

孙 月, 赵晋铭, 贾雯晴, 等. 固相萃取-高效液相色谱串联质谱法检测粮食中赭曲霉毒素 A[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(6): 1416-1420.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.06.034

固相萃取-高效液相色谱串联质谱法检测粮食中赭曲霉毒素 A

孙 月¹, 赵晋铭², 贾雯晴³, 田中伟⁴, 董 飞⁵

(1. 南京农业大学国家肉品质量安全控制工程技术研究中心, 江苏 南京 210095; 2. 南京农业大学国家大豆改良中心/作物遗传与种质创新国家重点实验室/南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095; 3. 南京农业大学科学研究院, 江苏 南京 210095; 4. 南京农业大学农学院/农业部作物生理生态与生产管理重点实验室, 江苏 南京 210095; 5. 江苏省农业科学院食品质量安全与检测研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了测定多种粮食样品中的赭曲霉毒素 A(Ochratoxins A, OTA), 建立了一种固相萃取-高效液相色谱串联质谱的检测方法。小麦、玉米、大豆和大米样品经乙腈-水(体积比 80:20)提取后, 采用氨基固相萃取柱进行富集和洗脱, 高效液相色谱串联质谱法进行检测。结果表明, 不同粮食中赭曲霉毒素 A 在 0.5 ~ 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 线性关系良好, 相关系数(r)为 0.999, 定量限和检出限分别为 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 日内和日间精密度的相对标准偏差(RSD)分别为 1.71% ~ 3.53% 和 0.69% ~ 1.58%, 重复性的相对标准偏差为 3.72% ~ 5.56%, 加标回收率为 83.2% ~ 98.6%, 相对标准偏差为 2.26% ~ 6.25%。

关键词: 固相萃取; 高效液相色谱串联质谱法; 赭曲霉毒素 A; 粮食

中图分类号: TS207.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)06-1416-05

Application of solid-phase extraction to determination of ochratoxin A in grains by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SUN Yue¹, ZHAO Jin-ming², JIA Wen-qing³, TIAN Zhong-wei⁴, DONG Fei⁵

(1. Key Laboratory of National Meat Quality and Safety Control Engineering Research Center, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. National Center of Soybean Improvement/State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. The Academy of Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 4. Agronomy College of Nanjing Agricultural University/Key Laboratory of Crop Physiology Ecology and Production Management of Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China; 5. Institute of Food Quality and Safety, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to determine the ochratoxin A (OTA) in different grains, a method was developed for the determination of OTA in wheat, corn, soybean, and rice by solid-phase extraction (SPE)-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). After extracted by acetonitrile-water (80:20, V/V) and purified with NH_2 -SPE column, OTA was detected by HPLC-MS/MS. The results showed that the linear correlation coefficient (r) was

greater than 0.999 in the range of 0.5-10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limits of quantitation (LOQ) and detection (LOD) were 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the relative standard deviation (RSD) of repeatability was ranged from 3.72% to 5.56%. The RSD of intra-day and inter-day precision were ranged from 1.71% to 3.53% and 0.69% to 1.58%, respectively. At different spiked

收稿日期: 2016-08-30

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(KJQN201632、KJSY201618)

作者简介: 孙 月(1989-), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事农产品质量安全分析检测研究。(Tel) 010-59199383; (E-mail) sunyuenjau@163.com

levels, the recoveries were ranged from 83.2% to 98.6%, and the RSD was ranged from 2.26% to 6.25%.

Key words: solid-phase extraction; HPLC-MS/MS; ochratoxin A; grain

赭曲霉毒素(Ochratoxins)是由曲霉属和青霉属等部分产毒菌株产生的一组结构类似的有毒代谢物质。赭曲霉毒素包括7种结构类似的化合物,其中以赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OTA)毒性最强,分布最广,各种谷物和豆类受赭曲霉毒素A污染较为严重^[1-2]。赭曲霉毒素A可溶于极性有机溶剂和稀碳酸氢钠溶液,微溶于水,赭曲霉毒素A的化学名称为7-(*L*-β-苯基丙氨基-羰基)-羧基-5-氯代-8-羟基-3,4-二氢化-3R-甲基异氧杂奈邻酮(香豆素),分子式为 $C_{20}H_{18}ClNO_6$,化学结构中含有一个羧基基团。动物毒性试验结果表明,赭曲霉毒素A具有免疫抑制毒性、神经毒性、致畸性及致癌性^[3]。1993年,国际癌症研究中心已将赭曲霉毒素A列为可能的人类致癌物^[4]。世界各国均重视对赭曲霉毒素A的检测和控制,制定了相关的限量标准。中国在2011年最新颁布的国家食品安全标准《食品中真菌毒素限量》规定了谷物及其制品中赭曲霉毒素A的最高限量值为5 μg/kg^[5]。

目前,国内外对于粮食中赭曲霉毒素A检测的前处理方法主要是免疫亲和层析柱法^[6-12]、多功能净化柱法^[13-14]和固相萃取法^[3, 8, 15]。免疫亲和层析柱法因其选择性高,特异性强,样品回收率较高,准确度高,已被国内外列为标准赭曲霉毒素A检测净化技术^[16],但缺点是成本高。目前国内尚无针对粮食中赭曲霉毒素A的多功能净化柱,需依赖进口,价格较为昂贵。固相萃取法是一种相对廉价而有效的方法,目前国内外也有将其纳入检测标准技术的例子^[17-18],但大多存在着前处理复杂,能处理的粮食种类有限等问题。因此迫切需要建立一种适用于多种粮食、灵敏、简单和成本低廉的检测方法。本研究根据赭曲霉毒素A化学结构,采用氨基固相萃取柱富集净化,优化洗脱试剂组成,改进流动相组成并利用高效液相色谱串联质谱法进行分析,以期建立一种可用于小麦、玉米、大豆和大米等大量粮食样品中赭曲霉毒素A的定量检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

主要仪器有高效液相色谱 LC20A(日本岛津公司产品)、质谱 AB6500(美国 AB 公司产品)、氨基固

相萃取柱(500 mg, 6 ml, 上海安谱公司产品)、0.22 μm 有机滤膜(天津津腾公司产品)、固相萃取仪 Visiprep 24™ DL(美国 Supelco 公司产品)、电子天平 YP30002(上海佑科仪器公司产品)、电子天平 BT125D(德国 Sartorius 公司产品)、离心机 5810R(德国 Eppendorf 公司产品)、氮吹仪 N-WVAP™ 112(美国 Organomation 公司产品)。

赭曲霉毒素A标准品,纯度≥99%,Romer 国际贸易(北京)有限公司产品;乙腈,分析醇,天津科密欧化学试剂有限公司产品;甲醇,色谱纯,德国 Merck 公司产品;甲酸,色谱纯,上海安谱公司产品;乙酸铵,色谱纯,美国 Tedia 公司产品;实验用水为 Milli-Q 超纯水,美国 Millipore 公司生产。

1.2 液相色谱条件

色谱柱为 Waters Atlantis® T-3 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)。流动相:A 为水(含 0.1% 甲酸和 5 mmol/L 乙酸铵),B 为甲醇。采用线性梯度洗脱,0~3 min,流动相中水相(A)比例由 90% 下降到 10%;3~5 min,保持流动相中水相(A)比例为 10%;5~7 min,流动相中水相(A)比例由 10% 上升至 90%;7~10 min,保持流动相中水相(A)比例为 90%。单次样品运行时间总共为 10 min。

1.3 质谱条件

离子化模式为电喷雾电离正离子模式(ESI⁺),多反应监测(MRM),离子源温度 500 ℃,驻留时间 100 ms,雾化气压 34.5 kPa,辅助气压 34.5 kPa,喷雾电压 5 500 V,碰撞室射出电压 6 V。赭曲霉毒素A的质谱参数见表 1。

表 1 赭曲霉毒素A质谱条件参数

Table 1 HPLC-MS/MS parameters for OTA

化合物	保留时间 (min)	母离子质荷比 (<i>m/z</i>)	特征离子质荷比 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 (eV)
OTA	3.37	404	358.0*, 239.0	32, 20

* 定量离子。

1.4 样品提取与净化

将粮食(小麦、玉米、大豆、大米)样品用粉碎机粉碎至完全通过 0.5 mm 筛。准确称取 5.0 g 样品于 50 ml 具塞三角瓶中,准确量取并加入 25 ml 乙腈-水(体积比 80:20),置于摇床中 180 r/min 振荡

30 min, 静置 5 min 后, 2 500 r/min 离心 5 min, 取上清, 待净化。

将氨基固相萃取柱连接在固相萃取仪上, 分别取 5 ml 甲醇和甲醇-水(体积比 25 : 75)活化。准确移取 5 ml 待净化的离心上清加入柱中, 使上清液以约 1 s 1 滴的流速通过氨基固相萃取柱, 弃过柱液, 分别取 5 ml 甲醇-水(体积比 25 : 75)和甲醇过柱淋洗, 弃淋洗液。

准确量取 10 ml 乙腈-甲酸(体积比 85 : 15)加入固相萃取柱, 洗脱富集在固相萃取柱上的赭曲霉毒素 A, 流速约为 1 s 1 滴, 收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中, 氮气吹干, 残留物加入 1 ml 流动相溶液, 于漩涡混合器上振荡 1 min, 过 0.22 μm 有机滤膜, 供 HPLC-MS/MS 检测。

1.5 基质标准曲线的建立

按 GB/T 25220-2010^[19] 的方法对从市场购买的小麦、玉米、大米和大豆样品进行检测, 取未检出赭曲霉毒素 A 的 4 种粮食用粉碎机粉碎至完全通过 0.5 mm 筛。分别称取 5.0 g 未检出赭曲霉毒素 A 的空白粮食样品, 分别加入 50 ml 具塞三角瓶中, 采用方法 1.4 提取净化, 将赭曲霉毒素 A 标准品用上述空白基质稀释, 分别标定为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准工作液。

1.6 方法的精密度、重复性与回收率测定

采用本研究建立的方法对添加赭曲霉毒素 A 的粮食样品进行检测, 测定方法的精密度、重复性与回收率。日内精密度测定: 添加赭曲霉毒素 A 使其终浓度为 1 $\mu\text{g/kg}$, 对添加后的 4 种粮食样品进行提取与净化, 1 d 内连续检测 6 次, 计算日内精密度; 日间精密度测定: 添加赭曲霉毒素 A 使其终浓度为 1 $\mu\text{g/kg}$, 提取净化后连续检测 3 d; 重复性测定: 添加赭曲霉毒素 A 使其终浓度为 1 $\mu\text{g/kg}$, 重复提取、净化、检测 6 次; 回收率测定: 分别在 4 种粮食中添加赭曲霉毒素 A 使其浓度达到 1 $\mu\text{g/kg}$ 、2 $\mu\text{g/kg}$ 、5 $\mu\text{g/kg}$, 每个添加浓度重复 3 次, 测定该方法的回收率和相对标准偏差(RSD)。

2 结果与分析

2.1 液相色谱流动相的选择

由于赭曲霉毒素 A 在 ESI^+ 条件下产生的是 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子, 酸性环境的流动相可明显改善谱峰形状, 乙酸铵可提高谱峰强度^[20]。本研究以水(含 0.1% 甲

酸和 5 mmol/L 乙酸铵)和甲醇为液相色谱流动相, 赭曲霉毒素 A 的峰形对称且灵敏度高(图 1)。

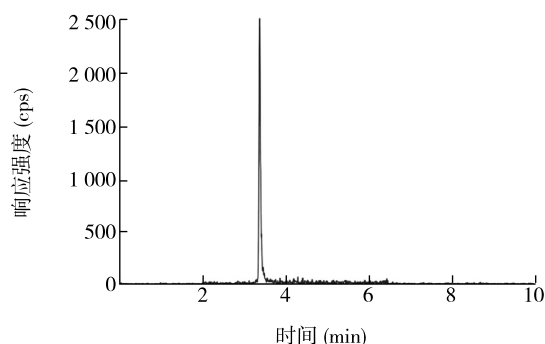


图 1 赭曲霉毒素 A (OTA) 的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatogram of ochratoxin A (OTA)

2.2 方法的线性范围与灵敏度

取未检出赭曲霉毒素 A 的空白粮食样品进行提取净化, 将赭曲霉毒素 A 标准品用空白基质稀释, 分别标定为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、2.0 $\mu\text{g/L}$ 、5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列标准溶液。以赭曲霉毒素 A 浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)作线性回归方程, 根据 3 倍信噪比的峰响应值得到方法的检出限, 根据 10 倍信噪比的峰响应值得到线性范围的下限。结果显示, 线性范围为 0.5 ~ 10.0 $\mu\text{g/kg}$, 相关系数(r)为 0.999, 检出限(LOD)为 0.25 $\mu\text{g/kg}$, 定量限(LOQ)为 0.50 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.3 优化的赭曲霉毒素 A 洗脱条件

采用静态洗脱的方式, 比较不同体积比的乙腈-甲酸对富集赭曲霉毒素 A 的洗脱效果。结果显示, 随着洗脱试剂中甲酸比例增高, 洗脱效率随之增高, 乙腈-甲酸体积比为 85 : 15 时, 小麦、玉米、大米和大豆中的洗脱效率均在 80% 以上。但是, 当乙腈-甲酸体积比为 80 : 20 时, 小麦和玉米中的洗脱效率仅分别上升了 0.4% 和 0.2%, 而大米和大豆样品的洗脱效率分别下降了 3.0% 和 1.7%。因此, 本方法选择体积比为 85 : 15 的乙腈-甲酸作为洗脱试剂。

2.4 方法的精密度、重复性与回收率

采用本方法对小麦、玉米、大米和大豆样品中添加的 OTA 进行检测, 结果表明, 日内和日间精密度相对标准偏差分别为 1.71% ~ 3.53% 和 0.69% ~ 1.58%, 重复性相对标准偏差为 3.72% ~ 5.56%, 加标回收率为 83.2% ~ 98.6%, 相对标准偏差(RSD)2.26% ~ 6.25% (表 2)。

表 2 不同 OTA 添加水平的添加回收率

Table 2 Recoveries of spiked samples with different OTA concentrations

样品	添加量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD)(%)
小麦	1	98.6	6.25
	2	91.4	4.87
	5	93.6	2.56
玉米	1	90.1	5.23
	2	86.8	3.98
	5	88.5	4.11
大米	1	93.2	4.71
	2	87.2	3.45
	5	91.6	2.26
大豆	1	89.6	5.42
	2	83.2	3.87
	5	87.1	3.20

表 3 本方法与文献报道方法检测结果的比较

Table 3 Comparison of detection results obtained by this method and literature methods

样 品	前处理方法	定量限($\mu\text{g/kg}$)	回收率(%)	参考文献
玉米	免疫亲和柱	0.25	75.9 ~ 105.7	[6]
小麦粉	免疫亲和柱	0.50	86.1 ~ 95.7	[9]
麦类	多功能净化柱	1.00	60.0 ~ 85.0	[13]
面粉	SPE-SAX 固相萃取	5.00	93.7	[15]
小麦、大米	SPE-C ₁₈ 固相萃取	2.00	81.5 ~ 97.6	[8]
小麦、玉米、大米和大豆	SPE-NH ₂ 固相萃取	0.50	83.2 ~ 98.6	本方法

3 讨 论

赭曲霉毒素 A 具有极大危害性且广泛分布,对人类健康、食品安全和国际贸易产生了严重的影响。世界各国纷纷制定了赭曲霉毒素 A 的检测标准和在食品、饲料等中的限量标准。中国在赭曲霉毒素 A 检测方面的研究相对落后,虽然已经制定了高效液相色谱和荧光光度法以及高效液相色谱-串联质谱法等^[19,21-23],但大多采用免疫亲和层析柱法,该方法在样品前处理过程中净化时间长,成本较高,无法满足基层实验室对大量样品的检测需要。目前,国内尚未制定利用固相萃取结合高效液相色谱串联质谱方法检测多种谷物中赭曲霉毒素 A 的国家标准。

本研究用乙腈:水(体积比 80:20)作为提取剂,离心取上清,经氨基固相萃取柱富集,以乙腈-甲

2.5 不同前处理方法的比较

目前应用于粮食中赭曲霉毒素 A 检测的前处理方法主要有免疫亲和层析柱法、多功能净化柱法和固相萃取法等(表 3)。比较这些方法后发现,本方法在粮食中的加标回收率为 83.2% ~ 98.6%,回收率相对较高;本方法的定量限为 0.5 $\mu\text{g/kg}$,低于多功能净化柱和其他固相萃取柱,与采用免疫亲和层析柱测定小麦粉中赭曲霉毒素 A 的定量限一致,仅低于采用免疫亲和层析柱测定玉米中赭曲霉毒素 A 的定量限(0.25 $\mu\text{g/kg}$)。本方法的检测灵敏度较高,采用的氨基固相萃取柱价格远低于免疫亲和层析柱和多功能净化柱,适用于大量粮食样品中赭曲霉毒素 A 的定量分析。

酸(体积比 85:15)洗脱,经高效液相色谱串联质谱法对来自不同地区的 40 份粮食样品(小麦、玉米、大米和大豆样品各 10 份)进行了测定,仅在 1 份玉米样品中检测出赭曲霉毒素 A,含量为 5.01 $\mu\text{g/kg}$ 。应用结果表明,本方法前处理简单,重复性好,回收率高,灵敏度高,成本低,适用于大量粮食样品中赭曲霉毒素 A 的定量分析。

参考文献:

- [1] 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,2008(6): 4-7.
- [2] 杨延友,高文花,温红玲,等. 济南市售小米和玉米中赭曲霉毒素 A 污染状况研究[J]. 山东大学学报,2010, 48(11): 125-128.
- [3] 谈敦芳,康维钧,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[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(1):

- 12-13.
- [4] MEDINA A, MATEO R, LÓPEZ-OCAÑA L, et al. Study of panish grape mycobiota and ochratoxin A production by Isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section Nigri [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(8): 4696-4702.
- [5] 卫生部, 国家标准化管理委员会. 食品安全国家标准——食品中真菌毒素限量: GB 2761-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [6] 文虹, 文辉, 徐田放. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定饲料及饲料原料中赭曲霉毒素A的研究 [J]. *饲料工业*, 2012, 33(3): 45-47.
- [7] 李军, 于一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A [J]. *色谱*, 2006, 24(6): 581-584.
- [8] 谢妮, 徐强, 吕相征, 等. 高效液相色谱法检测小麦、大米中赭曲霉毒素A [J]. *国公共卫生*, 2003, 19(2): 210-211.
- [9] 李卫丽. 高效液相色谱法测定小麦粉中的赭曲霉毒素 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2009, 19(5): 1154.
- [10] GAMZE N K, FATIH O, BULENT K. Co-occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in cereal flours commercialised in Turkey [J]. *Food Control*, 2015, 54: 275-281.
- [11] 赵孔祥, 葛宝坤, 陈旭艳, 等. 在线免疫亲和净化-液相色谱-串联质谱快速测定中草药及中成药中10种真菌毒素 [J]. *分析化学*, 2011, 39(9): 1341-1346.
- [12] ARNAU V, SONIA M, ANTONIO J R, et al. Determination of aflatoxins, deoxynivalenol, ochratoxin A and zearalenone in wheat and oat based bran supplements sold in the Spanish market [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 53: 133-138.
- [13] 樊祥, 褚庆华, 周瑶, 等. 多功能净化-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): 284-286.
- [14] 朱孟丽. 高效液相色谱法对饲料中赭曲霉毒素的测定 [J]. *广东饲料*, 2005, 14(3): 41-42.
- [15] 王峰, 仓以鹏, 蔡晶, 等. 高效液相色谱-三重四级杆质谱法测定面粉中17种真菌毒素 [J]. *食品科技*, 2014, 29(11): 331-335.
- [16] Foodstuffs-determination of ochratoxin A in barley and roasted coffee HPLC method with immunoaffinity column clean-up: EN 14132 [S].
- [17] Foodstuffs-determination of ochratoxin A in cereals and cereal products-part1: High performance liquid chromatographic method with silica gel clean up: ISO 15141-1 [S].
- [18] 李尧, 张雪梅, 党献民, 等. 基质分散故乡萃取精华液相色谱检测谷物中赭曲霉毒素A [J]. *粮食与饲料工业*, 2012, 31(24): 432-435.
- [19] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 粮油检测: 粮食中赭曲霉毒素A的测定(高效液相色谱法和荧光光度法): GB/T 25220-2010 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [20] 史娜, 路勇, 吴颖, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测食品中的赭曲霉毒素A [J]. *食品科学*, 2011, 32(18): 260-263.
- [21] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进口大豆、油菜籽和食用植物油中赭曲霉毒素A的检测方法: SN/T 1746-2006 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 进出口食品中赭曲霉毒素A的测定方法: SN/T 1940-2007 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [23] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口花生、谷物及其制品中黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素、HT-2毒素的测定: SN/T 3136-2007 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.

(责任编辑: 张震林)