

使用配备ACQUITY QDa质谱检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统对苹果汁中的棒曲霉素进行选择分析

Brian Tyler 和 Jennifer A. Burgess
沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德)

解决方案优势

确保能够检测出苹果汁中含量低于法规要求十分之一的棒曲霉素和婴儿食品中含量为相关法规要求的二分之一的棒曲霉素。

ACQUITY QDa™检测器可与UPLC®和HPLC系统结合，以提供稳定可靠的正交检测。

采用SIR选择性检测模式可实现可靠的定量检测，而能够同时采集完整质谱的RADAR™技术可以在方法开发和日常分析中提供所有背景干扰的信息。

新型ACQUITY® QDa检测器可轻松添加到现有液相色谱工作流程中，从而显著提高使用LC检测器获得的选择性。

沃特世解决方案

ACQUITY QDa检测器
ACQUITY UPLC® H-Class系统
MassLynx®软件
TargetLynx™应用软件
Oasis® HLB样品提取产品

关键词

棒曲霉素，霉菌毒素，
ACQUITY QDa 检测器，食品安全，苹果汁

简介

棒曲霉素是由多种青霉菌、曲霉菌和丝衣霉菌生成的霉菌毒素，常见于苹果中。在加工前已变质或有损伤的苹果更易受到产生棒曲霉素霉菌的污染。

对苹果适当的处理和储藏对于阻止产生棒曲霉素霉菌的生长十分重要。将已受到棒曲霉素污染的苹果加工成果汁时，可能会产生高浓度的棒曲霉素。棒曲霉素的热稳定性使其在巴氏灭菌过程中不易分解。

棒曲霉素对人体的作用尚不清楚，但在小鼠和大鼠实验中观察到肠道病变和胃出血。鉴于这样的毒性，U.S. FDA规定苹果汁和苹果汁浓缩物中棒曲霉素的最大残留量(MRL)为50 µg/kg¹。包括中国、日本和欧盟在内的其他国家同样也将苹果汁产品中棒曲霉素的最大污染量规定为50 µg/kg。欧盟所规定的固体苹果产品中的棒曲霉素限值更低(25 µg/kg)，例如苹果泥和婴幼儿专用产品(10 µg/kg)²。

为了保护生产商和消费者，需要进行准确的检测以防止苹果汁受到棒曲霉素的污染。棒曲霉素的检测通常使用LC在UV检测波长为273 nm的条件下分离。而在苹果汁的巴氏杀菌过程中产生的5-羟甲基糠醛(HMF)成分在此波长下同样也会有紫外吸收。其结构式如图1所示。

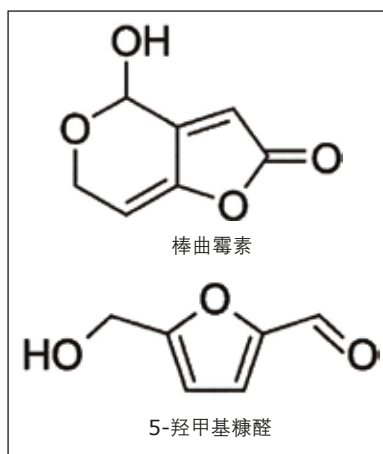


图1. 棒曲霉素和HMF的结构式。

实验

UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC H-Class
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
柱温:	40°C
进样体积:	10 µL
流速:	0.60 mL/min
流动相A:	0.1% NH ₄ OH水溶液
流动相B:	0.1% NH ₄ OH乙腈溶液
弱洗针液:	50:50 水/甲醇
强洗针液:	50:50 水/甲醇
密封清洗液:	90:10 水/乙腈

MS条件

MS系统:	ACQUITY QDa检测器 (性能)
电离模式:	ESI -
毛细管电压:	0.8 kV
脱溶剂气温度:	500°C
源温度:	150°C
锥孔电压:	2 V
棒曲霉素SIR:	152.9
HMF SIR:	124.8
采样速率:	5 Hz

固相萃取³

从本地超市购买苹果汁，经过滤和巴氏杀菌后装瓶。通过SPE萃取果汁。

小柱:	Oasis HLB 3 cc/60 mg
调整:	3 mL甲醇 3 mL水
上样:	2.5 mL样品
清洗1:	3 mL 1% NaHCO ₃ (1 g/100 mL)
清洗2:	1 mL 0.1%乙酸 在真空下干燥
洗脱:	2 x 1.5 mL甲基叔丁基醚 (MTBE)中10乙酸乙酯
复溶:	500 µL水

整个制备过程最后得到五倍浓度的样品。因此，在制备校准标准品时考虑了此浓缩步骤(苹果汁中5-200 µg/L的浓度范围等同于瓶装校准浓度范围25-1000 µg/L)。

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.60	99	1	6
1.80	0.60	99	1	6
2.30	0.60	10	90	6
2.80	0.60	10	90	6
2.81	0.60	99	1	6
5.00	0.60	99	1	6

表1. 用于分析苹果汁中棒曲霉素的UPLC梯度法。

使用UV检测分析棒曲霉素时，HMF是潜在的干扰因素。此外，UV方法勉强能够满足婴幼儿产品所需的最低检测限的要求。为了提升选择性并降低定量限，在分析棒曲霉素时需进行质谱检测³。使用质谱进行分析时，部分实验室可能需要调整工作流程、基础设施或资源以便操作和维护系统。为了让实验室能够充分利用质谱检测的优势，同时避免因新增质谱仪所带来的问题，我们开发了Waters® ACQUITY QDa质谱检测器。

本应用纪要介绍了一种使用ACQUITY QDa检测器进行质谱检测的ACQUITY UPLC方法。新型ACQUITY检测器可轻松添加到现有液相色谱的工作流程中，以显著提高使用LC检测器获得的选择性能。ACQUITY QDa检测器专为色谱系统而设计，可以方便地在现有实验室配置中使用。

结果与讨论

检测和定量

使用单离子记录(SIR)监测棒曲霉素和5-羟甲基糠醛(HMF)，同时利用RADAR技术采集全谱数据。通过UV检测分析棒曲霉素时，由于两种化合物在273 nm波长下都会有紫外吸收，因此需要达到基线分离。而利用质谱检测进行棒曲霉素分析时，由于两种化合物的质量数不同(棒曲霉素和HMF的 m/z 分别为153和125)，因此不需要基线分离。虽然使用质谱时无需分离HMF，但如有必要，也可将质谱检测与UV检测相结合以实现HMF和棒曲霉素的分离(此处未显示)。但质谱检测的检测限更低³。

如图2所示，在苹果汁中成功检测到棒曲霉素，并通过SIR质谱检测模式提高分析的选择性。检出的棒曲霉素加标浓度低至1 $\mu\text{g/L}$ 。最低加标浓度为5 $\mu\text{g/L}$ ，得到高于10的信噪比(S/N)（使用峰到峰的计算方式）。此浓度低于苹果汁中棒曲霉素EU和FDA规定浓度的十分之一，是婴儿食品中棒曲霉素EU限值的一半。

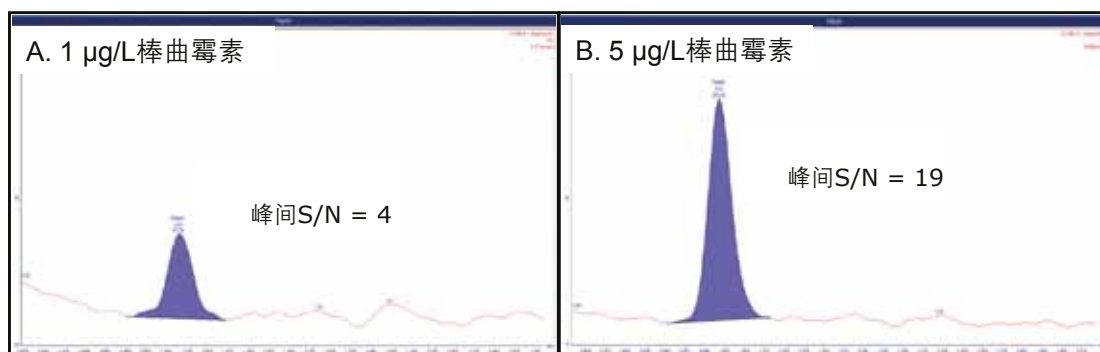


图2.加标至萃取苹果汁、浓度等同于A. 1 $\mu\text{g/L}$ 和B. 5 $\mu\text{g/L}$ 的棒曲霉素的单离子记录(SIR)色谱图。
B.在每个色谱图中标明了信噪比(使用峰间法计算)。

图3显示了棒曲霉素后加标萃取苹果汁的校准曲线，以建立5至200 $\mu\text{g/L}$ 范围内的基质匹配校准曲线。在此范围内获得了极佳的线性，其相关系数(r^2)为0.999。

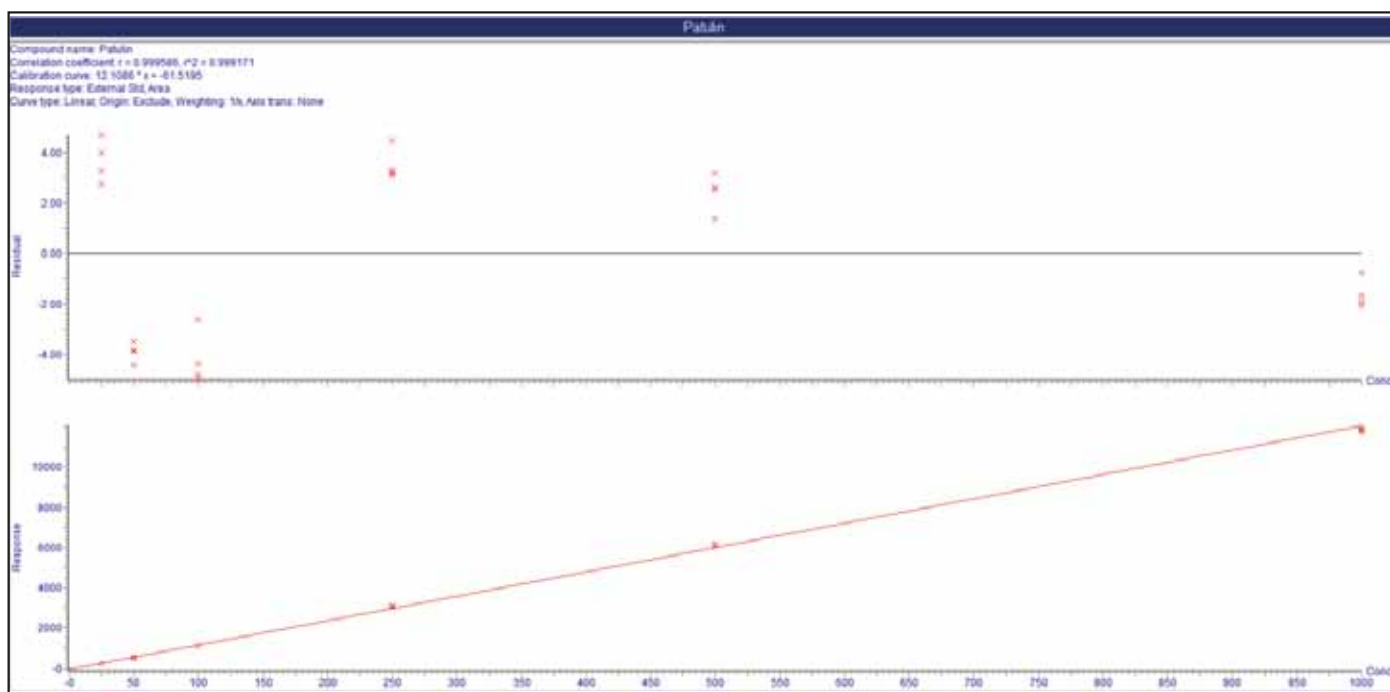


图3. 萃取苹果汁中棒曲霉素的校准曲线，等同于5-200 $\mu\text{g/L}$ 。

基质效应和 RADAR

由于与目标分析物一起提取出的基质会产生干扰，因此食品和饮料的分析通常很复杂。也正因为如此，评价基质所产生的效应十分重要，如有必要，还可以调整样品制备方案或色谱方法以确保方法的可靠性。利用所述样品制备过程，将棒曲霉素加标萃取苹果汁在整个校准范围内的响应与棒曲霉素加标水的响应进行对比。通过将基质中的校准曲线斜率与溶剂标准品(水)中的校准曲线斜率相比可达到此对比目的。图4显示了棒曲霉素水溶液的校准曲线，其范围与图3所示基质匹配校准曲线相同。从苹果汁的基质效应中观察到的信号抑制约为10%，证实了方法的可靠性。

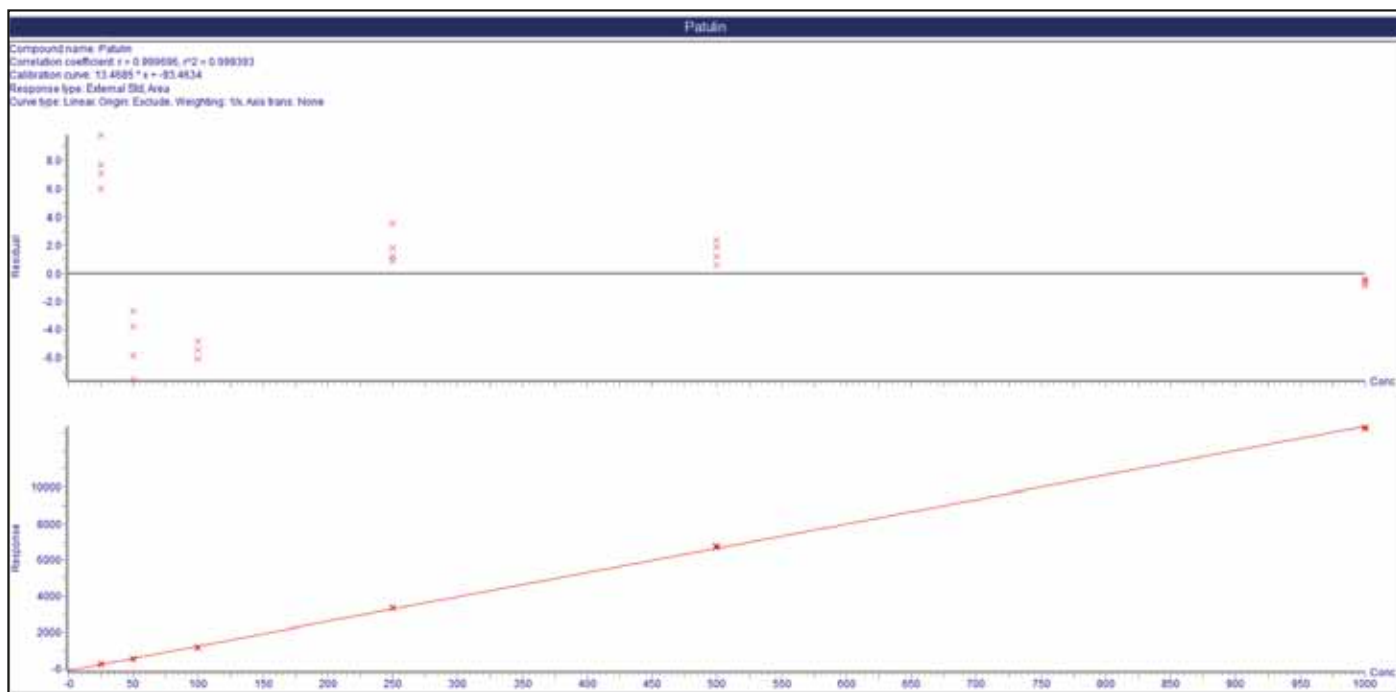


图4. 棒曲霉素水溶液的校准曲线，等同于5-200 $\mu\text{g/L}$ 。

SIR质谱检测模式的使用极大提高了方法的选择性，并降低了干扰UV分析的共提组分的影响。质谱检测的另一个优势是可以在整个目标质荷比(m/z)范围内采集全谱数据。沃特世的RADAR技术实现了SIR通道和全谱背景数据的同步采集。此项技术尤其有利于监测食品和饮料基质中高背景基质的干扰。本研究在分析棒曲霉素相同的电离模式(阴离子ESI)下采集全谱数据。图5显示了所得的背景基峰强度色谱图，以及同时采集到棒曲霉素和HMF的SIR通道。在这些色谱图中可以观察到，棒曲霉素在低基质干扰区域发生洗脱。这进一步确保了方法的可靠性，并尽可能减少了苹果汁中棒曲霉素可能发生的基质效应。

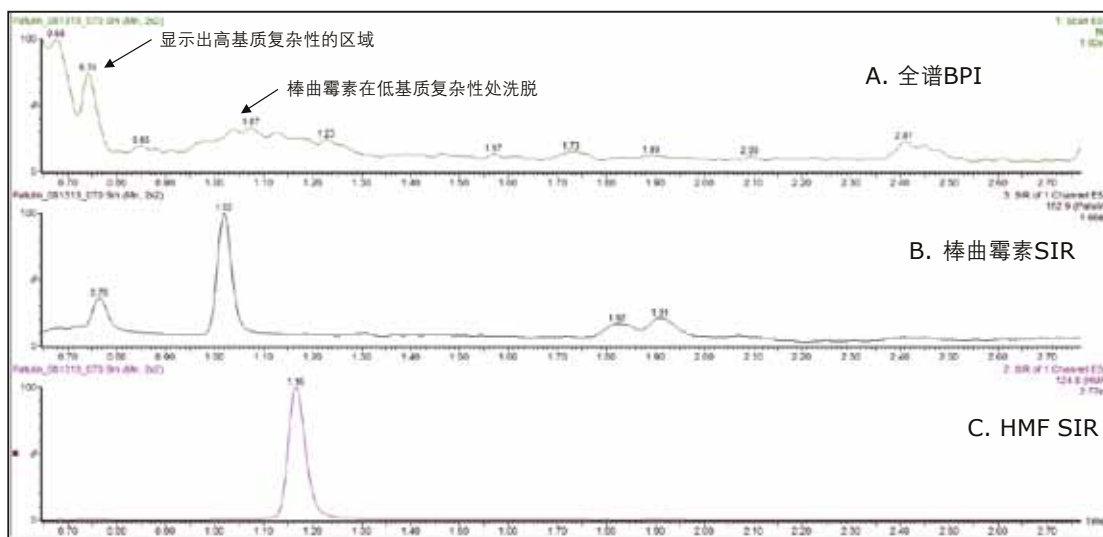


图5. 萃取苹果汁的全谱基峰强度(BPI)色谱图(A)、50 $\mu\text{g/L}$ 棒曲霉素SIR (B)和HMF SIR (C)的BPI色谱图。利用RADAR技术同时采集全谱数据。

重复性

为了评价重现性，用苹果汁中5 $\mu\text{g/L}$ 的样品进行了50次重复进样实验。图6显示了TargetLynx应用软件所绘制的TrendPlot结果。重现性为9%，完全符合EU法规2002/657/EC规定的20%的容差范围⁴。



图6. 用萃取苹果汁中的5 $\mu\text{g/L}$ 棒曲霉素进样50次的峰面积重复性。

结论

- 配备ACQUITY QDa检测器的ACQUITY UPLC H-Class系统能够定量苹果汁中含量低于果汁法规要求十分之一的棒曲霉素, 以及婴儿食品中含量为相关EU法规要求的二分之一的棒曲霉素。
- RADAR技术实现了SIR通道和全质谱数据的同步采集, 从而提供了强大的工具来获取背景干扰信息。在方法开发过程和日常分析中, 当基质干扰变化可能会影响到结果时, 此项技术尤为有用。
- ACQUITY QDa检测器促进了质谱检测在实验室中的运用, 增强了化合物鉴定的可靠性, 并提高了食品和饮料分析检测的选择性。

参考文献

1. US FDA website: <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/NaturalToxins/ucm212520.htm>
2. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 Section 2.3.
3. J Morphet, Rapid Analysis of Patulin Contamination in Apple Juice. Waters Application Note no. 720002410en, 2008.
4. Commission Directive 2002/657/EC, Off. J. of the European Communities No. L221/8.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY, ACQUITY UPLC, UPLC, MassLynx, Oasis 和 The Science of What's Possible 是沃特世公司的注册商标。ACQUITY QDa, RADAR, TargetLynx 和TrendPlot是沃特世公司的商标。其他所有商标 各自所有者所有。

©2013沃特世公司。中国印制
2013年9月 720004788ZH AG-PDF

沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 6555
成都: 028 - 6554 5999

沃特斯中国有限公司

香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com

