

基于复合萃取技术-超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法同时测定谷物及其制品中10种真菌毒素

冯婷婷, 魏旭东, 郑仕剑, 朱 帅, 张水锋*

(浙江方圆检测集团股份有限公司, 杭州 310018)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem with triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时测定谷物及其制品中的10种真菌毒素的检测方法。**方法** 以0.1%甲酸-80%乙腈水为提取溶剂, 经过涡旋、振荡提取后, 加入 Supel QuE z-sep+ 作为净化剂进行初级净化, 离心后的上清液过 PRiME HLB 固相萃取柱二次净化, 经 UPLC-MS/MS 测定, 质谱采用多反应监测模式定性, 基质匹配标准溶液外标法定量。**结果** 10种真菌毒素在谷物中的检出限为 0.10~10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.35~20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在玉米、花生、大米3种谷物基质中的回收率为 73.2%~98.1%, 相对标准偏差为 1.3%~9.3%。**结论** 该方法的灵敏度满足国家标准对真菌毒素的限量要求, 实验操作简便快速, 成本较低, 定性定量分析可靠, 适合谷物中真菌毒素的多组分高通量快速分析测定。

关键词: 分散固相萃取; 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法; 真菌毒素; 谷物

Simultaneous determination of 10 kinds of mycotoxins in grain and grain products based on composite extraction technology coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem with triple quadrupole mass spectrometry

FENG Ting-Ting, WEI Xu-Dong, ZHENG Shi-Jian, ZHU Shuai, ZHANG Shui-Feng*

(Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 10 kinds of mycotoxins in grain and grain products based on composite extraction technology coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem with triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** Using 0.1% formic acid-80% acetonitrile water as extraction solvent, after vortex and oscillation extraction, Supel QuE z-sep+ was added as purifying agent for primary purification, and the supernatant after centrifugation was purified by PRiME HLB solid phase extraction column for the second time, and was determined by UPLC-MS/MS. The mass spectrometry was characterized by multiple reaction monitoring mode and quantified by matrix matching standard solution external

基金项目: 浙江省市场监管局科研计划项目(ZC2021A040)

Fund: Supported by the Science and Technology Program Projects of Zhejiang Provincial Market Supervision Bureau (ZC2021A040)

*通信作者: 张水锋, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全色谱、质谱技术联用分析检测。E-mail: authorfy@163.com

*Corresponding author: ZHANG Shui-Feng, Ph.D, Senior Engineer, Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., No.300, Xiasha Road, Qiantang District, Hangzhou 310018, China. E-mail: authorfy@163.com

standard method. **Results** The limits of detection of 10 kinds of mycotoxins in cereals were 0.10–10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limits of quantitative were 0.35–20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recoveries in corn, peanut and rice were 73.2%–98.1%, and the relative standard deviations were 1.3%–9.3%. **Conclusion** The sensitivity of this method meets the limit requirements of national standards for mycotoxins. The experimental operation is simple and rapid, the cost is low, the qualitative and quantitative analysis is reliable, and it is suitable for multi-component high-throughput rapid analysis and determination of mycotoxins in cereals.

KEY WORDS: dispersed solid phase extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem with triple quadrupole mass spectrometry; mycotoxins; grain

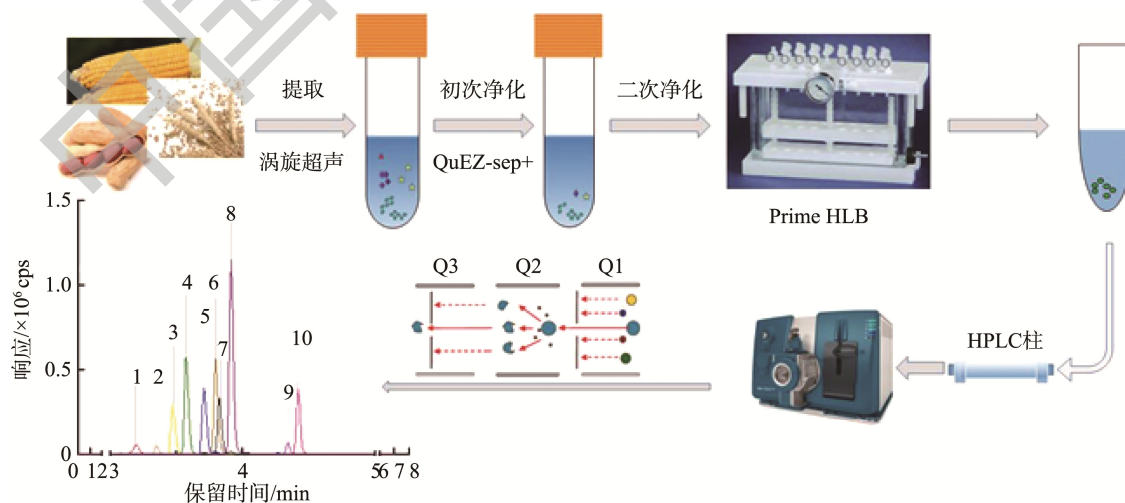
0 引言

真菌毒素是一类由曲霉菌、镰刀菌等产毒真菌生长产生的代谢产物,具有较强的生物毒性,可致癌、致畸、致突变^[1-2]。在全球范围内,每年约有 25% 的农产品受到不同程度的真菌毒素污染,特别是我国的主要粮食作物——大米、玉米、小麦^[3-4]。谷物在收获、储存、加工、运输等环节容易受到多种毒素的侵害,从而产生协同毒性作用^[5-9]。据文献^[10-14]统计,水稻中受污染程度最高的真菌毒素为黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)和玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN),这都与高温高湿的环境密不可分;玉米作为我国最大产量的粮食作物,受到伏马毒素 (fumonisin, FB)、ZEN、黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)等影响较为严重,其中大部分作为饲料及加工制品,依旧存在着向人类传递的可能性;花生是我国最大的粮油来源之一,其受潮、霉变、质变都很容易产生 AFT,加强花生中真菌毒素的检测,能有效保障我国粮油资源的安全,减少原料的浪费。

预防和控制粮食真菌毒素污染是保障食品安全的主要内容^[15-16],因此,迫切需要建立针对谷物及其制品中真菌毒素多组分、高通量的快速检测技术。目前常用的

真菌毒素检测方法包括免疫吸附法^[17-19]、色谱法^[20-22]、高效液相色谱-串联质谱法^[23-25]等。免疫吸附法利用抗原和抗体的特异性结合来识别真菌毒素,该方法操作简单,但是一次只能识别一种真菌毒素,效率低且价格昂贵,不适合大批量的多种真菌毒素的同时检测;色谱法通常用于对不同极性物质的分离,但是对于真菌毒素的检测需要结合其他技术,例如荧光、紫外检测等,适用范围较小;高效液相色谱-串联质谱法是目前最常用的检测方法,通过液相色谱将化合物分离,再经过质谱定性定量,准确度高灵敏度好,能高效地应用于多种真菌毒素的同时检测。

现有真菌毒素提取方法,大多数是在提取溶液提取后需要盐析分层,取有机相层净化,操作步骤相对复杂。本研究直接在提取后加入分散固相萃取剂,利用填料吸附提取溶液中的杂质,并且结合“直通型”固相萃取小柱 PRiME HLB,从而达到进行双重净化除杂的目的,在此基础上,建立超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem with triple quadrupole mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时测定谷物及其制品中 10 种真菌毒素的多组分、高通量的快速检测方法(过程图如图 1 所示),为实现对谷物中毒素更为全面的筛查提供技术支撑。



注: 1. DON; 2. FB₁; 3. FB₂; 4. AFM₁; 5. AFG₂; 6. AFG₁; 7. AFB₂; 8. AFB₁; 9. OTA; 10. ZEN。

图 1 复合萃取技术-UPLC-MS/MS 详细实验过程

Fig.1 Detailed experimental procedures of combined extraction technique-UPLC-MS/MS

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

样品来源公司抽检样品, 主要抽检产地为浙江省各地市县农贸市场、超市。

黄曲霉毒素 M₁ [(aflatoxin M₁, AFM₁), 纯度 99.8%]、黄曲霉毒素 B₁ (纯度 99.0%)、黄曲霉毒素 B₂ [(aflatoxin B₂, AFB₂), 纯度 99.5%]、黄曲霉毒素 G₁ [(aflatoxin G₁, AFG₁), 纯度 99.5%]、黄曲霉毒素 G₂ [(aflatoxin G₂, AFG₂), 纯度 98.5%](北京振翔科技有限公司); 伏马毒素 B₁ [(fumonisin B₁, FB₁), 纯度 98.4%]、伏马毒素 B₂ [(fumonisin B₂, FB₂), 纯度 99.1%]、赭曲霉毒素 A (ochratoxin, OTA)、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌稀醇(纯度 98.3%)(坛墨质检科技股份有限公司); 乙腈、甲醇(色谱纯, 德国 Meker 公司); 乙酸铵[色谱纯, 阿拉丁试剂(上海)有限公司]; 甲酸(色谱纯, 上海麦克林生化科技有限公司); Supel Que Z-sep+净化粉(美国 Supelco 公司); N-丙基乙二胺(N-propyl ethylenediamine adsorbent, PSA)、Florisil 填料(80~100 目)(杭州飞山浩科技有限公司); 石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB, 120~400 目)、十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈)(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.2 仪器设备

Agilent 1290/5500 Qtrap 型超高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(美国 SCIEX 公司); JY10002 电子天平(精度 0.01 g, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司); VORTEX GENIUS3 涡旋混合器(德国 IKA 公司); HY-2A 调速振荡器(江苏金坛荣华有限公司); Milli-Q Integral 超纯水仪(美国 Millipore 公司); ST16R 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); wat200606 固相萃取装置、固相萃取柱 Oasis PRiME HLB、固相萃取柱 Oasis HLB、固相萃取柱 Oasis PRiME MCX (3 cc/60 mg)、Waters ACOUITYUPLC[®]HSST3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司); DFY-300D 手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司); 0.22 μm 有机滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

根据各毒素在质谱中的响应情况不同, 将 10 种毒素分为 A、B、C 3 组, 具体分组情况见表 1。准确移取 A 组标准储备液, 用甲醇稀释配成 50.0 μg/L 的混合标准中间液; 准确移取 B 组标准储备液, 用甲醇稀释配成 200.0 μg/L 的混合标准中间液; 准确移取 C 组标准储备液, 用甲醇稀释配成 1000.0 μg/L 的标准中间液。各标准中间液低于-18℃避光保存。

精密吸取 A、B、C 3 组标准中间液适量, 用空白基质溶液配制成混合系列基质标准溶液, 其中 A 组系列质量浓度分别为 0.25、0.50、1.00、5.00、10.00、25.00 μg/L, B 组

系列质量浓度分别为 1、2、4、20、40、100 μg/L, C 组系列质量浓度分别为 5、10、20、100、200、500 μg/L。

1.3.2 样品前处理

谷物样品粉碎备用。称取粉碎过的试样 1 g(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚乙烯离心管中, 精确加入 10.00 mL 80%乙腈水(含 0.1%甲酸)提取液, 涡旋混匀 30 s, 振荡提取 20 min, 加入 0.50 g Supel QuE z-sep+净化粉, 涡旋混匀 1 min, 于 8000 r/min 离心 5 min, 移取 0.5 mL 上清液于 PRiME HLB 小柱中, 弃去, 除去柱子内的杂质并创造一定的溶剂环境, 再移取 1 mL 上清液于 PRiME HLB 小柱中, 以 1 滴/s 的速度过柱并接收, 经 0.22 μm 有机系滤膜过滤, 待进样。

1.3.3 空白基质溶液的制备

选取不含上述 10 种真菌毒素的样品, 按照 1.3.2 前处理步骤操作, 得到空白基质溶液。

1.4 仪器工作条件

1.4.1 液相色谱条件

色谱柱: Waters ACOUITYUPLC[®]HSST3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: A 为乙腈, B 为 0.1%甲酸水溶液; 流速: 0.3 mL/min; 柱温 30℃; 进样量 5 μL; 梯度洗脱条件: 0~1.0 min, 10% A; 1.0~2.0 min, 10%~55% A; 2.0~2.5 min, 55% A; 2.5~3.0 min, 55%~90% A; 3.0~5.5 min, 90% A; 5.5~6.0 min, 90%~10% A; 6.0~7.0 min, 10% A。

1.4.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 电喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 550℃; 碰撞气压力: 41.3 kPa (6 Psi); 气帘气压力: 206.8 kPa (30 Psi); 雾化气压力: 413.7 kPa (60 Psi); 辅助加热气压力: 413.7 kPa (60 Psi)。

监测离子对、定量离子、去簇电压、碰撞电压、碰撞能量见表 1。

2 结果与分析

2.1 提取溶剂的优化

通常真菌毒素分析中最常用的 2 种提取溶剂为乙腈和甲醇^[26], 因真菌毒素的结构各不相同, 致使其亲水性和亲脂性各有差异, 且根据文献及标准相关研究^[27], 在提取试剂中加入适量水和酸, 可以提高提取效率和改善部分峰型, 因此, 本研究分别考察了 0.1%甲酸-甲醇、0.1%甲酸-乙腈、0.1%甲酸-30%乙腈水、0.1%甲酸-50%乙腈水、0.1%甲酸-80%乙腈水作为提取溶剂进行实验分析, 结果见图 2。甲醇和乙腈在提取回收率方面差异不是很大, 乙腈提取溶剂回收率略高一点。当乙腈或甲醇浓度增加时, 大部分分析物随着有机相浓度提高而回收率提高, 而伏马毒素、呕吐毒素、赭曲霉毒素这类因含有羧基基团导致亲水性较强的真菌毒素回收率约为 50%~65%, 但提取试剂中水含

表 1 10 种真菌毒素的质谱参数
Table 1 Mass spectrum parameters of 10 kinds of mycotoxins

组别	化合物	母离子 Q1 (m/z)	子离子 Q3 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV	离子源
A	AFM ₁	328.3	273.2*	180	34	ESI+
			259.3	180	34	
	AFB ₁	313.3	285.1*	220	29	ESI+
			241.0	220	48	
	AFB ₂	315.4	287.0*	40	34	ESI+
			259.1	40	37	
	AFG ₁	329.3	243.3*	180	39	ESI+
			311.4	180	28	
	AFG ₂	331.3	313.2*	40	29	ESI+
			245.2	40	36	
B	FB ₁	722.5	352.4*	40	47	ESI+
			334.4	40	51	
	FB ₂	706.6	336.5*	80	50	ESI+
			354.5	80	43	
	ZEN	319.5	283.2*	120	17	ESI+
			187.1	120	24	
	OTA	404.3	239.3*	40	27	ESI+
			221.0	40	38	
C	DON	297.3	249.3*	40	14	ESI+
			231.2	40	17	

注: *定量离子对。

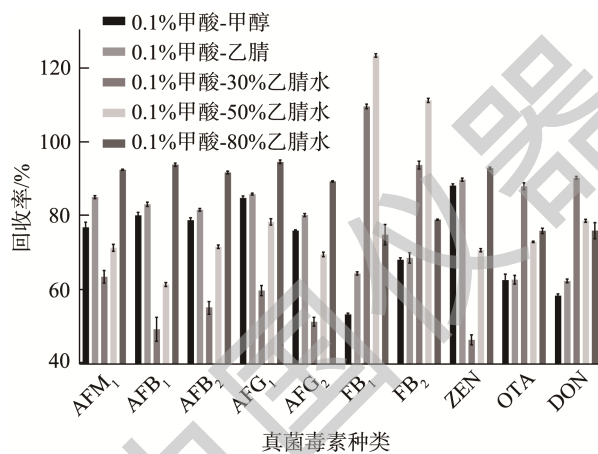


图 2 不同提取溶剂的加标回收率

Fig.2 Recoveries of different extraction solvents

量提高后, 各种杂质如色素、矿物质、氨基酸等也随之提取出来, 使得部分亲脂性毒素的质谱信号受到离子抑制效应影响而降低回收率。综合考虑, 选择 0.1%甲酸-80%乙腈水作为本研究的提取溶液。

2.2 净化过程的优化

2.2.1 分散萃取剂的选择

考察了 Supel QuE z-sep+净化粉、C₁₈、PSA、GCB、Florisol 5 种分散固相萃取剂对 10 种真菌毒素的净化效果比较。据文献报道^[28-31], C₁₈ 可以吸附基质中的非极性物质, 去除基质中的脂肪和糖类成分, PSA 可以去除基质中的有

机酸等物质, Florisol 可以吸附基质中的极性化合物, 但吸附色素效果不佳, GCB 对具有平面分子结构的化合物有显著的吸附效果, 可以吸附色素, 同时又吸附了 ZEN 等具有平面结构的目标物。通过在空白玉米粉基质中加标实验, 分别采用 5 种分散固相萃取剂净化, 实验结果见图 3, 其中, PSA 净化后 FB₂ 回收率只有 23%、GCB 净化后 ZEN 和 OTA 基本未检出, 而 Florisol 和 C₁₈ 净化后大多数真菌毒素回收率偏低, 集中在 50%~76%左右。Supel QuE z-sep+净化粉是在硅胶表面双重键合了氧化锆和 C₁₈ 的新型填料, 其中氧化锆可以保留脂肪和类固醇, C₁₈ 可以保留疏水杂质, 因

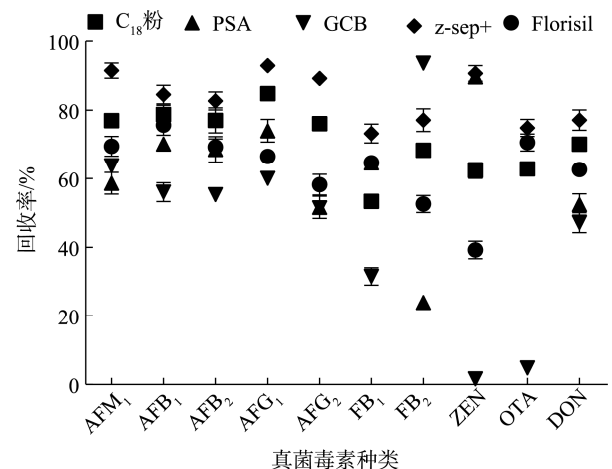


图 3 不同分散萃取剂的加标回收率

Fig.3 Recoveries of different dispersion extractants

此,有效吸附了谷物提取溶液中的杂质,且对目标物影响不大。综上所述,选择 Supel QuE z-sep+净化粉作为本研究的净化吸附剂。

2.2.2 固相萃取柱的选择

基于谷物种类众多,某些谷物中磷脂、脂肪、色素、蛋白质等杂质含量较高,本研究采用了二次净化,选取 HLB、PRiME HLB、PRiME MCX 3 种固相萃取小柱进行实验分析。HLB 柱为反相萃取柱,所以要将提取液中的有机相进行处理(旋蒸或水相稀释)后才能过柱,还需要活化、淋洗、洗脱等多步骤操作,导致了某些毒素的重复性较差,因此选择了“直通型”固相萃取柱。对比 PRiME HLB 和 PRiME MCX 小柱,PRiME MCX 小柱更适用于碱性化合物,而大多数真菌毒素偏酸性^[32],像 ZEN、OTA 这类对酸碱性较为敏感的毒素,在通过 PRiME MCX 小柱后,回收率偏低。且通过实验研究发现,特别是在含磷脂、油脂较多的花生基质中,过净化小柱和不过净化小柱的实验结果显示,过柱后的毒素响应得到了一定程度的提高,因此,本研究选择了 PRiME HLB 作为净化小柱。

2.3 仪器条件的优化

2.3.1 质谱条件优化

配制 10 种真菌毒素的混合标准溶液,在正离子扫描模式下,将标准溶液用独立针泵以 7 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速注入质谱,在电喷雾离子源下,进行一级母离子全扫描,比较正、负离子模式下的响应,选择合适的模式,优化质谱毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量、去簇电压、雾化气、气帘气,检测得到具有最强响应的定量离子和定性离子对,详情见表 1。

2.3.2 流动相的选择

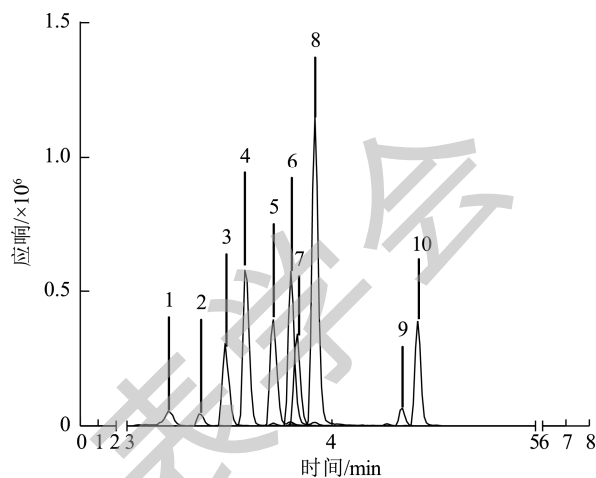
在优化质谱参数的基础上进行液相方法的优化,分别比较了 5 mmol/L 乙酸铵溶液和 0.1% 甲酸水溶液作为水相,以及乙腈和甲醇作为有机相,开展流动相优化实验。经过对比发现以 0.1% 甲酸水作为水相、乙腈作为有机相进行梯度洗脱,可以将 10 种真菌毒素进行有效的分离,且色谱峰峰型良好。10 种真菌毒素在 ESI+ 模式下的 MRM 色谱图见图 4。

2.4 方法学验证

2.4.1 基质效应

基质效应是指被测物以外的成分对分析及结果的准确性有显著的干扰和影响。基质效应(signal suppression enhancement, SSE)表现为离子抑制或离子增强,通过计算基质标准工作曲线与溶剂标准工作曲线的斜率百分比来定义抑制或增强^[33-35]。当 $\text{SSE} > 120\%$ 时,为离子增强效应;当 $\text{SSE} < 80\%$ 时,为离子抑制效应;当 SSE 介于 80%~120% 之间,则基质效应不明显。本研究按照 1.3 节配制空白基质标准工作液和直接用 0.1% 甲酸-80% 乙腈水配制标准工作

液,依次检测并评估玉米、花生、大米 3 种基质的基质效应,结果见表 2。结果显示,3 种谷物基质中 10 种真菌毒素的 SSE 值在 35.4%~256.3% 之间,说明每种毒素在不同基质中有一定的离子抑制或增强效应。因此,为了补偿基质效应,本研究采用空白基质匹配标准溶液校正方法进行目标物的定量分析和计算。



注: 1. DON; 2. FB₁; 3. FB₂; 4. AFM₁; 5. AFG₁; 6. AFG₁; 7. AFB₂; 8. AFB₁; 9. OTA; 10. ZEN。

图 4 10 种真菌毒素在 ESI+ 模式下的 MRM 色谱图
Fig.4 MRM chromatograms of 10 kinds of mycotoxins in ESI+ mode

2.4.2 线性范围及定量限

根据 1.3.1 节方法配制 10 种真菌毒素混合标准系列溶液,以各目标物定量离子的仪器响应峰面积(Y)对各目标物质量浓度(X, $\mu\text{g}/\text{L}$)绘制线性回归校正曲线。各化合物的线性范围如表 2 所示,相关系数均大于 0.99。选取空白玉米粉基质,添加 10 种真菌毒素混合标准溶液,按照 1.3.2 前处理方法处理,以 $S/N=3$ 确定各目标化合物的检出限(limit of detection, LOD),以 $S/N=10$ 确定各目标化合物的定量限(limit of quantitation, LOQ)。结果表明,10 种真菌毒素的 LOD 为 0.10~10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 为 0.35~20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$,方法的灵敏度完全满足国家标准对真菌毒素的限量要求。

2.4.3 回收率和精密度

选取花生、大米、玉米 3 类空白样品在低、中、高 3 种浓度水平进行 6 次平行加标回收实验,计算测定结果的相对标准偏差(relative standard deviations, RSD),结果见表 3。结果表明,10 种真菌毒素在这 3 类样品中的平均回收率为 73.2%~98.1%,相对标准偏差为 1.3%~9.3%,该方法准确性高,稳定性好,符合 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》实验室质量控制范围要求。

表 2 10 种真菌毒素的线性回归方程、相关系数、检出限和定量限

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation of 10 kinds of mycotoxins

化合物	线性范围/(μg/L)	相关系数(<i>r</i>)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)	线性回归方程	SSE/%		
						玉米	花生	大米
AFM ₁	0.25~25.00	0.9989	0.20	0.60	$Y=1.29246e^4X-8568.46781$	95.8	92.3	96.1
AFB ₁	0.25~25.00	0.9924	0.20	0.60	$Y=2.60107e^5X-5565.08412$	77.3	82.1	95.4
AFB ₂	0.25~25.00	0.9926	0.25	1.00	$Y=7.97845e^4X+3865.54891$	74.2	67.4	92.5
AFG ₁	0.25~25.00	0.9912	0.10	0.35	$Y=1.29024e^5X-6682.30687$	80.6	86.8	85.7
AFG ₂	0.25~25.00	0.9957	0.25	1.00	$Y=9.13210e^4X+3309.07361$	67.9	80.4	78.9
FB ₁	1~100	0.9950	1.50	5.00	$Y=10095.34844X-855.7963$	256.3	223.3	161.3
FB ₂	1~100	0.9966	1.50	5.00	$Y=6.97407e^4X-5068.53955$	198.5	179.8	175.5
ZEN	1~100	0.9947	1.50	5.00	$Y=7.77022e^4X-2833.38958$	82.5	87.7	87.5
OTA	1~100	0.9920	1.00	3.50	$Y=16070.8517X-1039.9731$	97.7	91.2	93.5
DON	5~500	0.9976	10.00	20.00	$Y=19969.38973X-1212.259$	35.4	50.7	78.2

表 3 真菌毒素在样品中的加标回收率和 RSDs (*n*=6)

Table 3 Recoveries and RSDs of mycotoxins (*n*=6)

真菌毒素	加标水平/(μg/kg)	玉米		大米		花生	
		平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%	平均回收率/%	RSDs/%
AFM ₁	0.5	90.1	1.3	95.3	2.1	81.2	2.1
	1.0	91.3	2.1	94.3	1.4	85.6	5.5
	5.0	97.0	1.7	94.2	1.8	91.1	2.0
AFB ₁	0.5	86.2	5.8	87.5	3.8	84.2	3.6
	1.0	96.8	4.7	92.1	2.6	80.1	8.0
	5.0	91.7	2.2	98.1	1.7	89.0	4.6
AFB ₂	0.5	85.4	5.0	82.2	2.1	79.4	4.1
	1.0	94.5	1.8	83.0	4.5	80.3	3.6
	5.0	92.1	3.3	90.2	5.1	85.7	2.5
AFG ₁	0.5	90.9	3.6	84.6	4.3	90.3	2.0
	1.0	89.4	3.8	90.4	2.2	89.4	2.4
	5.0	93.3	2.4	95.2	1.8	88.5	5.8
AFG ₂	0.5	84.0	2.9	80.8	3.8	81.3	2.4
	1.0	83.6	2.7	87.0	4.2	87.4	3.3
	5.0	89.7	4.4	92.5	1.6	87.6	6.3
FB ₁	5.0	79.3	3.5	75.5	5.0	73.7	4.4
	10.0	81.3	3.0	75.2	7.8	78.6	3.0
	50.0	87.3	1.7	83.4	4.5	84.2	2.5
FB ₂	5.0	73.2	4.8	77.3	2.7	74.1	7.2
	10.0	81.3	2.2	80.3	3.3	79.5	6.6
	50.0	90.2	5.0	86.4	5.2	88.3	2.4
ZEN	5.0	90.4	3.7	83.5	2.8	82.1	5.6
	10.0	92.9	4.1	90.2	3.3	88.6	6.9
	50.0	95.7	2.2	96.7	1.7	83.6	3.3
OTA	5.0	77.4	7.9	84.2	6.0	83.3	9.3
	10.0	85.2	5.6	82.4	5.5	80.2	4.7
	50.0	80.1	4.9	89.6	2.7	84.6	6.2
DON	20.0	93.4	2.3	89.0	6.8	79.4	7.6
	40.0	93.4	2.6	82.2	3.6	89.4	6.5
	100.0	97.1	3.7	90.2	3.0	90.3	2.7

2.5 实际样品分析

实验室随机抽取了市面上玉米、大米、花生等样品各 30 批次,按照本研究方法进行前处理和分析测定,结果如表 4 所示,玉米样品主要受 DON、ZEN 和 AFB₁ 这 3 种真菌毒素污染,其中 1 批次样品的 DON、1 批次样品的 ZEN、2 批次样品的 AFB₁ 超过 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》对其的限量要求;花生

样品主要受 AFB₁ 的污染,且有 3 批次样品超标;大米样品虽然有真菌毒素检出,但含量普遍较低。污染情况的结果表明,本研究抽检的浙江省内谷物及其制品中存在不同程度的真菌毒素污染,且分布情况在不同谷物及其制品中存在差异。样品中污染的真菌毒素主要为 DON、ZEN 和 AFB₁,可能是由于浙江属于亚热带季风气候,在谷物储藏阶段容易受梅雨季节多雨潮湿影响,从而更易滋生多种真菌毒素。

表 4 玉米、花生、大米中 10 种真菌毒素的污染情况
Table 4 Contamination of 10 kinds of mycotoxins in corn, peanut and rice

真菌毒素	玉米				花生				大米			
	限量值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	污染率 /%	超标率 /%	最高检出值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	限量值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	污染率 /%	超标率 /%	最高检出值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	限量值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	污染率 /%	超标率 /%	最高检出值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
AFM ₁	-	-	-	-	-	3.33	-	0.23	-	-	-	-
AFB ₁	20	20.00	6.67	66.47	20	36.67	10.0	25.14	10	36.67	-	0.44
AFB ₂	-	13.33	-	0.36	-	6.67	-	2.42	-	-	-	-
AFG ₁	-	6.67	-	0.45	-	13.33	-	4.17	-	-	-	-
AFG ₂	-	-	-	-	-	3.33	-	0.39	-	-	-	-
FB ₁	-	26.67	-	50.19	-	-	-	-	-	13.33	-	1.57
FB ₂	-	3.33	-	12.72	-	-	-	-	-	-	-	-
ZEN	60	43.33	13.33	85.62	-	16.67	-	101.33	-	23.33	-	4.28
OTA	5.0	13.33	3.33	10.06	-	6.67	-	19.67	5.0	3.33	-	1.21
DON	1000	73.33	3.33	1570.12	-	10.00	-	556.28	-	-	-	-

注: -表示未限定。

3 结论

本研究开发了一种分散固相萃取剂和“直通型”固相萃取小柱的复合萃取技术,达到双重净化效果,结合 UPLC-MS/MS 进行检测,建立了谷物及其制品中真菌毒素的多组分、高通量的检测方法,并对实际谷物样品中真菌毒素的污染情况进行快速筛查和确证。方法灵敏度高、稳定性好,且操作简便,定性定量分析可靠。希望通过后续研究,扩大应用范围,囊括更多的真菌毒素以及其他生物毒素,用于政府大规模开展谷物及其制品中多种真菌毒素的快速风险筛查工作。

参考文献

- [1] KOUADIO JH. Risk assessment of mycotoxins intake through the consumption of maize, peanuts, rice and cassava in Cote D' Ivoire [J]. Food Nutr Sci, 2022, 13(1): 41–54.
- [2] NAVALE V, VAMKUDOTH KR, AJMERA S, et al. A spergillus derived mycotoxins in food and the environment: Prevalence, detection, and toxicity [J]. Toxicol Rep, 2021, 8(3): 1008–1030.
- [3] 李雅静, 秦曙, 杨艳梅, 等. 中国谷物真菌毒素污染研究现状[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(3): 186–194.

LI YJ, QIN S, YANG YM, et al. Current research status of mycotoxin contamination in grains in China [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 2020, 35(3): 186–194.

- [4] QIAO XT, LI G, ZHANG J, et al. Urinary analysis reveals high *Alternaria* mycotoxins exposure in the general population from Beijing, China [J]. J Environ Sci, 2022, 118(8): 122–129.
- [5] AYODEJI AO, TUMISI M, RHULANI M, et al. A review on novel non-thermal food processing techniques for mycotoxin reduction [J]. Int J Food Sci Technol, 2020, 56(1): 13–27.
- [6] 陈鑫璐, 邱月, 张建友, 等. 国内外谷物中多种真菌毒素限量和同步检测标准及方法研究进展[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(12): 194–202.
CHEN XL, QIU Y, ZHANG JY, et al. Domestic and foreign research progress on the limit standards and simultaneous detection standards and methods of multiple mycotoxins in grain [J]. J Chin Cereals Oils Ass, 2021, 36(12): 194–202.
- [7] KOS J, HAJNAL E J, MALACHOVA A, et al. Mycotoxins in maize harvested in republic of serbia in the period 2012–2015. Part 1: Regulated mycotoxins and its derivatives [J]. Food Chem, 2020, 312: 126034.1–126034.1.10.
- [8] PINHAO M, TAVARES AM, LOUREIRO S, et al. Combined cytotoxic and genotoxic effects of ochratoxin A and fumonisin B₁ in human kidney and liver cell models [J]. Toxicol In Vitro, 2020, 68: 104949.

- [9] ALONSO-GARRIDO M, FRANGIAMONE M, FONT G, *et al.* Effects of mycotoxins and carotenoids on the blood brain barrier oxidative stress and mitochondrial gene expression *in vitro* [J]. *Free Radical Biol Med*, 2021, 165(1): 49–57.
- [10] 王星, 杨新文, 费晨, 等. 粮食作物中主要真菌毒素及其检测方法的研究进展[J]. *贵州农业科学*, 2020, 48(8): 48–53.
WANG X, YANG XW, FEI C, *et al.* Research progress on major mycotoxins in food crops and their detection methods [J]. *Guizhou Agric Sci*, 2020, 48(8): 48–53.
- [11] HE BS, WANG K. A “signal off” aptasensor based on NiFe₂O₄ NTs and Au@ Pt NRs for the detection of deoxynivalenol via voltammetry [J]. *Microchim Acta*, 2021, 188(1): 1–9.
- [12] 吴锦涛, 李萌萌, 关二旗, 等. 四极杆-轨道阱液质联用法同时检测玉米中四种真菌毒素[J]. *食品与发酵工业*, 2022, 48(24): 245–251.
WU HT, LI MM, GUAN ERQ, *et al.* Simultaneous determination of four mycotoxins in maize by quadrupole-orbitrap LC-MS [J]. *Food Ferment Ind*, 2022, 48(24): 245–251.
- [13] 闫兆凤, 黄常刚, 杨欣, 等. 中国主粮中真菌毒素污染现状[J]. *卫生研究*, 2022, 51(4): 685–691.
YAN ZF, HUANG CG, YANG X, *et al.* Current status of mycotoxin contamination in staple foods in China [J]. *J Hyg Res*, 2022, 51(4): 685–691.
- [14] QIN X, SU X, TU T, *et al.* Enzymatic degradation of multiple major mycotoxins by dye-decolorizing peroxidase from *Bacillus subtilis* [J]. *Toxins*, 2021, 13(6): 1–9.
- [15] 陈瑞鹏, 孙云凤, 霍冰洋, 等. 真菌毒素多重检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2021, 42(17): 267–274.
CHEN RP, SUN YF, HUO BY, *et al.* Progress in multiple detection technologies for mycotoxins [J]. *Food Sci*, 2021, 42(17): 267–274.
- [16] 张新中, 丁辉, 彭涛, 等. 真菌毒素检测与限量标准的现状与问题分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(18): 6149–6156.
ZHANG XZ, DING H, PENG T, *et al.* Current situation and problems of mycotoxin detection and limitation standards [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(18): 6149–6156.
- [17] NAOMI M, ELAINE M, DAVE L. *et al.* Analysis of aflatoxins, fumonisins, deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenone, HT-2, and T-2 toxins in animal feed by LC-MS/MS using cleanup with a multi-antibody immunoaffinity column [J]. *J AOAC Int*, 2022, 35(3): 1–11.
- [18] 潘明飞, 李诗洁, 郭丹丹, 等. 间接竞争酶联免疫分析方法检测花生中黄曲霉 B₁[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(9): 255–261.
PAN MF, LI SJ, GUO DD, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanut by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2019, 19(9): 255–261.
- [19] DONG G, PAN Y, WANG Y, *et al.* Preparation of a broad-spectrum anti-zearalenone and its primary analogues antibody and its application in an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Chem*, 2018, 247: 8–15.
- [20] 李瑾, 李聪. 高效液相色谱快速测定玉米中黄曲霉毒素方法研究[J]. *中国食品*, 2021, (9): 59–60.
LI J, LI C. Study on the method of rapid determination of aflatoxin in maize by high performance liquid chromatography [J]. *China Food*, 2021, (9): 59–60.
- [21] 徐一达, 袁晓, 王海鸣, 等. 色谱法检测真菌毒素的研究进展[J]. *粮油食品科技*, 2018, (6): 54–61.
XU YD, YUAN X, WANG HO, *et al.* Research progress in detection of mycotoxins by chromatography [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2018, (6): 54–61.
- [22] IRAKU MN, SKENDI A, PAPAGEORGIOU MD. HPLC-DAD-FLD method for simultaneous determination of mycotoxins in wheat bran [J]. *J Chromatogr Sci*, 2017, 55(7): 690–696.
- [23] 徐子婷, 郝莉花, 马静, 等. QuEChERS-SPE-超高效液相色谱-串联质谱法测定调味制品中的 12 种真菌毒素[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(6): 311–319.
XU ZT, HAO LH, MA J, *et al.* Determination of 12 mycotoxins in seasoning flour products by QuEChERS-SPE-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2022, 43(6): 311–319.
- [24] 周春红, 彭文静. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱多反应监测模式测定葡萄酒中 41 种农药和 7 种真菌毒素残留[J]. *食品发酵与工业*, 2023, 49(4): 264–267.
ZHOU CH, PENG WJ. Determination of 41 pesticides and 7 mycotoxins in wine by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(4): 264–267.
- [25] ANDRADE PD, DANTAS RR, MOURA-ALVES TLSDS, *et al.* Determination of multi-mycotoxins in cereals and of total fumonisins in maize products using isotope labeled internal standard and liquid chromatography/tandem mass spectrometry with positive ionization [J]. *J Chromatogr A*, 2017, 1490: 138–147.
- [26] 李文廷, 梁志坚, 张瑞雨, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定谷物及其制品中 11 种真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3747–3755.
LI WT, LIANG ZJ, ZHANG RY, *et al.* Determination of 11 kinds of mycotoxins in grains and its products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(10): 3747–3755.
- [27] SHEPHARD GS, BERTHILLER F, BURDASPAL PA, *et al.* Developments in mycotoxin analysis: An update for 2011–2012 [J]. *World Mycotoxin*, 2013, 6: 3–30.
- [28] 赵英莲, 张梓琪, 赵鑫, 等. QuEChERS 技术在食品真菌毒素检测中的研究进展[J]. *中国酿造*, 2020, 39(1): 1–5.
ZHAO YL, ZHANG ZQ, ZHAO X, *et al.* Research progress on QuEChERS technology in the detection of mycotoxins in food [J]. *Chin Brew*, 2020, 39(1): 1–5.
- [29] 肖全伟, 吴文林, 刘玲利. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定小麦中的 8 种真菌毒素[J]. *四川农业大学学报*, 2018, 36(5): 584–591.

- XIAO QW, WU WL, LIU LL. Determination of eight mycotoxins in wheat by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 2018, 36(5): 584-591.
- [30] 汪薇, 余婷婷, 张莉, 等. QuEChERS 联合 UPLC-Orbitrap/MS 同时测定检测坚果和干制水果中 60 种真菌毒素[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(4): 707-714.
- WANG W, YU TT, ZHANG L, *et al.* Sixty mycotoxins in nuts and dried fruits simultaneously detected by QuEChERS combined with UPLC-Orbitrap/MS [J]. *Chin J Food Hyg*, 2022, 34(4): 707-714.
- [31] 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.
- ZENG Y, ZHANG M, CHEN Y, *et al.* Research progress on detection of mycotoxins in tea by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(12): 3834-3841.
- [32] ALASSANE-KPEMBI I, SCHATZAMYR G, TARANU I, *et al.* Mycotoxins contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies [J]. *Crit Rev Food Sci*, 2016, 57(16): 3489-3507.
- [33] 苏萌, 艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(2): 511-515.
- SU M, AI LF. Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(2): 511-515.
- [34] 王瑞国, 郭丽丽, 王培龙, 等. 杂质吸附型净化结合超高效液相色谱-串联质谱法同时测定谷物和动物饲料中 37 种霉菌毒素[J]. *色谱*, 2020, 38(7): 817-825.
- WANG RG, GUO LL, WANG PL, *et al.* Simultaneous determination of 37 mycotoxins in grain and animal feed by impurity adsorption purification coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, 38(7): 817-825.
- [35] 艾道迎, 郑奕柔, 黄展锐, 等. 湘派卤汁中 10 种真菌毒素液相色谱串联质谱法的建立与评价[J]. *食品与发酵工业*, 2023, 49(3): 306-313.
- AI DY, ZHENG YR, HUANG ZR, *et al.* Establishment and evaluation of LC-MS/MS method for ten mycotoxins in Xiangpai brine [J]. *Food Ferment Ind*, 2023, 49(3): 306-313.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介



冯婷婷, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: fxstar1107@163.com



张水锋, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全色谱、质谱技术联用分析检测。

E-mail: authorfy@163.com