

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.06.013

焦梓毅, 李丽, 刘金阳, 等. 样品前处理对超高效液相色谱法分析粮食中黄曲霉毒素的影响[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(6): 98-106.

JIAO Z Y, LI L, LIU J Y, et al. Effect of sample pretreatment on the detection of aflatoxin in grain by ultra performance liquid chromatography[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(6): 98-106.

样品前处理对超高效液相色谱法分析 粮食中黄曲霉毒素的影响

焦梓毅¹, 李丽¹✉, 刘金阳², 叶金¹, 李宗旺^{1,3}, 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. 中国储备粮管理集团有限公司黑龙江分公司, 黑龙江 哈尔滨 150000;

3. 上海理工大学 健康科学与工程学院, 上海 200093)

摘要: 为优化和确立粮食中黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFS) 的前处理方法, 选用自然污染的粮食样本开展研究。粮食经粉碎后提取液提取, 免疫亲和柱净化, 超高效液相色谱-荧光检测器定量检测。84%乙腈水的提取效率优于 70%甲醇水, 无需浸泡, 涡旋振荡提取 20 min 或高速均质提取 2 min, 且一次提取即可提取样品中 99%以上黄曲霉毒素 B₁。4 种粮食中 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 加标回收率在 86.7%~115%之间, 变异系数为 1.0%~12.3%之间, 方法具有良好的准确性和重复性。玉米全粉、糙米粉、大米粉等粮食基质中黄曲霉毒素 B₁ 成分的国家有证标准物质的测定结果在标准值及其扩展不确定度范围内, 变异系数不大于 5.2%, 测定结果较为满意。采用此方法参加 FAPAS (PT04359) 能力验证, |Z|<1, 结果满意。粮食中黄曲霉毒素经 84%乙腈水涡旋提取 20 min 或均质提取 2 min 提取效率高、准确性好。文献中推荐使用的 70%甲醇水提取液, 采用超声等提取方式可能导致测定结果偏低, 无法真实反应样品中黄曲霉毒素的含量。因此, 统一样品前处理方法对于原粮中黄曲霉毒素检测结果的准确性和可比性具有重要意义, 本研究可为粮食中黄曲霉毒素样品前处理方法的选择提供借鉴。

关键词: 粮食; 黄曲霉毒素; 样品前处理; 影响因素; 优化; 准确性

中图分类号: TS207.3; S-3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)06-0098-09

Effect of Sample Pretreatment on the Detection of Aflatoxin in Grain by Ultra Performance Liquid Chromatography

JIAO Zi-yi¹, LI Li¹✉, LIU Jin-yang², YE Jin¹, LI Zong-wang^{1,3}, WANG Song-xue¹

(1. Institute of Grain and Oil Quality Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China; 2. Heilongjiang Branch Company of Sinograin Co. Ltd., Harbin, Heilongjiang 150000, China; 3. School of Health Science and Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

收稿日期: 2023-04-24

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

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

作者简介: 焦梓毅, 男, 2000 年出生, 本科, 研究方向为粮油质量安全。E-mail: jzy@ags.ac.cn

通讯作者: 李丽, 女, 1982 年出生, 硕士, 助理研究员, 研究方向为粮油质量安全。E-mail: ll@ags.ac.cn

Abstract: To optimize and establish the pretreatment method for aflatoxins (AFS) in grains, the method was optimized by using naturally contaminated grain samples. The grains were extracted by crushing, cleaned up by immunoaffinity column, and quantified by ultra performance liquid chromatography with fluorescence detector. The results showed that the extraction efficiency of 84% acetonitrile water was better than that of 70% methanol water, without soaking, and more than 99% of aflatoxin B₁ could be extracted from the samples by vortex shaking for 20 min or high-speed homogenization for 2 min. The method has good accuracy and reproducibility. The results of the determination of aflatoxin B₁ components in corn flour, brown rice flour, rice flour and other grain matrices of the national certified standards were within the range of standard values and their extended uncertainties, with a coefficient of variation of 5.2%, and the determination results were more satisfactory. Using this method to participate in the FAPAS (PT04359) proficiency testing, $|Z| < 2$, and the results were satisfactory. Aflatoxin in grain by 84% acetonitrile water vortex extraction 20 min or homogenization extraction 2 min extraction efficiency and accuracy, the literature recommended the use of 70% methanol water extraction solution, and the use of ultrasound and other extraction methods may lead to low determination results, which cannot truly reflect the content of aflatoxin in the sample. Therefore, the unification of sample pretreatment methods is important for the accuracy and comparability of aflatoxin assay results in raw grains, and this study can provide reference for the selection of sample pretreatment methods for aflatoxin in grains.

Key words: grain; aflatoxin; sample pretreatment; influencing factors; optimisation; accuracy

黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉等不同真菌对寄主造成侵染后形成的次级代谢产物。黄曲霉毒素在谷物中感染率非常高, 比如: 玉米、稻谷、花生、大豆等粮食作物。黄曲霉毒素具有较强的毒性, 对人畜有强烈的致病性、致畸性、致癌性和遗传毒性, 被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 I 类致癌物^[1]。目前黄曲霉毒素共鉴定出 20 余种, 其中常见的黄曲霉毒素有 B₁、B₂、G₁、G₂ 等四种^[2]。国内外非常重视黄曲霉毒素的防控, 为减少黄曲霉毒素的危害, 制定了相关的限量要求, 我国颁布了 GB 2761《食品中真菌毒素限量》, 规定了各类食品中黄曲霉毒素 B₁ 的限量要求。

对黄曲霉毒素的监测直接取决于精确和可靠的分析方法, 常见方法包括薄层色谱法^[3]、胶体金快速定量法^[4-5]、酶联免疫法^[6-7]、液质联用^[8-9]、高效液相色谱法^[10-11]等。薄层色谱法成本低、操作设备简单, 但实验过程中容易被各种因素影响, 实验所用试剂量大等。酶联免疫法与胶体金法等快速检测方法广泛应用于快检和初筛, 存在假阳性和假阴性。液相串联质谱法因液相色谱串联质

谱联用仪的价格昂贵, 对操作人员技能要求较高等原因导致使用范围受限。液相色谱法是目前国际上普遍采用的黄曲霉毒素精确定量和确认的方法, 因前处理免疫亲和层析具有基质干扰少、特异性强、灵敏度高及高效液相色谱仪成本低, 对操作人员技能要求相对较低等特点而被广泛应用^[12]。对复杂样品中黄曲霉毒素充分、完全的提取是保障检测准确的第一步。影响提取效果的主要因素包括提取液种类, 提取方式, 提取时间, 样品粒径及是否需要浸泡等。AOAC 和 ISO 公布的大多数有效方法都使用甲醇水, 有两种方法使用丙酮水溶液和乙腈水溶液作为提取液, 样品粉碎粒径除 ISO 16050:2003 规定细磨外, 其他标准均未提及, 称样量为 25~50 g 不等, 均采用高速均质 2 min 进行提取。GB 5009.22—2016《食品中食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》规定使用 70% 甲醇水或者 84% 乙腈水为提取液, 称样量为 5 g, 采用涡旋或均质的方式提取。Terenzio Bertuzzi^[13]等比较了自然污染玉米中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 不同比例的丙酮水和甲醇水的提取效率, 确定 60% 和 70% 丙酮水对四种黄曲霉毒

素的提取效率最好,显著优于甲醇水的提取效率。但目前由于丙酮为易制毒试剂,毒性强、且高效液相色谱法主要是基于免疫亲和层析净化过程建立的,丙酮溶液对免疫亲和柱抗体损害较强等原因、不推荐作为提取溶剂使用。Moller^[14]等从经认证的花生粉参考物质中提取黄曲霉毒素,指出与甲醇水溶液相比,乙腈水的提取效率更高。Junpeng Hu^[15]等研究大米、面条中黄曲霉毒素检测方法中,比较了纯甲醇、纯乙腈、84%甲醇水、84%乙腈水及 84%乙腈水-0.1%甲酸的提取效率,研究发现 84%乙腈水提取效率优于 84%甲醇水。石格鑫^[16]研究了不同提取液对小麦中黄曲霉毒素 B₁ 提取效率,结果表明 80%乙腈水提取效率优

于不同比例的甲醇水。而 Stroka 等^[17]研究不同食品和饲料中黄曲霉毒素提取方法时指出辣椒粉等干性物质不建议使用乙腈水作为提取液,因样品会从萃取剂中吸收大量的水,导致回收率过高。彭立^[18-19]等采用提取液为 70%甲醇水均质提取粮油食品中四种黄曲霉毒素的高效液相色谱法,回收率达到 85%以上。从表 1 可知,样品的粉碎粒径、固液比、提取方式和提取时间也存在较大的差异,这也可能对提取效率有影响。此外,通过免疫亲和柱净化前,提取液的稀释比例影响亲和柱的富集和净化效果,通常需要根据免疫亲和柱有机溶剂耐受量确定合适的稀释比例,否则超出有机耐受量导致方法的提取效率低。

表 1 部分黄曲霉毒素提取方法比较
Table 1 Comparison of extraction methods for aflatoxin

| 标准/参考文献 | 基体 | 粒径/mm | 提取液 | 提取方式 | 提取时间/min |
|-------------|--------|-------|--------------|------------------|----------|
| [20] | 谷物及其制品 | 2.0 | 84%乙腈/70%甲醇水 | 超声波/涡旋振荡/摇床/高速均质 | 20/3 |
| [21] | 食品 | 细磨 | 70%甲醇水 | 高速均质 | 2 |
| [17-19, 22] | 玉米 | / | 70%甲醇水 | 高速均质 | 2 |
| [23] | 玉米 | / | 90%乙腈水 | 高速均质 | 2 |
| [24] | 食品和饲料 | / | 85%丙酮水 | 高速均质 | 2 |
| [25] | 饲料 | 1 | 80%甲醇水 | 涡旋振荡/均质 | 30/2 |
| [26] | 粮食 | 1 | 70%甲醇水 | 涡旋振荡/均质 | 30/2 |
| [13] | 玉米 | 1 | 60%和 70%丙酮水 | 旋转摇动 | 45 |
| [14] | 花生粉 | / | 60%乙腈水 | 高速均质 | 3 |
| [15] | 大米、面条 | / | 84%乙腈 | 涡旋摇动 | 2 |
| [16] | 小麦 | / | 80%乙腈 | / | / |

通过上述可知,不同的提取步骤可能导致原粮中黄曲霉毒素的检测存在较大差异,而目前国内外黄曲霉毒素检测标准以及相关研究结果均未有一个统一的方式,甚至出现了不同报道互相矛盾的结论。GB5009.22 中两种提取溶剂、四种提取方式可能存在等效性的问题。因此,开展复杂样品中黄曲霉毒素提取方法的研究,指导检测人员选用准确可靠的方法,具有重要的意义。本文对不同提取液、提取时间、样品粒径、浸泡时间等提取步骤进行了系统地研究考察,对比了甲醇水和乙腈水两种提取体系下提取方法的效率,通过确认不同基质不同水平加标回收、基体标准物质及 FAPAS 能力验证方法性能,以期保证测定结

果的准确性和可靠性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Acquity UPLC 仪配大体积流通池:沃特世科技有限公司; Sartorius BS224S 电子天平:德国赛多利斯公司; 5810R 台式高速冷冻离心机:赛默飞世尔科技有限公司; LPD2500 多管涡旋混合器:莱普特科学仪器有限公司; Auto EVA—60 全自动浓缩氮吹仪、固相萃取装置:睿科集团股份有限公司; SR300 研磨仪:德国莱驰公司; 黄曲霉毒素免疫亲和柱:江苏苏薇微生物研究有限公司; 0.22 μm PTFE 膜针头过滤器:上海安谱科技股份

有限公司。

乙腈中四种黄曲霉毒素标准溶液 (TOXIN-YTBW15)、粮食基体黄曲霉毒素成分分析标准物质: 国家粮食和物资储备局科学研究院研制; 甲醇、乙腈: Fisher; 吐温-20、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、碳酸氢钠: 国药试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理方法

准确称取 (5 ± 0.01) g 样品, 加入 20 mL 提取液, 经高速均质/涡旋振荡/摇床振荡/超声提取, 离心机 7 000 r/min 离心 5 min, 将上清液置于干净容器中, 备用。

1.2.2 免疫亲和柱净化

将免疫亲和柱与大体积上样器相连, 置于固相萃取装置上。准确移取上清液 2 mL 和 23 mL 0.1% PBST 于大体积上样器中。稀释液全部通过免疫亲和柱, 加入 20 mL 水淋洗, 待液体全部流出后, 吹干柱体, 2 mL 甲醇洗脱, 40 °C 下氮气吹干。准确移取 1 mL 50% 甲醇水复溶, 混匀, 用 0.22 μm PTFE 滤器过滤, 上机检测。

1.2.3 仪器条件

WATERS I CLASS 配荧光检测器 (大体积流通池)。色谱柱: Waters BEH-C18 柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μm), 柱温: 40 °C。流动相, A 相: 乙腈+甲醇(体积比为 1+1); B 相: 水; A : B = 35 : 65, 等梯度洗脱。流速为 0.3 mL/min, 进样量为 10 μL 。激发波长: 365 nm; 发射波长 463 nm。

2 结果与分析

2.1 黄曲霉毒素提取液的选择

提取溶剂的选择对于获得目标物的真值非常重要, 是决定目标物提取效率的一个关键因素。根据查阅国内外标准及文献可知, 粮油及其制品中黄曲霉毒素的提取溶剂多选用甲醇水体系和乙腈水体系。为了获得最高的回收率并尽量减少基质干扰, 本实验主要考察了 30% 甲醇水、50% 甲醇水、70% 甲醇水、80% 甲醇水、30% 乙腈水、50% 乙腈水、84% 乙腈水, 玉米、小麦和大米等基质中 4 种黄曲霉毒素的提取效果。选择在不同基质阴性样品中添加黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的浓度分别为 20、5、20、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标实验进行考察。

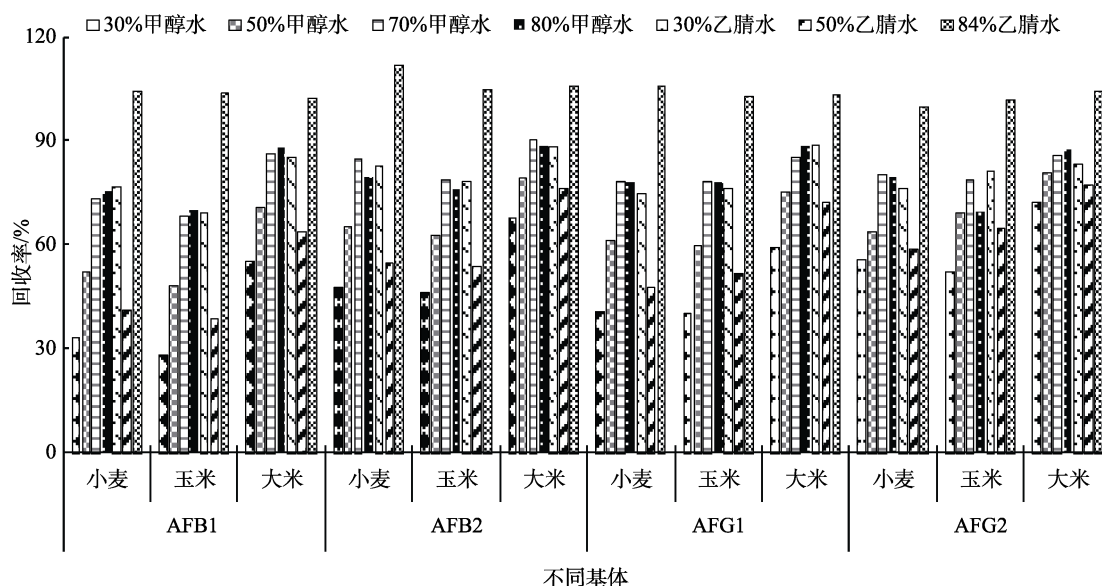


图 1 不同提取液的回收率结果 (n=3)

Fig.1 Recovery results of different extracts (n=3)

不同的提取液对四种黄曲霉毒素的提取效率存在较大的差异。在玉米、小麦和大米基体中, 30% 甲醇水、50% 甲醇水、50% 乙腈水提取四种黄曲霉毒素的效率最差, 如图 1, 尤其是黄曲霉毒

素 B₁, 回收率低于 60%。提取液为 70% 甲醇水、80% 甲醇水、30% 乙腈水在玉米粉中的回收率为 68%~81.4%, 在小麦和大米粉中的回收率分别为 74.1%~84.8% 和 77%~90.1%, 整体回收率偏低。

当提取液为 84%乙腈水时, 四种黄曲霉毒素的提取效率为 99.5%~111.7%, 提取效果最好。此外, 本研究也比较了 84%乙腈水和 AOAC 994.08 推荐的 90%乙腈水提取玉米粉中黄曲霉毒素 B₁ 的提取效率, 通过 t-检验可知, 两者之间没有显著性差异, 提取效率是一致的。

2.2 穷尽法提取考察

因加标样品无法像自然污染样品中目标物以复杂的结合方式与基体相结合, 所以可能不能完全反映溶剂的提取效率, 故采用自然污染样本进行多次提取考察提取效率。在 2.1 研究的基础上, 结合 GB5009.22—2016《食品中食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》推荐的提取液, 选取 70% 甲醇水与 84%乙腈水对自然污染的玉米质控样品与大米质控样品进行多次提取, 玉米、大米粉质控样品提取效率的影响如下图 2 所示。

玉米粉中黄曲霉毒素 B₁ 质控样品的量值范围是(44.3±6.0) μg/kg, 大米粉中黄曲霉毒素 B₁ 质

控样品的量值范围是(10.5±1.4) μg/kg。从图 2 可知, 84%乙腈水第一次提取玉米粉和大米粉质控样品的提取率即可达到 99%以上, 70%甲醇水第一次提取玉米和大米质控样品时提取并不完全, 尤其是玉米粉, 需经过第二次提取。说明 84%乙腈水一次提取可将样品中黄曲霉毒素 B₁ 全部提取出来, 故确定粮食中黄曲霉毒素的提取液为 84%乙腈水。

2.3 提取方式的研究

提取方式也是影响提取效率的一个因素。常用的黄曲霉毒素提取方式有高速均质、涡旋振荡、摇床振荡和超声提取 4 种, 其中涡旋振荡、摇床振荡和超声提取时间为 30 min, 高速均质提取 3 min。本研究结合 GB5009.22—2016 推荐的提取液, 对 4 种提取方式进行了研究比较, 不同提取液和提取方式下, 黄曲霉毒素 B₁ 的测定结果见下图 3。

从结果可知, 4 种提取方式下, 使用 84%乙腈水提取玉米和大米基体中黄曲霉毒素 B₁ 的提

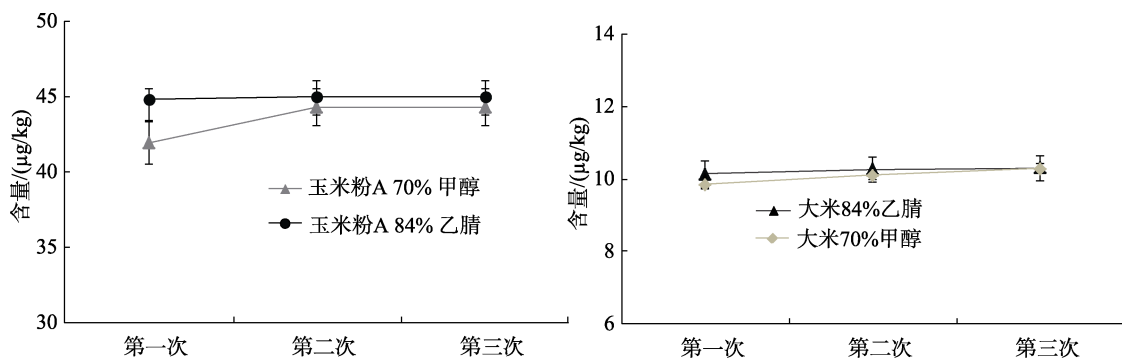


图 2 多次提取对自然污染玉米和大米中黄曲霉毒素提取效率的影响 (n=3)

Fig.2 Effect of multiple extractions on the extraction efficiency of aflatoxin in naturally contaminated maize and rice (n=3)

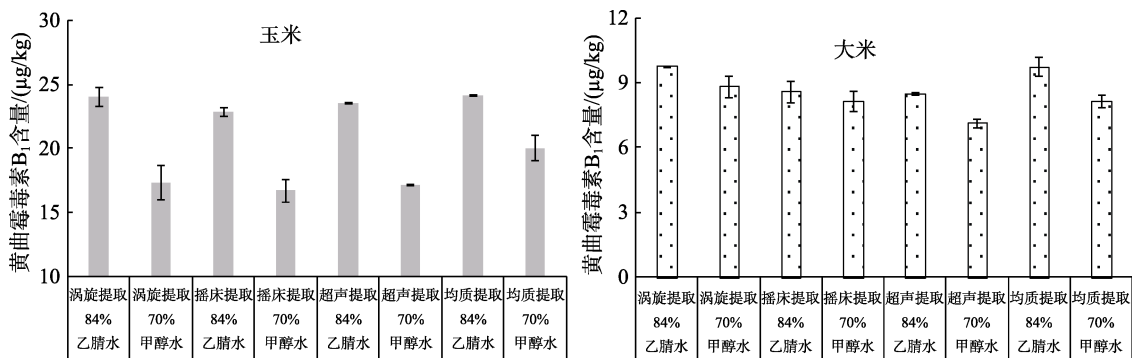


图 3 提取方式对自然污染玉米和大米中黄曲霉毒素提取效率的影响 (n=3)

Fig.3 Effect of extraction methods on the extraction efficiency of aflatoxins in naturally contaminated maize and rice (n=3)

取效率显著高于 70% 甲醇水的提取效率, 这也和前面提取液研究结果相符合。从提取方式而言, 提取液为 84% 乙腈水时, 均质提取和涡旋提取 2 种提取方式的检测结果相一致, 无显著性差异, 优于超声和摇床振荡提取。可能是由于超声提取时样品相对静止, 使得基质和溶液的接触不够充分, 摇床振荡提取转速相对较低导致提取效率低。

2.4 浸泡时间研究

为了确保天然污染的样品中黄曲霉毒素提取充分, 在提取前考察浸泡时间对提取效果的影响。选取均匀性良好的天然污染样品, 选用 84% 乙腈水, 涡旋振荡提取的方式, 分别考察浸泡 0、10、30 和 60 min 下黄曲霉毒素的提取效果。

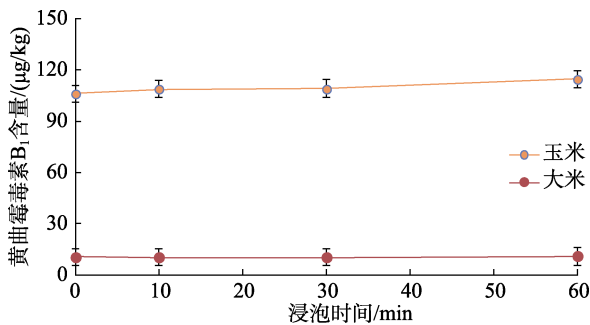


图 4 液浸泡时间对提取效果的影响 (n=3)
Fig.4 Effect of liquid soaking time on extraction (n=3)

从图 4 可知, 不同浸泡时间对天然污染大米粉与玉米粉中黄曲霉毒素 B₁ 的提取影响较小, 测定结果均在允许误差范围之内, 故检测样本时无需浸泡可直接提取。

2.5 提取时间的考察

提取时间长短对自然污染粮食中黄曲霉毒素的提取效率有一定的影响。本研究采用实验室常用的涡旋振荡提取方式, 提取液为 84% 乙腈水, 通过考察 5、10、15、20、25、30 min 等不同提取时间下自然污染大米与玉米中黄曲霉毒素 B₁ 的提取浓度, 确定最佳的提取时间, 结果如下。

从图 5 可知, 随着涡旋振荡时间的增加, 玉米粉和米粉中黄曲霉毒素 B₁ 的含量呈现逐步增长的趋势。当涡旋提取时间达到 20 min 后, 提取效率无明显变化, 综合考虑后确定粮食中黄曲霉毒素 B₁ 最佳涡旋振荡提取时间为 20 min。

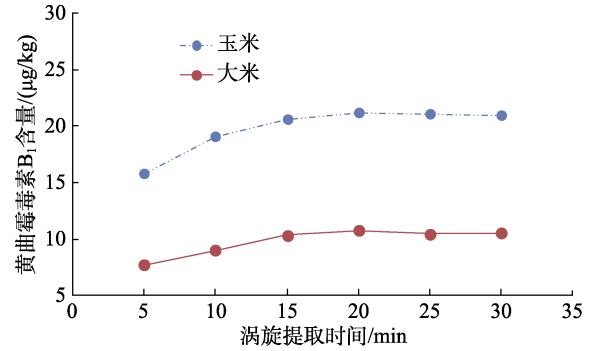


图 5 不同提取时间对黄曲霉毒素 B₁ 提取效率的影响
Fig.5 Effect of different extraction times on the extraction efficiency of aflatoxin B₁

2.6 粉碎粒径的考察

相同称样量下, 粉碎粒径的大小影响方法的精密度。本研究使用研磨仪对一批自然污染的玉米和米粉样品进行粉碎, 粉碎粒径分别为 0.25 mm、0.5 mm、1.0 mm。粉末样品分别手动混匀 10 min, 粮食样本的称样量为 5 g, 经 84% 乙腈水涡旋振荡提取 20 min, 考察测定结果的一致性 (相对标准偏差表示), 结果如下图 6。

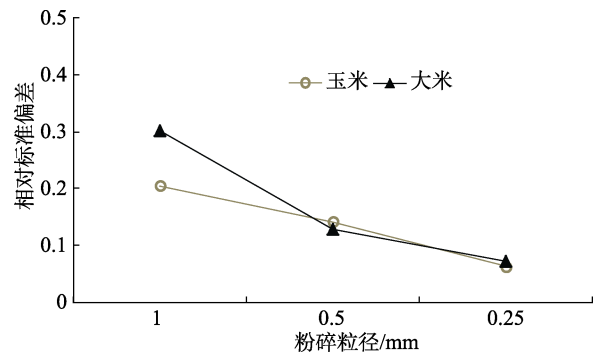


图 6 粉碎粒径对测定结果精密度的影响 (n=3)
Fig.6 Effect of crushed particle size on the precision of the measurement results (n=3)

因黄曲霉毒素污染粮食极不均匀, 故本研究中未对量值进行分析, 只测重考察测定结果的一致性。从上图可知, 当粉碎粒径为 1 mm 时, 玉米和米粉样品的相对标准偏差分别为 22.5% 和 30.1%; 粒径为 0.5 mm 时, 玉米和米粉样品相对标准偏差为 14.1% 和 12.8%; 粒径为 0.25 mm 时, 玉米和米粉样品相对标准偏差为 6.3% 和 7.1%。粉碎粒径越小, 相同混合时间下样品检测结果的精密度越好, 按照 GB 5009.22 测定结果精密度的

要求，确定粮食的粉碎粒径为 0.5 mm。

2.7 方法学研究

2.7.1 方法的线性相关系数、检出限和定量限

按照下表 2 黄曲霉毒素浓度范围制备了一系列标准溶液建立标准曲线。以峰面积 (Y) 与标

准溶液质量浓度 (X) 绘制标准曲线，得到回归方程相关系数。采用逐级稀释法获得 4 种黄曲霉毒素的检出限 (LOD, S/N≥3) 和定量限 (LOQ, S/N≥10)。其具有良好的线性范围，定量限显著低于限量要求，可以满足日常检测的需要。

表 2 黄曲霉毒素线性范围、检出限和定量限

Table 2 Linear range, limit of detection and limit of quantification for aflatoxin

| 真菌毒素 | 线性范围/(μg/kg) | 回归方程 | 相关系数 | 检出限/(μg/kg) | 定量限/(μg/kg) |
|------------------|--------------|----------------------|---------|-------------|-------------|
| AFB ₁ | 0.2~50 | y=29 470.5x-14 494.3 | 0.999 5 | 0.1 | 0.3 |
| AFB ₂ | 0.03~15 | y=133 046x-20 467.4 | 0.999 3 | 0.03 | 0.1 |
| AFG ₁ | 0.2~50 | y=7 000.12x-4 049.27 | 0.999 0 | 0.1 | 0.3 |
| AFG ₂ | 0.03~15 | y=46 215.6x-8 181.36 | 0.999 2 | 0.03 | 0.1 |

2.7.2 方法的准确度和精密度

将添加 AFT 的玉米粉样品按照本方法进行提取检测。添加量为 20 μg/kg 的同一批样品重复测 4 天，AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的日内精密度分别为 2.2%、1.8%、1.8%、0.9%，日间精密度分别为 4.4%、3.0%、8.7%、5.4%，具有较好的精密度。玉米、大米、小麦和糙米样品进行高、中、低 3 水平的黄曲霉毒素加标回收率测定，结果见下表 3，本方法的回收率在 86.7%~115% 之间，变异系数为 1.0%~12.3% 之间。回收率和变异系数均满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范食品理化检测》，方法具有良好的准确性和重复性。

选用玉米粉、糙米粉和大米粉基质中黄曲霉毒素成分分析国家有证标准物质验证该方法的准

确性，检测结果如表 4 所示，测定值在标准值及其扩展不确定度范围内，变异系数不大于 5.2%，检测结果理想。

表 3 方法回收率和变异系数 (n=3)

Table 3 Recoveries and coefficient of variation with spiked samples (n=3)

| 基体 | 基质加标量/ (μg/kg) B1/B2/G1/G2 | 平均回收率/% B1/B2/G1/G2 | 变异系数/% B1/B2/G1/G2 |
|----|----------------------------------|------------------------|-----------------------|
| 玉米 | 10/3/10/3 | 109/100/108/103 | 8.2/3.6/5.2/3.1 |
| | 20/6/20/6 | 108/97/108/98 | 12.3/10.5/5.5/7.4 |
| | 40/12/40/12 | 107/99/111/100 | 4.5/1.2/5.3/0.7 |
| 大米 | 5/1.5/5/1.5 | 112/102/115/100 | 8.7/7.6/3.0/4.4 |
| | 10/3/10/3 | 91/97/102/101 | 12.3/5.7/5.4/6.9 |
| | 20/6/20/6 | 88/100/104/102 | 1.5/2.2/1.1/1.0 |
| 小麦 | 5/1.5/5/1.5 | 90.8/109/109/102 | 3.1/3.4/1.8/2.8 |
| 糙米 | 10/3/10/3 | 90.0/89.6/97.9/86.7 | 3.2/3.2/4.4/3.6 |

表 4 不同粮食基质黄曲霉毒素标准物质检测 (n=2)

Table 4 Results of aflatoxin standards for CRMs (n=2)

| 编号 | 基体 | 标准值±扩展不确定度/(μg/kg) | 测定结果-1/(μg/kg) | 测定结果-2/(μg/kg) | 平均结果/(μg/kg) | 变异系数/% |
|--------------|-----|--------------------|----------------|----------------|--------------|--------|
| GBW(E)100386 | 玉米粉 | 27±3 | 24.7 | 24.5 | 24.6 | 5.2 |
| GBW(E)100607 | 糙米粉 | 10.3±1.4 | 10.0 | 9.8 | 9.9 | 4.2 |
| GBW(E)100606 | 大米粉 | 9.5±1.4 | 9.7 | 9.2 | 9.4 | 0.6 |

2.8 能力验证

为了进一步验证方法的准确性，采用建立的检测方法参加了 FAPAS (PT 04359) 真菌毒素能力验证，如图 7 所示，58 为本实验参与代码，黄曲霉毒素 B₁ 的|Z|=0.4，测定结果满意，表明本提

取方法准确可靠。

3 结论

所有的检测方法都需要一个合适的样品提取步骤，每个步骤都可能影响检测结果的准确性，通过对提取液、提取方式、浸泡时间、提取时间

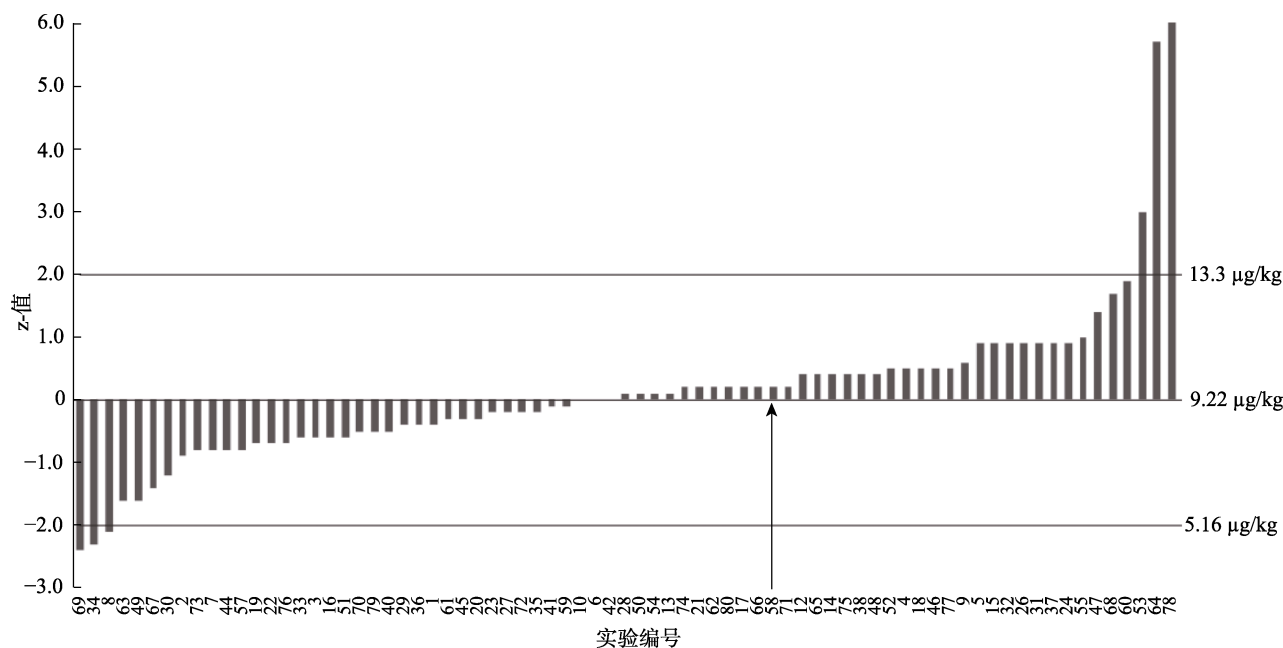


图7 FAPAS能力验证Z值分布

Fig.7 FAPAS capability verification Z-value distribution

和样品粉碎粒径等条件进行考察及确认，建立了原粮中四种黄曲霉毒素超高效液相色谱法的检测方法。结果表明选用84%乙腈水提取效率更好，样品不需浸泡可直接提取，涡旋振荡提取20 min或高速均质3 min一次就可以将样品中黄曲霉毒素完全提取出来。本方法的定量限显著低于限量标准要求，方法的准确度和精密度满足GB/T27404—2008的要求，对国家有证标准物质进行检测，测定值在标准值及其扩展不确定度范围内，变异系数不大于5.2%，检测结果较理想。此外，采用此方法参加FAPAS能力验证， $|Z| < 1$ ，结果满意。本方法灵敏度高，准确性好，适用于原粮中四种黄曲霉毒素的日常检测。文献或GB5009.22中推荐使用的70%甲醇水提取液，采用超声等提取方式可能导致测定结果偏低，无法真实反应样品中黄曲霉毒素的含量。因此，统一样品前处理方法对于原粮中黄曲霉毒素检测结果的准确性和可比性具有重要意义，本研究可为黄曲霉毒素的样品前处理方法的选择提供借鉴。

参考文献：

[1] 张牧臣, 郑楠, 王加启, 等. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 污染研究进展[J]. 食品科学, 2018, 39(7): 312-320.
 ZHANG M C, ZHENG N, WANG J Q, et al. Aflatoxin B₁

contamination in foods: a review[J]. Food Science, 2018, 39(7): 312-320.

- [2] EWIS L, ONSONGO M, NJAPAU H, et al. Aflatoxin contamination of commercial maize products during an outbreak of acute aflatoxicosis in eastern and central Kenya[J]. Environmental Health Perspectives, 2005, 113(12): 1763-1767.
- [3] ISSAG H J, BARR E W, ZIELINSKI W L. Nondestructive distinction between aflatoxin B₁ and ethoxyquin in thin-layer chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 132(1): 115-120.
- [4] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 232-235.
 DENG S L, LAI W H, XU Y. Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of aflatoxin B₁[J]. Food Science, 2007, 28(2): 232-235.
- [5] 王海彬. 花生中黄曲霉毒素免疫层析快速定量技术研究[D]. 中国农业科学院, 2012.
 WANG H B. Study on an enhanced quantitative immunochromatographic assay for aflatoxin detection in peanuts[D]. Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012.
- [6] 张宁, 赵志琴, 范志华, 等. 酶联免疫吸附法快速检测黄曲霉毒素[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(3): 146-150.
 ZHANG N, ZHAO Z Q, FAN Z H, et al. Rapid detection of aflatoxin by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Food Research and Development, 2021, 42(3): 146-150.
- [7] 杨艳, 吴鑫, 朱应飞, 等. 酶联免疫吸附法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(12): 3166-3170.
 YANG Y, WU X, ZHU Y F, et al. Detection of aflatoxin B₁ in vegetable oils by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(12): 3166-3170.

- [8] 吴宇, 叶金, 张冰, 等. 稳定同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定植物油中 16 种真菌毒素[J]. 分析化学, 2018, 46(6): 975-984.
WU Y YE J, ZHANG B, et al. A fast analytical approach for determination of 16 kinds of mycotoxins in vegetable oils using stable isotope dilution and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese J. Anal. Chem, 2018, 46(6): 975-984.
- [9] HU J P, LIANG M, XIAN Y P, et al. Development and validation of a multianalyte method for quantification of aflatoxins and bongkreic acid in rice and noodle products using PRiME-UHPLC-MS/MS method[J]. Food Chemistry, 2022, 395: 1-8.
- [10] PALMA P, GODOY M, VIDAL M, et al. Adaptation, optimization, and validation of a sensitive and robust method for the quantification of total aflatoxins (B₁, B₂, G₁, and G₂) in the spice merk'en by HPLC-FLD with post-column derivatization[J]. Microchemical Journal, 2022, 178: 1-5.
- [11] 李丽, 叶金, 王海波, 等. 全自动免疫亲和固相萃取超高效液相色谱法测定粮油中黄曲霉毒素[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(7): 157-164.
LI L, YE J, WANG H B, et al. High throughput method for analysis of aflatoxins in cereals and oils using automated immunoaffinity cleaning up and ultra-high performance liquid chromatography[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2020, 35(7): 157-164.
- [12] ARRANZ I, SIZOO E, VAN EGMOND H, et al. Determination of aflatoxin B₁ in medical herbs: interlaboratory study[J]. J AOAC Int, 2006, 89: 595-605.
- [13] TERENCEZIO B, SILVIA R, ANNALISA M, et al. Evaluation and improvement of extraction methods for the analysis of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ from naturally contaminated maize[J]. Food Anal. Methods, 2012, 5: 512-519.
- [14] MOLLER T E, NYBERG M. Efficiency of different extraction solvent mixtures used in analyses of aflatoxins from a certified peanut meal reference material[J]. Food Addit Contam, Part A, 2004, 21(8): 781-785.
- [15] HU J P, LIANG M, XIAN Y P, et al. Development and validation of a multianalyte method for quantification of aflatoxins and bongkreic acid in rice and noodle products using PRiME-UHPLC-MS/MS method[J]. Food Chemistry, 2022, 395: 1-8.
- [16] 石格鑫. 高效液相色谱法测定小麦中黄曲霉毒素 B₁ 含量[J]. 现代食品 2020, 10: 204-205.
SHI G X. Determination of aflatoxin B₁ in wheat by high performance liquid chromatography[J]. Modern food, 2020, 10: 204-205.
- [17] STROKA J, PETZ M, JOERISSEN U, et al. Investigation of various extractants for the analysis of aflatoxin B₁ in different food and feed matrices[J]. Food Addit Contam Part A, 1999, 16(8): 331-338.
- [18] 彭立. 高效液相色谱法测定粮油食品中黄曲霉毒素含量[J]. 食品安全导刊, 2021, (31): 84.
PENG L. Determination of aflatoxin in cereals, oils and foods by HPLC[J]. China Food Safety Magazine, 2021, (31): 84.
- [19] JALAL H, SHAHOO H. Reverse homogeneous liquid-liquid extraction as a miniaturized method for extraction of aflatoxins from pistachio and wheat and LC post-column derivatization-fluorescence detection[J]. Chromatographia, 2011, 73: 1005-1008.
- [20] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会国家食品药品监督管理总局. 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定: GB 5009.22—2016[S].
Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. Determination of aflatoxin B and G in food: GB 5009.22—2016[S].
- [21] International Standard Organization(ISO). Foodstuffs-Determination of aflatoxin B, and the total content of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereals, nuts and derived products-High-performance liquid chromatographic method:ISO 16050—2003[S].
- [22] AOAC INTERNATIONAL. Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter: AOAC Official Method 2005.08[S].
- [23] AOAC INTERNATIONAL. Aflatoxins in Corn, Almonds, Brazil Nuts, Peanuts, and Pistachio Nuts: 994.08[S].
- [24] AOAC INTERNATIONAL. Fluorine in Animal Feed:AOAC Official Method 975.08[S].
- [25] 国家市场监督管理总局 中国国家标准化管理委员会. 饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的测定 高效液相色谱法:GB/T 36858—2018[S].
State Administration of Market Supervision and administration, Standardization Administration of China. Determination of aflatoxin B₁ in feeds High performance liquid chromatography: GB/T 36858—2018[S].
- [26] 国家粮食局. 粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定 超高效液相色谱法:LS/T 6128—2017[S].
State Administration of Grain. Inspection of grain and oils Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in grains Ultra-high performance liquid chromatography: LS/T 6128—2017[S]. 完