

杨永坛研究员主持“粮油污染物检测及控制”专栏文章之二

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.05.020

叶金, 刘彤彤, 罗丽娟, 等. UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合全碳标记稳定同位素内标法精确测定粮油中黄曲霉毒素[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(5): 170-178.

YE J, LIU T T, LUO L J, et al. Accurate determination of aflatoxin in grains and oils use liquid chromatography mass spectrometry purified by automatic solid phase extraction instrument and quantified by fully ¹³C-Labelled internal standards[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(5): 170-178.

UPLC-Q-Orbitrap HRMS 结合全碳 标记稳定同位素内标法精确 测定粮油中黄曲霉毒素

叶金¹, 刘彤彤¹, 罗丽娟², 吴宇¹✉, 李丽¹, 王松雪¹

(1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮油质量安全研究所, 北京 100037;
2. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: 建立了全自动免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) 结合全碳标记稳定同位素内标法对粮油中四种黄曲霉毒素精确定量方法。样品准确称量后加入全碳标记稳定同位素内标, 经 84/16(V/V) 的乙腈/水提取、离心、稀释后, 通过全自动固相萃取仪采用黄曲霉毒素免疫亲和柱进行全自动净化, 净化液在 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 上进行检测后采用内标法进行定量分析。结果表明: 黄曲霉毒素的加标回收率为 84.7%~104.6%, 日内相对标准偏差为 1.7%~9.4%, 日间精密度为 0.7%~8.4%。采用本方法对国家标准物质的检测结果在赋值范围内, 能够最大限度地降低实验人员工作量, 提高工作效率, 避免因人员操作失误导致的结果偏差, 适用于粮油中黄曲霉毒素的精准测定, 可满足日常检测和监测需求。

关键词: 全自动固相萃取仪; 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱; 黄曲霉毒素; 免疫亲和柱; 全碳标记稳定同位素内标法

中图分类号: TS207; Q93 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)05-0170-09

网络首发时间: 2023-09-12 09:45:15

网络首发地址: <http://link.cnki.net/urlid/11.3863.TS.20230911.1034.004>

收稿日期: 2023-04-20

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFE0137500); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZX2231); 全国粮食和物资储备青年拔尖人才项目(QN 2022202)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No.2022YFE0137500); Fundamental Research Funds of the Central Research Institutes (No. ZX2231); Talent Project of National Food and Strategic Reserves Administration (No. QN 2022202)

作者简介: 叶金, 男, 1988 年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向为粮油质量安全检测及监测预警。E-mail: yj@ags.ac.cn

通讯作者: 吴宇, 女, 1988 年出生, 硕士, 助理研究员, 研究方向为粮油质量安全检测。E-mail: wyu@ags.ac.cn

Accurate Determination of Aflatoxin in Grains and Oils use Liquid Chromatography Mass Spectrometry Purified by Automatic Solid Phase Extraction Instrument and Quantified by Fully ¹³C-Labelled Internal Standards

YE Jin¹, LIU Tong-tong¹, LUO Li-juan², WU Yu¹✉, LI Li¹, WANG Song-xue¹

(1. Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; 2. School of Health Science Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract: An UPLC Quadrupole Orbitrap high resolution mass Spectrometry method for accurate quantification of aflatoxins in grains and oils was established, which were purified by automatic immunoaffinity column. The sample was extracted with 84/16(V/V) acetonitrile/water and centrifuged. The supernatant was diluted 10 times with 0.1% PBST. Aflatoxin immunoaffinity column without background and recovery greater than 90% was chosen for purification automatically. UPLC-Quadrupole Orbitrap HRMS was used for quantitative analysis. Results showed that recoveries for aflatoxins were 84.7%~104.6%. The intra-day relative standard deviations were 1.7%~9.4%, and the intra-day precision were 0.7%~8.4%. The developed method can minimize the workload, improve work efficiency and avoid the result deviation caused by operation manually. It is suitable for the accurate determination of aflatoxins in grains and oils, and meet the requirement of the daily test and monitoring aflatoxins.

Key words: automatic solid phase extraction instrument; ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole orbitrap high-resolution mass spectrometric; aflatoxin; immunoaffinity column; fully ¹³C isotope labeled internal standard calibration method

黄曲霉毒素 (AFT) 是由黄曲霉 (*aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*a.parasiticus*) 产生的一类化学结构类似的二氢呋喃香豆素衍生物^[1]。常见的有黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 四种, 它们存在于土壤、动植物、各种坚果中, 特别容易污染花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品, 其中黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最大, 被世界卫生组织列为 I 类致癌物。其对人和动物有较强的致病性、致癌性, 是危害最严重的真菌毒素之一, 因此受到世界各国的广泛关注^[2]。鉴于黄曲霉毒素对人类的危害, 食品安全国家标准 GB2761—2017《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》规定了我国食品中黄曲霉毒素 B₁ 的限量要求: 玉米、花生仁、花生油以及玉米及花生制品中不得超过 20 μg/kg, 大米及其食用油不得超过 10 μg/kg^[3]。

目前, 现有检测食品中黄曲霉毒素的前处理方法主要包括薄层层析法^[4]、酶联免疫吸附法^[5]和胶体金试纸条法^[6]、高效液相色谱法^[7]、高效液相色谱-质谱联用法^[8]等。薄层层析法前处理操作

繁琐, 费力耗时, 且重现性差; 酶联免疫吸附法和胶体金试纸条法多用于黄曲霉毒素的快速筛查, 易受基质干扰影响出现假阳性; 现普遍使用的免疫亲和柱层析高效液相色谱法, 具有净化效果好, 检测准确性高等特点, 但该方法需过柱、氮吹、复溶, 因此操作复杂、耗时、费力, 对操作人员技术水平要求高; 高效液相色谱-质谱联用法适用于多种真菌毒素同时定性定量检测, 有较高的灵敏度和稳定性, 并具有一定的抗干扰能力等特点, 但现有免疫亲和柱或者固相萃取柱通常需要手动净化, 操作复杂、耗时长, 且容易引入人为因素误差等。基于上述问题, 为提高检测效率, 并降低人为操作引入的误差, 本研究拟采用全自动固相萃取仪结合免疫亲和柱净化技术建立全自动免疫亲和柱固相萃取-超高效液相色谱-质谱法联用检测粮油中黄曲霉毒素的方法。该方法无需氮吹复溶、前处理简单、省时省力、定量准确、稳定性良好、环境和人员健康友好, 适用于复杂基质样品中黄曲霉毒素的检测。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

甲醇、乙腈: Merk, 色谱纯; PBS 盐包、吐温-20: Sigma, 色谱纯; 超纯水: Waston; Evergreen TREA 黄曲霉毒素免疫亲和柱: 中检环贸生物技术(北京)有限公司; GBW(E)100386 玉米全粉黄曲霉毒素 B₁ 成分标准物质、GBW(E)100604 花生油中黄曲霉毒素 B₁ 成分分析标准物质、GBW(E)100606 大米粉中玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素成分分析标准物质、玉米、小麦、糙米、大米、花生油空白: 国家粮食和物资储备局科学研究院; 黄曲霉毒素 B₁(4.0 μg/mL, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(1.0 μg/mL, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(1.0 μg/mL, AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂(1.0 μg/mL, AFG₂)、¹³C₁₇-黄曲霉毒素 B₁(0.5 μg/mL, ¹³C₁₇-AFB₁)、¹³C₁₇-黄曲霉毒素 B₂(0.5 μg/mL, ¹³C₁₇-AFB₂)、¹³C₁₇-黄曲霉毒素 G₁(0.5 μg/mL, ¹³C₁₇-AFG₁)、¹³C₁₇-黄曲霉毒素 G₂(0.5 μg/mL, ¹³C₁₇-AFG₂): ROMER。

Fotector Plus 全自动固相萃取仪: 睿科仪器有限公司; 四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱仪 Q-Exactive: Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 标准溶液的配制

黄曲霉毒素混标溶液 (AFS) 的配制: 取 333.3 μL 3.00 μg/mL AFB₁、83.3 μL 3.00 μg/mL AFB₂、83.3 μL 3.00 μg/mL AFG₁、83.3 μL 3.00 μg/mL AFG₂

分别于 1 mL 棕色小瓶中, 加入 416.8 μL 甲醇混合均匀后得到浓度为 1.00 μg/mL, AFB₁、0.25 μg/mL, AFB₂、0.25 μg/mL, AFG₁、0.25 μg/mL, AFG₂ 的混标即 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的浓度比为 4 : 1 : 1 : 1。

黄曲霉毒素混合内标溶液 (¹³C₁₇-AFS) 的配制: 取 400 μL 0.50 μg/mL ¹³C₁₇-AFB₁、100 μL 0.50 μg/mL ¹³C₁₇-AFB₂、100 μL 0.50 μg/mL ¹³C₁₇-AFG₁、100 μL 0.50 μg/mL ¹³C₁₇-AFG₂ 分别于 1 mL 棕色小瓶中, 加入 300 μL 甲醇混合均匀后得到浓度为 0.20 μg/mL ¹³C₁₇-AFB₁、0.05 μg/mL ¹³C₁₇-AFB₂、0.05 μg/mL ¹³C₁₇-AFG₁、0.05 μg/mL ¹³C₁₇-AFG₂ 的混标, 即 ¹³C₁₇-AFB₁、¹³C₁₇-AFB₂、¹³C₁₇-AFG₁、¹³C₁₇-AFG₂ 的浓度比为 4 : 1 : 1 : 1。

1.3 仪器条件

色谱条件: Waters CORTECTS C18 柱 (2.1 × 100 mm, 1.6 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: A 为甲醇, B 为含 0.1% (体积分数) 的甲酸和 1 mmol/L 乙酸铵的水溶液, 流速: 0.3 mL/min。梯度洗脱条件: 0 min, 70%B; 6 min, 50%B; 6.1 min, 5%B; 7 min, 5%B; 7.1 min, 70%B; 10 min, 70%B。流速为 0.2 mL/min, 进样量为 2 μL。

质谱条件: 加热电喷雾离子源 (HESI) 温度为 300 °C; 毛细管电压为 3.2 kV; 离子传输管温度为 320 °C; 鞘气为 35 unit; 辅助气为 10 unit; 黄曲霉毒素质谱参数见表 1。

表 1 黄曲霉毒素的分子式、保留时间 (RT) 和质谱参数

Table 1 Formula, retention times (RT) and mass parameters of aflatoxins

化合物名称	分子式	加合形式	保留时间/min	母离子/(m/z)	质量偏差/(ppm)	子离子/(m/z)
Aflatoxin B ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	5.52	313.070 01	-0.720 0	214.062 4、241.049 5、269.044 4、285.075 7
Aflatoxin B ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	4.96	315.086 18	-0.891 6	243.065 2、259.060 1、287.091 4、297.075 7
Aflatoxin G ₁	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	4.10	329.063 78	-0.827 7	215.070 3、243.065 2、283.060 1、311.055 0
Aflatoxin G ₂	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	3.65	331.080 66	-0.621 7	189.054 6、217.085 9、245.080 8、285.075 7

Targeted-SIM 模式; 极性 (Polarity): 正离子模式; 扫描范围 (Scan range): 250~800 m/z; 分辨率 (Resolution): 70 000; 自动增益控制 (AGC target): 5e5; 最大驻留时间 (Maximum IT): 20 ms; 同时扫描的母离子数 (MSX count): 5; 质荷比

宽度 (Isolation window): 1.5 m/z。

Fullscan 模式: 极性 (Polarity): 正离子模式; 扫描范围 (Scan range): 250~800 m/z; 分辨率 (Resolution): 70 000; 自动增益控制 (AGC target): 5e5; 最大驻留时间 (Maximum IT): 20 ms。

PRM 模式: 极性 (Polarity): 正离子模式; 分辨率 (Resolution): 70 000; 自动增益控制 (AGC target): $5e5$; 最大驻留时间 (Maximum IT): 20 ms, 质荷比分离宽度 (Isolution window): 1.5 m/z, 归一化碰撞能量 (NCE): 50。

1.4 样品前处理方法

准确称取 5 g (± 0.01 g) 样品, 加入 125 μL $^{13}\text{C}_{17}$ -AFS 稳定同位素内标, 加入 20 mL 的 84% 乙腈水, 涡旋提取 20 min, 7 000 rpm 离心 5 min, 取 4 mL 上清液加入 46 mL 0.1% PBST 缓冲液于全自动固相萃取仪的 80 mL 上样管内, 运行编辑好的方法对样品进行自动净化 (具体步骤见表 2), 将自动收集的洗脱液过 0.2 μm PTFE 滤膜后上机检测。

2 结果与讨论

2.1 色谱梯度优化

为使四种黄曲霉毒素的响应和峰形最佳以确保灵敏度最高, 实验考察了 AFB₁ 浓度为 5.00 $\mu\text{g/L}$, AFB₂、AFG₁、AFG₂ 浓度为 1.25 $\mu\text{g/L}$ 时, 5 个不同的液相色谱梯度对四种黄曲霉毒素的色谱分离情况。如图 1 所示, 流动相: A 为甲醇, B 为含 0.1% (体积分数) 的甲酸和 1 mmol/L 乙酸铵的水溶液, 流速: 0.3 mL/min, 梯度洗脱条件: 0 min, 70%B; 6 min, 50%B; 6.1 min, 5%B; 7 min, 5%B; 7.1 min, 70%B; 10 min, 70%B 时四种黄曲霉毒素能够基线分离, 且干扰峰与黄曲霉毒素 B₁ 分开, 提高了 AFB₁ 检测灵敏度、稳定性、准确性。

表 2 全自动固相萃取仪免疫亲和柱净化步骤

Table 2 Purification procedure of immune affinity column for automatic solid phase extraction instrument

序号	命令	溶剂	排出	流速/(mL/min)	体积/mL	时间/min
1	清洗样品通道	H ₂ O				2.8
2	填充样品路径	H ₂ O		40	3	1.3
3	特殊上样		废水	10	50	8
4	清洗样品瓶	H ₂ O	废水	80	5	2.6
5	气推		废水	80	30	2.2
6	气推		废水	80	30	2.2
7	气推		废水	80	30	2.2
8	清洗注射泵	CH ₃ OH		80	5	0.5
9	洗脱	CH ₃ OH	收集	0.5	2	4.4
10	气推		收集	0.5	2	4.4
11	气推		收集	80	20	1.6
12	结束					

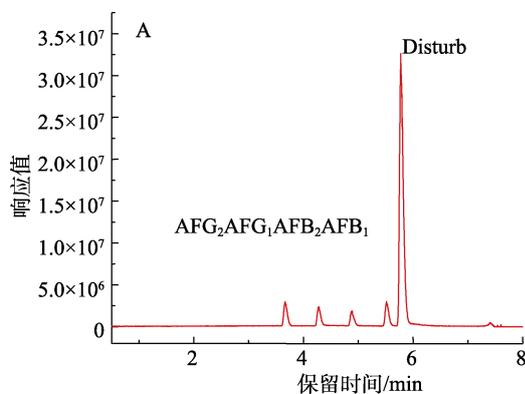


图 1 最终流动相梯度洗脱条件下 AFS 的色谱图

Fig.1 Chromatogram of AFS with final gradient conditions

2.2 溶剂效应

传统方法为避免免疫亲和柱的洗脱液 (100%)

高比例有机相作为标准品和样品溶剂时产生溶剂效应发生峰展宽从而导致方法偏差大、灵敏度低, 通常采用氮吹复溶方法将标准品和样品溶剂转换为初始流动相, 方法前处理时间长, 需要配备氮吹仪, 且氮吹过程易导致目标物损失, 回收率偏低。因此, 实验考察了在优化好的梯度下, AFB₁ 浓度为 5.00 $\mu\text{g/L}$, AFB₂、AFG₁、AFG₂ 浓度为 1.25 $\mu\text{g/L}$, 进样量为 2 μL 时使用 10% 甲醇 (10% MEOH)、50% 甲醇 (50% MEOH)、100% 甲醇 (100% MEOH) 配制的标准品有无溶剂效应, 从图 2a 可以看出三种溶剂中四种黄曲霉毒素的峰形尖锐, 无溶剂效应, 因此选择标准品和样品的溶剂为 100% MEOH 时, 可直接上机检测, 无

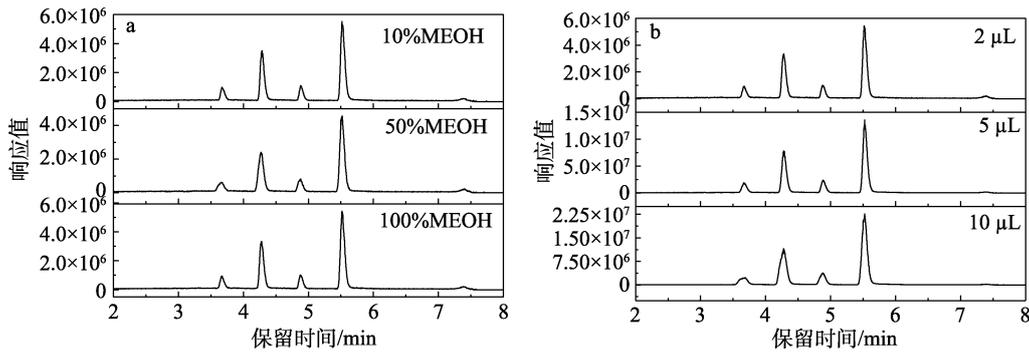


图 2 不同溶剂下 AFS 的色谱图 (a) 和不同进样体积下 AFS 的色谱图 (b)
 Fig.2 Chromatograms of AFS with different solvents (a) and AFS with different injection volumes (b)

需氮吹、复溶,大幅缩短样品前处理时间,避免步骤繁琐引入更多偏差。同时考察了标准品溶剂为 100% 甲醇,进样量为 2 μL 、5 μL 、10 μL 时是否有溶剂效应,结果见图 2 b,当进样量为 10 μL 时 AFG₁ 和 AFG₂ 有明显的溶剂效应,导致峰变宽,灵敏度降低,进样量为 2 μL 和 5 μL 时无溶剂效应,考虑到进样量为 5 μL 时四种黄曲霉毒素的响应增加约 2.5 倍,方法的灵敏度提高,因此,确定进样量为 5 μL 。

2.3 内标量对实验结果的影响

为保证内标法定量结果的准确性必须确保内标的响应和稳定性良好,因此内标浓度不能过低,

但是由于目标化合物的响应随着内标浓度的增加会发生质谱信号饱和导致的掉点现象(标准曲线高浓度点响应低于理论响应值),因此实验系统考察了系列标准溶液中(AFB₁ 浓度分别为 1.00、5.00、10.00、20.00、40.00 $\mu\text{g/L}$, AFB₂、AFG₁、AFG₂ 浓度为 0.25、1.25、2.50、5.00、10.00 $\mu\text{g/L}$) 分别加入不同浓度的内标(¹³C₁₇-AFB₁ 浓度分别为 1.00、5.00、10.00、20.00、40.00 $\mu\text{g/L}$, ¹³C₁₇-AFB₂、¹³C₁₇-AFG₁、¹³C₁₇-AFG₂ 浓度分别为 0.25、1.25、2.50、5.00、10.00 $\mu\text{g/L}$) 时质谱响应情况。结果见图 3,四种毒素的响应随着内标浓度的增加并未出现掉点现象,当内标 ¹³C₁₇-AFB₁

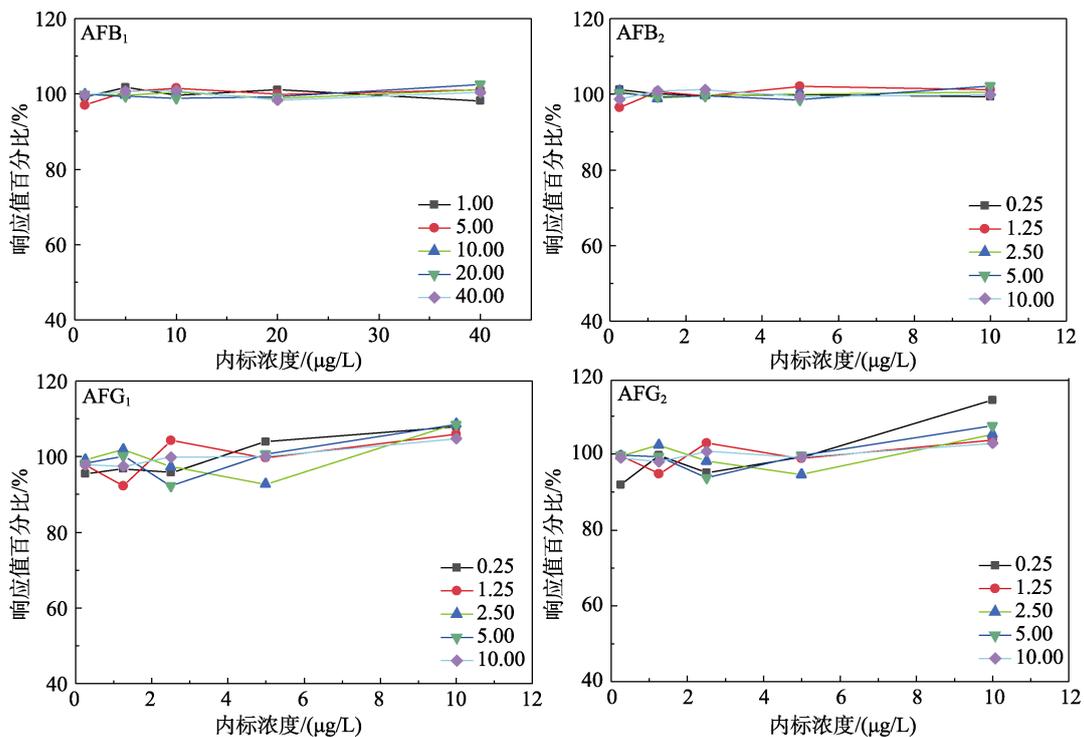


图 3 不同内标加标量下四种黄曲霉毒素的响应百分比变化情况
 Fig.3 The percentage response of four aflatoxins under different internal standard concentration

浓度为 5.00 μg/L, ¹³C₁₇-AFB₂、¹³C₁₇-AFG₁、¹³C₁₇-AFG₂ 浓度为 1.25 μg/L 时, 能保证内标响应稳定, 因此, 为了降低内标的使用成本, 最终选择内标 ¹³C₁₇-AFB₁ 浓度为 5.00 μg/L, ¹³C₁₇-AFB₂、¹³C₁₇-AFG₁、¹³C₁₇-AFG₂ 浓度为 1.25 μg/L。

2.4 不同质谱监测模式的对比

高分辨质谱常用的定量扫描模式有 Fullscan、SIM、PRM 三种, 不同扫描模式对线性、稳定性和灵敏度不同, 为考察不同扫描模式对定量参数的影响, 考察了 Fullscan、SIM、PRM 三种扫描模式下的相关系数 (R²)、相对标准偏差 (RSD)、基质效应、检出限 (LOD, S/N ≥ 3) 和定量限 (LOQ, S/N ≥ 10), 按照样品前处理方法对空白样品进行处理获得空白基质液, 采用逐级稀释法配制黄曲霉毒素基质匹配标准曲线 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 浓度为 0.10、0.20、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00、50.00、100.00、200.00 μg/L)。结果见表 3, Fullscan、SIM 扫描模式的相关系数 (R²) 均在 0.999 6 以上, PRM 扫描模式的相关系数 (R²) 在 0.991 3 以上; Fullscan、PRM 扫描模式下低浓度点的 RSD 值范围在 4.7%~86.5%, 其他浓度点 RSD

值范围均小于 11.8%; SIM 扫描模式下的 10 个浓度点 RSD 值均小于 14.1%。同时, 糙米、花生油、小麦和玉米的基质效应为 Fullscan: 111.1%~176.3%、SIM: 115.4%~140.8%、PRM: 106.2%~149.4%; 有不同程度的基质增强效应, 说明基质干扰对目标化合物的响应有增加作用。综合考虑, Fullscan、SIM 扫描模式下的相关系数 R² 在 0.999 6~0.999 9 范围内, 而 SIM 模式下的四种黄曲霉毒素 10 个浓度点的 RSD 值均 < 15%, SIM 模式下测定的检出限为 0.03 μg/kg、定量限为 0.1 μg/kg, 相比其他两种扫描模式灵敏度更高。因此选择 SIM 监测模式对样品进行检测最佳, 能够有效校正基质效应, 提高准确度和精密度。

2.5 上样流速的优化

为了缩短上样时间, 同时保证待测毒素全部吸附到免疫亲和柱上, 实验考察玉米基质加标稀释液在上样流速分别为 2、3、5、7、10 mL/min 时的柱回收率, 结果如图 4 所示, 当流速为 2~10 mL/min 时, 四种黄曲霉毒素的回收率均在 95%~110% 以上。为了缩短上样时间、确保回收率及精密度达到最佳, 最终选择上样流速为 10 mL/min。

表 3 不同监测模式对黄曲霉毒素定量参数的影响

Table 3 Comparison of different monitoring modes for quantitation of aflatoxins

	AFB ₁			AFB ₂			AFG ₁			AFG ₂			
	Fullscan	SIM	PRM										
检出限/(μg/kg)	0.05	0.03	0.1	0.05	0.03	0.1	0.05	0.03	0.1	0.05	0.03	0.1	
定量限/(μg/kg)	0.5	0.1	1	0.5	0.1	1	0.5	0.1	1	0.5	0.1	1	
截距	0.374 4	0.371 7	0.479 7	1.439 6	1.407 5	1.811 8	1.519 2	1.488 6	1.914 8	1.730 0	1.647 3	2.426 6	
相关系数(R ²)	0.999 8	0.999 7	0.999 7	0.999 9	0.999 6	0.991 3	0.999 9	0.999 9	0.998 3	0.999 9	0.999 8	0.998 8	
线性范围/(μg/kg)	0.5~200	0.1~200	1~200	0.5~200	0.1~200	1~200	0.5~200	0.1~200	1~200	0.5~200	0.1~200	1~200	
不同浓度水平 RSD/%	0.1	43.4	12.5	72.4	71.2	9.6	82.2	65.9	10.3	82.7	86.5	14.1	69.0
	0.2	34.8	1.9	23.5	44.9	1.5	63.2	42.7	4.8	36.4	51.4	5.0	47.0
	0.5	4.7	1.8	28.5	9.4	1.0	33.3	5.8	2.9	18.8	9.8	0.9	61.8
	1	1.6	1.2	10.4	0.7	1.6	9.5	0.5	0.7	11.8	1.1	3.2	7.3
	5	0.7	0.2	5.4	2.1	1.3	6.4	1.5	0.9	2.7	1.1	1.9	9.5
	10	0.9	1.2	6.0	2.5	1.0	16.3	1.6	0.8	7.4	1.8	1.3	14.9
	20	1.8	3.3	9.5	1.1	1.0	9.4	1.3	2.1	13.6	1.9	1.5	9.5
	50	0.8	1.2	6.9	2.3	0.5	18.7	1.3	1.2	13.5	0.6	0.5	17.0
基质效应/%	100	0.7	0.5	8.0	2.9	2.9	4.1	1.6	0.7	15.8	2.4	4.1	22.7
	200	1.5	1.3	4.2	0.2	1.7	11.0	3.4	1.5	5.9	1.6	1.0	39.5
	糙米	126.8	122.1	131.3	162.1	124.6	129.7	120.7	127.1	116.1	114.1	131.9	128.7
	花生油	125.0	121.8	125.0	150.9	124.5	122.6	119.0	127.3	119.5	117.4	128.2	122.2
	小麦	145.0	140.8	149.4	176.3	135.6	128.5	122.4	130.5	119.8	114.9	119.2	124.4
玉米	117.2	115.6	118.1	151.5	115.5	108.3	111.1	115.4	111.2	118.3	125.2	106.2	

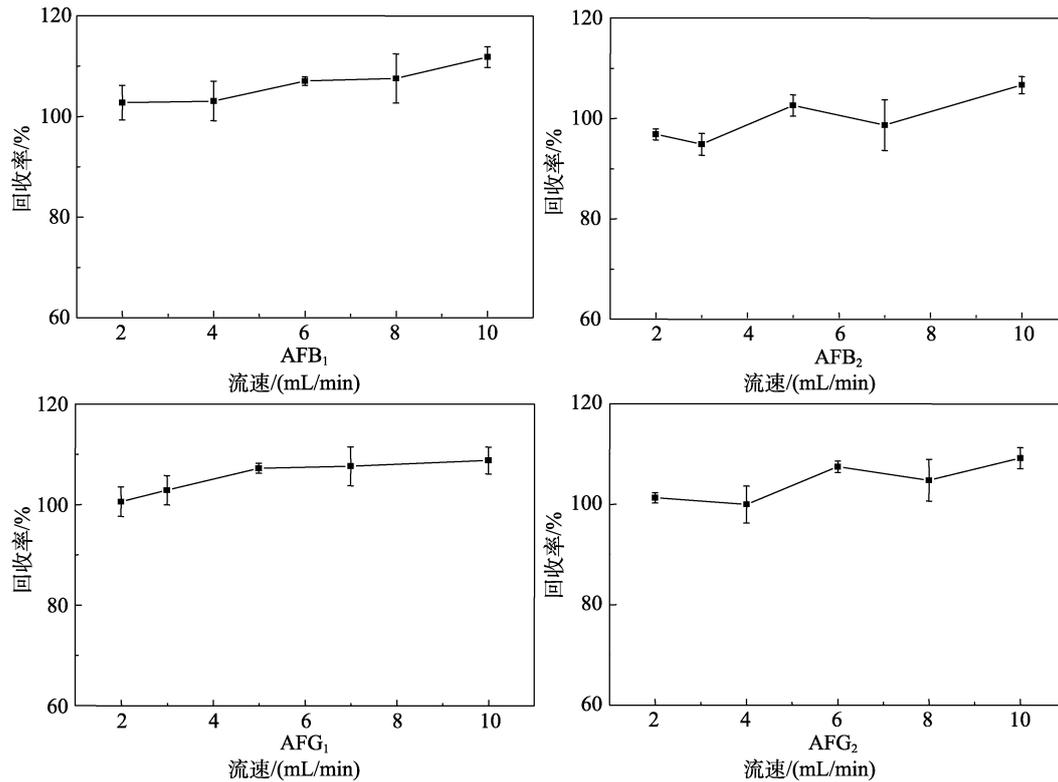


图 4 上样流速对黄曲霉毒素回收率的影响

Fig.4 Effect of loading sample flow rate on recovery of aflatoxins

2.6 方法验证

2.6.1 方法线性、检出限及定量限

采用净溶液逐级稀释方法获得 4 种黄曲霉毒素的检出限 (LOD, $S/N \geq 3$) 和定量限 (LOQ, $S/N \geq 10$)。表 4 列出了 4 种黄曲霉毒素的线性范围、检出限和定量限。结果表明 4 种黄曲霉毒素在各自的线性范围内线性关系良好, 相关系数 (R^2) 均 < 0.999 , LOD 为 $0.03 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、LOQ 为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$, 可满足黄曲霉毒素日常检测的需要。

表 4 方法的相关系数、线性范围、检出限和定量限
Table 4 Correlation coefficient, linear range, LOD and LOQ of the method

化合物	相关系数 R^2	线性范围 /($\mu\text{g}/\text{L}$)	检出限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
AFB ₁	0.999 7	0.1~200	0.03	0.1
AFB ₂	0.999 6	0.1~200	0.03	0.1
AFG ₁	0.999 9	0.1~200	0.03	0.1
AFG ₂	0.999 8	0.1~200	0.03	0.1

2.6.2 日内精密度及回收率

取空白玉米、小麦、糙米、花生油样品, 分别添加 3 个浓度水平的黄曲霉毒素混合标准溶液, 按样品前处理方法进行处理, 每个加标水平

进行 6 次重复实验, 回收率和 RSD 值见表 5。四种黄曲霉毒素 3 个添加水平回收率在 $84.7\% \sim 104.6\%$ 之间, RSD 值在 $1.7\% \sim 9.4\%$ 之间。

2.6.3 日间精密度及回收率考察

配制的低、中、高 3 个浓度梯度的花生油加标样品连续 3 天进行重复检测, 结果见表 6。方法 RSD 值在 $0.7\% \sim 8.4\%$ 范围内, 该方法具有较好的重复性。

2.6.4 方法的准确性考察

采用新建的方法对 GBW(E)100386 玉米全粉黄曲霉毒素 B1 成分标准物质、GBW(E)100604 花生油中黄曲霉毒素 B1 成分分析标准物质、GBW(E)100606 大米粉中玉米赤霉烯酮和黄曲霉毒素成分分析标准物质进行检测。结果见表 7, 所有结果均落在有证标准物质赋值范围内, 证明方法准确性良好。

2.6.5 新方法 with 国标方法的对比

本研究建立的新方法与 GB5009.22—2016 《食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》第一法进行了系统全面的比较, 具体比对情况见表 8。与 GB5009.22—2016 第一法相比, 新方法可以实现免疫亲和柱的全自动过柱、无需人员值守, 避免

表5 不同加标浓度水平下粮油样品的回收率

Table 5 Recoveries of aflatoxins in different grains and oils with different spiking levels

基体	水平	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	基体	水平	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂		
玉米	低	加标浓度/(μg/kg)	10.0	2.5	2.5	2.5	糙米	低	加标浓度/(μg/kg)	5.0	1.3	1.3	1.3
		平均值/(μg/kg)	9.4	2.3	2.3	2.4			平均值/(μg/kg)	4.7	1.2	1.2	1.2
		平均回收率/%	94.1	93.4	93.0	94.1			平均回收率/%	93.1	99.0	92.2	93.2
		RSD/%	2.7	2.6	2.7	4.8			RSD/%	3.8	5.8	4.0	3.7
	中	加标浓度/(μg/kg)	20.0	5.0	5.0	5.0		中	加标浓度/(μg/kg)	10.0	2.5	2.5	2.5
		平均值/(μg/kg)	19.4	4.7	4.8	4.7			平均值/(μg/kg)	8.7	2.2	2.1	2.1
		平均回收率/%	96.9	93.6	95.3	94.7			平均回收率/%	86.9	86.8	84.5	84.7
		RSD/%	1.7	2.2	1.1	3.2			RSD/%	4.0	4.0	3.1	2.9
	高	加标浓度/(μg/kg)	40.0	10.0	10.0	10.0		高	加标浓度/(μg/kg)	20.0	5.0	5.0	5.0
		平均值/(μg/kg)	36.7	8.9	9.0	9.5			平均值/(μg/kg)	18.6	4.5	4.4	4.6
		平均回收率/%	91.8	89.3	90.2	94.5			平均回收率/%	93.2	90.6	88.3	91.6
		RSD/%	2.8	3.6	4.8	4.3			RSD/%	2.4	5.4	5.0	4.4
小麦	低	加标浓度/(μg/kg)	2.5	0.6	0.6	0.6	花生油	低	加标浓度/(μg/kg)	10.0	2.5	2.5	2.5
		平均值/(μg/kg)	2.8	0.6	0.7	0.7			平均值/(μg/kg)	9.6	2.3	2.3	2.3
		平均回收率/%	110.3	102.7	115.1	111.2			平均回收率/%	95.8	90.6	93.3	92.5
		RSD/%	4.0	9.4	3.5	5.4			RSD/%	3.2	2.0	1.9	4.3
	中	加标浓度/(μg/kg)	5.0	1.3	1.3	1.3		中	加标浓度/(μg/kg)	20.0	5.0	5.0	5.0
		平均值/(μg/kg)	5.3	1.3	1.3	1.3			平均值/(μg/kg)	19.4	4.6	4.7	4.7
		平均回收率/%	106.1	104.5	106.0	103.1			平均回收率/%	96.8	92.0	93.5	94.5
		RSD/%	2.6	4.1	3.0	5.1			RSD/%	2.7	3.0	5.4	3.9
	高	加标浓度/(μg/kg)	10.0	2.5	2.5	2.5		高	加标浓度/(μg/kg)	40.0	10.0	10.0	10.0
		平均值/(μg/kg)	9.8	2.4	2.4	2.4			平均值/(μg/kg)	38.0	8.9	9.0	9.3
		平均回收率/%	98.0	94.9	94.3	95.6			平均回收率/%	94.9	89.3	89.9	93.0
		RSD/%	5.1	4.0	2.9	6.7			RSD/%	3.6	3.1	3.2	1.9

表6 花生油不同浓度日间精密度考察

Table 6 Intra-day precision of peanut oil with different concentration

测定	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	
加标浓度/(μg/kg)	3.5	3.5	3.5	3.5	
低	第一天/(μg/kg)	3.5	3.7	3.7	3.9
	第二天/(μg/kg)	3.9	3.7	3.9	3.9
	第三天/(μg/kg)	3.8	3.7	3.3	3.8
	平均值/(μg/kg)	3.7	3.7	3.6	3.9
	RSD/%	6.1	0.7	8.4	1.7
花生油 中	加标浓度/(μg/kg)	7.0	7.0	7.0	7.0
	第一天/(μg/kg)	7.3	6.8	7.5	8.0
	第二天/(μg/kg)	6.8	6.9	6.9	7.6
	第三天/(μg/kg)	7.3	7.3	6.5	7.3
	平均值/(μg/kg)	7.1	7.0	7.0	7.6
	RSD/%	4.5	3.7	7.2	4.4
	高	加标浓度/(μg/kg)	14.0	14.0	14.0
第一天/(μg/kg)		13.4	13.0	14.3	14.0
第二天/(μg/kg)		13.3	13.7	13.8	13.3
第三天/(μg/kg)		14.4	13.6	12.9	14.6
平均值/(μg/kg)		13.7	13.4	13.7	14.0
RSD/%		4.4	3.0	5.2	4.7

表7 三种有证标准物质或参考物质的测定结果

Table 7 Quantification results of three certified reference materials

标物编号	标定值 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	RSD/% (n=3)
GBW(E)100386	27±3	28.99	0.70
GBW(E)100604	15.8±2.3	15.18	1.80
GBW(E)100606	9.7±2.0	8.68	1.40

表8 新方法与国际方法的对比

Table 8 Comparison of standard method and the new method

	本方法	GB5009.22—2016 第一法
处理方式	自动化、高通量、 无需值守	手动、低通量、 全程值守
检测方法	液质联用	液质联用
定量方法	内标法	内标法
安全性	人体健康友好	人员暴露于实验试剂
氮吹	否	是
适用样品	谷物	谷物
时间/min	60	120
检出限/(μg/kg)	0.03	0.15
定量限/(μg/kg)	0.1	0.45
日间精密度/%	<8.4	<7.5
回收率/%	84.7~104.6	90.0~98.0

了实验人员暴露于实验试剂中的安全风险，且经过溶剂、进样量和液相色谱梯度系统优化后，无需氮吹即可直接上机检测，使样品前处理时间缩短一半，降低人为操作导致的实验偏差，且定量限、检出限、回收率、日间精密度均与 GB5009.22—2016 第一法测定结果无显著差异，因此本研究建立的新方法适用于实验室的准确定量和标物同时确证定值等实验场景。

3 结论

本研究建立了全自动免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱 (UPLC-Q-Orbitrap HRMS) -全碳标记稳定同位素内标法精确测定粮油中黄曲霉毒素的方法。样品经前处理后，通过高通量全自动固相萃取仪对样品进行上样、净化及洗脱后，采用 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 精确分子量准确性检测，全碳标记稳定同位素内标法精确定量。在粮油基质中黄曲霉毒素的检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，相关系数为 >0.999 ，加标回收率为 84.7%~104.6%，日内相对标准偏差为 1.7%~9.4%，日间相对标准偏差为 0.7%~8.4%，三种基体标准物质的测定结果均在标准物质赋值范围内。

本方法具有快速、高效、无需氮吹复溶、检测灵敏度高、稳定性好的优点，能够实现无人值守，避免工作人员因操作量大导致失误引起的检测偏差，适用于粮油中黄曲霉毒素的精确测定。

参考文献：

- [1] E. TUMUKUNDE G, MA D, LI J, et al. Current research and prevention of aflatoxins in China[J]. World Mycotoxin Journal, 2020, 13(2).
- [2] 张伟, 马青青, 张二鹏, 等. 粮食及其制品中真菌毒素检测及风险评估技术的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(5): 636-640.
ZHANG W, MA Q Q, ZHANG E P, et al. Research progress of mycotoxin detection and risk assessment in grain and its products[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Science, 2022, 32(5): 636-640.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017[S].
National Health Commission of the People's Republic of China.
- [4] WACOO ALEX P, WENDIRO DEBORAH, VUZI PETER C, et al. Methods for detection of aflatoxins in agricultural food crops[J]. Journal of Applied Chemistry, 2014.
- [5] 杨权, 孙婷琳, 王燕, 等. ELISA 法检测油菜籽中的黄曲霉毒素 B1[J]. 食品安全导刊, 2021(29): 107-109.
YANG Q, SUN T L, WANG Y, et al. ELISA method for detection of aflatoxin B1 rapeseed[J]. Journal of food safety Tribune, 2021(29): 107-109.
- [6] 徐振斌, 胡东青, 里南, 等. 胶体金免疫层析法快速定量检测玉米中黄曲霉毒素[J]. 粮食科技与经济, 2013, 38(3): 24-26.
XU Z B, HU D Q, LI N, et al. Colloidal gold rapid immune chromatography quantitative detection aflatoxins in corn[J]. Journal of food science and technology and economy, 2013, 38(3): 24-26.
- [7] 吴宇, 叶金, 李丽, 等. 免疫亲和柱全自动固相萃取-高效液相色谱法测定粮油中玉米赤霉烯酮[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(3): 176-180.
WU Y, YE J, LI L, et al. Determination of zearalenone in grain and oil by automatic solid phase extraction with immunoaffinity column and high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Grain and Oils, 20, 35(3): 176-180.
- [8] 刘栓, 冯梦雨, 李晓敏, 等. 高准确度液相色谱-同位素稀释质谱定值技术测定玉米粉中多种真菌毒素[J]. 分析化学, 2021, 49(4): 546-557.
LIU S, FENG M Y, LI X M, et al. Determination of mycotoxins in corn meal by high accuracy liquid chromatography- isotope dilution mass spectrometry[J]. Analytical chemistry, 2021, 49(4): 546-557. 

备注：本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。