

## 实验技术与方法

超临界萃取-超临界色谱-串联质谱法快速  
检测谷物中4种黄曲霉毒素

宫晓平,董琨,崔璐璐,谢颖,唐殿飞

(张家口市食品药品检验中心,河北 张家口 075000)

**摘要:**目的 建立以超临界萃取-超临界色谱-串联质谱法测定谷物中黄曲霉毒素的方法。方法 样品以超临界 CO<sub>2</sub>-甲醇(98:2, V/V)为萃取剂萃取,以超临界 CO<sub>2</sub>和甲醇为流动相梯度洗脱,经 Shim-pack UC-X RP C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm×4.6 mm, 3 μm)分离,采用电喷雾离子源正离子模式,多反应监测(MRM)进行检测。结果 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 质量在 0.5~20 ng 范围内,相关系数均大于 0.998,线性关系良好,在大米粉和玉米渣样品中加标回收率分别为 92.3%~107.9%、93.0%~106.1%、93.4%~104.9%、92.8%~102.2%,相对标准偏差分别为 3.0%~4.3%、3.2%~4.5%、3.0%~4.6%、3.0%~4.5% (n=6);方法定量限为 0.1 μg/kg。结论 本方法快速、简单、安全、准确,可用于检测谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的残留量。

**关键词:**黄曲霉毒素;超临界 CO<sub>2</sub>;超临界萃取-超临界色谱-串联质谱;食品污染物;谷物

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)02-0146-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.02.010

### Rapid detection of four aflatoxins in cereals with supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-mass spectrometer/mass spectrometer

GONG Xiaoping, DONG Kun, CUI Lulu, XIE Ying, TANG Dianfei

(Zhangjiakou Institute for Food and Drug Control, Hebei Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract: Objective** This thesis aims at establishing the measure method of aflatoxin in cereals with supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-mass spectrometer/mass spectrometer (SFE-SFC-MS/MS) method.

**Methods** Samples were extracted by supercritical CO<sub>2</sub>-methanol (98:2, V/V). The analysis was carried out on an Shim-pack UC-X RP C<sub>18</sub> column (150 mm×4.6 mm, 3 μm) with isocratic elution using a mobile phase of supercritical CO<sub>2</sub> and methanol. Mass spectrometry acquisition was done in the positive ion mode and the analytes were detected in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The correlation coefficients of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> were above 0.998 in the range of 0.5-20 ng. The method had good linear relation. The recovery rate in samples of rice and corn grit were 92.3%-107.9%, 93.0%-106.1%, 93.4%-104.9%, 92.8%-102.2% respectively, relative standard deviations of 3.0%-4.3%, 3.2%-4.5%, 3.0%-4.6%, 3.0%-4.5% (n=6) respectively. The limit of quantitation was 0.1 μg/kg.

**Conclusion** This method was quick, simple, safe and accurate. It was available for measuring the amount of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in cereals.

**Key words:** Aflatoxin; supercritical CO<sub>2</sub>; supercritical fluid extraction-supercritical fluid chromatography-mass spectrometer/mass spectrometer; food contamination; cereals

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFT)是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*A. parasiticus*)和模式曲菌(*A. nomius*)等在合适的温度和湿度条件下产生的真菌毒素,对人畜有强烈的致病性、致癌性<sup>[1]</sup>。常见的有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>等。其

中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的毒性和致癌性最强,其毒性比氰化钾高,也是目前最强的化学致癌物,故各国对其在食品中的允许量都有严格规定<sup>[2]</sup>。我国规定谷物及其制品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的限量指标为 5.0~20 μg/kg<sup>[3]</sup>。目前国标中检测食品中黄曲霉毒素方法主要有同位素稀释液相色谱-串联质谱法、高效液相色谱-柱前/柱后衍生法等<sup>[4]</sup>。但前处理方法繁琐,操作人员存在接触风险,因此对其进行及时、快速、高效地检测至关重要。

超临界流体既有与气体相当的高渗透力和低

收稿日期:2019-02-08

作者简介:宫晓平 男 主任药师 研究方向为食品药品检验及新方法开发 E-mail:gongxiaoping0176@126.com

通信作者:董琨 女 主管药师 研究方向为食品药品检验及新方法开发 E-mail:dayu30@126.com

粘度,又兼有与液体相近的密度和对物质优良的溶解能力<sup>[5]</sup>。超临界状态的 CO<sub>2</sub> 具有良好溶解性能和较大的扩散系数,适合于非极性、相对分子质量小于 500 的成分提取<sup>[6]</sup>。具有环保、经济、无溶剂残留等优点<sup>[7]</sup>,所以在实际操作中常使用 CO<sub>2</sub> 超临界流体。超临界流体萃取是国际上最先进的物理萃取技术,是近代化工分离中出现的高新技术,利用超临界 CO<sub>2</sub> 优良的溶解力,实现将基质与萃取物有效分离。处于超临界状态的 CO<sub>2</sub> 对极性物质的溶解度很低,常需加入调节剂(夹带剂),使其改善选择性或提高待萃取成分的溶解度,从而提高萃取效果<sup>[7]</sup>。超临界流体色谱是以超临界流体 CO<sub>2</sub> 做流动相,依靠流动相的溶剂化能力来进行分离的色谱过程。

本试验采用超临界萃取-超临界色谱-串联质谱(SFE-SFC-MS/MS)法,对以大米粉和玉米渣为代表的谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 进行测定,样品只需简单粉碎后直接上机,进行超临界流体萃取、经超临界色谱分离和质谱检测。与传统检验方法比较,SFE-SFC-MS/MS 法具有简单、快速、安全、准确等优点。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

Nexera UC 型超临界流体萃取/色谱系统、8060 型串联质谱仪均购自日本岛津,十万分之一精密电子天平。

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(STD#1042,100 μg/ml)、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>(STD#1052,100 μg/ml)、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>(STD#1062,100 μg/ml)、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>(STD#1072,100 μg/ml)均购自青岛普瑞邦,乙腈、甲醇、异丙醇、乙醇均为色谱纯,超临界萃取专用空白滤纸片(日本岛津)。玉米中黄曲霉毒素质控样品:黄曲霉毒素 14.6 μg/kg,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 13.4 μg/kg,黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 1.2 μg/kg 均购自北京中检维康。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准溶液的配制

精密量取黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准溶液 1 000 μl 至 50 ml 容量瓶中,分别加入乙腈稀释至刻度,摇匀,制成 2 μg/ml 的 4 种黄曲霉毒素标准储备液。分别精密量取上述黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标准储备液各 1 000 μl 至同一 10 ml 容量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,即得浓度均为 200 ng/ml 的标准品混合储备液。

#### 1.2.2 样品的制备

选取谷物样品用粉碎机粉碎,称取 0.5 g,放入

5 ml 规格超临界萃取装置的萃取罐中,待上机测定。

### 1.2.3 仪器条件

萃取:萃取剂:A 为超临界 CO<sub>2</sub>,B 为甲醇,萃取剂比例为 98:2,萃取流速 3 ml/min,萃取温度 40 ℃,萃取时背压 A 为 15 MPa,背压 B 为 14.8 MPa,采取先静态萃取 4 min,再动态萃取 3 min 进行萃取。

色谱:色谱柱为 Shim-pack UC-X RP C<sub>18</sub> (150 mm×4.6 mm, 3 μm);流动相:A 为超临界 CO<sub>2</sub>,B 为甲醇,流速 2 ml/min,柱温 40 ℃,梯度洗脱程序:7 min, 2% B; 14~15 min, 30% B; 15.1~17 min, 2% B;洗脱时背压 A 为 15 MPa,背压 B 为 40 MPa;补偿液:甲醇,补偿液流速 0.1 ml/min。

质谱:正离子检测模式;电喷雾离子源;离子源温度 400 ℃;脱溶剂管温度 200 ℃;加热模块温度 400 ℃;雾化气流量 3 L/min;加热气流量 15 L/min;干燥气流量 5 L/min;其他质谱参数见表 1。

表 1 黄曲霉毒素质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameter of aflatoxin

名称	前体离子 /(m/z)	产物离子 /(m/z)	Q1 预四极 偏置电压/V	碰撞能 /V	Q3 预四 极偏置 电压/V
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	313.10	241.10	-16.0	-39.0	-26.0
		285.10*	-12.0	-25.0	-30.0
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	315.10	259.10*	-12.0	-30.0	-27.0
		287.10	-16.0	-27.0	-30.0
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	329.10	243.10*	-10.0	-27.0	-26.0
		283.10	-13.0	-26.0	-20.0
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	331.10	245.10*	-10.0	-30.0	-26.0
		217.10	-10.0	-37.0	-23.0

注:\* 表示定量离子

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的优化

分别采用超临界 CO<sub>2</sub>-甲醇、超临界 CO<sub>2</sub>-乙醇、超临界 CO<sub>2</sub>-异丙醇和超临界 CO<sub>2</sub>-乙腈四种洗脱体系进行系列探索试验,结果显示当流动相为超临界 CO<sub>2</sub>-甲醇、超临界 CO<sub>2</sub>-乙醇时四种目标物质均能有效分离,对两种流动相分别进行方法学验证,发现流动相为超临界 CO<sub>2</sub>-乙醇时目标物质有响应值突然大幅下降的现象,故最终确定流动相为超临界 CO<sub>2</sub>-甲醇。

### 2.2 基质效应

用甲醇配制混合标准溶液系列,同时用空白大米粉及玉米渣样品分别按照 1.2.3 中萃取条件进行萃取,收集萃取液即为空白基质溶液。用空白基质溶液配制同浓度水平的系列基质匹配标准溶液。分别将上述溶剂标准溶液系列与基质匹配标准溶液系列按照 1.2.3 中的色谱条件进行测定,以基质

匹配标准曲线的斜率与纯溶剂配制标准曲线的斜率之比来评价基质效应,该比值越接近1.0说明基质效应越弱。黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 在大米粉和玉米渣中的基质效应比值在0.97~1.02范围内,表明本方法不存在明显的基质效应。

### 2.3 方法的线性范围和定量限

精密吸取1.2.1中的标准品混合储备液25、50、125、250、375、500、1 000  $\mu$ l,用乙腈稀释至1.0 ml,摇匀,配制成系列标准曲线工作液(5、10、25、50、75、100、200 ng/ml)。以超临界萃取专用空白滤纸片为基质,放入5 ml规格超临界萃取装置的萃取罐中,分别精密吸取上述系列标准曲线工作液100  $\mu$ l于基质表面,按照本试验选取的SFE-SFC-MS/MS法检测条件进行测定。以峰面积为纵坐标,标准品质量(ng)为横坐标,进行线性回归,各组分的回归方程及相关系数见表2。结果表明该方法在试验范围内线性关系良好。

表2 各组分线性关系测定结果

Table 2 Measurement result of partial linear relation for each groups

目标物质	工作曲线方程	相关系数 $r$
黄曲霉毒素 $B_1$	$y = 2544.71x + 10429.7$	0.999 2
黄曲霉毒素 $B_2$	$y = 2771.56x + 11377.4$	0.998 9
黄曲霉毒素 $G_1$	$y = 1927.40x + 5271.85$	0.998 8
黄曲霉毒素 $G_2$	$y = 834.374x + 10642.2$	0.999 3

以不含黄曲霉毒素的大米粉和玉米渣为空白

基质,称取0.5 g,放入5 ml规格超临界萃取罐中,用乙腈不断稀释标准品混合溶液,取稀释后的标准品溶液100  $\mu$ l分别于上述空白基质表面,混匀,按照本试验选取的SFE-SFC-MS/MS法检测条件测定,记录峰面积,在信噪比>10时测得最低检测浓度为0.1  $\mu$ g/kg,即定量限为0.1  $\mu$ g/kg。

### 2.4 方法的准确度和精密度

以空白基质加标回收率表示方法的准确度,以回收率的相对标准偏差(RSD)表示方法的精密度。分别以不含黄曲霉毒素的大米粉和玉米渣为空白基质,称取0.5 g,放入5 ml规格超临界萃取罐中,各18份,分别精密吸取浓度为5、25、100 ng/ml的标准曲线工作液100  $\mu$ l于空白基质表面,混匀,按照本试验SFE-SFC-MS/MS法检测条件提取测定,将峰面积代入回归方程计算加标回收率。结果显示在1~20  $\mu$ g/kg加标范围内,大米粉中黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的回收率范围分别为92.3%~103.7%、93.0%~102.7%、94.0%~103.3%、92.8%~102.2%,RSD范围分别为3.0%~4.3%、3.2%~4.3%、3.0%~3.8%、3.0%~4.5%;玉米渣中黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的回收率范围分别为94.3%~107.9%、93.9%~106.1%、93.4%~104.9%、94.2%~102.1%,RSD范围分别为3.3%~4.3%、3.9%~4.5%、4.0%~4.6%、3.4%~4.5%。具体数据见表3,SFE-SFC-MS/MS色谱图见图1。

表3 大米粉和玉米渣样品回收率测定结果( $n=6$ )

Table 3 Measurement result of rice and corn grit samples recovery

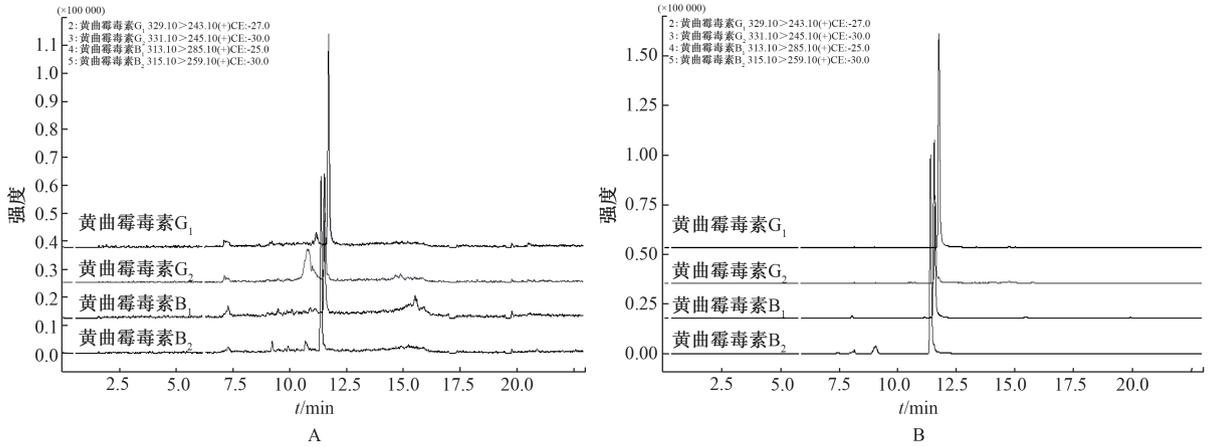
目标物质	添加浓度 /( $\mu$ g/kg)	大米粉			玉米渣		
		平均测定浓度 /( $\mu$ g/kg)	平均回收率 /%	RSD /%	平均测定浓度 /( $\mu$ g/kg)	平均回收率 /%	RSD /%
黄曲霉毒素 $B_1$	1	0.923 0	92.3	4.3	0.943 4	94.3	4.3
	5	4.858 5	97.2	3.7	4.899 3	98.0	3.3
	20	20.735 4	103.7	3.0	21.578 3	107.9	3.3
黄曲霉毒素 $B_2$	1	0.930 4	93.0	4.3	0.939 4	93.9	4.5
	5	4.932 4	98.6	3.5	4.891 6	97.8	3.9
	20	20.531 4	102.7	3.2	21.218 8	106.1	4.4
黄曲霉毒素 $G_1$	1	0.940 0	94.0	3.8	0.933 6	93.4	4.6
	5	4.937 1	98.7	3.0	4.899 2	98.0	4.3
	20	20.658 8	103.3	3.2	20.987 8	104.9	4.0
黄曲霉毒素 $G_2$	1	0.927 9	92.8	4.5	0.942 0	94.2	4.5
	5	4.871 8	97.4	3.0	4.886 4	97.7	4.1
	20	20.433 0	102.2	4.5	20.417 8	102.1	3.4

### 2.5 含基质标准物质的检测

用编号为TR-A1000的玉米黄曲霉毒素质量物质对方法进行验证,测定结果显示检出黄曲霉毒素 $B_1$ 的含量为12.91  $\mu$ g/kg,黄曲霉毒素 $B_2$ 的含量为1.14  $\mu$ g/kg,均在定值范围内。结果表明本方法结果可靠。

### 2.6 实际样品检测

应用本试验方法对10份大米粉和10份玉米渣进行黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的测定,仅有1份玉米渣检出黄曲霉毒素 $B_1$ (见图2),均未检出黄曲霉毒素 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ ,其中检出黄曲霉毒素 $B_1$ 的残留量为0.43  $\mu$ g/kg。



注:A为大米粉;B为玉米渣

图1 大米粉(1 μg/kg)和玉米渣(20 μg/kg)中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的回收率 SFE-SFC-MS/MS 色谱图

Figure 1 SFE-SFC-MS/MS chromatogram for recovery of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> from rice (1 μg/kg) and corn grit (20 μg/kg)

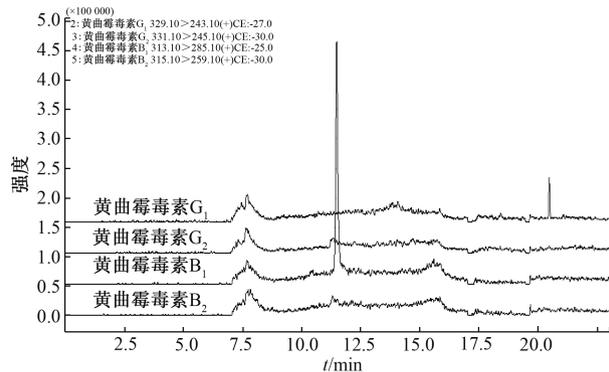


图2 实测样品检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 玉米渣样品的 SFE-SFC-MS/MS 色谱图

Figure 2 SFE-SFC-MS/MS chromatogram for aflatoxin B<sub>1</sub> from corn grit sample

### 3 小结

本试验建立了 SFE-SFC-MS/MS 法测定大米粉和玉米渣中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>, 提取全程加入甲醇作为调节剂, 极性较大的黄曲霉类物质得到了良好的分离效果, 扩大了超临界技术应用范围, 为其他极性较大物质实现超临界提取分离提供了参考。现行食品安全国家标准<sup>[4]</sup>中第一法(同位素稀释液相色谱-串联质谱法)与第二法(高效液相色谱-柱前衍生法)规定当称取样品为 5 g 时, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的定量限均为 0.1 μg/kg。本方

法取样量仅为 0.5 g, 定量限为 0.1 μg/kg, 与现行食品安全国家标准比较, 本试验方法取样量少, 减少操作人员的接触风险, 绿色环保, 且灵敏度更高, 操作简单、快速、安全, 适用于谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的快速定量检测。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 王浩, 杨红梅, 郭启雷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定植物油中苯并芘与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>[J]. 分析测试学报, 2014, 33(8): 911-916.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定: GB 5009.22—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [5] 马君昌. 超临界二氧化碳萃取的研究与应用[J]. 辽阳石油化工高等专科学校学报, 2001, 17(3): 16-19, 25.
- [6] 孙玉琦, 肖小河, 马永刚, 等. 中心组合设计法优化超临界 CO<sub>2</sub> 提取大黄蒽醌工艺[J]. 中国药学杂志, 2009, 44(22): 1689-1692.
- [7] 廖传华, 黄振仁. 超临界 CO<sub>2</sub> 萃取技术与中药现代化[J]. 中成药, 2006, 28(1): 110-113.