

# 三重四极杆质谱测定玉米中的赭曲霉毒素

## LCMSMS-124

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中赭曲霉毒素的方法。样品经超声提取、SPE 净化后，液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。2 种毒素在 0.1 ~ 20 ng/mL 浓度范围内线性良好；对 0.5 ng/mL、2 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.52% 和 1.19 ~ 4.85% 之间，仪器精密度良好；同时考察了空白玉米基质加标结果，结果显示 1 ng/mL 的 OTA 和 OTB 的加标回收率分别为 116.3 和 117.9%。；某市场上购买的玉米样品，未检出赭曲霉毒素。

**关键词：**赭曲霉毒素 玉米 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

赭曲霉毒素 (Ochratoxins) 是赭色曲霉属和几种青霉属真菌产生的一种毒素。研究表明该毒素可损害动物的肾脏和肝脏，有致畸和致癌作用，被国际癌症研究机构定位 2B 类致癌物。欧盟将其在谷物产品中的最大残留限量修订为 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。2011 年，我国颁布了《食品中真菌毒素限量》国家标准，规定谷物及其制品限量指标为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。目前为止，我国还没有使用 LC-MS/MS 检测赭曲霉毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用，建立了快速准确测定玉米中赭曲霉毒素的方法，供相关检测人员参考。

### 实验部分

#### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8040 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

#### 1.2 分析条件

##### 液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统

色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III  
2.0 mm I.D.  $\times$  75 mm L., 1.6  $\mu\text{m}$

流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液；

B - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：10  $\mu\text{L}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 45%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	45
2.50	90
3.50	90
3.70	45
5.00	Stop

##### 质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}\text{C}$

加热模块温度：400 $^{\circ}\text{C}$

扫描模式：多反应监测 (MRM)

驻留时间：40 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

编号	中文名称	英文名称 (简称)	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	赭曲霉毒素 A	Ochratoxins A (OTA)	303-47-9	404.1	239*	-12	-23	-18
					358	-12	-16	-26
2	赭曲霉毒素 B	Ochratoxins B (OTB)	4825-86-9	370.1	205*	-26	-22	-22
					187	-26	-36	-21
3	<sup>13</sup> C-OTA (内标)	<sup>13</sup> C-OTA	-	424.1	250	-12	-24	-26

\*表示定量离子

### 1.3 样品制备

标准溶液配制:

取适量单标储备液,用乙腈配制成 1000 ng/mL 的混合标准溶液,用乙腈/水 (50/50, v/v) 逐级稀释成浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的混合标准工作液。内标物 <sup>13</sup>C-OTA 的浓度均为 2 ng/mL。

样品前处理方法:

提取:称取 25 g 研磨好的固体样品加入 100 mL 乙腈/去离子水 (84/16, v/v) 中;250 rpm 转速下振荡 1 h,或高速均质 3 min;

净化:将 3 mL 样品萃取液与 35 mL 1% 的吐温-PBS 缓冲液混合均匀,通过 OchraStarR 免疫亲和柱,流速控制在 1~3 mL/min;用 10 mL PBS 缓冲液淋洗免疫亲和柱;用 3 x 1 mL 甲醇/醋酸 (98/2, v/v) 洗脱免疫亲和柱,收集洗脱液;55°C 下氮吹至干,乙腈/水溶液 (20/80, v/v) 定容至 1 mL。涡旋 30 s,过 0.22 μm 微孔滤膜后供进样。

## 结果讨论

### 2.1 标准样品的 MRM 色谱图

1 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

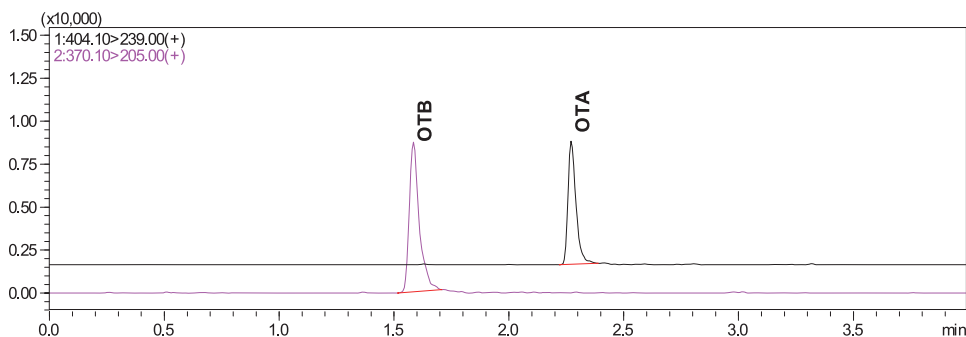


图1 1 ng/mL混合标准样品的MRM色谱图

### 2.2 线性关系

将浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定,以浓度为横坐标,峰面积比为纵坐标,内标法制作校准曲线,如图 2、3 所示。2 种赭曲霉毒素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

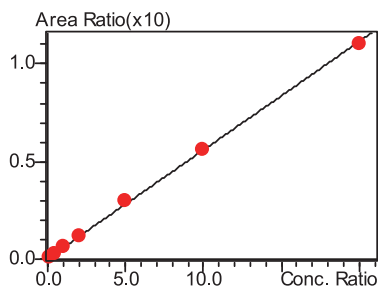


图2 OTA的标准工作曲线

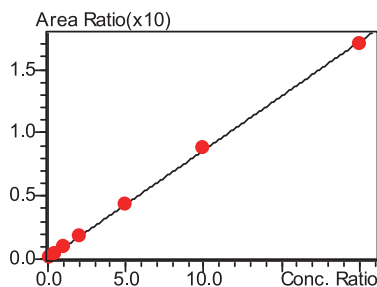


图3 OTB的标准工作曲线

表3 赭曲霉毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数r	定量限(ng/mL)	检出限(ng/mL)
1	OTA	$Y=0.555X+0.040$	0.9996	0.043	0.014
4	OTB	$Y=0.857X+0.036$	0.9996	0.033	0.011

### 2.3 精密度实验

对 0.5 ng/mL、2 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.52% 和 1.19 ~ 4.85% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=3)

名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
OTA	0.20	4.85	0.14	3.05	0.16	1.62
OTB	0.45	1.48	0.51	2.02	0.52	1.19

### 2.4 回收率考察

以空白玉米样配制加标溶液，加标浓度为 1 ng/mL，得到色谱图如图 4 所示。OTA 和 OTB 加标回收率在分别为：116.3 和 117.9%。

### 2.5 玉米样品分析

测试了某市场上购买的玉米样品，未检出赭曲霉毒素，色谱图见图 5。

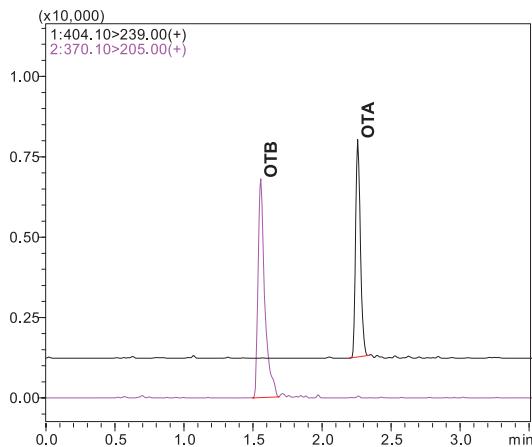


图4 基质加标1 ng/mL样品的色谱图

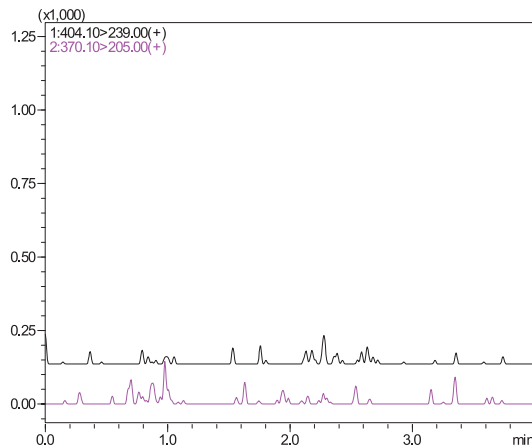


图5 玉米样品的色谱图

## 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中赭曲霉毒素的方法。2 种毒素在 0.1 ~ 20 ng/mL 浓度范围内线性良好，1 ng/mL 基质加标样品的回收率良好；低、中、高 3 浓度的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.52% 和 1.19 ~ 4.85% 之间，仪器精密度良好；某市场上购买的玉米样品，未检出赭曲霉毒素。