

超高压液相色谱-串联质谱法测定食用植物油中4种黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2

刘晓茂*, 李学民, 王 飞, 张守军, 杨志伟, 曹彦忠

(秦皇岛出入境检验检疫局, 秦皇岛 066004)

摘要: **目的** 建立测定食用植物油中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的优质高效的分析方法。**方法** 采用超高压液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法。样品用乙酸乙酯提取, 弗罗里硅土小柱净化, 经 C₁₈ 色谱柱分离, 以电喷雾离子源在正离子多反应监测(MRM)模式下进行测定, 外标法定量。**结果** 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的检出限均为 0.04 μg/kg, 定量限均为 0.10 μg/kg, 在 0.1~20 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数 *r* 分别为 0.9986, 0.9986, 0.9992, 0.9996。在 0.1~5.0 μg/kg 加标水平内黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的回收率为 79.1%~94.6%, RSD 为 5.0%~9.6%。**结论** 该方法实用、准确、灵敏, 适用于食用植物油中黄曲霉毒素残留量的测定。

关键词: 高压液相色谱-串联质谱; 黄曲霉毒素; 食用植物油

Determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in edible vegetable oil by ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Xiao-Mao*, LI Xue-Min, WANG Fei, ZHANG Shou-Jun, YANG Zhi-Wei, CAO Yan-Zhong

(Qinhuangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qinhuangdao 066004, China)

ABSTRACT: Objective To establish a high-quality and efficiency method for the determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in edible vegetable oil. **Methods** The ultra-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was developed. The sample was extracted by ethyl acetate, cleaned up by florisil solid phase extraction (SPE), separated by C₁₈ column and analyzed by UPLC-MS/MS under multiple reaction monitoring (MRM) mode via positive electrospray ionization, and the determination of aflatoxin was used external standard method. **Results** The detection limits of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 were all 0.04 μg/kg, and the limits of quantitation were 0.10 μg/kg. The method showed good linearity over the range of 0.1~20.0 μg/L with relative correlation coefficient of 0.9986, 0.9986, 0.9992 and 0.9996, respectively. The recoveries of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 at spiked levels in the range of 0.1~5.0 μg/kg were 79.1%~94.6% with relative standard deviations of 5.0%~9.6%. **Conclusion** The method is practical, accurate and sensitive, and it is suitable for the determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in edible vegetable oil sample.

KEY WORDS: ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); aflatoxin; edible vegetable oil

*通讯作者: 刘晓茂, 男, 河北秦皇岛人, 工程师。E-mail: fengbuxi123@163.com

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT), 是由广泛存在于土壤中的黄曲霉菌的孢子, 在合适的条件下侵染寄生体而产生的^[1]。目前已明确结构的黄曲霉毒素有20种以上, 包括B1、B2、G1、G2、M1、M2、P1、Q1等^[2], 它们的结构中都含有一个双呋喃环和一个氧杂萘邻酮, 黄曲霉毒素有剧毒性, 同时有致癌、致畸、致突变的作用, 是目前发现的化学致癌物中最强的物质之一^[3], 其主要存在于被污染过的坚果、谷物、调味品、棉籽、动物性食品如肝脏、咸鱼和奶制品中。用于食用植物油生产的主要原料—花生、大豆等, 在生产、加工、运输、贮藏等各环节均有可能受到黄曲霉侵染, 继而感染黄曲霉毒素, 据报道对全国22个省市区的1172份食用植物油样品进行黄曲霉毒素的检测, 花生油的污染率为47.3%。因此, 欧盟规定花生及其制品中黄曲霉毒素(B1、B2、G1和G2)总量的最大允许水平为4 μg/kg, 而黄曲霉毒素B1不得超过2 μg/kg^[4]。美国对花生及其制品中黄曲霉毒素的最高限量为20 μg/kg, 日本规定其最高限量为10 μg/kg。

食用植物油是我国主要的消费品和出口产品, 由于世界发达国家和地区不断提高黄曲霉毒素残留限量, 我国植物油出口存在隐忧, 食用植物油引发的黄曲霉毒素中毒的事件屡见报端, 而相关研究资料又非常有限。因此, 研究建立食用植物油中黄曲霉毒素残留的检测方法具有重要意义。目前黄曲霉毒素残留检测方法主要有薄层层析法(TLC)^[5]、酶联免疫吸附法(ELISA)^[6-7]、高压液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)^[8]、毛细管电泳法^[9]和液相色谱-质谱法^[10-14]。其中TLC法的前处理过程耗时长、易受杂质干扰且灵敏度较低, 在应用过程中具有一定局限性; ELISA法虽然使用方便安全, 但由于酶本身具有不稳定性, 致使假阳性样品率较高; HPLC-FLD法虽然是现行较常见的方法之一, 但柱前或柱后衍生需要成套设备, 且易对操作者和环境造成污染。本文采用超高压液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)对黄曲霉毒素的残留量进行检测, 考察了前处理条件和仪器测定参数对测定结果的影响, 并对各影响因素进行了较为深入地探讨, 旨在建立一种简单、快速、可靠的提取净化方法, 且方法的检出限和精密度均能满足国内外进出口食品安全检测的要求。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

UPLC超高压液相色谱仪(Waters公司); 5500三重四极杆质谱仪, 配有电喷雾离子源(ESI)(Applied Biosystems公司); 弗罗里硅土(DIKMA公司; 1000 mg, 6 mL); 旋转蒸发器(Buchi公司); 固相萃取装置(天津海洋玻璃仪器厂); 涡旋混匀器; 真空泵。

黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2标准品(Fermentek公司, 纯度99%); 所用溶剂或其它试剂均为分析纯或色谱纯; 所用水为超纯水; 无水硫酸钠(即用即烘)。

标准溶液的配制: 准确称取10 mg黄曲霉毒素标准品于10 mL容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 配制成1000 mg/L储备液, 于-20 °C条件下保存。

1.2 样品的提取与净化

称取2 g(精确至0.01 g)样品至50 mL塑料离心管中, 加入乙酸乙酯, 涡旋混合。弗罗里硅土柱上加入5 g无水硫酸钠, 用10 mL乙酸乙酯淋洗, 再将样品溶液过柱, 待样品溶液全部过柱后, 再用10 mL乙酸乙酯和10 mL乙酸乙酯-甲醇(8/2, v/v)淋洗, 弃去全部流出液和弗罗里硅土柱上面的无水硫酸钠, 用30 mL丙酮-水(99/1)溶液洗脱, 收集洗脱液于鸡心瓶中, 40 °C旋转蒸干, 用1 mL乙腈-水(1/1, v/v)溶液溶解残渣, 过0.2 μm水系滤膜, 待测。

1.3 液相色谱与质谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 35 °C; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL; 流动相: (A)甲酸-水(1/999)溶液, (B)乙腈。梯度洗脱程序: 1 min, 15%B; 1~3 min, 15%~80%B; 3~5 min, 15%B。

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 电喷雾电压(IS): 500 V; 辅助气(AUX)压力: 0.7 MPa; 辅助气温度(TEM): 450 °C; 聚焦电压(FP): 150 V; 去簇电压(DP): 190 V。黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的定量离子对、定性离子对、碰撞能量、驻留时间、保留时间, 见表1所示。

表 1 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的定量离子对、定性离子对、碰撞能量、驻留时间、保留时间
Table 1 Quality ions, quantity ions, collision energy, dwell time and retention time of aflatoxin B1, B2, G1 and G2

黄曲霉毒素	定量/m/z	定性/m/z	碰撞能量/V	驻留 ms	保留时间/min
B1	313.1/285.1	313.1/285.1	33	50	2.90
		313.1/270.1	38		
B2	315.1/287.1	315.1/287.1	36	50	2.77
		315.1/259.1	41		
G1	329.1/243.1	329.1/243.1	37	50	2.78
		329.1/311.1	31		
G2	331.1/245.1	331.1/245.1	39	50	2.64
		331.1/313.1	38		

2 结果与讨论

2.1 提取条件的选择

根据文献报道, 分别使用三氯甲烷、乙腈和乙酸乙酯作为提取液, 比较提取效果。结果表明, 乙酸乙酯的提取效果较好, 提取杂质少, 并且减少所用试剂对人员和环境的污染。

2.2 净化条件的选择

样品经乙酸乙酯溶解后, 如未经 SPE 小柱净化则会在质谱上产生较强的基质效应, 从而造成仪器灵敏度降低。本方法采用弗罗里硅土柱(1000 mg, 6 mL)净化, 通过该 SPE 小柱净化可去除大量的非极性干扰物, 并且通过实验比较了不同体积比的乙酸乙酯-甲醇溶液作为淋洗液的净化效果, 如图 1 所示。结果表明采用 10 mL 乙酸乙酯-甲醇(v/v, 80:20)溶液能够有效去除杂质干扰, 得到较好的回收率。

2.3 液相条件的选择

采用 Acquity BEH C₁₈ UPLC 色谱柱, 填料粒径为 1.7 μm, 与常规液相色谱柱相比, 具有更高的灵敏度、更强的分离能力和更短的分析时间, 可以使待测物组分在较短的时间内实现最大程度的有效分离。分别考察了使用不同洗脱梯度分离黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的效果, 实验结果发现降低流动相中乙腈的比例可以有效分离, 但同时也会导致灵敏度降低, 最终选择 1.3 所示的梯度洗脱程序, 得到较为满意的分离度和灵敏度。为了进一步提高在正离子模式下的灵敏度和分离度, 分别研究了在流动相中添加甲酸体积分数为 0.05%、0.1%、0.2%、0.5% 时, 色谱图的灵敏度和分离度, 结果表明添加 0.1% 甲酸水溶液时

待测物组分分离效果和灵敏度最好。

2.4 质谱条件的选择

根据黄曲霉毒素的结构特征选择 ESI(+) 作为电离模式, 取 1 mg/L 黄曲霉毒素混合标准溶液, 以 10 μL/min 流速注入离子源, 确定定性、定量离子对, 同时对去簇电压(DP)、聚焦电压(FP)、碰撞气能量(CE)及碰撞室出口电压(CXP)等参数进行优化, 优化后的质谱条件见 1.3。从图 3 中可以看出 AFB1 的准分子离子为 313.1, 对其子离子进行全扫描, 主要产生 m/z 285.1、270.1 的子离子; AFB2 的准分子离子为 315.1, 主要产生 m/z 287.1、259.1 的子离子; AFG1 的准分子离子为 329.1, 主要产生 243.1、311.1; AFG2 的准分子离子为 331.1, 主要产生 245.1、313.1。选择 2~3 个响应较强的子离子作为监控的碎片离子, 将其中响应值较高的一个子离子用于定量计算。

2.5 方法的检出限、线性范围及回收率

在优化条件下, 用阴性样品按 1.2 制作空白基质, 配制浓度为 0.10、0.50、1.00、2.00、5.00、20.00 μg/L 的黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 混合标准工作液, 上机测试。以黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的质量浓度 X(μg/L) 为横坐标, 以峰面积 Y 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到线性回归方程及相关系数, 结果见表 2。由表 2 可以看出本方法具有较宽的线性范围, 线性关系良好。

根据 6 个空白花生油样品的基线噪音值求其平均值, 按信噪比 S/N=3 计算检出限 (LOD), 信噪比 S/N=10 计算定量下限 (LOQ), 求得食用植物油中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的 LOD 均为 0.04 μg/kg, LOQ 均为 0.10 μg/kg。

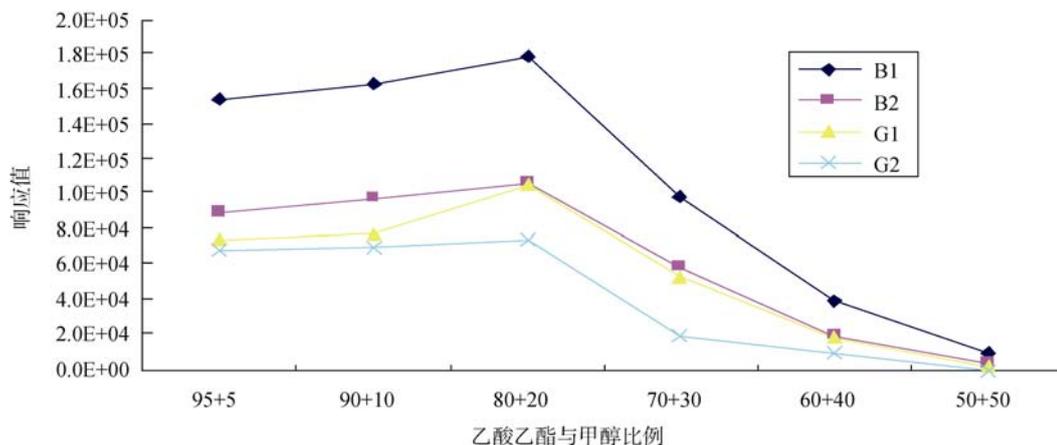


图1 淋洗液的选择

Fig. 1 The choice of eluate

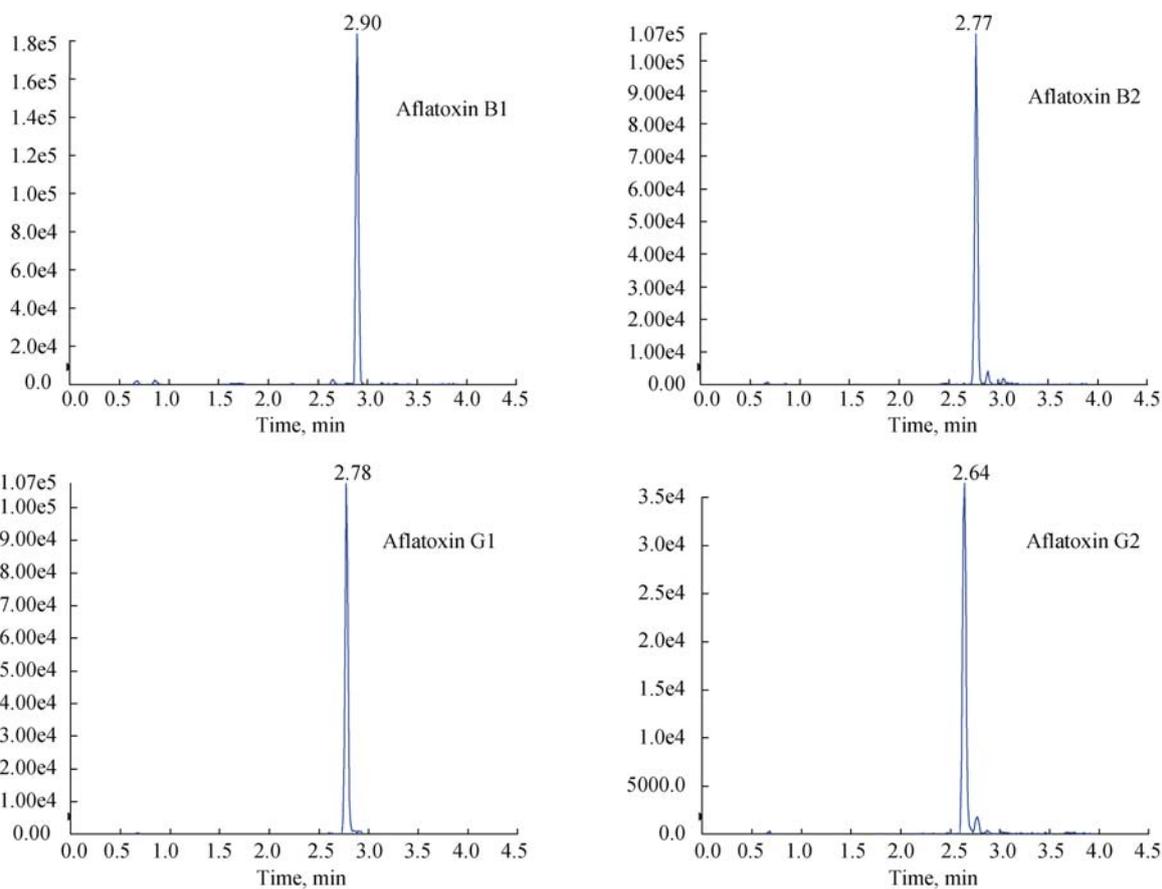


图2 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 多反应监测色谱图

Fig. 2 MRM chromatogram of aflatoxin B1, B2, G1 and G2

对花生油、玉米油、大豆油和菜籽油样品分别进行 0.1、0.5、1.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 4 个水平的空白加标回收率实验, 并分别设空白对照, 每个水平平行测定 6 次, 实验结果见表 3。

3 结论

本文建立了超高压液相色谱-串联质谱测定食用植物油中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的分析方法。

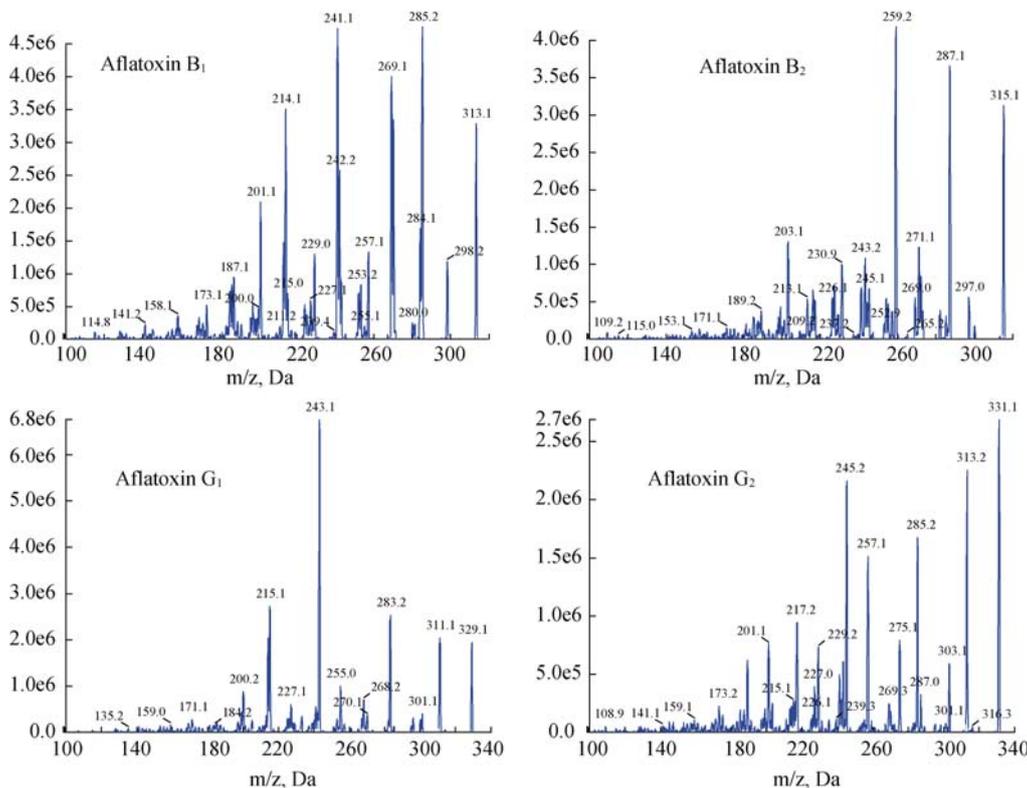


图 3 正离子模式下黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的扫描质谱图

Fig. 3 Mass spectra of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in positive mode

表 2 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2 Regression equations, correlation coefficients(*r*) and linear ranges of aflatoxin B1, B2, G1 and G2

Compound	Regression equation	<i>r</i>	Linear range/(μ g/L)
Aflatoxin B1	$Y=354000X+869$	0.9986	0.1~20
Aflatoxin B2	$Y=20700X+1310$	0.9986	0.1~20
Aflatoxin G1	$Y=311000X+908$	0.9992	0.1~20
Aflatoxin G2	$Y=236000X+511$	0.9996	0.1~20

Y: peak area; X: mass concentration, μ g/L.

表 3 花生油、玉米油、大豆油和菜籽油中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的回收率及相对标准偏差(*n*=6)

Table 3 Recoveries and relative standard deviations of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 of peanut oil, corn oil, soybean oil and rapeseed oil (*n*=6)

基质	黄曲霉毒素	添加浓度(μ g/kg)	平均回收率/%	相对标准偏差(<i>n</i> =6)/%
花生油	B1	0.1、0.5、1.0、5.0	85.2, 86.3, 88.6, 89.5	8.6, 7.2, 7.4, 6.1
	B2	0.1、0.5、1.0、5.0	84.3, 86.1, 87.9, 90.2	9.5, 7.4, 6.9, 5.0
	G1	0.1、0.5、1.0、5.0	85.3, 87.9, 90.2, 93.1	9.2, 8.8, 7.3, 5.3
	G2	0.1、0.5、1.0、5.0	88.1, 89.4, 91.6, 94.6	8.4, 7.2, 6.6, 5.9
玉米油	B1	0.1、0.5、1.0、5.0	83.4, 85.7, 89.7, 90.7	7.6, 7.0, 6.4, 5.2
	B2	0.1、0.5、1.0、5.0	86.2, 89.7, 90.5, 92.1	9.2, 7.8, 7.1, 6.7
	G1	0.1、0.5、1.0、5.0	84.2, 85.6, 89.4, 91.9	8.2, 7.6, 7.0, 5.4
	G2	0.1、0.5、1.0、5.0	87.4, 84.1, 86.5, 89.8	8.6, 7.7, 7.5, 6.5
大豆油	B1	0.1、0.5、1.0、5.0	90.1, 81.2, 81.2, 89.4	7.9, 7.4, 6.3, 5.1
	B2	0.1、0.5、1.0、5.0	79.8, 83.2, 84.2, 89.6	8.4, 7.8, 6.4, 5.2
	G1	0.1、0.5、1.0、5.0	81.6, 82.9, 87.7, 91.0	8.7, 7.2, 7.2, 6.8
	G2	0.1、0.5、1.0、5.0	81.4, 82.6, 87.0, 92.2	7.8, 6.9, 6.5, 5.7
菜籽油	B1	0.1、0.5、1.0、5.0	81.4, 82.7, 86.9, 90.4	9.6, 7.8, 7.6, 6.2
	B2	0.1、0.5、1.0、5.0	82.7, 83.0, 89.8, 93.3	7.6, 7.6, 6.7, 6.2
	G1	0.1、0.5、1.0、5.0	82.1, 86.4, 87.0, 94.1	7.4, 7.6, 6.3, 5.9
	G2	0.1、0.5、1.0、5.0	80.9, 84.4, 85.0, 92.5	8.9, 8.4, 7.6, 5.8

通过前处理中采用固相萃取柱净化样品, 有效地去除了基质干扰, 提高了灵敏度, 降低了方法检出限。该方法实用、快速、准确、灵敏, 可用于食用植物油中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的检测。

参考文献

- [1] Li PW, Zhang Q, Zhang W. Immunoassays for aflatoxins[J]. *TrAC Trend Anal Chem*, 2009, 28(9): 1115–1126.
- [2] Delmulle BS, De Saeger SM, Sibanda L, *et al.* Development of an immunoassay-Based Lateral Flow Dipstick for the Rapid Detection of Aflatoxin B1 in Pig Feed[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(9): 3364–3368.
- [3] IARC-WHO. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans[J]. Lyon France, 1993, 56: 245–362.
- [4] KOLOSOVA AY, SHIM WB, Yang ZY, *et al.* Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B1. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 384(1): 286–294.
- [5] BRAICU C, PUIA C, BODOKI E, *et al.* Screening and quantification of aflatoxins and ochratoxin A in different cereals cultivated in Romania using thin-layer chromatography densitometry[J]. *J Food Qual*, 2008, 31(1): 108–120.
- [6] KHAYOON WS, SAAD B, YAN C B, *et al.* Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up[J]. *Food Chem*, 2010, 118(3): 882–886.
- [7] Li PW, Zhang Q, Zhang W, *et al.* Development of a class-specific monoclonal antibody based ELISA for aflatoxins in peanut[J]. *Food Chem*, 2009, 115: 313–317.
- [8] 马良, 李培武, 张文. 高效液相色谱法对农产品中黄曲霉毒素的测定研究[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(6): 774–778.
- [9] PENA R, ALCARAZ M, ARCE L, *et al.* Screening of aflatoxins in feed samples using a flow system coupled to capillary electrophoresis[J]. *J Chromatogr A*, 2002, 967(2): 303–314.
- [10] Huang BF, Han Z, Cai ZX, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxin B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 662: 62–68.
- [11] 郑燕, 王远兴, 李瑾瑾. 液相色谱串联质谱法检测食品中的黄曲霉毒素[J]. *食品科学*, 2010, 31(24): 385–388.
- [12] 林建忠, 邹伟, 张志刚, 等. LC/MS/MS 测定食品中黄曲霉毒素 B1 的研究[J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(增刊 1): 31–33.
- [13] 杨静, 哈益明, 王锋. 高效液相色谱串联质谱法检测花生中的黄曲霉毒素 B1[J]. *分析实验室*, 2009, 28(6): 35–38.
- [14] 张浩, 杨毅, 潘见. LC-MS 法测定花生中黄曲霉毒素的研究[J]. *安徽化工*, 2007, 33(4): 68–70.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



刘晓茂, 男, 河北秦皇岛人, 工程师。
E-mail: fengbuxi123@163.com