

使用 LCMS-8060 测定番茄中链格孢菌毒素含量

LCMSMS-467

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-8060 联用测定番茄中链格孢霉素、链格孢酚、腾毒素和链格孢酚甲醚含量的方法。结果表明：4 种链格孢菌毒素经过 C18 色谱柱分离，在 5 min 内完成快速检测。链格孢菌毒素在 1 ng/mL ~100 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.999 以上，各校准点准确度在 88.7%~108.9% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词： 三重四极杆质谱 番茄 链格孢菌毒素

链格孢菌是在自然界中广泛分布的一种常见植物病原真菌和腐生真菌，它会破坏农作物，导致腐烂。番茄在受到链格孢菌的侵害后，果实上会产生多种有毒代谢产物，统称为链格孢霉毒素，其中主要有链格孢霉素、链格孢酚、腾毒素和链格孢酚甲醚等。链格孢霉毒素具有细胞毒性、基因毒性以及急性毒性，会对人体健康产生危害。我国出入境检验检疫行业标准《SN/T 4259-2015 出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》规定：链格孢菌毒素的测定低限为 0.01 mg/kg。

目前，关于链格孢菌毒素检测技术主要有薄层色谱分析法 (TLC)、气相色谱法 (GC)、高效液相色谱法 (HPLC)、气相色谱质谱联用法 (GC-MS/MS)、

液相色谱 - 串联质谱联用法 (LC-MS/MS)、液相色谱 - 串联高分辨质谱 (LC-QToF) 等。其中，LC-MS/MS 法具有很高的灵敏度和选择性，适合于复杂基体中的痕量物质分析，且准确度高。因此，建立一种快速、准确检测番茄中链格孢菌毒素含量的方法，对控制番茄及其制品的质量安全具有重要的意义。本文参照《SN/T 4259-2015 出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》标准方法，链格孢菌毒素用乙腈提取后，经固相萃取柱净化后，使用岛津超高效液相色谱与 LCMS-8060 质谱仪联用系统对番茄中 4 种链格孢菌毒素含量进行测定。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：SHIMADZU Shim-pack GIST C18 (50 mm×2.1 mm I.D., 2 μm) (P/N: 227-30001-02)

流动相：A 相 - 纯水；B 相 - 乙腈

流速：0.30 mL/min

进样体积：1 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，初始浓度为 B 相 15%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
3.00	Pumps	Pump B Conc.	70
3.50	Pumps	Pump B Conc.	70
3.60	Pumps	Pump B Conc.	15
5.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，负离子模式

脱溶剂管温度：250°C

离子源接口电压：-3.0 kV

加热模块温度：400°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：300°C

干燥气：氮气 10 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

加热气：空气 10 L/min

MRM 参数：见表 2

碰撞气：氩气

驻留时间：50 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
链格孢霉素	altenuene (ALT)	29752-43-0	291.1>229.0*	11	17	15
			291.1>247.1	11	16	16
链格孢酚	alternariol (AOH)	641-38-3	257.1>213.1*	10	22	14
			257.1>146.9	10	30	15
腾毒素	tentoxin (TEN)	28540-82-1	413.4>141.0*	12	22	25
			413.4>271.3	12	17	13
链格孢酚甲醚	alternariol monomethyl-ether (AME)	26894-49-5	271.1>256.1*	10	22	17
			271.1>228.1	10	29	15

注：* 表示定量离子对

1.3 样品前处理方法

参考《SN/T 4259-2015 出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》番茄样品前处理。

1.4 混合标准溶液的配制

分别取适量 10 µg/mL 的链格孢霉素、链格孢酚、腾毒素和链格孢酚甲醚的标准储备溶液，使用 50% 乙腈水溶液逐级稀释，配制成 100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、2 ng/mL 和 1 ng/mL 的混合标准工作液，供液相色谱 - 串联质谱仪测定。以定量离子峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

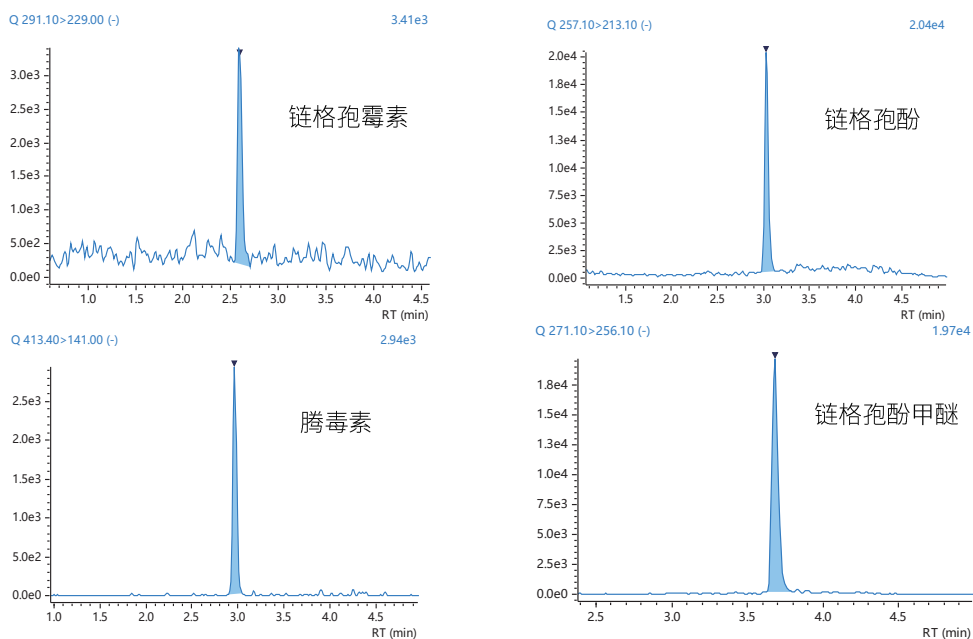


图1 链格孢菌毒素混合标准样品 MRM 图谱 (1 ng/mL)

2.2 线性范围与检出限

将 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 不同链格孢菌毒素浓度的混合标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

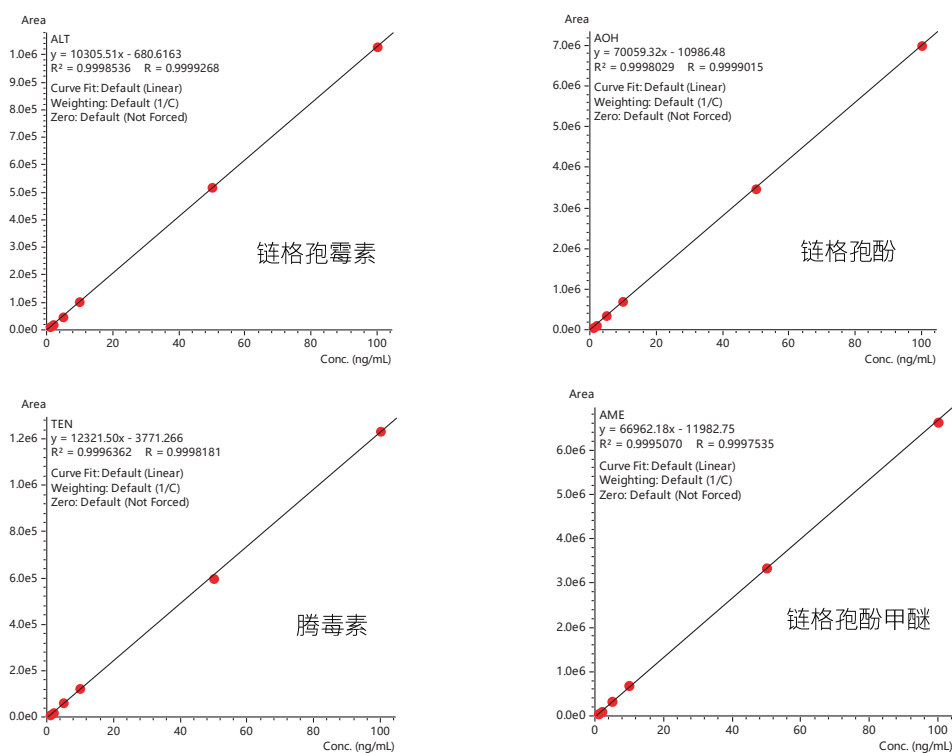


图2 链格孢菌毒素校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

化合物名称	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
链格孢霉素	Y=10305.51X-680.62	0.9999	1~100	96.5~105.2	0.3
链格孢酚	Y=70059.32X-10986.48	0.9999	1~100	93.8~105.5	0.3
腾毒素	Y=12321.50X-3771.27	0.9998	1~100	94.0~104.1	0.3
链格孢酚甲醚	Y=66962.18X-11982.75	0.9997	1~100	88.7~105.4	0.3

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 50 ng/mL 低中高浓度的链格孢菌毒素的混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：不同浓度的链格孢菌毒素保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03% ~ 0.15% 和 0.48% ~ 4.96% 之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间 (R. T.) 和峰面积 (Aera) 重复性结果 (n=6)

化合物名称	5 ng/mL		10 ng/mL		50 ng/mL	
	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%	R. T. RSD/%	Aera RSD/%
链格孢霉素	0.13	4.96	0.15	4.76	0.07	2.67
链格孢酚	0.11	2.55	0.13	1.80	0.04	0.48
腾毒素	0.11	3.31	0.13	1.82	0.04	0.71
链格孢酚甲醚	0.11	1.78	0.10	1.85	0.03	0.60

2.4 回收率实验

称取空白番茄样品，加入少量链格孢霉素、链格孢酚、腾毒素和链格孢酚甲醚的混合标准溶液，使加标浓度分别为 12.5 μg/kg、25.0 μg/kg 和 50.0 μg/kg。按照 1.3 样品前处理方法提取净化后，测定链格孢菌毒素的加标回收率，加标回收率结果见表 5。由结果可知，该测试方法准确率较高，可以满足标准检测方法《SN/T 4259-2015 出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的测定 液相色谱 - 质谱 / 质谱法》检测要求。

表 5 链格孢菌毒素的加标回收率结果 (n=3)

加标水平 (μg/kg)	平均回收率 (%)			
	链格孢霉素	链格孢酚	腾毒素	链格孢酚甲醚
12.5	94.4	81.8	101.4	80.2
25.0	80.5	80.4	96.6	82.4
50.0	80.1	81.4	93.5	84.8

■ 结论

LC-MS/MS 法测定水果蔬菜中痕量真菌毒素，具有灵敏度高，定性和定量结果准确的优点，在食品安全检测领域得到了越来越多的应用。本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定番茄中链格孢霉素、链格孢酚、腾毒素和链格孢酚甲醚含量的方法。4 种链格孢菌毒素经过 Shim-pack GIST C18 色谱柱分离，在 5 min 内完成快速检测。链格孢菌毒素在 1 ng/mL ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.999 以上，各校准点准确度在 88.7%~108.9% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于番茄中 4 种链格孢菌毒素含量的快速检测。

岛津应用云

