

三重四极杆质谱测定奶粉中的 6 种黄曲霉毒素

LCMSMS-125

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 联用测定奶粉中 6 种黄曲霉毒素的方法。样品经乙腈 / 水提取、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。6 种黄曲霉毒素在 0.5 ~ 10 ng/mL 浓度范围内线性良好; 对 1 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 4 次进样, 3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差分别在 89.6~ 113.2% 和 1.59 ~ 9.99% 之间, 仪器精密度良好; 同时考察了空白奶粉基质加标结果, 结果显示 6 种黄曲霉毒素的加标回收率在 90.2 ~ 112.2% 之间; 在某奶粉样品中检出黄曲霉毒素 AFT-B1 和 AFT-B2, 浓度分别为 5.54 和 0.29 ng/mL。

关键词: 黄曲霉毒素奶粉超高效液相色谱仪三重四极杆质谱仪

黄曲霉毒素 (Aflatoxins AFT) 是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物。其毒性远远高于氰化物、砷化物和有机农药的毒性, 可发生急性中毒, 出现急性肝炎、出血性坏死、肝细胞脂肪变性和胆管增生。AFT 的致癌力也居首位, 是目前已知最强致癌物之一。鉴于各种黄曲霉毒素的易引入和比较强烈的毒性, 各国已经对黄曲霉毒素的含量水平做了严格的规定。欧盟 (EU) No 165/2010 规定婴幼儿配方奶粉中 M1 的限量为 0.025 μ g/kg; 日本检验检疫措施规定, 黄曲霉毒素 B1 在进口食品中的残留限量为“不得检出”; 美国食品与药物监督管理局 (FDA) 规定, 食品中黄曲霉毒素 (B1+B2+G1+G2) 的最大残留限量为 15 μ g/kg, 牛奶中黄曲霉毒素 M1 的最大残留限量为 0.5 μ g/kg; 我国 GB 2761-2011 食品安全国家标准《食品中真菌毒素限量》规定, 乳制品中黄曲霉毒素 M1 的限量为 0.5 μ g/kg。目前黄曲霉毒素常用方法为液相色谱-荧光检测法, 我国还没有使用 LC-MS/MS 检测黄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奶粉中 6 种黄曲霉毒素的方法, 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 μ m

流动相: A - 0.1% 甲酸水溶液;

B - 乙腈 / 甲醇 (v/v = 1/1)

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 10 μ L

柱温: 40 $^{\circ}$ C

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 32%, 时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	32
4.50	45
4.80	100
5.80	100
6.00	32
8.00	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: 4.5kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氦气

脱溶剂管温度: 250 $^{\circ}$ C

加热模块温度: 400 $^{\circ}$ C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 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	黄曲霉毒素 -M2	Aflatoxins M2 (AFT-M2)	6885-57-0	331	259*	-12	-26	-28
					273	-12	-25	-30
2	黄曲霉毒素 -M1	Aflatoxins M1 (AFT-M1)	6795-23-9	329	273*	-12	-25	-30
					229	-12	-43	-25
3	黄曲霉毒素 -G2	Aflatoxins G2 (AFT-G2)	7241-98-7	331	245*	-12	-31	-26
					257	-12	-31	-30
4	黄曲霉毒素 -G1	Aflatoxins G1 (AFT-G1)	1165-39-5	329	243*	-12	-29	-27
					283	-12	-25	-21
5	黄曲霉毒素 -B2	Aflatoxins B2 (AFT-B2)	7220-81-7	315	259*	-12	-30	-28
					287	-12	-27	-30
6	黄曲霉毒素 -B1	Aflatoxins B1 (AFT-B1)	1162-65-8	313	241*	-22	-38	-26
					285	-22	-24	-30
7	G1同位素 内标	¹³ C-AFT-G1	-	346.00	257.00	-12.0	-29.0	-27.0
8	B1同位素 内标	¹³ C-AFT-B1	-	329.90	254.90	-22.0	-38.0	-26.0
9	B2同位素 内标	¹³ C-AFT-B2	-	332.00	272.90	-12.0	-30.0	-28.0

*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 10 mg/L 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 10、7.5、5、2、1、0.75 和 0.5 ng/mL 的标准工作液。内标物 ¹³C-AFT-G1、¹³C-AFT-B1 和 ¹³C-AFT-B2 的浓度为 2 ng/mL。

样品前处理方法：

提取：取 5.0 g 样品，加入乙腈 / 水 (84/16, v/v) 20 mL，涡旋 1 min，超声 40 min，离心 5 min (8000 rpm)，取 2 mL 上层清液，加 1% 吐温 -20 PBS 稀释至 25 mL，液体备用。

净化：先将免疫亲和柱内液体排光，在免疫亲和柱上接一个 30 mL 的注射器，将提取的液体上黄曲霉毒素 (B1、B2、G1、G2、M1 和 M2) 免疫亲和柱，上样完后，用 10 mL PBS 淋洗柱子，吹干，再用 5 mL 的甲醇洗脱，吹干，收集洗脱液，并氮气吹干，用 1.0 mL 乙腈 / 水 (20/80, v/v) 溶液溶解残留物，过 0.22 μm 滤膜并收集滤液，进 LC-MS/MS 分析。

结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

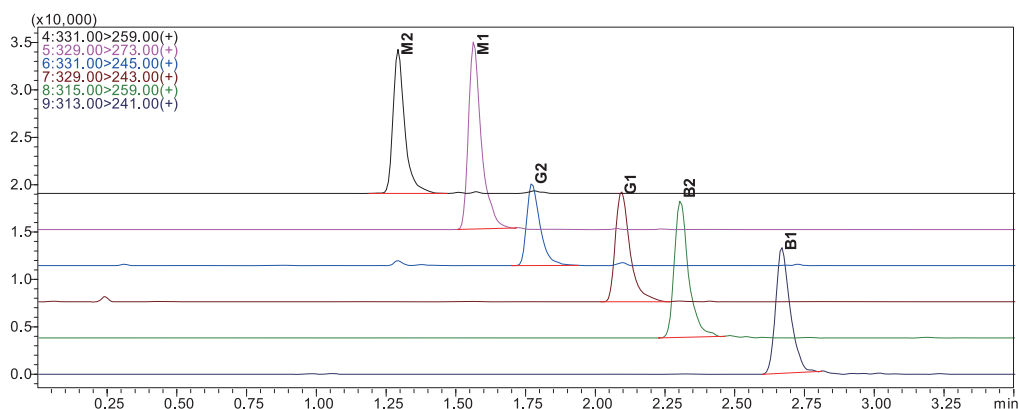


图1 10 ng/mL混合标准样品的MRM色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 0.5、0.75、1、2、5、7.5、10 ng/mL 的混合标准工作液，其中内标浓度为 2 ng/mL，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2~7 所示。6 种黄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。

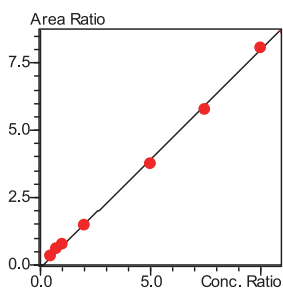


图2 AFT-B1的标准工作曲线

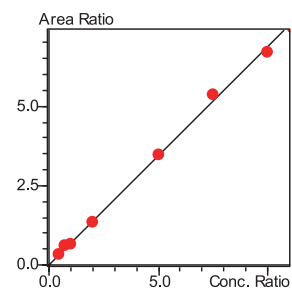


图3 AFT-B2的标准工作曲线

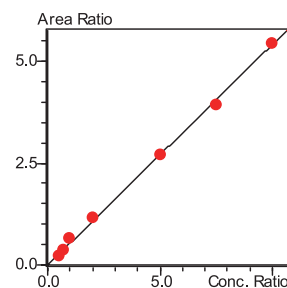


图4 AFT-G1的标准工作曲线

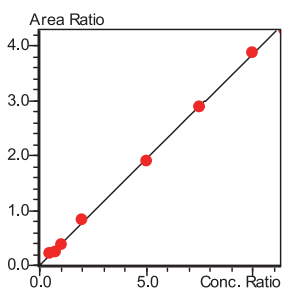


图5 AFT-G2的标准工作曲线

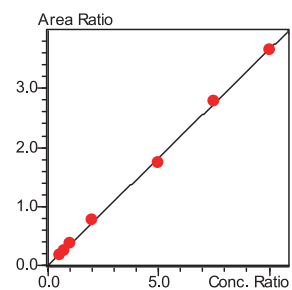


图6 AFT-M1的标准工作曲线

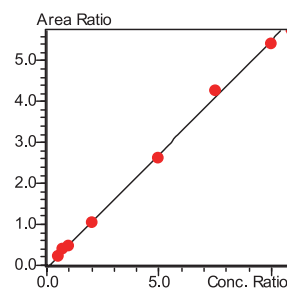


图7 AFT-M2的标准工作曲线

表3 6种黄曲霉毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限(ng/mL)	定量限(ng/mL)
1	AFT-B1	$Y=0.8144X+0.0945$	0.9993	0.15	0.50
2	AFT-B2	$Y = 0.6750X+0.0498$	0.9992	0.15	0.50
3	AFT-G1	$Y = 0.5317X+0.0081$	0.9980	0.15	0.50
4	AFT-G2	$Y=3028.33X+377.835$	0.9974	0.15	0.50
5	AFT-M1	$Y=2902.20X+68.4405$	0.9986	0.15	0.50
6	AFT-M2	$Y=4152.96X+230.694$	0.9993	0.15	0.50

2.3 精密度实验

对 1 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 4 次进样，3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差分别在 89.6~113.2% 和 1.59~9.99% 之间，仪器精密度良好。

表4 3个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差 (n=4)

名称	1 ng/mL		5 ng/mL		10 ng/mL	
	Accuracy(%)	Conc. RSD%	Accuracy(%)	Conc. RSD%	Accuracy(%)	Conc. RSD%
AFT-B1	97.5	9.55	89.8	5.55	102.3	4.30
AFT-B2	101.6	5.76	96.1	3.26	94.9	4.21
AFT-G1	108.2	9.85	104.3	3.82	103.2	4.85
AFT-G2	108.8	9.99	104.2	3.53	95.5	3.77
AFT-M1	89.6	1.59	94.8	5.36	105.0	2.03
AFT-M2	113.2	9.84	101.5	5.20	102.0	2.42

2.4 回收率考察

以空白奶粉样配制加标溶液，加标浓度 5 ng/mL，得到色谱图如图 8 所示。6 种黄曲霉毒素加标回收率见表 5。

2.5 奶粉样品分析

在某奶粉样品中检出 AFT-B1 和 AFT-B2，浓度分别为 5.54 和 0.29 ng/mL，色谱图见图 9。

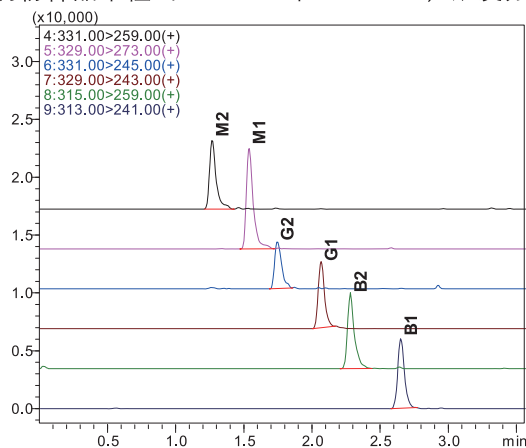


图8 基质加标样品 (5 ng/mL) 的色谱图

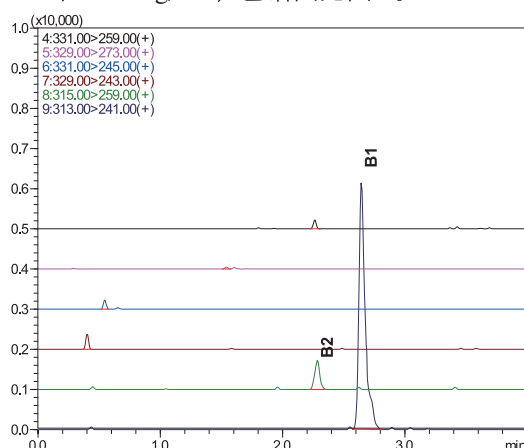


图9 奶粉样品的色谱图

表5 空白基质加标样品 (5 ng/mL) 回收率

名称	1	2	3	平均	回收率(%)
AFT-B1	6.19	5.24	5.33	5.59	111.7
AFT-B2	4.36	4.87	4.31	4.51	90.2
AFT-G1	4.98	4.76	5.42	5.05	101.1
AFT-G2	5.44	5.91	5.48	5.61	112.2
AFT-M1	5.32	5.54	5.39	5.41	108.3
AFT-M2	5.54	4.79	5.37	5.23	104.7

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 联用测定奶粉中 6 种黄曲霉毒素的方法。6 种黄曲霉毒素在 0.5 ~ 10 ng/mL 浓度范围内线性良好，基质加标回收率良好；低、中、高 3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差分别在 89.6~113.2% 和 1.59 ~ 9.99% 之间，仪器精确度良好；在某奶粉样品中检出黄曲霉毒素 AFT-B1 和 AFT-B2，浓度分别为 5.54 和 0.29 ng/mL。