

超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱联用快速筛查辣椒中黄曲霉毒素

LCMS-QTOF-044

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱 - 四极杆飞行时间质谱联用系统，建立了一种快速定性筛查辣椒中的黄曲霉毒素（B1、B2、G1、G2）的方法。该方法前处理简便快捷，样品经乙腈提取，分散固相萃取方式净化后直接进样分析。黄曲霉毒素（B1、B2、G1、G2）的检出限在 0.42 ng/mL~1 ng/mL 之间，且各化合物质量数准确性高。通过保留时间、一级 MS 精确质量数和同位素分布信息实现对目标化合物的快速定性筛查，结合二级质谱库搜索功能，可进一步确认筛查结果。

关键词： 四极杆飞行时间质谱 黄曲霉毒素 筛查 辣椒

黄曲霉毒素 (Atoxins, AF) 是一类化学结构类似的二氢呋喃香豆素衍生物，由黄曲霉和寄生曲霉等在合适的温度和湿度条件下经过聚酮途径产生的次生代谢产物，主要包括 B1、B2、G1、G2、M1、M2 六种。黄曲霉毒素在自然界中广泛存在，对人畜具有强烈的致病性、致癌性，严重危害人体健康，是到目前为止所发现的毒性最大的真菌毒素。1993 年，黄曲霉毒素 B1 就已被世界卫生组织的癌症研究机构认定为 I 类致癌物。辣椒在采摘、晾晒、贮藏、运输、加工等过程中，由于环境温度及水分控制的问题，极易引起霉变和霉菌毒素污染，因而有必要开展辣

椒中黄曲霉毒素的快速监测与控制研究。

目前，对黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层色谱法、胶体金试纸条法、酶联免疫法、荧光光谱法、液相色谱法和液质联用法等。近年来，液质联用法由于具有检测灵敏度高、结果选择性好的特点，已成为食品类复杂基质中痕量物质检测的主流方法。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 联用系统建立了对辣椒中的黄曲霉毒素（B1、B2、G1、G2）筛查分析方法，该方法灵敏高、且快速准确，可供相关检测人员参考使用。

■ 实验部分

1.1 仪器

使用超高效液相色谱仪 LC-30A 与四极杆飞行时间质谱仪 LCMS-9030 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	LCMS-9030
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.99		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (100 mm×2.1 mm I.D., 2 μm) (P/N: 227-30001-04, 岛津(上海)实验器材有限公司)

流动相：A 相 -5mM 乙酸铵 +0.1% 甲酸水溶液； B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 10%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	10
2.00	Pumps	Pump B Conc.	30
13.00	Pumps	Pump B Conc.	100
15.00	Pumps	Pump B Conc.	100
16.00	Pumps	Pump B Conc.	10
20.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式：ESI +	接口温度：300 °C
接口电压：4.5 kV	加热气：空气 10 L/min
雾化气：氮气 3.0 L/min	干燥气流速：氮气 10 L/min
加热模块温度：400°C	碰撞气：氦气
脱溶剂管温度：250°C	扫描模式：MS Scan (m/z 130 -500)
事件时间：0.3 sec	& DDA (m/z 50 - 500)

■ 样品前处理方法

称取试样 3 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入乙腈 15 mL, 涡旋混匀, 置于振荡器上剧烈震荡 (500 次 / 分) 5 min, 加入无水硫酸镁与无水乙酸钠的混合粉末 (4:1) 7.5 g, 立即摇散, 置于振荡器上剧烈震荡 (500 次 / 分) 3 min, 于水浴冷却 10 min, 再离心 (4000 r/min) 5 min。取上清液 9 mL 置于已预先装有净化材料的分散固相萃取净化管 [无水硫酸镁 900 mg, N-丙基乙二胺 (PSA) 300 mg, 十八烷基硅烷键合硅胶 300 mg, 硅胶 300 mg, 石墨化炭黑 90 mg] 中, 涡旋使其充分混匀, 再置于振荡器上剧烈震荡 (500 次 / 分) 5 min 使其净化完全, 离心 (4000 r/min) 5 min 后, 取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜, 待分析。

■ 结果与讨论

3.1 数据库信息采集与建立

将 6 种黄曲霉毒素标准物质的单标溶液按照 1.2 分析条件进样并采集数据, 获取各标准物质的精确质量数和二级碎片离子质谱图。使用 LabSolutions Insight 软件进行质谱数据库的创建和编辑。通过将各标准物质的保留时间、精确质量数和二级碎片离子质谱图录入软件, 构建黄曲霉毒素筛查质谱数据库, 各化合物信息见表 2。

表 2 黄曲霉毒素化合物信息

No.	中文名	英文名	CAS#	分子离子	精确质量数
1	黄曲霉毒素 B1	Aflatoxins B1	1162-65-8	[M+H] ⁺	313.0707
2	黄曲霉毒素 B2	Aflatoxins B2	7220-81-7	[M+H] ⁺	315.0863
3	黄曲霉毒素 G1	Aflatoxins G1	1165-39-5	[M+H] ⁺	329.0656
4	黄曲霉毒素 G2	Aflatoxins G2	7241-98-7	[M+H] ⁺	331.0812
5	黄曲霉毒素 M1	Aflatoxins M1	6795-23-9	[M+H] ⁺	329.0656
6	黄曲霉毒素 M2	Aflatoxins M2	6885-57-0	[M+H] ⁺	331.0812

3.2 黄曲霉毒素精确质量数提取结果

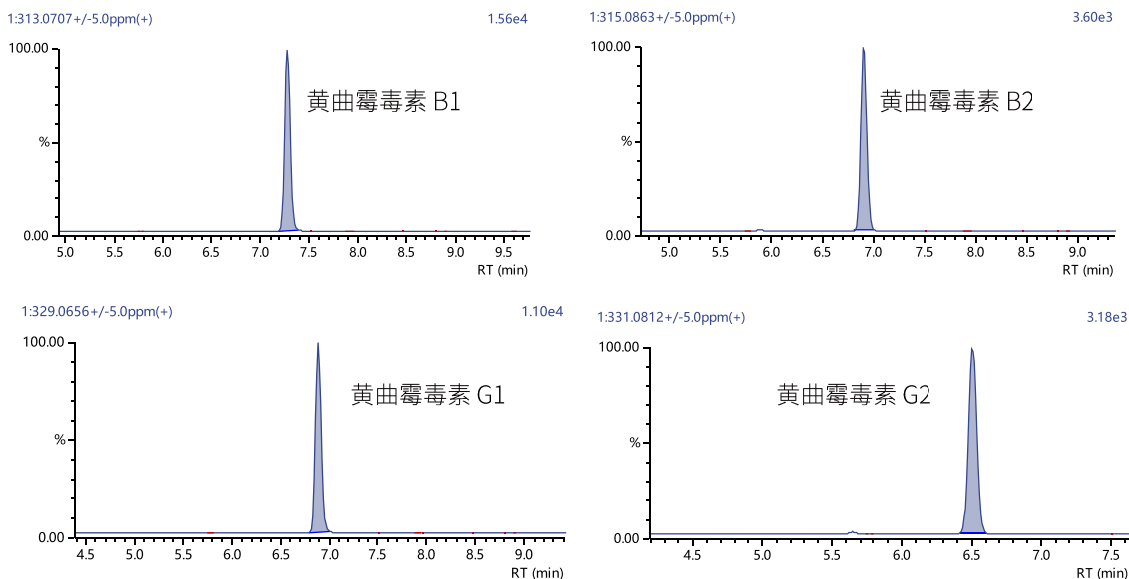


图 1 黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 的提取离子流图谱 (5 ng/mL)

3.3 一级 MS 质量准确度考察与灵敏度试验

一级 MS 质量测量准确度是高分辨质谱定性的重要依据。将用空白试样基质溶液配制成的黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 浓度为 5 ng/mL 混合标准溶液, 按照上述 1.2 分析条件上机扫描一级 MS 图谱, 考察各化合物精确质量数信息, 并以 ASTM 作为噪音计算方法, 根据 $S/N=3$, 确定黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 的检出限 (LOD)。黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 的保留时间、质量偏差和检出限信息如表 4 所示。由结果可知, 各化合物实测值与理论值的质量偏差均小于 2 ppm, 优于一般定性要求。

表 3 黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 一级 MS 精确质量数与检出限信息

中文名	保留时间 (min)	理论 m/z	实测 m/z	质量偏差 (ppm)	检出限 (ng/mL)
黄曲霉毒素 B1	7.28	313.0707	313.0709	0.83	0.43
黄曲霉毒素 B2	6.90	315.0863	315.0865	0.63	0.45
黄曲霉毒素 G1	6.88	329.0656	329.0658	0.61	0.42
黄曲霉毒素 G2	6.51	331.0812	331.0815	0.91	1.00

3.4 同位素峰分布评估

使用岛津 Formula Predictor 分子式预测软件可以实现基于一级 MS 精确质量数和同位素峰丰度比的匹配定性。设置误差范围为 5 ppm, 设定元素组成为 C、H 和 O, 可对试样中黄曲霉毒素进行同位素峰信息确认。以对黄曲霉毒素 B1 定性为例, 根据一级 MS 精确质量数信息和响应强度, 使用 Formula Predictor 预测化合物分子式为 $C_{17}H_{12}O_6$, 且理论同位素峰分布和实测同位素峰分布一致, 软件给出匹配得分为 97.83, 初步可判定该化合物即为黄曲霉毒素 B1。

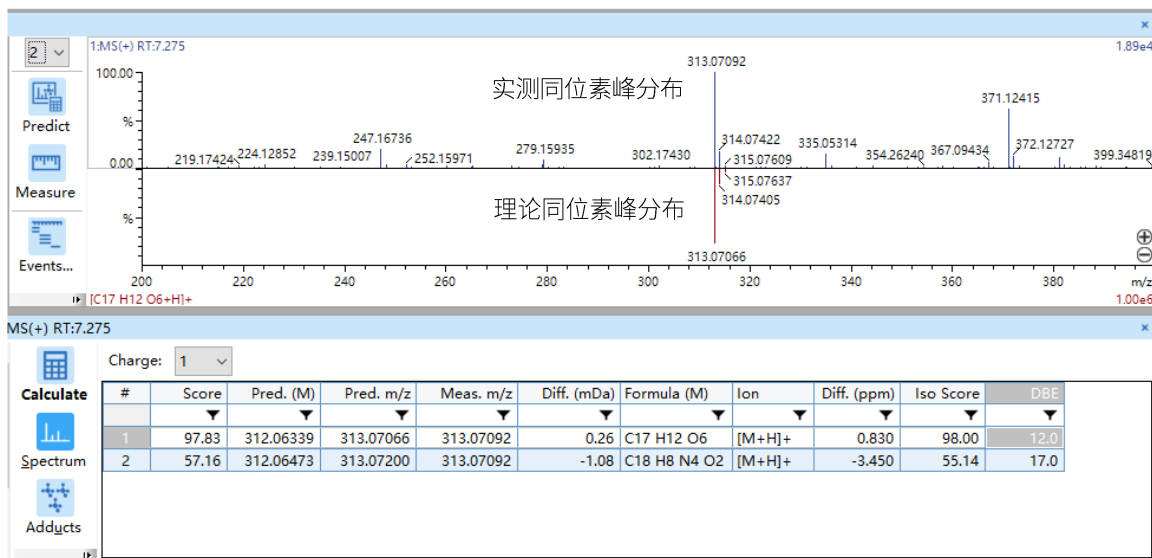


图 2 黄曲霉毒素 B1 的同位素峰分布评价结果

3.5 二级质谱库搜索结果

在 LabSolutions Insight 软件中使用 MSⁿ 谱库搜索功能，调用已构建的黄曲霉毒素筛查质谱数据库，设置相应的搜索参数，可对辣椒试样中黄曲霉毒素的筛查结果做进一步确认。对于未知物的确认，通常基于保留时间、前体离子及碎片离子质量准确度、同位素峰丰度比匹配度和二级碎片相对离子丰度比符合欧盟 2002/657/EC 规范中规定的离子相对比例最大允许偏差要求。图 3 为空白试样基质加标样品中黄曲霉毒素 G1 的二级质谱搜库结果。由搜库结果可知，黄曲霉毒素 G1 的实测二级质谱图与谱库中碰撞能量 (CE) 在 20 eV 下采集到的二级质谱信息搜索匹配相似度可达 85%。

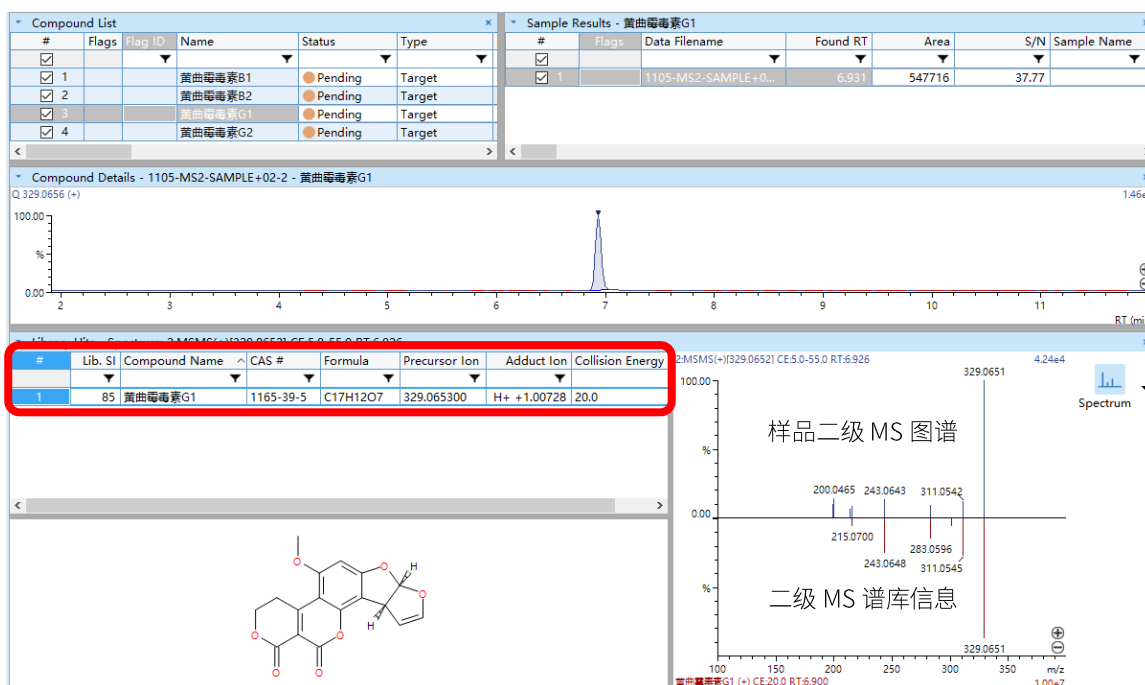


图 3 辣椒加标样品中黄曲霉毒素 G1 的二级质谱图搜库结果

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和四极杆飞行时间质谱 LCMS-9030 联用系统建立了对辣椒中黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 的快速筛查分析方法, 并构建黄曲霉毒素化合物信息质谱数据库。辣椒样品前处理简单, 经过乙腈提取, 分散固相萃取方式净化后上机分析, 黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2) 检出限在 0.42 ng/mL~1 ng/mL。该方法简便快速、灵敏度高、定性筛查准确性好, 可适用于快速定性筛查辣椒中的黄曲霉毒素。

岛津应用云

