

超高效液相色谱-串联质谱法测定麦芯粉中四种交链孢毒素

陈蓓, 朱峰, 李放, 刘华良, 吉文亮

(江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009)

摘要:探讨固相萃取方法,超高效液相色谱串联质谱仪(UPLC-MS/MS)测定麦芯粉中4种交链孢毒素。样品经0.05 mol/L NaH₂PO₄ (pH 3.0)-乙腈-甲醇超声提取(450+450+100, V/V),上清液过HLB固相萃取柱净化,以1.0 mmol/L氨水溶液(pH 8.3)-甲醇为流动相,经Waters CORTECS C18 (4.6×100 mm, 2.7 μm)柱分离梯度洗脱,采用电喷雾负离子(ESI⁻)-多反应监测(MRM)模式检测;以基质加标工作曲线定量。细交链孢菌酮酸(TeA)、交链孢酚(AOH)在2.0 μg/L~100 μg/L浓度范围内,腾毒素(TEN)、交链孢酚单甲醚(AME)在0.2 μg/L~10.0 μg/L浓度范围内线性关系良好,相关系数(R²)均大于0.998。回收率为76.3%~107.5%,TeA、AOH检出限和定量限分别为1.0 μg/kg和3.0 μg/kg, TEN、AME检出限和定量限分别为0.1 μg/kg和0.3 μg/kg。该方法灵敏度高,简便,准确。适于测定麦芯粉中的交链孢毒素。

关键词:交链孢毒素;固相萃取;超高效液相色谱串联质谱

文章编号:1673-9078(2017)11-251-256

DOI:10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.11.036

Simultaneous Determination of Four Individual *Alternaria* Toxins by Ultra-high Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry in Flour

CHEN Bei, ZHU Feng, LI Fang, LIU Hua-liang, JI Wen-liang

(Jiangsu Provincial Center for Disease Control and Prevention, Nanjing 210009, China)

Abstract: A sensitive and rapid method based on solid phase extraction (SPE) and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was developed for the determination of four individual *Alternaria* toxins in the wheat flour. The samples were extracted with the mixture of 0.05 mol/L NaH₂PO₄ (pH 3.0)-acetonitrile-methanol (450+450+100, V/V) by ultrasound, and then purified by HLB solid-phase extraction column. The separation used Waters CORTECS C18 (4.6×100 mm, 2.7 μm) column gradient elution with 1.0 mmol/L ammonia solution (pH 8.3) and methanol as the mobile phase. The electrospray negative ion (ESI⁻) and multiple reaction monitoring mode (MRM) pattern were used to detect and the matrix additive standard was used to quantify the *Alternaria* Toxins. The tenuazonic acid (TeA) and alternariol (AOH) in concentration range of 2.0~100 μg/L, as well as tentoxin (TEN) and alternariol methyl ether (AME) in concentration range of 0.2~10.0 μg/L, had a good linear relationship with the correlation coefficient (R²) of > 0.998. The average recovery was 76.3%~107.5%. The detection limit and the quantitative limit of TeA, AOH, TeA and AME were 1.0 μg/kg and 3.0 μg/kg, respectively. The detection limit and the quantitative limit were 0.1 μg/kg and 0.3 μg/kg, respectively. Therefore, the method is suitable for the determination of *Alternaria* toxins in flour.

Key words: *Alternaria* toxins; solid-phase extraction; ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

链格孢霉 (*Alternaria*) 广泛存在于自然界, 是污染水果、蔬菜与田间作物中一种最常见的腐生菌和植物病原菌^[1,2]。因其可在低温潮湿环境下生长繁殖, 由

收稿日期: 2017-06-21

基金项目: 江苏省医学重点学科-流行病学资助项目 (ZDXKA2016008)

作者简介: 陈蓓, 本科, 副主任技师

通讯作者: 朱峰, 硕士, 主管技师, 主要从事食品理化检验研究

此成为果蔬与粮食在冷藏与运输途中霉变腐败的重要微生物。链格孢霉产生 70 余种毒素, 对人畜具有致癌性、致畸性等慢性^[2,3]和急性毒性作用已引起业界的关注。交链孢毒素对人食道上皮的作用机理已有报道, 是我国林县地区食道癌高发的潜在原因之一。AOH 和 AME 是链格孢霉的主要代谢物, 具有一定的致畸性和致癌性, 而且 AOH 和 AME 产生的毒性具有一定的协

同作用。TeA 与其它真菌毒素产生急性毒性作用,1979 年被列入美国国家职业安全与卫生研究所的《有毒化学物质登记册》中。TeA 无诱变性,但它能抑制氨基酸的聚合,阻止蛋白质和 DNA 合成,干扰核糖体释放新的蛋白。还能与其他的交链孢霉毒素具有协同作用,同时存在时可引起急性毒性。

现在食品中交链孢霉毒素国内外尚有限量标准及国家标准检测方法,为了调查食品中生物毒素的污染状况提供检测依据显得尤为迫切。现有的报道^[4]交链孢霉毒素的检测方法有薄层色谱法(TLC)^[5]、气相色谱法(GC)^[6]、气相色谱-质谱法(GC-MS)^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8]、液相色谱串联质谱法(HPLC-MS/MS)^[9,10]、酶联免疫吸附法^[11]等。薄层色谱法 TLC 前处理简单,能同时分离多个样品,但是灵敏度低,操作繁琐,耗费试剂与时间等缺点;GC 需要衍生化处理避免基质干扰,结果重现性差,操作复杂,耗时。液相色谱串联质谱法灵敏度高,简单,快速,重现性好,适用于麦芯粉中交链孢霉毒素的检测。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

麦芯粉来源于市售;标准品:细交链孢菌酮酸(TeA)、交链孢酚(AOH)、赭毒素(TEN)、交链孢酚单甲醚(AME)(均为曼哈格公司);甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);磷酸(H_3PO_4)、无水磷酸二氢钠(NaH_2PO_4)、氨水、冰醋酸(均为分析纯);实验用水均为超纯水。

溶液的配制:0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 3.0):称取 NaH_2PO_4 6.0 g,加水溶解至 950 mL,加入磷酸使溶液调节 pH 为 3.0,加水定容至 1000 mL,混匀。样品萃取液:取 0.05 mol/L NaH_2PO_4 (pH 3.0) 450 mL 与乙腈 450 mL 和 100 mL 甲醇混匀。氨水溶液(1.0 mmol/L, pH 8.3):准确吸取 75 μ L 氨水,加水至 950 mL,用稀醋酸溶液将 pH 调至 8.3,定容至 1000 mL。

超高效液相色谱串联质谱仪(TSQ Quantum Access Max, Thermo Fisher American);固相萃取装置(Supelco);固相萃取柱:Oasis[®] HLB 6 mL(200 mg);

冷冻离心机(SIMGA, 2-16K, Germany);氮吹仪(N-EVAP-12, Organomation, American);涡旋振荡器(Vortex-Genie2, American);pH 计(雷磁 PHSJ-3F)。

1.2 样品处理

1.2.1 样品提取

称取 5.0 g 样品置于 50 mL 刻度离心管中,加 25 mL 样品萃取液 0.05 mol/L NaH_2PO_4 (pH 3.0)-乙腈-甲醇(450+450+100),涡旋 1 min,超声 30 min,于 10000 r/min 低温 4 $^{\circ}C$ 离心 10 min,吸取 5 mL 上清液于另一 50 mL 离心管,加入 15 mL 0.05 mol/L NaH_2PO_4 溶液(pH 3.0),混匀。

1.2.2 样品净化

取 Oasis[®] HLB 6 mL(200 mg)柱依次用 5 mL 甲醇和水活化。将 1.2.1 稀释后的样品提取液全部过柱,加 20%甲醇溶液 5 mL 淋洗,抽干柱子。依次用甲醇和乙腈各 4 mL 洗脱,合并洗脱液,45 $^{\circ}C$ 氮吹至近干,残渣用 10%甲醇溶液 1 mL 复溶,混匀后于 10000 r/min 离心 10 min,上清液供 UPLC-MSMS 分析。

1.3 仪器条件

1.3.1 超高效液相色谱条件

色谱柱 Waters CORTECS C18 (4.6 \times 100 mm, 2.7 μ m);流动相(A)氨水溶液(1.0 mmol/L, pH 8.3)和(B)甲醇;柱温 40 $^{\circ}C$;进样室温度 8 $^{\circ}C$;进样量 10 μ L;采用的梯度洗脱程序见表 1。

表 1 液相色谱流动相的梯度程序

Table 1 The gradient elution program of LC

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
0.0	0.25	90	10
1.0	0.25	90	10
2.0	0.25	25	75
4.0	0.25	10	90
6.0	0.25	10	90
7.0	0.25	90	10
9.0	0.25	90	10

1.3.2 质谱参考条件

表 2 4 种交链孢霉毒素的质谱条件

Table 2 The mass spectrometric conditions for the analysis of the four compounds

目标物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量(eV)
细交链孢菌酮酸(TeA)	5.31	196.0	112.0 139.1*	31 23

转下页

接上页

交链孢酚 (AOH)	6.28	257.0	213.0*	24
			215.0	27
腾毒素 (TEN)	6.61	413.1	141.1	22
			217.0*	17
交链孢酚单甲醚 (AME)	7.34	271.0	254.9	31
			256.0*	23

注: 带*为定量离子。

采用电喷雾离子源, 负离子模式 (ESI-)、多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 扫描分析。辅助气温度 380 °C; 毛细管温度 350 °C; 鞘气流量 13 L/min; 辅助气流量 6 L/min; 喷雾电压-2800 V; 各特征离子及碰撞能见表 2。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件优化

采用蠕动泵直接进样的方式, 将四种目标物质的混合标准溶液以 5 μL/min 的速度注入离子源, 分别在正离子 (ESI+)、负离子 (ESI-) 模式下进行 Q1 母离子全扫描, 实验结果表明, 4 种目标化合物均在 ESI- 模式下具有较高的响应值。分别考察了喷雾电压、鞘气流速、辅气流速、挥发气和毛细管温度对离子强度的影响, 同时利用仪器自动优化每个化合物的碰撞能, 最终选用了 1.3.2 节的质谱条件。

2.2 色谱分离条件的优化

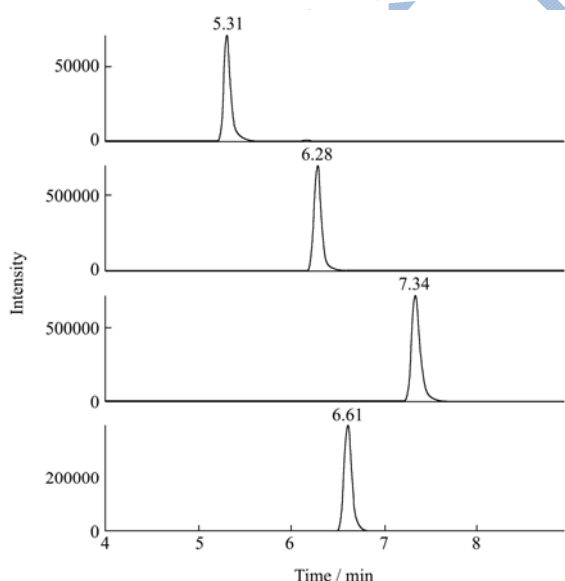


图 1 1 mmol/L 碳酸氢铵 (pH=8.3) - 甲醇

Fig.1 1 mmol/L NH₄HCO₃ (pH=8.3)-CH₃OH

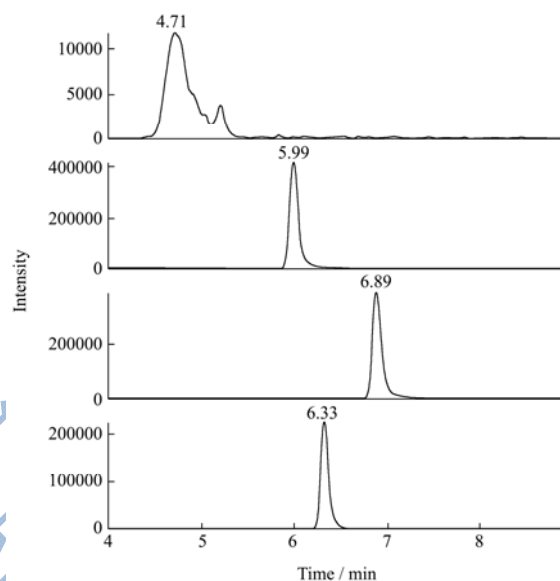


图 2 1 mmol/L 碳酸氢铵 (pH=8.3) - 甲醇-乙腈 (4+6, V/V)

Fig.2 1 mmol/L NH₄HCO₃ (pH=8.3)-CH₃OH-CH₃CN (4+6, V/V)

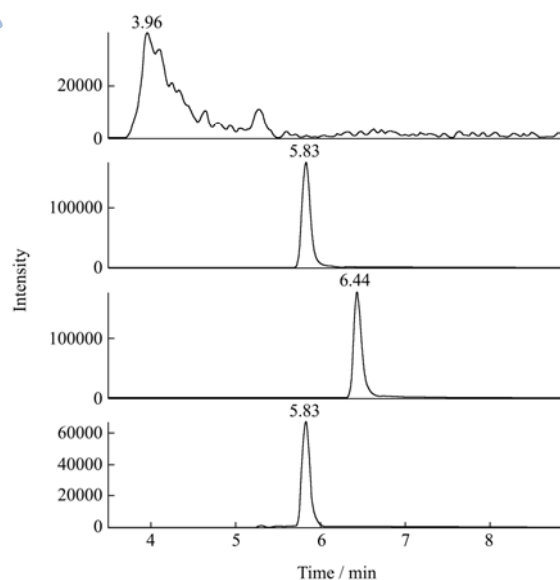


图 3 1 mmol/L 碳酸氢铵 (pH=8.3) - 乙腈

Fig.3 1 mmol/L NH₄HCO₃ (pH=8.3)-CH₃CN

为了考察目标物质的灵敏度以及分离度, 首先以 1 mmol/L 碳酸氢铵 (pH=8.3) 作为水相 (流动相 A 相),

分别比较了甲醇、甲醇-乙腈 (4:6, V/V)、乙腈作为有机相 (流动相 B 相) 对目标物质的响应和色谱峰形的影响, 发现使用甲醇作为流动相时各物质的响应及峰形较好, 甲醇-乙腈 (4:6, V/V) 以及乙腈使 TeA 的峰形变差 (如图 1~3 所示)。

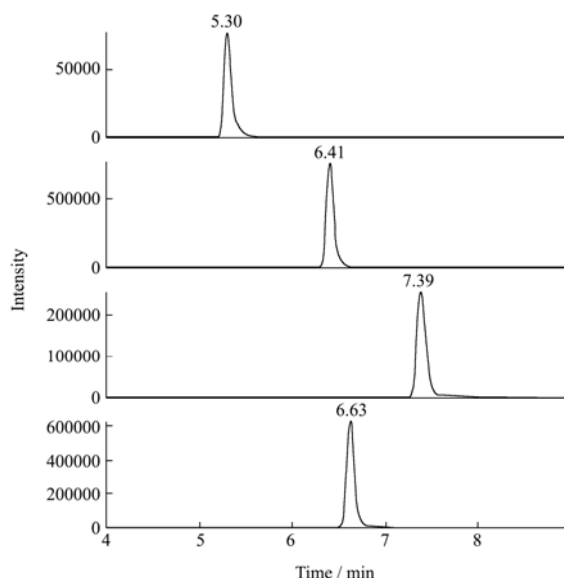


图 4 1 mmol/L 氨水 (pH=8.3) - 甲醇

Fig.4 1 mmol/L NH₃·H₂O (pH=8.3)-CH₃OH

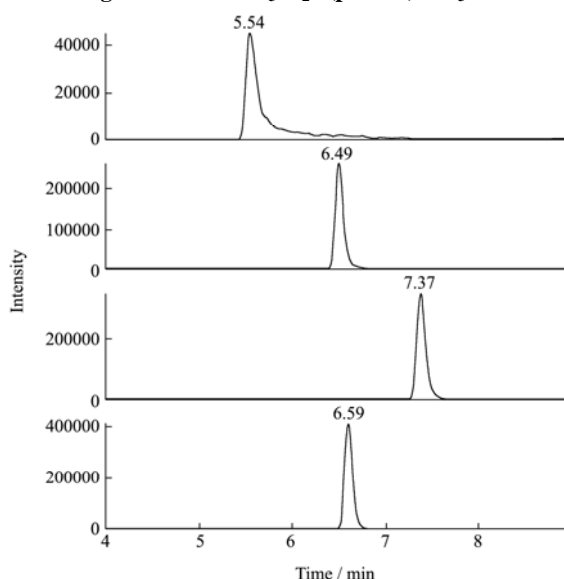


图 5 1 mmol/L 醋酸铵 (pH=7.0) - 甲醇

Fig.5 1 mmol/L CH₃COONH₄ (pH=7.0)-CH₃OH

进一步以甲醇作为有机相 (流动相 B 相), 分别比较了 1 mmol/L 碳酸氢铵溶液 (pH=8.3)、1 mmol/L 氨水溶液 (用醋酸调 pH 至 8.3)、1 mmol/L 醋酸铵溶液 (pH=7.0) 作为水相 (流动相 A 相) 对目标物质的响应及色谱峰形的影响, 发现使用醋酸铵时, TeA 的色谱峰有拖尾, 并且各物质响应较低, 使用 1 mmol/L 的氨水时各物质的响应最高 (除 AME 外)、峰形较好 (如图 4~5 所示)。

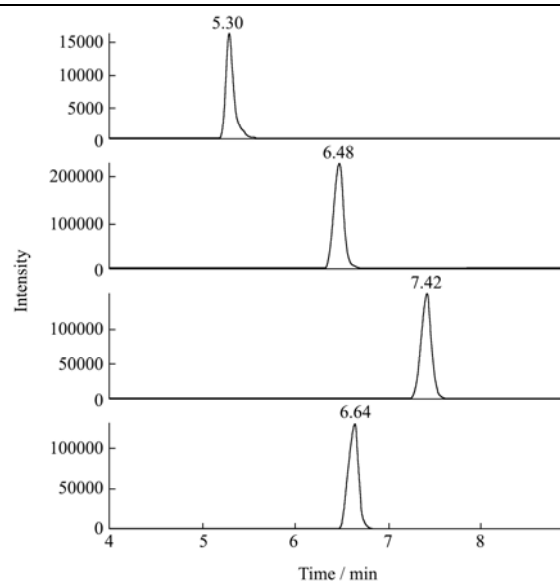


图 6 1 mmol/L 氨水 (pH=7.3) - 甲醇

Fig.6 1 mmol/L NH₃·H₂O (pH=7.3)-CH₃OH

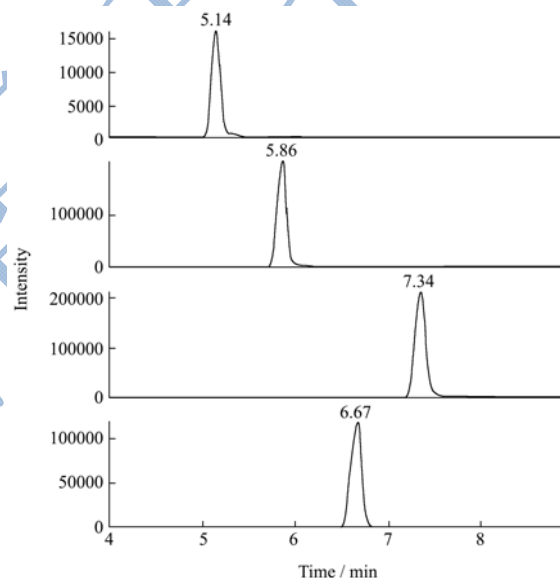


图 7 1 mmol/L 氨水 (pH=9.3) - 甲醇

Fig.7 1 mmol/L NH₃·H₂O (pH=9.3)-CH₃OH

通常情况下碱性能增强负离子的响应强度, 因此以甲醇作为有机相 (流动相 B 相), 分别比较了 pH 为 7.3、8.3 和 9.3 的氨水 (1 mmol/L, pH 值用醋酸调节) 对目标物质的响应强度的影响, 结果表明, 使用 pH=8.3, 1 mmol/L 的氨水时各物质响应最高 (如图 4、6 和 7 所示), 综上所述, 最终选用了 pH=8.3, 1 mmol/L 氨水-甲醇作为流动相。

2.3 萃取条件的选择

2.3.1 固相萃取柱的选择

用 Oasis[®]PRiME HLB 6 mL (200 mg) 柱和 Oasis[®] HLB 6 mL (200 mg) 柱进行萃取效率比较, 发现 Oasis[®] HLB 6 mL (200 mg) 的萃取率更优, 因此本实验选用

Oasis® HLB 6 mL(200 mg)为固相萃取小柱。

2.3.2 洗脱溶剂的选择

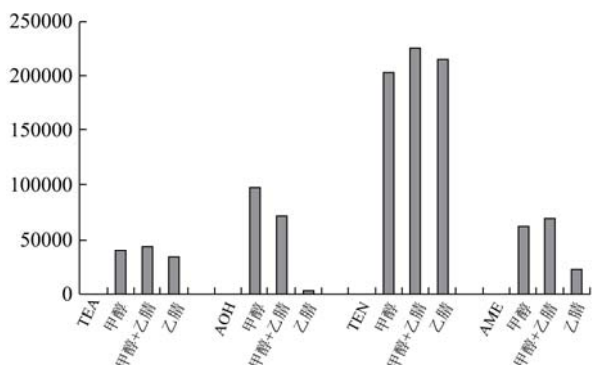


图8 三种洗脱液的萃取率比较

Fig.8 Extraction rates of three kinds of eluate

为优化萃取的实验条件，以添加质量浓度为 20 μg/kg 时，比较了甲醇、乙腈、甲醇+乙腈对 4 种化合物洗脱效率的影响，见图 8 结果表明：使用甲醇作为洗脱液时，AOH 的洗脱效率最高；甲醇+乙腈作为洗脱液时，TEA、TEN 和 AME 的洗脱效率均高；综合

考虑后运用甲醇+乙腈混合洗脱。

2.3.3 pH 值对于回收率的影响

利用磷酸盐缓冲液和直接调节 pH 值至 3.0 的结果比较，发现使用磷酸盐缓冲液回收率结果偏高。

2.4 线性范围与检出限、定量限

基质加标工作曲线的绘制：分别称取 6 份空白样品，按 1.2.1 样品提取和 1.2.2 样品净化过程至样品近干后，准确加入标准混合溶液，用 10% 甲醇配制基质加标工作曲线。其中 TEA 和 AOH 的浓度为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/L；TEN 和 AME 的浓度为 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 μg/L。分别以浓度为横坐标，以定量离子的峰面积为纵坐标绘制基质标准工作曲线。按 S/N=3 得到方法检出限分别为 TEA 和 AOH 1.0 μg/kg，TEN 和 AME 0.1 μg/kg；S/N=10 定量限分别为 TEA 和 AOH 3.0 μg/kg，TEN 和 AME 0.3 μg/kg。线性关系良好，见表 3。

表 3 方法线性范围、相关系数与检出限

Table 3 Linear range, correlation coefficient and detection limit

化合物	标准曲线	相关系数	线性范围/(μg/L)	检出限/(μg/kg)
TeA	Y=2684.93X-2515.7	R ² =0.9994	2.0~50.0	1.0
AOH	Y=15610.2X-20915.0	R ² =0.9994	2.0~50.0	1.0
AME	Y=6893.7X-12528.4	R ² =0.9988	0.2~5.0	0.1
TEN	Y=6447.15X+53850.3	R ² =0.9981	0.2~5.0	0.1

2.5 回收率与精密度

表 4 回收率和精密度

Table 4 Recovery and precision

化合物	添加量/(μg/kg)	回收率/%	RSD % (n=6)
TeA	10	85.3~93.0	4.7
	50	79.0~92.3	7.8
AOH	10	76.3~91.4	9.5
	50	77.6~91.9	9.0
AME	10	84.4~103.4	10.4
	50	86.8~107.5	10.7
TEN	10	88.7~101.9	7.4
	50	82.5~102.3	10.9

在空白麦芯粉样品中添加标样溶液，质量浓度分别为 10、50 μg/kg，按 1.2 样品处理方法进行前处理和色谱分析，采用基质加标工作曲线计算定量。回收率和相对标准偏差 (n=6) 均能满足样品分析要求。

2.6 样品测定

对江苏省内的综超与农贸市场等流通环节在售麦芯粉作为检测对象，采集了 12 个市 105 份的麦芯粉制品。结果表明四种毒素均能检出，TeA 污染水平范围为 5.94~173.5 μg/kg，AOH 污染水平范围为 1.43~4.73 μg/kg，TEN 污染水平范围为 1.36~15.5 μg/kg，AME 污染水平范围为 0~8.2 μg/kg。与国内外的其他检测结果比较，2016 年江苏省内阴雨连绵而交链孢毒素的结果低于闫璐等报道^[12]。分析原因虽然省内粮食生长周期中的扬花抽穗时湿度可能较大，但是常年气温适宜，且日照时间充足有关。

3 结论

建立了麦芯粉中四种交链孢毒素的液相色谱-串联质谱分析方法。对比了萃取方法，将色谱分离条件进行了优化。为了改善基质效应的影响，运用基质加

标工作曲线定量。目前我国尚缺系统的食品中交链孢毒素污染水平的资料, 首先应建立准确的检测方法, 结合膳食消费量进行评估居民的该毒素膳食暴露风险。

参考文献

- [1] 李凤琴. 链格孢毒素及其食品卫生问题[J]. 中国食品卫生杂志, 2001, 13(6): 45-49
LI Feng-qin. The problem of *Alternaria* toxins and its food hygiene [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2001, 13(6): 45-49
- [2] Davide Arcella, Mari Eskola, Jose Angel Gómez Ruiz, et al. Dietary exposure assessment to *Alternaria* toxins in the European population [J]. Efsa. J., 2016, 14(12): 4654
- [3] 张鹏, 刘桂亭. 交链孢霉代谢产物的致畸致突变致癌作用[J]. 微生物学杂志, 1989, 9(2): 49-51
ZHANG Peng, LIU Gui-ting. The carcinogenic teratogenic mutation of *Alternaria* metabolites [J]. Journal of Microbiology and Immunology, 1989, 9(2): 49-51
- [4] 满燕, 梁刚, 李安, 等. 链格孢霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 453-458
MAN Yan, LIANG Gang, LI An, et al. Advances in the detection methods of *Alternaria* toxins [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(2): 453-458
- [5] 裴留成, 苗健, 郑香梅, 等. 互隔交链孢霉毒素 AME, AOH 天然品、人工合成品 TLC 鉴定[J]. 河南肿瘤学杂志, 1991, 4(4): 16-17
PEI Liu-cheng, MIAO Jian, ZHENG Xiang-mei, et al. The TLC identify *Alternaria alternata* toxin AME, AOH natural products, synthetic products [J]. Henan Journal of Oncology, 1991, 4(4): 16-17
- [6] Harvan D J, Pero R W. Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid [J]. J Chromatogr A, 1974, 101(1): 222-224
- [7] Scott P M, Weber D, Kanhere S R. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins [J]. J Chromatogr A, 1997, 765(2): 255-263
- [8] 魏冉, 王玲, 陈世国, 等. 利用 HPLC 法测定链格孢菌培养液中细交链孢菌酮酸的含量[J]. 江苏农业科学, 2009, 6: 413-415
WEI Ran, WANG Ling, CHEN Shi-guo, et al. HPLC determination of the content of *Alternaria* acid in *Alternaria* sp [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2009, 6: 413-415
- [9] 李碧芳, 郑彦婕, 陈素娟. 粮油制品中交链孢霉毒素的测定[J]. 广东化工, 2010, 5(37): 220-227
LI Bi-Fang, ZHENG Yan-jie, CHEN Su-juan, et al. Determination of *Alternaria* mycotoxins in grain and oil products [J]. Guangdong Chemical Industry, 2010, 5(37): 220-227
- [10] 罗毅, 刘锋, 冯建林, 等. 高效液相色谱和高效液相色谱-质谱法测定粮食中互隔交链孢霉醇、互隔交链孢霉醇单甲醚及玉米赤霉烯酮[J]. 色谱, 1994, 5(12): 342-347
LUO Yi, LIU Feng, FENG Jian-lin, et al. HPLC and HPLC-MASS determination of *Alternaria alternata* alcohol, glycol monomethyl ether and zearalenone in grain [J]. Chinese Journal of Chromatography, 1994, 5(12): 342-347
- [11] 杨星星, 刘细霞, 王弘, 等. 细交链孢菌酮酸酶联免疫吸附分析研究方法研究[J]. 色谱, 2012, 9(40): 1347-1352
YANG Xing-xing, LIU Xi-xia, WANG Hong, et al. Study on ELISA analysis tenuazonic acid [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2012, 9(40): 1347-1352
- [12] 闫璐, 高贵田, 哈益明, 等. 谷物中链格孢毒素的研究进展[J]. 核农学报, 2017, 31(2): 334-341
YAN Lu, GAO Gui-tian, HA Yi-ming, et al. Advances in the study of *Alternaria* in cereals [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2017, 31(2): 334-0341