

高效液相色谱-串联质谱法测定花生中的 黄曲霉毒素 B₁

王一晨, 刘 奇, 吴学贵*, 黄肖凤, 王芳姑, 李小梅

(海南威尔检测技术有限公司, 澄迈 571924)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法测定花生中黄曲霉毒素 B₁ 含量的分析方法。**方法** 样品经乙腈水溶液提取, 三氯甲烷反提取后, 正己烷净化, 以水(D)和乙腈(A)作为流动相进行梯度洗脱, 质谱采用多离子检测模式对黄曲霉毒素 B₁ 的定量离子和定性离子进行检测。**结果** 在 0.5~10 ng/mL 范围内线性良好(线性方程: $Y=8.57 \times 10^3 X+312$, $r>0.999$), 黄曲霉毒素 B₁ 在 1、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平上进行加标回收试验, 平均回收率为 93.2%~100.2%, 相对标准偏差为 2.8%~6.9%, 方法检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。**结论** 该方法经济、快速、准确, 适合测定花生中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 黄曲霉毒素 B₁; 花生

Determination of aflatoxin B₁ in peanut by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Yi-Chen, LIU Qi, WU Xue-Gui*, HUANG Xiao-Feng, WANG Fang-Gu, LI Xiao-Mei

(Hainan Willtest Technology Co., Ltd., Chengmai 571924, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of aflatoxin B₁ in peanut by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted by acetonitrile aqueous solution, reversed chloroform extraction and n-hexane purification, and eluted with water (D) and acetonitrile (A) as mobile phase. Multiple detection mode (MRM) was used to detect quantitative and qualitative ions of aflatoxin B₁ by mass spectrometry. **Results** Within the range of 0.5-10 ng/mL, the linearity was good (linear equation: $Y=8.57 \times 10^3 X+312$, $r>0.999$). The average recovery rate was 93.2%-100.2%, and relative standard deviation (RSD) was 2.8%-6.9% with 3 spiked concentrations of 1, 5 and 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The limit of detection was 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This method is economical, rapid and accurate, which is suitable for the determination of aflatoxin B₁ in peanut.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aflatoxin B₁; peanut

1 引言

黄曲霉毒素广泛存在于自然界中, 主要是黄曲霉和寄生曲霉的次级代谢产物^[1]。黄曲霉毒素是一种剧毒物质,

具有严重的致癌性、致畸性和致突变性^[2], 能够污染谷物、玉米、大米、花生等多种农作物和食品, 人或动物摄入了受黄曲霉毒素污染的食物或饲料, 会造成急性中毒死亡或慢性积累致癌等极严重的危害^[3]。其中, 黄曲霉毒素

*通讯作者: 吴学贵, 硕士, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。E-mail: 767605373@qq.com

*Corresponding author: WU Xue-Gui, Master, Engineer, Hainan Willtest Technology Co., Ltd., Laocheng Hi-tech Industry Demonstration Zone, Chengmai 571924, China. E-mail: 767605373@qq.com

B₁(aflatoxin B₁, AFT B₁)的毒性最为强烈,其毒性是氰化钾的10倍,砒霜的68倍^[4]。

黄曲霉毒素耐高温,通常的加热处理方式对其破坏很小,而黄曲霉毒素在食品中的污染非常难预防,主要是因为该真菌毒素在食物或食品原料中普遍存在,而花生尤为容易产生黄曲霉毒素 B₁,因此建立花生中黄曲霉毒素 B₁准确、快速、经济的检测方法尤为重要。目前黄曲霉毒素 B₁的检测方法有很多^[3,5,6],包括薄层色谱法和酶联免疫法^[7]、免疫比色法^[8]、高效液相色谱法^[9-13]、液相色谱-串联质谱法^[14-17],薄层色谱法灵敏度较低,一般用作定性及半定量,酶联免疫法易出现假阳性或假阴性结果、免疫比色法灵敏度低、高效液相色谱法通常以保留时间定性,易产生假阳性,且灵敏度较差,而液相色谱-串联质谱法定性科学,定量准确,灵敏度高,已逐渐成为黄曲霉毒素的主要检测方法。本研究样品经提取、浓缩后采用正己烷进行除脂净化,液相色谱-串联质谱仪测定黄曲霉毒素 B₁的含量,操作简便、快速、回收率高、检出限低、结果准确,适用于大批量花生样本中黄曲霉毒素 B₁的测定,且完全满足花生中黄曲霉毒素 B₁的限量要求(20 μg/kg)^[18]。

2 材料与方

2.1 仪器、试剂和材料

Agilent1200-API 3200 高效液相色谱-串联质谱仪(Agilent1200,美国安捷伦科技公司;API 3200,美国 AB Sciex 生物技术有限公司);PL-602 电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];IKA T18 涡旋混合器(德国 IKA 公司);HY-3 多功能振荡器(江苏金坛市环宇科学仪器厂);LXJ-IIB 低速大容量多管离心机(上海安亭科学仪器厂);TTL-DCII 氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司);Milli-QA10 超纯水机[密理博(上海)贸易有限公司]。

乙腈(色谱纯,北京百灵威科技有限公司);三氯甲烷(分析纯,广州化学试剂厂);正己烷(色谱纯,北京百灵威科技有限公司);实验用水(Milli-QA10 超纯水机制备);黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(2 mg/mL,农业部环境保护科研监测所)。

花生样品为海口农贸市场随机购买的花生仁。

2.2 试验方法

2.2.1 提取

称取 2 g 粉碎后的花生样品于 50 mL 离心管中,加入 8 mL 50%乙腈-水溶液(1:1, V:V),充分涡旋 1 min,用多功

能振荡器以最大速度振荡 5 min,加入 1 g 氯化钠,涡旋 30 s,促使乙腈和水分层,4000 r/min 离心 5 min,取上层清液 2 mL 于 10 mL 玻璃管中,在 40 °C 下用压缩空气流吹至近干后,加入 1 mL 水,涡旋 20 s,加入 2 mL 三氯甲烷,涡旋 20 s,4000 r/min 离心 5 min,弃上层,取 1 mL 下层溶液在 40 °C 下用压缩空气流吹干。

2.2.2 净化

吹干后的残渣加入 2 mL 正己烷,涡旋 20 s,加 1 mL 10%乙腈水溶液,涡旋 20 s,4000 r/min 离心 5 min,弃上层,取下层过滤,上机分析。

2.2.3 标准溶液的配制

黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液配制:将 2 mg/mL 标准溶液用乙腈稀释成 100 ng/mL。

2.3 仪器工作条件

2.3.1 液相色谱条件

色谱柱:安捷伦 Poroshell 120 EC-C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相:乙腈(A)-水(D),梯度洗脱,见表 1;流速:0.3 mL/min;柱温:40 °C;进样体积:10 μL。

表 1 梯度洗脱方式
Table 1 Elution gradients

t/min	A/%	D/%
0	10	90
1	90	10
4.5	90	10
4.6	10	90
9.0	10	90

2.3.2 质谱条件

离子源模式:电喷雾离子源(ESI+);检测方式:多反应监测(multiple detection mode, MRM);电喷雾电压(ionspray voltage, IS):5 kV;离子源温度(temperature, TEM):600 °C;雾化气压力(ion source gas 1, GS1):50 psi;辅助气压力(ion source gas 2, GS2):50 psi;气帘气压力(entrance potential, EP)、碰撞室入口电压(collision cell entrance potential, CEP)、碰撞气能量(collision energy, CE)及碰撞室出口电压(collision cell exit potential, CXP)见表 2。

表 2 质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameter

药物名称	离子对/(m/z)	DP/V	EP/V	CEP/V	CE/V	CXP/V
黄曲霉毒素 B ₁	313.0/285.0*	30	10	18	22	5
	313.0/241.1	30	10	18	38	5

注:“*”为定量离子对。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件选择和优化实验

采用串联质谱进行测定时,对于某些化合物,基质效应对离子化效率影响较大,往往导致同一浓度在纯溶剂中和在基质样液中响应值相差很大,本实验仅采用正己烷除脂净化,因此不可避免的残留一些样品基质。使用常规 C₁₈柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm)为分析色谱柱,目标出峰处由于基质效应影响,离子化效率降低,信号下降。故选择核壳柱 Poroshell 120 EC-C₁₈(2.1 mm×50 mm, 2.7 μm),其填料由 1.7 μm 直径的实心核与 0.5 μm 厚的多孔层所构成,这种核壳型的颗粒可以提供和亚 2 μm 颗粒类似的高柱效和高分离效率,且柱反压只有亚 2 μm 色谱柱的 50%,相比传统化的全多孔颗粒,核壳颗粒具有更窄的粒径分布,提供了高柱效、高分离度及低柱压的性能优势。同时,本实验通过优化色谱分离条件,使目标化合物与抑制电离的基质分离,极大降低了基质对质谱检测的影响。

本实验对比了用乙腈+0.5 mmol 乙酸铵(含 0.1%甲酸)和乙腈+水溶液作为流动相的测试结果,发现乙腈+0.5 mmol 乙酸铵(含 0.1%甲酸)目标物峰型更对称,乙腈+水目标物峰型轻微拖尾,但同浓度相比信号更高,高出 2 倍,二者出峰时间均为 4.3 min,考虑到盐溶液易滋生微生物污染仪器,且长期使用会由于盐析加速仪器的损坏,因此,试验采用乙腈+水作为流动相体系。图 1、图 2 和图 3 分别为黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液色谱图、加标花生样品和空白花生样品色谱图。

3.2 样品前处理净化方式的优化

样品经 2.2.1 方法提取后,分别采用免疫亲和柱和正己烷净化,发现免疫亲和柱净化操作繁琐、重复性较差[相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)>10%],而且成本也较高,而用正己烷净化,操作简单、回收率理想,结果稳定(RSD<10%),成本低廉,结果见表 3。故用正己烷净化完全能满足实验的要求。

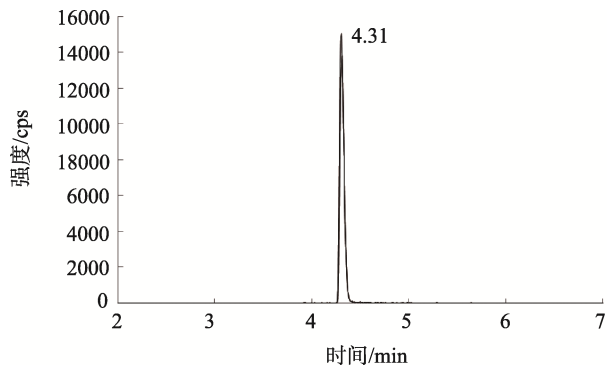


图 1 5 μg/L 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatogram of 5 μg/L AFT B₁

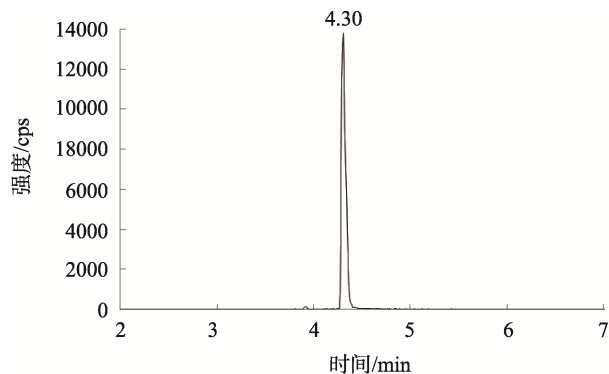


图 2 加标(10 μg/kg)花生样品 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatogram of peanut at the spiked concentration of 10 μg/kg

表 3 2 种净化方式在 2 μg/kg 加标水平下的重复性(n=6)
Table 3 Repeatability of two purification methods at the spiked concentration of 2 μg/kg (n=6)

浓缩方式	RSD/%
免疫亲和柱净化	13.7
正己烷净化	5.7

3.3 浓缩方式优化

实验比较了在 40 °C 条件下用氮气缓缓吹干提取液和用压缩空气缓缓吹干提取液,发现二者结果差异不大,回收率较稳定,见表 4。而压缩空气来源经济实惠,因此实验选择压缩空气浓缩提取液。

表 4 2 种浓缩方式在不同加标水平下的平均回收率
Table 4 Average recovery of 2 kinds of concentration methods at different spiked concentrations

浓缩方式	平均回收率/%		
	1 μg/kg	5 μg/kg	10 μg/kg
氮气吹干浓缩	107.3	93.0	100.1
压缩空气吹干浓缩	100.5	103.2	94.8

3.4 线性范围

将 100 ng/mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准使用液用 10% 乙腈水溶液稀释成 0、0.5、1、2、5、10 ng/mL 系列标准溶液,按上述条件和方法进行分析,以标准溶液中黄曲霉毒素 B₁(AFT B₁)浓度为横坐标 X, AFT B₁ 峰面积为纵坐标 Y 绘制标准工作曲线(见图 4),得到回归方程 $Y=8.57 \times 10^3 X + 312$ ($r=0.9997$),结果表明,在 0.5~10 μg/L 范围内, AFT B₁ 浓度和色谱峰面积线性关系良好。

3.5 方法检出限和定量限

以色谱峰信噪比 $S/N=3$ 为方法检出限、 $S/N=10$ 为方法定量限,将加标质量浓度逐级稀释添加于空白样品中测定信噪比,最终确定该方法检出限为 0.1 μg/kg、定量限为 0.2 μg/kg。

■ XIC of +MRM(2 pairs): 313.0/285.0 Da ID: AFT B1-1 from Sample 2(TS1803461)...

Max. 135.0 cps

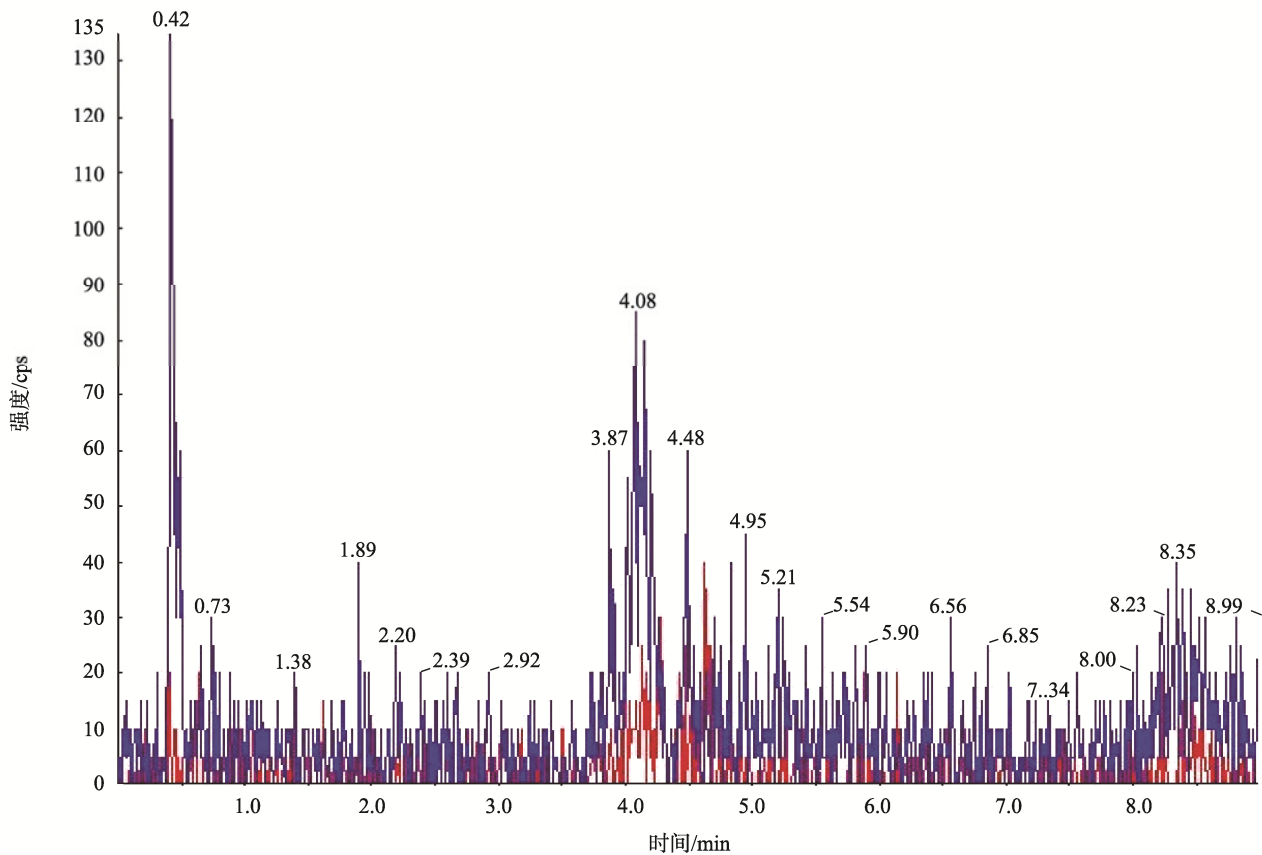


图 3 空白花生样品 MRM 色谱图

Fig.3 MRM chromatogram of negative peanut

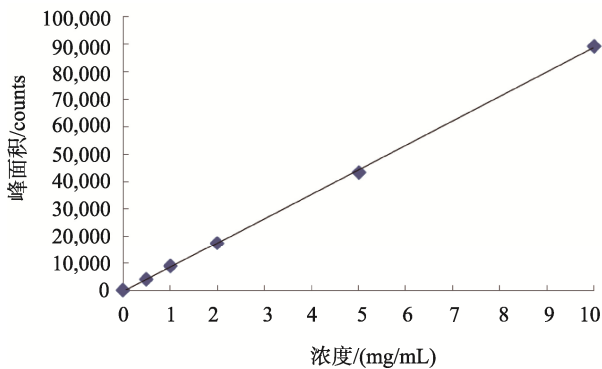


图 4 黄曲霉毒素 B₁ 的校准曲线图

Fig.4 Calibration curve of AFT B1

结果显示有 4 份花生检出黄曲霉毒素 B₁, 含量分别为 0.21、7.67、10.27 和 2.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 5 加标回收率和精密度实验结果($n=6$)

Table 5 Result of spiked recovery and precision ($n=6$)

化合物	添加浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}$	平均回收率/%	RSD/%
黄曲霉毒素 B ₁ (AFT B ₁)	1	100.2	6.9
	5	95.6	6.2
	10	93.2	2.8

3.6 回收率和精密度试验

在阴性花生样品中加入 AFT B₁ 标准溶液, 加标水平分别为 1、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每个水平作 6 个平行样品测定, 结果见表 5。方法的加标回收率为 93.2%~100.2%, 相对标准偏差均小于 7.0%。

3.7 实际样品测定

从市场采购的 30 份花生样品, 采用本方法进行检测,

4 结论

样品采用乙腈溶液提取、三氯甲烷反萃取、压缩空气吹干浓缩、正己烷脱脂净化后, 经乙腈和水梯度洗脱、色谱柱 Poroshell 120 EC-C₁₈ 分离, 确定了花生中黄曲霉毒素 B₁ 含量检测的最佳条件。采用三重四级杆串联质谱仪测定, 外标法定量, 测定花生中黄曲霉毒素 B₁ 含量。方法简单、快捷、灵敏、重复性好, 定性、定量准确, 为花生中黄曲霉毒素 B₁ 的准确测定提供了新方法。

参考文献

- [1] Lima GPP, Vianello F. Food quality, safety and technology [M]. Wier: Springer-Verlag, 2013.
- [2] Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [M]. Lyon: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2002.
- [3] 马海华, 孙焯舟, 甄彤, 等. 我国国家标准和行业标准中黄曲霉毒素测定方法综述[J]. 食品工业科技, 2016, 37(6): 360-366.
Ma HH, Sun JZ, Zhen T, *et al.* A review on aflatoxins determination methods in China's national and industry standards [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2016, 37(6): 360-366.
- [4] 芳芳, 张旭, 郑睿行. 免疫亲和柱净化-光化学柱后衍生高效液相色谱荧光法测定粮食中黄曲霉毒素[J]. 粮食与饲料工业, 2012, (6): 60-62.
Fang F, Zhang X, Zheng RX. Determination of aflatoxin in cereal by immune-affinity column clean-up and HPLC-FLD with post-column photochemical derivation [J]. *Cereal Feed Ind*, 2012, (6): 60-62.
- [5] 陈晓, 梅利, 文奇菊. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 检测方法的发展[J]. 自然科学(文摘版), 2018, (6): 241.
Chen X, Mei L, Wen QJ. Development of aflatoxin B₁ detection in food [J]. *Nat Sci*, 2018, (6): 241.
- [6] 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].
- [7] 柳其芳. 酶联免疫吸附法和薄层色谱法联合分析黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 中国热带医学, 2006, 6(2): 246-248.
Liu QF. Study on the detection of aflatoxin B₁ by ELISA and thin layer chromatography [J]. *China Trop Med*, 2006, 6(2): 246-248.
- [8] 程慧, 李诗瑶, 彭青枝. 基于脲酶-金纳米棒的双重放大免疫比色法检测食品中黄曲霉毒素 B₁[J]. 中国酿造, 2017, 36(12): 158-162.
Cheng H, Li SY, Peng QZ. Rapid detection of aflatoxin B₁ in food by dual-amplified immuocolorimetry based on urease-functionalized gold nanorods [J]. *China Brew*, 2017, 36(12): 158-162.
- [9] 李军, 于一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A[J]. 色谱, 2006, 24(6): 581-584.
Li J, Yu YM, Tian M, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxins, zearalenone and ochratoxin A in cereal grains by immunofinity column and high performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical derivatization [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24(6): 581-584.
- [10] 谢刚, 王松雪, 张艳. 超高效液相色谱法快速检测粮食中黄曲霉毒素的含量[J]. 分析化学, 2013, 41(2): 223-228.
Xie G, Wang SX, Zhang Y. Rapid analysis of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂) in grain by immuno-affinity clear-up column and ultra performance liquid chromatography without derivation [J]. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41(2): 223-228.
- [11] 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.
Ma L, Li PW, Zhang W. Detection of aflatoxins in agricultural products by high performance liquid chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2007, 26(6): 774-778.
- [12] 王君, 刘秀梅. 食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的高效液相色谱测定方法[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 17(6): 498-500.
Wang J, Liu XM. High performance liquid chromatographic method for determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in foods [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 17(6): 498-500.
- [13] 冯靓, 蔡增轩, 谭莹, 等. HPLC 同时测定食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(3): 511-513.
Feng L, Cai ZX, Tan Y, *et al.* Simultaneous detection of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in foods by HPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(3): 511-513.
- [14] 王秀嫔, 李培武, 杨扬, 等. 液相色谱-三重串联四级杆质谱测定粮油中的黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2011, 29(6): 517-522.
Wang XP, Li PW, Yang Y, *et al.* Determination of aflatoxins in cereals and oil by Liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2011, 29(6): 517-522.
- [15] 杨静, 哈益明, 王峰. 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.
Yang J, Ha YM, Wang F. Detection of aflatoxin B₁ in peanut food by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Lab*, 2009, 28(6): 35-38.
- [16] 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.
Zheng Y, Wang YX, Li JJ. Detection of aflatoxins in food peanut by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2010, 31(24): 385-388.
- [17] 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): 31-33.
Lin JZ, Zou W, Zhang ZG, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in food by LC/MS/MS [J]. *Inspect Quarant Sci*, 2004, (14): 31-33.
- [18] 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: 苏笑芳)

作者简介



王一晨, 工程师, 主要研究方向为食用农产品检测。

E-mail: 455589269@qq.com



吴学贵, 硕士, 工程师, 主要研究方向为水产品质量安全。

E-mail: 767605373@qq.com