

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240718003

基于自建数据库的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法定量测定玉米中 5 种真菌毒素

梁艳婷^{1#}, 杨奉筠^{1#}, 贾艳丰¹, 张鑫宇¹, 刘蓉², 柳明^{1*}

(1. 内蒙古赤峰市疾病预防控制中心, 赤峰 024000; 2. 中国 SCIEX 公司, 北京 100000)

摘要: **目的** 基于自建数据库建立超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS)测定玉米中玉米赤霉烯酮(zearealenone, ZEN)、交链孢酚(alternariol, AOH)、交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)、腾毒素(tentoxin, TEN) 5 种负离子真菌毒素的方法。**方法** 样品经提取、净化、复溶后, 采用 Waters UPLC BEH C₁₈ 色谱柱进行分离后在信息依赖型的扫描(information-dependent scanning, IDA)负离子模式采集。SCIEX OS Explorer 条件下确定 5 种负离子真菌毒素精确数据录入数据库。在玉米基质中以筛查检出限作为主要参数验证方法。**结果** 高分辨模式下采用加内标来改善基质干扰系数校正, 在玉米基质中对真菌毒素类的基质效应 θ 进行计算, θ 在 0.84~1.10 之间。基质匹配内标校准定量, 5 种负离子真菌毒素在范围内具有较好的线性关系, 相关系数(r)为 0.9972~0.9993。5 种负离子真菌毒素的检出限为 0.2~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。玉米基质在低、中、高 3 个加标水平下的平均回收率为 83.9%~119.4%, 相对标准偏差为 2.39%~11.37% ($n=6$)。用此方法检测内蒙地区 120 份玉米中 5 种负离子真菌毒素都有检出, TeA 和 TEN 检出率高达 98.1%和 95.6%。有 3 份玉米中 ZEN 超过 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 限量标准, 应引起相关监管部门重视。**结论** 本方法具有高通量、精准、快速等优点, 可以在无标准物质情况下对玉米中 ZEN、AOH、AME、TeA、TEN 的定性筛查, 为玉米中这 5 种真菌毒素污染监测提供技术支持。

关键词: 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法; 自建数据库; 玉米; 负离子; 真菌毒素

Determination of 5 kinds of mycotoxins in *Zea mays* by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry based on self-established database

LIANG Yan-Ting^{1#}, YANG Feng-Jun^{1#}, JIA Yan-Feng¹, ZHANG Xin-Yu¹,
LIU Rong², LIU Ming^{1*}

(1. Chifeng Center for Disease Control and Prevention, Inner Mongolia, Chifeng 024000, China;
2. SCIEX Corporation, Beijing 100000, China)

基金项目: 赤峰市科协自然科学科研课题项目(20230130)

Fund: Supported by the Natural Science Research Project of the Chifeng Association for Science and Technology (20230130)

#梁艳婷、杨奉筠为共同第一作者

#LIANG Yan-Ting and YANG Feng-Jun are Co-first Authors

*通信作者: 柳明, 副高级工程师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: 275904916@qq.com

*Corresponding author: LIU Ming, Associate Senior Engineer, Chifeng Center for Disease Control and Prevention, 146A Yulong Street, Xincheng District, Chifeng 024000, China. E-mail: 275904916@qq.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for determining 5 kinds of negative ion mycotoxins in *Zea mays*, namely zearalenone (ZEN), alternariol (AOH), alternariol monomethyl ether (AME), tenuazonic acid (TeA), and tentoxin (TEN), by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) based on a self-established database. **Methods** After extraction, purification and redissolution of the sample, separation was carried out using Waters UPLC BEH C₁₈ chromatographic column and then collection was performed in negative ion mode of information-dependent scanning (IDA). Under the conditions of SCIEX OS Explorer, the accurate data of 5 kinds of negative ion mycotoxins were determined and entered into the database. The limit of detection for screening in corn matrix was used as the main parameter to verify the method. **Results** In high-resolution mode, internal standard addition was used to improve the correction of matrix interference coefficient. The matrix effect θ of mycotoxins was calculated in corn matrix, and θ was between 0.84 and 1.10. Matrix-matched internal standard calibration was used for quantification. The 5 kinds of negative ion mycotoxins had a good linear relationship within the range, and the correlation coefficient (r) was between 0.9972 and 0.9993. The limits of detection of 5 kinds of negative ion mycotoxins were 0.2–5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average recoveries of corn matrix at low, medium and high spiked levels were 83.9%–119.4%, and the relative standard deviations were 2.39%–11.37% ($n=6$). Using this method, all 5 kinds of negative ion mycotoxins were detected in 120 corn samples from Inner Mongolia. The detection rates of TeA and TEN were as high as 98.1% and 95.6%. In 3 corn samples, ZEN exceeded the limit standard of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, which should attract the attention of relevant regulatory departments. **Conclusion** This method has the advantages of high throughput, accuracy and speed. It can qualitatively screen ZEN, AOH, AME, TeA and TEN in corn without standard substances and provide technical support for the monitoring of pollution of 5 kinds of mycotoxins in *Zea mays*.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry; self-established database; *Zea mays*; negative ion; mycotoxin

0 引言

《“健康中国 2030”规划纲要》将有效控制危害食品药品安全的主要因素作为新兴战略目标, 食品安全方面的问题已经引起了国家的高度重视。目前众多国家都制定了严格的真菌毒素最大残留限量标准和相应的检测方法^[1-2], 但是还有部分真菌毒素没有制定相关的残留限量标准, 例如交链孢霉毒素。交链孢霉毒素[交链孢酚(alternariol, AOH)、交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)、腾毒素(tentoxin, TEN)]污染是普遍存在的, 对人体具有一定的致癌、致畸等慢性或急性毒性作用^[2], 如果多种交链孢霉毒素同时存在可产生协同作用, 导致毒性增强^[3-4], 因此迫切需要对其制定限量标准^[2,5]。玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)具有雌激素样作用, 长期摄入 ZEN 对人或动物健康危害巨大^[6-9]。交链孢霉毒素和 ZEN 常用的检测方法为薄层色谱法^[10]、液相色谱法^[11]、酶联免疫吸附法^[12]、气相色谱-质谱法^[13-14]、高效液相色谱-串联质谱法^[15-17]、纳米酶、荧光生物传感器法^[18-19]等。酶联免疫吸附法简单、快速、易出现假阳性结果; 薄层色谱法随机误差大、重复率低; 气相色谱-质谱法操作复杂、重复性差、耗时且成本高^[20]; 液相色谱法和高效液相色谱-串联质谱法是交链孢霉毒素常用的测定方法^[21-23], 样本处理步骤复杂、烦琐, 不适合快速检

测, 还需要购买真菌毒素标准物质(价格昂贵, 反复使用高纯度真菌毒素对身体危害很大); 纳米酶、荧光生物传感器法便捷、快速, 但准确性偏低、检测真菌毒素数量有限^[18-19]。目前交链孢霉毒素和 ZEN 几乎都是不同的色谱或质谱方法完成检测的^[3-8], 可实现两者同时检测的报道较少。

超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法(ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF/MS)在全扫描模式下能采集选定质量范围内的全部信息^[5], 具有超高分辨率、敏捷灵敏度等数据采集特性^[1], TOF-MS 同时具有对没有参考标准物质的化合物进行定性筛查分析特性^[22]。UPLC-Q-TOF/MS 应用面广, 分析速度快, 检测范围应用动态变化, 分辨率、灵敏性^[23]等都有了很大的提升, 在高通量筛选, 定量分析中的应用也非常广泛^[20]。

交链孢霉毒素在自然界中广泛分布, 可对蔬菜、水果、粮食作物、油料作物、香料和调味料等造成污染, 在粮食作物中的污染情况尤其严重^[3-4], 根据 2022—2023 年内蒙古各个盟市统计局耕地面积数据显示 70%以上均种植的玉米, 因此本研究对内蒙古地区玉米中交链孢霉毒素和 ZEN 污染状况做调查研究, 并了解其污染现状。采用 UPLC-Q-TOF/MS 信息依赖型的扫描(information-dependent scanning, IDA)模式、电喷雾电离源(electrospray ionization source, ESI)负离子对真菌毒素混合标准溶液扫描, 筛选建

立玉米基质中 AOH、AME、TeA、TEN^[24]、ZEN^[25] 5 种真菌毒素的非靶向数据库, 然后利用所建数据库质谱数据结合基质匹配标准曲线内标法在飞行时间高分辨多反应监测模式下进一步定量检测^[26], 为玉米真菌毒素污染监测和风险防范提供的更多技术选择。

1 材料与方 法

1.1 仪器和设备

X500R 超高效液相色谱-飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); Multifuge X Pro 高速低温离心机(转速≥10000 r/min, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); AL204-IC 电子天平(感量 0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Talboys 涡旋器[泛特(上海)国际贸易有限公司]; ZTY-70N 摇床(上海知楚仪器有限公司); FV64UP 全自动智能双模式氮吹仪(广州得泰仪器科技有限公司); 200 型高速粉碎机(永康市松青五金厂)。

1.2 材料与试剂

玉米样品来源于内蒙古部分盟市, 每年玉米收获季节是 10 月份, 采样人员及时用透气的牛皮纸袋收集样本, 每份样本 2 kg, 然后邮寄到检测单位, 本次为 2023 年 10 月末收到样本。

乙腈、甲醇(质谱纯, 美国 Tedia 公司); 甲酸、乙酸(色谱纯, 美国 Dikma 公司); 磷酸二氢钠(分析纯)、碳酸氢铵(优级纯)(国药集团化学试剂有限公司); Waters Oasis HLB 固相萃取柱(美国 Waters 公司); 标准物质[TeA、AOH、TEN、AME、ZEN (100 μg/mL)、同位素内标[TeA-D₁₃ (10 μg/mL)、AOH-D₂ (25 μg/mL)、TEN-D₃ (10 μg/mL)、AME-D₃ (25 μg/mL)、¹³C₁₈-ZEN (25 μg/mL)](德国 Romer Labs 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 仪器工作条件

(1)超高效液相色谱条件

色谱柱: Waters UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 样品室温度: 10 °C, 进样量 10 μL, 柱温 40 °C; 流速 0.25 mL/min, 流动相 A 为 1.0 mmol/L 碳酸氢铵溶液, B 为甲醇, 梯度洗脱程序^[3,27]: 0~2.0 min 时, B 为 5%; 2.0~3.0 min 时, B 由 5%升至 75%; 3.0~4.0 min 时, B 由 75%升至 90%, 保持 2.0 min; 6.0~6.5 min 时, B 由 90%降至 5%, 保持 1.5 min。

(2) TOF-MS 条件

离子源(电喷雾); 喷雾电压: -4500 V, 离子源温度: 500 °C, 雾化气 Gas1: 55 psi, 雾化气 Gas2: 60 psi, 气帘气: 35 psi^[25], 碰撞气: 8 psi, 采集方式: IDA 和高分辨多重反应监测两种模式, 质量扫描范围: *m/z* 50~1200, 碰撞能量范围: -5~40 eV。

1.3.2 样品前处理、提取、净化

参照《2023 年国家食品污染物和有害因素风险监测工作手册》中食品中真菌毒素多组分测定的标准操作程序(同位素稀释 HPLC-MS 法)和食品中交链孢霉毒素测定的标准操作程序(同位素稀释 HPLC-MS)^[28], 用谷物研磨机粉碎样品, 称取 5 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 刻度离心管中, 涡旋混匀 10 s, 样品加入 25 mL 乙腈:甲醇:0.05 mol/L pH 3.0 磷酸二氢钠(9:2:9, *V:V:V*), 盖紧盖子涡旋混匀 10 s, 振荡提取 15 min, 于 4 °C, 10000 r/min 离心 10 min, 取 5.0 mL 上清液, 加入 15 mL 0.05 mol/L pH 3.0 磷酸二氢钠溶液, 混匀, 10000 r/min 离心 10 min。净化: HLB 固相萃取柱依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化, 将稀释后的样品提取液全部过柱, 再用 5 mL 20%甲醇溶液淋洗, 于负压状态下抽干柱子 5 min。依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 乙腈洗脱, 合并洗脱液于小试管中, 45 °C 水浴氮吹近干, 残渣先用 200 μL 甲醇复溶, 涡旋混匀 10 s 后加入 200 μL 混合内标工作液, 再加 1.6 mL 水, 涡旋混匀 10 s, 于 4 °C, 12000 r/min 离心 10 min, 上清液供 UPLC-Q-TOF/MS 分析。

1.3.3 数据库的构建

(1)混合标准溶液的制备

混合标准工作液(TeA: 500 ng/mL、AOH: 200 ng/mL、TEN: 100 ng/mL、AME: 20 ng/mL、ZEN: 20 ng/mL)^[29]: 分别准确移取 10 μL ZEN 标准物质(100 μg/mL)、250 μL TeA 标准物质(100 μg/mL)、100 μL AOH 标准物质(100 μg/mL)、50 μL TEN 标准物质(100 μg/mL)和 10 μL AME 标准物质(100 μg/mL)至 50 mL 容量瓶中, 用 10%甲醇定容至刻度, 摇匀, 4 °C 冰箱内保存。混合内标工作液浓度(TeA-D₁₃: 500 ng/mL, AOH-D₂: 200 ng/mL, TEN-D₃: 100 ng/mL, AME-D₃: 20 ng/mL, ¹³C₁₈-ZEN: 1.25 μg/mL): 分别准确移取 2.5 mL TeA-D₁₃ 储备液(10 μg/mL)、400 μL AOH-D₂ 储备液(25 μg/mL)、500 μL TEN-D₃ 储备液(10 μg/mL)、40 μL AME-D₃ 储备液(25 μg/mL)和 2.5 mL ¹³C₁₈-ZEN (25 μg/mL)至 50 mL 容量瓶中, 用乙腈定容至刻度, 混匀, 备用。

(2)数据库建立及 SCIEX OS Explorer 筛查条件

这 5 种真菌毒素全部采用负离子采集模式, 选取加合物([M-H]⁻和[M+CH₃COO]⁻)作为目标质量, 在优化的色谱条件下进样, 对 5 种化合物进行质谱全扫描。通过 SCIEX OS Explorer 建立 5 种化合物的一级精确质量数据库^[30], 在将目标物精确质量的母离子在不同碰撞能下进行采集二级谱库所需的子离子信息, 同时建立化合物的一级、二级信息谱库, 包括母离子、子离子、保留时间、采集时间范围^[31]、去簇电压、不同碰撞能量的质谱信息等。

1.4 数据处理

通过 SCIEX OS 仪器配置工作站系统进行数据采集, 利用 Microsoft Office Excel 2007 软件、Graphpad prism 10.0 进行数据分析及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 色谱柱的选择

本研究比较了 BEH HILIC C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 和 BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱, 使用 BEH HILIC C₁₈ 色谱柱时, 化合物出峰速度过快, 导致各个化合物的峰型都不理想, 使用 BEH C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 化合物峰形和保留时间都比较好。可能是因为 BEH C₁₈ 柱随流动相梯度变化压力随之变化, 适合分析化合物。因此选择 BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。

2.1.2 流动相条件的优化

AOH、AME 是二苯并吡喃酮类的多羟基化合物, 酸性条件稳定, TeA 和 TEN 是四氨基酸衍生物类, ZEN 是酚的二羟基苯酸的内酯结构, 鉴于 5 种真菌毒素的结构特征, 为增强化合物的离子化, 采用质谱条件下[M-H]⁻模式采集数据。本研究比较了水-甲醇体系、0.1%氨水溶液-甲醇体系、0.1%碳酸氢铵溶液-甲醇体系。水-甲醇体系离子化不完全, 在此体系水中加入 0.1%氨水后发现离子峰型前伸, 更换 0.1%碳酸氢铵-甲醇体系离子峰好, 离子化强度较前两者佳, 5 种真菌毒素的色谱图见图 1。

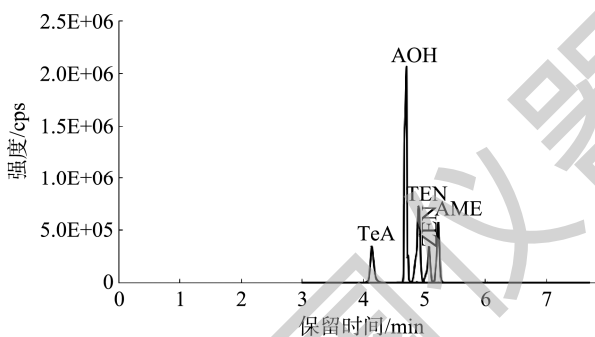


图1 5种真菌毒素的色谱图

Fig.1 Chromatograms of 5 kinds of fungal toxins

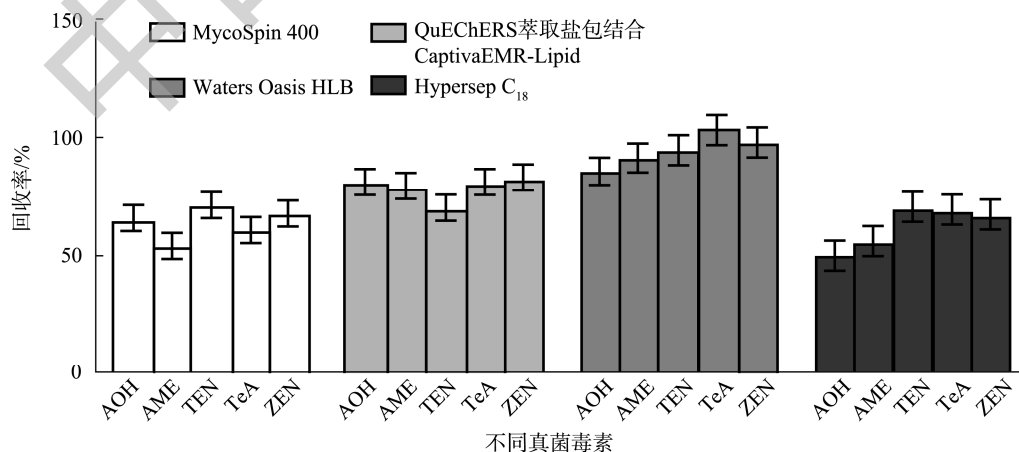


图2 4种的净化柱净化5种真菌毒素的回收率

Fig.2 Recoveries of 5 kinds of mycotoxins by 4 kinds of column

2.2 固相萃取柱的选择

净化方式的选择以玉米基质加标样品的回收率为考察对象, MycoSpin 400 净化柱法、QuEChERS 萃取盐包结合 CaptivaEMR-Lipid 过滤柱、Waters Oasis HLB 固相萃取柱和 Hypersep C₁₈ 柱(简称 C₁₈ 柱)的净化效果进行对比。净化法的考察结果如图 2 所示。Waters Oasis HLB 固相萃取柱净化法中 AOH、AME、TEN、TeA、ZEN 的回收率比采用 MycoSpin 400 净化柱法、QuEChERS 萃取盐包结合 CaptivaEMR-Lipid 过滤柱、C₁₈ 柱更高。Waters Oasis HLB 固相萃取柱是一种适用于酸性、中性和碱性化合物的通用性净化柱, 其良好的化学稳定性、高而稳定的回收率, 所以选择 Waters Oasis HLB 柱净化。

2.3 数据采集条件的优化

UPLC-Q-TOF/MS 的 IDA 全扫描模式采集建立数据库所需的数据, 在 SCIEX OS Explorer(Peakview 2.0)模块内输入真菌毒素的分子结构式查询其对应分子式计算理论分子量(不含同位素)。按 1.3.1 色谱、质谱条件对 5 种真菌毒素混合标准溶液进行 IDA 质谱扫描, 确定 5 种真菌毒素都以[M-H]⁻模式采集, 将包括有 UPLC 分离、质谱加合物及碎裂信息的原始数据导入 SCIEX OS 软件中的 Explorer 信息系统^[1]。首先是一级质谱特征离子信息库的建立: 通过全扫描 MS 确定化合物的加合物离子的精确质量数(精确到小数点后 4 位)、保留时间等信息等。然后二级质谱信息库的建立: 在 IDA 模式 MS/MS 中, 结合真菌毒素的分子结构信息确定每个加合物离子碎片离子, 选择 2~3 个能量强度高的作为二级碎片, 其碎片离子的响应接近加合物离子响应 20%以上为宜。在 MRM^{HR}(高分辨多重反应监测)模式分别为每个真菌毒素碎片离子设置碰撞电压。以 AOH 为例, 碰撞能-5 V 为步阶, -5~40 eV 范围内测试碰撞能量, 选择最佳能量强度-30 eV 为其子离子碰撞能。同理得出其他 4 种真菌毒素子离子碰撞能信息。将混合标准溶液最终采集后获得的数据信息录入 SCIEX OS 中 Library 中建立 5 种真菌毒素数据库见表 1。

2.4 筛查方法判定

样品中目标物与数据库中匹配依据: 目标物信号响应信噪比 ≥ 3 , 获得目标物的保留时间范围为 0.5 min; 母离子精确质量数的质量偏差 $\leq 5 \times 10^{-6}$, 其中至少一个碎片离子精确质量数的质量偏差 $\leq 10 \times 10^{-6}$, 相对丰度比大于 70%^[32]。以 AOH 为例, 根据数据库表 1 记录加合物离子的精确质量数为 257.0455, 主要碎片离子的精确质量数分别为 147.0452、215.0352, 出峰时间为 4.670 min; 如图 3 所示, 加合物离子和主要碎片离子的保留时间为 4.667~4.675 min, 偏差在 ± 0.1 min 范围内。在 SCIEX OS MRM^{HR} 软件中测定母离子的质量数为 257.0459, 子离子分别为 215.0353、147.0457, 与理论偏差分别为 0.46×10^{-7} 、 3.40×10^{-6} , 符合

SANTE/11813/2017^[32]指南中质量数(其中一个为碎片离子)与理论质量数质量偏差不超过 5×10^{-6} 的要求。

2.5 方法学验证

2.5.1 检出限

在玉米基质中, 5 种真菌毒素中只有 ZEN 规定了检出限, 其他 4 种尚未规定, 用 3 倍信噪比^[33-34]为最低浓度点开始对玉米样品基质添加 1 倍最低点、2 倍最低点、4 倍最低点、8 倍最低点, 每个浓度点测定 20 次, 做筛查方法学验证。在验证的过程中为排除杂质离子的干扰, 采用提取离子峰等扣除样品中背景, 提高母离子的相对能量强度^[33]。表 2 可以看出 ZEN 检出限为 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、AOH 检出限为 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、AME 检出限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TeA 检出限为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TEN 检出限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 1 5 种负离子真菌毒素的质谱数据
Table 1 Mass spectroscopic data of 5 kinds of negative ion mycotoxins

化合物	理论质量数 (m/z)	实际质量数 (m/z)	质量偏差 ($\times 10^{-6}$) (m/z)	子离子(m/z)	离子模式	出峰时间 /min	扫描时间 /s	去簇电压 /V	碰撞能 /eV
AME	271.0612	271.0614	0.74	256.0376	[M-H] ⁻	5.24	0.04	-90	-30
AME				228.0424	[M-H] ⁻	5.24	0.04	-90	-40
AOH	257.0455	257.0459	1.19	147.0452	[M-H] ⁻	4.67	0.04	-90	-40
AOH				215.0352	[M-H] ⁻	4.67	0.04	-90	-30
TeA	196.09792	196.09800	0.41	139.0274	[M-H] ⁻	4.12	0.04	-50	-25
TeA				112.0161	[M-H] ⁻	4.12	0.04	-50	-30
ZEN	317.1394	317.1400	1.80	175.0403	[M-H] ⁻	5.08	0.04	-90	-30
ZEN				131.0498	[M-H] ⁻	5.09	0.04	-90	-35
TEN	413.2194	413.2196	0.48	141.0669	[M-H] ⁻	4.92	0.04	-75	-30
TEN				271.1457	[M-H] ⁻	4.92	0.04	-75	-25

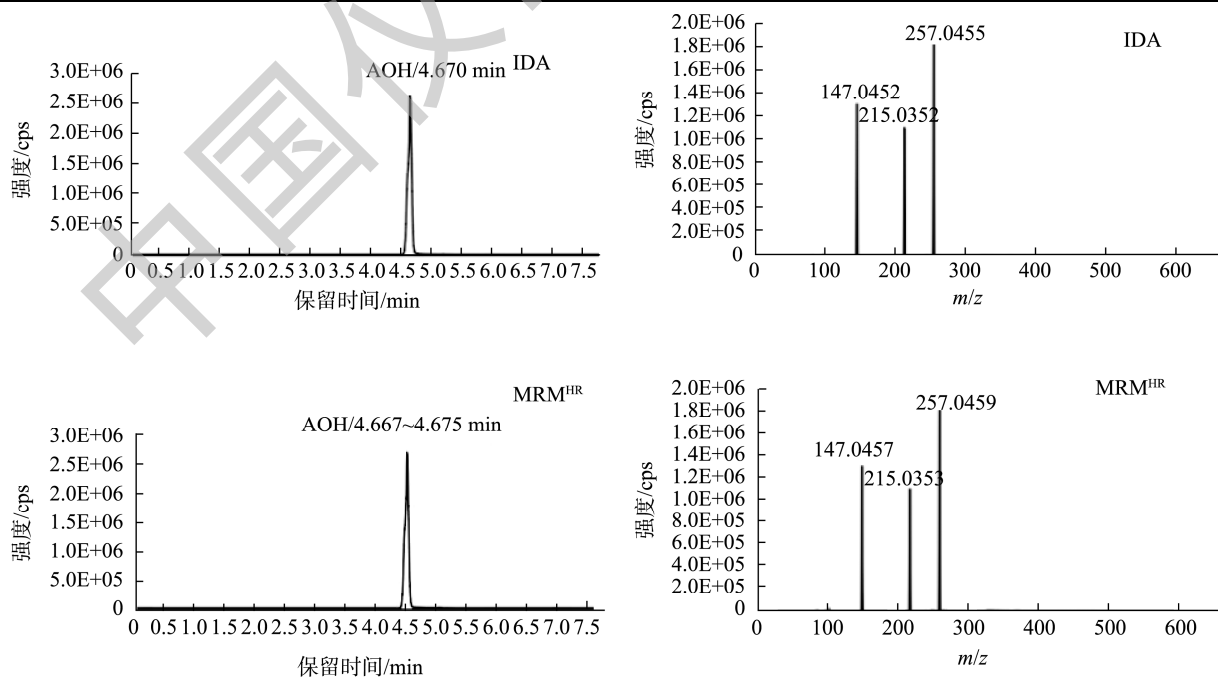


图3 AOH的筛查分析图

Fig.3 AOH screening analysis chart

表 2 5 种真菌毒素在玉米粉中的加标量、检出个数、检出限
Table 2 Addition quantity, detection number and limit of detection of 5 kinds of mycotoxins in corn meal

编号	化合物	1 倍最低点		2 倍最低点		4 倍最低点		8 倍最低点		检出限 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出数量	含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出数量	含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出数量	含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出数量	
1	ZEN	2.5	8	5.0	20	10.0	20	20.0	20	5.0
2	AOH	0.8	13	1.5	19	3.2	20	6.4	20	1.5
3	AME	0.08	16	0.2	20	0.32	20	0.64	20	0.2
4	TeA	2.0	14	4.0	20	8.0	20	16.0	20	2.0
5	TEN	0.4	18	1.0	20	1.6	20	3.2	20	1.0

2.5.2 基质效应

在样品提取净化后,定量分析时一些共存提取物可能会对目标离子化过程产生影响,导致出现假阴性或者假阳性的结果^[30],即基质效应(matrix effects, ME)。ME 是影响检测结果准确性和重复性的重要因素^[35],本研究通过添加内标物来改善基质干扰的系数校正,能有效地消除因进样不充分或仪器响应不稳定造成的结果差异^[36]。因此分析中用于评价基质效应的方法即采用提取后添加法对真菌毒素在基体中的基质效应进行评估^[33],用相对空白基质溶液(A)和空白溶剂(B)配制相同浓度的被测物溶液,比较二者质谱响应,即 $\text{ME}/\%=(\text{峰面积 } A-\text{峰面积 } B)\times 100\%$,采用同位素内标稀释质谱法校正因子 θ 评价被测物与其同位素稀释剂的 ME 差异,即 $\theta=\text{ME}_{\text{myco}}-\text{ME}_{\text{IS}}$,其中, ME_{myco} 为被测物的基质效应, ME_{IS} 为同位素稀释剂的基质效应。

这 5 种真菌毒素与对应同位素内标的基质效应,结果如表 3 所示,在玉米样品基质中,5 种真菌毒素与其内标均有较强的基质效应,基质校正因子 θ 在 0.84~1.10 之间。如果没有空白基质,采用溶剂校准液与基体匹配校准液对样品中真菌毒素同时定量,采用 IDMS 校正因子校正后的结果与基体匹配校准液测定结果相当^[37],如表 4 所示,校正因子可以有效地校正由溶液校准定量方法产生测量结果偏差。

表 3 真菌毒素的 MEs
Table 3 MEs of mycotoxins

化合物	分析物	MEs/%		校正因子	
		相对标准偏差	内标物 相对标准偏差		
ZEN	49	2.4	51	1.9	0.96
AOH	35	3.1	36	2.6	0.97
AME	42	2.1	38	1.3	1.10
TEN	50	4.3	56	5.1	0.89
TeA	41	5.4	49	3.7	0.84

2.5.3 精密度和准确度

选用真菌毒素污染较低的玉米做基质,添加低、中、高 3 个水平的混合标准溶液^[32],按 1.3.2 节方法处理,每个

水平相同样品 6 份,进行回收率实验,并计算平行样相对标准偏差,见表 5,不同的真菌毒素在其合适的线性范围内,线性回归方程的相关系数在 0.9972~0.9993 之间,玉米中真菌毒素在低、中、高 3 个加标量的平均回收率为 83.9%~119.4%,相对标准偏差为 2.39%~11.37%,证实上述方法具有较好的精密度和准确度,可以应用于玉米中 5 种真菌毒素的定量测定。

表 4 溶液校准与基质匹配液定量结果比较

Table 4 Comparison of quantitative results between solution calibration and matrix matching solution

毒素种类	溶液校准 /(ng/g)	基质匹配液 /(ng/g)	校正结果 /(ng/g)
ZEN	1.91	2.11	2.01
	1.98	2.13	2.06
	2.06	2.09	2.08
AOH	9.87	9.96	9.92
	9.61	10.23	9.92
	9.57	10.08	9.82
AME	2.14	1.86	1.98
	2.06	1.79	1.91
	2.09	1.98	1.94
TEN	4.92	5.24	5.53
	5.03	5.17	5.65
	4.96	5.09	5.57
TeA	49.21	53.67	58.58
	50.36	54.19	59.95
	49.75	55.03	59.22

2.5.4 实际样品分析

采集内蒙古地区共 120 份玉米中真菌毒素进行检测。样品的处理参照 1.3.2 提取净化,按所建数据库条件测定;ZEN 的检出率为 83.0%,AME 检出率为 57.0%,AOH 检出率为 46.2%,TeA 和 TEN 检出率高达 98.1%和 95.6%。其中 ZEN 有 3 份超出限量标准(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$),建议有关部门引起重视。

表 5 5 种真菌毒素的的线性范围、线性方程、相关系数、加标回收率和精密度($n=6$)
Table 5 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, recoveries and precisions of 5 kinds of mycotoxins ($n=6$)

化合物	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	线性回归方程	相关系数(r)	加标量/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	精密度/%
ZEN	1.0~30.0	$Y=1032.19775X-17.52798$	0.9972	5	88.2	10.41
				10	101.63	3.62
				20	93.6	2.39
AOH	0.4~20.0	$Y=1229.10636X+555.90233$	0.9993	1.0	86.3	7.65
				2.0	96.9	8.92
				5.0	107.9	3.76
AME	0.04~2.00	$Y=9305.67333X+801.62203$	0.9979	0.4	83.9	11.37
				0.8	109.2	7.65
				1.0	96.5	6.59
TEN	0.2~10.0	$Y=600.90859X+114.57324$	0.9991	1.0	89.6	6.56
				2.0	112.3	2.43
				5.0	93.4	4.09
TeA	1.0~50.0	$Y=206.75889X+381.74944$	0.9986	10	119.4	6.79
				20	90.6	4.57
				50	93.8	3.21

3 结论

本研究以玉米作为研究对象, 用 UPLC-Q-TOF/MS 自建数据库对玉米中 5 种负离子真菌毒素定量测定。该方法前处理操作简便、筛查高效、定量准确, 适用于大批量玉米中 5 种真菌毒素的筛查测定。AOH、AME、TeA、TEN 制定检出限及其限量标准刻不容缓, 应用 UPLC-Q-TOF/MS 建立了真菌毒素非靶向筛查数据库为玉米中的真菌毒素筛查检测领域发挥更大的作用, 也为粮食监管提供有力的分析手段。

参考文献

- [1] 章璐幸, 黄朝辉, 罗淑青, 等. 应用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法建立谷物中 18 种真菌毒素非靶向筛查数据库及确证方法[J]. 色谱, 2023, 41(1): 66-75.
ZHANG LX, HUANG ZH, LUO SQ, *et al.* Application of ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry to establish a database of 18 mycotoxins for non-targeted screening and a confirmatory method for 18 mycotoxins in cereals [J]. *Chin J Chromatogr*, 2023, 41(1): 66-75.
- [2] 吴振兴, 程果, 肖志西. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测番茄酱中 6 种交链孢霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 700-704.
WU ZX, CHENG G, XIAO XZ. Determination of 6 streptosporins in tomato paste by solid phase extractionsolid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(3): 700-704.
- [3] 毕珊, 吴玉田, 杨绍群, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定葵花籽中 4 种交链孢霉毒素的含量[J]. 理化检验化学分册, 2023, 59(9): 1008-1023.
BI S, WU YT, YANG SQ, *et al.* Determination of 4 cross-streptotoxin in

sunflower seeds by solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Phys Tests Chem Anal*, 2023, 59(9): 1008-1023.

- [4] 何迎迎. 粮食中交链孢霉毒素同时检测方法及膳食暴露评估研究[D]. 无锡: 江南大学, 2023.
HE YY. Study on simultaneous detection method and dietary exposure assessment of cross-streptotoxin in grain [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2023.
- [5] 黄晴雯. 真菌毒素的分析方法及风险评估研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2021.
HUANG QW. Analysis methods and risk assessment of mycotoxins [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2021.
- [6] 谭林, 陆阳, 王正坤. 玉米中真菌毒素检测技术的研究进展[J]. 粮食加工, 2023, 48(6): 111-114.
TAN L, LU Y, WANG ZK. Research progress in the detection technology of mycotoxins in maize [J]. *Grain Proc*, 2023, 48(6): 111-114.
- [7] 孙灵利, 王硕, 张洪磊. 番茄和樱桃中 4 种交链孢霉毒素的同位素稀释 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱同时测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(14): 1671-1675.
SUN LL, WANG S, ZHANG HL. Isotope dilution of four cross-linked mycotoxins in tomatoes and cherries QuEChERS-simultaneous determination by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2022, 32(14): 1671-1675.
- [8] 胡佳薇, 王彩霞, 田丽. 2013—2016 年陕西省市售食品中玉米赤霉烯酮的污染状况及暴露评估[J]. 卫生研究, 2017, 46(4): 585-588.
HU JW, WANG CX, TIAN L. Pollution status and exposure assessment of zearalenone in food sold in Shaanxi Province from 2013 to 2016 [J]. *J Hyg Res*, 2017, 46(4): 585-588.
- [9] 王丽英, 任贝贝, 路杨, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测玉米油中的黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3924-3928.
WANG LY, REN BB, LU Y, *et al.* Determination of aflatoxin and zearalenone in corn oil by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(12): 3924-3928.

- [10] SAUER DB, SEITZ LM, BURROUGHS R, *et al.* Toxicity of alternaria metabolites found in weathered sorghum grain at harvest [J]. *J Agric Food Chem*, 1978, 26(6): 1380–1383.
- [11] 陈月萌. 液相色谱法测定水果中链格孢霉素含量的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
CHEN YM. Determination of alternaria toxin in fruits by liquid chromatography [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2012.
- [12] GROSS M, ASAM S, RYCHLIK, *et al.* Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of the mycotoxin tenuazonic acid in sorghum grains and sorghum-based infant food [J]. *Mycotoxin Res*, 2017, 33(1): 75–78.
- [13] 郭诗曼, 冯启. 链格孢霉菌毒素的研究进展[J]. *广州化工*, 2020, 48(17): 9–12.
GUO SM, FENG Q. Research progress of streptomyces mycotoxin [J]. *Guangzhou Chem Ind*, 2020, 48(17): 9–12.
- [14] SEBASTIAN H, MARIAN B, SEYMA E, *et al.* Survey of alternaria toxin contamination in food from the German market using a rapid HPLC-MS/MS approach [J]. *Mycotoxin Res*, 2016, 32(1): 7–18.
- [15] 何国鑫, 邓青芳, 周欣. 链格孢霉素的分析方法及其毒理机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 342–346, 352.
HE GX, DENG QF, ZHOU X. Research progress of analytical methods and toxicological mechanisms for alternaria mycotoxins [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(4): 342–346, 352.
- [16] 邢家深, 张子庚, 郑睿行, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测婴幼儿奶粉中的 7 种链格孢霉素[J]. *色谱*, 2022, 40(2): 156–164.
XING JL, ZHANG ZG, ZHENG RH, *et al.* Determination of seven streptogramin toxins in infant milk powder by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2022, 40(2): 156–164.
- [17] 汪弘康, 高猛峰, 沈斯文, 等. 分散固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 7 种链格孢霉素的含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 1(10): 22–30.
WANG HK, GAO MF, SHEN SW, *et al.* Simultaneous determination of 7 streptospirins in fruits by dispersive solid phase extraction purification with ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 40(2): 156–164.
- [18] 张朱泽惠, 李明, 关桦楠. 基于纳米酶生物传感器检测真菌毒素的研究进展[J]. *分析测试学报*, 2024, 43(6): 945–954.
ZHANG ZZH, LI M, GUANG HN. Research progress of mycotoxin detection based on nanase biosensor [J] *J Instrum Anal*, 2024, 43(6): 945–954.
- [19] 孙青月, 余涛, 彭双凤. 荧光生物传感器用于多种真菌毒素同时检测的研究进展[J]. *材料导报*, 2024, 38(10): 1–10.
SUN QY, YU T, PENG SF. Research progress of fluorescence biosensor for simultaneous detection of mycotoxins [J]. *Mat Rep*, 2024, 38(10): 1–10.
- [20] 李红洲, 国果, 李博岩, 等. 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-高分辨质谱法分析 6 种李果实中的代谢物差异性[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(11): 63–73.
LI HZ, GUO G, LI BY, *et al.* The metabolites in 6 plum fruits analyzed by ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(11): 63–73.
- [21] 王海波, 袁光蔚, 莫紫梅, 等. 谷物中多种真菌毒素的 UPLC-Q-Trap MS 高通量筛查和定量方法的研究[J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(22): 91–100.
WANG HB, YUAN GW, MO ZM, *et al.* Study on UPLC-Q-Trap MS high-throughput screening and quantification methods for various mycotoxins in cereals [J]. *Food Res Dev*, 2018, 39(22): 91–100.
- [22] 周秀锦, 陈宇, 杨赛军, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法非靶向快速筛查进口粮谷中未知的农药残留[J]. *色谱*, 2017, 35(8): 787–796.
ZHOU XJ, CHEN Y, YANG SJ, *et al.* Non-targeted rapid screening of unknown pesticide residues in imported grain by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(8): 787–796.
- [23] 胡巧茹, 曹鹏, 丛中笑, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱对粮谷产品中 20 种真菌毒素的快速筛查和确证[J]. *色谱*, 2019, 37(11): 1241–1245.
HU QR, CAO P, CONG ZX, *et al.* Rapid screening and identification of 20 mycotoxins in grain products by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbital trap high resolution mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2019, 37(11): 1241–1245.
- [24] 王刘庆, 王多, 王蒙. 白光光照对交链孢毒素合成的调控研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(3): 658–664.
WANG LQ, WANG D, WANG M. Study on the regulation of white light on the synthesis of crossspore toxin [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(3): 658–664.
- [25] 张耀光, 翟志雷, 王谢, 等. 2020 年河南省玉米和大米中 4 种交链孢毒素污染情况调查[J]. *河南预防医学杂志*, 2022, 33(6): 421–424.
ZHANG YG, ZHAI ZL, WANG X, *et al.* Investigation on pollution of 4 cross-spore-toxins in maize and rice in Henan Province in 2020 [J]. *Henan J Pre Med*, 2022, 33(6): 421–424.
- [26] 官春波, 董峰光, 王朝霞. 烟台市售谷类及其制品中真菌毒素污染状况调查分析[J]. *食品研究与开发*, 2018, 16(39): 189–194.
GONG CB, DONG FG, WANG ZX. Investigation and analysis of mycotoxin contamination in cereals and their products in Yantai City [J]. *Food Res Dev*, 2018, 16(39): 189–194.
- [27] 孙政, 杨彦平, 崔小倩, 等. LC-MS/MS 法检测 4 种抗生素中的黄曲霉毒素[J]. *中国药物评价*, 2021, 38(4): 305–308.
SUN Z, YANG YP, CUI XQ, *et al.* Determination of aflatoxins in four antibiotics by LC-MS/MS [J]. *Chin Drug Eva*, 2021, 38(4): 305–308.
- [28] 邓涛, 杨华, 肖英平. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿辅食果泥中 5 种链格孢霉素[J]. *浙江农业学报*, 2022, 34(12): 2728–2739.
DENG T, YANG H, XIAO YP. Simultaneous determination of 5 streptomyces in infant supplementary food fruit puree by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Zhejiang Acta Agric*, 2022, 34(12): 2728–2739.
- [29] 蔡琛, 程先先, 吴学森. 固相萃取-同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定橄榄油中 4 种交链孢霉素含量及其分布状况[J]. *中国食物与营养*, 2023, 29(2): 15–19.
CAI C, CHENG XX, WU XS. Determination of the content and distribution of 4 cross-streptomyces in olive oil by solid phase extraction, isotope dilution ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin Food Nutr*, 2023, 29(2): 15–19.
- [30] 伊雄海, 时逸吟, 赵善贞, 等. 气相色谱-四极杆-飞行时间质谱法快速

- 筛查食品中 182 种农药残留[J]. 色谱, 2016, 34(11): 1097-1105.
- YI XH, SHI YY, ZHAO SZ, *et al.* Rapid screening of 182 pesticide residues in food by gas chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2016, 34(11): 1097-1105.
- [31] 潘孝博, 伊雄海, 时逸吟, 等. 液相色谱-高分辨飞行时间质谱法快速筛查食品中香港规例农药残留[J]. 分析化学, 2016, 44(7): 1125-1132.
- PAN XB, YI XH, SHI YY, *et al.* Rapid screening of Hong Kong regulation pesticide residues in food by ultra-high performance liquid chromatography- quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2016, 44(7): 1125-1132.
- [32] 章路幸, 周征, 曹琳, 等. 基于自建数据库的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法定量测定谷物中 7 种真菌毒素[J]. 色谱, 2023, 41(11): 1002-1009.
- ZHANG LX, ZHOU Z, CAO L, *et al.* Determination of seven mycotoxins in cereals by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry based on a self-constructed database [J]. *Chin J Chromatogr*, 2023, 41(11): 1002-1009.
- [33] 刘栓, 冯梦雨, 李晓敏. 高准确度液相色谱-同位素稀释质谱定值技术测定玉米粉中多种真菌毒素[J]. 分析化学, 2021, 49(4): 546-553.
- LIU S, FENG MY, LI XM. Determination of mycotoxins in corn meal by high accuracy liquid chromatography-isotope dilution mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2021, 49(4): 546-553.
- [34] 王洋. 蛋奶过敏原同位素稀释质谱定量方法研究及其应用[D]. 北京: 北京化工大学, 2014.
- WANG Y. Study on quantitative method of egg and milk allergen isotope dilution mass spectrometry and its application [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2014.
- [35] 尹锐, 孙鹏, 于卫松, 等. 气相色谱-四级杆飞行时间质谱分析烟草中 184 种农药残留[J]. 中国烟草科学, 2018, 39(6): 79-90.
- YI R, SUN P, YU WS, *et al.* Analysis of 184 pesticide residues in tobacco by gas chromatography-four-pole time-of-flight mass spectrometry [J]. *Chin Tobac Sci*, 2018, 39(6): 79-90.
- [36] 谭洁, 韦卓才, 梁善范, 等. 基质效应对测定农产品中农药残留影响的研究进展[J]. 食品工业, 2022, 43(5): 193-196.
- TAN J, WEI ZC, LIANG SF, *et al.* Research progress on the influence of matrix effects on the determination of pesticide residues in agricultural products [J]. *Food Ind*, 2022, 43(5): 193-196.
- [37] 刘栓. 粮食基体中真菌毒素的高准确度计量技术研究及标准物质研制[D]. 北京: 北京化工大学, 2019.
- LIU S. Research on high accuracy measurement technology of mycotoxins in grain matrix and development of standard materials [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2019.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)

作者简介



梁艳婷, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为食品、水质、空气理化检验。
E-mail: 214739065@qq.com



杨奉筠, 主任医师, 主要研究方向为疾病预防控制和理化检验。
E-mail: nmgyfj@sohu.com



柳明, 副高级工程师, 主要研究方向为食品理化检验。
E-mail: 275904916@qq.com