

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定燕麦粉和小米粉中白僵菌素和恩镰孢菌素

邢 杨<sup>1</sup>, 牛宇敏<sup>1</sup>, 靳玉慎<sup>1</sup>, 李 会<sup>1</sup>, 徐 鑫<sup>1,2</sup>, 张 晶<sup>1\*</sup>

(1. 北京市疾病预防控制中心食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013;

2. 首都医科大学公共卫生学院, 北京 100069)

**摘要: 目的** 建立一种超高效液相色谱-串联质谱法测定谷物性食品燕麦粉和小米粉中白僵菌素 (beauvercin, BEA)、恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A<sub>1</sub>、恩镰孢菌素 B 和恩镰孢菌素 B<sub>1</sub> 残留的分析方法。**方法** 样品采用乙腈-水-甲酸(84:15:1, V:V:V)提取、经过 Oasis Prime HLB 固相萃取柱净化后, Waters BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 分离, 在正离子模式下, 以 5 mmol/L 乙酸铵水溶液-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 在多反应监测模式下进行定性定量检测分析, 基质匹配标准曲线外标法定量。**结果** BEA 和 4 种恩镰孢菌素在各自的线性范围内具有良好的线性关系 ( $r^2 > 0.999$ ), 方法检出限为 0.02~0.05 μg/kg, 定量限为 0.05~0.15 μg/kg。按线性范围的最低浓度、中浓度和最高浓度 3 个水平进行加标回收实验, 燕麦粉和小米粉的平均回收率分别是 83.6%~105.2% 和 88.5%~104.2%, 相对标准偏差分别为 1.3%~8.2% 和 1.3%~3.2% ( $n=6$ )。对北京市采集的 10 份燕麦粉和 10 份小米粉样品进行检测, 5 种化合物均有不同程度检出, 其中, 恩镰孢菌素 B 和恩镰孢菌素 B<sub>1</sub> 的检出率为 100%。**结论** 本方法简单快速、准确性好、灵敏度高, 可以实现对燕麦粉和小米粉中白僵菌素和恩镰孢菌素进行准确的定性定量。

**关键词:** 超高效液相色谱-串联质谱法; 白僵菌素; 恩镰孢菌素; 小米粉; 燕麦粉

## Determination of beauvercin and enniatins in oat flours and millet flours by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XING Yang<sup>1</sup>, NIU Yu-Min<sup>1</sup>, JIN Yu-Shen<sup>1</sup>, LI Hui<sup>1</sup>, XU Xin<sup>1,2</sup>, ZHANG Jing<sup>1\*</sup>

(1. Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China; 2. School of Public Health, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish an ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of beauvercin (BEA), enniatin A, enniatin A<sub>1</sub>, enniatin B and enniatin B<sub>1</sub> in cereal food oat flour and millet flour. **Methods** The sample was extracted by acetonitrile-water-formic acid (84:15:1, V:V:V), purified by Oasis Prime HLB solid phase extraction column, and separated by Waters BEH C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm). In positive ion mode, gradient elution was carried out with 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution-acetonitrile as mobile phase, qualitative and quantitative detection and analysis were carried out in multiple

基金项目: 高层次公共卫生技术人才培养计划项目(学科骨干-01-033)

Fund: Supported by the High-level Public Health Technical Talent Training Program Project (backbones in subjects-01-033)

\*通信作者: 张晶, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品检测。E-mail: brightjing@163.com

\*Corresponding author: ZHANG Jing, Ph.D, Professor, Beijing Center for Disease Control and Prevention, No.16, Hepingli Middle Street, Dongcheng District, Beijing 100013, China. E-mail: brightjing@163.com

reaction monitoring mode, and the matrix matching standard curve external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The results showed good linearity ( $r^2 > 0.999$ ) in the respective linear ranges of BEA and 4 kinds of enniatins, with the limits of detection of 0.02–0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and the limits of quantification of 0.05–0.15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The accuracy of the method was evaluated by conducting a recovery test at 3 spiked levels: The lowest, middle and highest concentrations of the linear ranges. The average recoveries for oat flours and millet flours were 83.6%–105.2% and 88.5%–104.2%, respectively, with the relative standard deviations of 1.3%–8.2% and 1.3%–3.2% ( $n=6$ ). The 5 kinds of compounds were detected in different degrees in 10 samples of oat flour and 10 samples of millet flour collected in Beijing, among which, the detection rates of enniatin B and enniatin B<sub>1</sub> were 100%. **Conclusion** The method is quick, easy, accurate and sensitive, which is suitable for the accurate qualitative and quantitative determination of beauvericin and enniatins in oat flour and wheat flour.

**KEY WORDS:** ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; beauvericin; enniatin; millet flour; oat flour

## 0 引言

白僵菌素(beauvericin, BEA)和恩镰孢菌素是一类新兴的霉菌毒素,主要由镰刀菌属产生<sup>[1]</sup>,是谷物和谷物制品的天然污染物<sup>[2]</sup>,会降低谷物产量<sup>[3]</sup>。它们是由3个N-甲基氨基酸和3个羟甲基氨基酸交替脱水缩合组成的六酯环缩肽<sup>[4]</sup>。已鉴定的恩镰孢菌素有29种分子<sup>[5]</sup>,其中最受人关注的是恩镰孢菌素A(enniatin A, ENA)、恩镰孢菌素A<sub>1</sub>(enniatin A<sub>1</sub>, ENA<sub>1</sub>)、恩镰孢菌素B(enniatin B, ENB)和恩镰孢菌素B<sub>1</sub>(enniatin B<sub>1</sub>, ENB<sub>1</sub>)<sup>[6]</sup>。白僵菌素和恩镰孢菌素具有细胞毒性,会降低细胞活力、促进细胞周期停滞、增加细胞凋亡和活性氧的生成<sup>[7–10]</sup>。它们虽然暂时未列入限量标准<sup>[11]</sup>,但其潜在危害不容忽视,需要更多关于检测与毒性的研究<sup>[12]</sup>。一旦受污染的粮食和饲料等作物进入食物链被人或动物食用,将对人身健康产生影响<sup>[13]</sup>。因此,这些霉菌毒素对动物和人类健康的影响日益受到关注。

目前,在欧美等国家的谷物及其制品、植物油、蔬菜、坚果、香料和生牛乳等样品中已检测到白僵菌素和恩镰孢菌素<sup>[14–16]</sup>。此外,在猪、家禽及人体血液样品中检测到的前5种常见霉菌毒素就包括白僵菌素和恩镰孢菌素<sup>[17–19]</sup>。可见,此类镰刀菌毒素的污染普遍存在。目前欧盟对于新兴及隐蔽性毒素监测已经开展了多年风险监测评估。为了解此类真菌毒素在我国食品中的污染状况,我国食品安全风险评估中心开展了白僵菌素和恩镰孢菌素的相关研究,对我国部分省市的小麦、玉米和食用植物油中白僵菌素和恩镰孢菌素的污染水平进行了监测<sup>[20–22]</sup>。随着我国居民生活水平的提高,人们更加注意饮食健康,喜欢吃膳食纤维含量高的粗粮代替传统的精粮,如小米、燕麦等。谷物粉现在越来越流行,它们可以添加在各类食品中,比如面包、饼干等,人们也喜欢冲调谷物粉剂。这类制品在长期存放过程中极易被污染,了解新兴毒素在燕麦粉和小米粉的污染情况,对评估我国居民的健康水平有重要意义。

真菌毒素检测常用方法有酶联免疫法<sup>[23]</sup>、薄层色谱法<sup>[24]</sup>、近红外光谱法<sup>[25]</sup>、气相色谱-质谱法<sup>[26]</sup>、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[27–28]</sup>等。其中LC-MS/MS由于选择性和灵敏度高,已成为检测白僵菌素和恩镰孢菌素最常用的方法。但我国目前谷物研究中主要以玉米和小麦等传统谷物为主,而燕麦粉和小米粉两类谷物制品正逐渐成为餐桌上主要的谷物来源,关于燕麦粉和小米粉两类毒素的检测方法研究较少。本研究拟采用超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)建立白僵菌素和恩镰孢菌素的测定方法,同时对北京市市售燕麦粉和小米粉进行检测,以了解这类真菌毒素在北京市此类谷物制品中的污染情况,为进一步开展白僵菌素和恩镰孢菌素对我国居民健康影响的评估提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

燕麦粉和小米粉,购自北京各超市。

BEA标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ENA标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ENA<sub>1</sub>标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ENB标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、ENB<sub>1</sub>标准溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )(加拿大TRC公司/天津阿尔塔科技有限公司); Oasis PRiME HLB固相萃取柱(200 mg/6 mL, 美国Waters公司); 甲醇、乙腈(质谱级,迪马科技有限公司); 甲酸(色谱级,纯度>99%,美国Acros公司); 甲酸铵、乙酸铵(质谱级,美国Thermo Fisher Scientific公司); 实验用水由Milli-Q超纯水净化处理系统制备。

### 1.2 仪器与设备

ACQUITYTM超高效液相色谱仪-Xevo®TQ-XS串联质谱仪、Waters ACQUITYUPLC BEH C<sub>18</sub>柱(100 mm×2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )(美国Waters公司); Allegra X-30R Centrifuge冷冻离心机(美国Beckman公司); Vortex-Genie 2涡旋振荡器(美国Scientific Industries公司); Milli-Q超纯水

器(美国 Millipore 公司); Mettler Toledo XPE 105 电子天平(精度 0.01 mg, 瑞士梅特勒-托利多集团)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 溶液的配制

分别准确吸取 100  $\mu\text{g/mL}$  BEA、ENA、 $\text{ENA}_1$ 、ENB、 $\text{ENB}_1$  标准储备液 0.1 mL, 用乙腈定容至 10 mL, 配制成 1  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准溶液,  $-20^\circ\text{C}$  密封保存。

#### 1.3.2 样品前处理

准确称取 5 g(精确至 0.01 g)样品于 50 mL 聚丙烯离心管中, 加入 20.0 mL 乙腈-乙酸-水混合液(84:1:15, V:V:V), 涡旋 30 s, 180 r/min 振荡提取 30 min 后, 8 000 r/min 离心 5 min。准确移取 10 mL 上清液于另一 50 mL 离心管, 加入 20 mL 超纯水, 混合均匀, 待净化。

将 5 mL 待上样的稀释液加入到 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱。以 5 mL 40%乙腈-水溶液作为淋洗液, 然后用 2 mL 乙腈洗脱(分两次洗脱, 每次用 1 mL), 用 15 mL 聚丙烯离心管收集全部的洗脱液, 之后将其置于  $40^\circ\text{C}$  水浴中进行氮气吹干, 最后用 1 mL 乙腈复溶, 涡旋 30 s, 样品过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜, 待上机分析检测。

#### 1.3.3 仪器条件

##### (1) 色谱条件

正离子模式: 色谱柱: Waters ACQUITYUPLC BEH  $\text{C}_{18}$  柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ); 流动相 A: 5 mmol/L 乙酸铵水溶液, 流动相 B: 乙腈; 柱温:  $30^\circ\text{C}$ ; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 2  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 70% B; 1.0~5.0 min, 70%~100% B; 5.0~7.0 min, 100% B; 7.0~7.1 min, 100%~70% B; 7.1~9.6 min, 70% B。

##### (2) 质谱条件

电喷雾离子源, 正离子模式; 多反应离子监测模式扫描; 毛细管电压: 2.5 kV; 锥孔电压: 35 V; 离子源温度:  $150^\circ\text{C}$ ; 脱溶剂气温度:  $450^\circ\text{C}$ ; 脱溶剂气( $\text{N}_2$ )流量: 1000 L/h; 碰撞室压力:  $3.2\text{e}^{-3}$  mbar。

### 1.4 数据处理

利用 Masslynx4.2 进行质谱数据分析处理, Origin Pro 2021 进行数据分析和图表绘制。

## 2 结果与分析

### 2.1 质谱条件的确立

首先配制 5 种真菌毒素的标准溶液, 在正离子模式下对标准品进行一级质谱全扫描, 获得目标物的母离子和质荷比( $m/z$ ); 之后再行子离子全扫描, 将 2 个响应度最高、最稳定的碎片离子作为目标物的定性和定量离子。在多反应监测模式下, 优化碰撞能量, 详细质谱参数信息如表 1 所示。

### 2.2 色谱条件的优化

研究比较了 Waters ACQUITYUPLC BEH  $\text{C}_{18}$  柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )和 Waters ACQUITY HSS T3 柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )对 5 种待测物分离效果及响应值, 混合标准溶液的浓度为 5.0  $\mu\text{g/L}$ 。结果表明, 5 种真菌毒素经  $\text{C}_{18}$  柱分离后, 峰形较好, 响应值高。

此外, 研究了流动相对分离的影响。考察了甲醇-水、乙腈-水、5 mol/L 乙酸铵-乙腈和 5 mol/L 乙酸铵-甲醇共 4 种体系对目标物的分离效果, 结果如图 1 所示。纯水相条件下发现存在色谱峰不能完全分离的情况, 而且水-乙腈和水-甲醇两个体系下得到的峰强度明显低于加了铵盐的体系, 说明 5 种真菌毒素 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 的信号响应值明显高于 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 和 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰的信号响应值, 在铵盐存在的条件下, 离子化效果好, 质谱响应强, 所以本研究中选用铵盐作为流动相。研究中进一步考察了甲醇和乙腈的影响, 结果表明, 采用乙腈-5 mol/L 乙酸铵水进行梯度洗脱, 目标物的响应值和分离度最好。在此条件下目标物呈现的分离度和响应值较为理想, 符合分析要求(图 1)。

### 2.3 样品前处理优化

#### 2.3.1 提取溶剂的优化

已有研究表明乙腈-水的体系有利于谷物中 BEA、ENA、 $\text{ENA}_1$ 、ENB 和  $\text{ENB}_1$  的提取, 韩小敏等<sup>[29]</sup>和赵迪等<sup>[20]</sup>的研究中采用了 85%的乙腈-水溶液进行提取, 胡文彦等<sup>[30]</sup>采用了 50%的乙腈-水溶液分析了大米和面粉中 BEA、ENA、 $\text{ENA}_1$ 、ENB 和  $\text{ENB}_1$  的污染情况。本研究中采用乙腈-水体系提取真菌毒素, 考察了乙腈与水的混合比例对

表 1 5 种目标化合物的质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of 5 kinds of target compounds

真菌毒素	离子模式	母离子( $m/z$ )	子离子( $m/z$ )	碰撞能/eV	保留时间/min
BEA	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	801.8	244*/262	33/33	3.72
ENA	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	699.8	210*/228	35/30	4.61
$\text{ENA}_1$	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	685.8	210*/228	30/35	4.21
ENB	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	657.7	196*/214	30/30	3.36
$\text{ENB}_1$	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	671.7	196*/210	30/30	3.80

注: \*为定量离子, 下同。

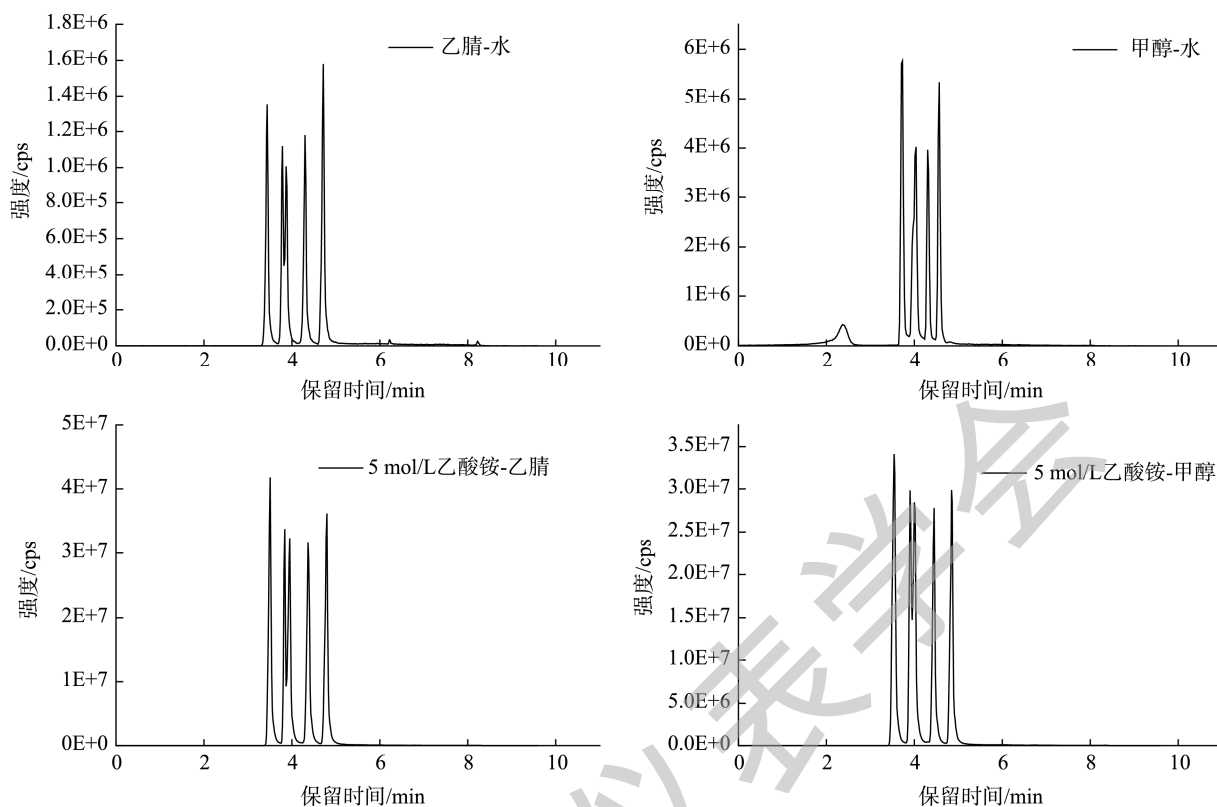


图 1 正离子模式条件下 5 种真菌毒素不同流动相体系下的总离子流图  
Fig.1 Total ion flow diagrams of 5 kinds of mycotoxins in different mobile phase systems under positive ion mode

BEA、ENA、ENA<sub>1</sub>、ENB 和 ENB<sub>1</sub> 回收率的影响。此外, 加入少量酸有助于真菌毒素的提取<sup>[31]</sup>, 所以在本研究中, 为了提高 BEA、ENA、ENA<sub>1</sub>、ENB 和 ENB<sub>1</sub> 的提取率, 在提取溶剂中添加了 1% 的乙酸, 实验结果如图 2 所示。结果表明, 5 种真菌毒素采用 84% 的乙腈体系提取的回收率高于 50% 乙腈体系下提取得到的回收率。因此, 本研究选用 84% 乙腈加 15% 的水, 同时添加 1% 的乙酸作为 5 种真菌毒素的提取剂。

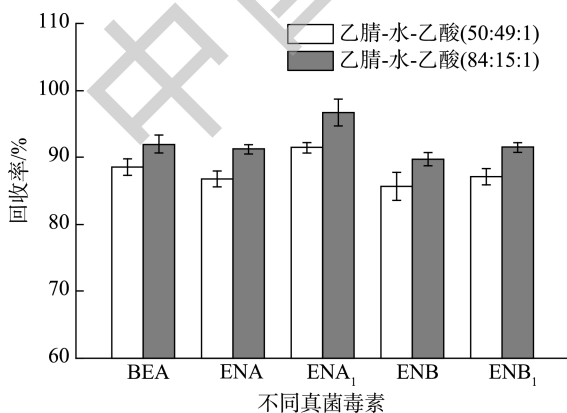


图 2 采用不同乙腈-水比例提取液时 BEA、ENA、ENA<sub>1</sub>、ENB 和 ENB<sub>1</sub> 的回收率(n=3)  
Fig.2 Recoveries of BEA, ENA, ENA<sub>1</sub>, ENB and ENB<sub>1</sub> using different acetonitrile-water ratio extracts (n=3)

### 2.3.2 淋洗液的选择

空白阴性样品中加入适量混合标准溶液(100 μg/L)。加标样品经乙腈-水-乙酸提取后加入到 Oasis PRiME HLB 固相萃取柱, 分别用 5 mL 的乙腈-水溶液淋洗固相萃取柱, 淋洗液比较了 20%、40% 和 60% 乙腈-水体系, 通过计算 5 种待测物的加标回收率, 考察不同淋洗液对净化的影响。结果表明, 5 种待测物的回收率范围在 87.9%~101.7%(图 3)。40% 的乙腈-水溶液提取的回收率最大, 但提高乙腈的比例,

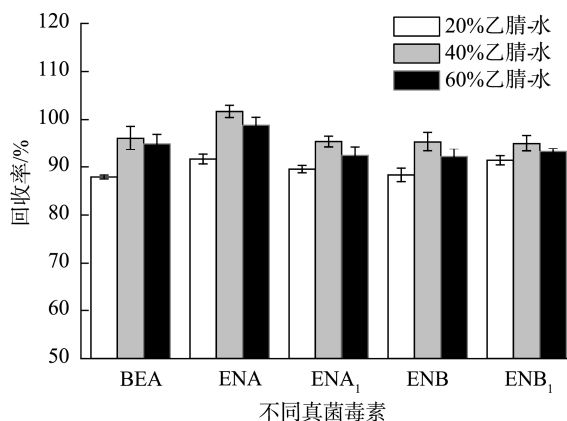


图 3 采用不同乙腈-水比例的淋洗液时 BEA、ENA、ENA<sub>1</sub>、ENB 和 ENB<sub>1</sub> 的回收率(n=3)  
Fig.3 Recoveries of BEA, ENA, ENA<sub>1</sub>, ENB and ENB<sub>1</sub> using different acetonitrile-water ratio lysates (n=3)

5 种待测物的回收率有所降低,这是由于高比例的有机相淋洗液可能导致部分待测物溶出,进而影响下一步的洗脱,降低最终回收率。因此,选择 40%作为最佳的淋洗液。

## 2.4 方法验证

### 2.4.1 基质效应评价

基质效应(matrix effect, ME)是指共流出干扰物对目标离子造成基质抑制或增强的效应,ME 在质谱分析中普遍存在,会影响分析结果的准确性。本研究中,基质效应的计算公式为  $ME = (\text{空白样品基质经前处理后加入标准物质得到的峰面积} / \text{乙腈中直接加入标准物质得到的峰面积} - 1) \times 100\%$ 。 $|ME| < 20\%$ ,表明无明显的基质效应; $20\% < |ME| \leq 50\%$ ,表明基质效应中等; $|ME| > 50\%$ ,表明对目标化合物有较强的基质效应。燕麦粉的基质效应在 2.5%~47.8%,小米粉的基质效应在 0.8%~34.8%(表 2)。燕麦粉的基质效应强于小米粉,5 种化合物的基质效应在中等以下。为消除基质效应的影响,本研究采用基质空白提取液配制标准曲线来消除基质效应的影响。

### 2.4.2 方法的线性范围、检出限和定量限

分别用燕麦粉和小米粉的空白基质配制质量浓度分别为 0.01、0.02、0.03、0.05、0.06、0.10、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00 和 40.00  $\mu\text{g/L}$  的系列混合标准溶液。经 UPLC-MS/MS 测定,以定量离子峰面积为纵坐标,以质量

浓度为横坐标,绘制基质匹配标准曲线,外标法定量。结果如表 3 和表 4 所示,5 种待测物在各自的浓度范围内呈现良好的线性关系,相关系数( $r^2$ ) $> 0.999$ 。在空白燕麦粉和小米粉样品中添加标准品,以定量离子  $S/N$  为 3 或 10 的质量浓度分别确定方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)。当基质为燕麦粉时,此方法的 LODs 为 0.02~0.05  $\mu\text{g/kg}$ , LOQs 为 0.05~0.15  $\mu\text{g/kg}$ ,当基质为小米粉时,此方法的 LODs 为 0.02~0.04  $\mu\text{g/kg}$ , LOQs 为 0.05~0.12  $\mu\text{g/kg}$ 。与文献[6,20,29]测定的谷物中白僵菌素和恩镰孢菌素的方法相比,本方法的灵敏度有不同程度的提高。

表 2 燕麦粉和小米粉的基质效应  
Table 2 MEs of oat flours and millet flours

真菌毒素	基质效应	
	燕麦粉	小米粉
BEA	12.4	7.6
ENA	30.6	12.5
ENA <sub>1</sub>	2.5	0.8
ENB	18.3	10.5
ENB <sub>1</sub>	47.8	34.8

表 3 燕麦粉中白僵菌素和恩镰孢菌素的线性方程及相关系数  
Table 3 Linear equations and correlation coefficients of beauvericin and enniatins in oat flour

真菌毒素	线性方程	LOD/( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ/( $\mu\text{g/kg}$ )	相关系数( $r^2$ )	线性范围/( $\mu\text{g/L}$ )
BEA	$Y=109320X-3709.84$	0.03	0.07	0.9994	0.03~40.00
ENA	$Y=239035X-7996.95$	0.05	0.15	0.9995	0.06~40.00
ENA <sub>1</sub>	$Y=187147X-5457.19$	0.05	0.15	0.9991	0.06~40.00
ENB	$Y=224061X-6943.08$	0.03	0.07	0.9997	0.03~40.00
ENB <sub>1</sub>	$Y=153252X-4698.36$	0.02	0.05	0.9990	0.02~40.00

表 4 小米粉中白僵菌素和恩镰孢菌素的线性方程及相关系数  
Table 4 Linear equations and correlation coefficients of beauvericin and enniatins in millet flour

真菌毒素	线性方程	LOD/( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ/( $\mu\text{g/kg}$ )	相关系数( $r^2$ )	线性范围/( $\mu\text{g/L}$ )
BEA	$Y=11640.3X+127.909$	0.02	0.05	0.9990	0.02~40.00
ENA	$Y=51564X-501.524$	0.04	0.12	0.9991	0.05~40.00
ENA <sub>1</sub>	$Y=44918.2X-3228.7$	0.04	0.12	0.9995	0.05~40.00
ENB	$Y=66718.2X-3166.48$	0.02	0.05	0.9997	0.02~40.00
ENB <sub>1</sub>	$Y=28112X-1115.36$	0.02	0.05	0.9996	0.02~40.00

### 2.4.3 准确度和精密度

方法的准确度采用回收率评价, 选择不含目标物的燕麦粉和小米粉样本分别在低浓度(LOQ 附近水平)、中间浓度(5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )和最高浓度(16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 3 个水平进行加标回收实验, 每个浓度设 6 个平行实验。结果如表 5 所示, 5 种新型真菌毒素在 3 个浓度水平的加标样品的平均回收率为 83.6%~105.2%之间, 加标样品测定结果的相对标准偏差在 1.3%~8.2%范围内, 可见, 回收率均在 60%~120%范围内, 符合 GB/T 27417—2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》的相关要求, 表明本方法具有良好的准确性和精密度。

### 2.5 实际样品检测

用本方法对北京市采集的 20 份谷物制品中的 5 种新

型真菌毒素进行检测, 其中包括 10 份燕麦粉和 10 份小米粉, 实验结果如表 6 所示。其中, 有 4 份小米粉样品和 10 份燕麦粉样品中检出了 BEA, 浓度范围是 0.48~2.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 有 6 份小米粉样品检出了 ENA, 浓度范围是 0.17~0.31  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 有 4 份小米粉样品和 10 份燕麦粉样品中检出了 ENA<sub>1</sub>, 浓度范围是 0.49~2.58  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 有 8 份小米粉样品和 10 份燕麦粉样品中检出了 ENB, 浓度范围是 0.16~22.70  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 有 8 份小米粉样品和 10 份燕麦粉样品中检出了 ENB<sub>1</sub>, 浓度范围是 0.05~20.30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。可见, 通过本研究的方法可以有效检测出 5 种毒素, 发现北京市售的燕麦粉和小米粉有不同程度的污染, 燕麦粉污染程度更高, 应引起广泛关注。

表 5 燕麦粉和小米粉中白僵菌素和恩镰孢菌素的加标回收率及精密度( $n=6$ )  
Table 5 Spiked recoveries and precision of beauvericin and enniatins in oat flour and millet flour ( $n=6$ )

真菌毒素	燕麦粉			小米粉		
	加标浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	相对标准偏差/%	加标浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	相对标准偏差/%
BEA	0.07	83.6	2.5	0.05	88.5	2.1
	5.00	98.2	2.7	5.00	101.2	2.9
	16.00	100.2	1.3	16.00	99.5	2.3
ENA	0.15	92.5	5.5	0.12	94.2	2.1
	5.00	98.5	5.0	5.00	99.5	2.8
	16.00	102.3	3.1	16.00	103.4	2.9
ENA <sub>1</sub>	0.15	97.2	8.2	0.12	90.4	1.8
	5.00	99.5	4.5	5.00	100.6	2.7
	16.00	99.1	3.6	16.00	103.2	2.2
ENB	0.07	95.2	6.9	0.05	88.6	2.2
	5.00	98.6	5.2	5.00	102.3	3.2
	16.00	99.4	1.8	16.00	96.2	1.3
ENB <sub>1</sub>	0.05	88.6	6.8	0.05	90.2	1.3
	5.00	105.2	4.1	5.00	104.2	2.1
	16.00	101.5	2.5	16.00	103.2	1.6

表 6 实际样品中 5 种真菌毒素检出情况  
Table 6 Occurrence of 5 kinds of mycotoxins in actual samples

真菌毒素	燕麦粉( $n=10$ )		小米粉( $n=10$ )	
	检出份数	检出浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检出份数	检出浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
BEA	10	0.62~2.08	4	0.48~1.40
ENA	8	0.22~0.42	6	0.17~0.31
ENA <sub>1</sub>	10	1.07~2.58	4	0.49~1.01
ENB	10	1.79~22.70	8	0.16~1.22
ENB <sub>1</sub>	10	0.79~20.30	8	0.05~1.27

### 3 结 论

本研究通过对色谱-质谱参数、色谱柱、流动相、提取溶剂和固相萃取淋洗液条件进行优化,建立了一种超高效液相色谱-串联质谱法检测燕麦粉和小米粉中 BEA 和 4 种 ENNs 的方法。应用所建立的分析方法,对 20 份实际样品进行测定,共有 18 份样品中检出了真菌毒素。与其他方法相比,本方法灵敏度高,适用于燕麦和小米制品中 BEA 和 4 种 ENNs 的定性筛查和定量分析,为研究其在谷物中的残留和风险评估提供了可靠的技术参考。

### 参考文献

- [1] HU L, RYCHLIK M. Occurrence of enniatins and beauvericin in 60 Chinese medicinal herbs [J]. *Food Addit Contam: Part A*, 2014, 31(7): 1240–1245.
- [2] STANCIU O, JUAN C, MIERE D, *et al.* Analysis of enniatins and beauvericin by LC-MS/MS in wheat-based products [J]. *CyTA-J Food*, 2017, 15(3): 433–440.
- [3] NIELSEN LK, COOK DJ, EDWARDS SG, *et al.* The prevalence and impact of *Fusarium* head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK [J]. *Int J Food Microbiol*, 2014, 179: 38–49.
- [4] 张丹, 刘柏林, 赵紫微, 等. PRiME HLB 柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定果蔬制品中 5 种新型真菌毒素[J]. *分析化学*, 2023, 51(8): 1343–1357.  
ZHANG D, LIU BL, ZHAO ZW, *et al.* Rapid determination of five kinds of emerging mycotoxins in fruit and vegetable products by PRiME HLB purification coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2023, 51(8): 1343–1357.
- [5] GAUTIER C, PINSON-GADAIS L, RICHARD-FORGET F. *Fusarium* mycotoxins enniatins: An updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(17): 4788–4798.
- [6] 杨军, 孙小杰, 胡文彦, 等. 基于 QuEChERS 提取的超高效液相色谱-串联质谱法测定小麦粉中 5 种镰刀菌毒素[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(7): 882–886.  
YANG J, SUN XJ, HU WY, *et al.* Determination of 5 *Fusarium* mycotoxins in wheat flour by QuEChERS extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2017, 36(7): 882–886.
- [7] HASUDA AL, BRACARENSE A. Toxicity of the emerging mycotoxins beauvericin and enniatins: A mini-review [J]. *Toxicon*, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2023.107534>
- [8] NOVAK B, LOPES A, GHANBARI M, *et al.* Effects of *Fusarium* metabolites beauvericin and enniatins alone or in mixture with deoxynivalenol on weaning piglets [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112719>
- [9] CIMBALO A, FRANGIAMONE M, JUAN C, *et al.* Proteomics evaluation of enniatins acute toxicity in rat liver [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 151: 112–130.
- [10] SØDERSTRØM S, SØFTELAND L, SELE V, *et al.* Enniatin B and beauvericin affect intestinal cell function and hematological processes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after acute exposure [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113557>
- [11] JAJIĆ I, DUDAŠ T, KRSTOVIĆ S, *et al.* Emerging *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin in serbian maize [J]. *Toxins*, 2019, 11(6): 357–370.
- [12] GAMBACORTA L, EL DARRA N, FAKHOURY R, *et al.* Incidence and levels of *Alternaria* mycotoxins in spices and herbs produced worldwide and commercialized in Lebanon [J]. *Food Control*, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106724>
- [13] ZHAO D, YIN D, HU J, *et al.* Determination of beauvericin and enniatins in rice flour and wheat flour by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Hyg Res*, 2023, 52(5): 756–768.
- [14] GARCÍA-NICOLÁS M, ARROYO-MANZANARES N, CAMPILLO N, *et al.* Cellulose-ferrite nanocomposite for monitoring enniatins and beauvericins in paprika by liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122144>
- [15] PIETRUSZKA K, PANASIUK Ł, JEDZINIAK P. Survey of the enniatins and beauvericin in raw and UHT cow's milk in Poland [J]. *J Vet Res*, 2023, 67(4): 259–266.
- [16] LI Y, HE N, LUO M, *et al.* Application of untargeted tandem mass spectrometry with molecular networking for detection of enniatins and beauvericins from complex samples [J]. *J Chromatogr A*, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461626>
- [17] 刘柏林, 倪曼, 单晓梅, 等. 冷诱导液液萃取-分散固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定鸡蛋中白僵菌素和 4 种恩镰孢菌素残留[J]. *色谱*, 2021, 39(12): 1331–1339.  
LIU BL, NI M, SHAN XM, *et al.* Simultaneous determination of beauvericin and four enniatins in eggs by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with cold-induced liquid-liquid extraction and dispersive solid phase extraction [J]. *Chin J Chromatogr*, 2021, 39(12): 1331–1339.
- [18] HOLANDA DM, KIM SW. Mycotoxin occurrence, toxicity, and detoxifying agents in pig production with an emphasis on deoxynivalenol [J]. *Toxins*, 2021, 13(2): 171–192.
- [19] KRÍŽOVÁ L, DADÁKOVÁ K, DVOŘÁČKOVÁ M, *et al.* Feedborne mycotoxins beauvericin and enniatins and livestock animals [J]. *Toxins*, 2021, 13(1): 32–45.
- [20] 赵迪, 尹丹阳, 胡佳薇, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定大米粉和小麦粉中白僵菌素和恩镰孢菌素[J]. *卫生研究*, 2023, 52(5): 756–761.  
ZHAO D, YIN DY, HU JW, *et al.* Determination of beauvericin and enniatins in rice flour and wheat flour by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Hyg Res*, 2023, 52(5): 756–761.
- [21] 韩小敏, 李凤琴, 徐文静, 等. 重要产毒镰刀菌合成白僵菌素和恩镰孢菌素研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(1): 89–93.  
HAN XM, LI FQ, XU WJ, *et al.* Progress on biosynthesis of beauvericin and enniatins for important toxin-producing *Fusarium* species [J]. *Chin J Food Hyg*, 2019, 31(1): 89–93.

- [22] 韩小敏, 徐文静, 刘明, 等. 2017年山东省部分地区玉米及其制品中白僵菌素和恩镰孢菌素污染调查[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(6): 622-627.  
HAN XM, XU WJ, LIU M, *et al.* Survey on natural occurrence of beauvericin and enniatins in corn and corn-based samples collected from Shandong Province of China in 2017 [J]. *Chin J Food Hyg*, 2018, 30(6): 622-627.
- [23] 刘云翔, 周荣荣, 詹志来, 等. 蕈苡仁中呕吐毒素酶联免疫检测方法的建立[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(24): 6581-6586.  
LIU YX, ZHOU RR, ZHAN ZL, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of vomitoxin (DON) in *Coicis semen* [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(24): 6581-6586.
- [24] SALISU B, ANUA SM, ISHAK WRW, *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]. *J Adv Vet Anim Res*, 2021, 8(4): 656-670.
- [25] CARAMÈS ETDS, PIACENTINI KC, APARECIDA ALMEIDAN, *et al.* Rapid assessment of enniatins in barley grains using near infrared spectroscopy and chemometric tools [J]. *Food Res Int*, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111759>
- [26] NIKNEJAD F, ESCRIVÁ L, ADEL RADKB, *et al.* Biomonitoring of multiple mycotoxins in urine by GC-MS/MS: A pilot study on patients with esophageal cancer in Golestan Province, Northeastern Iran [J]. *Toxins*, 2021, 13(4): 243-254.
- [27] 邓涛, 吉小凤, 肖英平, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素[J]. 宁波大学学报(理工版), 2023, 36(6): 50-56.  
DENG T, JI XF, XIAO YP, *et al.* Determination of enniatins and beauvericin in fruit juice by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Ningbo Univ (Nat Sci Eng Ed)*, 2023, 36(6): 50-56.
- [28] 牛蓉, 秦丽波, 张梦丽, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定饮用水中林可霉素、替米考星和泰乐菌素残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(20): 8150-8155.  
NIU R, QIN LB, ZHANG ML, *et al.* Simultaneous determination of lincomycin, tilmicosin and tylosin residues in drinking water by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(20): 8150-8155.
- [29] 韩小敏, 徐文静, 赵熙, 等. 玉米及其制品和小麦及其制品中白僵菌素和恩镰孢菌素的高效液相色谱-串联质谱检测方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(6): 633-640.  
HAN XM, XU WJ, ZHAO X, *et al.* Development of high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry method for determination of beauvericin and enniatins in corn and wheat and their products [J]. *Chin J Food Hyg*, 2017, 29(6): 633-640.
- [30] 胡文彦, 孙小杰, 宗凌丽, 等. 大米与面粉中白僵菌毒素及恩镰孢菌素污染情况调查研究[J]. 食品科技, 2018, 43(2): 297-301.  
HU WY, SUN XJ, ZONG LL, *et al.* Investigation on the contamination of beauvericin and enniatins in rice and flour [J]. *Food Sci Technol*, 2018, 43(2): 297-301.
- [31] 韩小敏, 李凤琴, 徐文静. 食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的污染情况及分析方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(4): 508-513.  
HAN XM, LI FQ, XU WJ. Research progress on the contamination of beauvericin and enniatins and the development of analytical method in food [J]. *Chin J Food Hyg*, 2017, 29(4): 508-513.

(责任编辑: 张晓寒 郑 丽)

## 作者简介



邢 杨, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: xingyang0224@163.com



张 晶, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: brightjing@163.com