

高效液相色谱-串联质谱法快速检测粮油制品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量

任宏彬*, 贾晓婷, 杨晓伟, 杨蒲晨, 张志华, 郭素平

(大同海关, 大同 037006)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-串联质谱法快速测定粮油制品中黄曲霉毒素 B₁ 含量的分析方法。**方法** 样品中的黄曲霉毒素 B₁ 经提取、免疫亲和柱净化、浓缩等步骤, 以 5 mmol/L 乙酸铵溶液、乙腈-甲醇溶液(50:50, V:V)为流动相, 按照梯度洗脱程序, 通过液相色谱-串联质谱法进行测定, 外标法定量。**结果** 黄曲霉毒素 B₁ 在 0.2~20 ng/mL 浓度范围内与峰面积呈现良好的线性关系, 线性方程为 $Y=68577.3X-20845$, $r>0.998$, 加标回收率在 85.0%~94.1%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)<5.5%, 方法检出限和定量限分别为 0.07 和 0.2 μg/kg。**结论** 该方法测定结果准确、可靠, 可用于快速测定粮油制品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

关键词: 液相色谱-串联质谱法; 粮油制品; 黄曲霉毒素 B₁

Rapid determination of aflatoxin B₁ in grain and oil products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

REN Hong-Bin*, JIA Xiao-Ting, YANG Xiao-Wei, YANG Pu-Chen,
ZHANG Zhi-Hua, GUO Su-Ping

(Datong Customs, Datong 037006, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the determination of aflatoxin B₁ in grain and oil products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted, purified and concentrated by immunoaffinity column. Using 5 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile-methanol solution (50:50, V:V) as mobile phase, according to gradient elution procedure, the samples were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantified by external standard method. **Results** There was a good linear relationship between aflatoxin B₁ concentration and peak area in the range of 0.2–20 ng/mL, the linear equation was $Y=68577.3X-20845$, $r>0.998$. The recoveries of aflatoxin B₁ were 85.0%–93.3% and RSDs were less than 5.5%, the limit of detection and limit of quantitative were 0.07 and 0.2 μg/kg, respectively. **Conclusion** This method is accurate and reliable, which can be used for the rapid determination of aflatoxin B₁ in grain and oil products.

KEY WORDS: liquid chromatography-mass spectrometry; grain and oil products; aflatoxin B₁

基金项目: 海关总署科研计划项目(2017IK097)

Fund: Supported by the General Administration of Customs Scientific Research Program (2017IK097)

*通讯作者: 任宏彬, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检测。E-mail: 1193118452@qq.com

*Corresponding author: REN Hong-Bin, Master, Assistant Engineer, Datong Customs, NO.606, Yunzhong Road, Pingcheng District, Datong 037006, China. E-mail: 1193118452@qq.com

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFT)是真菌毒素中毒性最大、对人类健康危害突出的一类,广泛存在于各类农产品中,主要有 B₁、B₂、G₁、G₂ 4 种形式,其中以 AFT B₁ 毒性和致癌性最强,是威胁农产品质量安全的重大风险隐患^[1-5]。

目前,黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层色谱法、液相色谱法和液相色谱-质谱联用法等^[6-8]。其中,液相色谱法应用较为普遍,但通常需要对样品进行柱前或柱后衍生化,检测步骤较为繁琐^[9,10];而液相色谱-质谱联用法则无需衍生化,可对处理后的样品直接检测,并且具有快速、高灵敏度和强专一性等优点^[11-15]。本研究采用免疫亲和柱净化-高效液相色谱-串联质谱技术,建立粮油制品中的 AFT B₁ 含量的快速检测方法,并通过参加能力验证活动对方法的准确性进行确证,以期快速检测粮油制品中的 AFT B₁ 及更多种类的真菌毒素提供参考和借鉴。

2 材料与方法

2.1 仪器、标准品、试剂耗材及样品

液相色谱(LC-30AD)-串联质谱仪(LCMS-8050)(日本岛津公司); ST40R 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司); vortex genie2 涡旋混合器(美国 SI 公司); LE244S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

黄曲霉毒素标准溶液(浓度为 2 μg/mL,购自天津农业部)。

乙酸铵(分析纯,山东西亚化学股份有限公司); 甲醇、乙腈(色谱级,北京迪马欧泰科技发展中心); 黄曲霉毒素免疫亲和柱(美国 VICAM 公司); 0.22 μm 微孔有机滤膜(上海安谱实验股份科技有限公司)。

实验用粮油样品均由当地食药监局于本地市场近期抽样取得;“植物油中黄曲霉毒素的测定能力验证”是国家认证认可监督管理委员会(Certification and Accreditation Administration of the People's Republic of China, CNCA)组织,山东出入境检验检疫局技术中心承担,浙江省疾病预防控制中心和华测检测认证集团股份有限公司协助的能力验证计划(项目编号为:CNCA-18-A09)。

2.2 标准溶液的配制

2.2.1 黄曲霉毒素标准储备液配制

准确移取适量的黄曲霉毒素原液 B₁,用甲醇溶解配制成浓度为 100 ng/mL 的标准储备液。

2.2.2 黄曲霉毒素标准工作液配制

分别准确移取标准储备液: 2、20、50、100、200 μL 于样品瓶中,用初始比例流动相定容配制成浓度为 0.2、2、5、10、20 ng/mL 的 AFT B₁ 系列标准工作液。

2.3 液相色谱-质谱联用(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS)分析条件

2.3.1 HPLC 参数

色谱柱: Shim-pack GIST C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 2 μm); 柱流量: 0.3 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL; 流动相: A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液, B 为乙腈-甲醇溶液(50:50, V:V), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions of mobile phase

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	68	32
0.50	68	32
3.00	55	45
4.00	55	45
4.20	0	100
4.80	0	100
5.00	68	32
7.00	68	32

2.3.2 质谱参数

扫描方式: 正离子扫描; 接口电压 4.0 kV; 雾化气: 氮气, 3 L/min; 加热气流量: 10 L/min; DL 温度: 250 °C; 加热块温度: 400 °C; 碰撞气: 氩气, 270 kPa; 检测方式: 多离子反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 检测条件见表 2。

表 2 MRM 的质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters of MRM

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	碰撞能量/eV
AFT B ₁	313.1	285.1*	23
		241.1	38

注: *用于定量。

2.4 样品前处理

2.4.1 提取

准确称取粮油样品 5.00 g 于 50 mL 离心管中,加入 25.0 mL 甲醇-水(70:30, V:V)溶液,涡旋混匀后置于超声波仪中提取 20 min,取出后以 6000 r/min 离心 10 min,收集上清液待净化。

2.4.2 净化

准确移取 5 mL 上清液,加入 20 mL 含 1%吐温-20 的磷酸盐缓冲溶液混匀,待恢复至室温的免疫亲和柱原有液体流尽后,将上述液转移至注射器中,调节流速以 1.0 mL/min

下滴, 样液滴完后以 20 mL 水分 2 次淋洗免疫亲和柱, 水滴完后抽干免疫亲和柱, 用 2 mL 甲醇分 2 次洗脱免疫亲和柱, 调节流速以 1.0 mL/min 下滴, 收集洗脱液于氮吹管中, 50 °C 下氮气吹干, 加入 1 mL 初始比例流动相溶解残渣, 过 0.22 μm 微孔有机滤膜后于进样小瓶中待分析。

3 结果与分析

3.1 实验条件的优化

提取剂的选择: 黄曲霉毒素易溶于有机溶剂^[16], 实验前对比了乙腈-水, 甲醇-水溶液作为提取剂的提取效果, 结果表明, 两种提取剂的提取效果差别不大, 因此, 本研究采用成本相对较低的甲醇-水(70:30, V:V)进行提取。

流动相的选择: 通过查阅标准和文献, 按照标准 GB 5009.22-2016^[17]中的洗脱程序, 对比了乙腈-水, 甲醇-乙腈(50:50, V:V)和水, 以及甲醇-乙腈(50:50, V:V)和 0.5 mmol/L 乙酸铵溶液 3 种流动相组合的洗脱效果, 其中, 甲醇-乙腈混合可有效提高洗脱效率, 缩短洗脱时间; 正离子扫描电离模式下, 加入乙酸铵可以提高正离子目标物的离子化效率^[18], 使出峰更加尖锐, 峰形对称性更好, 因此选择甲醇-乙腈(50:50, V:V)和 0.5 mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相。

质谱条件的优化: 采用正离子(ESI+)扫描模式, 以中间浓度点 5 ng/mL 标准工作液进行扫描, 对其母离子、子离子、碰撞能量等条件进行优化, 使分子离子和特征碎片离子强度达到最大, 选择丰度最高的碎片离子作为定性与定量特征离子, 优化后的质谱参数见表 2。按照 2.3 中的分析条件对中间浓度点 5 ng/mL 标准工作液进行检测得到 AFT B₁ 标准溶液 MRM 图谱见图 1。

3.2 线性方程及相关性

按照 2.2 中的步骤配制标准溶液后, 将各浓度点标准溶液检测分析, 结果以目标化合物响应峰面积(Y)与对应化合物浓度(X)进行线性回归, 得到 AFT B₁ 线性回归方程为: $Y=68577.3X-20845$, 在线性范围 0.2~20 ng/mL 内, 相关系

数 $r>0.998$ 。

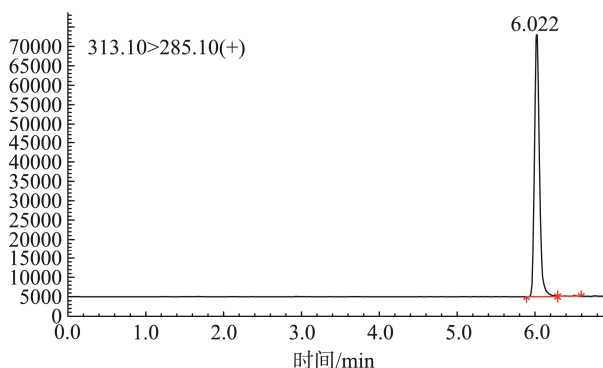


图1 中间浓度点 AFT B₁ 标准溶液 MRM 图谱

Fig.1 MRM mapping of AFT B₁ standard solution at intermediate concentration point

3.3 方法检出限

取 AFT B₁ 标准工作溶液适量添加到制备好的空白样品溶液中, 用初始流动相逐级稀释, 依据检出限为信噪比 $S/N=3$ 计算测得 AFT B₁ 检出限为 0.07 μg/kg, 依据定量限为信噪比 $S/N=10$ 计算, 得到 AFT B₁ 定量限为 0.2 μg/kg。

3.4 加标回收和重现性

准确称取 18 份空白粮油样品(每份 5.00 g), 将 AFT B₁ 标准储备液按照 1、4、15 ng/mL 3 个水平分别加标 6 次, 按照本方法进行处理检测, 得到 AFT B₁ 的加标回收率和相对标准偏差 RSD 见表 3。加标回收率在 85.0%以上, RSD 在 2.8%~5.5%之间。

3.5 样品检测

为进一步验证方法的可靠性和实用性, 先后按照本实验方法对两份能力验证样品和 4 种市抽粮油样品进行前处理, 测定 AFT B₁ 的含量, 测定结果见表 4。

表3 加标回收试验(n=6)
Table 3 Standard addition recovery test (n=6)

加标水平/(ng/mL)	回收测定值/(ng/mL)						回收率平均值/%	RSD/%
1	0.82	0.80	0.93	0.85	0.87	0.83	85.0	5.4
4	3.50	3.05	3.81	3.74	3.28	3.60	94.1	2.8
15	13.25	13.02	13.90	13.15	13.30	13.80	93.3	5.5

两份能力验证样品中 AFT B₁ 的含量测定结果经上报活动组织方, 得到 Z 比分数为-0.83, $|Z| \leq 2$, 取得满意结果, 证明了本方法的准确性。根据 GB 2761-2017 《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》^[19]中规定谷物及

其制品中 AFT B₁ 的安全限量为 5.0~20 μg/kg, 油脂及其制品中 AFT B₁ 的安全限量为 10~20 μg/kg。样品检测结果显示: 各类市抽粮油制品中的 AFT B₁ 含量均符合国家安全限量标准。

表 4 样品检测结果
Table 4 Sample test results

样品信息	AFT B ₁ /(μg/kg)
植物油 CNCA-18-A09-790	2.70
植物油 CNCA-18-A09-604	5.30
玉米面	2.50
糯米粉	0.85
荞麦粉	3.25
花生油	1.20

4 结论与讨论

本研究对粮油制品进行提取、净化、浓缩后, 通过高效液相色谱-质谱法对其中的 AFT B₁ 进行了检测, 样品检测结果符合国家安全限量标准。加标回收率在 85.0% 以上, RSD 在 2.8%~5.5% 之间。通过参加能力验证活动, 取得了满意结果, 进一步验证了方法的可靠性, 可用于粮油制品中 AFT B₁ 的快速检测。该方法前处理快速简捷, 结果重复性好、准确可靠, 可作为检测机构日常粮油制品中 AFT B₁ 的快速筛查方法。

参考文献

- [1] 丁晓雯, 柳春红. 食品安全学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011.
Ding XW, Liu CH. Food safety science [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.
- [2] 陈志飞, 王元凯, 严亚贤, 等. 真菌毒素的污染状况及毒性研究[J]. 检验检疫学报, 2012, 22(5): 71-76.
Chen ZF, Wang YK, Yan YX, *et al.* Pollution and toxicity of mycotoxins [J]. *Inspect Quarant Sci*, 2012, 22(5): 71-76.
- [3] 赖先文, 张荷, 刘承兰. 稻米中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 的研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(22): 386-391.
Lai XW, Zhang H, Liu CL. Advances in aflatoxin and ochratoxin A in rice [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2014, 35(22): 386-391.
- [4] 罗自生, 秦雨, 徐艳群, 等. 黄曲霉毒素的生物合成、代谢和毒性研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(3): 250-257.
Luo ZS, Qin Y, Xu YQ, *et al.* Advances in biosynthesis, metabolism and toxicity of aflatoxins [J]. *Food Sci*, 2015, 36(3): 250-257.
- [5] 马爱华. 饲料中黄曲霉毒素的危害及预防[J]. 吉林农业, 2019, (8): 64.
Ma AH. Harm and prevention of aflatoxin in Feed [J]. *Jilin Agric*, 2019, (8): 64.
- [6] 翟雪华. 粮油食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 现代食品, 2019, (1): 120-121.
Zhai XH. Advances in the detection methods of aflatoxins in cereals, oils and foodstuffs [J]. *Mod Food*, 2019, (1): 120-121.
- [7] 唐志峰, 卢锦永. 粮油食品中黄曲霉毒素的检测方法[J]. 现代食品, 2017, (1): 80-81.
Tang ZF, Lu JY. Method for the determination of aflatoxin in cereals and oils [J]. *Mod Food*, 2017, (1): 80-81.

- [8] 曹萍, 赵娜. 粮油食品中黄曲霉毒素检测方法研究[J]. 现代食品, 2017, (11): 38-39.
Cao P, Zhao N. Study on the detection method of aflatoxin in cereals, oils and foods [J]. *Mod Food*, 2017, (11): 38-39.
- [9] 朱鹏飞, 刘文卫, 凌霞, 等. 光化学衍生-高效液相色谱法测定粮谷类样品中黄曲霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(5): 1798-1802.
Zhu PF, Liu WW, Lin X, *et al.* Photochemical derivatization-high performance liquid chromatography for the determination of aflatoxin in cereal samples [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(5): 1798-1802.
- [10] 周欣, 张琳, 毛婵, 等. 免疫亲和和柱-液相色谱法测定麦麸中黄曲霉毒素含量[J]. 食品工业, 2019, 40(2): 327-330.
Zhou X, Zhang L, Mao C, *et al.* Determination of aflatoxin in wheat bran by immunoaffinity column-liquid chromatography [J]. *Food Ind*, 2019, 40(2): 327-330.
- [11] 刘文静, 余海霞, 严忠雍, 等. 多组分免疫亲和柱净化/超高效液相色谱-串联质谱检测水产饲料中的黄曲霉毒素[J]. 分析测试学报, 2019, 38(3): 323-327.
Liu WJ, Yu HX, Yan ZY, *et al.* Multicomponent immune affinity column purification/ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of aflatoxin in aquatic feeds [J]. *Anal Test Report*, 2019, 38(3): 323-327.
- [12] 王勤, 刘辉, 李秋霞, 等. 固相萃取液相色谱-串联质谱法测定食品中 6 种黄曲霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5888-5892.
Wang Q, Liu H, Li QX, *et al.* Solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of six aflatoxins in food [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(22): 5888-5892.
- [13] 焦慧泽, 陆世清, 洪体玉. 免疫亲和结合超高效液相色谱-串联质谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ [J]. 化学研究与应用, 2018, 30(11): 1918-1923.
Jiao HZ, Lu SQ, Hong TY. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in peanut butter by immunoaffinity-binding ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chem Res Appl*, 2018, 30(11): 1918-1923.
- [14] Jin Q, Liu SY, Huang XH, *et al.* Determination of aflatoxin in infant cereals from Hangzhou, China [J]. *Anal Letters*, 2013, 46(15).
- [15] 王一晨, 刘奇, 吴学贵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定花生中的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 食品安全质量检测学报, 2019, (7): 2059-2063.
Wang YC, Liu Q, Wu XG, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanuts by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, (7): 2059-2063.
- [16] 黄小兵. 超高效液相色谱法测定花生油中黄曲霉毒素[J]. 广东化工, 2019, 46(3): 181-183, 177.
Huang XB. Determination of aflatoxins in peanut oil by UPLC [J]. *Guangdong Chem Ind*, 2019, 46(3): 181-183, 177.
- [17] GB 5009.22-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定[S].
GB 5009.22-2016 National food safety standard- Determination of aflatoxins B and G in foods [S].
- [18] 胡巧茹, 丛中笑, 沙美兰, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定花生中 4 种黄曲霉毒素和 11 种农药残留[J]. 分析测试学报, 2019, 38(4): 396-402.

Hu QR, Cong ZX, Sha ML, *et al.* Determination of 4 aflatoxins and 11 pesticide residues in peanut by ultrahigh performance liquid chromatography – quadrupole /electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Anal Test Report, 2019, 38(4): 396–402.

- [19] GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
GB 2761-2017 National food safety standard-Limit of mycotoxins in foods [S].

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



任宏彬, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品理化检测。

E-mail: 1193118452@qq.com

“发酵食品及其安全性评价”专题征稿函

发酵食品因其独特的风味受到消费者的普遍欢迎。发酵是一种传统的食品储存与加工方法, 是指利用有益微生物加工制造的一类食品, 包括发酵乳制品、酒类、泡菜、酱油、食醋、豆豉等。由于其独特的加工方式, 发酵食品或存在一定的安全隐患, 可能会影响人体健康。

鉴于此, 本刊特别策划了“**发酵食品及其安全性评价**”专题, 主要围绕**(1) 菌种的选育和保藏; (2) 发酵工艺的条件优化, 发酵机制, 发酵工程动力学; (3) 发酵食品的分析与检测; (4) 发酵食品的安全性评价及风险评估类; (5) 发酵食品的种类与加工方式; (6) 发酵食品的营养成分及其对人体健康的影或您认为有意义的相关领域**展开论述和研究, 本专题计划在 2019 年 12 月出版。

鉴于您在该领域的成就, **本刊主编吴永宁研究员及编辑部全体成员**特别邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2019 年 11 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并优先发表。

同时, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com

E-mail: jfoodsqa@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部