

# 超高效液相色谱-串联质谱测定白酒中的 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub> 总量

李晓颀, 杨丽英\*, 杨晓雯, 段胜智, 杨世波

(云南省保山市食品药品检验检测中心, 保山 678000)

**摘要: 目的** 建立一种超高效液相色谱—串联质谱(ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS)测定白酒中黄曲霉毒素总量(G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>)的检测方法。**方法** 以甲醇+5 mmol/L 乙酸铵作为流动相梯度洗脱, 流速为 0.2 mL/min, 经 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)色谱柱, 柱温为 40 °C, 采用电喷雾电离源正离子模式检测, 进样时间为 10 min。**结果** 经检测, 黄曲霉毒素总量均有较好的线性关系, 线性相关系数  $r^2$  均大于 0.999。检出限在 0.01~0.03 μg/kg 之间。加标回收率为 87~103%。**结论** 用所建方法同 GB 5009.22-2016 从时间、样品处理及最后结果上进行对比分析, 该方法简单、快速, 结果准确, 灵敏度高。

**关键词:** 超高效液相色谱—串联质谱仪; 黄曲霉毒素总量; 白酒

## Simultaneous detection of aflatoxin total B<sub>1</sub>B<sub>2</sub>G<sub>1</sub>G<sub>2</sub> in Chinese liquor by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Xiao-Qi, YANG Li-Ying\*, YANG Xiao-Wen, DUAN Sheng-Zhi, YANG Shi-Bo

(Baoshan Food and Drug Inspection and Testing Center of Yunnan Province, Baoshan 678000, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for simultaneous detection of aflatoxin total (AFT) (G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>1</sub>) by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS) in Chinese liquor. **Methods** A gradient elution program of methanol-5 mmol/L ammonium acetate as mobile phase was adopted at the flow rate of 0.2 mL/min, ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) chromatographic column was adopted. The column temperature was maintained at 40 °C. By using electrospray ionization source in positive ion mode with the injection time as 10 min. **Results** Aflatoxin total had a good linear relationship in their individual linear ranges, and the linear correlation coefficient  $r^2$  was above 0.999. The detection limit was between 0.01 μg/kg to 0.03 μg/kg. The spiked recovery rate were 87% to 103%. **Conclusion** The method is compared with the standard GB 5009.22-2016 to analyze the time, sample processing and final results. The method was simple, rapid, accurate, and sensitive.

**KEY WORDS:** ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aflatoxin total; Chinese liquor

\*通讯作者: 杨丽英, 工程师, 主要研究方向为食品中添加剂、毒素等方面的研究。E-mail: 8438204@qq.com

\*Corresponding author: YANG Li-Ying, Engineer, Baoshan Food and Drug Inspection and Testing Center of Yunnan Province, Baoshan 678000, China. E-mail: 8438204@qq.com

## 1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxin total, AFT)由真菌黄曲霉和寄生曲霉产生,主要有 4 种: AFTB<sub>1</sub>, AFTB<sub>2</sub>, AFTG<sub>1</sub> 和 AFTG<sub>2</sub><sup>[1,2]</sup>, 是自然界已发现的理化性质最稳定的真菌毒素,有很强的毒性、致癌性和致畸毒性<sup>[3]</sup>。黄曲霉菌代谢产物黄曲霉毒素是诱发肝癌、乳腺癌等疾病的主要因素之一,严重威胁人类的健康,同时,也是造成粮食、水产、畜牧、养殖业等产业经济损失的元凶之一<sup>[4]</sup>。当摄入量超过一定限量时,直接危及生命<sup>[5-8]</sup>。所以,各国为避免动物、人类与其暴露接触,全世界对 AFT 的污染情况进行了全面的监管<sup>[9,10]</sup>。

谷物是最易受到黄曲霉毒素污染的粮食作物之一<sup>[11]</sup>,在生产、加工及流通过程中极易受黄曲霉菌及其代谢产物黄曲霉毒素的污染<sup>[12]</sup>,而粮食作物是白酒工业的主要原料,白酒通常以大米、高粱等为主要原料,经蒸煮、糖化、发酵、蒸馏等酿制而成。白酒在近几年的食品安全中屡出问题,主要的质量安全问题有 4 大方面,食品添加剂和理化指标、污染物和真菌毒素<sup>[13]</sup>。地方小作坊生产制作的白酒,在原料采购、运输、保存到生产制作各个环节,缺乏相应的技术水平或者安全意识,均会受到黄曲霉菌及其毒素的污染,但真菌毒素对白酒生产的影响报道相对较少。

在酿造白酒过程中,如果选择的粮食存在黄曲霉毒素,虽经过蒸煮、发酵但不能去除其毒性,很有可能将黄曲霉毒素以及产毒微生物带入白酒中,威胁白酒生产的安全。因此,黄曲霉毒素在白酒产业以及其他食品行业存在的威胁不容忽视<sup>[14-16]</sup>,验证黄曲霉毒素在白酒生产中的安全性研究也体现出其重要性。

本研究以云南省保山市隆阳区小作坊生产的白酒为研究对象,利用超高效液相色谱—串联质谱仪建立一种高效、准确测定白酒中的黄曲霉毒素总量(G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>)的检测方法。同标准 GB 5009.22-2016<sup>[17]</sup>从时间、样品处理及最后结果上进行对比分析,旨在为白酒生产过程中的安全性提供一种新的方法和技术。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料、试剂及仪器

样品: 云南省保山市小作坊生产的散装白酒[原料: 大米; 生产工艺: 固态法发酵], 生产企业瓶装白酒(腾越老烧(云南小曲清香型白酒)、耆酒(清香型白酒)、小甬酒(小曲清香型白酒))。

试剂及耗材: 甲醇(LC/MS 级, 美国 Fisher 公司); 乙酸钠、黄曲霉毒素总量标准品(aflatoxin B<sub>1</sub>: 2.02 μg/mL, aflatoxin B<sub>2</sub>: 0.504 μg/mL, aflatoxin G<sub>1</sub>: 2.03 μg/mL, aflatoxin G<sub>2</sub>: 0.505 μg/mL, 溶于乙腈, 普瑞邦公司); 多功能免疫亲和柱(Rome 实验室)。

仪器设备: ACQUITY UPLC<sup>®</sup>超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); ACQUITY<sup>®</sup> TQ-S MICRO 串联四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); 0.22 μm 有机滤膜(天津市津腾实验设备有限公司); 万分之一分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 标准溶液的配制

准确吸取 1.0 mL 黄曲霉毒素总量标准品于 10 mL 容量瓶用乙腈定容得到总量标准溶液母液(B<sub>1</sub>: 202 ng/mL, B<sub>2</sub>: 50.42 ng/mL, G<sub>1</sub>: 203 ng/mL, G<sub>2</sub>: 50.5 ng/mL), 准确吸取母液 2.0 mL 用 70% 的甲醇水定容至 20.0 mL 得到总量标准溶液中间液(B<sub>1</sub>: 20.2 ng/mL, B<sub>2</sub>: 5.04 ng/mL, G<sub>1</sub>: 20.3 ng/mL, G<sub>2</sub>: 5.05 ng/mL)根据需要配制所需的总量标准溶液。

#### 2.2.2 样品的前处理

##### (1) 样品的萃取

称取 4 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中, 用甲醇定容至 25 mL(精确 0.1 mL), 涡旋混匀, 置于超声波中超声 20 min, 在 6000 r/min 下离心, 待用。

##### (2) 样品净化

将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温, 待免疫亲和柱内原有液体流尽后, 将萃取液移至 50 mL 注射器中, 调节下滴速度, 控制样液以 1~3 mL/min 的速度稳定下滴。待样液滴完后, 往注射器内加入 2×10 mL 水, 以稳定流速淋洗免疫亲和柱。待水滴完后, 擦干亲和柱内壁的水滴, 加入 1 mL 甲醇洗脱亲和柱, 重力作用下自然下滴, 收集全部洗脱液并用真空泵抽干亲和柱, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤, 进 UPLC-MS 检测。

#### 2.2.3 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub>(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温为 40 °C; 进样量: 5 μL; 流动相: A 相为甲醇, B 相为 5 mmol/L 乙酸钠水溶液; 流速: 0.2 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~4.5 min, 35% A~85% A; 4.5~6 min, 85% A~100% A; 6~6.5 min, 100% A~35% A; 6.5~10 min, 35% A。

#### 2.2.4 质谱条件

质谱仪选用 ESI<sup>+</sup>, 采用多反应监测模式(multiple response monitoring, MRM)定量, 离子源温度: 150 °C, 毛细管电压为 0.47 kV, 脱溶剂气温度: 350 °C, 脱溶剂气和锥孔气流量分别设为 550 L/h 和 100 L/h。质谱参数见表 1。

## 3 结果与讨论

### 3.1 前处理方法的优化

(1) 提取液的选择。准确称取 4 g 酒样直接用纯水与用 PBS 定容至 25 mL 做对比, 其中 PBS 有溶解并保护试剂的作用, 具有盐平衡是生物活性需要的物质, 但通过加标实验发现使用这两种试剂回收率、稳定性等都很好, 考虑到

PBS 试剂配制的繁琐, 最终选择纯水作为提取液。(2)上样液量的选择, 取 4 g 酒样直接用纯水定容至 25 mL 与 50 mL, 混匀, 过免疫亲和柱, 根据加标回收率的结果(见表 2)显示, 最终选择定容体积为 25 mL。

### 3.2 色谱条件的优化

流动相的选择: 对比甲醇—甲酸水和甲醇—5 mmol/L 乙酸铵两种流动相体系, 发现用甲醇—

5 mmol/L 乙酸铵做为流动相, 4 种黄曲霉毒素的响应都更好, 且稳定性更好。最终选择甲醇—5 mmol/L 乙酸铵做为流动相。

### 3.3 质谱条件的优化

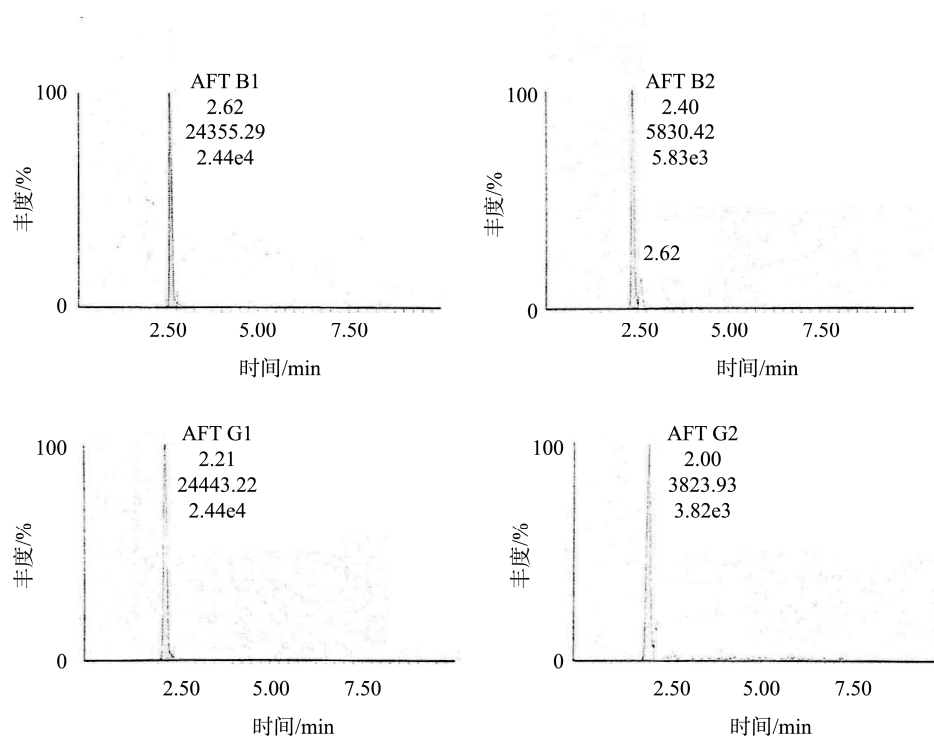
用 MRM 模式对选定的子离子进行质谱参数的优化, 取丰度最强的子离子作为定量离子。图 1 为 4 种黄曲霉毒素在优化的质谱和色谱条件下的 MRM 色谱图。

表 1 黄曲霉毒素总量的质谱条件参数

Table 1 Mass spectrometry parameters of aflatoxin total

黄曲霉毒素总量	母离子( <i>m/z</i> )	子离子( <i>m/z</i> )	碰撞能量/eV	锥孔电压/V
AFTB <sub>1</sub>	313.04	285.09*	40	12
		240.93	62	
AFTB <sub>2</sub>	315.05	287.12*	40	10
		259.06	44	
AFTG <sub>1</sub>	329.03	243.06*	45	7
		283.02	57	
AFTG <sub>2</sub>	331.06	245.09*	40	40
		285.01	45	

注: 带\*的为定量离子。



注: AFTB<sub>1</sub>(2.62 min), AFTB<sub>2</sub>(2.40 min), AFTG<sub>1</sub>(2.21 min), AFTG<sub>2</sub>(2.00 min)。

图 1 黄曲霉毒素总量的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of aflatoxin total

表 2 定容体积选择  
Table 2 Constant volume selection

黄曲霉毒素总量	定容至 25 mL 回收率/%	定容至 50 mL 回收率/%
AFTB <sub>1</sub>	100.93	95.60
	102.41	102.57
	103.38	101.96
AFTB <sub>2</sub>	87.30	80.36
	95.98	94.12
	91.52	95.40
AFTG <sub>1</sub>	95.57	93.47
	96.74	94.00
	95.73	96.31
AFTG <sub>2</sub>	91.09	89.60
	90.97	95.54
	92.16	89.03

### 3.4 方法学验证的指标(线性范围、检出限、定量限、精密度、回收率)

用配制好的总量标准溶液进行检测, 绘制标准曲线结果表明, 黄曲霉毒素总量均有较好的线性关系, 以 3 倍信噪比( $S/N$ )确定检出限(limit of detection, LOD), 以 10 倍信噪比( $S/N$ )确定定量限(limit of quantitation, LOQ), 结果见表 3。

在空白样品中添加标准溶液的方法, 选择云南省保山市小作坊生产的散装白酒 5 批次, 生产企业瓶装白酒 3 批次做黄曲霉总量检测实验, 黄曲霉毒素均为未检出, 随机选择小作坊生产的白酒 1 批次进行 3 个水平浓度加标回收实验, 各做 6 次平行实验, 计算平均回收率和相对标准偏差(RSD)。结果表明, 白酒中黄曲霉毒素总量待测物的回收率在 87%~103%之间, RSD 小于 3.0%(见表 4), 方法的准确度和精密度均符合毒素分析的要求。

### 3.5 样品的检测

以云南省保山市小作坊生产的散装白酒, 生产企业瓶装白酒为样品, 用本方法进行检测, 样品中没有检出黄曲霉毒素, 根据方法学验证指标表明该方法可行, 且操作简单快速准确, 可用于白酒中黄曲霉毒素总量的检测。

表 3 黄曲霉毒素总量的回归方程、线性范围及检出限  
Table 3 Linear equations, correlation coefficients (R), linear ranges, LODs of aflatoxin total

黄曲霉毒素总量	线性方程	相关系数( $R^2$ )	线性范围/(ng/mL)	检出限/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
AFTB <sub>1</sub>	$Y=3062.02X+130.1$	0.99986	0.4~20	0.01
AFTB <sub>2</sub>	$Y=2753.68X+67.75$	0.99989	0.1~5	0.03
AFTG <sub>1</sub>	$Y=2971.4X+138.8$	0.99983	0.4~20	0.01
AFTG <sub>2</sub>	$Y=1884.71X-10.09$	0.99982	0.1~5	0.03

表 4 黄曲霉毒素总量三个水平回收率和精密度( $n=6$ )  
Table 4 Recoveries and RSDs of aflatoxin total at 3 spiked levels ( $n=6$ )

黄曲霉毒素总量	添加量/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率/%	RSD/%
AFTB <sub>1</sub>	0.404	100.93	0.91
	0.808	102.41	1.12
	1.212	103.38	1.08
AFTB <sub>2</sub>	0.1008	87.30	1.02
	0.2016	95.98	1.54
	0.3024	91.52	1.85
AFTG <sub>1</sub>	0.406	95.57	2.40
	0.812	96.74	1.85
	1.218	95.73	0.93
AFTG <sub>2</sub>	0.101	91.09	2.97
	0.202	90.97	2.33
	0.303	92.16	2.86

## 4 结 论

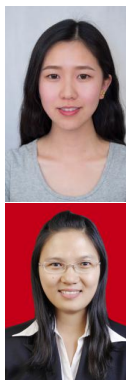
研究建立了用超高效液相色谱-串联质谱测定白酒中黄曲霉毒素总量的方法, 通过对线性、回收率和精密度等技术参数的考察, 表明该方法操作简便, 与国标 GB 5009.22-2016 相比, 前处理简单, 节约成本, 具有快速简便、灵敏度高、抗干扰强等特点, 为白酒中黄曲霉毒素总量的检测提供一种新的方法和技术。

## 参考文献

- [1] 杨美华. 药用植物及其产品中真菌及真菌毒素污染研究进展[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(6): 59-63.  
Yang MH. Research progress in fungi and mycotoxin infection of medicinal plants and their products [J]. Guizhou Agric Sci, 2008, 36(6): 59-63.
- [2] Sweeney MJ, Dobson AD. Mycotoxin production by aspergillus, fusarium and penicillium species [J]. Int J Food Microbiol, 1998, 43(3): 141-158.
- [3] 李少晖, 任丹丹, 谢云峰, 等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1107-1108.  
Li XH, Ren DD, Xie YF, *et al.* Research progress on determination methods of aflatoxins in foodstuffs [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(4): 1107-1108.
- [4] 胡延春, 贾艳, 张乃生. 生物毒素的应用研究[J]. 生物技术通讯, 2004, (1): 83-85.  
Hu YC, Jia Y, Zhang NS. Applied research of biotoxin [J]. Letters Biotechnol, 2004(1): 83-85.
- [5] De Girolamo A, Fauw D, Pereboom-de, SE, *et al.* Determination of fumonisins B1 and B2 in maize-based baby food products by HPLC with fluorimetric detection after immunoaffinity column clean-up [J]. World Mycotoxin J, 2010, 11(1): 159.
- [6] Li H, Mu Y, Yan JR, *et al.* Label-free photoelectrochemical immunosensor for neutrophil gelatinase-associated lipocalin based on the use of nanobodies [J]. Anal Chem, 2015, 87(3): 2007-2015.
- [7] Marroquín-Cardona AG, Johnson NM, Phillips TD, *et al.* Mycotoxins in a changing global environment—A review [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 69: 220-230.
- [8] Hou SL, Ma ZE, Meng H, *et al.* Inorganic/organic mesoporous silica as a novel fiber coating of solid-phase microextraction [J]. Talanta, 2019, 194: 919.
- [9] Verheecke C, Liboz T, Mathieu F. Microbial dehradation of aflatoxin B1: Current status and future advances [J]. Int J Food Microbiol, 2016, (237): 1-9.
- [10] Wu F, Guclu H. Aflatoxin regulations in a network of global maize trade [J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45151.
- [11] 胡振阳, 都立辉, 袁康, 等. 稻谷黄曲霉毒素的检测与污染控制研究进展[J]. 中国粮油学报. 2020, 35(1): 175.  
Hu ZY, Du LJ, Kang Y, *et al.* Advances in the detection and contamination control of aflatoxin in rice [J]. J Chin Cereals Oils Association, 2020, 35(1): 175.
- [12] 莫紫梅, 袁天蔚, 陈宁周, 等. 黄曲霉毒素降解技术及其降解生物研究进展[J]. 2019, 40(2):189-193.  
Mo ZM, Yuan TW, Chen ZN, *et al.* The Research progress of aflatoxins degradation and product analysis [J]. Food Res Dev, 2019, 40(2): 189-193.
- [13] 张秋, 范光森, 李秀婷. 我国白酒质量现状浅析[J]. 中国酿造, 2016, 35(11): 15-20.  
Zhang Q, Fan XG, Li XT. Brief analysis on the status of Baijiu quality and safety in China [J]. China Brew, 2016, 35(11): 15-20.
- [14] Charles L, Wilso, Samir D. Microbial food contamination [M]. New York: CRC Press, 2001.
- [15] 庄振宏, 郑传琦, 汪世华. 黄曲霉培养条件的优化及黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的提取[J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(5): 724-729.  
Zhuang ZH, Zhen CQ, Wang SH. Aspergillus flavus culture conditions and extraction of aflatoxin B1 [J]. China J Appl Environ Biol, 2010, 16(5): 724-729.
- [16] 刘作新, 高军侠. 黄曲霉毒素的检测方法研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2004, 31(2): 223-226.  
Liu ZX, Gao JX. Advances in the detection of aflatoxin [J]. J Anhui Agric Univ, 2004, 31(4): 223-226.
- [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 aflatoxin groups B and G in food [S].

(责任编辑: 王 欣)

## 作者简介



李晓颀, 助理工程师, 主要研究方向为食品中添加剂、毒素等方面的研究。  
E-mail: 260769812@qq.com

杨丽英, 工程师, 主要研究方向为食品中添加剂、毒素等方面的研究。  
E-mail: 8438204@qq.com