

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定人造肉中赭曲霉毒素 A

LCMSMS-677

摘要： 本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用系统测定人造肉中赭曲霉毒素 A 含量的方法。赭曲霉毒素 A 在优化后的色谱及质谱条件下，采用负离子模式进行电离，通过多反应监测 (MRM) 模式进行测定。结果表明：使用外标法定量，赭曲霉毒素 A 在 1 ng/mL~50 ng/mL 浓度范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度在 96.1%~102.7% 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 人造肉 赭曲霉毒素 A

人造肉是近几年在欧美国家提出的一种肉类替代方案，主要包括人工培养肉和植物性肉。目前市场上主要以植物性肉为主，其原料不局限于大豆蛋白，还会用豌豆、燕麦等粮食作物原料，制作上经过拉丝等技术将植物蛋白分子结构重构成肉类的纤维状结构，再通过交联酶、风味蛋白酶改进，使其口感质地及风味接近真肉。赭曲霉毒素 (Ochratoxins) 是一种有毒真菌代谢的产品，其中毒性最大、与人类健康关系最密切、对粮食作物污染最普遍的是赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)。研究表明该种毒素可以损害动物的肾脏和肝脏，有致畸和致癌作用。植物性人造肉的质量安全涉及到原料、生产加工、储存流通及烹饪加工等各方面，如果受到赭曲霉毒素 A 的污染，必

然会给消费者的健康带来风险。因此，建立快速、准确、高灵敏度检测人造肉中赭曲霉毒素 A 的分析方法意义重大。

目前，赭曲霉毒素 A 的检测方法主要采用的有薄层色谱法、酶联免疫吸附法以及液相色谱法等。高效液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 法由于具有检测灵敏度高、结果选择性好的特点，已成为粮食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和三重四极杆质谱联用系统，参照《GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中的方法，建立了一种快速准确测定人造肉中赭曲霉毒素 A 的方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。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-8045
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 x 2.1 mm I.D., 2 μm, Shimadzu SGLC P/N:227-30001-04)

流动相：A 相 -5 mmol/L 甲酸铵 0.1 % 甲酸水溶液 B 相 - 乙腈

流速：0.5 mL/min

进样体积：3 μL

柱温：35°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 50%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.50	Pumps	Pump B Conc.	50
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.10	Pumps	Pump B Conc.	50
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子化模式: ESI, 负离子模式	接口温度: 300°C
接口电压: -3.5 kV	加热气: 空气 10 L/min
雾化气流速: 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: 氩气 270 kPa
脱溶剂管温度: 200°C	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
MRM 参数 : 见表 2	驻留时间: 60 ms

表 2 MRM 参数

化合物	英文名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
赭曲霉毒素 A	Ochratoxins A (OTA)	303-47-9	402.00>358.00*	20	21	36
			402.00>167.00	20	37	26

注: * 表示定量离子对

1.3 样品前处理方法

参照食品安全国家标准《GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》第三法中粮食产品试样提取和净化方法。

1.4 基质校准曲线的制备

取适量空白试样, 按 1.3 样品前处理方法操作后, 得到空白样品提取溶液。移取一定量的赭曲霉毒素 A 标准储备液, 用空白样品提取液稀释, 分别配成相当于 1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL 的基质标准工作溶液, 供液相色谱 - 串联质谱仪测定。以定量特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 基质匹配标准工作溶液浓度为横坐标, 绘制校准曲线。

结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

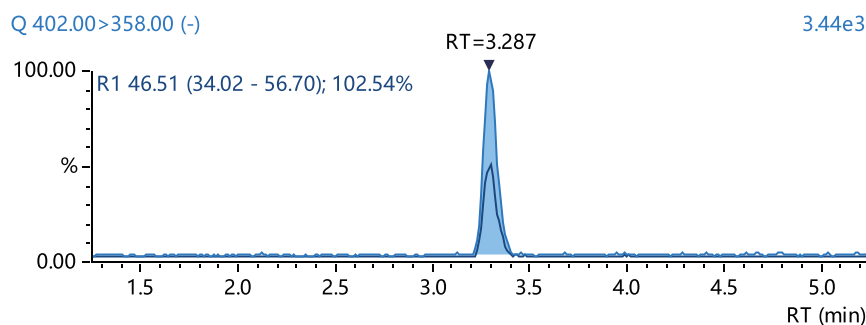


图 1 赭曲霉毒素 A (5 ng/mL) 的 MRM 图谱

2.2 线性范围与检出限

将不同浓度的赭曲霉毒素 A 基质匹配标准工作液，按照 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。

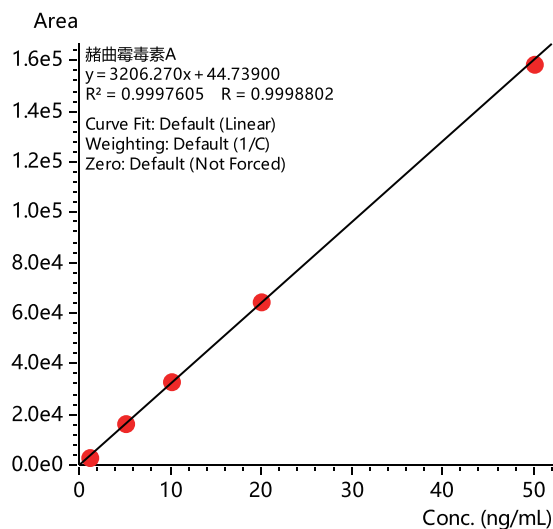


图 2 赭曲霉毒素 A 的校准曲线

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)
赭曲霉毒素 A	$Y = (3206.27)X + (44.7390)$	0.9998	1~50	96.1~102.7	0.3

2.3 精密度实验

对不同浓度的赭曲霉毒素 A 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：不同浓度样品溶液中赭曲霉毒素 A 的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.11% ~ 0.19% 和 0.88% ~ 3.29% 之间，显示仪器精密度良好。

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

名称	Conc. (ng/mL)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
赭曲霉毒素 A	5	0.19	3.29
	10	0.12	1.25
	20	0.11	0.88

2.4 加标回收率实验

称取 25 g 空白试样，加入少量赭曲霉毒素 A 的标准储备溶液，使得赭曲霉毒素 A 的加标浓度分别为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。加标样品经过 1.3 样品前处理操作后，测得赭曲霉毒素 A 的加标回收率在 87.1% ~ 91.6% 之间，加标回收率结果见表 5。

表 5 赭曲霉毒素 A 的加标回收率结果 (n=3)

化合物	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)
赭曲霉毒素 A	10	91.6
	20	87.1
	40	89.5

■ 结论

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-8045 联用测定人造肉中赭曲霉毒素 A 含量的方法。使用外标法定量，赭曲霉毒素 A 在 1 ng/mL~50 ng/mL 浓度范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度在 96.1%~102.7% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。方法学结果表明，本方法操作简便，且准确度高，可用于人造肉中赭曲霉毒素 A 含量的快速测定。

岛津应用云

