

高效液相色谱-串联质谱法测食品中的赭曲霉毒素 A

史娜¹, 路勇¹, 吴颖², 姜杰¹

(1.北京市食品安全监控中心, 北京 100041; 2.北京市产品质量监督检验所, 北京 100026)

摘 要: 研究建立高效液相色谱-串联质谱联用技术检测食品中赭曲霉毒素 A 的方法。根据不同样品, 用甲醇-2% 碳酸氢钠溶液(60:40, *V/V*)或甲醇-水(80:20, *V/V*)提取样品中的赭曲霉毒素 A, 经 OchraTest 亲和柱净化, 以甲醇-5 mmol/L (含 0.1% 甲酸)乙酸铵为流动相, 采用正离子模式对赭曲霉毒素 A 进行检测。结果回收率在 82.3%~98.5% 之间, 检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法适用不同基质样品, 准确性好、灵敏度高、抗干扰能力强, 方法检出限可满足欧盟等最新限量要求。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 赭曲霉毒素 A; 免疫亲和柱; 多离子反应监测

Analysis of Ochratoxin A in Foods by HPLC-MS/MS

SHI Na¹, LU Yong¹, WU Ying², JIANG Jie¹

(1. Beijing Municipal Center for Food Safety Monitoring, Beijing 100041, China;

2. Beijing Products Quality Supervision and Inspection Institute, Beijing 100026, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was proposed to determine ochratoxin A (OTA) in foods. Samples were extracted by methanol-2% sodium bicarbonate solution (60:40, *V/V*) or methanol-water (80:20, *V/V*), followed by clean-up on OchraTest affinity cartridge using methanol-5 mmol/L ammonium acetate solution in the presence of 0.1% formic acid as the mobile phase. OTA was detected in the in positive ion mode. The average spike recoveries for ochratoxin A in 4 food samples were 82.3%—98.5% ($n=5$). The limit of detection was 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, which can meet the latest requirement of the EU. Moreover, this method proved suitable for a broad range of sample matrices with high accuracy, sensitivity and disturb resistance.

Key words: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS); ochratoxin A; immuno-affinity column; multiple reaction monitoring (MRM)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0260-04

赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA) 是毒性最强的真菌毒素之一——赭曲霉毒素 (ochratoxin, OTS) 的一种^[1-2], 其广泛分布于谷物和其他植物性食品及相关产品和动物性食品中, 对动物和人体具有肾脏毒性、肝脏毒性, 另外还有致畸、致突变和致癌作用, 并有免疫抑制作用^[3-4], 严重危害人类健康。1993 年国际癌症机构 (the international agency for research on cancer, IARC) 将其确定为 2B 类致癌物。近几年, 食品中检出赭曲霉毒素 A 的报道屡见不鲜, 因此有必要研究准确、灵敏的赭曲霉毒素 A 检测方法。准确甄别、掌控食品中该毒素的含量水平, 为食品安全监测与评估、食品安全有效

监管工作提供有力的技术支持, 具有重要意义。

目前国内外检测 OTA 的方法主要有薄层析法 (thin layer chromatography, TLC)、高效液相色谱法^[5] (high performance liquid chromatography, HPLC)、酶联免疫吸附法^[6] (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 等方法。其中 HPLC 是国际上检测赭曲霉毒素 A 最常用的方法, 这种方法使用溶剂萃取或免疫亲和色谱柱等, 将 OTA 从基质中分离出来。已有报道表明, 反相色谱柱应用于食品分析中有较好的回收率^[7-8]。但是, 对于咖啡、饲料、红酒等比较复杂的基质, 液相色谱法的基质干扰大、分析过程耗时较长。本研究旨在建立一种

收稿日期: 2010-11-17

作者简介: 史娜 (1982—), 女, 研究实习员, 学士, 研究方向为食品中兽药残留分析。E-mail: bjshina@hotmail.com

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

高效液相色谱-质谱(mass spectrometry, MS)/质谱法(HPLC-MS-MS)以代替高效液相色谱法。该方法具有灵敏度高、专属性强、分析速度快的优点^[9-10],结合高速匀质提取、免疫亲和柱净化等前处理方法^[11],可降低检出限,应用于食品中 OTA 的测定,可获得满意的结果。

1 材料与amp;方法

1.1 材料和试剂

实验样品均为市购。

OTA 标准样品 以色列 Fermentek 公司。母液采用称量法制备,准确称取赭曲霉毒素 A 对照品 1mg 到 10mL 容量瓶中,用 HPLC 级甲醇配成质量浓度约为 100μg/mL 的标准贮备液,2~8℃冷藏保存,有效期 6 个月。

甲醇、乙酸铵、甲酸 美国 Dikma Dikmapure 公司;碳酸氢钠、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、酸均为分析纯;实验室用水符合 GB/T 6682—2008《分析实验室用水规格和试验方法》中二级水的规定。PBS 配制:8.0g 氯化钠+1.2g 磷酸氢钠+0.2g 氯化钾,用 990mL 纯水将上述试剂溶解,然后用浓 HCl 调 pH7.0。OchraTest Column 亲和柱、真菌清洗缓冲液 美国 Vicam 公司。

1.2 仪器与设备

Quattro Premier XE-串联四极杆液质联用仪(Masslynx 数据处理系统)、ACQUITY 高效液相色谱系统 美国 Waters 公司;3-18K 高速冷冻离心机 德国 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS T3(2.1mm×50mm, 1.8μm) 色谱柱;柱温 40℃;进样量 10μL;流动相 A 为 5mmol/L (含 0.1% 甲酸)乙酸铵溶液,流动相 B 为甲醇,洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件
Table 1 HPLC gradient elution conditions

步骤	时间/min	流速/(mL/min)	流动相体积分数/%	
			A 相	B 相
1	0.00	0.30	95.0	5.0
2	2.00	0.30	20.0	80.0
3	4.00	0.30	10.0	90.0
4	5.00	0.30	95.0	5.0
5	6.00	0.30	95.0	5.0

1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI),正离子扫描,多反应监测(multi-resolution mesh, MRM);毛细管电压 3kV;源温度 105℃;脱溶剂气温度 350℃;

锥孔气流 50L/h;脱溶剂气流速 600L/h;定性离子对、定量离子对,采集时间及碰撞能量见表 2。

表 2 MRM 所用的母/子离子
Table 2 Precursor/daughter ions used in multi-reaction monitoring (MRM)

化合物	定性离子对(m/z)	定量离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/eV
OTA	404.1/239.0		25.0	34.0
	404.1/341.1	404.1/239.0	25.0	27.0
	404.1/358.1		25.0	20.0

1.4 样品前处理方法

1.4.1 咖啡样品^[11]

1.4.1.1 样品提取

称取 25g 磨细的样品,置于搅拌杯中。加入 100mL 甲醇-2% NaHCO₃ 溶液(60:40, V/V),用匀浆机以 6000r/min 搅拌 2min,将提取物 3000r/min 离心 5min。

1.4.1.2 提取物的稀释

移取 1.4.1.1 节制得的上清液 10mL,置于干净的容器中,用 90mL PBS 缓冲液将滤液稀释,混匀,将前一节稀释液通过玻璃纤维过滤器,滤液收集于玻璃注射器筒中。

1.4.1.3 免疫亲和层析柱操作

将前一节 10mL 滤液(10mL 即为 0.25g 样品),以 1~2 滴/s 的流速全部通过 OchraTest 亲和柱,直至空气进入到亲和柱中。将 10mL 真菌毒素清洗液以 1~2 滴/s 的流速全部通过亲和柱。将 10mL 纯水以 1~2 滴/s 的流速通过亲和柱,直到空气进入到亲和柱。用 1.5mL HPLC 级甲醇以 1~2 滴/s 的流速淋洗亲和柱,将所有样品淋洗液(1.5mL)收集于玻璃测试管中。最后注入液相色谱-质谱/质谱检测。

1.4.2 小麦、高粱和饲料样品

1.4.2.1 样品提取

称取 25g 磨细的样品、25g 氯化钠置于烧杯中,加入 100mL 甲醇-水(80:20, V/V)溶液,匀浆机高速匀浆 1min,将提取物倒入槽纹滤纸上,滤液收集于烧杯中。

1.4.2.2 提取物的稀释

移取 10mL 前一节的上清液,置于干净的烧杯中。用 40mL PBS 缓冲液将滤液稀释,混匀。将稀释液通过玻璃微纤维过滤器,滤液收集于烧杯中。

1.4.2.3 免疫亲和层析柱操作

将前一节 10mL 滤液(10mL 即为 0.5g 样品),以 1~2 滴/s 的流速全部通过 OchraTest 亲和柱,直至空气进入到亲和柱中。将 10mL 真菌清洗缓冲液以 1~2 滴/s 的流速全部通过亲和柱。将 10mL 纯水以 1~2 滴/s 的流速

通过亲合柱，直到空气进入到亲和柱。用 1.5mL HPLC 级甲醇以 1~2 滴/s 的流速淋洗亲和柱，将所有样品淋洗液(1.5mL)收集于玻璃测试管中。最后注入 HPLC 检测。

1.4.3 红酒样品

1.4.3.1 样品提取

将酒样于 4℃条件下放置 30min，防止起泡，超声脱气 1 h。

1.4.3.2 提取物的稀释

称取 10.00g 前一节的上清液，置于干净的容器中。用 40mL PBS 缓冲液将滤液稀释，混匀。将稀释液通过玻璃微纤维过滤器，滤液收集于玻璃注射器筒中。

1.4.3.3 免疫亲和层析柱操作

将前一节 10mL 滤液以 1~2 滴/s 的流速全部通过 OchraTest 亲和柱,直至空气进入到亲和柱中。将 10mL 真菌毒素清洗液以 1~2 滴/s 的流速全部通过亲和柱。将 10mL 纯水以 1~2 滴/s 的流速通过亲和柱,直到空气进入到亲和柱。用 1.5mL HPLC 级甲醇以 1~2 滴/s 的流速淋洗亲和柱,将所有样品淋洗液(1.5mL)收集于玻璃测试管中。最后注入 HPLC 检测。

1.5 标准工作曲线的制备

标准样品的配制：分别吸取(5、10、50、100 μL) 100ng/mL 的标准样品配制液定容到1mL(即质量浓度分别为0.5、1、5、10ng/mL)。

加标回收：按样品预处理的方法进行提取和净化后，高效液相色谱-串联质谱进行测定，以质量浓度 X /(ng/mL) 为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标，绘制标准工作曲线。

2 结果与分析

2.1 色谱条件与质谱条件的选择

2.1.1 色谱条件的选择

采用 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1mm × 50mm, 1.8 μm)色谱柱对标准品进行分离, 当流动相为 5mmol/L (含 0.1% 甲酸)乙酸铵溶液 - 甲醇体积配比为 20:80 的时候响应值最好。1ng/mL 的标准品响应值可达到 7010。

2.1.2 质谱条件的选择

根据赭曲霉毒素 A 的分子质量和分子结构^[12-14]，选择电喷雾离子源正离子扫描模式注射进样，对锥孔电压、毛细管电压、源温度、脱溶剂气等条件进行优化，得到 M^+ 为 m/z 404.1 的分子离子峰质量数。当碰撞能量为 34eV 时，碎片离子 m/z 239.0、341.1、358.1 有最强峰度。且 m/z 239.0 有最大峰度，故选择 m/z 239.0 为定量离子。选择 m/z 341.1 和 m/z 358.1 为定性离子。咖啡样品中加标量为 0.50ng/mL 的样品流图见图 1。

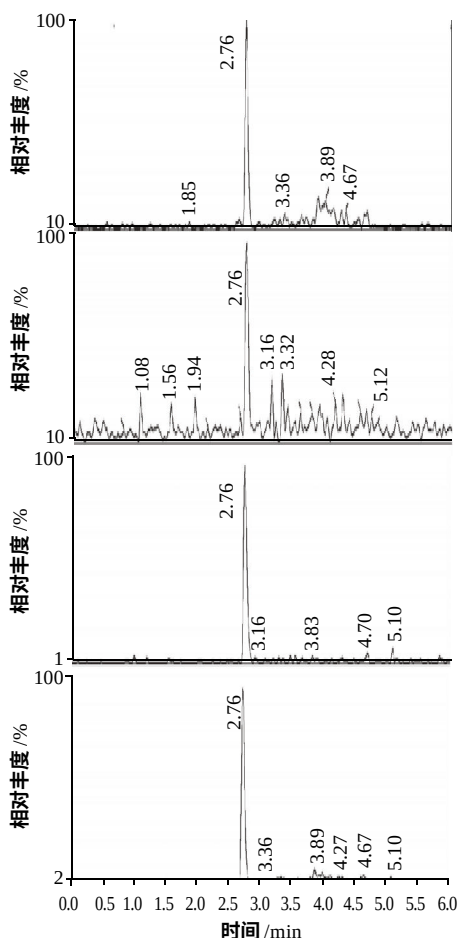


图 1 咖啡样品中 OTA 标准品的选择性离子流图
Fig.1 OTA standard curve

2.2 前处理方法的选择

在实验过程中，萃取溶剂的选择直接影响回收率的高低。为了获得尽可能高的回收率，所以必须选择萃取效率高的溶剂。根据赭曲霉毒素 A 溶解性能，本实验分别选用不同比例的甲醇-水作为萃取溶剂，而赭曲霉毒素 A 在弱碱性条件下，溶解性会更好。实验证明，咖啡样品采用甲醇-2% NaHCO_3 溶液(60:40, V/V)萃取效率为 99%，小麦、高粱和饲料样品采用甲醇-水(80:20, V/V)提取率为 100%，并且杂质干扰小。

采用高速匀质提取、免疫亲和柱净化和 LC-MS/MS 联用方法, 为食品中的 OTA 含量测定提供了一种可靠方法。本实验对多功能净化柱与免疫亲和柱进行比较, 实验证明免疫亲和柱过柱时间短(不需要活化直接进样)、操作简单方便, 对红酒等液体样品和谷物等固体样品均有很好的回收率(表 3), 并且杂质干扰小了很多。

2.3 标准曲线和检出限

准确吸取不同质量浓度的 OTA 标准工作溶液 10 μ L 进行 HPLC-MS/MS 分析, 结果表明 OTA 在 0.5~10 ng/mL 质量浓度范围内具有良好的线性关系, $r = 0.998$ (图 2)。

在定量限(LOQ)附近添加一系列低质量浓度的样品,以信噪比大于等于 $3(R_{SN} \geq 3)$ 的最低质量浓度为最低检测限(LOD),实验得出检出限为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ 。

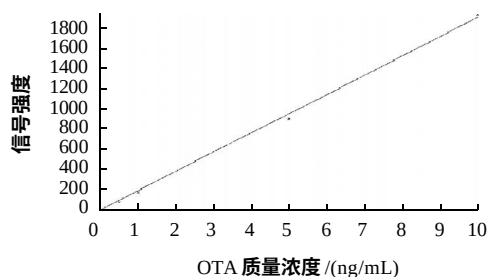


图2 OTA标准溶液通过HPLC-MS/MS分析所得曲线图

Fig.2 Selective ion current chromatogram of coffee spiked with OTA

2.4 回收率及精密度实验

本实验对多种样品进行测定,并做了添加回收实验,并进行了5组平行实验,结果见表3。样品的回收率在82.3%~98.5%之间,且相对标准偏差在6.3%~9.6%之间。

表3 实际样品的测定及添加实验结果($n=5$)

Table 3 Contents and average spike recoveries of OTA in 4 food samples ($n=5$)

样品名称	OTA 实测值/ ($\mu\text{g/kg}$)	添加水平/ ($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%	相对标准偏差/%
咖啡	未检出	5.00	82.3	8.0
小麦、高粱	未检出	2.00	90.7	7.1
饲料	未检出	2.00	85.6	9.6
红葡萄酒	0.10	5.00	98.5	6.3

3 结 论

本实验建立了用HPLC-MS/MS检测多种食品中OTA的方法。目前高速匀质提取、免疫亲和柱净化和HPLC-MS/MS联用方法检测OTA且同一方法检测多种基

质的方法报道较少,本实验建立了咖啡、红酒、粮食和饲料基质的方法。免疫亲和柱净化样品中赭曲霉毒素A,样品前处理简单,免疫亲和层析净化效果好,对待测物的选择性富集使分析方法的检出限主要取决于样品量,对样品组分具有高效保留能力等。本方法的精密度和回收率能满足食品检测的相关法规标准要求。

参考文献:

- [1] 褚庆华,郭德华,王敏,等.谷物和酒类中赭曲霉毒素A的测定[J].中国国境卫生检疫杂志,2006,29(4):109-112.
- [2] 许烨,马荣山,李军.高效液相色谱法测定酒中赭曲霉毒素A[J].酿酒,2006,33(2):40-42.
- [3] VISCONTI A, PASOAL M. Gianluca centonze determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 888(11): 32-326.
- [4] 马莉,李珊,牛凌梅,等.固相萃取-高效液相色谱检测啤酒中赭曲霉毒素A[J].中国卫生检验杂志,2007,17(8):1345-1346.
- [5] 杨家玲,岳田利,高振鹏,等.赭曲霉毒素A检测方法的研究进展[J].农产品加工:学刊,2008,139(6):4-7.
- [6] BOUDRA H, BARS P L, BARS J L. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1156-1158.
- [7] 谈敦芳,康维均,甄国新,等.高效液相色谱法检测谷物中赭曲霉毒素A的方法评价与应用[J].中国卫生检验杂志,2008,18(1):12-13.
- [8] 孙林超.免疫亲和柱-高效液相色谱在白酒赭曲霉毒素A检测中的应用[J].酿酒科技,2009,117(3):113-115.
- [9] 谢春梅,王华.葡萄与葡萄酒中赭曲霉毒素A检测方法研究进展[J].酿酒科技,2007(3):92-95.
- [10] WOOD G M, PATEL S, ENTWISLE A C, et al. Ochratoxin A in wheat: A second intercomparison of procedures[J]. Food Addit Contam, 1996, 50(13): 519-539.
- [11] 陈大义,余蓉. HPLC 法快速检测咖啡及粮食中赭曲霉毒素 A[J]. 卫生研究, 1999, 27(增刊 1): 143-145.
- [12] 樊祥,褚庆华,周瑶,等.多功能柱净化柱-高效液相色谱法检测麦类中赭曲霉毒素 A[J]. 分析试验室, 2007, 26(增刊 1): 284-286.
- [13] ABRUNHOSA L, SERRA R, VENANCIO A. Biodegradation of ochratoxin A by Fungi isolated from grapes[J]. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50(25): 7493-7496.
- [14] 章英,许杨. 谷物类食品中赭曲霉毒素 A 分析方法的研究进展[J]. 食品科学, 2006, 27(12): 767-771.