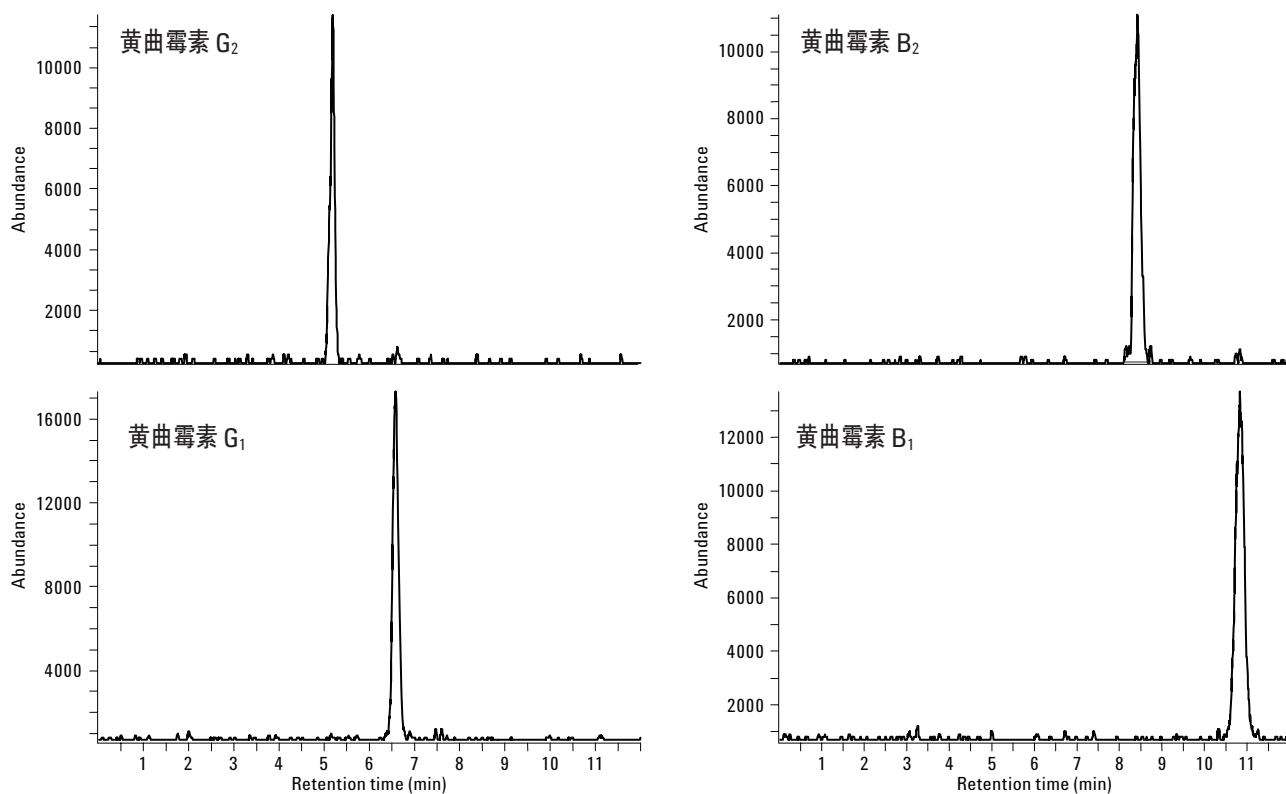


图 5. 在谷类提取物中注入 0.2 ng/mL 黄曲霉素的 MRM 色谱图

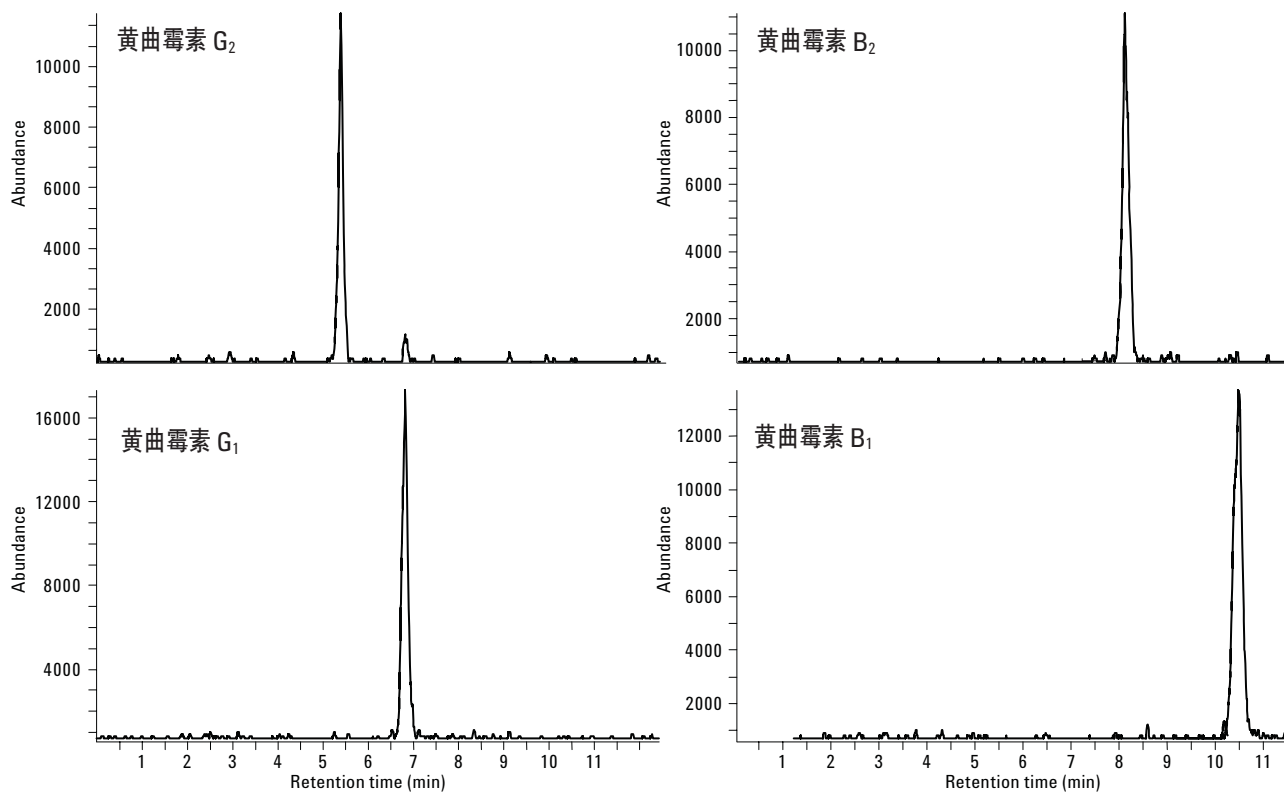


图 6. 在玉米提取物中注入 0.2 ng/mL 黄曲霉素的 MRM 色谱图

此外，与黄曲霉素标准品的色谱峰强度对比，考察了样品基质中各种黄曲霉素峰强度的变化。结果如表 3 所示，各种成分的相对峰强度为 88%-96%。因此，基质效应（如离子抑制）可能不显著，并且可能使用外标代替与基质相匹配的标准品。

表 3. 样品提取物中各种黄曲霉素的相对强度

No	霉菌毒素	相对强度 (%)	
		谷类	玉米
1	黄曲霉素 G ₂	88	91
2	黄曲霉素 G ₁	92	94
3	黄曲霉素 B ₂	93	96
4	黄曲霉素 B ₁	97	95

结论

本文中阐述的使用 LC/MS/MS 测定多种黄曲霉素的方法适合于测定谷类和玉米提取物中的四种黄曲霉素，灵敏度高，选择性强。该方法的另一优点是对于所有研究的食品样品，未发现离子抑制。因此，无需与基质相匹配的标准品，这使得对不同来源样品的分析方法更趋一致。

参考文献

1. K. K. Sinha and D. Bhatnagar, 1998, "Mycotoxins in Agriculture and Food Safety," 1998 (New York: Marcel Dekker)
2. W. J. Hurst, R. A. Martin, and C. H. Vestal, 1991, "The Use of HPLC/Thermospray MS for the Confirmation of Aflatoxins in Peanuts," *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 2541-2540.
3. A. Cappiello, G. Famiglini, and B. Tirillini, 1995, "Determination of Aflatoxins in Peanut Meal by LC/MS with a Particle Beam Interface," *Chromatographia*, **40**, 411-416.
4. M. Vahl and K. Jorgensen, 1998, "Determination of Aflatoxins in Food Using LC/MS/MS," *Z Lebensm Unters Forsch A.*, **206**, 243-245.
5. T. Tanaka, A. Yoneda, Y. Sugiura, S. Inoue, M. Takino, A. Tanaka, A. Shinoda, H. Suzuki, H. Akiyama, and M. Toyoda, 2002, "An Application of Liquid Chromatography and Mass Spectrometry for Determination of Aflatoxins," *Mycotoxins*, **52**, 107-113.

更多信息

如需了解本公司产品和服务的更多信息，请访问本公司网址 www.agilent.com/chem/cn。

如需了解与此应用相关的详情，请联系 masahiko_takino@agilent.com。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2008

2008年1月4日 中国印刷
5989-7615CHCN

