

应用液相色谱-质谱联用技术同时测定 花生中的黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2

王浩, 刘艳琴, 杨红梅, 郭启雷, 史海良, 阎龙宝, 李小运

(国家食品质量监督检验中心, 北京 100094)

Simultaneous Determination of Aflatoxin B1, B2, G1, G2 in Peanut by LC-MS/MS

WANG Hao, LIU Yan-qin, YANG Hong-mei, GUO Qi-lei, SHI Hai-liang, YAN Long-bao, LI Xiao-yun
(Nation Food Quality & Safety Supervision and Inspection Center, Beijing 100094, China)

Abstract: The aflatoxin B1, B2, G1, G2 in peanut were developed by LC-MS/MS. The mass spectrometer was operated in the positive ion mode using multiple reaction monitoring. The sample was extracted with methanol, and chromatographic separation was carried out on a MGIII-C₁₈ column (2.1 mm × 150 mm × 1.8 μm) with elution of V(acetonitrile):V(water)=35:65. The limit of detection is 0.5 μg·L⁻¹, the limit of quantitation is 0.5 μg·kg⁻¹. The linear plots are between 0.5 μg·L⁻¹ and 25.0 μg·L⁻¹. Overall recoveries are between 88.3% and 99.2%, and RSD values are between 1.73% and 3.75%.

Key words: LC-MS/MS; aflatoxin B1, B2, G1, G2; peanut

中图分类号: O 657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-2997 (2009) 增刊-0159-03

1 实验部分

1.1 仪器

液相色谱-串联质谱仪: Agilent 6410 型串联三重四极杆质谱, 配 Agilent1200 型液相色谱仪。

1.2 试剂和材料

乙腈, 甲酸 (色谱纯); 甲醇 (分析纯); 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 (浓度 1 mg·L⁻¹, 纯度 99%); Sigma 公司产品。

1.3 分析条件

1.3.1 色谱条件 资生堂 MGIII-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 150 mm × 1.8 μm); 流速 0.25 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL; 流动相: V (水溶液):V (乙腈) = 65:35。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源 (ESI), 正离子扫描, 多反应检测, 干燥气 N₂, 雾化气压力为 2.76 × 10⁵ Pa, 干燥气温度 340 °C, 干燥气流速 8 L·min⁻¹。黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 质谱分析的条件参数列于表 1。

1.4 样品处理

称取 5 g 粉碎后试样 (精确至 0.01 g), 置于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 20 mL 甲醇, 于液体混匀器上涡旋提取 1 min, 超声波提取 10 min, 以 4 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 上清液转移至 100 mL 比色管中。残渣再加入 20 mL 甲醇, 重复上述操作 2 次。合并全部上清液至 100 mL 比色管中, 无

水硫酸钠脱水,再取 25 mL 甲醇冲洗比色管及无水硫酸钠,并入蒸发瓶内,将其接至旋转蒸发器上,于 45 °C 水浴中减压蒸馏至干,用 5 mL 50% 甲醇溶液溶解,过 0.20 μm 滤膜后,用液相色谱-串联质谱测定。

表 1 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的质谱参数

被测物质名称	定量离子	定性离子	碎裂电压/V	碰撞能量/V
黄曲霉毒素 B1	313/284.9	313/284.9, 313/270	80	20/30
黄曲霉毒素 B2	315/258.9	315/258.9, 315/286.9	80	30/20
黄曲霉毒素 G1	329/242.8	329/242.8, 329/242.8	80	30/20
黄曲霉毒素 G2	331/312.9	331/312.9, 331/284.8	80	20/30

2 结果与讨论

2.1 样品提取

黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 易溶于甲醇。本研究利用甲醇作为提取溶剂,能够提高黄曲霉毒素的溶出率,同时减少蛋白溶出造成的影响。实验发现:用甲醇重复提取样品 3 次,可以充分提取出样品中的黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2;黄曲霉毒素净化方法目前主要有专用于黄曲霉毒素分离纯化的免疫亲和柱,其特异性强、灵敏度高,但价格高,且只能一次性使用。本研究利用 C_{18} 色谱柱将样品测定液中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 进行有效分离,利用串联三重四极杆质谱对其进行准确的定性定量分析,取得满意的结果。

2.2 质谱条件的优化

采用直接进样方式将黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 标准溶液分别注入离子源中,在正离子检测方式下进行母离子全扫描,得到每种黄曲霉毒素的分子离子峰。以每种黄曲霉毒素的准分子离子峰为母离子,进行二级质谱扫描,然后再对得到的每种黄曲霉毒素的二级质谱参数,如破碎电压、碰撞能量等进行优化,得到每种黄曲霉毒素的最佳质谱参数。

2.3 色谱条件的优化

黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 属于中等极性化合物,为了有利于色谱峰的分离及峰形的改善,分别采用资生堂 MGIII- C_{18} 柱、ZORBAX Eclipse XDB- C_{18} 和 ZORBAX SB-Aq 柱进行分离试验,发现采用资生堂 MGIII- C_{18} 柱, $V(\text{水溶液}):V(\text{乙腈})=65:35$ 为流动相,流速 $0.25 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,在 8 min 内可以较好的分离样品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2。加标样品 MRM 色谱图示于图 1,从图中可以看出,黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 得到较好的分离。

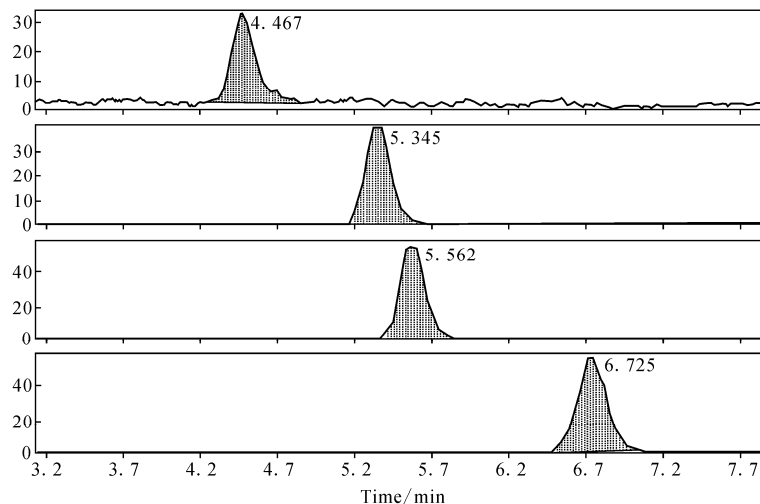


图 1 黄曲霉毒素加标样品的提取离子流图

2.4 线性范围与检出限

将逐级稀释的混合标准工作液分别进样 20 μL , 测定结果经线性回归, 线性范围、回归方程 (y 为峰面积, Counts; x 为浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、相关系数和检出限列于表 2。

2.5 方法的回收率和精密度

称取 4 份空白样品, 每份 5 g, 分别添加 1 mL $20\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄曲霉毒素混合标准溶液, 按供试品溶液制备方法制备后, 进行测定, 结果列于表 3。从表 3 中的回收率及精密度可以看出, 平均加标回收率在 88.3%~99.2%之间, 相对标准偏差在 1.73%~3.75%之间, 满足试验要求。

表 2 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的回归方程、相关系数及检出限

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	线性回归方程	线性相关系数 (r)	检出限 ($S/N\geq 3$) / $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
黄曲霉毒素 B1	0.5~25	$y=41\ 965.64x-15\ 994.89$	0.996 8	0.5
黄曲霉毒素 B2	0.5~25	$y=33\ 002.89x-6\ 951.88$	0.999 5	0.5
黄曲霉毒素 G1	0.5~25	$y=34\ 557.13x-13\ 987.11$	0.999 1	0.5
黄曲霉毒素 G2	0.5~25	$y=16\ 065.93x-2\ 338.65$	0.997 9	0.5

注: 进空白样, 以基线 3 倍噪声值在标准曲线查得结果计算, 测得方法检出限

表 3 花生中 5 种黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的添加回收率数据 ($n=4$)

化合物	添加浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	加标回收率/%	相对标准偏差/%
黄曲霉毒素 B1	4.0	99.2	1.87
黄曲霉毒素 B2	4.0	88.3	3.75
黄曲霉毒素 G1	4.0	91.1	1.73
黄曲霉毒素 G2	4.0	90.5	1.92

3 结论

本研究建立了花生及其制品中黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 的高效液相色谱-串联四极杆质谱联用测定方法。该方法样品前处理简单, 试样用甲醇提取, C_{18} 反相色谱柱对样品中黄曲霉毒素进行有效分离, 电喷雾离子化, 串联质谱检测。实验表明: 该方法测定低限 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 加标回收率高于 88.0%, 可以为国内质检部门快速测定花生中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 残留量提供方法参考。

(上接第 140 页)

参考文献:

- [1] RICHARDSON S D, TERNES T A. Water analysis: emerging contaminants and current issues[J]. Anal Chem, 2005, 77: 3 807-3 838.
- [2] QIU B, LUO H. Desorption electrospray ionization mass spectrometry of DNA nucleobases: implications for a liquid film model[J]. J Mass Spectrom, 2009, 44(5): 772-779.
- [3] SAISON D, DE SCHUTTER D P, DELVAUX F, et al. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and head-space solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2009, 1 216: 5 061-5 068.