

检测分析

基于 UPLC - MS - MS 技术快速测定花生中 4 种黄曲霉毒素

孟繁磊, 宋志峰, 牛红红, 蔡红梅, 何智勇, 李 刚

(吉林省农业科学院 农业质量标准与检测技术研究所, 农业部农产品质量安全风险评估实验室(长春), 长春 130033)

摘要:建立了花生中 4 种黄曲霉毒素的超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-MS-MS)检测的方法。样品经 80% 乙腈-水溶液振荡超声提取后, 采用多功能净化柱净化。待测物经 Kinetex SB-C₁₈ 色谱柱分离, 甲醇-0.1% 甲酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 三重四级杆串联质谱多反应离子监测(MRM)方式检测, 外标法定量。结果表明: 4 种黄曲霉毒素在各自的线性响应范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999, 方法的检出限为 0.014~0.025 μg/kg, 空白样品中加标回收率为 72.25%~89.46%, RSD 在 4.01%~9.56% 之间。该方法前处理简单快速、净化效果好、检出限低, 适合花生中多种黄曲霉毒素的同时快速测定。

关键词: UPLC-MS-MS; 花生; 黄曲霉毒素; 快速测定

中图分类号: TS222+.1; TQ646.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-7969(2018)01-0136-04

Rapid determination of four kinds of aflatoxins in peanut by UPLC - MS - MS

MENG Fanlei, SONG Zhifeng, NIU Honghong, CAI Hongmei,
HE Zhiyong, LI Gang

(Laboratory of Quality and Safety Risk Assessment for Agro-Products(Changchun),
Ministry of Agriculture, Institute of Agricultural Quality Standard and Testing Technology,
Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: A UPLC-MS-MS method for detecting four kinds of aflatoxins in peanut was established. The samples were extracted in 80% acetonitrile-water solution by ultrasonic vibration, and purified using a multi-functional cleanup column. The sample was separated by Kinetex SB-C₁₈ chromatographic column, subjected to gradient elution using methanol-0.1% formic acid solution as the mobile phase, then detected by triple-quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring (MRM), and analyzed quantitatively by the external standard method. The results suggested that four kinds of aflatoxins presented good linearity within their respectively linear response ranges, and the coefficient of correlation were above 0.999; the method's limit of detection was 0.014-0.025 μg/kg; the recoveries of standard addition for blank samples were 72.25% - 89.46% with the RSDs 4.01% - 9.56%. Characterized by simple and quick pre-treatment, good purification effect, and low limit of detection, this method could be used for simultaneously rapid determination of various aflatoxins in peanut.

Key words: UPLC-MS-MS; peanut; aflatoxin; rapid determination

收稿日期: 2017-03-10; 修回日期: 2017-08-09

基金项目: 吉林省农业科技创新工程项目农产品质量安全创新团队(CXGC2017TD011)

作者简介: 孟繁磊(1984), 女, 助理研究员, 硕士研究生, 主要从事食品质量安全方面的研究工作(E-mail) mengfanlei622@163.com。

通信作者: 李 刚, 教授, 博士(E-mail) Ligang6@yeah.net。

黄曲霉毒素是一类化学结构类似的二氢呋喃香豆素的衍生物, 是主要由黄曲霉、寄生曲霉产生的代谢产物, 特别容易污染花生、玉米、小麦等粮油产品。黄曲霉毒素被世界卫生组织划定为 1 类致癌物, 毒性比砒霜大 68 倍, 仅次于肉毒霉素, 是目前已知霉

菌中毒性最强的^[1]。据悉,黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用,严重时可导致肝癌甚至死亡,在天然污染的食品中以黄曲霉毒素B₁最为多见,其毒性和致癌性也最强^[2-3]。因此,世界各国都对食品中的黄曲霉毒素的含量做出了严格的规定,食品中黄曲霉毒素B₁的限量范围为1~20 μg/kg,黄曲霉毒素总量(包括AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)的限量范围为0~35 μg/kg。2011年我国发布的《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2011)中规定花生及其制品中黄曲霉毒素B₁的限量为20 μg/kg。2000年以来我国出口花生和玉米连续多次由于黄曲霉毒素含量超标而被欧盟额外实施特检甚至拒绝进口。因此,无论是黄曲霉毒素毒性的严重性还是国际贸易的紧迫性,都说明选择一种合适的黄曲霉毒素的检测方法是一个亟待解决的重要问题。

目前,黄曲霉毒素的检测方法包括:酶联免疫法^[4-6]、薄层色谱法^[7]、高效液相色谱法^[8-11]、液相色谱-串联质谱技术^[12-16]。近年来,液相色谱-串联质谱技术在检测毒素方面的优势逐渐显现,采用选择离子监测技术,可大大提高检测的灵敏度和特异性,因其可以采用简便的前处理技术,且不需要衍生化,是同时检测多种毒素的理想方法。本研究采用超高液相色谱-三重四极杆串联质谱技术(UPLC-MS-MS),建立了4种黄曲霉毒素的同时定性、定量分析方法,并利用此方法对吉林省松原地区的花生样品进行了分析,以期为黄曲霉毒素的定性确证提供一种可靠方法,适用于花生中黄曲霉毒素确证分析。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

花生样品,2016年秋季采自吉林省松原地区。乙腈、甲醇、甲酸:色谱级,赛默飞世尔科技公司;黄曲霉毒素B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素G₂(AFG₂)标准品:纯度≥99%,农业部环境保护科研监测所。

1.1.2 仪器与设备

超高液相色谱-串联质谱仪:AB QTRAP 5500质谱仪(美国AB Sciex),Chimadzu LC-30A 超高液相色谱仪(日本岛津公司);KQ-250DB 数控超声清洗器;RM 2255 涡旋混匀器(德国IKA公司);SC-3610 离心机;NR-3 振荡器;HSC-24B 氮吹仪;MyCOsepTM226 多功能净化柱(Romer公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理

准确称取2 g(精确至0.001 g)花生样品于50 mL 刻度离心管中,加入10 mL 80%乙腈-水溶液,旋涡混匀30 s,浸泡30 min,振荡1 h后在超声功率500 W 条件下超声提取30 min,10 000 r/min 离心10 min,收集上清液经MyCOsepTM226 多功能柱净化,取5 mL 净化液于50℃下氮气吹干,加入1.0 mL 50%甲醇溶解,涡旋混匀30 s,用0.22 μm 微孔滤膜过滤于进样瓶中,待UPLC-MS-MS 检测。

1.2.2 色谱条件

色谱柱:Kinetex SB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:A相为0.1%甲酸溶液,B相为甲醇。梯度洗脱程序如下:0~8 min,30%~100% B;8~13 min,100% B;13.1~20 min,30% B;柱温:40℃;进样量:3 μL。

1.2.3 质谱条件

扫描模式:正离子扫描;监测方式:多反应离子监测MRM;离子源温度:550℃;离子化电压:5 500 V;气帘气压力:206.9 kPa;雾化气压力:379.2 kPa;辅助气压力:379.2 kPa。

1.2.4 溶液配制

1.2.4.1 溶剂混合标准工作液

用50%甲醇溶液将AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂标准品配成质量浓度为0.1、0.2、1、5、10、20 μg/L的溶剂混合标准工作液,现用现配。

1.2.4.2 基质混合标准工作液

用不含黄曲霉毒素的花生样品,按照1.2.1进行前处理,得空白样品提取液,用空白提取液将4种黄曲霉毒素标准品配制质量浓度为0.1、0.2、1、5、10、20 μg/L的基质混合标准工作液,现用现配。

1.2.4.3 质谱条件优化工作液

将4种黄曲霉毒素标准品分别用50%的甲醇溶液配制质量浓度为50 μg/L的AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂溶液,用于质谱条件优化。

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

本实验采用10 μg/kg的添加水平,分别以50%、60%、70%、80%、90%、100%乙腈-水溶液为提取溶剂,考察其对花生中黄曲霉毒素提取率的影响,结果见图1。

由图1可知,以80%乙腈-水溶液为提取溶剂时,黄曲霉毒素的提取率最大。因此,选择80%乙腈-水溶液为花生中黄曲霉毒素的提取溶剂。

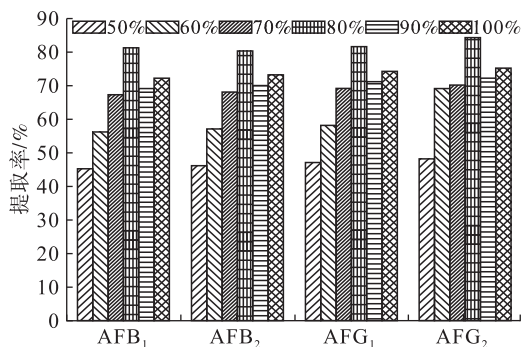


图1 提取溶剂对4种黄曲霉毒素提取率的影响

2.2 质谱条件的选择

将1.2.4.3 质谱条件优化工作液,依次通过针泵直接进样,测定其在 ESI⁺ 和 ESI⁻ 模式下质谱信号强度,确定各个黄曲霉毒素的母离子质量数。结果发现在 ESI⁺ 模式下, AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 均可以得到较高灵敏度的 [M + H]⁺ 准分子离子峰。

确定好各个黄曲霉毒素的母离子后,采用产物离子扫描 Product Ion (MS2) 的方式选择 2 个响应值最强的子离子,其丰度比满足欧盟 2002/657/EC 决议要求,建立合适的 MRM 离子对通道,优化获得最佳碰撞能量和去簇电压。4 种黄曲霉毒素的监测离子对、扫描模式、去簇电压、碰撞能量见表 1。

表1 4种黄曲霉毒素质谱测定参数

黄曲霉毒素	扫描模式	保留时间/min	监测离子对	碰撞能量/V	去簇电压/V
AFB ₁	ESI ⁺	6.29	313/285;313/241	31;49	150
AFB ₂	ESI ⁺	6.03	315/287;315/259	35;39	150
AFG ₁	ESI ⁺	5.69	329/243;329/215	36;42	140
AFG ₂	ESI ⁺	5.42	331/245;331/217	40;48	150

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系、基质效应、检出限和定量限

分别用基质混合标准工作液和溶剂混合标准工作液,以峰面积对各个黄曲霉毒素的质量浓度作线性回归,绘制标准曲线,计算曲线斜率的比值,以此评价基质效应情况。若比值等于 1,说明没有基质效应,黄曲霉毒素的电离不受基质的影响,这是一种理想状况,在实际中很难得到这样的结果,一般比值在 0.85 ~ 1.15 之间认为基质效应不明显;比值大于 1 为基质增强效应,黄曲霉毒素的电离效应增大;若比值小于 1 为基质抑制效应,黄曲霉毒素的电离效应被减弱。用花生空白样品为基质,添加不同量的混合黄曲霉毒素标准品后按照 1.2.1 处理后测定,以信噪比(S/N) ≥ 3 确定方法的检出限(LOD),以信噪比(S/N) ≥ 10 确定方法的定量限(LOQ)。4 种黄曲霉毒素的线性方程、相关系数、线性范围、基质效应、检出限、定量限见表 2。

表2 4种黄曲霉毒素的线性方程、相关系数、线性范围、检出限、定量限、基质效应

黄曲霉毒素	线性方程	相关系数	线性范围/(μg/L)	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)	基质效应/%
AFB ₁	$Y = 1.31 \times 10^5 X + 3.87 \times 10^5$	0.999 4	0.1 ~ 20	0.014	0.05	87.59
AFB ₂	$Y = 6.43 \times 10^4 X + 7.90 \times 10^3$	0.999 5	0.1 ~ 20	0.016	0.05	85.46
AFG ₁	$Y = 2.71 \times 10^4 X - 6.09 \times 10^3$	0.999 8	0.1 ~ 20	0.025	0.08	93.48
AFG ₂	$Y = 3.88 \times 10^4 X + 8.45 \times 10^3$	0.999 9	0.1 ~ 20	0.025	0.08	94.29

由表 2 可知,4 种黄曲霉毒素在各自的线性响应范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999;4 种黄曲霉毒素的基质效应在 85.46% ~ 94.29%,可以认为基质效应不明显,所以本实验选择用 1.2.4.1 系列标准工作液,用外标法定量测定;4 种黄曲霉毒素的检出限在 0.014 ~ 0.025 μg/kg 之间,定量限在 0.05 ~ 0.08 μg/kg 之间,均低于欧盟规定的最大残留限量。

2.3.2 精密度

取质量浓度为 10 μg/L 的 4 种黄曲霉毒素混合标准溶液,连续进样 6 次,测定日内 4 种黄曲霉毒素峰面积的 RSD,再连续 10 d 进样,测得日间 4 种黄曲霉毒素峰面积的 RSD,结果表明日内精密度和日间精密度均符合实验的要求,具体结果见表 3。

表3 4种黄曲霉毒素的精密度

黄曲霉毒素	日内精密度(n=6)		日间精密度(n=10)	
	峰面积平均值	RSD/%	峰面积平均值	RSD/%
AFB ₁	1.417×10^6	4.39	1.411×10^6	5.69
AFB ₂	6.329×10^5	4.13	6.321×10^5	5.51
AFG ₁	2.656×10^5	4.49	2.598×10^5	5.74
AFG ₂	3.828×10^5	2.91	3.796×10^5	4.04

2.3.3 加标回收率和重复性

向空白的花生样品中加入不同质量浓度的标准溶液,进行加标回收率和重复性实验,每个添加量平行测定 6 次,添加量、回收率和 RSD 结果见表 4。

由表 4 可知,4 种黄曲霉毒素的平均回收率在 72.25% ~ 89.46% 之间,表明该方法提取测定花生中这 4 种黄曲霉毒素准确可行;测得 4 种黄曲霉毒

素平均回收率的 *RSD* 在 4.01% ~ 9.56% 之间,表明该方法重复性良好。

表 4 4 种黄曲霉毒素的加标回收率 ($n=6$)

黄曲霉毒素	添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	加标回收率/%	<i>RSD</i> /%
AFB ₁	0.1	75.19	8.11
	1.0	81.11	7.10
	5.0	85.10	4.45
AFB ₂	0.1	77.09	7.45
	1.0	83.44	8.48
	5.0	89.46	4.01
AFG ₁	0.1	72.25	6.89
	1.0	76.45	7.58
	5.0	81.29	6.04
AFG ₂	0.1	78.45	9.56
	1.0	80.78	5.45
	5.0	84.46	5.44

2.4 样品测定

应用建立的分析方法对吉林省松原地区新采收的 100 份花生样品中黄曲霉毒素进行测定,结果没有检测出黄曲霉毒素。在正常储存两个月后,又对此 100 份样品重新测定,结果 5 份样品中检测出黄曲霉毒素 B₁,含量范围在 1.02 ~ 4.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。分析原因,可能是今年采收期时花生生产地的连续阴雨,使得花生样品含水量较高,在合适的温度及湿度条件下,在储存过程中黄曲霉菌迅速繁殖产生黄曲霉毒素 B₁,所以在储存了两个月后再次检测时,有 5 份样品检出黄曲霉毒素 B₁,这也充分说明储存条件的控制对花生黄曲霉毒素的预防有积极的作用。

3 结论

本文研究了花生中 4 种黄曲霉毒素的分析方法,建立了有效的超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱联用的方法。在确定的分析条件下,4 种黄曲霉毒素在各自的线性响应范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.999,方法的检出限为 0.014 ~ 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$,空白样品中加标回收率为 72.25% ~ 89.46%,*RSD* 在 4.01% ~ 9.56% 之间。该方法灵敏度、重现性、精密度较好,能够满足花生中黄曲霉毒素的检测,也为其他基质中黄曲霉毒素的测定提供参考依据。

参考文献:

[1] BARROS G, MAGNOLI C, REYNOSO M M, et al. Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina[J]. World Mycotoxin J, 2009, 2

(1):53-60.

- [2] ZAIN M E. Impact of mycotoxins on humans and animals [J]. J Saudi Chem Soc, 2011, 15(2):129-144.
- [3] LEWIS L, ONSONGO M, NJAPAU H, et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya[J]. Environ Health Perspect, 2005, 113(12):1763-1767.
- [5] 李海礁, 喻东威, 刘志楠, 等. 谷物中黄曲霉毒素 B₁ 检测方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(21):83-85.
- [6] 徐洲, 谭书明, 焦彦朝, 等. 酶联免疫法测定干辣椒中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品科学, 2009, 30(10):245-247.
- [7] 张鹏, 赵卫东, 张艺兵. 高效薄层色谱法测定黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂[J]. 分析化学, 2000, 10(3):392.
- [8] 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.
- [9] 曾涛, 罗晓燕, 胡国媛, 等. 茶叶中黄曲霉毒素的碘柱后衍生化和光化学柱后衍生化-高效液相色谱法比较[J]. 中国卫生检验杂志, 2016(3):323-325.
- [10] 马良, 李培武, 张文. 高效液相色谱法对农产品中黄曲霉毒素的测定研究[J]. 分析测试学报, 2007(6):774-778.
- [11] 胡晓科, 孙丹红, 文君. 柱前衍生-高效液相色谱法检测食品中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂[J]. 食品工业科技, 2015(12):49-52, 56.
- [12] SEWRAM V, NIEUWOUDT T W, MARASAS W F O, et al. Determination of the fusarium, mycotoxins, fusaproliferin and beauvericin by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 1999, 858(2):175-185.
- [13] RAN R, WANG C, HAN Z, et al. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: current status of analytical methods[J]. Food Control, 2013, 34(1):138-148.
- [14] 曾宪远, 宁焕焱, 尹艳, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定花生及制品中的五种真菌毒素[J]. 现代食品科技, 2014(1):217-221, 164.
- [15] 王秀斌, 李培武, 杨扬, 等. 液相色谱-三重串联四级杆质谱测定粮油中的黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2011(6):517-522.
- [16] 范素芳, 李培武, 王秀斌, 等. 高效液相色谱和高效液相色谱-离子阱质谱测定花生、玉米和大米中黄曲霉毒素方法比较[J]. 食品科学, 2011, 32(12):254-258.