

QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法 测定砂仁中 4 种黄曲霉毒素

陈昊文¹, 周春霞¹, 陈金¹, 洗燕萍², 管晶晶¹, 胡均鹏², 罗东辉^{1,3*}

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东海洋大学食品科学与工程学院, 广东湛江 524088) (2. 广州质量监督检测研究院, 广州市食品安全风险动态监测与预警研究中心, 广州市食品安全检测技术重点实验室, 广东广州 511447) (3. 化学与精细化工广东省实验室潮州分中心(韩江实验室), 广东潮州 521000)

摘要: 该研究建立了利用 QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法同时测定砂仁中 4 种黄曲霉毒素(Aflatoxin B1、B2、G1、G2)的分析方法。通过对 QuEChERS 前处理技术、色谱和质谱条件的优化, 确定了最佳的实验条件。研磨后的样品经 $\phi=1\%$ 甲酸酸化的乙腈提取, 无水硫酸镁及氯化钠脱水盐析, 上清液经十八烷基键合硅胶(C_{18})、乙二胺-N-丙基硅胶(PSA)、无水硫酸镁混合吸附剂净化。经 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm)进行分离, 以乙腈和 $\phi=0.1\%$ 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵溶液进行梯度洗脱。在正离子模式下, 进行多反应监测(MRM), 进一步通过空白基质标准溶液外标法定量。结果表明, 4 种黄曲霉毒素在 0.20~10.00 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.998 9。实际样品的加标回收试验结果显示, 回收率范围为 89.50%~113.12%, 日内精密密度为 1.31%~6.71%, 日间精密密度为 1.29%~6.20%, 4 种黄曲霉毒素的方法检出限为 0.30~0.60 $\mu\text{g/kg}$ 、定量限为 1.00~2.00 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法操作简单, 快速, 灵敏, 适用于砂仁中 4 种黄曲霉毒素的定性、定量筛查。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS); 黄曲霉毒素; 砂仁

文章编号: 1673-9078(2023)12-286-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.12.0128

Identification of Four Aflatoxins in *Fructus amomi* using QuEChERS Combined with Ultra-performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry

CHEN Haowen¹, ZHOU Chunxia¹, CHEN Jin¹, XIAN Yanping², GUAN Jingjing¹, HU Junpeng², LUO Donghui^{1,3*}

(1. College of Food Science and Technology, College of Food Science and Engineering, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China) (2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou City Research Center of Risk Dynamic Detection and Early Warning for Food Safety, Guangzhou City Key Laboratory of Detection Technology for Food Safety, Guangzhou 511447, China) (3. Chaozhou Branch of Chemistry and Chemical Engineering Guangdong Laboratory (Hanjiang Laboratory), Chaozhou 521000, China)

Abstract: A quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe solid phase extraction (QuEChERS), in combination with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established to identify four aflatoxins in *Fructus amomi*. Optimal experimental conditions were determined by optimizing the QuEChERS pre-treatment technique and the chromatographic and mass spectrometric conditions. The samples were extracted using acetonitrile with 1% formic acid and salted out with anhydrous magnesium sulfate

引文格式:

陈昊文,周春霞,陈金,等.QuEChERS 结合超高效液相色谱-串联质谱法测定砂仁中 4 种黄曲霉毒素[J].现代食品科技,2023,39(12):286-294

CHEN Haowen, ZHOU Chunxia, CHEN Jin, et al. Identification of four aflatoxins in *Fructus amomi* using QuEChERS combined with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(12): 286-294

收稿日期: 2023-02-09

基金项目: 广东省重点领域研发计划项目(2021B070706001); 潮州市重大科技创新项目(2020PT01); 韩江实验室(HJL202101B005)

作者简介: 陈昊文(2000-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 农产品加工与贮运, E-mail: dicky494914601@qq.com

通讯作者: 罗东辉(1982-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品营养与健康, E-mail: luodonghui@gdou.edu.cn

and sodium chloride, then purified using C18, primary secondary amine (PSA), and magnesium sulfate anhydrous. The target analytes were separated on Waters HSS T3 columns (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm), eluted by acetonitrile and a 0.1% (V/V) formic acid-5 mmol/L ammonium acetate solution gradient elution was used. Results were detected using MS/MS in positive ion mode under multiple reaction monitoring (MRM); quantification was further conducted using matrix-matched external standard calibrations. Good linearities for the four aflatoxins in the range of 0.20~10.00 $\mu\text{g/L}$ were obtained and the correlation coefficients were >0.9989 . The recoveries were 89.50%~113.12%. The intraday relative standard deviations (Intra-RSDs) and interday relative standard deviations (Inter-RSDs) were 1.31%~6.71% and 1.29%~6.20%, respectively, as determined using spiked samples. The limits of detection and limits of quantification were 0.30~0.60 $\mu\text{g/kg}$ and 1.00~2.00 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The method is simple, rapid, and sensitive. It can be used for the qualitative determination and quantitative analysis of four aflatoxins residues in *Fructus amomi*.

Key words: ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); aflatoxin; *Fructus amomi*

砂仁 (*Fructus amomi*) 为我国“四大南药”之一, 距今已有 1 300 多年的用药历史。药理作用研究表明, 砂仁具有潜在的胃肠保护、抗炎、镇痛、止泻、抑菌、调节菌群、降血糖、抗氧化等作用^[1-3]。砂仁“药食同源”, 在我国的传统饮食里还是一种常用的芳香调味料^[4]。由于受气候地域等条件的影响, 砂仁在运输、储藏过程中极易受到真菌的污染而产生毒素的残留^[5], 对消费者的健康产生潜在危害, 世界卫生组织 (WHO) 已经将真菌毒素的监测归入食品安全的重点监控项目^[6], 因此需要加强对砂仁中真菌毒素的检测和监控, 以保障消费者的饮食安全。

在各种真菌毒素中, 由黄曲霉和寄生曲霉两类霉菌代谢所产生的黄曲霉毒素, 因具备高毒性、致癌性、致畸性和致突变性等危害而成为重点关注对象, 其中自然界以 B 族和 G 族的黄曲霉毒素较为常见, 包括黄曲霉毒素 B1 (Aflatoxin B1, AFB1)、黄曲霉毒素 B2 (Aflatoxin B2, AFB2)、黄曲霉毒素 G1 (Aflatoxin G1, AFG1) 和黄曲霉毒素 G2 (Aflatoxin G2, AFG2), 它们的分子结构如图 1 所示, 黄曲霉毒素因拥有双呋喃环这一基本毒素结构, 辅以致癌结构氧杂萜邻酮, 成为危害人体的剧毒物质^[7]。国际癌症研究机构已将黄曲霉毒素视为 IA 类致癌物, 许多国家已经对该类毒素制定了严格的食品限制指标^[8], 我国 GB 2761-2017《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》中也规定了 AFB1 在多种食品基质中的限量^[9], 可见我国在食品中黄曲霉毒素的残留限量方面给予了高度重视, 为此建立准确、快速的相关检测方法具有重要意义。

目前, 黄曲霉毒素的主要检测方法有薄层色谱法 (TLC)^[10]、酶联免疫法 (ELISA)^[11]、高效液相色谱法 (HPLC)^[12]、气相色谱法 (GC)^[13] 等等, 由于砂仁基质的复杂性与毒素检测的痕量性, 上述检测方法有着检测步骤繁琐、时间长、灵敏度相对较低、易出现假阳性等问题^[14], 在应用方面受到限制。近年来, 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 由于具备

优良的分离能力与鉴定能力, 被广泛用于测定各种食品基质中的真菌毒素。此外, 目前黄曲霉毒素检测的净化手段主要采用免疫亲和柱法^[15], 但该方法检测成本高、耗时长, 缺点也不利于日常的大批量检测。而操作简便的 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 净化法价格低廉, 不仅能快速高效地去除基质杂质, 而且能减少化学试剂的使用, 目前在各类食品中真菌毒素的检测领域上有着良好的应用^[16,17]。经查阅文献, 采用 QuEChERS-UPLC-MS/MS 法测定砂仁样品中真菌毒素的研究尚未见报道, 考虑到检测机构的成本及样品基质的复杂程度, 本研究建立了适用于测定砂仁中 4 种黄曲霉毒素的 QuEChERS 结合超高效液相色谱串联质谱法, 以期填补液质联用技术在检测砂仁真菌毒素的空白。

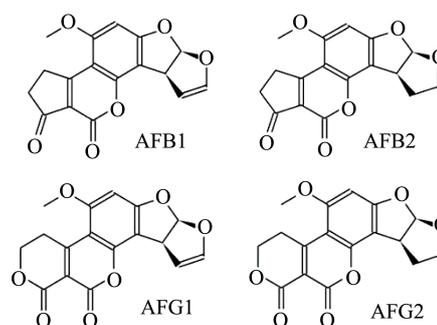


图 1 4 种黄曲霉毒素的结构式

Fig.1 Structure formula of 4 aflatoxins

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

ACQUITY™ 超高效液相色谱、Waters Xevo™ TQ MS 三重四级杆串联质谱仪, 美国 Waters 公司; ACQUITY BEH C18 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm), 美国 Waters 公司; ME204 电子天平, 瑞士梅特勒-托利多公司; MS3 digital 涡旋混合器, 德国 IKA 公司;

KDC-40 低速离心机, 安徽中科中佳公司; Milli-Q 去离子水发生器, 美国 Millipore 公司; KQ-500E 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

4 种黄曲霉毒素 (Aflatoxin B1、B2、G1、G2) 混合标准溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 天津阿尔塔科技有限公司; 甲醇 (HPLC 级), 德国 Merck 公司; 乙腈 (HPLC 级), 德国 Merck 公司; 甲酸 (HPLC 级), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 乙酸铵 (HPLC 级)、PSA、C₁₈、GCB, 上海安谱有限公司; 无水硫酸镁、氯化钠, 广州化学试剂厂; 实验用水均为超纯水。

1.2 样品前处理方法

提取: 称取研磨后的砂仁试样 2 g (精确至 0.01 g) 于 50 mL 塑料离心管中, 加入 5 mL 超纯水静置 5 min, 使其浸润样品, 再加入 5 mL $\phi=1\%$ 甲酸-乙腈溶液涡旋 2 min, 超声提取 10 min, 然后加入 1.2 g 无水硫酸镁和 0.4 g 氯化钠, 涡旋 2 min, 4 200 r/min 离心 5 min, 取出上清液, 重复萃取两次, 合并提取液。

净化: 吸取 1.5 mL 上述清液至含有 180 mg C₁₈、150 mg PSA 和 300 mg 无水硫酸镁的 2 mL 离心管中, 涡旋振荡 2 min 除去杂质, 12 000 r/min 离心 5 min, 上清液经 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 将滤液置于 2 mL 进样小瓶中, 供 UPLC-MS/MS 测定。

1.3 色谱条件

表 1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

<i>t</i> /min	0	1.0	7.0	8.0	8.5	10.0
<i>V</i> (0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵溶液) /%	80	80	10	10	80	80
<i>V</i> (乙腈) /%	20	20	90	90	20	20

UPLC-MS/MS 检测色谱条件: ACQUITY UPLC

表 2 4 种黄曲霉毒素的质谱参数

Table 2 MS/MS parameters of 4 aflatoxins

Compounds	Ion Formation	<i>R</i> _t /min	Parent Ions (<i>m/z</i>)	Daughter Ions (<i>m/z</i>)	Cone Voltage/V	Collision Energy/eV
Aflatoxin B1 (AFB1)	[M+H] ⁺	5.07	313.3	285.1*/241.1	45	30 50
Aflatoxin B2 (AFB2)	[M+H] ⁺	4.82	315.1	287.1*/259.1	45	35 40
Aflatoxin G1 (AFG1)	[M+H] ⁺	4.79	329.1	311.1*/243.1	45	33 40
Aflatoxin G2 (AFG2)	[M+H] ⁺	4.51	331.1	313.1*/245.1	40	30 37

注: *为目标化合物的定量离子。

MRM 模式由于具有良好的选择性, 能同时扫描多化合物多离子对^[18], 为获得 4 种化合物最佳灵敏度和分离效果, 本实验对每个目标化合物的质谱参数进行了优化。采用直接进样的方式, 在电喷雾正离子 (ESI⁺) 模式下分别对 4 种黄曲霉毒素混合标准工作

HSS T3 色谱柱 (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 2 μL ; 流动相: 0.1% 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵溶液 (A) 和乙腈 (B); 梯度洗脱程序见表 1。

1.4 质谱条件

电离方式为电喷雾正离子 (ESI⁺) 模式; 毛细管电压 2 kV; 离子源温度 150 $^{\circ}\text{C}$, 去溶剂温度 400 $^{\circ}\text{C}$; 去溶剂气为氮气, 800 L/Hr; 锥孔气为氮气, 150 L/Hr; 监测模式: 多反应监测 (MRM), 4 种黄曲霉毒素的相关质谱参数如表 2 所示。

1.5 标准溶液配制

准确移取质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Aflatoxin B1、B2、G1、G2 的混合标准溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至 10 mL, 配制成 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准溶液储备液, 于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

标准品混合中间液 (100 $\mu\text{g}/\text{L}$): 准确移取 4 种化合物的混合标准溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶, 用乙腈定容到 10.00 mL, 此时各化合物质量浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

标准曲线工作液: 用乙腈溶液稀释混合中间液 (或根据基质效应使用空白基质溶液稀释), 配制系列标准曲线为 0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

1.6 数据处理

所有试验进行 3 次平行, 采用 Origin 2021 pro 软件进行作图。

2 结果与讨论

2.1 质谱条件的优化

液 (100 $\mu\text{g}/\text{L}$) 进行一级质谱扫描, 寻找目标化合物的母离子信息, 通过对标准品扫描后发现, 4 种化合物在电离后均产生了 [M+H]⁺ 峰, 因此均采用 [M+H]⁺ 作为其分子离子峰; 4 种目标化合物的母离子经碰撞后, 分别对其进行二级质谱扫描, 得到相应的二级质

谱图, 确定两个子离子 (响应值较高、质量数较大) 分别作为定性、定量离子, 并优化得到每种黄曲霉毒

素特征离子对的最佳质谱参数, 使特征离子对响应最高^[19]。经优化后的特征离子对及质谱参数见表 2。

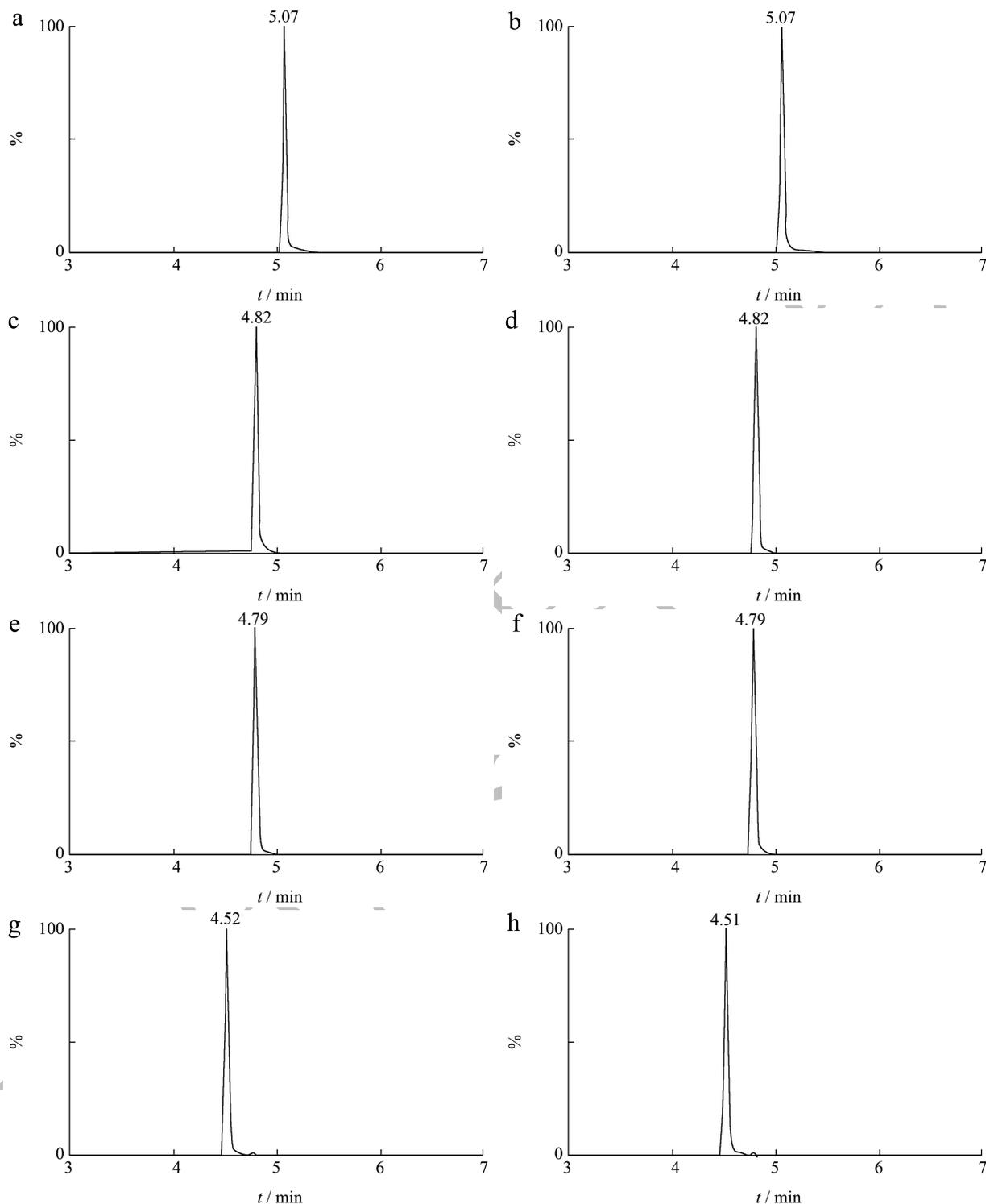


图 2 4 种黄曲霉毒素的提取离子流图

Fig.2 Extracted ion chromatogram of 4 aflatoxins

注: a 和 b、c 和 d、e 和 f、g 和 h 分别为 Aflatoxin B1、B2、G1、G2。a、c、e、g 为定性离子对, b、d、f、h 为定量离子对。

2.2 色谱条件的优化

色谱柱是液相色谱的灵魂, 是保证多分析物能良好分离的关键。由于化合物 AFB1 和 AFG1 的结构与

极性较为相似, 本研究比较了 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) 和 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (1.7 μm, 100 mm×2.1 mm) 对目标化合物的分离效果。运用相同的实验条件, 使

用质量浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的黄曲霉毒素混合标准溶液上机检测, 结果发现, ACQUITY UPLC HSS T3 柱能够在 6 min 内较好的分离 4 种化合物, 获得最优的峰型与响应强度, 原因在于 HSS T3 作为极性较强的色谱柱, 本质上是在 C18 键合相基础上加上了极性基团修饰, 辅以高纯度的合成硅胶作为基体, 使得该色谱柱对高比例水相及低 pH 的耐受性更好, 故选择 ACQUITY UPLC HSS T3 柱作为分析色谱柱。

在反相液相色谱中, 甲醇-水、乙腈-水等是较为常用的流动相体系, 为了改善峰型和提高离子化效率可以向水相中添加少量甲酸、乙酸铵等试剂^[20]。因此, 本研究以甲醇、乙腈分别与纯水、 $\varphi=0.1\%$ 甲酸水溶液、5 mmol/L 乙酸铵水溶液、 $\varphi=0.1\%$ 甲酸-5 mmol/L 乙酸铵组成流动相, 比较 4 种真菌毒素的出峰情况。结果表明, 不同流动相能在一定程度上影响目标化合物的出峰时间和响应值。由于乙腈较强的洗脱能力, 选择乙腈为有机相的流动相体系相比甲醇而言, 柱压明显降低, 这对于仪器保护和检测效率而言更为有利。综合比较以乙腈为有机相的流动相组合的出峰效果与响应强度, 发现以乙腈与 0.1%甲酸-5 mmol/L 乙酸铵溶液组合作为流动相时, 4 种黄曲霉毒素的保留时间稳定, 且色谱峰形和响应强度最好, 因此将其确定为该方法的最佳流动相组合, 最佳梯度洗脱条件通过改变不同时间段流动相的比例进行确定, 目标毒素的提取离子流图如图 2 所示。

2.3 提取条件的优化

不同类型的提取溶剂因其极性和溶解性的差异会影响目标化合物的提取效果, 多数真菌毒素易溶于有机溶剂, 而目前甲醇和乙腈两种溶剂常被用于毒素的提取, 此外, 向提取溶剂中添加酸对某些真菌毒素的提取具有正向作用^[21], 降低提取系统的 pH 值有利于促进部分毒素在有机相中的分布^[22], 因此, 本研究选择基质较为复杂的阳春砂仁作为代表性基质, 进行加标回收实验, 考察了甲醇、乙腈、1%甲酸-甲醇、1%甲酸-乙腈对目标化合物回收的影响, 不同提取溶剂对黄曲霉毒素的提取效果及回收率结果见图 3、图 4。

实验表明, 使用乙腈组提取的回收率要远远高于甲醇组的回收率, 当使用乙腈作为提取溶剂时, 4 种黄曲霉毒素的回收率在 64.48%~125.81%之间, 而用甲醇作为提取溶剂时, 4 种黄曲霉毒素的回收率最高仅达 52.34% (图 4)。这是由于甲醇比乙腈具有更好的溶解性, 易将样品中的非目标成分提取出来, 使得样品中的其他基质进入到提取液中, 获得的提取物颜色过深, 干扰后续的盐析和净化步骤, 进而导致目标化

合物的电离信号受到抑制^[23], 使用甲醇时的共萃取现象导致低回收率的结果在肉豆蔻^[20]基质的相关研究也有报道, 该研究同样选择了乙腈对多种真菌毒素进行提取。乙腈的极性适中, 使用时能减少共萃取物的干扰, 从而获得较为理想的回收率, 同时可以观察到使用酸化后的乙腈作为提取剂时, 目标化合物的回收率在 69.81%~104.95%, 整体与纯乙腈的回收率相比更接近于 100%, 因此选择 1%甲酸-乙腈作为提取剂。

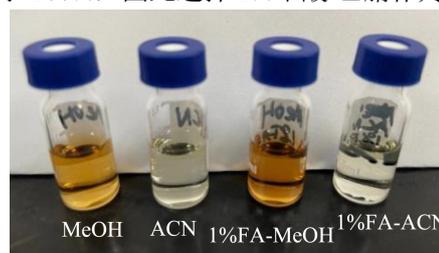


图 3 4 不同提取剂的提取效果

Fig.3 Extraction effect of different extractant

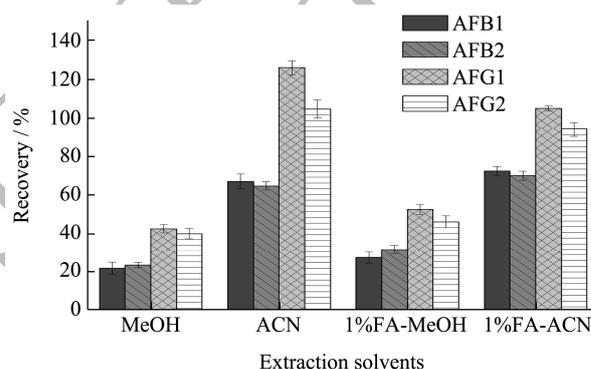


图 4 4 不同提取剂对黄曲霉毒素回收率的影响

Fig.4 Effect of different extractant on recovery of 4 aflatoxins

在 QuEChERS 前处理过程中加入盐析剂可以促进目标化合物从水相进入有机相, 利于水相和有机相的相互分离, 从而提高化合物在提取时的回收率^[24]。本实验选择无水 MgSO_4 和 NaCl 两种较为常见的盐析剂, 并对其用量进行优化, 由于 MgSO_4 具有干燥放热特性, 能诱使极性化合物从水相往有机相迁移, 利于目标化合物的回收^[20], 然而当 MgSO_4 的量超过 1.2 g 时, 整个样品体系的加热情况和结块程度明显, 导致提取液无法完全取出, 影响对目标毒素的回收。参考 Zhang 等^[25]研究中的类似现象并结合本实验结果, 我们优化确定盐析剂的使用剂量为 1.2 g 无水 MgSO_4 和 0.4 g NaCl 。

2.4 净化条件的优化

考虑到砂仁基质中含有酚类、多糖、色素等干扰物质^[26], 这些化合物不仅会影响目标物的响应值, 同时会对仪器造成一定的污染, 影响仪器寿命, 因此在进样之前需要对提取液进行 QuEChERS 技术净化^[27],

不同净化剂对黄曲霉毒素的除杂效果及回收率结果见图 5、图 6。PSA、C₁₈ 和 GCB 作为三种常见的净化吸附剂，被广泛用于除去基质中杂质；C₁₈ 可用于吸收基质中的非极性成分和脂肪类物质，PSA 是一种弱阴离子交换剂，可有效去除有机酸、脂肪酸、色素等成分，GCB 对含苯结构的有机化合物有较好的吸附能力^[28]。同时，加入无机盐能去除有机相中的水分并将基质中的非目标干扰物保留在水层，利于真菌毒素溶于有机相的同时提高溶液电离强度^[29]，从而提高回收率。本实验考察了三种净化剂单独或协同使用对回收率的影响，并对净化剂和无水 MgSO₄ 的用量进行了优化，从净化液的澄清度上看，PSA+C₁₈+GCB 的净化效果最好，溶液状态接近无色透明，PSA+C₁₈ 混合使用的净化效果也要优于三种净化剂单独使用（图 5）；但从回收率上看，由于 GCB 对于平面结构的真菌毒素具有较高的亲和力，它的加入使目标物的回收率明显下降（图 6），这一现象也与 Zhao 等^[20]的研究结果相似，在该研究中其经过筛选后选择了单一的 C₁₈ 作为净化剂。杂质相对较少的样品更有利于对色谱柱和仪器的保护，综合考虑，本实验选择 PSA+C₁₈+无水 MgSO₄ 作为净化剂组合。

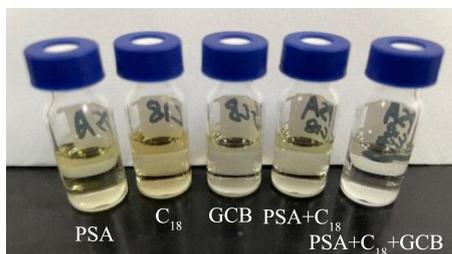


图 5 不同吸附剂对砂仁基质的净化效果

Fig.5 Purifying effect of different adsorbents on *Amomum villosum*

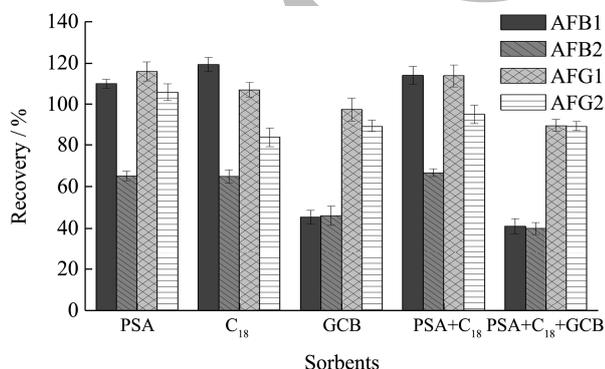


图 6 不同吸附剂对 4 种黄曲霉毒素回收率的影响

Fig.6 Effect of adsorbents on recovery of 4 aflatoxins

在 QuEChERS 净化技术的应用中，吸附剂的用量对基质杂质的去除和目标化合物的回收有着至关重要的作用，过量吸附剂的使用会导致部分目标物被吸附除去，吸附剂剂量使用的不足会导致除杂效果不佳，两

种情况皆会影响方法的灵敏度及目标化合物的响应值。本实验前期比较了不同用量（50、100、150、200 mg）的 C₁₈、PSA（1:1）组合的净化效果，结果发现 C₁₈、PSA（1:1）的用量为 150 mg 时目标物的整体回收率最高，达到了 72.09%~91.13%，因此通过选取两种净化剂 120、150、180 mg 三个水平下的用量组合，进行优化配比，并加以比较了 C₁₈、PSA（1:2）和（2:1）的净化效果。净化剂用量对黄曲霉毒素的回收率结果见图 5，两种净化剂用量为 180 mg C₁₈+150 mg PSA 时 4 种毒素的整体回收率最高，达到了 77.75%~98.49%，因而选择此配比为净化剂最佳用量，同时实验过程中发现加入无水 MgSO₄ 能普遍提高目标毒素的回收率，可以解释为盐的除水作用能使目标物往有机层移动，从而尽可能地使其充分溶解于乙腈。综合净化剂种类及其用量的探究结果，本研究确定以“180 mg C₁₈+150 mg PSA+300 mg 无水 MgSO₄”为最佳净化剂组合，此组合下目标物的回收率达到了 94.12%~110.49%。无独有偶，姚誉阳等^[12]对该 4 种毒素的净化提取同样使用了该净化剂组合，但用量不同，其用量为 75 mg C₁₈+50 mg PSA+200 mg 无水 MgSO₄，与本实验相比较少，这与样品基质相关，基于砂仁基质的复杂性，该净化剂组合的确定，对于精准测定 4 种毒素尤为重要。

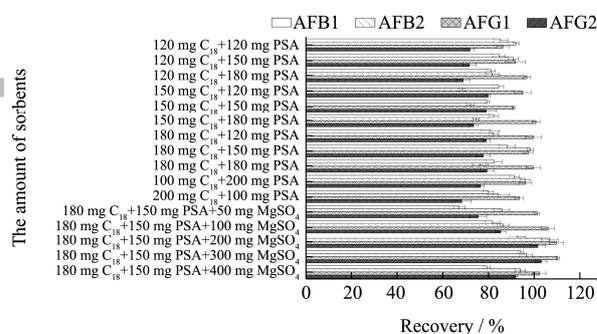


图 7 吸附剂用量对 4 种黄曲霉毒素回收率的影响

Fig.7 Effect of the amount of sorbents on recovery of 4 aflatoxins

2.5 线性范围、检出限、定量限和基质效应

在液质联用技术的分析过程中，目标化合物的检测结果会被样品基质中的某些物质所干扰，这种现象被称作基质效应（Matrix Effect, ME）^[30]，对于基质效应，采用 $ME=K_1/K_2$ （ K_1 ：基质标准曲线的斜率， K_2 ：溶剂标准曲线的斜率）评估^[31]；若 ME 在 0.8~1.2 之间，基质效应可忽略不计，ME 值低于或高于该范围则表明存在基质抑制或增强现象。经分析表明，4 种毒素的基质效应在 0.46~0.67 的范围内，表明该方法

存在基质抑制情况, 同位素内标法与空白基质外标法常被用于改善基质抑制情况, 考虑到检测机构的成本及分析时间等因素, 本实验采用后者进行定量实验以补偿基质效应。

配制空白基质标准工作液 (0.20~10.00 $\mu\text{g/L}$, 6 个质量浓度点), 上机测定。以目标物定量离子的峰面积为纵坐标 (y) 与对相应的质量浓度为横坐标 (x , $\mu\text{g/L}$) 作图, 绘制 4 种黄曲霉毒素的基质标准曲线, 求出线性方程和相关系数, 仪器的检出限 (LOD, $S/N \geq 3$) 和定量限 (LOQ, $S/N \geq 10$) 通过信噪比 (S/N)

来确定。结果表明, 4 种黄曲霉毒素在 0.20~10.00 $\mu\text{g/L}$ 的质量浓度范围内, 峰面积与其对应质量浓度展现出良好的线性关系, 相关系数 (R^2) 均大于 0.998 9, 方法检出限在 0.30~0.60 $\mu\text{g/kg}$ 之间, 方法定量限在 1.00~2.00 $\mu\text{g/kg}$ 之间, 其中 AFB1、AFB2 的检出限和定量限与米粉^[12]、白露片^[32]基质中的报道值相同, AFG1 的检出限和定量限低于槟榔^[33]基质的报道值, AFG2 的检出限和定量限低于玉米^[34]基质中的报道值, 由此可知, 本方法的定性和定量分析能力良好。

表 3 4 种黄曲霉毒素的线性方程、相关系数、线性范围、检出限、定量限和基质效应

Table 3 Linear equation, linear range, correlation coefficient (R^2), LOD, LOQ and ME of 4 aflatoxins

Analytes	Linear equation	R^2	Linear range($\mu\text{g/L}$)	LODs($\mu\text{g/kg}$)	LOQs($\mu\text{g/kg}$)	ME
AFB1	$y=70\ 756x-9\ 163.8$	0.998 9	0.20~10.00	0.30	1.00	0.46
AFB2	$y=34\ 504x-3\ 140.7$	0.999 5	0.20~10.00	0.30	1.00	0.50
AFG1	$y=14\ 904x-1\ 081.9$	0.999 2	0.20~10.00	0.60	2.00	0.67
AFG2	$y=16\ 352x-2\ 739.3$	0.999 0	0.20~10.00	0.60	2.00	0.52

表 4 实际空白样品 4 种黄曲霉毒素的加标回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

Table 4 Spiked recoveries and RSDs of 4 aflatoxins in real blank samples ($n=6$)

Analytes	Spiked level ($n=6$)								
	1 \times LOQ			2 \times LOQ			10 \times LOQ		
	Recovery /%	Intra-RSD /%	Inter-RSD /%	Recovery /%	Intra-RSD /%	Inter-RSD /%	Recovery /%	Intra-RSD /%	Inter-RSD /%
AFB1	89.50	6.71	4.16	106.05	3.01	4.62	103.15	1.31	1.29
AFB2	94.33	4.71	6.20	104.02	3.89	3.73	101.60	2.12	1.59
AFG1	107.70	3.04	5.11	113.12	4.87	4.59	105.31	2.25	3.11
AFG2	102.67	3.77	4.48	99.17	4.26	4.66	102.23	2.32	2.12

2.6 方法回收率和精密度

通过分析在定量限水平不加标的空白砂仁样品, 评估该方法的回收率与精密度。分别按照低 (1 \times LOQ)、中 (2 \times LOQ)、高 (10 \times LOQ) 3 个质量浓度水平加入适量 4 种黄曲霉毒素混合标准工作液, 每个浓度做 6 个平行样品, 上机测定, 计算加标回收率 (Recovery)、日内精密度 (Intra-RSD) 和日间精密度 (Inter-RSD)。结果表明, 在砂仁基质中, 各目标化合物在低水平添加量下的平均回收率为 89.50%~107.70%, 日内精密度的 3.04%~6.71%, 日间精密度为 4.16%~6.20%; 在中水平添加量下的平均回收率为 99.17%~113.12%, 日内精密度为 3.01%~4.87%, 日间精密度为 3.73%~4.66%; 在高水平添加量下的平均回收率为 101.60%~105.31%, 日内精密度为 1.31%~2.32%, 日间精密度为 1.29%~3.11% (表 4), 证明此方法具有较高的可重复性与准确度, 可满足砂仁食品中 4 种黄曲霉毒素的定量分析要求。

2.7 实际样品的测定

应用本方法对广州市售的 15 批砂仁样品进行定量分析, 均未检测出阳性样品。从检测结果上分析, 广州市售砂仁的黄曲霉毒素污染情况并不严重, 但参考学者现有的研究及实际样品的检测结果^[35,36], 随着各地气候的差异及储藏时间的延长, 砂仁中仍存在黄曲霉毒素污染的风险, 该方法对于其污染情况的日常筛查具有重要意义。

3 结论

本文建立了 QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法同时检测砂仁中 4 种黄曲霉毒素的测定方法, 该方法前处理过程简便、灵敏度高、复现性强。通过对不同流动相、色谱柱、提取条件及净化条件进行优化, 确定最佳实验条件, 经 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱分离后 4 种黄曲霉毒素得到良好分离; 采用 1% 甲酸-乙腈提取、QuEChERS 盐析和净化以获得良好的除

杂效果及回收率。与现有文献相比,本文首次将超高效液相色谱串联质谱法应用于砂仁基质中黄曲霉毒素的检测,该方法可满足政府监管部门对砂仁中4种黄曲霉毒素快速筛查,有望在日常风险监测中得到良好的应用,具有一定的实际意义。

参考文献

- [1] 李丽丽,田文仓,刘茵,等.砂仁中化学成分及其药理作用的研究进展[J].现代生物医学进展,2018,18(22):4390-4396.
- [2] Luo D, Zeng J, Guan J, et al. Dietary supplement of *Amomum villosum* Lour. polysaccharide attenuates ulcerative colitis in BALB/c mice [J]. Foods, 2022, 11(22): 3737.
- [3] 韦志,阮心眉,戴涛涛,等.碱提砂仁多糖的结构表征及其抗氧化活性研究[J].食品工业科技,2021,42(24):87-93.
- [4] Liu H, Zhuang S, Liang C, et al. Effects of a polysaccharide extract from *Amomum villosum* Lour. on gastric mucosal injury and its potential underlying mechanism [J]. Carbohydrate Polymers, 2022, 294(7): 164-170.
- [5] 王庆,邱彬,周亮,等.四种常见保健药材中16种真菌毒素的测定和污染状况研究[J].湘南学院学报(医学版),2022,24(2): 13-20.
- [6] 郑嘉,王红旗,刘继红,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测小麦中19种真菌毒素[J].食品安全质量检测学报,2022,13(16):5382-5390.
- [7] 王东旭,王新财,王凤丽,等.挥发性铵盐盐析辅助液萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法测定酱油中4种黄曲霉毒素[J].食品安全质量检测学报,2022,13(14):4634-4640.
- [8] Zhou H, Liu N, Yan Z, et al. Development and validation of the one-step purification method coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of four aflatoxins in fermented tea [J]. Food Chemistry, 2021, 354(2): 496-504.
- [9] GB 2761-2017,食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
- [10] Salisu B, Anua S M, Ishak W R W, et al. Development and validation of quantitative thin layer chromatographic technique for determination of total aflatoxins in poultry feed and food grains without sample clean-up [J]. Journal of Advanced Veterinary and Animal Research, 2021, 8(4): 656-666.
- [11] 胡成国,宋春宏,顾文佳,等.酶联免疫法检测复合调味料中黄曲霉毒素 B1 含量[J].食品安全质量检测学报,2020,11(11):3490-3494.
- [12] 姚誉阳,顾妍丽,吴宇伉,等.QuEChERS-高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定稻谷类食品中黄曲霉毒素[J].食品安全质量检测学报,2021,12(9):3497-3502.
- [13] Gaspar E M S M, Lopes J F. Simple gas chromatographic method for furfural analysis [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(14): 2762-2767.
- [14] 赵亮.粮油食品中的黄曲霉毒素检测技术分析[J].现代食品, 2021,11(14):47-49.
- [15] 郭伟华,李熠.免疫亲和柱结合液相色谱串联质谱法测定蜂花粉中黄曲霉毒素[J].食品与发酵工业,2014,40(11):222-226.
- [16] Perestrelo R, Silva P, Porto-Figueira P, et al. QuEChERS-Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1070(9): 1-28.
- [17] Kim K, Choi Y, Mok S, et al. Optimization of the QuEChERS method for multi-residue analysis of pharmaceuticals and pesticides in aquaculture products [J]. Food Chemistry, 2022, 399(8): 158-167.
- [18] 李子豪,林芳,王昌钊,等.超高效液相色谱-四极杆串联离子阱复合质谱法筛查和定量玉米中5种链格孢菌毒素[J].食品安全质量检测学报,2022,13(12):3762-3770.
- [19] 梁明,陈杰锋,洗燕萍,等.QuEChERS-UPLC-MS/MS 测定焙烤食品中4种链格孢菌毒素[J].现代食品科技,2019,35(6): 280-286.
- [20] Zhao X, Liu D, Zhang L, et al. Development and optimization of a method based on QuEChERS-dSPE followed by UPLC-MS/MS for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in nutmeg and related products [J]. Microchemical Journal, 2021, 168(5): 106-115.
- [21] 孙晓冬,郝杰,毛婷,等.固相萃取柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定液态乳中14种真菌毒素[J].食品科学, 2018,39(18):292-301.
- [22] Liao C D, Wong J W, Zhang K, et al. Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(20): 4771-4782.
- [23] 曾艳,张矛,陈亚,等.液相色谱-串联质谱法检测茶叶中真菌毒素的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2022,13(12): 3834-3841.
- [24] Bruzzoniti M C, Checchini L, De Carlo R M, et al. QuEChERS sample preparation for the determination of pesticides and other organic residues in environmental matrices: A critical review [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2014, 406(17): 4089-4116.
- [25] Zhang B, Chen X, Han S Y, et al. Simultaneous analysis of 20 mycotoxins in grapes and wines from Hexi corridor region (China): Based on a QuEChERS-UHPLC-MS/MS method

- [J]. *Molecules*, 2018, 23(8): 1926-1936.
- [26] Zeng Y, Ali M K, He W, et al. Chemical constituents of functional food *Amomum villosum* to combat human diseases [J]. *Current Chinese Science*, 2022, 2(1): 57-67.
- [27] Harmoko H, Kartasasmita R E, Munawar H, et al. Determination of histamine in different compositions of commercially canned fish in Indonesia by modified QuEChERS and LC-MS/MS [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, 105(11): 113-121.
- [28] Hu J, Liang M, Xian Y, et al. Development and validation of a multianalyte method for quantification of aflatoxins and bongkrelic acid in rice and noodle products using PRiME-UHPLC-MS/MS method [J]. *Food Chemistry*, 2022, 395(6): 298-306.
- [29] 张建伟,孟蕾,吴志明,等.牛奶中兽药残留检测前处理技术研究进展[J].*食品安全质量检测学报*,2021,12(22):145-151.
- [30] 汪春明,乐粉鹏,赵鑫,等.QuEChERS-同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中灭蝇胺残留[J].*食品科技*, 2022,47(5):309-316.
- [31] Zhao J, Pu J, Wu X, et al. Evaluation of the matrix effect of pH value and sugar content on the analysis of pesticides in tropical fruits by UPLC-MS/MS [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 168(6): 122-131.
- [32] 覃冬杰,张鹏,钟文俊,等. QuEChERS-LC-MS/MS 法同时测定陈香露白露片中 10 种真菌毒素[J].*中成药*,2022,44(7): 2282-2285.
- [33] 梁振纲,徐志伟,孟茹,等.高效液相色谱-串联质谱法测定食用槟榔中 4 种黄曲霉毒素的含量[J].*理化检验(化学分册)*, 2018,54(10):1153-1157.
- [34] 姜涛,赵琳,兰静,等.QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定玉米中的 17 种真菌毒素[J].*黑龙江农业科学*,2019, 305(11):106-115.
- [35] 高瑞英,梁美琼,张显策,等.药材中黄曲霉毒素的免疫亲和层析净化高效液相色谱法[J].*环境与健康杂志*,2010,27(1):66-69.
- [36] 陈红,程再兴,唐吉鹤.闽产砂仁中黄曲霉毒素 B1 的含量测定及限量制定[J].*时珍国医国药*,2011,22(8):1879-1880.