

检测分析

高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定花生油中黄曲霉毒素 B₁ 的含量

鲍会梅

(江苏食品药品职业技术学院 食品学院, 江苏 淮安 223003)

摘要:建立了高效液相色谱-电喷雾串联质谱检测花生油中黄曲霉毒素 B₁ 含量的方法,并探讨了最佳检测条件。结果表明:最佳检测条件为离子源温度 110 °C,毛细管电压 3 500 V,电喷雾离子源 (ESI⁺),鞘气压力 270 kPa,辅助气压力 104 kPa,磁接气流速 0.1 mL/min,提取溶剂为甲醇。在最佳检测条件下,黄曲霉毒素 B₁ 在 1.00 ~ 11.00 ng/mL 范围内呈良好的线性关系,检出限为 0.3 μg/kg,平均回收率为 99.7%,RSD 为 0.27%。该测定方法具有简单、快速、灵敏度高、准确的优点,电喷雾质谱提供的离子对扫描能够很大程度上减少基质的干扰。

关键词:高效液相色谱-电喷雾串联质谱;黄曲霉毒素 B₁;花生油

中图分类号:TS227;TS201.6 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)04-0139-04

Determination of AFB₁ content in peanut oil by HPLC-ESI MS/MS

BAO Huimei

(School of Food, Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, Jiangsu, China)

Abstract: A method for the determination of AFB₁ content in peanut oil was developed by HPLC-ESI MS/MS, and the detection conditions were optimized. The results showed that the optimal detection conditions were obtained as follows: ion source temperature 110 °C, capillary voltage 3 500 V, electrospray ionization (ESI⁺), sheath gas pressure 270 kPa, auxiliary gas pressure 104 kPa, magnetic gas flow rate 0.1 mL/min, with methanol as extraction solvent. Under these conditions, AFB₁ had good linear relationship in the range of 1.00 - 11.00 ng/mL, and the limit of detection, average recovery rate and RSD were 0.3 μg/kg, 99.7% and 0.27% respectively. The method had the items of simpleness, rapidness, sensitivity and accuracy, and the ion pair scanning provided by ESI-MS could reduce the matrix interference to a great extent.

Key words: HPLC-ESI MS/MS; AFB₁; peanut oil

黄曲霉毒素是食物及饲料中寄生的黄曲霉、寄生曲霉代谢的化学结构类似的一组产物,在潮湿温热地区发生概率较高^[1],具有致癌、致畸和致突变作用^[2];其中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的毒性最强,接触浓度高时可导致肝癌甚至死亡。因此,黄曲霉毒素被世界卫生组织列为已知的最强致癌化学物质之一^[3]。

为了控制食品中黄曲霉毒素的含量,世界各国

均制定了食用油的最大限量水平。欧盟规定,花生及其制品中黄曲霉毒素 (B₁、B₂、G₁ 和 G₂) 总量允许存在的最高限量为 4 μg/kg,其中 AFB₁ 不得超过 2 μg/kg。美国对花生及其制品中黄曲霉毒素的最高限量为 20 μg/kg,日本规定其最高限量为 10 μg/kg^[4-5]。我国 GB 2761-2017 规定花生油中 AFB₁ 的含量不大于 20 μg/kg^[6]。

目前,食品中黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层色谱-分光光度法、火焰离子化气相色谱法、高效液相色谱法和气相色谱-质谱法等^[7]。常见检测方法为高效液相色谱法,该方法具有准确性、灵敏度和分辨率高的优点,但是该法操作复杂烦琐。高效

收稿日期:2017-07-24;修回日期:2018-01-23

作者简介:鲍会梅(1974),女,副教授,硕士,主要从事食品理化检验教学工作(E-mail) bhm7412@126.com。

液相色谱-串联质谱结合了前者样品分离的能力以及质谱选择性好的优点。使用高效液相色谱-电喷雾串联质谱检测,提高了资源的利用率,使其抗干扰能力更强,具有重现性和准确性更高、耗时少等优点^[8-10]。本文在 GB 5009.22-2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》的基础上对该方法的精密度、准确度进行了探讨,并对离子源温度、毛细管电压、扫描离子方式、鞘气压力、提取溶剂等条件进行了优化。

1 材料与方法

1.1 实验材料

花生油,购于淮安大润发超市。NaCl、正己烷为分析纯,AFB₁标准品,乙腈、甲醇、醋酸铵为色谱纯,水为高纯水。

AR1530/C 型电子天平, N - Evap112 型氮吹仪, MS3 型旋涡混合器, HC09001AFT 免疫亲和柱, 1200 型高效液相色谱仪, MS6430 型三重四级杆质谱仪。

1.2 实验方法

1.2.1 样品制备与提取

准确称取约 25 g 的花生油于 250 mL 锥形瓶中,分别加入 5.0 g NaCl 和 125 mL 60% 的甲醇溶液,涡旋振荡 10 min,用快速滤纸过滤,用 10 mL 超纯水稀释滤液,振荡混匀 1 min。取 10 mL 溶液待净化。

1.2.2 净化

AFB₁免疫亲和柱,使用前要恢复至室温,弃去保护液。注射器通过转接头连接在 AFB₁免疫亲和柱上部,将上述滤液倒入注射器中,使滤液以 2 ~ 3 mL/min 流速缓慢通过柱体,并抽干。先用 10 mL 磷酸盐缓冲液,再用 5 mL 超纯水淋洗,弃去全部流出液。最后用 5 mL 甲醇洗脱,收集滤液于试管中,置于平行样品浓缩仪上,50 °C 蒸干溶剂。用初始流动相定容,旋涡混合 30 s,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后,用高效液相色谱-电喷雾串联质谱进行检测。

1.2.3 检测条件

高效液相色谱条件:Hypersil Gold - C18 色谱柱 (150 mm × 2.1 mm × 1.9 μm);柱温 30 °C;进样体积 10 μL,流动相 20 mol/L 醋酸铵水溶液-甲醇,流速 0.3 mL/min,梯度洗脱。

质谱条件:电喷雾离子源 (ESI⁺);检测方式为多反应监测 (MRM);毛细管电压 3 500 V;离子源温度 110 °C,鞘气压力 270 kPa,辅助气压力 104 kPa,碰撞气流速 0.1 mL/min。

1.2.4 标准曲线的绘制

AFB₁标准贮备液 (10 μg/mL):准确称取 1.000 0 mg AFB₁标准品于 100 mL 容量瓶中,用苯-乙腈混合液稀释至刻度。

AFB₁标准工作液:将 AFB₁标准贮备液稀释成 0.00、1.00、3.00、5.00、7.00、9.00、11.00 ng/mL 系列标准溶液。

对不同质量浓度的 AFB₁标准溶液进行分析,在 0.00、1.00、3.00、5.00、7.00、9.00、11.00 ng/mL 系列质量浓度下,在 1.2.3 检测条件下进样 10 μL,以 AFB₁进样质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.2.5 样品的测定

吸取净化后的试样液 10 μL,在 1.2.3 检测条件下进行测定。根据测得的峰面积结合标准曲线回归方程,计算样品中 AFB₁的含量。

2 结果与分析

2.1 测定条件的优化

2.1.1 提取溶剂的选择

本实验比较了乙腈、酸化乙腈和甲醇 3 种不同的提取溶剂,对花生油样品中 AFB₁回收率的影响,结果见图 1。

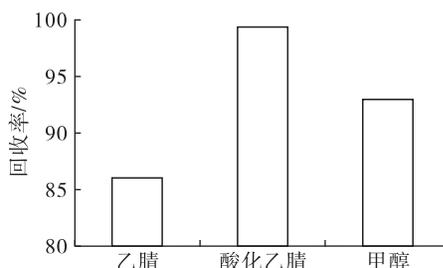


图 1 不同提取溶剂对花生油样品中 AFB₁回收率的影响

由图 1 可知,经过对 3 种提取溶剂的对比,发现甲醇对花生油样品中 AFB₁的回收率低于酸化乙腈的。但是酸化乙腈具有一定的毒性,且价格高于甲醇。因此,综合考虑,本实验选择甲醇作为提取溶剂。

2.1.2 离子源温度的选择

本实验考察了在毛细管电压 3 500 V、ESI⁺扫描离子模式、鞘气压力 270 kPa、辅助气压力 104 kPa、碰撞气流速 0.1 mL/min 的条件下,改变离子源温度分别为 100、110、120、130、140 °C 时对测定花生油样品中 AFB₁含量的影响,结果见图 2。

由图 2 可知,在 100 ~ 110 °C 时 AFB₁含量呈上升趋势,110 °C 以后 AFB₁含量开始下降。说明离子源温度在 110 °C 最为稳定,而温度过高会导致挥发,使 AFB₁含量下降。因此,本实验采用离子源温度为 110 °C。

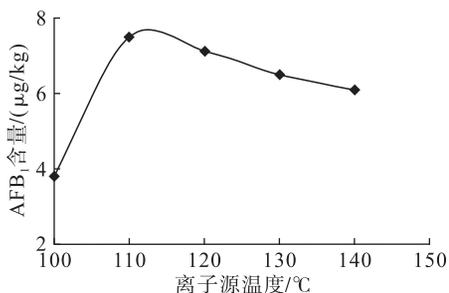


图2 离子源温度对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响

2.1.3 毛细管电压的选择

本实验考察了在离子源温度 110 °C、ESI⁺ 扫描离子模式、鞘气压力 270 kPa、辅助气压力 104 kPa、碰撞气流速 0.1 mL/min 的条件下,改变毛细管电压分别为 2 000、2 500、3 000、3 500、4 000 V 时,对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响,结果见图 3。

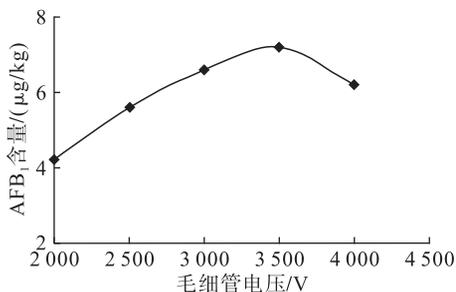


图3 毛细管电压对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响

由图 3 可知,毛细管电压在 2 000 ~ 3 500 V 时 AFB₁ 含量呈上升趋势,当毛细管电压超过 3 500 V 时,AFB₁ 含量开始下降。表明毛细管电压在 3 500 V 时是最适电压。因此,本实验选择毛细管电压为 3 500 V。

2.1.4 扫描离子方式的选择

本实验考察了在离子源温度 110 °C、毛细管电压 3 500 V、鞘气压力 270 kPa、辅助气压力 104 kPa、碰撞气流速 0.1 mL/min 的条件下,通过两种扫描离子方式对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响,结果见图 4。

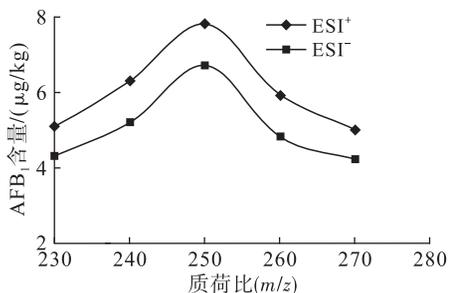


图4 ESI⁺ 和 ESI⁻ 对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响

由图 4 可知,在相同质荷比下,发现 ESI⁺ 扫描

离子模式对测定花生油样中 AFB₁ 含量的效果比 ESI⁻ 的效果好,所得 AFB₁ 含量较高,实验稳定性较好。因此,本实验选用 ESI⁺ 扫描离子模式。

2.1.5 鞘气压力的选择

本实验考察了毛细管电压 3 500 V、离子源温度 110 °C、ESI⁺ 扫描离子模式、辅助气压力 104 kPa、碰撞气流速 0.1 mL/min 的条件下,改变鞘气压力分别为 250、260、270、280、290 kPa 时对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响,结果见图 5。

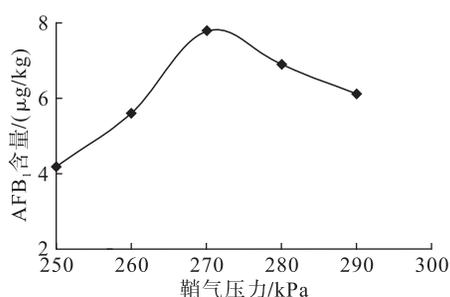


图5 鞘气压力对测定花生油样品中 AFB₁ 含量的影响

由图 5 可知,当鞘气压力在 250 ~ 270 kPa 时, AFB₁ 含量呈上升趋势。当超过 270 kPa 后 AFB₁ 含量开始下降。表示鞘气压力在 270 kPa 后出现不稳定因素。因此,本实验选择鞘气压力为 270 kPa。

2.2 AFB₁ 的标准曲线

根据 1.2.3 和 1.2.4 方法,以 AFB₁ 进样质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果见图 6。

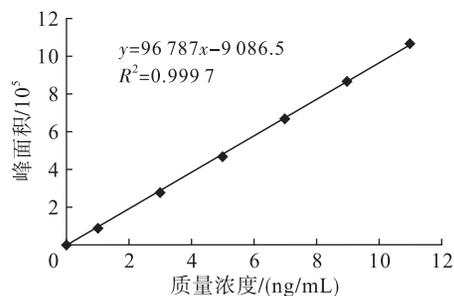


图6 AFB₁ 标准曲线图

由图 6 可知, AFB₁ 质量浓度在 1.00 ~ 11.00 ng/mL 范围内呈良好的线性关系。按照 1.2.5 方法通过标准曲线回归方程,可计算得到花生油中 AFB₁ 的含量为 7.48 μg/kg,检出限为 0.3 μg/kg。

2.3 精密度和回收率实验

2.3.1 精密度实验

按照 1.2.3 检测条件,对花生油样品中 AFB₁ 含量进行 6 次平行测定,进样量 10 μL,计算相对标准偏差(RSD),结果见表 1。由表 1 可知,相对标准偏差(RSD)为 0.27%。

表1 AFB₁ 精密度实验

测定次数	AFB ₁ 含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD/%
1	7.43		
2	7.51		
3	7.59	7.43	0.27
4	7.45		
5	7.38		
6	7.23		

2.3.2 回收率实验

按照1.2.3检测条件,对花生油样品进样9次平行AFB₁加标回收实验,结果见表2。由表2可知,AFB₁平均回收率为99.7%。

表2 AFB₁回收率实验

测定次数	本底值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标量/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	平均回收率/%
1	6.50	9.50	16.37	102.3	
2	6.50	9.50	16.13	100.8	
3	6.50	9.50	15.87	99.2	
4	6.50	6.50	12.86	98.9	
5	6.50	6.50	13.01	100.1	99.7
6	6.50	6.50	12.46	95.8	
7	6.50	3.50	10.31	103.1	
8	6.50	3.50	9.83	98.3	
9	6.50	3.50	9.86	98.6	

本实验的精密度即RSD为0.27%,表明此方法重现性好,精密度高,AFB₁平均回收率为99.7%,准确度符合国标要求,因此该方法可行,可用于花生油中黄曲霉毒素的定量测定。

3 结论

建立了花生油中AFB₁的高效液相色谱-电喷雾串联质谱测定法。得出最佳检测条件为:离子源温度110℃,毛细管电压3500V,电喷雾离子源(ESI⁺),鞘气压力270kPa,辅助气压力104kPa,碰撞气流速0.1mL/min,提取溶剂为甲醇。在最佳检

测条件下测得花生油中AFB₁含量为7.48 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFB₁质量浓度在1.00~11.00ng/mL范围内呈良好的线性关系。AFB₁平均回收率为99.7%,RSD为0.27%,检出限为0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本方法具有操作简便、快速、准确性高,可满足花生油中AFB₁检测的需求,且可以实现黄曲霉毒素与样品基质的良好分离。

参考文献:

- [1] 劳哲,江恩源. Oasis HLB固相萃取-超快速液相-三重四极杆质谱法测定花生和花生油中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂[J]. 国外医学(医学地理分册), 2015, 36(2):137-141.
- [2] 甘仁榕,彭浏宇,肖靖松,等. 超高效液相色谱法检测花生油中4种黄曲霉毒素的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2016(8):1109-1111.
- [3] 杨忠红. 浅析花生油中黄曲霉毒素的检测及去除方法[J]. 粮食流通技术, 2007(4):39-41.
- [4] 祝伟霞,杨冀州,袁萍,等. 高效液相色谱法测定3种植物油中4种黄曲霉毒素含量[J]. 理化检验(化学分册), 2013, 49(8):981-984.
- [5] 吕飞,朱事康,余优军,等. LC-MS/MS测定植物油脂中黄曲霉毒素B₁[J]. 惠州学院学报(自然科学版), 2012, 32(6):14-16,32.
- [6] 李少晖,任丹丹,谢云峰,等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4):1107-1115.
- [7] 钟冬莲,莫润宏,沈丹玉,等. 气相色谱-串联质谱法测定食用植物油中 β -谷甾醇含量[J]. 中国油脂, 2015, 40(2):95-97.
- [8] 李万福,李一聪. 花生油黄曲霉毒素B₁的危害及其检测的研究进展[J]. 四川农业科技, 2015(3):35-36.
- [9] 李可,丘汾. 免疫亲和层析-超高效液相色谱法测定大米中4种黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(16):2328-2330.
- [10] 丁明,钟冬莲. 高效液相色谱-串联质谱法测定山茶油中黄曲霉毒素B₁[J]. 分析试验室, 2012, 31(5):26-29.

告

读

者

为更好地服务于广大读者,《中国油脂》杂志社常年办理《中国油脂》逾期补订和过刊订阅业务;常年办理油脂专业书籍邮购业务,书目、代号、价格请查阅近期《中国油脂》杂志社专业书籍征订广告。

订阅、邮购地址:西安市劳动路118号,《中国油脂》杂志社读者服务部
邮编:710082 电话:029-88653162 联系人:潘亚萍