

## LC/MS 及 HPLC 法分析大麦中的赭曲霉毒素 A

## Analysis of Ochratoxin A in barley by LC/MS and HPLC methods

赭曲霉毒素 A 是 *A.ochraceus* 等真菌产生的一种霉菌毒素，在谷物、咖啡以及啤酒中最常见，具有肝脏毒性以及肾脏毒性。目前，日本国内暂未设定检测限，不过国外设定了 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （麦类、CODEX）以及 2~10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （麦类、EU）。中国在《GB 5009.96-2016 食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中规定小麦和大麦的检出限为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

日本厚生劳动省通告的赭曲霉毒素 A 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 HPLC 法进行分析。本报告介绍了参照上述检测法对大麦样品中的赭曲霉毒素 A 进行分析的实例。

大麦样品的前处理方法如图 2 所示。添加乙腈/水混合溶剂，然后搅拌萃取。提取液过滤后，使用结合有赭曲霉毒素特异性抗体的免疫亲和柱进行纯化后的溶液作为待测样品。

## (1) LC/MS 法

分析条件如表 1 所示。分析柱使用了 TSKgel ODS-100V 5 $\mu\text{m}$ ，通过乙酸铵水溶液/乙腈的梯度洗脱进行分离。采用 ESI 正负离子模式的任意一种均可以检出赭曲霉毒素 A，本次实验采用  $[\text{M}+\text{H}]^+$  404 进行检测。

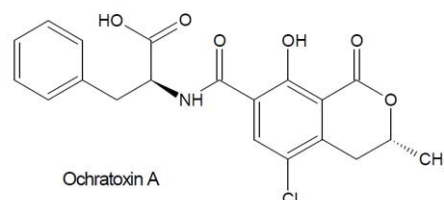


图 1 赭曲霉毒素 A 的结构式

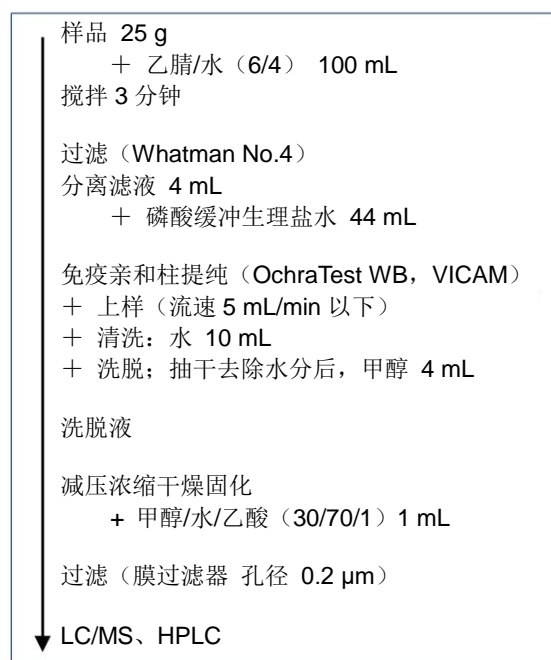


图 2 大麦样品的前处理

表 1 分析条件 (LC/MS 法)

Column : TSKgel ODS-100V 5 $\mu\text{m}$ (2.0 mmI.D. $\times$ 150 mm, 5 $\mu\text{m}$ )
Eluent : A ; 10 mmol/L CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
B ; CH <sub>3</sub> CN
Gradient : B conc.(0 min) 20 % $\rightarrow$ (20-21 min) 50 % $\rightarrow$ (21.1-25 min) 95 %
Flow rate : 0.2 mL/min
Column temp. : 40 $^{\circ}\text{C}$
Injection volume : 50 $\mu\text{L}$
Instrument : G1956B (Agilent)
Ionization : ESI
Polarity : Positive
Temperature : 350 $^{\circ}\text{C}$
m/z : 404

在大麦样品中添加浓度为  $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$  的赭曲霉毒素 A，按照图 2 进行前处理后，采用 LC/MS 法进行测定，色谱图如图 3 所示。赭曲霉毒素 A 在 15 分钟左右被洗脱，在未加标的大麦提取样品中没有检测到赭曲霉毒素 A。

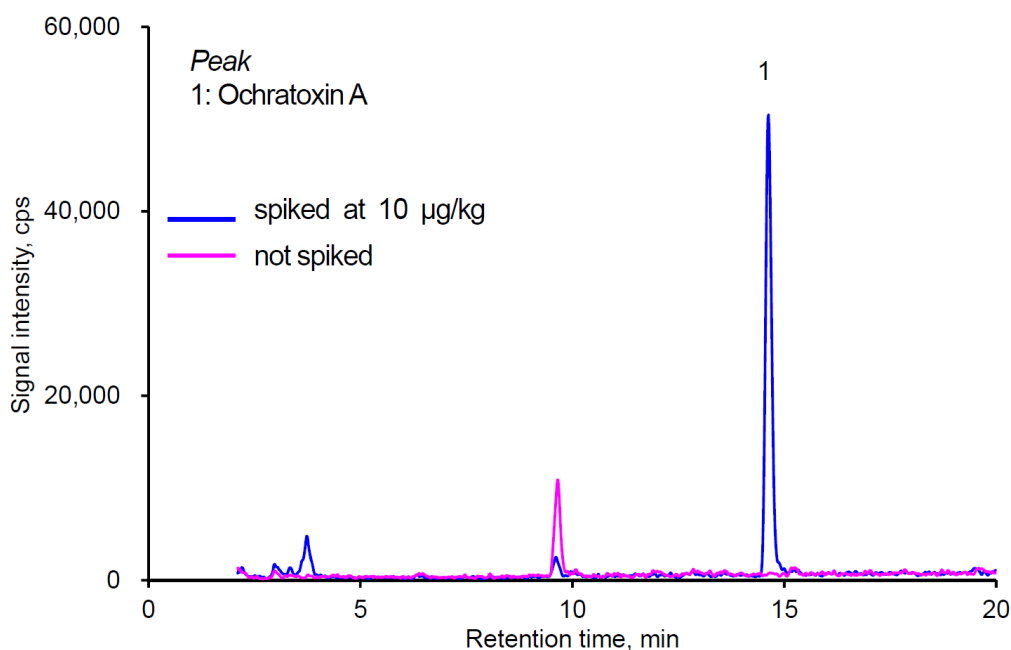


图 3 大麦提取样品（加标与未加标）的色谱图（LC/MS 法）  
加标浓度：大麦中赭曲霉毒素 A 含量为  $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$

## (2) HPLC 法

分析条件如表 2 所示。分析柱采用了 TSKgel ODS-100V  $5\ \mu\text{m}$ ，流动相使用乙腈、水以及乙酸的混合溶剂进行分离。

通过荧光检测器，检测到了赭曲霉毒素 A 自带的天然荧光。并测定与图 3 中相同的各样品溶液，得到的色谱图如图 4 所示。

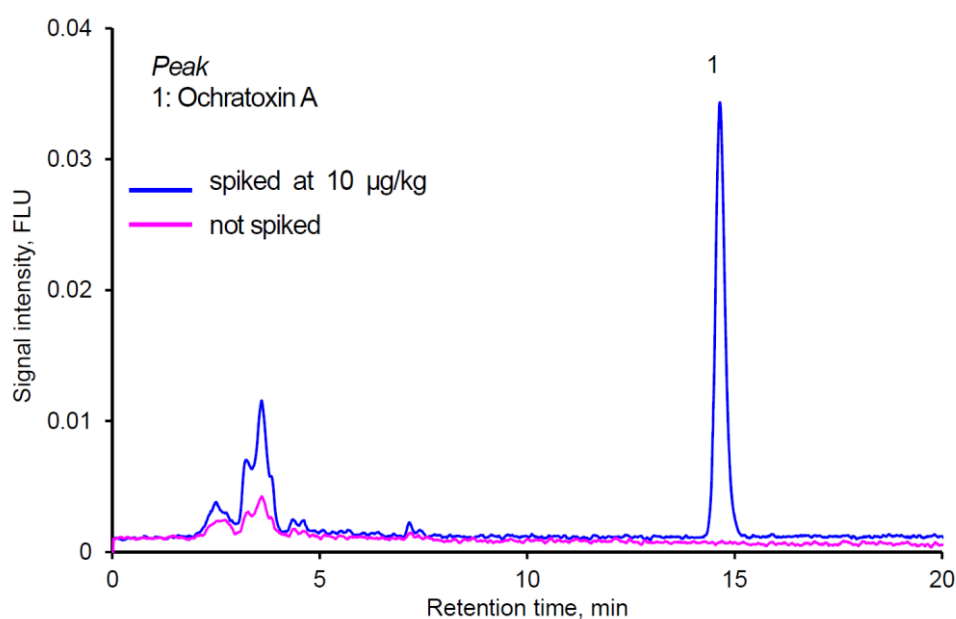


图 4 大麦提取样品（加标与未加标）的色谱图（HPLC 法）  
加标浓度：赭曲霉毒素 A 含量为  $10\ \mu\text{g}/\text{kg}$

表 2 分析条件 (HPLC 法)

Column : TSKgel ODS-100V 5 $\mu$ m (4.6 mmI.D. $\times$ 250 mm, 5 $\mu$ m)
Eluent : CH <sub>3</sub> CN / H <sub>2</sub> O / CH <sub>3</sub> COOH = 480 / 510 / 10
Flow rate : 1.0 mL/min
Column temp. : 45 °C
Injection volume : 100 $\mu$ L
Detection : FLD (Ex; 333 nm, Em; 460 nm)

两种检测方法的赭曲霉毒素 A 定量范围、重现性、定量限以及回收率, 如表 3 所示。根据标准样品得到的校准曲线结果显示, 两种分析方法在 0.5~10  $\mu$ g/L 的浓度范围内, 均呈良好的线性关系, 相关系数为  $r^2=0.999$ 。定量下限值(LOQ)为 0.16 和 0.29  $\mu$ g/L, 在用上述检测方法中的前处理方法时, 大麦中含有的赭曲霉毒素 A 浓度分别相当于 0.16  $\mu$ g/kg 和 0.29  $\mu$ g/kg。

经确认, 完全可以检测出 CODEX 规定的检测限的 1/10 浓度。另外, 将添加了 10  $\mu$ g/kg 赭曲霉毒素 A 标准物质的大麦作为样品, 测得的回收率为 102.4 % 和 89.0 %, 结果良好。

表 3 各分析法的定量范围、重现性、定量限以及回收率

Methods	Calibration curve		RSD (% , n=6)	LOQ		Recovery(%)
	Range( $\mu$ g/L)	$r^2$	(at 5 $\mu$ g/L)	( $\mu$ g/L)	( $\mu$ g/kg: barley)	(at 10 $\mu$ g/kg: barley)
LC/MS	0.5-10	0.999	1.57	0.16	0.16	102.4
HPLC	0.5-10	0.999	0.55	0.29	0.29	89.0