

LC-MS/MS 测定啤酒中赭曲霉毒素 A 含量

LCMSMS-572

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪建立了一种 LC-MS/MS 测定啤酒中赭曲霉毒素 A 残留方法。样品前处理参照《GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中的方法进行，啤酒样品经过提取后，采用免疫亲和柱进行净化，净化液浓缩后进行液质联用分析。样品在 1-100 ng/mL 范围内线性良好，线性相关系数 > 0.999，检出限在 0.1 ng/mL，选 1、10、50 ng/mL 三个浓度水平，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.104~0.288% 和 0.786~3.528% 之间，系统精密度良好。同时考察了空白啤酒基质加标，回收率在 89.2-96.8% 之间，满足检测需求。

关键词： 三重四极杆串联质谱 赭曲霉毒素 A 啤酒

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、对农作物污染最普遍的是赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)，它广泛存在于各类食品中。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，被国际癌症研究机构定为 2B 类致癌物。啤酒等酒类大都是以粮食为原料进行酿造的，如果酿酒的原材料受到 OTA 污染，则酒类制品也存在污染风险。因此，建立一种快速简单、准确、灵敏的检测啤酒中赭曲霉毒素 A 的方法意义重大。

目前使用的检测酒中的 OTA 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，我国《GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中也规定了 LC-MS/MS 检测赭曲霉毒素的方法，包括免疫亲和层析净化液相色谱法、离子交换固相萃取柱净化高效液相色谱法、免疫亲和层析净化液相色谱-串联质谱法、酶联免疫吸附测定法。

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啤酒中赭曲霉毒素 A 的方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

输液泵：LC-30AD×2

脱气机：DGU-20A_{5R}

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

系统控制器：CBM-20A

检测器：LCMS-8045 三重四极杆质谱仪

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

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

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

流速：0.3 mL/min

进样体积：3 μL

柱温：40°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 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.80	Pumps	Pump B Conc.	50
2.00	Pumps	Pump B Conc.	80
3.00	Pumps	Pump B Conc.	80
3.01	Pumps	Pump B Conc.	50
4.50	Controller	Stop	

质谱条件

离子源: ESI (+)	脱溶剂管温度: 250°C
离子源接口电压: +4 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: MRM
加热气: 空气 10 L/min	驻留时间: 100 ms
碰撞气: 氩气	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 优化参数

中文名	英文名	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
赭曲霉毒素 A	Ochratoxins A	404.10>239.10*	-28	-26	-22
	(OTA)	404.10>358.10	-28	-13	-28

注: * 表示定量离子

1.3 标准品与试剂

标准品: 购于上海安谱, 于 -20°C 冰箱保存, 备用。

试剂: 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱 (SHIMADZU SGLC P/N: 380-05104-01), 4°C 冰箱保存。

提取溶液: 称取 15 g 氯化钠和 2 g 碳酸氢钠, 加水定容至 100 mL。

■ 样品前处理

参照《GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中规定的方法: 称取 25 g 啤酒样品, 加入 50 mL 提取溶液, 混匀后过滤, 收集滤液。移取 10 mL 滤液注入免疫亲和柱, 待液体通过亲和柱后, 使用 15 mL 水淋洗 1 次, 弃去所有淋洗液。然后用 5 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 于 40°C 下氮吹干, 用 1 mL 35% 乙腈水溶液复溶, 过 0.22 μm 滤膜后, 上机检测。

■ 结果与讨论

3.1 标准样品的 MRM 色谱图和线性范围

按照样品前处理方式处理啤酒样品得到空白基质溶液, 用空白基质溶液配制 1、5、10、25、50、100 ng/mL 六个浓度的 OTA 标准溶液, 按照 1.2 中的分析条件进行测定, 采用外标法定量。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制校准曲线, 标准样品的 MRM 色谱图和校准曲线如图 1 所示。所得曲线线性关系良好, 线性方程、线性范围、相关系数和检出限见表 3。

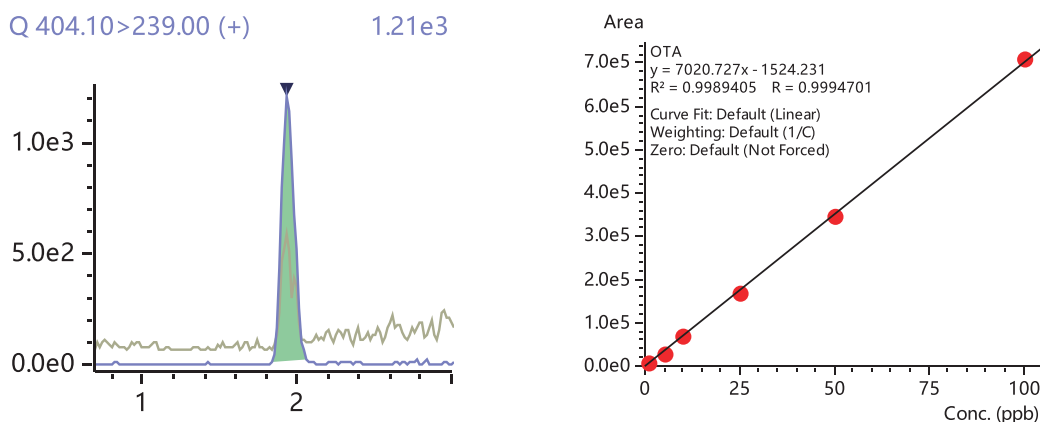


图1 标准品的 MRM 色谱图 (1 ng/mL) 和校准曲线

表3 校准曲线参数

中文名称	标准曲线	相关系数 r	线性范围 (ng/mL)	检出限 (ng/mL)
赭曲霉毒素 A	$Y = 7020.73X - 1524.23$	0.9995	1-100	0.10

3.2 精密度实验

不同浓度的混合标准工作液连续进样 6 次，用于考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.104~0.288% 和 0.786~3.528% 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=6)

名称	RSD% (1 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
赭曲霉毒素 A	0.288	3.528	0.212	1.410	0.104	0.786

3.3 回收率实验

以空白啤酒样品进行加标回收实验，分别添加低、中、高三个浓度水平的赭曲霉毒素 A 标准品，计算平均回收率。啤酒基质空白样品色谱图见图 2，空白基质中不含赭曲霉毒素 A。加标回收色谱图见图 3，各添加水平的平均回收率在 87.9-96.8% 之间，详见表 5。

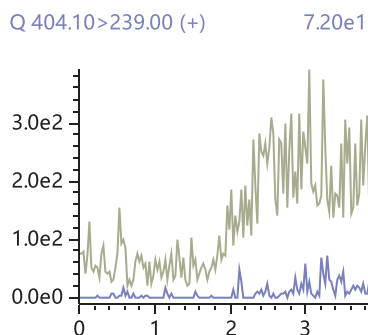


图2 啤酒空白基质色谱图

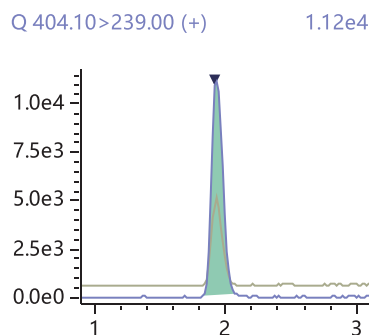


图3 啤酒基质加标回收色谱图 (5 μg/kg)

表 5 赭曲霉毒素 A 回收率 (n=3)

名称	加标水平 (µg/kg)	回收率 %
赭曲霉毒素 A	1	89.2
	5	94.3
	10	96.8

■ 结论

本文使用岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用仪建立了一种 LC-MS/MS 测定啤酒中赭曲霉毒素 A 残留的方法。样品前处理参照《GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中的方法进行，啤酒样品经过提取后，采用免疫亲和柱进行净化，净化液浓缩后进行液质联用分析。赭曲霉毒素 A 在 1-100 ng/mL 范围内线性良好，线性相关系数 > 0.999，检出限在 0.1 ng/mL，选 1、10、100 ng/mL 三个浓度水平，连续 6 次进样保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.104~0.288% 和 0.786~3.528% 之间，系统精密度良好。同时考察了空白啤酒基质加标，回收率在 89.2-96.8% 之间，满足检测需求。

岛津应用云

