

# 液相層析串聯式質譜儀運用於飼料中黃麴毒素之分析<sup>(1)</sup>

鄧名志<sup>(2)</sup> 李免蓮<sup>(2) (3)</sup> 徐阿里<sup>(2)</sup>

收件日期：95年10月18日；接受日期：96年3月27日

## 摘要

飼料配方中使用多種穀類原料，黃麴毒素普遍發生於穀類原料，文獻記載以黃麴毒素B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 為這類黴菌毒素毒性最強，因此，對於飼料中黃麴毒素含量有瞭解的必要。本試驗中使用免疫吸附管柱 (immunoaffinity column) 純化並搭配液相層析串聯式質譜儀 (Liquid chromatography/tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)，發展出具有靈敏度及選擇性之黃麴毒素分析方法，使用三段式四極棒質譜儀 (Triple quadrupole mass spectrometer) 搭配渦輪噴灑離子源 (TurboIon Spray source) 在正離子的模式下偵測黃麴毒素。整體分析回收率分別為：黃麴毒素B<sub>1</sub> 73.52%、黃麴毒素B<sub>2</sub> (Aflatoxin B<sub>2</sub>, AFB<sub>2</sub>) 80.70%、黃麴毒素G<sub>1</sub> (Aflatoxin G<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>) 81.62% 以及黃麴毒素G<sub>2</sub> (Aflatoxin G<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub>) 87.28%，其變異係數 (coefficient of variation, CV) 範圍介於6.43%至9.20%之間。四種黃麴毒素之偵測極限 (LOD, S/N=3) 為0.06~0.11 ng/mL，四種黃麴毒素之定量極限 (LOQ, S/N=10) 為0.25~0.69 ng/mL，儀器對於四種黃麴毒素之CV介於3.33%至5.63%之間。本方法可應用於飼料化驗分析。

關鍵詞：飼料、黃麴毒素、免疫吸附管柱、液相層析串聯式質譜儀。

## 緒言

黃麴毒素受到重視起因於1960年在英國發生了因餵食被真菌污染的花生粕，導致大批火雞突然死亡的事件。黃麴毒素於自然界中主要是由屬於麴菌屬 (*Aspergillus*) 的黃麴菌 (*A. flavus*) 及寄生麴菌 (*A. parasiticus*) 這兩種真菌所產生的次級代謝產物 (secondary metabolites)，依據黃麴毒素螢光的顏色以色層法分為4種不同的化合物，並命名為AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>及AFG<sub>2</sub> (圖1)，B為藍色，G為綠色，並依據其相對遷移率加下標。黃麴毒素具有潛在性的肝毒害 (hepatotoxin) 及致癌物 (carcinogen)，中毒症狀有嗜眠、垂翼、體溫上升和神經症狀，會造成雞隻生長性能及飼料利用效率降低，其毒害作用對畜禽業者造成極大的經濟損失。國際癌症研究中心 (International

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1359號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所營養組。

(3) 通訊作者，E-mail：mainlian@mail.tlri.gov.tw。

Agency for Research on Cancer, IARC) 將AFB<sub>1</sub>定為group1致癌物，而AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>及AFG<sub>2</sub>定為group 2B可能致癌物 (IARC, 1993)。食物及飼料於自然環境下所產生黃麴毒素以AFB<sub>1</sub>較多，但經由改變黴菌的生長環境可產生較多的AFG<sub>1</sub>。

薄層色層分析法 (Thin-layer chromatography, TLC) 用於檢測黃麴毒素已有30年，主要優勢在於容易、快速及便宜 (Holcomb *et al.*, 1992; Le Tutour *et al.*, 1984)。隨著前處理技術與液相層析儀 (Liquid chromatography, LC) 設備的提升，逐漸將黃麴毒素檢測技術轉移至液相層析儀，液相層析儀配合螢光偵測器 (Fluorescence detector) 是現今常使用於檢測黃麴毒素的分析設備，因為其具備高解析度的管柱及靈敏度高的螢光偵測器 (Blesa *et al.*, 2003; Garcia-Villanova *et al.*, 2004; Holcomb and Thompson., 1991; Nilufer and Boyacioglu, 2002; Reif and Metzger, 1995; Stroka *et al.*, 2001)。為了降低螢光偵測器之偵測極限，常使用的下列方法：1. 前處理過程使用三氟醋酸 (Trifluoroacetic acid, TFA)；2. 管柱與偵測器間加裝反應槽 (反應試劑：碘)；3. 管柱與偵測器間使用Kobra cell，將溴化鉀轉變成溴直接導入動相中，靈敏度較碘佳 (Kussak *et al.*, 1995)。然而這些步驟卻增加了實驗複雜性及試劑成本。

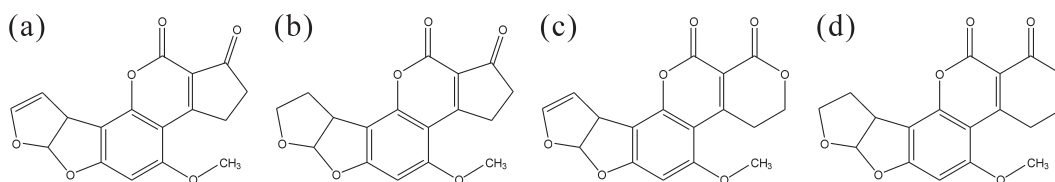


圖 1. 黃麴毒素化學結構：(a)AFB<sub>1</sub>；(b)AFB<sub>2</sub>；(c)AFG<sub>1</sub>；(d)AFG<sub>2</sub>

Fig. 1. Structures of aflatoxins : (a)AFB<sub>1</sub> ; (b)AFB<sub>2</sub> ; (c)AFG<sub>1</sub> ; (d)AFG<sub>2</sub>

隨著質譜儀分析技術的增進，漸漸取代了傳統偵測系統，亦因為離子源技術的改良，改善了液相層析儀與質譜儀間的串聯，逐漸應用於黃麴毒素及其他黴菌毒素的分析 (Blesa *et al.*, 2003; Edinboro and Karnes, 2005; Schatzki and Haddon, 2002; Sorensen and Elbak., 2005; Ventura *et al.*, 2004; Walton *et al.*, 2001)，而黃麴毒素應用於LC/MS/MS具有所有化合物無須添加衍生試劑、高選擇性、高靈敏度以及可同時定性與定量等特點。

台灣位處亞熱帶且屬海島型氣候，高溫多濕，非常適合黴菌的生長，因此飼料原料如玉米、花生等易受黃麴毒素污染，當乳牛攝入此種受污染的飼料後，其中所含的AFB<sub>1</sub>經牛體代謝後轉為另一形式的黃麴毒素M<sub>1</sub> (Aflatoxin M<sub>1</sub>, AFM<sub>1</sub>)，乳汁中便會有AFM<sub>1</sub>的殘留。由於黃麴毒素難以使用加工程序去除及破壞，因此飼料保存及安全監控就格外重要，故本試驗使用免疫吸附管柱純化飼料中黃麴毒素，以LC/MS/MS檢測黃麴毒素的含量，建立一套完整的檢測方法，維護飼料品質及安全。

## 材料與方法

### I. 試驗藥劑

黃麴毒素選購自思必可 (Supelco Co.) 出產的標準儲備液，其AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>及AFG<sub>2</sub>個別配製於苯 (Benzene, C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) / 乙腈 (Acetonitrile, CH<sub>3</sub>CN) = 98/2之溶液中，濃度為3 μg/mL (ppm)，此標準儲備液必須儲存在4℃狀態下，此儲備液稀釋為100 ng/mL (ppb)，用於質譜分

析條件測定。另一黃麴毒素混合標準液配製於甲醇 (Methanol, CH<sub>3</sub>OH)，濃度為AFB<sub>1</sub>及AFG<sub>1</sub>各 1  $\mu$ g/mL，AFB<sub>2</sub>及AFG<sub>2</sub>各 0.3  $\mu$ g/mL，購自思必可，應用於檢量線配製及添加回收率測定。

## II. MS/MS分析條件設定

本研究之MS/MS為Sciex API 3000 ESI-MS/MS系統之三段式四極棒質譜儀 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)，此儀器包含注射幫浦及渦輪噴灑離子源，離子源溫度設定在 420 °C，氣簾氣體 (Curtain gas) 及碰撞氣體 (Collision gas) 是使用高純度氮氣 (99.999%)。多重反應監測 (Multiple reaction monitoring, MRM) 用以測定母離子及碰撞反應後之子離子，以此判讀黃麴毒素碰撞反應游離圖譜，提取最佳母、子離子監測模式。

將 3  $\mu$ g/mL 黃麴毒素標準品以含 0.1 % 甲酸 (Formic acid, FA) 之CH<sub>3</sub>OH 稀釋成 100 ng/mL，使用 1 mL 注射針以注射幫浦 10  $\mu$  L/min 注入質譜儀離子源，找尋Declustering Potential (DP)、Focusing Potential (FP)、Entrance Potential (EP)、Collision Cell Exit Potential (CXP)、Nebulizer Gas (NEB)、Curtain Gas (CUR)、Collision Gas (CAD)、IonSpray Voltage (IS) 等最佳質譜分析參數，以及黃麴毒素之母離子、子離子及其碰撞能量 (Collision Energy, CE) 參數。

## III. 液相層析儀分析條件設定

液相層析儀之動相 (mobile phase) 推進幫浦為 Agilent 1100 series pump，管柱為Zorbax SB-C18 column (5  $\mu$  m, 4.6  $\times$  150 mm)，管柱使用時溫度維持 30 °C。動相組成：動相 A 為 0.1% FA之H<sub>2</sub>O；動相B為 0.1% FA之CH<sub>3</sub>OH。分析之動相梯度列於表1，流速為 350  $\mu$  L/min，樣品注射體積為 10  $\mu$  L。

表 1. 液相層析分析黃麴毒素之動相梯度

Table 1. Mobile phase gradient program was used for the aflatoxins analysis by LC

Time (min)	0	0.5	5	10	11	15
Mobile phase A (%) <sup>1</sup>	50	50	0	0	50	50
Mobile phase B (%) <sup>2</sup>	50	50	100	100	50	50

<sup>1</sup> H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid.

<sup>2</sup> CH<sub>3</sub>OH + 0.1% formic acid.

## IV. 檢量線配製

將黃麴毒素混合標準液以CH<sub>3</sub>OH稀釋至所需檢量線濃度，AFB<sub>1</sub>及AFG<sub>1</sub>：1.5、3.0、6.0、12.0、20.0 ng/mL，AFB<sub>2</sub>及AFG<sub>2</sub>：0.45、0.90、1.80、3.60、6.0 ng/mL，檢量線查核濃度為 5.00 ng/mL。

## V. 黃麴毒素樣品前處理

參照中國國家標準 CNS4090 (1997) 修飾之，取樣品 25 g 添加 2.5 g 氯化鈉 (NaCl)，以 100 mL 80% CH<sub>3</sub>OH 萃取，高速打碎攪拌 1 分鐘。用 Whatman 4 號濾紙粗過濾，吸取濾液 20 mL 以水定量至 100 mL，並用玻璃纖維濾紙 (GF) 細過濾。將免疫吸附管柱裝於 20 mL 針筒下方，吸取濾液 10 mL 置於針筒內，以 1 drop/s 之流速濾出管柱，再以 10 mL 二次去離子水沖提 (1 drop/s) 二次，最後以 2 mL CH<sub>3</sub>OH 以 1 drop/s 之流速將免疫吸附管柱中分析物萃出，濾液收集並上機測試。

## VI. 線性、回收率及儀器再現性測定

依據檢量線配製方法配製不同濃度，經由LC/MS/MS偵測結果，計算求得線性回歸。取黃麴毒素混合標準液（AFB<sub>1</sub>及AFG<sub>1</sub>各 1  $\mu$ g/mL，AFB<sub>2</sub>及AFG<sub>2</sub>各 0.3  $\mu$ g/mL）0.5 mL加入25 g飼料中，依據黃麴毒素前處理步驟執行，處理完成之分析物以LC/MS/MS偵測濃度，推算回收率。配製濃度 5.00 ng/mL 於一天內（Intra-day）以LC/MS/MS測定5次，以及三個不同天（Inter-day）測定11次，所得結果經由統計計算求得儀器分析黃麴毒素含量之再現性。

## 結果與討論

### I. 黃麴毒素於質譜儀之母離子、子離子與各項參數測定

AFB<sub>1</sub>與AFB<sub>2</sub>間以及AFG<sub>1</sub>與AFG<sub>2</sub>間分子量的差異各為2，本研究所使用之MS/MS為三段式四極棒質譜儀，對於這之間的差異具有很好的解析度及靈敏度。此質譜儀具有（1）碰撞活化解離效率高；（2）掃描速度快；（3）高離子傳送率；（4）母離子（precursor ion）質譜與子離子（product ion）質譜皆可得單一質量（Unit mass）解析度；（5）比一般扇形串聯式質譜儀廉價及（6）易用電腦控制等優點（李，1999）。其離子化的方式是使用電灑法（electrospray）再配合高溫氮氣使分析物迅速汽化，使其帶正電荷（positive charge），母離子為 $[M+H]^+$ 。選定所欲分析的母離子後進行第二次的撞擊，使母離子產生碎裂形成許多子離子（圖2），並找尋合適的子離子，其選擇方式必須具備：（1）其母離子碎裂成子離子的轉換具有特異性；（2）子離子的強度必須達到儀器的偵測極限。

調整DP、FP、EP及CXP等參數值以找尋最佳離子強度（表2），並測出NEB=11、CUR=8、CAD=8、IS=5000等參數值為離子源最佳離子化條件參數，藉由調整CE參數得到最佳子離子的偵測強度及最佳母離子與子離子之偵測強度比例（表2）。

表 2. 質譜儀儀器各項分析參數

Table 2. Instrument parameters of mass spectrometry

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Declustering potential (V)	Focusing potential (V)	Collision energy (V)	Collision cell exit potential (V)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	313	285	70	370	32.6	8.0
	313	269	70	370	43.2	18.1
Aflatoxin B <sub>2</sub>	315	287	68	380	36.8	8.1
	315	259	68	380	42	17.2
Aflatoxin G <sub>1</sub>	329	243	74	370	36.7	16.1
	329	311	74	370	30.8	9.1
Aflatoxin G <sub>2</sub>	331	313	53	380	35.9	9.1
	331	245	53	380	42	6.8

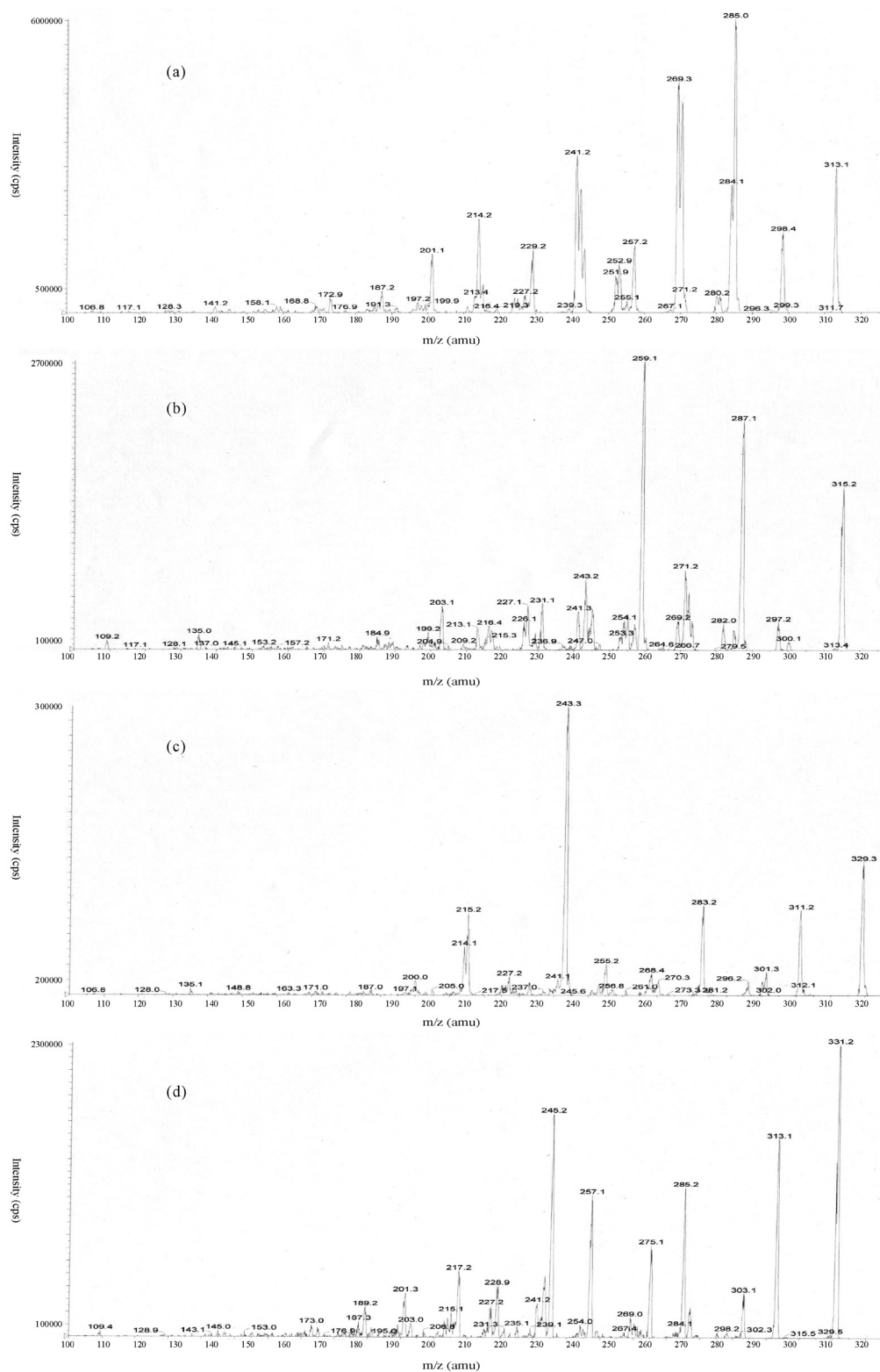


圖 2. 黃麴毒素質譜圖：(a) Aflatoxin B<sub>1</sub>；(b) Aflatoxin B<sub>2</sub>；(c) Aflatoxin G<sub>1</sub>；(d) Aflatoxin G<sub>2</sub>。

Fig. 2. Mass spectrometry of Aflatoxins：(a) Aflatoxin B<sub>1</sub>；(b) Aflatoxin B<sub>2</sub>；(c) Aflatoxin G<sub>1</sub>；(d) Aflatoxin G<sub>2</sub>。



## II. LC/MS/MS對黃麴毒素分析效能

本研究以逆相 (reverse phase) 色層分析法分離黃麴毒素，原先採用H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH = 50/50之動相比比例分離黃麴毒素，但黃麴毒素至偵測器的時間超過15分鐘且訊號波寬 (peak width) 過寬，不僅拖長整體分析時間且波寬太寬造成定量誤差變大及靈敏度變差，因此將動相採以梯度方式分離黃麴毒素。先以H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH=50/50之動相比分離黃麴毒素，0.5分鐘後增加CH<sub>3</sub>OH之比例，至5分鐘CH<sub>3</sub>OH比例為100%，隨著動相極性的下降將黃麴毒素快速沖提出管柱並產生凝聚的效果，使四種黃麴毒素能在10分鐘內完成分析且訊號波寬明顯縮小，波寬介於0.2~0.5 min之間，其波寬明顯優於 Ventura *et al.* (2004) 之波寬 (0.5~0.8 min)。

依據黃麴毒素極性與化學結構不同，分別於不同的時間到達偵測器，先後順序為AFG<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFB<sub>1</sub>。為了縮短分析時間及波寬，卻也造成AFG<sub>2</sub>與AFG<sub>1</sub>間以及AFB<sub>2</sub>與AFB<sub>1</sub>間之訊號產生些許重疊 (圖3)，但四者間母離子與子離子之質荷比 (m/z) 不相同 (表2)，因此可藉由MRM偵測四者間的差異，在同一系統下對4種黃麴毒素個別偵測，並顯示個別層析圖譜 (圖3)，依據個別圖譜訊號積分定量，不受訊號重疊影響。若是使用螢光偵測器，則必須將黃麴毒素於層析系統完全分離，否則無法準確定量，另，若有其他物質會釋放相同波長螢光且與分析訊號重疊，亦會干擾訊號積分定量，此為質譜儀分析之優勢。

## III. 黃麴毒素之定量分析

檢量線線性濃度範圍為0.45~20.00 ng/mL，其線性 (r) 達0.999 (表4)。查核濃度為5.00 ng/mL，於同一日進行5次測定，CV值 (Intra-day) 從3.33%至5.55%，分成三日進行11次測定，CV值 (Inter-day) 從4.34%至5.63% (表3)，Garcia-Villanova *et al.* (2004) 以螢光偵測器檢測四種黃麴毒素，所得標準偏差為2.23%~5.69%，顯示兩種偵測系統對於黃麴毒素偵測皆具有良好再現性及穩定性。四種黃麴毒素之偵測極限 (LOD, S/N = 3) 為0.06~0.19 ng/mL (表4)，四種黃麴毒素

表 3. 黃麴毒素於LC/MS/MS之變異係數(CV)

Table 3. The coefficient of variation (CV) for aflatoxins detected by LC/MS/MS

CV (%)	Aflatoxins			
	Aflatoxin B <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>2</sub>	Aflatoxin G <sub>1</sub>	Aflatoxin G <sub>2</sub>
Intra-day <sup>a</sup> (n=5)	3.73	3.54	5.55	3.33
Inter-day <sup>b</sup> (n=11)	5.63	4.34	4.76	4.44

<sup>a</sup>. CV value obtained at one day.

<sup>b</sup>. CV value obtained from three different days.

表 4. 黃麴毒素於LC/MS/MS之線性、偵測極限(S/N = 3)與定量極限(S/N = 10)

Table 4. Linearity, limit of determination (LOD, S/N=3) and limit of quantitation (LOQ, S/N=10) for aflatoxins measured by LC/MS/MS

Aflatoxins	Linearity (r)	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	0.996~0.999	0.07	0.20
Aflatoxin B <sub>2</sub>	0.997~0.999	0.06	0.22
Aflatoxin G <sub>1</sub>	0.997~0.999	0.11	0.37
Aflatoxin G <sub>2</sub>	0.997~0.999	0.19	0.69

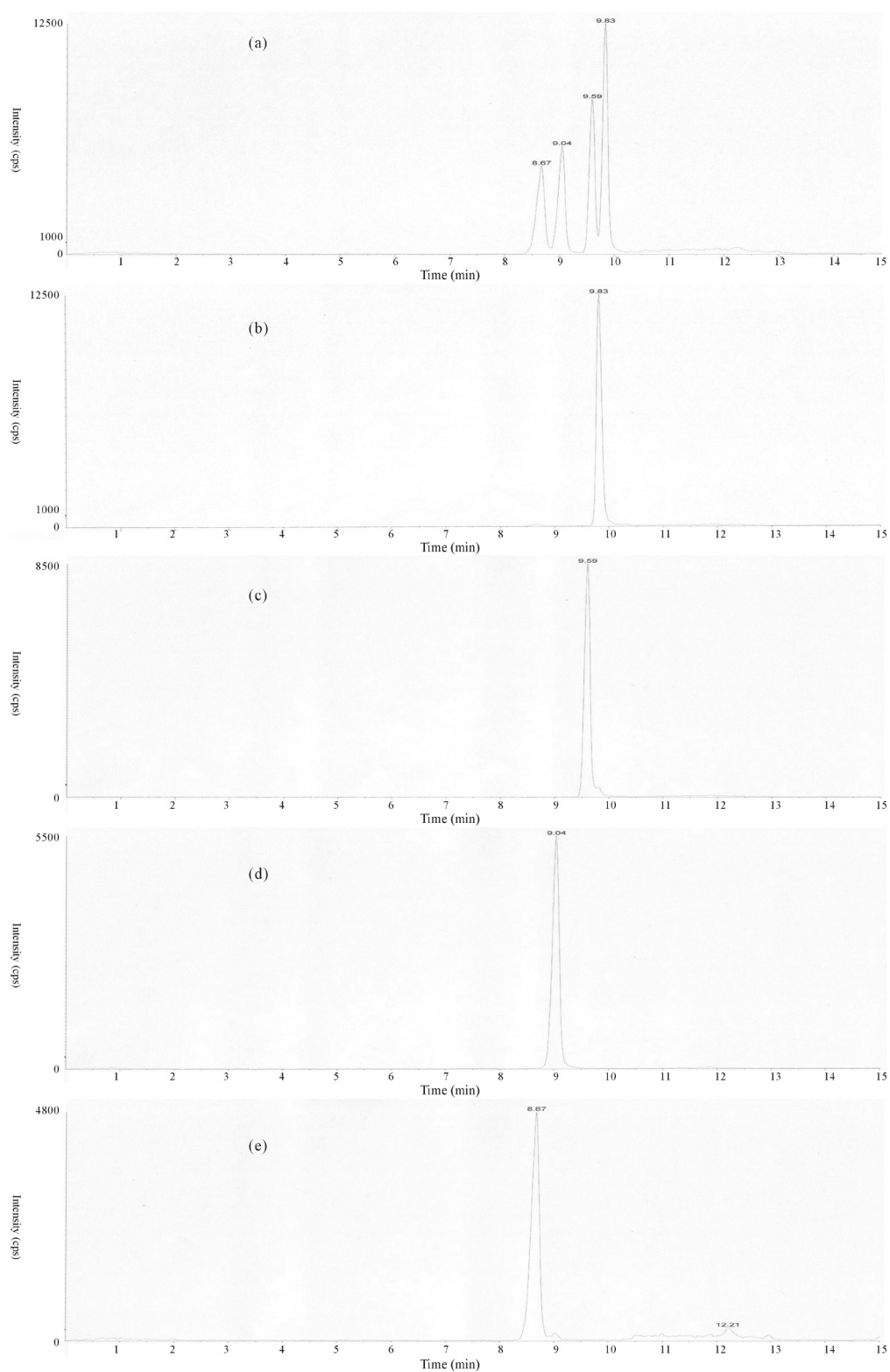


圖 3. (a)黃麴毒素標準混合液層析全圖譜；MRM層析圖譜 (b) Aflatoxin B<sub>1</sub>；(c) Aflatoxin B<sub>2</sub>；  
(d) Aflatoxin G<sub>1</sub>；(e) Aflatoxin G<sub>2</sub>。

Fig. 3. (a) Total chromatogram of aflatoxins standard mixture; MRM chromatograms of (b) Aflatoxin B<sub>1</sub>；  
(c) Aflatoxin B<sub>2</sub>；(d) Aflatoxin G<sub>1</sub>；(e) Aflatoxin G<sub>2</sub>。

定量極限 (LOQ, S/N = 10) 為 0.20~0.69 ng/mL，其中 AFG<sub>2</sub> 之訊號最弱，因此達到定量極限之量需 0.69 ng/mL (表 4)。Blesa *et al.* (2003) 以液相層析／螢光光譜儀及單一質譜儀偵測黃麴毒素，螢光光譜儀之 LOD 為 0.08~1.45 ng/mL，LOQ 為 0.25~5.00 ng/mL，單一質譜儀之 LOD 為 1.35~3.80 ng/mL，LOQ 為 4.00~12.00 ng/mL。本試驗之 LOD 及 LOQ 皆優於 Blesa *et al.* (2003) 試驗中螢光光譜儀及單一質譜儀之 LOD 及 LOQ，而且本試驗 LOQ 低於歐盟所規定的最低檢出標準 (AFB<sub>1</sub> = 2 ppb)。

#### IV. 回收率測定結果

Blesa *et al.* (2003) 以 C18 矽膠粒子作為吸附劑，乙腈為沖提液，萃取純化花生中黃麴毒素，其回收率為 78%~86%。Ventura *et al.* (2004) 以固相萃取法萃取純化草藥中黃麴毒素，回收率為 77.6%~110.4%。本試驗以免疫吸附管柱純化分析物，取黃麴毒素混合標準液 (AFB<sub>1</sub> 及 AFG<sub>1</sub> 各 1 µg/mL，AFB<sub>2</sub> 及 AFG<sub>2</sub> 各 0.3 µg/mL) 0.5 mL 添加於 25 g 飼料中，測定整體分析系統對於飼料樣品中黃麴毒素之回收率，並執行 10 次測定 (n=10)，四種黃麴毒素回收率介於 73.52% 至 87.28% 之間，CV 值介於 6.43% 至 9.20% 之間 (表 5)，具有良好且穩定的回收率。

表 5. 黃麴毒素添加於飼料樣品之回收率 (n=10)

Table 5. Recovery of four different aflatoxins from spiked feed samples, n=10

Compound	Recovery (%) (Mean ± SD)	CV (%)
Aflatoxin B <sub>1</sub>	73.52 ± 4.73	6.43
Aflatoxin B <sub>2</sub>	80.70 ± 7.42	9.20
Aflatoxin G <sub>1</sub>	81.62 ± 6.04	7.39
Aflatoxin G <sub>2</sub>	87.28 ± 8.00	9.16

## 結論

LC/MS/MS 應用於黃麴毒素分析具有高靈敏度、高解析度、無須衍生化及可同時定性定量等優勢，並配合新型離子源 (渦輪噴灑離子源) 使分析物汽化與離子化更加完全，增強了質譜儀偵測效能。另外 MRM 可對各個黃麴毒素同時多工鑑定，並不會干擾其他分析物之鑑別，在定性定量上是一項利器。隨著國際組織及國內對於有毒物質之不可檢出量不斷下修，LC/MS/MS 之良好的偵測極限與靈敏度必能迎合這個趨勢，而且不論在樣品前處理步驟或是 LC/MS/MS 之偵測都具有很好的再現性。未來將黃麴毒素之分析技術轉移至 LC/MS/MS 使用，是一項可行且必然的方向。

## 參考文獻

中國國家標準 CNS4090。1997。食品中黃麴毒素檢驗法。

李茂榮。1999。第五章 低能量碰撞誘導解離之串聯式質譜儀。科儀叢書 5-質譜分析術專輯。民全書局，台北，pp. 99。



- Blesa, J., J. M. Soriano, J. C. Moltó, R. Marín and J. Mañes. 2003. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1011 : 49-54.
- Edinboro, L. E. and H. T. Karnes. 2005. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in sidestream cigarette smoke by immunoaffinity column extraction coupled with liquid chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1083 : 127-132.
- Garcia-Villanova, R. J., C. Cordon, A. M. G. Paramas, P. Aparico and M. E. G. Rosales. 2004. Simultaneous immunoaffinity column cleanup and HPLC analysis of aflatoxins and ochratoxin A in Spanish bee pollen. *J. Agric. Food Chem.* 52 : 7235-7239.
- Holcomb, M., D. M. Wilson, M. W. Truckess and H. C. Thompson. 1992. Determination of aflatoxins in food products by chromatography. *J. Chromatogr. A* 624 : 341-352.
- Holcomb, M. and H. C. Thompson. 1991. Analysis of aflatoxins (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>) in rodent feed by HPLC using postcolumn derivatization and fluorescence determination. *J. Agric. Food Chem.* 39 : 137-140.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. 56 : 489.
- Kussak, A., B. Andersson and K. Andersson. 1995. Immunoaffinity column clean-up for the high-performance liquid chromatographic determination of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub> and Q<sub>1</sub> in urine. *J. Chromatogr. B* 672 : 253-259.
- Le Tutour, B., A. Tantaoui-Elaraki and A. Aboussalim. 1984. A simultaneous thin layer chromatographic determination of aflatoxin B<sub>1</sub> and ochratoxin a in blank olives. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67: 611-612.
- Nilufer, D. and D. Boyacioglu. 2002. Comparative study of three different methods for determination of aflatoxins in tahini. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 3375-3379.
- Reif, K. and W. Metzger. 1995. Determination of aflatoxins in medicinal herbs and plant extracts. *J. Chromatogr. A* 692 : 131-136.
- Schatzki, T. F. and W. F. Haddon. 2002. Rapid, non-destructive selection of peanuts for high aflatoxin content by soaking and tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 50 : 3062-3069.
- Sorensen L. K. and T. H. Elbak. 2005. Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 820 : 183-196.
- Stroka, J. S., E. Anklan, U. JöRissen and J. Gilbert. 2001. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in baby food (infant formula) by immunoaffinity column cleanup liquid chromatography with postcolumn bromination: collaborative study. *J. AOAC Int.* 84 : 1116-1123.
- Ventura, M., A. Gómez, I. Anaya, J. Díaz, F. Broto, M. Agut and L. Comellas. 2004. Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and G<sub>2</sub> in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1048 : 25-29.
- Walton, M., P. Egner, P. F. Scholl, J. Walker, T. W. Kensler and J. D. Groopman. 2001. Liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of urinary aflatoxin biomarkers: characterization and application to dosimetry and chemoprevention in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 14 : 919-926.

## Determination of aflatoxins in feeds by liquid chromatography tandem mass spectrometry<sup>(1)</sup>

Ming-Chih Teng<sup>(2)</sup>, Mian-Lian Lee<sup>(2) (3)</sup> and A-Li Hsu<sup>(2)</sup>

Received : Oct. 18, 2006 ; Accepted : Mar. 27, 2007

### Abstract

Most feeds are formulated with cereals and grains. Aflatoxins occur widely in cereals and grains. Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) is well known as the most toxic of this class of mycotoxins. So, it is necessary to determine the amount of aflatoxins in feeds. In this experiment, we coupled the method of immunoaffinity column clean-up with liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) to produce a sensitive and selective approach for the analysis of aflatoxins. A triple-quadrupole mass spectrometry using a TurboIon Spray source operating in the positive ion mode was used to detect aflatoxins. Recoveries of the full analytical procedure were 73.52% for aflatoxin B<sub>1</sub>, 80.70% for aflatoxin B<sub>2</sub>, 81.62% for aflatoxin G<sub>1</sub> and 87.28% for aflatoxin G<sub>2</sub>, respectively, with the coefficient of variation (CV) values ranging from 6.43% to 9.20%. The limits of detection (LOD, S/N = 3) ranged from 0.06 to 0.11 ng/mL for the four aflatoxins. The limits of quantification (LOQ, S/N = 10) ranged from 0.25 to 0.69 ng/mL for the four aflatoxins. The CV values for the four aflatoxins were from 3.33% to 5.63%. We concluded therefore that this method can be applied to the analysis of aflatoxins in feeds.

Key words: Feeds, Aflatoxins, Immunoaffinity column, Liquid chromatography / tandem mass spectrometry.

---

(1) Contribution No.1359 from Livestock Research Institute (LRI), Council of Agriculture (COA).

(2) Nutrition Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan, Taiwan, R.O.C.

(3) Corresponding author, E-mail: mainlian@mail.tlri.gov.tw