

多组分免疫亲和柱净化 – 高效液相色谱 串联质谱法同步测定植物油中 7 种真菌毒素

朱建国^{1,3,4,5}, 李培武^{1,2,3,4,5*}, 张 奇^{1,2,3,4}, 张 文^{1,3,4,5},
张兆威^{1,3,4}, 杨青青^{1,3,4}, 王秀嫔^{1,3,5}, 王素君^{1,5}

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉, 430062; 2. 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062;
3. 农业部生物毒素检测重点实验室, 湖北 武汉, 430062; 4. 农业部油料产品质量安全风险评估实验室, 湖北 武汉, 430062;
5. 农业部油料及制品质量监督检验测试中心, 湖北 武汉, 430062)

摘要:为提高植物油中真菌毒素的检测效率, 研制免疫亲和柱, 建立检测方法。以纯化的抗黄曲霉毒素(AFT, 包括 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)、抗玉米赤霉烯酮毒素(ZEA)、抗 T-2 毒素、抗伏马 B₁ 毒素(FB₁) 的四种单克隆抗体为特异性抓捕元件, 通过研究比较 3 种载体材料和 2 种抗体偶联方法, 成功制备出以 CNBr-activated Crystarose 4B 作为固相载体材料的真菌毒素多组分免疫亲和柱。同时研究比较了提取溶剂、提取方式和上样缓冲液等条件, 并结合高效液相色谱串联质谱技术(HPLC-MS/MS), 建立了植物油中 7 种真菌毒素的同步免疫亲和净化——HPLC-MS/MS 检测方法。结果表明, 该方法对 7 种真菌毒素的检测线性范围宽, 线性回归方程相关系数(R²) 均不低于 0.992; 对 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 四种真菌毒素的检出限为 0.02 ~ 0.08 μg/kg, 对 ZEA、T-2、FB₁ 三种真菌毒素的检出限为 0.10 ~ 0.50 μg/kg; 添加回收实验中, 低、中、高三个不同加标水平下的平均回收率为 80.22% ~ 106.10%, 相对标准偏差为 1.05% ~ 6.56%。该方法操作简便、净化彻底、回收率高、有机溶剂消耗量少, 为食用植物油中真菌毒素多组分同步确证性检测提供了一种高效、准确、灵敏的技术。

关键词: 真菌毒素; 多组分免疫亲和柱; 高效液相色谱串联质谱; 同步检测; 植物油

中图分类号: TS201.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2016)05-0658-08

Simultaneous determination of 7 major mycotoxins in vegetable oil by HPLC-MS/MS with multi-component immunoaffinity column

ZHU Jian-guo^{1,3,4,5}, LI Pei-wu^{1,2,3,4,5*}, ZHANG Qi^{1,2,3,4}, ZHANG Wen^{1,3,4,5},
ZHANG Zhao-wei^{1,3,4}, YANG Qing-qing^{1,3,4}, WANG Xiu-pin^{1,3,5}, WANG Su-jun^{1,5}

(1. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China;
2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China;
3. Key Laboratory of Detection for Mycotoxins, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China;
4. Laboratory of Risk Assessment for Oilseeds Products (Wuhan), Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China;
5. Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract: A multi-component immunoaffinity column (MIAC) were prepared by covalently coupling four high specific monoclonal antibodies, such as anti-aflatoxin (AFT, including AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂), anti-zearalennone toxin (ZEA), anti-T-2 toxin and anti-fumonisin B₁ toxin (FB₁), with CNBr-activated Crystarose 4B, after the investigation of three carriers and two coupling methods. In addition, with the optimization of extraction solvent, extraction method and loading condition, a method of high performance liquid chromatography

收稿日期: 2016-01-05
基金项目: 国家农产品质量安全风险评估重大项目 (GJFP2014006); 湖北省科技支撑重点项目 (2014BBB017); 农业行业科技专项 (201203037)
作者简介: 朱建国 (1989-), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事农产品质量标准与检测技术研究, E-mail: zhujianguo2016@163.com
* 通讯作者: 李培武 (1961-), 男, 山东成武人, 二级研究员, 博士, 博士生导师, 研究农产品质量标准与检测技术, E-mail: peiwuli@oilcrops.cn

tandem mass spectrometry (HPLC - MS/MS) combined with self - made MIAC was established for simultaneous and quantitative determination of these 7 major mycotoxins in vegetable oil. The linear ranges of regression equation were wider and the correlation coefficients were not less than 0.992. The limits of detection to AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were 0.02 - 0.08 μg/kg and ZEA, T - 2 and FB₁ were 0.10 - 0.50 μg/kg respectively. The recoveries of these 7 mycotoxins in spiked vegetable oil samples were in the range of 80.22% - 106.10% with the relative standard deviation of 1.05% - 6.56%. The method had the advantages of simple operation, effective purification, high recovery rate and less organic solvent consumption, which provided an efficient, accurate and sensitive technique of multi - component determination for mycotoxins in edible vegetable oil.

Key words: Mycotoxins; Multicomponent immunoaffinity column (MIAC); HPLC - MS/MS; Simultaneous detection; Vegetable oil

我国是世界油料作物种植大国,也是食用植物油消费大国,花生、菜籽、大豆、玉米、芝麻、棉籽等是我国最主要的食用植物油资源^[1]。然而,这些油料产品在田间生产、收获、储藏和运输各环节中极易受到黄曲霉毒素(AFT,包括 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)、玉米赤霉烯酮毒素(ZEA)、T - 2 毒素、伏马 B₁ 毒素(FB₁)^[2~5]等多种真菌毒素的污染,经过加工进而会污染植物油等副产品,严重影响我国油料产品的品质和消费安全。因此,研究建立植物油中多种真菌毒素的同步检测技术对于保障我国食用植物油质量安全具有重要意义,也是当前多组分检测技术研究的热点和难点。

目前用于油料产品中真菌毒素的检测方法主要有薄层层析色谱法(TLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱 - 串联质谱法(HPLC - MS/MS)^[6,7]等。其中,TLC 法操作设备简单、易于普及,但方法灵敏度和重现性较差,且实验过程中需要消耗大量毒性较强的有机溶剂,目前已很少使用。ELISA 法简便快捷,但是受基质干扰影响较大,检测结果容易出现假阳性误判。HPLC 方法稳定可靠、灵敏度较高,但通常仅适用于检测同一类的毒素,不能实现多种不同类别真菌毒素的同步检测^[8,9]。HPLC - MS/MS 法则根据目标物的保留时间和结构特征来实现多组分化合物的准确度和定量分析,灵敏度高、重现性好,适用于多种真菌毒素的同步检测^[10,11]。

另外,植物油样品成分复杂多样,基质中高含量的油脂通常会对真菌毒素的分析检测产生严重干扰,甚至还会对检测仪器产生损害,给多组分分析造成更大困难^[12]。因此,建立植物油中多种真菌毒素的同步检测技术,不仅需要高通量和高灵敏的仪器检测方法,还需要建立与之匹配的样品前处理技术^[13],有效地消除基质干扰,确保分析结果的准确可靠。免疫亲和柱净化(IAC)是基于抗原抗体特异

性免疫反应原理的净化技术,选择性强、净化处理彻底、大大提高了方法的灵敏度和准确性,且操作步骤简便快捷^[14,15],是目前应用最为广泛的真菌毒素前处理净化技术^[16,17]。而现有的免疫亲和柱大多只针对一种或一类真菌毒素^[18],对同一样品进行多组分分析时,需要使用多种免疫亲和柱分别重复净化,耗时繁琐,无法满足真菌毒素多组分混合污染同步测定的需求。

本文试制了针对 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、ZEA、T - 2、FB₁ 七种真菌毒素的多组分免疫亲和柱(MIAC),利用其高特异亲和性对复杂的植物油样品基质进行净化处理,将多种真菌毒素的提取、净化、浓缩富集一次完成,高度简化了前处理过程,并借助 HPLC - MS/MS 检测,实现了对植物油中七种真菌毒素的同步分析检测,大大提高了检测效率。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄曲霉毒素(AFT,包括 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)、玉米赤霉烯酮毒素(ZEA)、T - 2 毒素、伏马 B₁ 毒素(FB₁),均购自 Sigma 公司,其抗体均由本实验室自制;聚丙烯酰胺硅胶微球(粒径 200 - 300 μm),由武汉大学研制;CNBr - Activated Crystarose 4B:武汉晶诚生物科技有限公司;CNBr - Activated SepharoseTM 4B:GE Healthcare 公司;碳二亚胺(EDC):ACROS 公司;三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)和乙酸铵(CH₃COONH₄):国药集团化学试剂有限公司;甲酸(纯度 ≥ 95%):Sigma - Aldrich 公司;甲醇、乙腈:安徽时联特种溶剂股份有限公司。

1.2 仪器与设备

电子分析天平(德国 Sartorius 公司),循环控温搅拌反应装置(Amersham Pharmacia 公司),BCD - 198 冰箱(德国 Siemens 公司),涡旋振荡器(意大利

VELP 公司),恒温振荡器(天津欧诺仪器仪表有限公司),玻璃砂漏斗(上海垒固仪器有限公司),塑料巴氏吸管(泰州为尔康医用品有限公司),Mili-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司),UV500 紫外分光光度计(美国 Thermo 公司),一次性注射器(武汉王冠医疗器械有限责任公司),CT6E 台式离心机(日本 HITACHI 公司),6 孔泵流架(中检维康公司),微量移液器(德国 Eppendorf 公司),TSQ Quantum Ultra EMR 高效液相色谱-三重四级杆串联质谱联用仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 方法

1.3.1 溶液的配制 真菌毒素标准品溶液配制:将 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、ZEA、T-2 毒素固体标准品用甲醇溶解,并稀释为 10μg/mL 的标准储备液;将 FB₁ 毒素用甲醇配制成 100μg/mL 的标准储备液。根据实验需要将上述标准储备液配制成七种真菌毒素的混合标准品溶液,用于添加回收实验和制备标准溶液系列,4℃ 条件下避光保存。

磷酸盐缓冲液 PBS (0.01mol/L, pH7.4) 的配制:准确称取 24.0g NaCl、8.7g NaHPO₄、0.6g KH₂PO₄ 和 0.6g KCl,用 3L 超纯水溶解,然后调节至 pH7.4。

1.3.2 MIAC 的制备 准确称取辛酸硫酸铵法纯化制备的抗黄曲霉毒素(AFT,包括 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)抗体、抗玉米赤霉烯酮毒素(ZEA)抗体、抗 T-2 毒素抗体各 4.0mg,抗伏马 B₁ 毒素(FB₁)抗体 8.0mg。选择适宜的固相载体材料与抗体混合物偶联,取偶联前后的上清液适量,测定其在紫外光 280nm 波长下的吸光度值,按照公式(1)计算载体材料对抗体的偶联率^[14],并评价偶联效果。

偶联率(%) = (偶联前抗体总量 - 未偶联抗体量)/偶联前抗体总量 × 100 %

(1)

取容积为 1mL 的柱管,将已偶联好的载体抗体复合物采用湿法装柱至填料体积为 0.2mL。将含有过量多种真菌毒素的混合标准品溶液(AFB₁ 300ng, AFB₂ 300ng, AFG₁ 300ng, AFG₂ 300ng, ZEA 500ng, T-2 500ng, FB₁ 2 000ng)用 PBS 溶液适当稀释后通过免疫亲和柱,经过淋洗、洗脱后,检测洗脱液中各真菌毒素含量。试验重复 5 次,以确定每种真菌毒素的柱容量,并评价多组分免疫亲和柱的性能。柱容量的评定参照动态柱容量^[14,19,20]评定方法:

柱容量(ng/mL gel) = [分析物浓度(ng/mL) × 体积(mL)]/柱床体积(mL)

(2)

1.3.3 样品提取、净化及测定 称取 5.0g 植物油样品于 50mL 离心管中,加入 25mL 80% 甲醇水溶液(V/V)和 2mL 石油醚充分混匀,摇床振荡提取 20min,然后在 6 000r/min 条件下离心 10min,收集上层清液备用。用 10mL PBS 溶液将制备的多组分免疫亲和柱进行预淋洗活化,取 2mL 样品提取液用 8mL PBS 溶液稀释,然后将稀释液通过已活化的免疫亲和柱进行富集净化,流速 2mL/min;待液体全部流出后,再用 10mL PBS 溶液以 3~4mL/min 的流速淋洗免疫亲和柱去除非特异性吸附的干扰杂质,最后再用 1mL 甲醇洗脱,收集洗脱液供 HPLC/MS/MS 测定。

1.4 HPLC-MS/MS 条件

1.4.1 色谱条件 Thermo Hypersil GOLD (C18)反向色谱柱(100mm × 2.1mm, 3μm),柱温 20℃,流速:0.2mL/min,进样量:10μL,流动相为(A)甲醇和(B)0.1% 甲酸水溶液(V/V,含 5mmol/L CH₃COONH₄),采用梯度洗脱程序(表 1)。

表 1 流动相梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

流动相 Mobile phase	时间 Time/min									
	0.00	1.00	3.00	4.50	6.50	7.00	10.00	13.00	13.10	16.00
甲醇 Methanol (A)/%	10	10	20	50	50	55	100	100	10	10
0.1% 甲酸 0.1% methanoic acid aqueous solution (B)/%	90	90	80	50	50	45	0	0	90	90

表 2 7 种真菌毒素的监测离子对、碰撞能量和离子化方式
Table 2 Qualitative and quantitative ion pair, collision energy and ionization mode of seven major mycotoxins

真菌毒素 Mycotoxin	母离子/子离子 Precursor ion/product ion		碰撞能量 Collision energy/eV		离子化方式 Ionization mode
AFB ₁	313/285 *	313/241.1	35	35	ESI ⁺
AFB ₂	315/287.1 *	315/259.1	26	26	ESI ⁺
AFG ₁	329/243 *	329/283	22	24	ESI ⁺
AFG ₂	331/245.1 *	331/217.1	24	26	ESI ⁺
ZEA	317/130.8 *	317/175.9	30	20	ESI ⁻
T-2	484/245.2 *	484/387.3	30	25	ESI ⁺
FB ₁	722/334.4 *	722/352.3	26	20	ESI ⁺

注/Note: * 定量离子 * Quantitative ion

1.4.2 质谱条件 离子源:电喷雾电离源(ESI),离子源温度:330℃,毛细管电压:4.0kV(ESI⁺)、3.0kV(ESI⁻),去溶剂气温度:300℃,去溶剂气流速:10mL/min,质谱扫描方式:多反应监测(MRM),各真菌毒素的扫描方式、监测离子对(*m/z*)和其他参数见表2。

2 结果与分析

2.1 多组分免疫亲和柱的制备

2.1.1 固相载体材料的选择 由于制备 MIAC 需要偶联多种不同的抗体,抗体的数量和种类增加势必会影响载体材料对抗体的偶联效果。因此,MIAC 制备时对固相载体材料的选择往往需要更高的要求。本实验考查了三种载体材料(聚丙烯酰胺硅胶微球、CNBr-Activated Crystarose 4B 和 CNBr-Activated SepharoseTM 4B)分别与抗体混合溶液的偶联效果。实验结果显示,最佳偶联条件下,聚丙烯酰胺硅胶微球对抗体的偶联率为 53.12%,CNBr-Activated Crystarose 4B 和 CNBr-Activated SepharoseTM 4B 的偶联率分别为 91.85% 和 93.53%,后两者偶

联效果明显优于前者,而后两者之间差异不显著。另外,由于使用 CNBr-Activated Crystarose 4B 作载体材料时,操作步骤简单易行,试剂用量少,且材料成本较低,因此,选择 CNBr-Activated Crystarose 4B 作为 MIAC 制备的最佳载体。

2.1.2 偶联方法的优化 偶联方法是影响免疫亲和柱性能的重要因素。本研究选择两种偶联方法进行单克隆抗体与载体材料偶联,即混合单抗同步偶联和各单抗单独偶联后按比例混匀,然后采用湿法装柱制得多组分免疫亲和柱,将含有过量真菌毒素的混合标准品溶液通过免疫亲和柱检测评价,比较两种偶联方法对柱容量的影响,结果见表3。由测定结果可知,同样实验条件下,两种偶联方法对各真菌毒素的柱容量影响差异不明显,且混合偶联时柱容量略有增加。这可能是混合偶联条件下,各同类单抗在反应体系中相对分散,空间位阻影响减少^[19],有利于对目标物的捕获。为提高实验效率,选择将四种单抗混合后与 CNBr-Activated Crystarose 4B 同步偶联作为最佳的偶联方式。

表3 抗体偶联方式对柱容量的影响
Table 3 Effects of the coupling method on the column capacity

偶联方法 Coupling method	柱容量 Column capacity/(ng/mL) (相对标准偏差 RSD/%)						
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	ZEA	T-2	FB ₁
混合偶联 Mixed coupling	1012.8 (5.26)	705.3 (6.95)	753.7 (4.38)	719.1 (4.77)	887.7 (4.79)	774.4 (3.97)	2514.0 (1.69)
单独偶联 Separate coupling	993.4 (4.73)	793.5 (6.80)	718.9 (4.27)	711.5 (5.88)	810.6 (5.29)	782.5 (6.63)	2353.5 (2.11)

注:表格中柱容量数值为5次测量重复平均值
Note: Values of the column capacity were mean of five repeat measurements

2.2 样品前处理方法优化

从实际样品中提取真菌毒素时,样品基质通常会影响真菌毒素的提取,而提取效率的高低对于检测方法的准确性影响很大。因此,选择合适的提取溶剂、提取方式和净化条件有利于提高方法的准确性和灵敏度。

2.2.1 提取溶剂的选择 真菌毒素提取时,一般选用毒性小、极性大、价格低廉的溶剂,常用的提取溶剂包括甲醇、乙腈、丙酮和水等一种或多种不同比例的混合物^[21]。选用70%、80%、90%、100%甲醇水溶液和70%、80%、90%、100%乙腈水溶液共8种作为提取溶剂,比较提取效率,如图1。结果显示,各真菌毒素在不同提取溶剂中回收率存在显著差异,80%甲醇水溶液作为提取溶剂时,回收率在86.58%~114.96%之间,提取效率最高,变异系数小于5.17%,重复性良好。

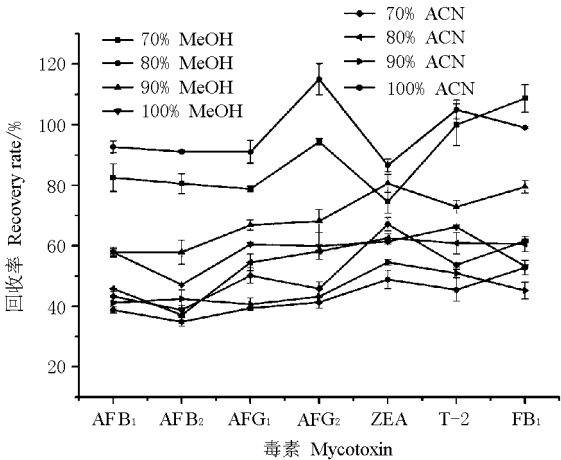


图1 样品提取溶剂的优化
Fig.1 Optimization of extraction solvent for sample preparation

2.2.2 提取方式的优化 实际样品中真菌毒素提取时,提取方式同样是影响提取效率的重要因素之一。已报道的真菌毒素的提取方式有摇床振荡提

取^[22]、超声波提取^[23]、高速均质提取^[24]等。本实验比较了高速均质提取 5min、涡旋提取 10min、超声提取 20min 和摇床振荡 20min 四种提取方式下的提取效率,如图 2。从图中可以看出,使用摇床振荡提取 20min 作为提取方式时,对七种真菌毒素提取效率最高,回收率为 76.21% ~ 112.59%,相对标准偏差为 1.97% ~ 4.22%,稳定性最好。

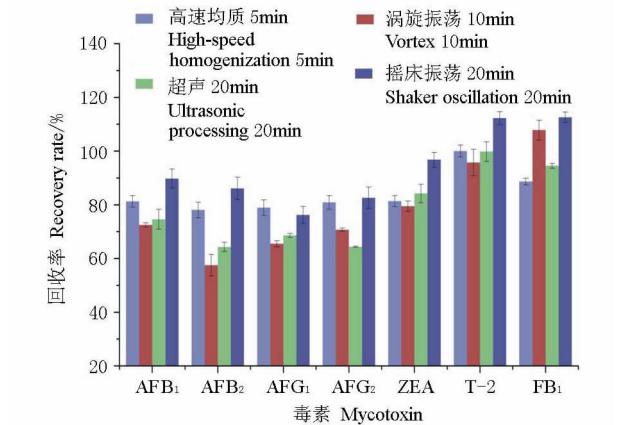


图 2 样品提取方式的优化
Fig. 2 Optimization of extraction method for sample preparation

2.2.3 上样缓冲条件的优化 样品经提取后,提取液中有有机溶剂浓度较高。由于特异性抗体对有机溶剂有一定的耐受性,因此,提取液需要适当稀释后才能通过免疫亲和柱净化。本实验将样品提取液用 PBS 水溶液按一定比例稀释,稀释后有机溶剂比例分别为 5%、10%、20% 和 30%,比较不同有机溶剂浓度条件下通过免疫亲和柱对各真菌毒素回收率的影响,如图 3。从图中可以看出,当上样缓冲体系中有有机溶剂浓度低于 20% 时,各真菌毒素回收率随有机溶剂浓度增加而升高;当有机溶剂浓度达到 20% 时,各真菌毒素回收率最高;有机溶剂浓度继续增加,各毒素回收率反而降低。可能原因是,有机溶剂浓度较低时,真菌毒素溶解度下降,易在缓冲体系中

分散不均,导致亲和柱中的特异性抗体不能将目标物完全捕获,而有机溶剂浓度过高则使得部分抗体失活而降低了免疫亲和柱的柱效能^[25]。

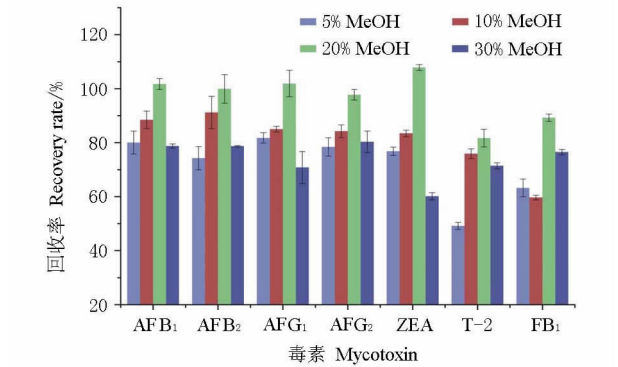


图 3 上样缓冲条件的优化
Fig. 3 Optimization of loading condition

2.3 方法的线性范围、标准曲线、检出限及定量限 将一系列浓度梯度的七种真菌毒素混合标准溶液进行液相色谱串联质谱分析,以各真菌毒素的质量浓度为横坐标,相对应的峰面积为纵坐标,进行回归分析,得到线性回归方程和相关系数;以植物油空白样品为基质,向其中添加一定量的七种真菌毒素混合标准溶液,经优化条件提取净化处理后,用液相色谱串联质谱仪测定。根据信噪比 S/N = 3 的峰响应值对应的加标浓度,确定方法的检出限 (LOD)^[26];根据信噪比 S/N = 10 的峰响应值对应的加标浓度,确定方法的定量限 (LOQ) (表 4)。由测定结果可知,各真菌毒素标准曲线的线性相关系数均不低于 0.992,线性关系良好。本研究建立的方法对 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 四种真菌毒素的检出限为 0.02 ~ 0.08 μg/kg,对 ZEA、T-2、FB₁ 三种真菌毒素的检出限为 0.10 ~ 0.50 μg/kg,远低于国家标准和欧盟所规定的最大限量标准^[27]。7 种真菌毒素标准品溶液多反应监测扫描模式 (MRM) 下色谱图见图 4。

表 4 7 种真菌毒素的线性方程、线性范围、相关系数、检出限和定量限

毒素 Mycotoxin	线性方程 Linear equation	线性范围 Linear range/(μg/kg)	相关系数 R ²	检出限 LOD/(μg/kg)	定量限 LOQ/(μg/kg)
AFB ₁	Y = 17 048X + 9 900	0.07 ~ 40	0.992	0.02	0.07
AFB ₂	Y = 2 970X + 118.7	0.27 ~ 40	0.994	0.08	0.27
AFG ₁	Y = 5 066X - 139.7	0.27 ~ 40	0.998	0.08	0.27
AFG ₂	Y = 7 631X - 2 987	0.20 ~ 40	0.993	0.06	0.20
ZEA	Y = 1 520X - 1 166	0.33 ~ 120	0.995	0.10	0.33
T-2	Y = 4 257X - 3 395	0.83 ~ 200	0.999	0.25	0.83
FB ₁	Y = 1 640X - 2 414	1.67 ~ 2 000	0.995	0.50	1.67

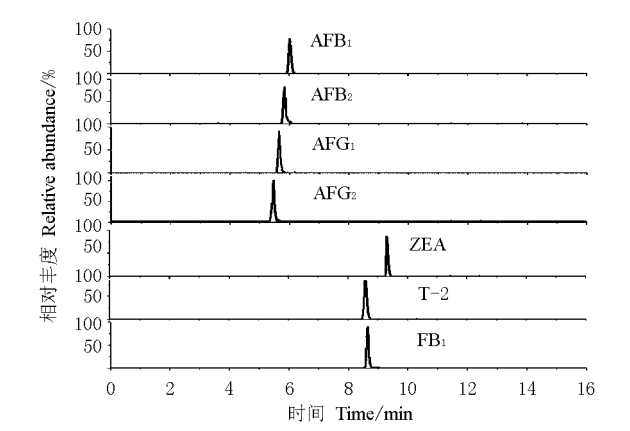


图 4 7 种真菌毒素多反应监测色谱图
Fig.4 Multiple reaction monitoring (MRM)
chromatograms of 7 mycotoxins

表 5 植物油样品中 7 种真菌毒素的加标回收率测定
Table 5 Recovery of spiked vegetable oil for 7 mycotoxins

毒素 Mycotoxin	添加水平 Added/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测量值 Measurement/($\mu\text{g}/\text{kg}$)					平均回收率 Average recovery rate/%	相对标准偏差 RSD/%
AFB ₁	2	1.97	2.13	2.21	1.91	2.07	102.90	5.86
	5	4.61	4.93	4.77	4.57	4.86	94.96	3.28
	10	9.18	9.53	10.12	9.21	9.64	95.36	4.01
AFB ₂	2	1.87	2.04	1.96	1.79	2.11	97.70	6.56
	5	4.57	4.68	4.77	4.46	4.83	93.24	3.21
	10	9.21	9.07	9.33	9.15	9.47	92.46	1.70
AFG ₁	2	1.94	1.76	1.82	1.71	1.92	91.50	5.44
	5	4.42	4.18	4.37	4.27	4.53	87.08	3.10
	10	8.47	8.33	8.52	8.29	8.57	84.36	1.44
AFG ₂	2	2.26	2.17	1.96	2.08	2.14	106.10	5.25
	5	4.69	4.84	4.97	4.75	4.92	96.68	2.40
	10	9.25	9.38	9.13	9.46	9.27	92.98	1.36
ZEA	5	4.87	4.63	4.56	4.74	4.69	93.96	2.50
	10	8.43	8.96	8.77	8.58	8.94	87.36	2.63
	20	17.91	18.24	18.35	18.11	18.37	90.98	1.05
T-2	5	4.38	4.52	4.44	4.31	4.58	88.92	2.42
	20	18.70	18.22	19.05	19.13	18.47	93.57	2.05
	40	32.77	33.51	34.24	33.26	34.17	93.98	1.85
FB ₁	10	8.04	7.86	8.37	8.24	7.96	80.94	2.57
	50	41.39	42.56	40.78	41.69	42.28	83.48	1.70
	200	148.45	161.48	170.47	158.44	163.37	80.22	5.01

表 6 本方法与已报道文献方法比较
Table 6 Comprison of detection results obtained by this method and reported literature methods

分析物 Analyte	前处理方法 Pretreatment	检测技术 Determination	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Recovery/%	RSD/%	文献 Ref.
AFTs (B ₁ 、B ₂ 、G ₁ 、G ₂)	凝胶渗透色谱 (GPC)	HPLC - FLD	1.0 ~ 2.0	82.6 ~ 98.4	4.97 ~ 9.79	[28]
AFTs (B ₁ 、B ₂ 、G ₁ 、G ₂)	QuEChERS	UPLC - MS/MS	0.2 ~ 0.3	84.3 ~ 103.2	2.9 ~ 7.6	[29]
AFTs、ZEA、DON、PAT 等 9 种	多功能净化柱 (Mycosep113、226、228)	HPLC - FLD HPLC - DAD	0.01 ~ 40	80.0 ~ 101.5	1.3 ~ 5.6	[30]
AFB ₁	免疫亲和柱 (IAC)	HPLC - FLD	0.3	90.5 ~ 99.8	6.3 ~ 9.8	[31]
AFTs (B ₁ 、B ₂ 、G ₁ 、G ₂)	免疫亲和柱 (IAC)	HPLC - FLD	0.03 ~ 0.12	84 ~ 92	3.4 ~ 10.2	[32]
T-2、HT-2、DON、ZEA	免疫亲和柱 (IAC)	LC - MS/MS	0.03 ~ 0.33	78 ~ 109	0.8 ~ 6.1	[26]
AFTs、ZEA、T-2、FB ₁ 等 7 种	多组分免疫亲和柱 (MIAC)	HPLC - MS/MS	0.02 ~ 0.50	80.22 ~ 106.10	1.05 ~ 6.56	本方法 This method

2.5 实际样品检测

从本地超市和农贸市场抽取共 40 份植物油样品(花生油、玉米油、大豆油和菜籽油各 10 份)进行七种真菌毒素的含量分析,有 7 份样品中检出真菌毒素,检出的 7 份阳性样品中均含有黄曲霉毒素 B₁(AFB₁),含量范围为 2.3 ~ 15.2 μg/kg;1 份玉米油阳性样品中同时还检出玉米赤霉烯酮毒素(ZEA)和伏马毒素 B₁(FB₁),含量分别为 33.5 μg/kg 和 65.7 μg/kg;黄曲霉毒素 B₂、G₁、G₂ 和 T-2 毒素未检出。检测结果显示,玉米油和花生油中真菌毒素检出率较高,但均未超过国家规定的限量标准。

3 结论

本研究选择稳定性好、偶联率高、非特异性吸附少且价格相对低廉的 CNBr-Activated Crystarose 4B 作为固相载体材料,结合本实验室自制的多种高特异性和灵敏度的单克隆抗体,成功制备了可以同时净化 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、ZEA、T-2、FB₁ 七种真菌毒素的多组分免疫亲和柱,并建立了同步检测植物油中七种真菌毒素的高效液相色谱串联质谱检测方法。与已报道文献食用植物油及油料中真菌毒素的检测方法进行比对研究,结果表明,本方法检测通量高,可以实现多种不同类别真菌毒素的同步处理和检测,大大提高了检测效率(表 6);灵敏度和回收率高,净化效果好,分析性能明显改善,完全可以满足复杂样品基质中多种真菌毒素的同步定量检测需求,为确保我国食用植物油质量安全提供了关键的技术支撑。

参考文献:

[1] 徐雪高,曹 慧,刘 宏. 中国油料作物及食用植物油供需现状与未来发展趋势分析[J]. 农业展望,2013(11):9-15.

[2] 褚庆华,郭德华,王 敏,等. 油料和食用油中真菌毒素快速测定方法的研究[J]. 中国粮油学报,2006,21(2):114-120.

[3] 吴振兴,鲍 蕾,吕 宁,等. 植物油中多种真菌毒素的液相色谱-串联质谱检测方法建立及污染调查分析[J]. 分析测试学报,2012,31(增刊):106-110.

[4] 静 平,宋琳琳,鲍 蕾,等. 植物油中真菌毒素污染的防控[J]. 食品安全质量检测学报,2014(12):3 843-3 847.

[5] Wang Y, Xiao C, Guo J, et al. Development and application of a method for the analysis of 9 mycotoxins in maize by HPLC-MS/MS[J]. J Food Sci,2013,78(11): 1 752-1 756.

[6] Gordon S S. Determination of mycotoxins in human foods[J]. Chem Soc Rev,2008,37(11):2 468-2 477.

[7] Turner N W, Subrahmanyam S, Piletsky S A, et al. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review[J]. Anal Chim Acta,2009,632(2):168-180.

[8] Javed I, Muhammad A A, Aftab A, et al. Aflatoxins contamination in Pakistani brown rice: a comparison of TLC, HPLC, LC-MS/MS and ELISA techniques[J]. Toxicol Mech Method,2014,24(8):544-551.

[9] Hassanshahian M, Mohamadi H, Abbaspour H. Comparisons of different methods for detection of aflatoxin in grain and grain products[J]. Acta Horticulturae,2012,963(963):275-280.

[10] 宫小明,任一平,董 静,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定花生、粮油中 18 种真菌毒素[J]. 分析测试学报,2011,30(1):6-12.

[11] García-Moraleja A, Font G, Mañes J, et al. Development of a new method for the simultaneous determination of 21 mycotoxins in coffee beverages by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Food Res Int, 2015,72:247-255.

[12] Li N, Wang Z, Zhang L, et al. Liquid-phase extraction coupled with metal-organic frameworks-based dispersive solid phase extraction of herbicides in peanuts[J]. Talanta,2014,128:345-353.

[13] 余 乐,霍光华,符金华. 莱克多巴胺、沙丁胺醇与克伦特罗三合一免疫亲和柱的制备及应用[J]. 分析测试学报,2014,33(6):693-697.

[14] 韦林洪,刘曙照,邵秀金,等. 绿磺隆克百威三唑磷多抗体免疫亲和色谱技术研究[J]. 农业环境科学学报,2009,28(10):2 211-2 216.

[15] Chuang J C, Emon J M V, Jones R, et al. Development and application of immunoaffinity column chromatography for atrazine in complex sample media[J]. Anal Chim Acta,2007,583(1):32-39.

[16] 肖付刚,赵晓联,汤 坚,等. 免疫亲和层析及其在真菌毒素检测中应用[J]. 粮食与油脂,2007(8):40-43.

[17] 袁 艺,陆廷瑾,沈腾腾,等. 免疫亲和柱的制备及在真菌毒素检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技,2013,34(24):396-400.

[18] 肖志军,李培武,张 文,等. 粮油黄曲霉毒素 B₁ 高效快速检测微柱的研制[J]. 中国油料作物学报, 2006,28(3):335-341.

[19] 李 存,石玉祥,江海洋,等. 同时偶联两种抗体的免疫亲和色谱柱的制备[C]. 中国畜牧兽医学学会家畜内科学分会 2009 年学术研讨会. 2009.

[20] Davis G C, Hein M B, Chapman D A. Evaluation of immunosorbents for the analysis of small molecules. Iso-

- lation and purification of cytokinins[J]. J Chromatogr, 1986,366(5):171-189.
- [21] 傅 勇,曹纪亮,杨小丽,等. 真菌毒素检测的前处理技术及其应用[J]. 中国卫生检验杂志,2012(6):1 462-1 466.
- [22] Romagnoli B, Ferrari M, Bergamini C. Simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxins in breakfast cereals and baby food by high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry[J]. J Mass Spectrom,2010,45(9):1 075-1 080.
- [23] 孙秀兰,张银志. 应用超声波法提取大米中黄曲霉毒素 B₁[J]. 中国卫生检验杂志,2007(5):828-829.
- [24] 李 军,于一茫,田 苗,等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A[J]. 色谱,2006,24(6):581-584.
- [25] Wang Y, Zhang Q, Li P, et al. Selective sample clean-up by immunoaffinity chromatography for determination of fenvalerate in vegetables[J]. J Chromatogr B,2011,879(30):3 531-3 537.
- [26] Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, et al. Determination of Fusarium mycotoxins by liquid chromatography/tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity extraction[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2010,24(16):2 445-2 452.
- [27] 苏福荣,王松雪,孙 辉,等. 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析[J]. 粮油食品科技,2007,15(6):57-59.
- [28] 杨红梅,王 浩,郭启雷,等. 凝胶渗透色谱-高效液相色谱法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂[J]. 食品科技,2013(12):325-328.
- [29] 程盛华,杨春亮,曾绍东,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定植物油中黄曲霉毒素[J]. 化学试剂,2015,37(10):897-902.
- [30] 刘 柱,陈万勤,沈潇冰,等. 多功能柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测玉米和花生中 9 种真菌毒素[J]. 分析科学学报,2014,30(2):168-172.
- [31] 周贻兵,刘利亚,李 磊,等. 免疫亲和柱净化-光化学衍生高效液相色谱荧光法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的含量[J]. 中国油脂,2014(6):92-94.
- [32] Bao L, Trucksess M W, White K D. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in olive oil, peanut oil, and sesame oil[J]. J Aoac Int,2010,93(3):936-942.

(责任编辑:肖唐华)