LC/MS 及 HPLC 法分析花生中黄曲霉毒素

Analysis of Aflatoxins in peanut by LC/MS and HPLC methods

黄曲霉毒素是主要由黄曲霉（aspergillus flavus）等霉菌产生的代谢产物，存在于土壤、动植物、各种坚果中，特别是容易污染花生、玉米、稻米等粮油产品，具有很强的致癌性，是对人类健康危害极为突出的一类霉菌毒素。现已鉴定出的黄曲霉毒素大约有 20 种，其中最典型的有黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 共计 4 种（图 1）。日本厚生劳动省发布的黄曲霉毒素检测法，是使用免疫亲和色谱柱进行前处理后再采用 LC/MS 法以及荧光衍生-HPLC 法进行分析。中国 2017 年 1 月发布的最新国家标准 GB 5009.22-2016 中新增了同位素稀释液相色谱-串联质谱法。也同样先用免疫亲和柱对样品进行前处理，然后再用 LC/MS 方法检测。

本报告将参照日本的方法，对花生样品的黄曲霉毒素检测进行介绍。

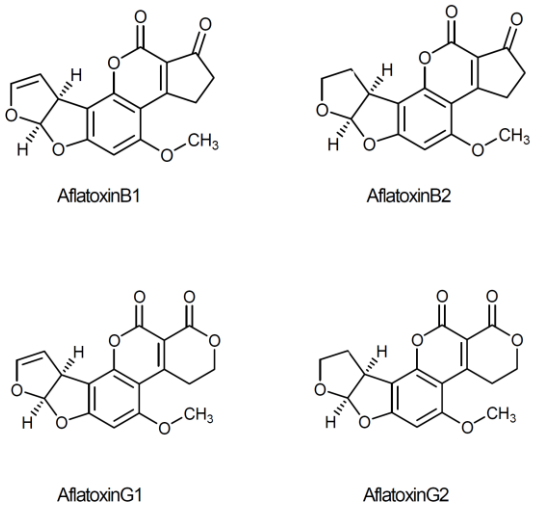

图 1 黄曲霉毒素的结构式

（1）LC/MS 法

花生样品的前处理方法如图 2 所示。经搅拌机粉碎、萃取、过滤后，采用结合了黄曲霉毒素特异性抗体的免疫亲和色谱柱净化样品，然后直接测定。

分析柱使用 TSKgel ODS-100V 5μm (2.0 mmI.D. x 150 mm，5 μm)，将乙酸铵水溶液、乙腈以及甲醇的混合溶剂作为流动相进行分离。检测法列出了选择性离子监测（SIM）以及选择性反应监测（SRM）的检测条件，此次采用 SIM 进行检测。将总黄曲霉毒素浓度添加至检测限量值的 2 倍（20 μg/kg）的花生作为样品，进行前处理后，通过 LC/MS 法进行测定，色谱图如图 3 所示。

样品 50 g
＋ 乙腈/水（9/1） 100 mL
搅拌机搅拌 5 分钟

离心分离（2500 r/min，5 分钟）

分取萃取液 5 mL
＋ 磷酸缓冲生理盐水定容至 50 mL
过滤（玻璃纤维滤纸）

滤液 10 mL

免疫亲和色谱柱提纯
＋ 清洗；磷酸缓冲液 10 mL
＋ 清洗；水 10 mL
＋ 洗提；加压除去水分后，乙腈 3 mL

洗提液 乙腈 5 mL 定容

烟棍溶液 1 mL

减压浓缩干固
＋ 流动相 1 ml
LC/MS

图 2 花生样品的前处理

表 1 分析条件

色谱柱：TSKgel ODS-100V 5μm (2.0 mml.D. x 150 mm, 5 μm)				
流动相：CH_3OH/CH_3CN/10 mmol/L CH_3COONH_4 =60/20/150				
流　速：0.2 mL/min				
柱　温：40 °C				
进样量：10 μL				
MS：G1956B (Agilent Technologies)				
离子源：ESI(+)				
模　式：SIM				
m/z：	AflatoxinB1	313	AflatoxinB2	315
	AflatoxinG1	329	AflatoxinG2	331

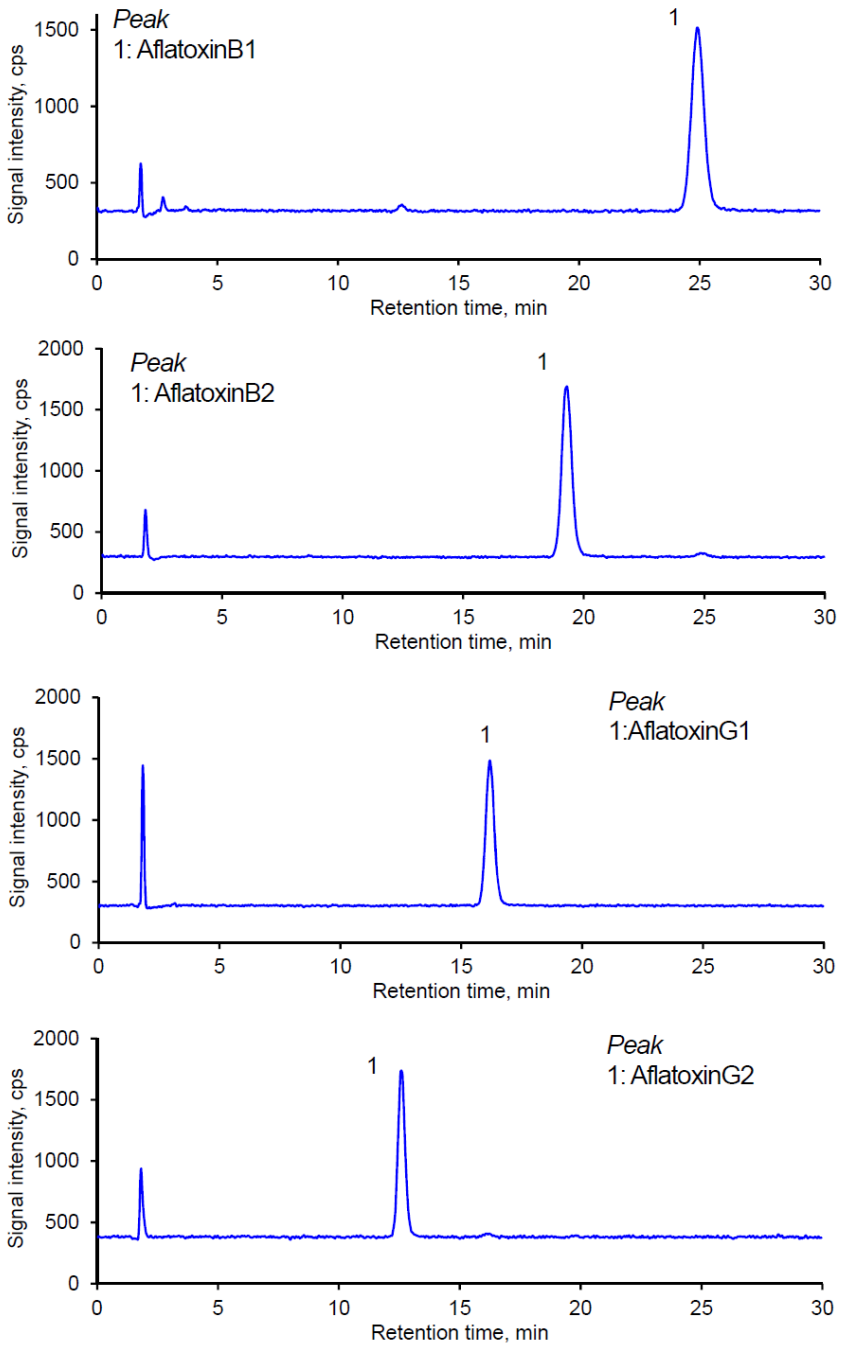

图 3 花生样品的色谱图（LC/MS 法）
添加浓度：总黄曲霉毒素量为 20 μg/kg（检测限量值的 2 倍）

（2）荧光衍生-HPLC 法

花生样品的前处理方法如图 4 所示。样品的粉碎、萃取、过滤处理以及使用免疫亲和色谱柱净化都按图 2 进行相同处理。黄曲霉毒素有天然荧光，无须衍生化即可检测出荧光。为增强黄曲霉毒素 B1 和 G1 的荧光强度，使用 TFA 将其衍生为氢氧化物。此外，黄曲霉毒素 B2 和 G2 未进行衍生化。

分析柱使用 TSKgel ODS-100V 5μm (4.6 mmI.D. x 250 mm，5 μm)，以水、乙腈以及甲醇的混合溶剂作为流动相进行分离。将总黄曲霉毒素浓度添加至检测限量值的 2 倍（20 μg/kg）的花生作为样品，进行图 4 所示的前处理后，采用 HPLC 法进行测定，色谱图如图 5 所示。因为衍生为氢氧化物，黄曲霉毒素的洗脱顺序与图 3 中有所不同。

样品 50 g
　　＋ 乙腈/水（9/1） 100 mL
搅合器搅拌 5 分钟

离心分离（2500 r/min，5 分钟）

分取萃取液 5 mL
　　＋ 磷酸缓冲生理盐水定容至 50 mL
过滤（玻璃纤维滤纸）

滤液 10 mL

免疫亲和色谱柱提纯
＋ 清洗：磷酸缓冲液 10mL
＋ 清洗：水 10mL
＋ 洗提：加压除去水分后，乙腈 3 mL

洗提液 乙腈 5mL 定容

洗提液 1 mL

减压浓缩干固
　　＋ TFA 0.1 mL
使用试管搅拌器搅拌，室温阴凉处静置 15 分钟
　　＋ 乙腈/水（1/9）0.9 mL
试管搅拌器混合

HPLC

图 4 花生样品的前处理法

表 2 分析条件

色谱柱：	TSKgel ODS-100V 5μm (4.6 mmI.D. x 250 mm, 5 μm)
流动相：	CH_3OH / CH_3CN / H_2O = 30/10/60
流　速：	1.0 mL/min
柱　温：	40 °C
进样量：	20 μL
检　测：	FLD (Ex; 365 nm, Em; 450 nm)

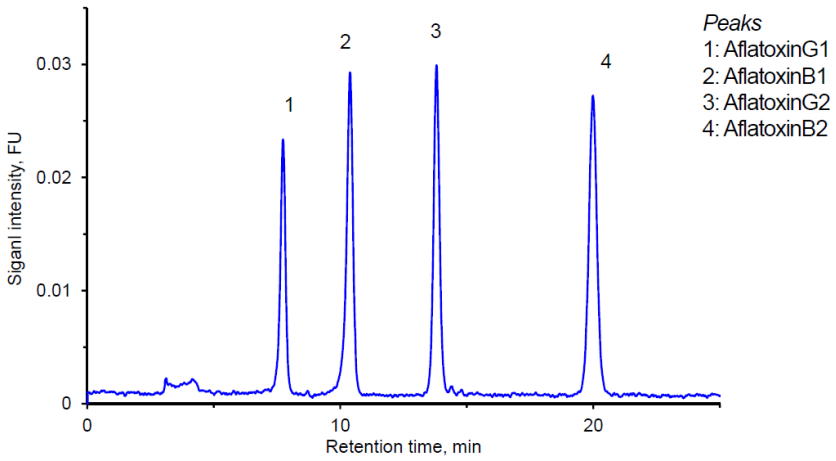

图 5 花生样品的色谱图（荧光衍生化-HPLC 法）
添加浓度：总黄曲霉毒素量为 20 μg/kg（检测限量值的 2 倍）

两种分析方法的黄曲霉素定量范围、重现性、定量限界以及回收率如表 3 所示。

根据标准样品制成的校准曲线结果显示，LC/MS 法结果在 0.25～10 μg/L、荧光衍生化-HPLC 法结果在 1.0～4.0 μg/L 的浓度范围内，可得到相关系数 r^2=0.999 以上的良好线性关系。

两种方法的定量下限值（LOQ）均为约 0.1 μg/L，根据检测法前处理时相当于 1 μg/kg（限量值的 1/10 浓度）。将各黄曲霉毒素标准物质浓度分别添加至 5 μg/kg 的花生作为样品，测定的回收率为 98.7～110 %，结果良好。

表 3 各分析法的定量范围、重现性、定量限界以及回收率

LC/MS 法

Analytes	Calibration curb		RSD (%, n=6)	LOQ		Recovery (%)
	Range (μg/L)	r^2	(at 5 m/L)	(μg/L)	(μg/kg: peanut)	(at 20μg/kg: peanut)
AflatoxinBI	0.25-10	0.999	0.76	0.072	0.72	101.7
AflatoxinB2	0.25-10	0.999	0.68	0.077	0.77	98.7
AflatoxinGI	0.25-10	0.999	0.37	0.093	0.93	109.2
AflatoxinG2	0.25-10	0.999	0.72	0.070	0.70	105.2

荧光衍生化-HPLC 法

Analytes	Calibration curb		RSD (%, n=6)	LOQ		Recovery (%)
	Range (μg/L)	r^2	(at 2 μg/L)	(μg/L)	(μg/kg : peanut)	(at 20μg/kg: peanut)
AflatoxinB1	1.0-4.0	0.999	1.0	0.068	0.68	104.6
AflatoxinB2	1.0-4.0	0.999	0.5	0.061	0.61	104.0
AflatoxinG1	1.0-4.0	0.999	2.0	0.069	0.69	108.3
AflatoxinG2	1.0-4.0	0.999	1.3	0.061	0.61	107.3