



三重串联四极杆液质联用仪用于食品中黄曲霉素 B₁, B₂, G₁ 和 G₂ 的高灵敏度检测

应用摘要

食品安全

作者

Yang Chen and Jack Cappozzo
国家食品安全和技术中心
伊利诺伊理工学院
伊利诺伊州
美国

Peter JW Stone
安捷伦科技
史蒂文斯河大道
美国加州圣克拉拉市, 95051
美国

摘要

采用简单而且低成本分散固相萃取法 (C18) 进行样品前处理能有效地去除基质背景, 使得三重四极杆液质对于黄曲霉毒素的检测限达到 fg 水平。本方法具有分离度高, 分离速度快 (< 6 min) 的优点。在 0.1–100 µg/L 浓度范围内, 每种黄曲霉毒素都具有很好的线性相关性 (> 0.998)。使用分散固相萃取作为样品净化方法, 食品基质中添加的四种黄曲霉毒素标准品回收率在 85–110% 之间, 和其他广泛应用的常规 SPE 方法相当。对于本文中的四种食品基质, 其检测限 < 0.15 µg/kg, 定量限 < 0.5 µg/kg。分析结果的变异小于 5% (相对标准偏差, RSD)。



Agilent Technologies

前言

黄曲霉素是由真菌寄生曲霉和黄曲霉产生的代谢物，是真菌毒素的一种[1]。它们可能出现在谷物、坚果和香料等食品中[2]。主要存在四种天然黄曲霉素： B_1 、 B_2 、 G_1 和 G_2 （图 1）。接触黄曲霉素可能会引起人类和牲畜的癌症，因此需要可靠而且高灵敏度的检测方法以保证食品的安全。

实验条件

本方法使用的液质联用系统是使用喷射流离子聚焦技术的安捷伦 6460 三重串联四极杆液质联用仪[3]和安捷伦 1200 SL 系列液相色谱，液相系统包括二元高压泵 (G1312B)，真空脱气机 (G1379B)，超低残留自动液体进样器 (G1367D)，柱温箱 (G1316B) 和 MassHunter 数据分析系统

黄曲霉素标准品和待测食品

高纯度黄曲霉毒素 (B_1 、 B_2 、 G_1 和 G_2) 购自 Sigma-Aldrich。不含黄曲霉毒素的玉米粉，花生和核桃仁购自当地的杂货店。

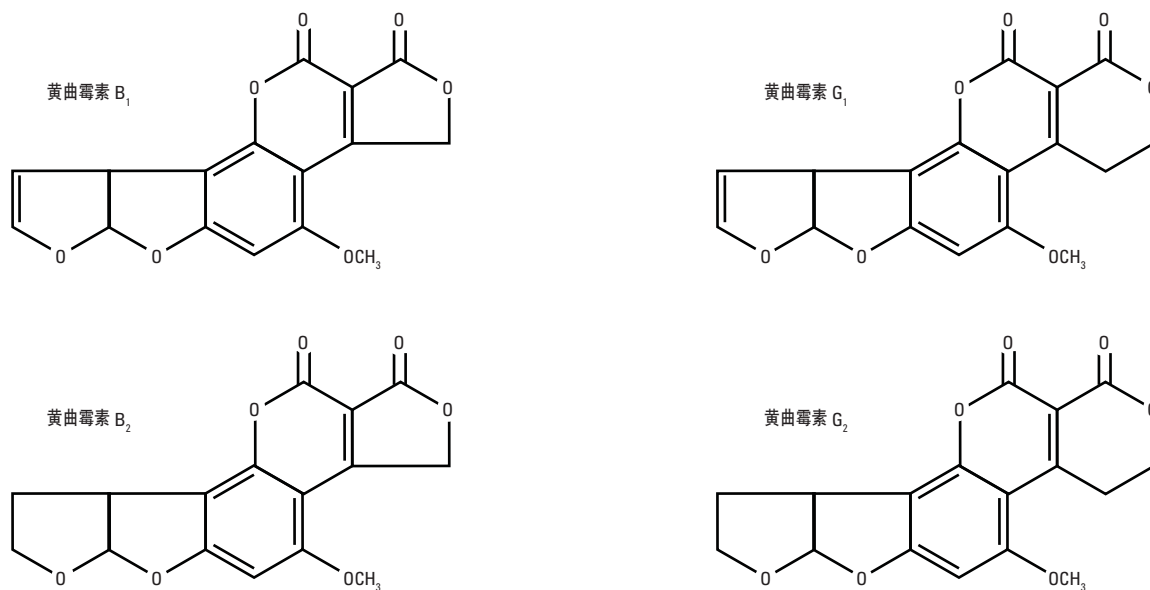


图 1. 黄曲霉素 B_1 、 B_2 、 G_1 和 G_2 的结构

仪器

高分离度快速液相色谱条件和配置：

- 安捷伦 1200 高压二元泵 (G1312B)
- 高性能自动进样器 (G1367D) 和温控器 (G1330B)
- 柱温箱 (G1316B), 包括两位十通切换阀(G1316B option #057)

方法条件：

色谱柱:	安捷伦 ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 x 50 mm, 1.8 µm	
柱温:	40 °C	
进样体积:	5 µL	
自动进样器温度:	4 °C	
洗针:	洗针针座 (100% 甲醇), 5 秒	
流动相:	A = 10 mM 醋酸铵溶液 B = 100%甲醇	
流速:	0.6 mL/min (不分流)	
梯度:	时间 (min)	%B
	0	5
	5	100
	6	100
分析时间:	6 min	
平衡时间:	1.5 min	
总分析时间:	7.5 min	

质谱离子源条件和配置：

使用喷射流离子聚集技术的安捷伦 6460 三重串联四极杆液质联用仪。

离子源参数：

离子化模式:	喷射流离子聚焦电喷雾，正模式
毛细管电压:	4000 V
干燥气 (氮气):	10 L/min
干燥器温度:	325 °C
雾化气 (氮气):	50 psi
鞘气温度:	350 °C
鞘气流速:	11 L/min
喷嘴电压:	0 V
Q1 和 Q2 分辨率:	0.7 amu [自动调谐模式]
Delta EMV:	400V

三重串联四极杆液质多反应监测模式 (MRM) 参数见表 1。安捷伦自动参数优化软件(MassHunter Optimizer) 可以自动得到每个待测组分的最佳碰撞电压，二级质谱碰撞能量，并确定最优的子离子。

表 1. 黄曲霉素和对应内标的 MRM 参数

名称	保留时间 (min)	碰撞电压 (V)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)
黄曲霉素 B ₁	4.68	130	313.1	241.1	35
				285.1	20
				269.1	25
黄曲霉素 B ₂	4.57	130	315.1	287.1	25
				259.1	25
				243.1	40
黄曲霉素 G ₁	4.40	130	329.1	243.1	25
				311.1	20
				283.1	20
黄曲霉素 G ₂	4.26	130	331.1	245.1	30
				285.1	25
				313.1	25
内标同位素 B ₁	4.68	130	330.1	301.1	20
				255.1	40
				303	25
内标同位素 B ₂	4.57	130	332.1	273.0	30
				257.1	25
				299.1	25
内标同位素 G ₁	4.40	130	346.1	330.1	25
				259.1	30
内标同位素 G ₂	4.26	130	348.1	330.1	25
				259.1	30
				259.1	30

样品前处理和回收率研究

玉米粉，面粉，花生和核桃仁（每个样品 10 克），然后添加四种黄曲霉素标准品，浓度分别为 5 和 25 ng/g。在室温条件下样品用 40 毫升甲醇-水(84:16, v/v)震荡提取 30 分钟。提取液用 C18 粉末吸附剂（ODS 固相萃取吸附剂，安捷伦部件号 5982-1182）和 MycoSep 226 多功能固相萃取吸附剂 (Romer) 进行净化。取 0.4 毫升上清液加 0.6 毫升 10 mM 醋酸铵水溶液。

样品溶液 14000 rpm 离心 3 分钟，然后准备进样分析。

每一种食品基质和加标浓度都重复 7 次，以便于统计学分析。样品前处理的整个过程见图 2。

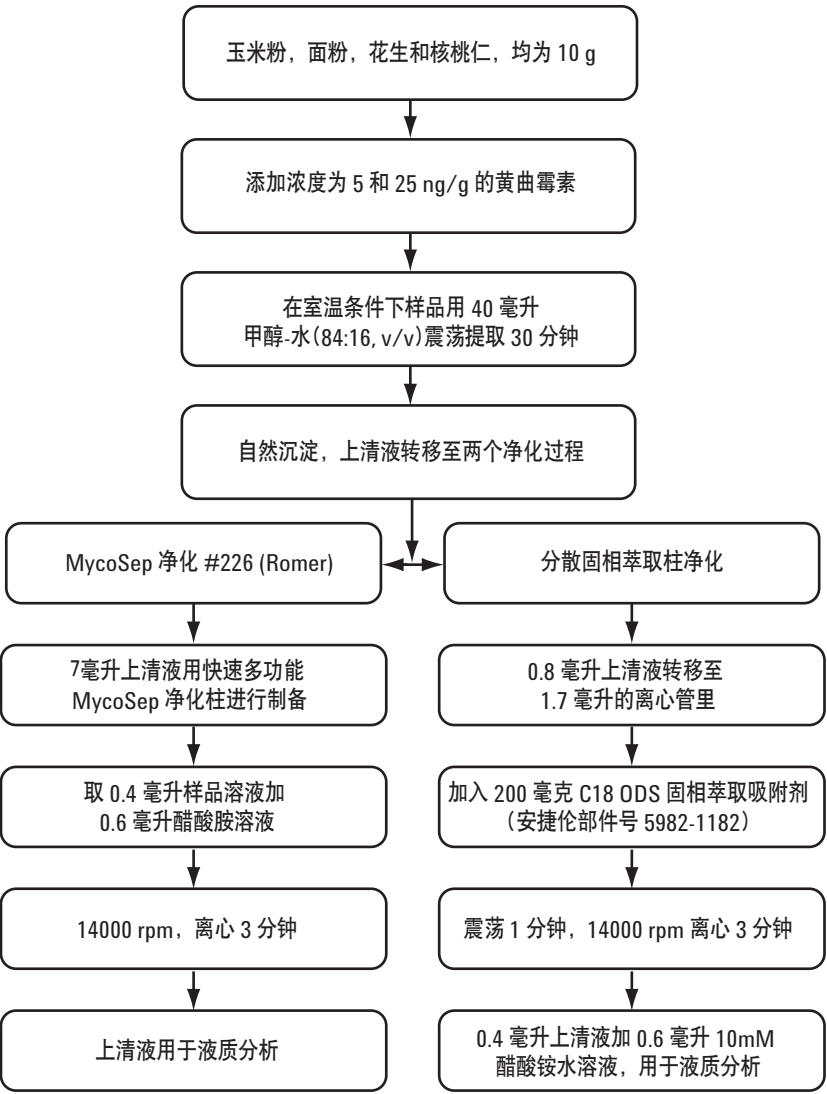


图 2. 样品制备流程示意图，分散固相萃取净化与目前广泛使用的固相萃取净化方法

结果与讨论

实验部份描述的快速色谱方法使得黄曲霉素混合物得到了很好的分离, 而且分析时间小于 6 分钟。典型的离子流图见图 3(a)——浓度为 1 ppb 的各黄曲霉素和见图 3(b)——浓度为 2.5 ppb 的对同位素标记的黄曲霉素内标的离子流图。离子流图是多反应检测模式下的提取离子的叠加图 (EICs)。

在 0.1 到 100 ppb 的浓度范围内,黄曲霉素 B1, B2, G1 和 G2 都具有很好的线性, 线性相关性 (R^2) 优于 0.999。图 4 是在同一个水平上四个黄曲霉素校准曲线的叠加图, 没有进行内标修正。使用内标可以有效地校正基质效应, 结果见图 5。

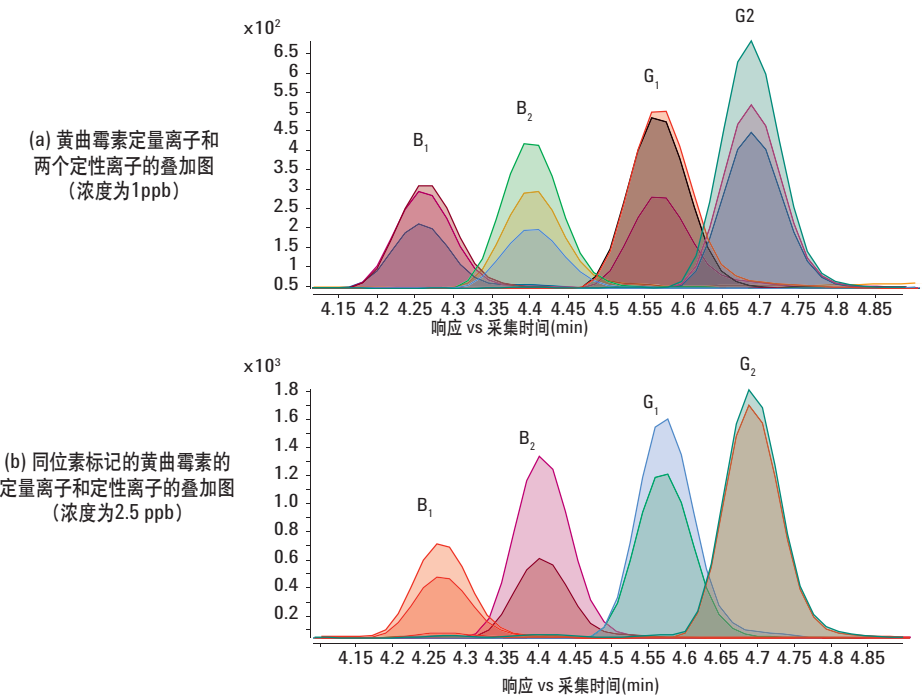


图 3. 浓度 1 ppb 的黄曲霉素 B_1 , B_2 , G_1 和 G_2 和浓度为 2.5 ppb 的同位素标记的黄曲霉素的 LC/MS/MS 色谱图

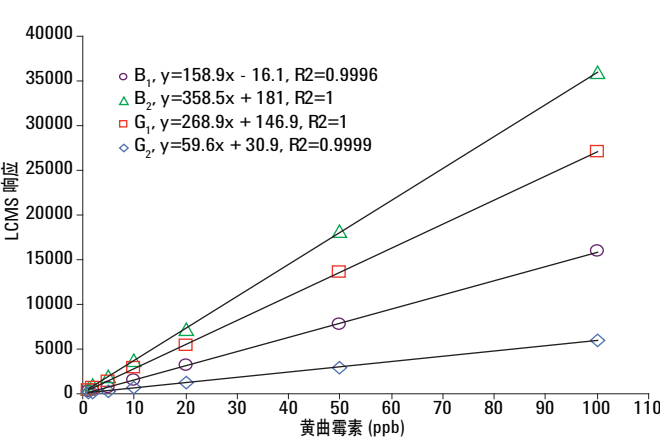


图 4. 黄曲霉素 B_1 , B_2 , G_1 和 G_2 校正曲线的叠加图

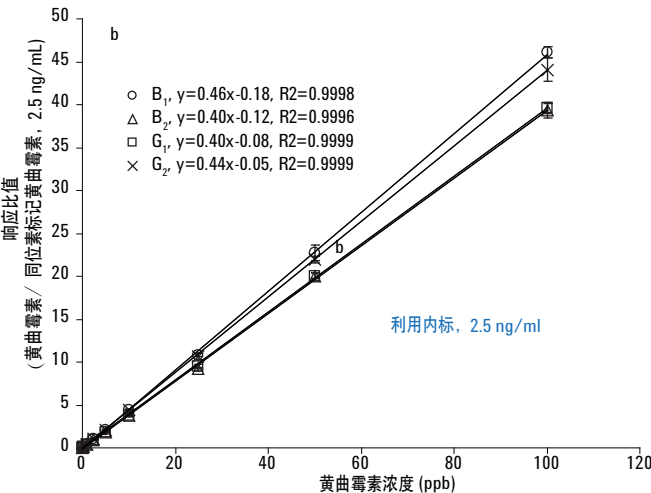


图 5. 经过内标修正之后的黄曲霉素 B_1 , B_2 , G_1 和 G_2 校正曲线的叠加图

为了测定检测限 (LOD) 和报告限 (LOR), 对于每一种食品基质, 用前面介绍的两种样品净化流程和 LC/MS/MS 方法重复 7 次。本文中的分析结果是 7 次分析结果的平均值 (N=7)。

检测限是在峰对峰信噪比大于等于 3 的条件下测得的。报告限是在峰对峰信噪比大于等于 10 的条件下测得的。

表 2 是四种食品基质中每一种黄曲霉素的检测限 (LOD) 和报告限 (LOR)。对四种样品基质和两种净化流程, 黄曲霉素的检测限小于 0.15 µg/kg, 定量限小于 0.5 µg/kg。

表 3 和 4 总结了 7 次重复实验分析的检测限数据。表 3 是用分散固相萃取净化得到的数据, 表 4 是用 Mycosep 净化得到的数据。

表 2. 是四种食品基质及两种净化方法得到的黄曲霉素的检测限 (LOD) 和报告限 (LOR)

黄曲霉素		Mycosep (#226, Romer)		分散 C18 固相萃取吸附剂, 安捷伦部件号 5982-1182	
食品基质		LOD ng/g (S/N>3)	LOR ng/g (S/N>10)	LOD ng/g (S/N>3)	LOR ng/g (S/N>10)
玉米粉 (7 次重复平均值)	B ₁	0.047	0.16	0.060	0.20
	B ₂	0.036	0.12	0.085	0.28
	G ₁	0.08	0.28	0.10	0.35
	G ₂	0.046	0.15	0.033	0.11
面粉 (7 次重复平均值)	B ₁	0.068	0.23	0.012	0.042
	B ₂	0.11	0.36	0.037	0.12
	G ₁	0.14	0.47	0.15	0.50
	G ₂	0.038	0.13	0.11	0.36
花生 (7 次重复平均值)	B ₁	0.051	0.17	0.056	0.19
	B ₂	0.045	0.15	0.069	0.23
	G ₁	0.07	0.23	0.05	0.15
	G ₂	0.052	0.17	0.14	0.45
核桃仁 (7 次重复平均值)	B ₁	0.12	0.41	0.093	0.31
	B ₂	0.035	0.12	0.098	0.33
	G ₁	0.03	0.10	0.12	0.40
	G ₂	0.047	0.16	0.04	0.13

表 3. 利用分散固相萃取净化方法得到黄曲霉素 B₁, B₂, G₁ 和 G₂ 的检测限(LOD)

食品基质	B ₁ LOD (ng/g)	B ₂ LOD (ng/g)	G ₁ LOD (ng/g)	G ₂ LOD (ng/g)
玉米粉	0.060	0.085	0.100	0.033
面粉	0.012	0.037	0.150	0.110
花生	0.056	0.069	0.050	0.140
核桃仁	0.093	0.098	0.120	0.040
平均值	0.055	0.072	0.105	0.080
柱上进样量(fg)	275	360	525	400

表 4. 利用 Mycosep, #226 净化方法得到的黄曲霉素 B₁, B₂, G₁ 和 G₂ 的检测限 (LOD)

食品基质	B ₁ LOD (ng/g)	B ₂ LOD (ng/g)	G ₁ LOD (ng/g)	G ₂ LOD (ng/g)
玉米粉	0.047	0.036	0.080	0.046
面粉	0.068	0.110	0.140	0.038
花生	0.051	0.045	0.070	0.052
核桃仁	0.120	0.035	0.030	0.047
平均值	0.072	0.057	0.080	0.046
柱上进样量(fg)	360	283	400	229

样品制备方法

利用两种样品净化方法对四种样品基质中的黄曲霉素回收率进行了研究，每个样品分析重复 7 次。图 6 (a)和 (b) 用图形描述了四种

食品基质在分散固相萃取净化和 Mycosep 固相萃取净化条件下，黄曲霉素回收率的对比。正如结果所示，两种样品净化方法的回收率都在 85-110%之间，MycoSep 净化法仅在核桃仁样品稍微优于分散固相萃取法。

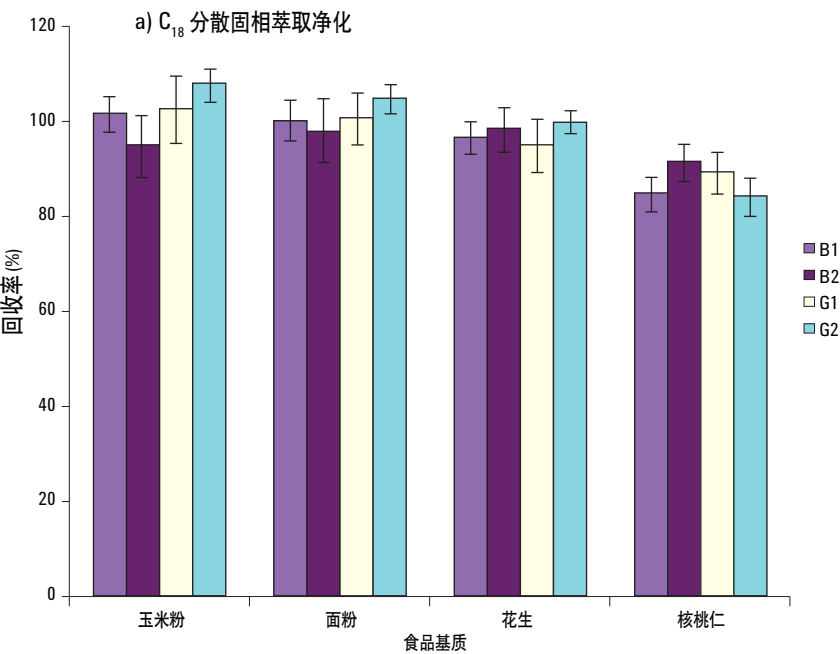


图 6(a). 使用 C_{18} 分散固相萃取法得到的黄曲霉素 B_1 , B_2 , G_1 和 G_2 的回收率

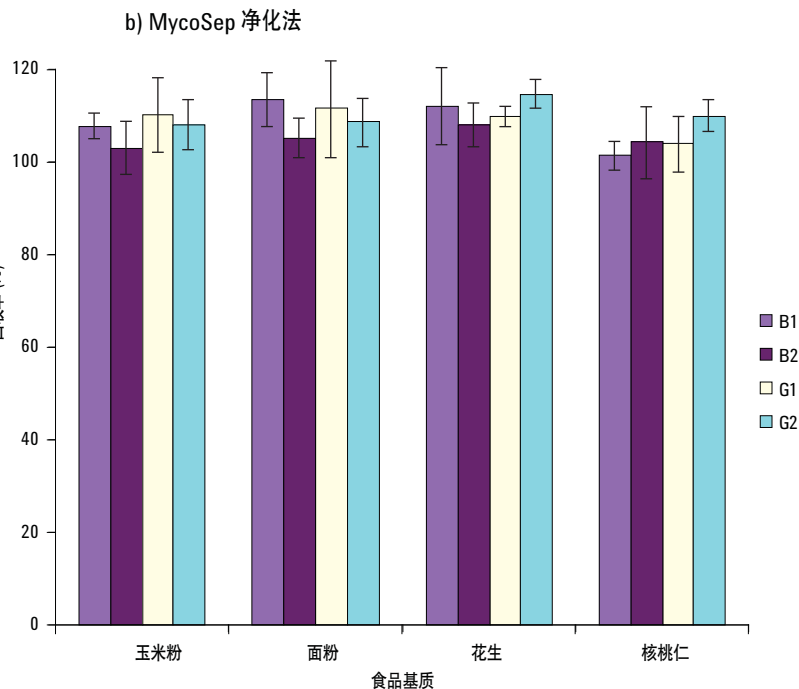


图 6(b). 使用 Mycosep #226 净化法得到的黄曲霉素 B_1 , B_2 , G_1 和 G_2 的回收率

表 5 至 8 是对于每一种食品基质中黄曲霉素的回收率数据，添加浓度分别为 5 ng/g 和 25 ng/g。每一种样品分为两份，分别用 C18 分散固相萃取和 Mycosep #226 法进行净化，详细的流程见图 2(a)。

表 5. 加标的玉米粉样品——回收率数据 (百分回收率, $\pm RSD$, $N=7$)

	黄曲霉素	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化
无内标	B ₁	101.7 $\pm$ 3.7	95.7 $\pm$ 3.0	107.8 $\pm$ 2.8	105.4 $\pm$ 2.8
	B ₂	95 $\pm$ 6.3	95.4 $\pm$ 1.4	103.0 $\pm$ 5.7	105.3 $\pm$ 2.0
	G ₁	102.7 $\pm$ 7.1	96.8 $\pm$ 1.75	110.2 $\pm$ 7.9	103.7 $\pm$ 3.0
	G ₂	107.9 $\pm$ 3.5	97.8 $\pm$ 0.88	108.1 $\pm$ 5.4	104.3 $\pm$ 2.4
内标	B ₁	102.3 $\pm$ 2.9	100.1 $\pm$ 2.4	108.2 $\pm$ 5.1	97.8 $\pm$ 3.3
	B ₂	100.0 $\pm$ 7.9	94.0 $\pm$ 3.1	101.7 $\pm$ 4.7	92.8 $\pm$ 3.5
	G ₁	107.3 $\pm$ 3.5	97.0 $\pm$ 6.0	110.3 $\pm$ 3.6	102.5 $\pm$ 1.8
	G ₂	101.3 $\pm$ 5.6	100.4 $\pm$ 3.8	104.9 $\pm$ 5.4	97.2 $\pm$ 6.3

表 6. 加标的面粉样品——回收率数据 (百分回收率, $\pm RSD$, $N=7$)

	黄曲霉素	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化
无内标	B ₁	100.1 $\pm$ 4.4	96.6 $\pm$ 2.9	113.5 $\pm$ 5.9	100.6 $\pm$ 1.8
	B ₂	98.2 $\pm$ 6.9	96.4 $\pm$ 2.6	105.1 $\pm$ 4.5	102.1 $\pm$ 4.4
	G ₁	100.5 $\pm$ 5.5	105.4 $\pm$ 3.8	111.5 $\pm$ 10.4	106.1 $\pm$ 4.0
	G ₂	104.9 $\pm$ 3.2	106.7 $\pm$ 1.3	108.6 $\pm$ 5.2	103.7 $\pm$ 2.9
内标	B ₁	100.9 $\pm$ 3.6	109.3 $\pm$ 4.7	107.5 $\pm$ 4.8	111.7 $\pm$ 4.9
	B ₂	85.2 $\pm$ 7.7	99.8 $\pm$ 2.8	92.4 $\pm$ 6.3	101.0 $\pm$ 4.0
	G ₁	110.6 $\pm$ 7.8	112.8 $\pm$ 1.8	117.6 $\pm$ 7.7	109.3 $\pm$ 5.7
	G ₂	108.4 $\pm$ 6.2	108.3 $\pm$ 3.9	115.6 $\pm$ 7.1	109.8 $\pm$ 3.6

表 7. 加标的花生样品——回收率数据 (百分回收率, $\pm RSD$, $N=7$)

	黄曲霉素	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化
无内标	B ₁	96.7 $\pm$ 3.4	97.0 $\pm$ 4.6	112.0 $\pm$ 8.4	104.9 $\pm$ 1.7
	B ₂	98.3 $\pm$ 4.7	97.4 $\pm$ 2.9	108.0 $\pm$ 4.6	104.5 $\pm$ 2.0
	G ₁	95.0 $\pm$ 5.6	95.0 $\pm$ 4.9	109.9 $\pm$ 2.1	105.7 $\pm$ 3.4
	G ₂	100.0 $\pm$ 2.3	100.0 $\pm$ 2.0	114.7 $\pm$ 3.2	106.3 $\pm$ 1.1
内标	B ₁	101.8 $\pm$ 3.6	96.1 $\pm$ 2.0	100.0 $\pm$ 6.8	103.0 $\pm$ 3.5
	B ₂	102.5 $\pm$ 5.5	100.2 $\pm$ 5.0	99.4 $\pm$ 4.1	102.9 $\pm$ 2.7
	G ₁	105.7 $\pm$ 7.3	99.2 $\pm$ 2.2	105.2 $\pm$ 4.3	101.7 $\pm$ 5.2
	G ₂	107.5 $\pm$ 10.9	104.9 $\pm$ 6.7	109.3 $\pm$ 8.7	102.4 $\pm$ 3.1

表 8. 加标的核桃仁样品——回收率数据 (百分回收率, $\pm RSD$, $N=7$)

	黄曲霉素	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, C18 分散固相萃取净化	加标 5 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化	加标 25 ng/g 的 玉米粉样品, Mycosep #226 净化
无内标	B ₁	84.9 $\pm$ 3.7	85.2 $\pm$ 2.2	101.4 $\pm$ 3.2	101.0 $\pm$ 2.3
	B ₂	91.5 $\pm$ 3.9	89.8 $\pm$ 2.8	104.2 $\pm$ 7.9	106.3 $\pm$ 2.9
	G ₁	89.4 $\pm$ 4.4	86.7 $\pm$ 1.5	103.9 $\pm$ 5.9	101.7 $\pm$ 4.2
	G ₂	84.0 $\pm$ 4.0	83.1 $\pm$ 1.3	109.9 $\pm$ 3.4	106.3 $\pm$ 1.5
内标	B ₁	106.5 $\pm$ 4.9	98.9 $\pm$ 4.1	93.8 $\pm$ 1.4	100.2 $\pm$ 2.9
	B ₂	99 $\pm$ 5.4	96.5 $\pm$ 3.5	92.4 $\pm$ 2.7	98.7 $\pm$ 4.4
	G ₁	103.2 $\pm$ 5.9	94.9 $\pm$ 2.5	102.8 $\pm$ 9.0	102.1 $\pm$ 3.9
	G ₂	100.2 $\pm$ 6.2	97.5 $\pm$ 4.6	99.5 $\pm$ 6.8	101.2 $\pm$ 3.8

结论

本文开发了一种样品净化成本相对较低的 LC/MS/MS 方法用于坚果中黄曲霉素 B₁, B₂, G₁ 和 G₂ 的分析, 其检测限低于 1 ppb。本方法利用分散 C18 固相萃取技术进行样品的净化 (安捷伦部件号 5982-1182)。这种样品净化方法与当今广泛使用的前处理方法的黄曲霉素的回收率相当。

黄曲霉素检测限小于 0.15 µg/kg, 报告限小于 0.5 µg/kg (玉米粉, 面粉, 花生和核桃仁)。

黄曲霉素 B₁, B₂, G₁ 和 G₂ 在 0.1 - 100 ppb 的浓度范围内具有优异的线性, 相关系数 (R²) 大于 0.999。

利用 C18 分散固相萃取法进行样品净化, 黄曲霉素的回收率在 85-110% 之间。

参考文献

1. Microhim Acts 153, 2006, 101-108
2. Rapid Commun. Mass Spectrum, 2009; 23: 3-11
3. "Agilent Jet Stream Thermal Gradient Focussing Technology" 安捷伦出版号 5990- 3494EN

更多信息

有关安捷伦产品和服务的更多信息, 请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

有关本应用的更多信息, 请联络 Peter JW Stone, 安捷伦科技有限公司, 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA, 95051, USA.

本文提到的商品名称、商标, 制造商所涉及的任何具体商业化产品或非盈利性组织、流程或服务, 并不代表其受美国政府的认可、推荐或支持。作者的观点和意见, 并不代表美国政府的立场, 不得用于广告或产品宣传目的。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本文可能存在的错误或由于提供、展示或使用本文所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2010

中国印刷

2010 年 12 月 2 号

5990-6894CHCN



Agilent Technologies