

# 使用液相色谱/紧凑型质谱仪（LC/CMS） 快速测定玉米粉中黄曲霉毒素



## 介绍

黄曲霉、寄生曲霉以及其他一些真菌都会产生黄曲霉毒素（B1, B2, G1, G2）。这是一种有毒的代谢物，会引发各种疾病，例如在世界各地牲畜、家畜和人类身上发生的黄曲霉毒素中毒<sup>[1,2,3]</sup>。国际癌症研究机构（IARC）也将它们归为第1类致癌物质<sup>[4]</sup>。快速、准确地检测出食物中的黄曲霉毒素对人类健康至关重要。而人类食品中黄曲霉毒素的检出限至少应达到20 ppb水平<sup>[5]</sup>。分析黄曲霉毒素的方法有很多，包括TLC、HPLC、免疫分析、LC-MS等。其中，LC-MS方法由于其高选择性和灵敏度，被视为首选方法。本演示描述了一种用于测定黄曲霉毒素的简单、经济的LC/CMS分析方法。

名称	化学式	(M+H) <sup>+</sup>
黄曲霉毒素 B1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	313.07
黄曲霉毒素 B2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	315.08
黄曲霉毒素 G1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	329.07
黄曲霉毒素 G2	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>	331.08
黄曲霉毒素 M1	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>	329.07



B1



B2



G1



G2



M1



表1黄曲霉毒素的化学式和质子化分子质荷比

## 样品制备

黄曲霉毒素 (B1, B2, G1, G2和M1), LC-MS级溶剂 (水, 乙腈, 甲醇) 购自Sigma-Aldrich (密苏里州圣路易斯)。玉米粉样品从当地市场获得, 并且显示不包含任何黄曲霉毒素。黄曲霉毒素 M1作为内标。

根据Tanaka<sup>[6]</sup>报告的验证方法, 对黄曲霉毒素进行萃取和净化。简而言之, 将5克细磨样品转移至50-mL锥形瓶, 随后加入10 mL乙腈 - 水 (9:1, v/v)。振荡30分钟后, 将液体层转移到干净的离心管中并以5000 rpm的速度离心10分钟。将得到的上清液用0.5 μm滤膜过滤, 并在N<sub>2</sub>下干燥。然后用溶剂 (含有10 mM NH<sub>4</sub>OAc的水/甲醇, 20/80) 将其复溶。

将黄曲霉毒素 (B1, B2, G1, G2) 的储备溶液加入到玉米提取物内, 制成含500 ppb B1和G1, 以及150 ppb B2和G2的储备溶液。使用含30 ppb黄曲霉毒素M1的玉米提取物作为溶剂, 逐级稀释, 用于绘制校准曲线。

使用两份添加了黄曲霉毒素的玉米粉样品进行方法评估。样品1是将9 μL 黄曲霉毒素 (G1和B1为1000 ppb, G2和B2为300 ppb) 和20 μL黄曲霉毒素M1加入到500 mg玉米粉。样品2中加入6 μL的黄曲霉毒素 (G1和B1为1000 ppb, G2和B2为300 ppb), 其他同样品1。黄曲霉毒素M1的最终浓度与产生校准曲线的溶液浓度相同。提取过程如上所述。

## LC/CMS条件

### LC设置

溶剂A: 0.1%甲酸水溶液

溶剂B: 0.1%甲酸和含2 mM

NH<sub>4</sub>OAc的MeOH/ACN (50/50) 溶液

色谱柱: Waters UPLC BEH C18

50x2.1 mm1.7 μ 色谱柱

柱温: 40°C

流速: 500 μL/min

进样体积: 20 μL

### expression CMS-S 设置 正

ESI正电压: 3500 V

毛细管温度: 300°C

毛细管电压: 180°C

电源电压: 20°C

源电压范围: 0°C

气体温度: 350°C

扫描模式: SIM

Time(min)	B%	Mass (m/z)	Span (m/z)	Time (ms)	Delay (us)
0.0	20	313.1	0.5	50.0	10.0
5.0	50				
5.2	98	315.1	0.5	50.0	10.0
7.2	98	329.1	0.5	100.0	10.0
7.5	20				
12	20	331.1	0.5	100.0	10.0

## 玉米粉提取物中黄曲霉毒素的准确度和精密度

浓度 (ppb)	黄曲霉毒素 G1 (n=3)		黄曲霉毒素 B1 (n=3)		浓度 (ppb)	黄曲霉毒素 G2 (n=3)		黄曲霉毒素 B2 (n=3)	
	准确度 (%)	精密度 (%)	准确度 (%)	精密度 (%)		准确度 (%)	精密度 (%)	准确度 (%)	精密度 (%)
1.3	N/A	N/A	100.9	11.4	0.39	N/A	N/A	115.5	0.5
2.6	108.7	3.3	100.7	7.1	0.78	114.8	5.3	117.9	1.1
5.2	102.3	1.4	102.5	1.3	1.56	116.3	1.4	103.8	7.3
10.4	101.5	0.04	99.5	1.2	3.13	109.0	0.7	99.9	0.8
20.8	94.0	1.4	96.1	2.7	6.25	97.9	1.9	98.7	2.6
41.7	100.7	1.0	102.5	0.8	12.5	104.0	2.0	103.1	2.1
83.3	100.2	1.3	99.7	0.6	25.0	94.7	2.2	99.9	1.6

黄曲霉毒素的校准曲线线性范围为1至100 ppb, 每个浓度水平溶液进样3次。美国食品药品监督管理局对人类食品<sup>[5]</sup>的干预水平为20 ppb, 在该线性浓度范围内。对于黄曲霉毒素 B1, LOQ (定量限) 为1.3 ppb, 准确度为100.9%, 精密度为11.4%。B2的LOQ (定量限) 为0.78 ppb, 准确度为117.9%, 精密度为1.1%; G1的LOQ为2.6 ppb, 准确度为108.7%, 精密度为3.3%; G2的LOQ为0.78 ppb, 准确度为 114.8%, 精密度为5.3%。LOQ水平的各黄曲霉毒素LC-SIM色谱图, 见图1a至d。

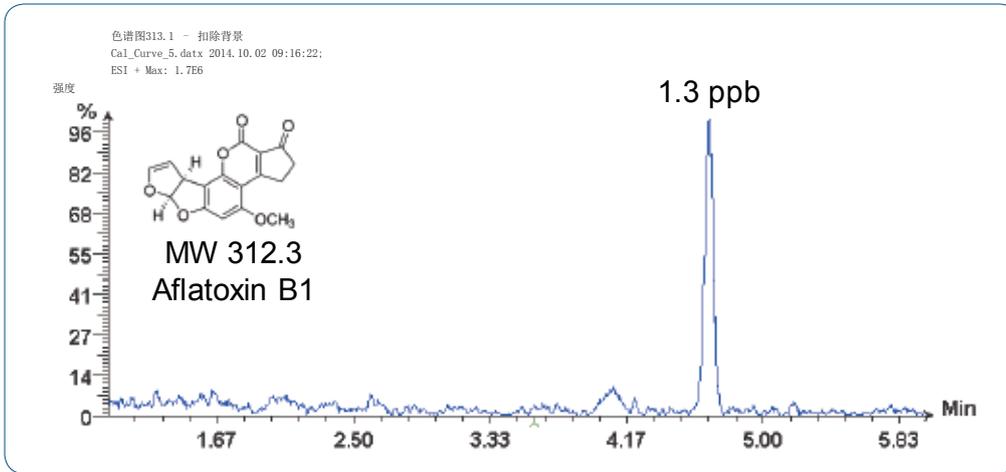


图1a: 玉米粉提取物中加入  
1.3 ppb黄曲霉毒素B1的  
LC-SIM色谱图

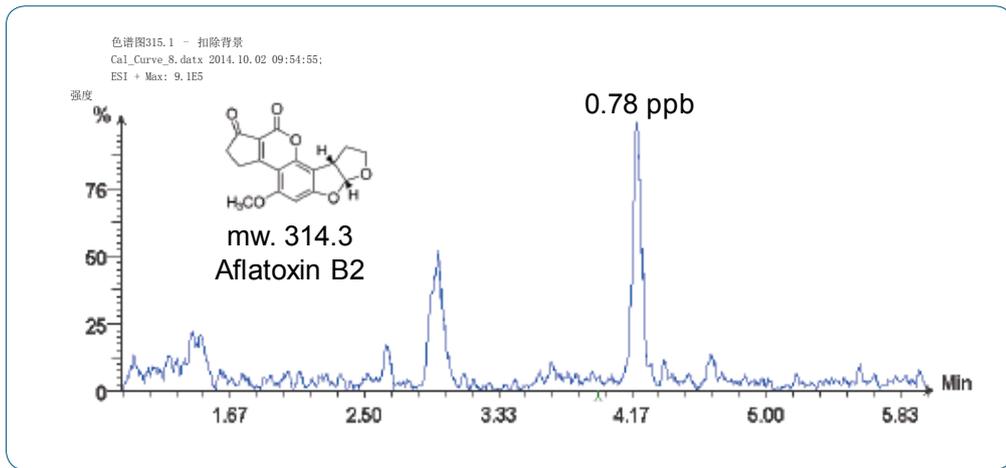


图1b: 玉米粉提取物中加入  
0.78 ppb黄曲霉毒素B2的  
LC-SIM色谱图

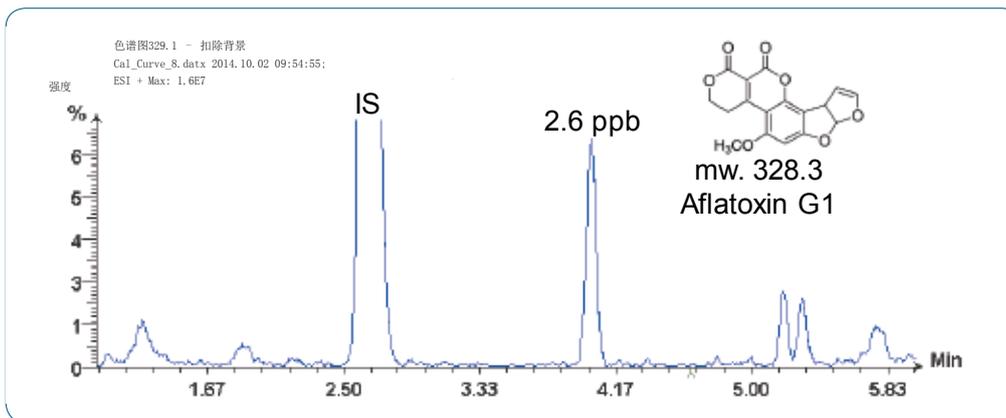


图1c: 玉米粉提取物中加入  
2.6 ppb黄曲霉毒素G1的  
LC-SIM色谱图

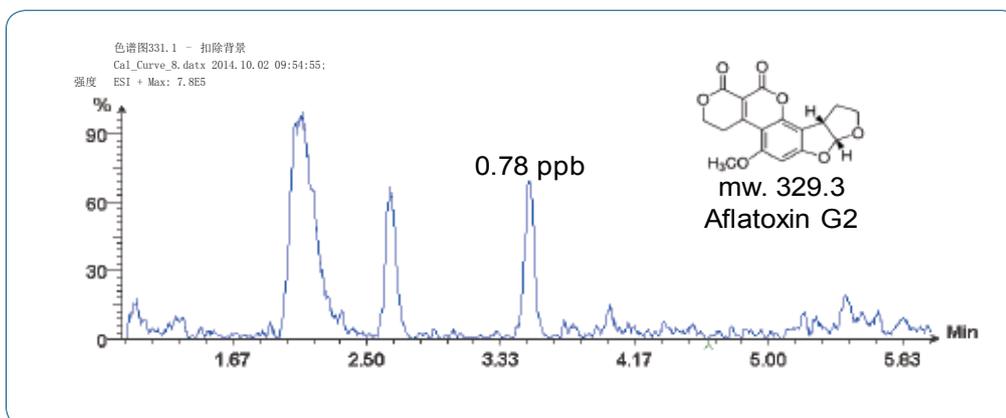


图1d: 玉米粉提取物中加入  
0.78ppb黄曲霉毒素G2的  
LC-SIM色谱图

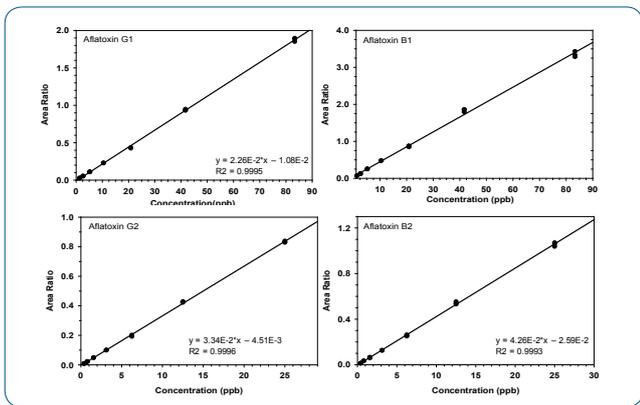


图2: 玉米粉提取物中黄曲霉素G1、G2、B1和B2的校准曲线, 黄曲霉素M1为IS。每个浓度分析3次

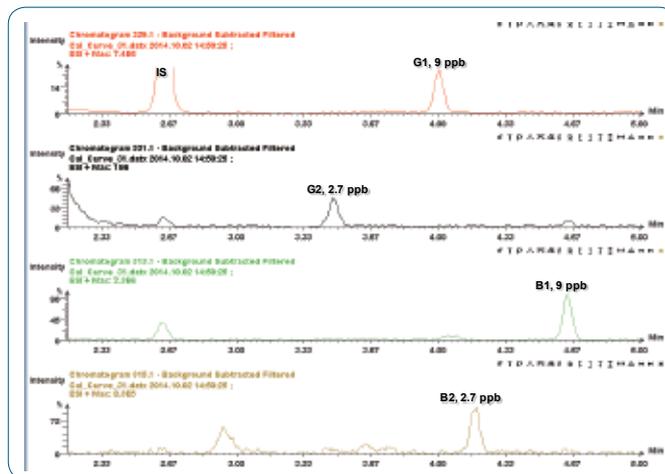


图3: 玉米粉中加入黄曲霉素 (B1和G1为9 ppb, B2和G2为2.7 ppb) 制备的样品1中黄曲霉素B1、B2、G1和G2的LC-SIM色谱图

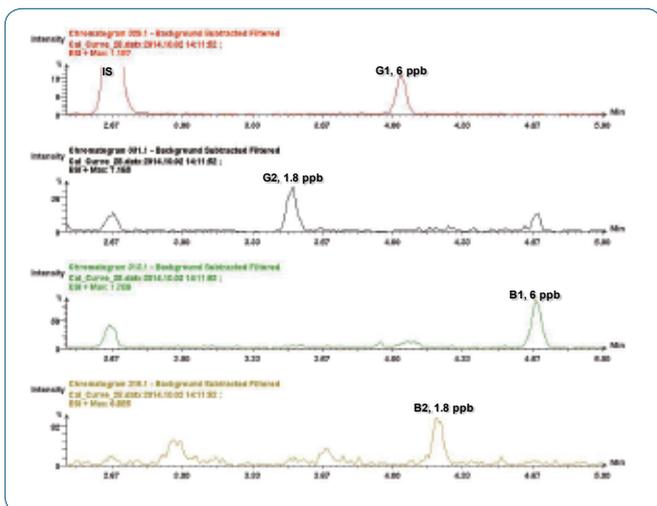


图4: 玉米粉中加入黄曲霉素 (B1和G1为6 ppb, B2和G2为1.8 ppb) 制备的样品2中黄曲霉素B1、B2、G1和G2的LC-SIM色谱图

## 总结

- 本文描述了一种简便的采用expression LC/CMS系统分析玉米粉中黄曲霉素的LC-MS方法。
- 使用LC-SIM测定强化玉米粉提取物中黄曲霉素的LOQ很容易达到比FDA干预水平低20倍的水平。
- 黄曲霉素的线性动态范围在1-100 ppb之间,  $R^2$ 大于99%。在线性浓度范围内, 平均准确度在90-120%范围之内, 精密度小于15%。
- 对于限定黄曲霉素分析, 使用Advion紧凑型质谱仪系统的LC/CMS推荐方法, 可能更具有成本效益。

## 参考文献

1. Chao, T.C.; Maxwell, S.M.; Wong, S.Y.; J. Pathol., 1991, 164, 225-33.
2. Patten, R.C.; Am. J. Trop. Med. Hyg. 1981, 30, 422-5.
3. Rawal, S.; Coulombe, R.A. Jr.; Toxicol. Appl. Pharmacol. 2011, 254 (3), 349-54.
4. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>, IARC retrieved 2014
5. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. Food and Drug Administration. August 2000.
6. Tanaka, T.; Yoneda, A.; Sugiura, Y.; Inoue, S.; Takino, M.; Tanaka, A.; Shinoda, A.; Suzuki, H.; Akiyama, H.; Toyoda, M.; Mycotoxins, 2002, 52, 107-113.

**Advion**

www.expressioncms.com  
info@advion.com

Advion质谱与合成解决方案 expression CMS是一种高性能、紧凑、价格合理的单四级质谱仪。其大小紧凑, 适用于空间有限的实验室, 可供化学家直接获取质量确认、反应监测、质量控制和纯度分析所需的结果。