

UPLC-MS-MS法测定黄曲霉毒素

赵 华

遵义市CDC 贵州遵义 563000

摘要: 目的: 建立UPLC-MS-MS法测定辣椒中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂ (AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂)。方法: 将辣椒样本通过用乙腈与水一定比例混合后提取, 提取后利用特定的免疫亲和小柱对提取液进行过柱净化, 净化后的液体通过氮吹仪吹干, 利用液相色谱的流动相对其复溶后, 加入一定浓度的¹³C标记AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂同位素标记的内标, 用UPLC-MS-MS法进行分析, 采用离子对(MRM)法测定, 用同位素标记的内标对其进行定量分析。结果: AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂在0.05-100ng/ml的范围内, 其标准曲线的线性较好, r均大于0.9930; 在0.3, 0.6, 1.5 μg/kg的加标条件下, AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂的平均回收率在80.12-117.45%, 其精密度的标准偏差系数(RSD)为3.6%-12.2%。以信噪比为3计算AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂方法检出限(LOD), AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂的LOD为0.03 μg/kg, 以信噪比为10计算AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂方法定量限(LOQ), AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂的LOQ为0.1 μg/kg。结论: 利用UPLC-MS-MS法测定辣椒中AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂其测定结果较好, 重现性、加标回收率良好, 可用于辣椒中AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂残留量的检测。

关键词: 辣椒; AFT B₁; AFT B₂; AFT G₁; AFT G₂; 超高效液相色谱四级杆串联质谱仪(UPLC-MS-MS)

辣椒又名番椒、辣子, 属茄科辣椒属植物, 多为一年生草本植物, 在热带地区也有多年生木本植物, 目前世界各地普遍栽培的是一年生草本, 辣椒中含有丰富的辣椒素、VC、可溶性糖、蛋白质、胡萝卜素以及游离氨基酸等多种营养成分^[1-2]。但是辣椒在生产、储藏、运输过程中会受到黄曲霉毒素污染。黄曲霉毒素是一组化学结构类似的二呋喃香豆素的衍生化合物, 它是一种天然毒素, 在发霉辣椒中普遍存在, 它毒性大, 致癌性强, 对人类健康危害极大^[3-6]。

1 材料与方法

1.1 仪器与设备

AB SCIEX 6500液相色谱四级杆串联质谱联用仪; 全自动SPE固相小柱萃取仪美国Gilson; 分析天平瑞士Mettler; 涡旋混匀器赛默飞; 黄曲霉毒素免疫亲和柱美国Beacom; 台式高速低温离心机湖南赫西仪器设备有限公司; 氮吹仪美国Horizon technology公司。

1.2 主要试剂

甲醇、乙腈均为质谱纯(美国, 赛默飞公司); 吐温-20为分析纯(上海ANPEL); 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱(Beacon); 磷酸盐缓冲液pH7.4(以达科技); 黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂标准溶液均为3mg/L, 购于上海ANPEL; 内标¹³C₁₇-黄曲霉毒素B₁浓度为0.05 μg/ml, 购于阿尔塔科技; 内标标液¹³C₁₇-黄曲霉毒素B₂浓度为

0.506 μg/ml, 购于哈格(BePure)科技; 标液黄曲霉毒素G₁、黄曲霉毒素G₂、内标标液¹³C₁₇-黄曲霉毒素G₁、内标标液¹³C₁₇-黄曲霉毒素G₂, 浓度分别为100.08 μg/ml、24.97 μg/ml、0.508 μg/ml、0.506 μg/ml, 购于Pribolad公司。

1.3 色谱条件与质谱条件

色谱柱HypersilGOLD, 100 mm x 2.1 mm, 粒径1.9 μm, 管路A道流动相为纯水, 管路B道流动相为甲醇-乙腈(1:1), 利用流动相进行梯度洗脱: 0-1.0min 20%B, 1.0-4.0min 40%B, 4.0-10.0min 70%B, 10.0-11.8min 100%B, 11.8-17min 20%B, 泵流速0.3ml/min, 柱温箱温度: 40摄氏度; 存放样品的样品盘温度: 20摄氏度; 进样体积: 1 μL; 质谱: ESI源, 碰撞池EP电压10V(ESI+), 出口电压离子10V, 离子源加热温度为500℃, 离子化电压5500V, 扫描模式采用多离子对监测(MRM)模式检测。

1.4 标准曲线的配置

标准溶液: 用乙腈配置1 μg/ml的黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂混合标准储备液, 再用乙腈配置100ng/ml、10ng/ml、1ng/ml标准中间液; 用乙腈配置50ng/ml同位素标液¹³C₁₇-AFT B₁、同位素标液¹³C₁₇-AFT B₂、同位素标液¹³C₁₇-AFT G₁、同位素标液¹³C₁₇-AFT G₂混合储备液, 再用乙腈配置内标混合液浓度为20ng/ml; 最后利用初

始流动相, 取相应体积的标准混合液, 再加入 $50\ \mu\text{L}$, 20ng/ml 的混合同位素内标, 定容至 1ml , 配置浓度为 0.05 、 0.1 、 0.2 、 0.4 、 0.8 、 1.5 、 3.0ng/ml 的标准溶液系列。

1.5 样品的提取

称取 $5.00\ \text{g}$ 辣椒置于离心管中, 加入 $20.0\ \text{mL}$ 乙腈与水混合液, 其比例为 $84:16$, 振荡摇匀 30 分钟后, 置于离心机上, 离心机转速为 8000 转每分钟, 离心 5 分钟, 将离心后的上清液转移至干净的离心管中备用。

1.6 样品净化

取离心好的上清液 2ml , 加入 23ml 的PBS缓冲液(内含 1% TWEEN-20), 再加入 $50\ \mu\text{L}$, 20ng/ml 的同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₁、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₂、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₁、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₂混合液, 混匀。将 $2-8^\circ\text{C}$ 冷藏保存的黄曲霉毒素免疫亲和柱恢复至室温, 取下免疫亲和柱顶端的密封盖, 等免疫亲和柱内原有保存液流尽后, 将已经处理好的样品混匀液加入到样品试管中, 将该离心管放入到全自动SPE固相小柱萃取仪, 设置好仪器参数, 让仪器以 1 毫升每分钟的速度滴下过柱子, 液体上样完毕后, 向样品试管中加入 5ml 的去离子水, 再通过仪器抽取该样品试管中的液体, 同时以 1 毫升每分钟的速度滴下过柱子, 液体滴完后, 通过仪器, 进行快速抽空气在快速推空气, 将固相萃取小柱子内的液体吹干, 在固相萃取小柱下端放试管, 设置全自动SPE固相小柱萃取仪, 吸取 2ml 的甲醇试剂加入到小柱内, 以 1 毫升每分钟的速度滴下过柱子收集管中, 利用仪器的液体泵, 进行快速抽空气在快速推空气, 将固相萃取小柱子内的液体吹干至收集管中, 将收集管放到氮吹仪上, 设置氮吹仪温度为 45°C , 氮气吹干后, 向吹干的收集管加入 1.0ml 乙腈与水混合液, 其比例为 $5:95$, 混匀溶解后, 利用孔径为 $0.22\ \mu\text{m}$ 针式滤膜进行过滤, 滤液置于进样瓶。

1.7 定性与定量方法

对于黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂其定性方法主要是根据标样的出峰时间与样品的出峰时间是否一样, 同时再根据样品质谱图信息, 将标液的母离子与子离子的丰度比值与样品母离子与子离子的丰度比值进行比较, 在相同实验条件下测定样品和标准品, 若样品与标准品黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的色谱图的保留时间一致, 同时其特征离子相对丰度比的相对标准偏差不超过标准规定的范围, 则可以确定样品中检出黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂成分。

2 结果

2.1 提取方式优化

对于样品的提取方式多数为超声提取、涡旋混匀、均质器提取, 对于辣椒中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂提取实验考察, 将样品至于超声波中, 超声 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40min , 后将样品按照上面实验步骤前处理后, 上机检测, 超声时间在 $25-40\text{min}$ 内, 变化不明显, 到 35min 中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂达到最高值, 所以若用超声方式提取, 超声时间在 25min 为最高提取效率; 将提取样品至于涡旋混匀或置摇床中振荡 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40min , 然后按照上面的实验提取方法进行样品提取, 最后检测, 结果显示, 涡旋混匀或置摇床中振荡时间在 $20-40\text{min}$ 结果变化不明显, 在 30min 样品中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂达到最高值, 所以若用涡旋混匀或置摇床中振荡提取, 其提取时间为 20min 达到最大提取效率; 将样品至于均质器上提取, 均质时间 5 、 10 、 15 、 20 、 25 、 30 、 35 、 40min , 将样品上面实验步骤前处理后, 上机检测, 结果表明, 均质时间 5min , 样品中的黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂达到最高值, 均质时间在 $10-40\text{min}$ 后, 变化结果明显, 因此若用均质器提取, 均质时间为 5min , 提取效率达到最佳。

2.2 质谱条件优化

质谱条件的优化目标物有黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₁、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT B₂、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₁、同位素标液 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFT G₂, 共计 8 种化合物, 将这 8 中化合物用 50% 乙腈水分别配置为 50ng/ml 的浓度, 直接从质谱端进标准溶液, 在ESI⁺模式下进行母离子质谱扫描, 选取质量数为 331.1 作为AFTB₁的母离子, 在对母离子 331.1 进行打碎碎片扫描, 选取相应值最大的 2 个碎片离子分别作为定量离子和定性离子, 同时再优化每对离子对的碰撞能量, 最终AFTB₁的定量离子对为 $331.1/285.1$, 定性离子对为 $331.1/241.1$ 其定量离子的CE能量为 32 、定性离子的CE能量为 50 ; 选取质量数为 315.1 作为AFTB₂的母离子, 在对母离子 315.1 进行打碎碎片扫描, AFTB₂的定量离子对为 $315.1/287.1$, 定性离子对为 $331.1/259.1$, 其定量离子的CE能量为 35 、定性离子的CE能量为 41 ; 选取质量数为 329.1 作为AFTG₁的母离子, 在对母离子 329.1 进行打碎碎片扫描, 最终AFTB₂的定量离子对为 $329.1/243.2$, 定性离子对为 $329.1/214.9$, 其定量离子的CE能量为 33 、定性离子的CE能量为 43 ; 选取质量数为 331.1 作为AFTG₁的母离子, 在对母离子 331.1 进行打碎碎片扫描, 最终AFTB₂的定量

离子对为331.1/285.3, 定性离子对为331.1/245.3, 其定量离子的CE能量为38、定性离子的CE能量为45;

2.3 线性范围和检出限

取辣椒样品 5.00g, 采用标准加入法, 加入 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂ 混合标准标液, 按照 1.6、1.7 方法进行样品前处理, 经过免疫亲和柱净化后, 采用优化好的液相色谱和质谱条件进行样品测定, 根据 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂ 与同位素标液 ¹³C₁₇-AFT B₁、同位素标液 ¹³C₁₇-AFT B₂、同位素标液 ¹³C₁₇-AFT G₁、同位素标液 ¹³C₁₇-AFT G₂ 的峰面积之比和浓度之间的关系, 检测结果显示: AFT B₁ 标准曲线在 0.05-100ng/ml 浓度范围标准曲线良好, 其线性回归方程为: $y=1.84459x+0.00214$, $r=0.99666$; AFT B₂ 标准曲线 0.05-100ng/ml 浓度范围标准曲线良好, 其线性回归方程为: $y=0.42285x+0.01336$, $r=0.99391$; AFT G₁ 标准曲线 0.05-100ng/ml 的浓度范围标准曲线良好, 其线性回归方程为: $y=1.32294x+0.02227$, $r=0.99278$; AFT G₂ 标准曲线 0.05-100ng/ml 的浓度范围标准曲线良好, 其线性回归方程为: $y=0.67360x+0.00912$, $r=0.99927$ 。AFT B₁、B₂、G₁、G₂ 总离子流谱图见图 1。

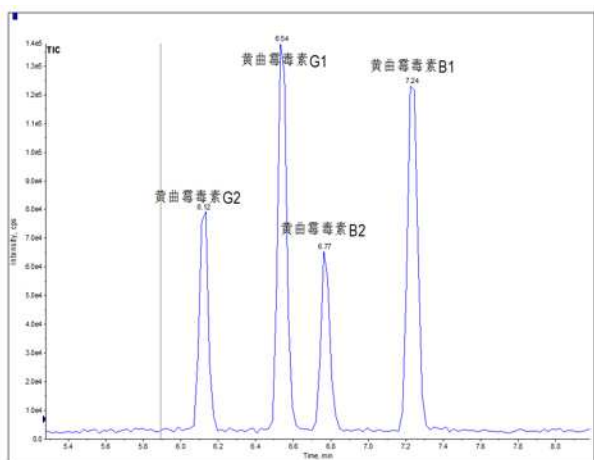


图1 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 总离子流图

3 结论

本研究通过固相萃取 (SPE) 小柱进行样品净化, 建立了 UPLC-MS-MS 方法检测辣椒中 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂ 含量的检测方法, 该方法加入乙腈与水的混合溶液, 其比例为 (84+16), 提取样品中黄曲霉毒素, 在加入 1% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液, 过免疫亲和固相萃取小柱, 通过液相色谱对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 进行分离, 该方法分离效果好, 精密度准确度都满足实验分析要求, 可以为辣椒黄曲霉毒污染导致的食品安全检测提供技术手段。

参考文献:

- [1] 王雅芳. 辣椒病毒病防治法[J]. 农民致富之友, 2015(21):1.
- [2] 胡小静, 李蕾, 李付惠, 等. 海苔辣椒脆的研制[J]. 保鲜与加工, 2021, 21(5):91-96.
- [3] 蔡增轩, 胡玲玲, 王军淋, 等. 超高效液相色谱检测奶及奶制品中的 M 族黄曲霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 000(003):801-807.
- [4] 杨娟. 高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定变性淀粉中黄曲霉毒素含量的研究[J]. 工业微生物, 2021, 51(3):31-35.
- [5] 王坤, 胡晓飞, 王耀, 等. 食品中黄曲霉毒素高灵敏检测方法研究进展[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(7).
- [6] 梁剑锋, 李亚, 梁燕妮, 等. QuEChERS 萃取-UPLC-MS/MS 测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 方法的研究[J]. 中国调味品, 2020, 045(005):182-185, 190.