

## 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定 浓缩苹果汁中的4种链格孢霉毒素

何 强\* , 李建华 , 孔祥虹 , 乐爱山 , 吴双民

( 陕西出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 陕西 西安 710068 )

**摘要** :建立了浓缩苹果汁中链格孢霉素、链格孢酚、腾毒素、链格孢酚甲醚4种毒素残留量的固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱检测方法。样品用水稀释后,用PS DVB固相萃取柱净化,外标法定量。测定时用BEH C18色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离,乙腈和水梯度洗脱,质谱测定采用多反应监测(MRM)模式。4种链格孢霉毒素的测定低限在1.0~5.0 μg/L范围内,加标回收率为77.8%~117.2%,相对标准偏差均低于9.7%。该方法灵敏、稳定、可靠,可用于浓缩苹果汁样品中4种链格孢霉毒素的检测和确证。

**关键词** :超高效液相色谱-串联质谱法;链格孢霉素;链格孢酚;腾毒素;链格孢酚甲醚;浓缩苹果汁

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)12-1128-04

## Simultaneous determination of four *Alternaria* toxins in apple juice concentrate by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry

HE Qiang\* , LI Jianhua , KONG Xianghong , YUE Aishan , WU Shuangmin

( Inspection and Quarantine Technology Centre , Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau , Xi 'an 710068 , China )

**Abstract** : An ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry ( UPLC-MS/MS ) method was developed for the determination of altenuene ( ALT ) , alternariol ( AOH ) , tentoxin and alternariol monomethyl ether ( AME ) in apple juice concentrate ( AJC ). The sample was diluted with water , and then cleaned up with a PS DVB column. The quantification was carried out using an external standard method. The UPLC was performed on a BEH C18 column ( 50 mm × 2.1 mm , 1.7 μm ) using a gradient elution of acetonitrile and water. The MS/MS was performed with multiple reaction monitoring ( MRM ) mode. The limits of quantification of the four *Alternaria* toxins were between 1.0 and 5.0 μg/L. The recoveries were 77.8% - 117.2% with the relative standard deviations less than 9.7%. The method is sensitive , stable and reliable. It 's suitable for the quantitative and qualitative analyses of the four *Alternaria* toxins in AJC.

**Key words** : ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry ( UPLC-MS/MS ) ; altenuene ; alternariol ; tentoxin ; alternariol monomethyl ether ; apple juice concentrate

链格孢霉(*Alternaria*)是一类广泛分布于泥土和各种农作物里的真菌,能引起冷藏的蔬菜、水果的腐败,是污染食物最普遍的真菌之一,也是苹果生长过程中重要的致病菌之一<sup>[1]</sup>。其有毒代谢产物比较复杂,达70多种,统称为链格孢霉毒素。链格孢霉毒素(altenuene, ALT)、链格孢酚(alternariol,

AOH)、腾毒素(tentoxin)、链格孢酚甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)是4种主要的链格孢霉毒素,这些毒素具有细胞毒性<sup>[2]</sup>,对动物有胚胎毒性和致畸性等<sup>[3]</sup>,对人体健康危害较大。对浓缩苹果汁中这些毒素进行检测对于控制产品的质量安全、维护人们的饮食健康有重要的意义。但我国目

\* 通讯联系人:何 强,工程师,主要从事农兽药残留检测研究。Tel:(029)85407235, E-mail:heq@snciq.gov.cn.

基金项目:国家质量检验公益性科研项目(200810618)和陕西省农业科技攻关项目(2010k01-19)。

收稿日期:2010-09-02

前还未见有相关的检测方法报道。

目前食品中链格孢霉毒素的检测方法主要有薄层色谱法<sup>[4]</sup>、液相色谱法<sup>[5-7]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[8-11]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[12]</sup>、实时聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 定量分析<sup>[13]</sup> 等,但未见同时测定浓缩苹果汁中链格孢霉毒素、链格孢酚、腾毒素、链格孢酚甲醚这 4 种毒素的文献报道,而且相关方法均为普通高效液相色谱检测,检测时间较长。本文利用聚苯乙烯-二乙烯基苯共聚物 (PS DVB) 固相萃取柱净化样品,超高效液相色谱-串联质谱法 (UPLC-MS/MS) 同时检测浓缩苹果汁中 4 种链格孢霉毒素,建立的方法简便、快速、准确、稳定。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

Acquity<sup>TM</sup> 超高效液相色谱仪,配 Quattro Premier XE 串联质谱仪、电喷雾电离 (ESI) 接口 (美国 Waters 公司); 甲醇、乙腈、正己烷和乙酸乙酯 (均为 HPLC 级,美国 TEDIA 公司); 超纯水 (由美国 Millipore 公司 Milli-Q 超纯水净化系统制备); PS DVB 固相萃取柱 (500 mg, 6 mL; 美国 Agilent

公司); Supelclean ENVI<sup>TM</sup>-18 固相萃取柱 (500 mg, 3 mL; 美国 Supelco 公司); Supelclean LC-NH2 固相萃取柱 (500 mg, 3 mL; 美国 Supelco 公司); Oasis HLB 固相萃取柱 (60 mg, 3 mL; 美国 Waters 公司); 链格孢霉毒素、链格孢酚和链格孢酚甲醚标准品 (美国 Sigma 公司); 腾毒素标准品 (英国 Apolloscientific 公司)。

### 1.2 测定条件

#### 1.2.1 超高效液相色谱条件

色谱柱: BEH C18 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm; Waters 公司); 柱温: 35 °C; 样品室温度: 15 °C; 流动相: 乙腈和水; 梯度洗脱程序: 在 0 ~ 3 min 内乙腈由 15% 线性递增至 70%, 保持 0.5 min, 然后在 0.1 min 内恢复至 15%, 并保持 1.4 min; 流速 0.3 mL/min; 进样量 5.0 μL。

#### 1.2.2 质谱条件

电喷雾离子源; 负离子扫描; 多反应监测 (MRM) 模式检测; 毛细管电压 3 kV; 萃取电压 3 V; 离子源温度 115 °C; 脱溶剂温度 400 °C; 脱溶剂气流量 600 L/h; 锥孔气流量 50 L/h; 碰撞室氩气流量 0.2 mL/min; 光电倍增器电压 650 V。4 种链格孢霉毒素的监测离子、锥孔电压、碰撞池电压如表 1 所示。

表 1 4 种链格孢霉毒素的串联质谱测定参数  
Table 1 MS/MS parameters for the four *Alternaria* toxins

Component	Parent ion ( <i>m/z</i> )	Cone voltage/V	Fragment ion ( <i>m/z</i> ) ( collision energy/eV )
Altenuene	291.14	25	247.08* ( 18 ); 229.04 ( 18 )
Alternariol	257.10	45	213.08* ( 22 ); 146.87 ( 30 )
Tentoxin	413.37	35	140.96* ( 22 ); 271.25 ( 18 )
Alternariol monomethyl ether	271.15	38	256.11* ( 22 ); 228.10 ( 30 )

\* quantification ion.

### 1.3 样品处理

称取 5 g 浓缩苹果汁试样 (精确到 0.01 g), 置于 50 mL 具塞离心管中, 加入 20 mL 超纯水, 振荡提取 1 min。将 PS DVB 固相萃取柱依次用 6 mL 甲醇、10 mL 水活化, 取提取液上样; 用约 5 mL 水洗涤离心管, 洗涤液并入上样液中; 再依次用 5 mL 水、10 mL 甲醇-水 (2:8, v/v) 淋洗固相萃取柱, 减压抽干 20 min; 用 10 mL 正己烷淋洗固相萃取小柱, 弃去所有淋洗液, 减压抽干 1 min; 用 20 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液, 于 40 °C 水浴中减压蒸至近干, 再用氮气吹干; 用 1.0 mL 乙腈-水 (1:1, v/v) 溶解残渣并定容, 过 0.2 μm 微孔滤膜, 滤液待测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理条件的选择

链格孢霉毒素检测时多采用文献 [6] 建立的样

品净化方法。该方法分 C<sub>18</sub> 柱净化和氨基柱净化两步, 净化过程中需要 3 次活化固相萃取柱、2 次上样、4 次淋洗、2 次洗脱、2 次浓缩, 共需要 10 种溶剂, 操作十分复杂, 净化过程不易控制, 而且相关报道多数仅用于检测 AOH 和 AME 残留。也有采用 HLB 固相萃取柱净化的报道<sup>[7]</sup>, 但其仅对 AOH 有较好的回收率。本文选择 PS DVB 柱净化样品, 对浓缩苹果汁中 4 种链格孢霉毒素同时提取、净化。比较了 3 种不同净化方法的加标回收率 (加标量均为 10 μg/kg), 样品提取均采用本文的方法, 每种净化方法 2 个平行样, 结果见表 2。文献报道的两种净化方法对 AOH 均能获得较好的回收率, 但对其他 3 种链格孢霉毒素的回收率均不理想, 特别是 ALT 的回收率均不到 30%; 而采用本文所用的 PS DVB 柱进行提取、净化 4 种链格孢霉毒素的加标回收率均能达到 80% 以上, 操作也较简便。

表 2 3 种样品净化方法对 4 种链格孢霉毒素的添加回收率

Table 2 Recoveries of four *Alternaria* toxins by 3 different sample purification methods %

Component	C <sub>18</sub> and aminopropyl SPE column	HLB SPE column	PS DVB SPE column
Altenuene	20.5, 22.8	27.9, 20.8	86.2, 94.9
Alternariol	63.5, 105.2	107.8, 111.4	81.4, 118.2
Tentoxin	41.9, 48.4	62.1, 54.7	94.8, 87.3
Alternariol monomethyl ether	40.6, 60.3	68.8, 62.7	88.5, 109.0

实验中考察了 PS DVB 固相萃取柱的淋洗及洗脱条件。用 10 mL 20% 甲醇溶液淋洗,可有效去除浓缩果汁中的糖类及有机酸类等极性大的物质,有效降低色谱分离时的干扰及质谱测定时的样品基质效应。接着采用正己烷淋洗,可进一步去除脂溶性杂质。洗脱时考察了甲醇和乙酸乙酯两种溶剂,用 10 mL 甲醇即可洗脱完全,但有明显的黄色色带同时被洗脱,而用 20 mL 乙酸乙酯可洗脱完全,且只有少量黄色杂质被洗脱,净化效果优于甲醇。

在 1.3 节所述的样品前处理条件下,链格孢霉毒素混合标准溶液(均为 5 μg/L)及浓缩苹果汁样品的总离子流图如图 1 所示。

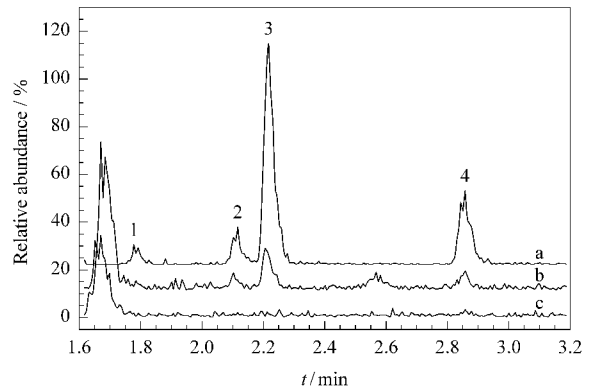


图 1 (a) 4 种链格孢霉毒素混合标准溶液、(b) 浓缩苹果汁阳性样品和 (c) 阴性样品的总离子流色谱图

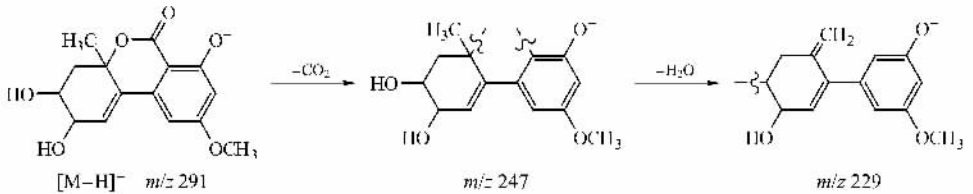
Fig. 1 Total ion chromatograms of (a) the four *Alternaria* toxins standard solution, (b) a positive apple juice concentrate sample and (c) a blank sample

1. altenuene; 2. alternariol; 3. tentoxin; 4. alternariol monomethyl ether.

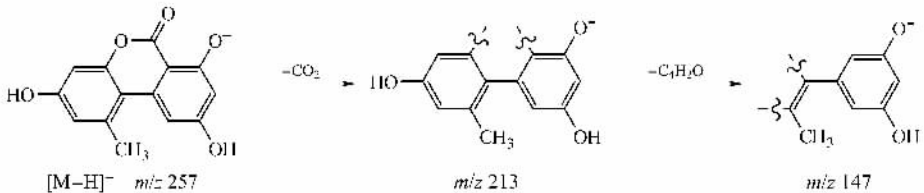
## 2.2 目标物的质谱裂解途径分析

4 种目标物的母离子与主要裂解碎片的裂解途径见图 2。ALT、AOH 和 AME 均为二苯并吡喃酮类化合物,化学结构中均含有较多的羟基,而腾毒素化

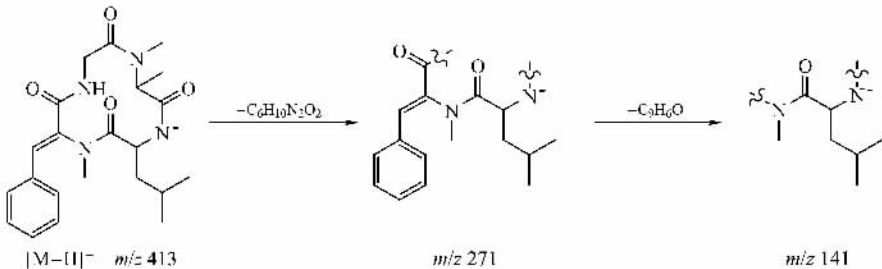
Altenuene



Alternariol



Tentoxin



Alternariol monomethyl ether

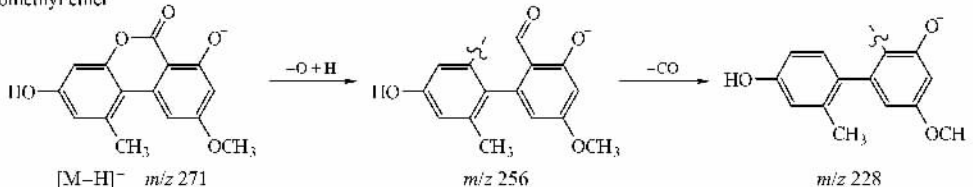


图 2 4 种链格孢霉毒素的质谱裂解途径

Fig. 2 MS fragmentation pathways of the four *Alternaria* toxins

学结构中含有较多的羰基,在质谱检测时均适合采用负离子电离模式。实验中选择每种毒素丰度较高、稳定性较好的两个离子碎片作为定量和定性离子。本研究采用 ESI 负离子扫描模式,化合物通过一级电离失去一个氢原子,得到带负电荷的母离子,然后再通过氩气碰撞,得到子离子碎片。图 2 中列出的两个子离子碎片即为本实验中选择的定量和定性离子。

### 2.3 线性关系、测定低限及加标回收率

配制质量浓度为 2.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0  $\mu\text{g/L}$  的 4 种链格孢霉毒素混合标准溶液,按

表 3 4 种链格孢霉毒素的线性方程、线性范围、相关系数和标准溶液的定量限

Table 3 Regression equations, linear ranges, correlation coefficients ( $r$ ), limits of quantification (LOQ) of the four *Alternaria* toxins

Component	Regression equation	Linear range/( $\mu\text{g/L}$ )	$r$	LOQ/( $\mu\text{g/L}$ )
Altenuene	$Y = 9.637X + 5.338$	5.0 - 100	0.9937	5.0
Alternariol	$Y = 30.400X + 10.939$	5.0 - 100	0.9918	4.0
Tentoxin	$Y = 64.771X + 9.974$	2.0 - 100	0.9985	1.0
Alternariol monomethyl ether	$Y = 197.024X + 20.228$	5.0 - 100	0.9958	2.5

$Y$ : peak area;  $X$ : mass concentration,  $\mu\text{g/L}$ .

取空白浓缩苹果汁样品添加 2.0、5.0、10.0  $\mu\text{g/kg}$  3 个水平的链格孢霉毒素,每个添加水平重复测定 5 次,4 种链格孢霉毒素的加标回收率为 77.8% ~ 117.2%,相对标准偏差(RSD)均低于 9.7%(见表 4),表明回收率及重现性良好。

表 4 4 种链格孢霉毒素的添加回收率及精密度( $n = 5$ )

Table 4 Recoveries and precisions for the four spiked *Alternaria* toxins ( $n = 5$ )

Component	Spiked/( $\text{mg/kg}$ )	Recovery/%	RSD/%
Altenuene	0.5	93.1	9.4
	1.0	97.3	6.9
	2.0	102.7	8.3
Alternariol	0.5	94.6	9.7
	1.0	96.8	9.6
	2.0	100.8	9.3
Tentoxin	0.5	96.5	8.7
	1.0	97.1	7.4
	2.0	96.8	6.9
Alternariol monomethyl ether	0.5	91.8	7.9
	1.0	95.1	6.1
	2.0	102.1	7.6

### 2.4 样品测定

利用该方法测定了 15 份浓缩苹果汁样品,其中 1 份检出腾毒素,含量为 1.2  $\mu\text{g/kg}$ ;1 份检出链格孢酚、腾毒素、链格孢酚甲醚,含量分别为 1.9、0.5、0.8  $\mu\text{g/kg}$ ;其余样品中均未检出相关毒素。

## 3 结论

建立了一种浓缩苹果汁中 4 种链格孢霉毒素残

留检测的方法。该方法主要在样品净化方法上进行了创新,并利用 UPLC-MS/MS 进行样品检测,提高了检测效率。该方法简便、灵敏、稳定,可以为其他样品中链格孢霉毒素的检测提供参考。

1.2 节的条件进样检测,以标准溶液中分析物的质量浓度( $X$ ,  $\mu\text{g/L}$ )为横坐标,峰面积( $Y$ )为纵坐标作图,4 种毒素的线性关系及标准溶液的定量限(LOQ)(以信噪比( $S/N$ )为 10 计)见表 3。

取空白样品,按 1.3 节方法处理后定量添加 4 种毒素混合标准溶液,使溶液中 4 种毒素的质量浓度均为 5.0  $\mu\text{g/L}$ ,进样检测。以  $S/N$  为 10 确定样品检测的定量限,以  $S/N$  为 5 确定样品检测的检出限,链格孢霉毒素、链格孢酚、腾毒素、链格孢酚甲醚的定量限依次为 1.0、0.8、0.2、0.5  $\mu\text{g/kg}$ ,检出限依次为 0.5、0.4、0.1、0.25  $\mu\text{g/kg}$ 。

留检测的方法。该方法主要在样品净化方法上进行了创新,并利用 UPLC-MS/MS 进行样品检测,提高了检测效率。该方法简便、灵敏、稳定,可以为其他样品中链格孢霉毒素的检测提供参考。

### 参考文献:

- [1] Gur N, Karamanoglu S, Gur S. World Appl Sci J, 2008, 3(5): 781
- [2] Tiemann U, Tomeka W, Schneidera F, et al. Toxicology Letters, 2009, 186(2): 139
- [3] Yang X. Foreign Medical Sciences: Section Hygiene (杨欣. 国外医学:卫生学分册), 2000, 27(3): 182
- [4] Fàbrega A, Agut M, Calvo M A. J Food Sci, 2002, 67(2): 802
- [5] da Motta S, Soares L M V. Brazilian J Microbiol, 2000, 31: 315
- [6] Delgado T, Gómez-Cordovés C, Scott P M. J Chromatogr A, 1996, 731: 109
- [7] Fente C A, Jaimez J, Vázquez B I, et al. Analyst, 1998, 123: 2277
- [8] Lau B P Y, Scott P M, Lewis D A, et al. J Chromatogr A, 2003, 998: 119
- [9] Magnani R F, De Souza G D, Rodrigues-Filho E. J Agri Food Chem, 2007, 55(13): 4980
- [10] Sulyok M, Krska R, Schuhmacher R. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(5): 1505
- [11] Monbaliu S, Van Poucke C, Van Peteghem C, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2009, 23: 3
- [12] Scott P M, Weber D, Kanhere S R. J Chromatogr A, 1997, 765: 255
- [13] Andersen B, Smedsgaard J, Jørring I, et al. Int J Food Microbiol, 2006, 111: 105