

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.01.021

刘笑笑, 丁辉, 吴福祥, 等. 杂质吸附固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定粮食中 15 种真菌毒素[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(1): 155-167.
LIU X X, DING H, WU F X, et al. Simultaneous determination of 15 mycotoxins in grains by solid phase extraction with impurity adsorption and UPLC/MSMS[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(1): 155-167.

杂质吸附固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定粮食中 15 种真菌毒素

刘笑笑^{1,2}, 丁辉^{1,2}, 吴福祥^{1,2}, 苗茜^{1,2}, 姬良亮^{1,2}, 彭涛^{1,2}, 张菁菁^{1,2}✉

(1. 兰州市食品药品检验所, 甘肃 兰州 741250;

2. 甘肃省种植中药材外源性污染物监测工程研究中心, 甘肃 兰州 741250)

摘要: 建立了同步检测粮食中 15 种真菌毒素的杂质吸附固相萃取-超高效液相色谱串联质谱方法。样品经 0.1% 酸化 84% 乙腈水溶液提取, 杂质吸附柱 Prime-HLB 净化后, 加入稳定同位素内标补偿基质效应干扰, 选择 Phenomenon Kinetex Bipheny 1100A 作为分离柱, 采用梯度洗脱, 超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-MS/MS) 检测, 内标法定量。结果表明, 15 种真菌毒素的线性相关系数均大于 0.996, 检出限为 0.2~15 μg/kg, 定量限为 0.8~30 μg/kg; 三种基质 3 个添加水平的回收率为 76.9%~116.1%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.4%~10%; 对玉米基质标准物质进行检测验证, 表明 8 种真菌毒素的检测值均在标示范围内; 采用本方法检测了市售粮食 135 批次, 共有 97 批样品检出真菌毒素, 检出率为 71%, 多毒素同时污染现象较为普遍。方法可用于粮食及其制品中真菌毒素的快速检测。

关键词: 杂质吸附固相萃取; 液相色谱-串联质谱法; 真菌毒素; 粮食; 稳定同位素内标

中图分类号: TS207.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)01-0155-13

网络首发时间: 2020-12-30 09:43:52

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.ts.20201229.0923.002.html>

Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Grains by Solid Phase Extraction with Impurity Adsorption and UPLC/MSMS

LIU Xiao-xiao^{1,2}, DING Hui^{1,2}, WU Fu-xiang^{1,2}, MIAO Qian^{1,2},
JI Liang-liang^{1,2}, PENG Tao^{1,2}, ZHANG Jing-jing^{1,2}✉

(1. Lanzhou Institute of Food and Drug Control, Lanzhou, Gansu 740050, China; 2. Engineering Research Center for Monitoring Exogenous pollutants in planting Chinese medicinal in Gansu, Lanzhou, Gansu 740050, China)

Abstract: To establish a method for the simultaneous determination of 15 mycotoxins in grains by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC/MSMS). Samples were extracted by acidified acetonitrile solution, purified by impurity adsorption column prime HLB, and compensated for matrix effect interference by adding stable isotope internal standard. Phenomenon Kinetex Bipheny 1100A column was used as separation column, gradient elution, UPLC-MS/MS for detection and internal standard

收稿日期: 2020-06-14

基金项目: 甘肃省市场监督管理局科技计划项目 (2018GSFDA043); 甘肃省药品监督管理局科技项目 (2019GMP007)

Supported by: Science and Technology Project of Gansu Provincial Administration of market supervision (No. 2018GSFDA043); Science and Technology Project of Gansu Provincial Drug Administration (No. 2019GMP007)

作者简介: 刘笑笑, 女, 1989 年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为食品安全检测技术。E-mail: 371676144@qq.com.

通讯作者: 张菁菁, 女, 1986 年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为食品营养与安全检测技术。E-mail: 61034527@qq.com.

method for quantification. The results showed that the linear correlation coefficient of 15 mycotoxins was greater than 0.996, the detection limit was 0.2-15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the quantitative limit was 0.8- 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the recovery of three levels of three kinds of matrixes was 76.9%-116.1% and the RSD was 1.4%- 10%. The certified reference materials of corn matrix were The results from test and verification of corn matrix reference materials showed that the detection values of 8 mycotoxins were in the marked range. This method has been used to detect 135 batches of food sold in the market, 97 batches of samples were detected have mycotoxin with a detection rate of 71%, multi toxin simultaneous pollution was common. The method is simple, rapid and reliable, and can be used for the rapid and accurate detection of 15 mycotoxins in grains.

Key words: solid phase extraction with impurity adsorption; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC/MSMS); mycotoxins; grains; stable isotope internal standard

真菌毒素是由产毒真菌在适宜的环境条件下产生的有毒次生代谢产物, 目前已知的真菌毒素有 400 多种^[1]。粮食作物比较容易被真菌霉毒素污染, 对人类健康影响较大的有黄曲霉毒素(AFT)、赭曲霉毒素 A (OTA)、玉米赤霉烯酮 (ZEN) 和脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 等^[2], 超过一定摄入量后会损坏人的肝功能、致癌、致畸并诱发免疫抑制性疾病^[3]。世界卫生组织已将真菌毒素纳入食品安全体系重点监测对象^[4], 我国 GB2761—2017《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》也对上述几种真菌毒素在食品中的限量指标有严格的规定^[5-8]。在自然情况下作物常常遭受多种真菌毒素污染, 根据国家现行标准规定, 需要同时采用几种检测方法进行多次实验分析, 才能测得不同真菌毒素的含量, 测定方法不仅繁琐, 而且效率较低, 因此, 亟需建立多种真菌毒素同步检测方法^[9-12]。

Anastassiades 等提出 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) 法, 即分散固相萃取法, 但是针对复杂基质中多种毒素的提取仍有不足, 杂质吸附固相萃取法被广泛应用于食品中有机残留污染物的检测, 其中包括复杂的粮食及其制品^[10-13], 液相色谱-串联质谱技术 (LC-MSMS) 具有更高的选择性和灵敏度, 逐渐成为同步检测多种真菌毒素的主要手段^[15]。

本研究将样品经过简单提取和稀释, 利用杂质吸附固相萃取净化, 优化了液相色谱与质谱条件, 利用稳定同位素内标, 建立了 UPLC-MS-MS 检测粮食中多种真菌毒素的方法^[12,14-16]。本方法简单、快速、通量高、成本低, 适用于大批量粮

食样品中多毒素的快速、准确定量检测, 可为粮食中真菌毒素的检测和污染风险评估工作提供技术保障, 减少因真菌毒素残留带来的食品安全问题。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UPLC-MS/MS 液相色谱-三重串联四级杆质谱仪, 配电喷雾离子源: 美国安捷伦 1290-G6460; Milli-Q 超纯水仪: 德国默克密理博公司; 氮吹仪: 美国 Organomation 公司; Eppendorf5810R 高速冷冻离心机: 德国艾本德曼公司; BSA2202S- CW 分析天平: 梅特勒公司。

15 种真菌霉毒素: 黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-deoxynivalenol, 3-AcDON)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-deoxynivalenol, 15-AcDON)、展青霉毒素 (patulin, PAT)、玉米赤霉烯酮 (zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素 (orchatoxin A, OTA)、T2 毒素 (T-2)、HT2 毒素 (HT-2)、伏马毒素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁)、伏马毒素 B₂ (fumonisin B₂, FB₂)、伏马毒素 B₃ (fumonisin B₃, FB₃): 奥地利 Biopure 和美国 Sigma 公司; [¹³C₁₅]DON、[¹³C₁₇]-3-AcDON、[¹³C₁₇]AFB₁、[¹³C₁₇]AFB₂、[¹³C₁₇]AFG₁、[¹³C₁₇]AFG₂、[¹³C₃₄]FB₁、[¹³C₂₀]OTA、[¹³C₃₄]FB₂、[¹³C₂₄]T-2、[¹³C₂₂]HT-2、[¹³C₁₈]ZEN12 种全碳同位素内标溶液: 奥地利 Biopure 公司。

乙腈、甲醇、甲酸均为色谱纯：德国默克公司；乙酸铵（分析纯）：国药集团；乙酸（色谱纯）：赛默飞；0.22 μm 水系滤膜：天津津滕公司；实验室用水为 Milli-Q 超纯水。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液配制

真菌毒素标准溶液配制：分别精密量取 OTA、AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、DON、ZEN、FB₁、FB₂、FB₃、T-2、HT-2、PAT、3-AcDON、15-AcDON 毒素标准品 1.000 mL，用乙腈各自定容至 10 mL 配制标准储备液，分别移取上述标准储备液适量用乙腈稀释成浓度分别为 100 ng/mL，10 ng/mL，3.0 ng/mL，10 ng/mL，3.0 ng/mL，500 ng/mL，250 ng/mL，500 ng/mL，500 ng/mL，500 ng/mL，500 ng/mL，500 ng/mL，200 ng/mL，500 ng/mL，500 ng/mL 的混合标准中间液。加入一定浓度同位素内标，配置成系列混合标准曲线。

1.2.2 样品前处理

制备：抽取有代表性的样品，用四分法缩减取 200 g，粉碎后过 0.4 mm 孔径的分析筛，混匀，装入自封袋中，避光，备用。

提取：准确称取粉碎均匀的样品 5 g（精确至 0.001 g），于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 1% 乙酸酸化的 84% 乙腈水溶液溶解，匀浆 1 min，加入 3 g 无水硫酸镁、2 g 氯化钠脱水盐提取，震荡

提取 20 min，以提高提取率，震荡后立即涡旋混合 1 min，在 4 °C、4 900 r/min 离心 10 min，使得完全分离，取 10.0 mL 上清液待净化。

净化：加入装有不同填料的净化管中，HLB 柱先活化，再移取 10 mL 上清液过柱，弃去净化液，淋洗一边，甲醇洗脱，收集洗脱液，加入 12 种同位素内标混合液；Prime HLB 柱直接移取 10 mL 上清液过柱，收集净化液，加入 12 种同位素内标混合液；分别涡旋震荡混匀，于 40 °C 水浴，氮吹至近干，1.00 mL 甲醇复溶，经 0.22 μm 滤膜过滤，上机测定。对比不同组成及配比的净化柱，以目标物的回收率为评价指标。

1.2.3 液相色谱-串联质谱条件

1.2.3.1 液相色谱条件 Kinetex 2.6 μm Biphenyl 1100A 色谱柱（LCColumn 50×2.1 mm，2.7 μm，phenomenon），流动相：A：0.1%（V/V）甲酸的 2 mmol/L 甲酸铵溶液、B：甲醇，流速：0.3 mL/min，进样体积：5 μL，柱温：35 °C。液相色谱梯度洗脱程序如表 1 所示。

1.2.3.2 质谱条件 电喷雾离子（electrospray ionization, ESI）源：正离子、负离子分别扫描；离子源温度：正离子模式 650 °C，负离子模式 600 °C；气帘气：35 psi；碰撞气：中等；电喷雾电压：正离子模式：5 000，负离子模式：-4 500；Gas1：60，Gas2：65；其他质谱条件参见表 2。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution program

时间/min	0	2	2.1	6	10	14	15	16	16.1	17	19	20
流动相 A/%	90	88	75	50	45	35	22	20	15	5	90	90
流动相 B/%	10	12	25	50	55	65	78	80	85	95	10	10

表 2 质谱条件

Table 2 Mass spectrometry conditions

时间段	序号	名称	保留时间/min	Fragment	母离子/定量子 离子质荷比 (m/z)		母离子/定性子 离子质荷比 (m/z)		模式	内标物
					m/z	碰撞能/eV	m/z	碰撞能/eV		
0~4.50	1	展青霉毒素	3.568		152.8/109.0*		152.8/81.0		[M-H] ⁻	-
4.51~5.8	2	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	4.876	90	297/249*	12	297/231	14	[M+H] ⁺	[¹³ C ₁₅]DON
			4.797	90	312.2/263.1*	12	-	-	[M+H] ⁺	-
5.81~7.25	3	3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	6.828	106	339.2/231.1*	12	339.2/213.1	19	[M+H] ⁺	[¹³ C ₁₇]-3-AcDON
			6.821	106	356.2/245.0*	12	-	-	-	-
	4	15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	6.814	106	339.2/137.0*	12	339.2/261.1	19	[M+H] ⁺	[¹³ C ₁₇]-3-AcDON

续表 2

时间段	序号	名称	保留时间/min	Fragment	母离子/定量离子		母离子/定性离子		模式	内标物
					离子质荷比 (m/z)		离子质荷比 (m/z)			
					m/z	碰撞能/eV	m/z	碰撞能/eV		
7.26~10.59	5	黄曲霉毒素 B ₁	8.990	160	313.2/285.1*	22	313.2/241.1	38	[M+H] ⁺	[[¹³ C ₁₇]AFB ₁
		[¹³ C ₁₇]AFB ₁	8.898	160	330.1/301.1*	22	-	-	[M+H] ⁺	-
	6	黄曲霉毒素 B ₂	8.429	160	315.2/287.1*	24	315.2/259.1	30	[M+H] ⁺	[¹³ C ₁₇]AFB ₂
		[¹³ C ₁₇]AFB ₂	8.421	160	332.2/303.0*	21	-	-	[M+H] ⁺	-
	7	黄曲霉毒素 G ₁	7.954	150	329.2/243.1*	25	329.2/311.1	20	[M+H] ⁺	[¹³ C ₁₇]AFG ₁
		[¹³ C ₁₇]AFG ₁	7.950	150	346.1/257.1*	25	-	-	[M+H] ⁺	-
8	黄曲霉毒素 G ₂	7.549	150	331.2/313.1*	23	331.2/245.1	30	[M+H] ⁺	[¹³ C ₁₇]AFG ₂	
	[¹³ C ₁₇]AFG ₂	7.551	160	348.1/330.1*	23	-	-	[M+H] ⁺	-	
10.60~13.9	10	赭曲霉毒素 A	11.562	100	404.1/358*	18	404.1/239	40	[M+H] ⁺	[¹³ C ₂₀]OTA
		[¹³ C ₂₀]OTA	11.568	100	424.1/250.1*	18	-	-	[M+H] ⁺	-
	11	伏马毒素 B ₂	12.287	180	706.5/336.3*	45	706.5/318.3	45	[M+H] ⁺	[¹³ C ₃₄]FB ₂
		[¹³ C ₃₄]FB ₂	12.283	180	740.5/358.5*	43	-	-	[M+H] ⁺	-
	12	伏马毒素 B ₃	12.262	180	706.5/336.0	45	706.5/318.3	45	[M+H] ⁺	[¹³ C ₃₄]FB ₃
	13	T-2 毒素	13.048	110	484.3/305.1*	13	484.3/185.1	20	[M+Na] ⁺	[¹³ C ₂₄]T-2
[¹³ C ₂₄]T-2		13.046	110	508.3/322.1*	13	-	-	[M+Na] ⁺	-	
14	HT-2 毒素	11.240	100	442.2/263.1*	14	442.2/215.1	16	[M+Na] ⁺	[¹³ C ₂₂]HT-2	
	[¹³ C ₂₂]HT-2	11.238	100	464.3/278.1*	14	-	-	[M+Na] ⁺	-	
13.91~14.9	15	玉米赤霉烯酮	14.747	190	317.1/175*	25	317.1/130.8	33	[M-H] ⁻	[¹³ C ₁₈]ZEN
		[¹³ C ₁₈]ZEN	14.758	190	330.1/301.1*	22	-	-	[M-H] ⁻	-

注：*为定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

采用直接进样的方式，分别对 15 种浓度为 100 μg/L 的目标化合物优化其质谱条件。本试验分别在 ESI⁺模式和 ESI⁻模式下对 15 种真菌毒素进行全扫描，大多数化合物在 ESI⁺正极模式下都显示了大量的[M+H]⁺离子，HT-2 毒素和 T-2 毒属于单端孢霉烯族毒素，其母离子都形成了[M+Na]⁺的形式，[M+Na]⁺的结合物灵敏度更高，因此上述 2 种毒素选择[M+Na]⁺作为母离子。试验表明，玉米赤霉烯酮和展青霉毒素在 ESI⁻模式下响应更显著，其余 13 种毒素均在 ESI⁺下有响应，确定母离子后，母离子进入二级质谱得到各目标分析物碎片离子信息，确定定量离子对和定性离子对，优化各质谱参数，考虑到正负离子模式频繁转换易造成仪器不稳定，因此选择分段采集模式试验。15 种真菌毒素优化的质谱参数见表 2，MRM 色

谱图见图 1。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 流动性的选择

由于电喷雾质谱的电离是在溶液状态下电离，因此流动相的种类和比例不仅影响目标化合物的保留时间和峰形，还会影响到目标化合物的离子化效率，从而影响灵敏度，本文考察了对比流动相 A：0.1%甲酸水溶液-甲醇，B：乙酸铵 0.1%甲酸水溶液-甲醇，C：甲酸铵 0.1%甲酸水溶液-甲醇对 15 种真菌毒素质谱响应的影响。结果表明，A 为流动相，各毒素均有质谱响应。当流动相中存在乙酸铵且浓度增至 5 mmol/L 时，虽然大部分对照品离子响应加强，但 FB₁ 和 FB₂ 无响应。用 C 作为流动相时，各真菌毒素的色谱峰信号强度明显高于 A 和 B，本文最终选择 2 mmol/L 甲酸铵 0.1%甲酸水溶液-甲醇作为流动相。

2.2.2 色谱柱的选择

同分异构体有相同的母离子和子离子，在

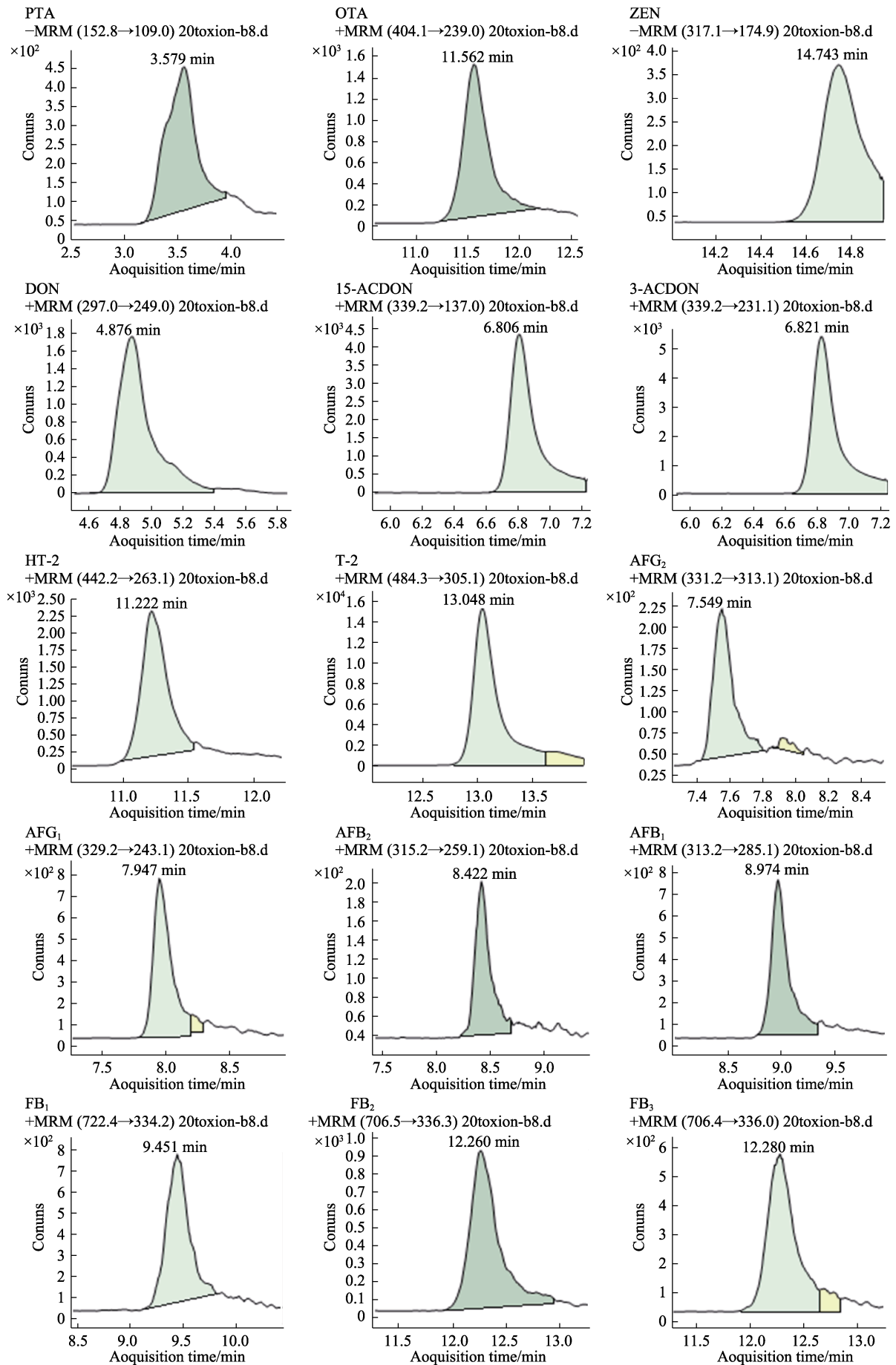


图 1 15 种真菌毒素的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of the 15 mycotoxins

质谱检测上会产生干扰, 因此必须在色谱上实现基线分离才能准确的定性、定量分析。本研究比较了不同类型的 C18 色谱柱对两种毒素的分离效果, 考察 Agilent ZORBAX Elipse Plus C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Waters BEH C18 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Phenomenon Kinetex Bipheny 1100A 色谱柱 (LCColumn 50×2.1 mm, 2.7 μm), 3 种色谱柱对 15 种真菌毒素的

分离。Phenomenon Kinetex Bipheny 1100A 色谱柱对 15 种真菌毒素达到基线分离、峰形尖锐。同时也可以看出 Phenomenon Kinetex Bipheny 1100A 色谱柱在 20 min 的洗脱梯度内对多数毒素能够实现较好地分离 (见图 2 中 C), 因此最终选择 Phenomenon Kinetex Bipheny 1100A 色谱柱 (LCColumn 50×2.1 mm, 2.7 μm)。

试验发现, 流动相起始的比例对目标物的分

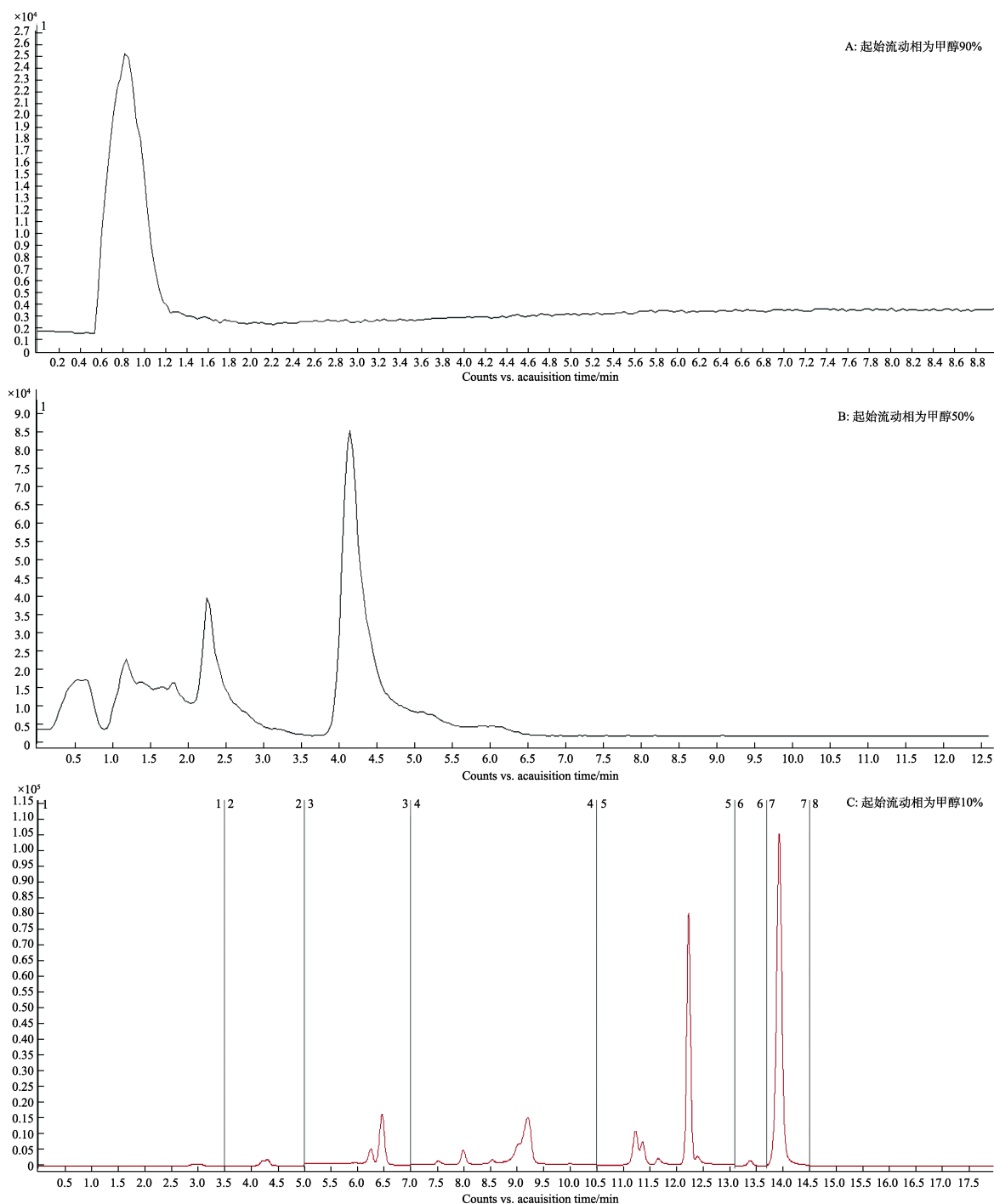


图 2 不同初始流动相对真菌毒素出峰的影响

Fig.2 Effects of that gradient condition on the peak of the mycotoxins

注: 图 A~C 流动相起始比例分别为: 2 mmol/L 甲酸铵 0.1%甲酸水: 甲醇=10%: 90%、50%: 50%、90%: 10%

离有较大的影响,图 2 为三种梯度条件下 15 种真菌毒素的总离子流图。由图 2 可知, A (起始比例为甲醇 90%) 和 B (起始比例为甲醇 50%) 条件下,所有目标物出峰时间重叠,影响峰形,且无法分段采集,导致目标物响应降低。当水相起始比例为 90%,按流动相梯度洗脱时(见表 1),各化合物在 15 min 内依次分离(见图 2 中 C),泵压在 20 min 时达到平衡。

2.3 前处理条件优化

2.3.1 提取条件优化

2.3.1.1 提取溶剂的选择 真菌毒素主要采用甲醇、乙腈或这两种溶剂与水以不同比例混合后作为提取剂。由于不同基质适应性不同,且 15 种真菌毒素理化性质差异较大,选择合适 15 种真菌毒素的提取溶剂至关重要,经查阅文献和标准,比较了 8 种较为常见的提取溶剂: 80% 甲醇 (MeOH)、50% 乙腈 (ACN)、70% ACN、84% ACN、80% MeOH 加入 1% 乙酸 (AA)、50% ACN 加入 1% AA、70% ACN 加入 1% AA、84% ACN 加入 1% AA 对中药材中 15 种真菌霉毒素的提取效率,结果表明,大部分真菌毒素乙腈的提取率要显著

优于甲醇的,乙酸的加入对 ZEN、OTA、FB₃、DON、HT-2 的提取率有显著提高,综合考虑 8 种提取剂对 15 种真菌霉毒素的提取效果,选择 84% ACN+1% AA 作为提取剂。

2.3.1.2 助提取剂的选择 本试验中,选择 84% ACN 加入 1% AA 作为提取剂,向提取液中加入助提剂,可以提高提取效率。选择无机盐 NaCl+MgSO₄ 作为本试验的助提剂,可以促进分层,促使目标物进入有机相。分别考察当添加量为 NaCl (0、1、2、3、4、5 g) 和 MgSO₄ (0、1、2、3、4、5 g) 的添加量对提取效率的影响。结果表明:当 NaCl 为 2 g 时盐析效果最好,大部分真菌毒素能达到较高回收率,NaCl 添加量再增加时提取率无显著变化,见图 4; MgSO₄ 添加量为 3 g 时除水效果较好,大部分真菌毒素能达到较高回收率, MgSO₄ 添加量再增加时提取率无显著变化,见图 5; 因此,综合考虑助提剂无机盐 NaCl+MgSO₄ 的添加量对 15 种真菌霉毒素的提取效果,选择 2 g NaCl+3 g MgSO₄ 作为本试验的助提剂。

2.3.2 净化条件的优化

本研究以粮食为基质,利用 84% ACN 加入

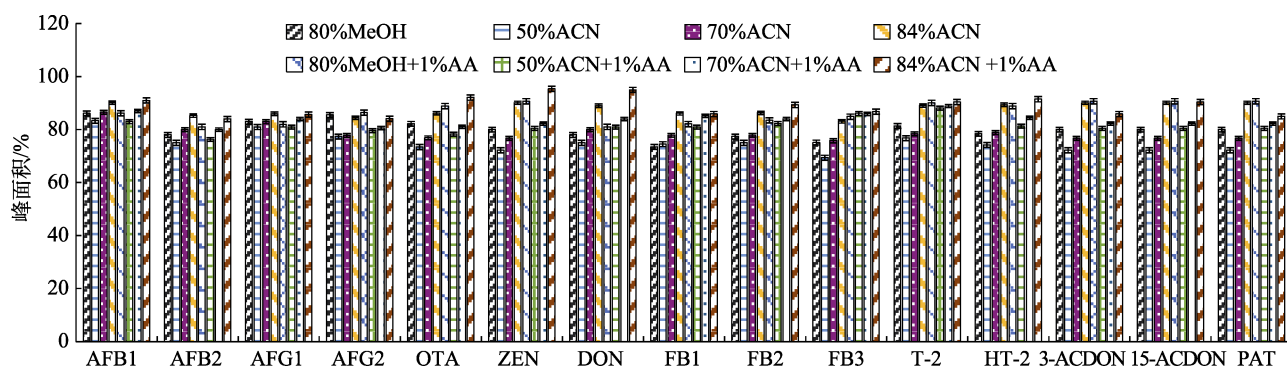


图 3 不同提取溶剂对 15 种真菌毒素的回收率的影响

Fig.3 Effect of different extraction solvents on the recoveries of 15 mycotoxins

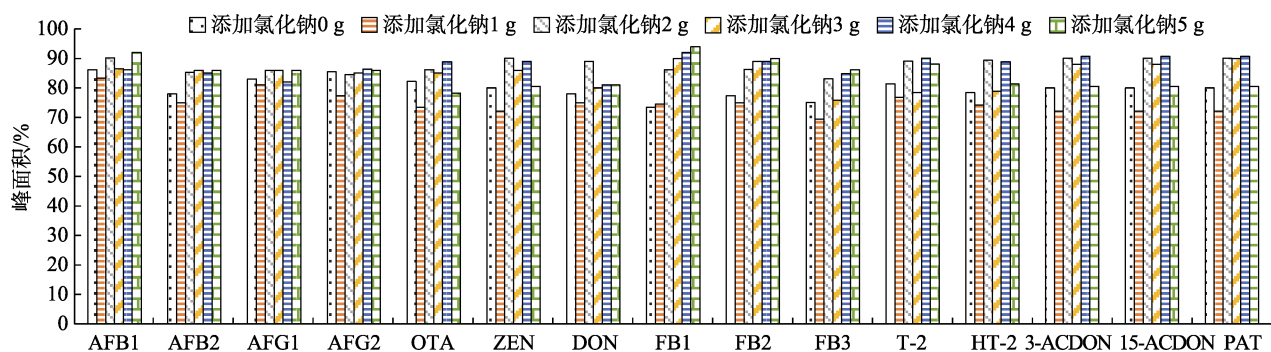


图 4 不同 NaCl 添加量对 15 种真菌毒素的回收率的影响

Fig.4 Effect of different NaCl add on the recoveries of 15 mycotoxins

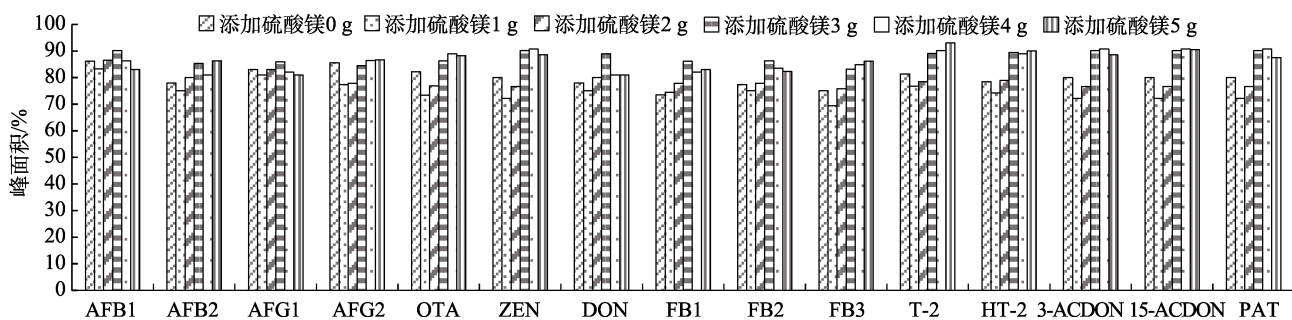


图 5 不同 MgSO₄ 添加量对 15 种真菌毒素的回收率的影响

Fig.5 Effect of different MgSO₄ add on the recoveries of 15 mycotoxins

1%AA 作为提取剂，匀浆提取，并加入 2 gNaCl 和 3 gMgSO₄ 助提剂，充分震荡萃取后，3 900 r/min 离心，移取上清液，考察 2 种不同的固相萃取净化柱，考察添加标准下多种真菌毒素的回收率。HLB 为反相固相萃取柱，对目标物进行吸附，将杂质进行淋洗除去，而 Prime-HLB 主要是将杂质吸附使目标物流出，不需要平衡活化可直接上样，简化和加速 SPE 流程。结果发现，2 种净化柱对 15 种真菌毒素回收率较好，其中 Prime-HLB 对这 2 类真菌毒素的加标回收率范围为 78.9%~101.1%，相对标准偏差在 0.9%~5.1%，HLB 柱净化获得的回收率在 58.5%~94.2%，相对标准偏差在 2.3%~12.0%。对比 2 种固相萃取柱，杂质吸附型固相萃取柱除 HT-2 毒素外，回收率均优于目标物吸附性固相萃取柱，主要是由于 HLB 柱并非对特定毒素具有专一吸附性，所以回收率的损失在净化过程中的目标物吸附以及杂质淋洗过程中都容易产生，具体结果见表 3。而玉米赤霉烯酮类毒素则需在酸性条件下净化获得的回收率较高，因此本试验选择 Prime- HLB 柱作为净化柱。

2.4 基质效应

基质效应是在提取基质中的目标物时，基质中的干扰物影响目标化合物的离子化，主要源于样品中的内源性组分和样品处理后引入的杂质。在 ESI 离子化模式下，化合物的质谱响应容易受到基质的干扰，影响定量检测的准确性。13C 标记的稳定同位素内标与目标物有相同结构、化学性质和色谱质谱行为，因此也具有相同的基质效应，在进样之前加入稳定同位素内标能够补偿进样体积、ESI 源的离子化效率、离子传输导致的目标物偏移，保证了质谱分析结果的准确性和稳定性。本研究将毒素的混合标准储备液用空白

表 3 不同净化柱对 15 种真菌毒素的回收率的影响

Table 3 Effect of different Multifunction Clean-up Column on the recoveries of 15 mycotoxin %

序号	化合物	HLB		Prime-HLB	
		回收率	RSD	回收率	RSD
1	展青霉毒素	78.0	4.2	90.2	5.1
2	黄曲霉毒素 B ₁	77.0	2.3	90.2	3.1
3	黄曲霉毒素 B ₂	65.0	4.2	85.3	4.5
4	黄曲霉毒素 G ₁	81.0	11.3	86.0	2.4
5	黄曲霉毒素 G ₂	64.0	9.3	84.5	4.2
6	赭曲霉毒素 A	73.4	3.5	86.2	3.5
7	玉米赤霉烯酮	86.8	7.8	96.1	7.4
8	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	72.0	4.5	89.0	0.9
9	3-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	75.0	10.3	86.1	1.5
10	15-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	77.1	11.3	86.3	1.8
11	伏马毒素 B ₁	67.1	12.0	83.1	2.4
12	伏马毒素 B ₂	68.9	8.4	78.9	2.3
13	伏马毒素 B ₃	58.5	10.9	83.4	5.1
14	T-2 毒素	92.3	7.9	101.1	3.9
15	HT-2 毒素	94.2	9.6	90.1	2.4

样品经处理所得提取液和甲醇溶液分别稀释，制得一定质量浓度的 2 种标准工作液，用相对响应值法（基质效应=空白基质标准响应值/纯溶剂标准响应值×100%，基质效应大于 1 时，表现为基质增强效应；基质效应小于 1 时，为基质抑制效应）评价了 15 种真菌毒素在玉米、小麦和藜麦中的基质效应见表 4。结果表面黄曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇毒素及伏马毒素等在三种基质中均有较强的基质抑制效应，T-2 毒素和 HT-2 毒素在三种基质中均有基质增强效应，影响结果的准确性。因此，在所有样品和标液中加入稳定同位素，以毒素峰面积与对应毒素内标的峰面积比进行定量从而弥补真菌毒素的基质效应影响，考虑到 15-AcDon 市面上没有稳定同位素出售，选择

表 4 玉米、小麦和藜麦的基质效应
 Table 4 Matrix effects of 15 mycotoxins
 in maize, wheat and quinoa

序号	化合物	玉米	小麦	藜麦
1	展青霉毒素	1.02	1.03	0.99
2	黄曲霉毒素 B ₁	0.67	0.81	0.80
3	黄曲霉毒素 B ₂	0.82	0.83	0.83
4	黄曲霉毒素 G ₁	0.83	0.92	0.93
5	黄曲霉毒素 G ₂	0.84	0.82	0.88
6	赭曲霉毒素 A	1.03	1.02	0.99
7	玉米赤霉烯酮	1.02	1.01	0.87
8	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.88	0.88	0.92
9	3-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.97	0.92	0.91
10	15-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.93	0.93	0.94
11	伏马毒素 B ₁	0.94	0.91	0.90
12	伏马毒素 B ₂	0.92	0.87	0.95
13	伏马毒素 B ₃	0.91	0.82	0.93
14	T-2 毒素	1.01	1.04	1.11
15	HT-2 毒素	1.02	1.14	1.01

[¹³C₁₇-3-AcDon 作为内标物质。本实验采用的分散固相萃取技术提取 15 种真菌毒素的提取率很

高, 提取回收率基本在 80%~120%之间, 同时稳定同位素内标价格昂贵, 因此选择在上机进样前加入稳定同位素。相比于样品提取前加入同位素内标, 本方法大大减少了稳定同位素的使用量, 节约了检测成本, 又能够有效地补偿基质效应的影响, 保证检测结果的准确。

2.5 方法学考察

2.5.1 方法的线性范围及检出限

将 2.1 中对照品配制标准曲线, 向空白玉米、小麦及藜麦样品中添加不同量的真菌毒素标准溶液, 按照样品处理方法进行前处理和检测, 采用空白基质液逐级稀释方法获得各真菌毒素的检出限 (S/N=3) 和定量限 (S/N=10), 表 5 列出 15 种真菌毒素的线性范围、检出限、定量限。在各自的线性范围内, 15 种真菌毒素线性良好, 相关系数 R₂ 均大于 0.996, 检出限和定量限均低于欧盟及我国规定的粮食中真菌毒素的限量标准, 满足限量检出要求。

表 5 15 种真菌毒素的线性范围、相关系数、检出限、定量限

Table 5 Linear relationships, LODs and LOQs of 15 mycotoxins

序号	化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围/(ng/mL)	方法检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
1	展青霉毒素	Y=3.549 380 4*X	0.999 4	10~200	10	20
2	黄曲霉毒素 B ₁	Y=832.382 60*X	0.998 7	0.2~10	0.5	1.0
3	黄曲霉毒素 B ₂	Y=511.609 70*X	0.998 2	0.05~3.0	0.2	0.5
4	黄曲霉毒素 G ₁	Y=749.898 29*X	0.999 6	0.2~10	0.4	0.9
5	黄曲霉毒素 G ₂	Y=495.233 45*X	0.999 8	0.05~3.0	0.3	0.8
6	赭曲霉毒素 A	Y=239.466 19*X	0.999 5	2~100	1.0	2.5
7	玉米赤霉烯酮	Y=16.600 905*X	0.999 5	5~250	5.0	8.0
8	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Y=49.823 440*X	0.998 5	10~500	8.0	20
9	3-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Y=120.580 91*X	0.999 5	10~500	8.0	20
10	15-乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Y=97.666 629*X	0.998 5	10~500	5.0	10
11	伏马毒素 B ₁	Y=18.239 267*X	0.999 8	10~500	5.0	15
12	伏马毒素 B ₂	Y=32.466 465*X	0.998 4	10~500	10	20
13	伏马毒素 B ₃	Y=19.628 085*X	0.997 8	10~500	15	30
14	T-2 毒素	Y=463.510 38*X	0.996 9	5~500	5.0	20
15	HT-2 毒素	Y=30.391 684*X	0.998 2	5~500	5.0	25

2.5.2 不同基质回收率及精密度

分别取藜麦、小麦、玉米的空白基质, 添加低、中、高三个水平的 15 种真菌毒素混合标准溶液, 进行前处理, 测定回收率, 每个水平均测定 6 次, 计算 RSD, 结果见表 5, 15 种真菌毒素 3 个添加水平的回收率为 76.9%~116.1%, RSD 为

1.4%~10%。

为了进一步验证方法准确性, 采用建立的检测方法对玉米基质标准物质 (FAPAS04319 玉米) 进行检测验证。验证结果如表 7 所示, 8 种真菌毒素的检测值均在标示范围内, 表明本文所建立方法准确可靠。

表 6 玉米、小麦和藜麦中 15 种真菌毒素的加标回收率和精密度 (n=6)

Table 6 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of 15 mycotoxins in Maize, Wheat and Quinoa sample (n=6)

	添加水平/(ug/kg)	玉米回收率/%	RSD/%	小麦回收率/%	RSD/%	藜麦回收率/%	RSD/%
展青霉毒素	50	87.4	5.6	88.5	4.7	88.7	4.3
	20	81.2	6.8	83.1	5.9	84.5	5.6
	5	79.5	8.3	78.9	9.0	79.0	7.4
黄曲霉毒素 B ₁	50	101.3	3.2	96.1	3.8	98.7	2.8
	20	94.2	4.2	90.7	4.9	91.3	3.8
	5	83.2	6.7	84.1	7.1	85.4	8.2
黄曲霉毒素 B ₂	50	98.3	4.1	92.1	5.2	94.3	4.3
	20	91.8	7.4	85.9	8.1	87.3	3.5
	5	84.2	8.9	78.2	10	83.5	9.0
黄曲霉毒素 G ₁	50	98.8	5.3	95.6	5.0	99.4	7.4
	20	93.2	6.1	90.8	6.7	90.2	6.5
	5	83.1	10	80.6	9.1	82.3	10
黄曲霉毒素 G ₂	50	96.3	4.5	93.2	5.7	95.6	6.3
	20	92.8	8.9	86.1	7.8	90.6	8.0
	5	83.8	10	81.1	10	83.4	8.8
赈曲霉毒素 A	50	101.1	3.1	96.4	4.2	99.8	3.9
	20	92.9	7.4	90.1	6.8	91.9	6.0
	5	85.2	8.4	80.6	8.4	85.4	7.4
玉米赤霉烯酮	50	104.3	2.0	98.3	1.9	102.6	3.2
	20	93.4	3.9	89.1	4.8	92.3	5.2
	5	86.3	7.8	82.6	7.1	85.3	8.7
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	50	102.8	1.4	116.1	1.9	98.4	3.3
	20	92.2	4.5	88.6	5.2	90.1	5.2
	5	86.8	6.2	81.9	6.6	86.6	7.1
3 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	50	95.5	1.8	92.6	2.3	95.2	3.0
	20	90.5	5.4	88.8	3.9	90.2	6.7
	5	83.0	7.6	79.7	6.7	84.1	9.3
15 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	50	95.4	2.4	96.5	2.8	96.1	2.8
	20	90.2	5.3	89.4	4.1	92.3	4.3
	5	84.3	6.4	78.4	8.4	84.1	3.2
伏马毒素 B ₁	50	94.3	5.3	88.2	6.3	90.4	2.2
	20	88.4	5.2	81.7	7.2	81.6	3.4
	5	79.4	8.3	77.5	9.6	78.4	3.1
伏马毒素 B ₂	50	89.4	6.4	87.4	4.4	89.1	5.2
	20	80.4	8.1	81.3	8.3	80.3	3.9
	5	78.4	9.8	76.9	9.1	77.6	9.0
伏马毒素 B ₃	50	86.2	5.2	82.1	4.9	84.9	7.9
	20	79.1	7.4	84.8	8.4	81.6	9.0
	5	80.2	9.6	78.3	9.7	78.4	9.3
T-2 毒素	50	93.4	2.1	90.3	2.8	92.3	3.4
	20	89.4	5.8	88.4	5.1	89.3	4.5
	5	81.4	7.1	81.1	6.1	79.1	4.6
HT-2 毒素	50	95.4	3.1	93.2	3.3	93.4	4.1
	20	90.2	5.0	89.1	5.4	90.1	4.8
	5	82.3	6.7	82.2	7.7	83.2	5.0

表 7 基质标准物质玉米中 8 种真菌毒素的检测结果

Table 7 Analytical results for the determination of 8 mycotoxins in maize reference materials

真菌毒素	FB ₁	FB ₂	T-2	HT-2	ZEN	OTA	AFB ₁
测定结果	697	321	123	91.2	261	4.2	5.83
标准偏差 (n=2)	2.1	1.7	1.6	0.9	6.5	0.4	0.4
证书标示值	745	330	150	106	275	4.5	5.8
证书范围 (Z)	551.4~938.6	238.5~421.5	116.3~183.7	82.7~126.9	219.8~330.2	3.57~5.43	4.61~6.99

2.6 实际样品测定

随机购买市售粮食 135 批, 在本文优化条件下进行测定, 共有 97 批样品检出真菌毒素, 检出率为 71%, 其中小麦中主要的污染毒素为 DON、3-AcDON、15-ACDON、ZEN、FB₁ 和 FB₂, 玉米中主要污染毒素为 DON、15-AcDON、ZEN、FB₁, 藜麦中主要污染毒素为 DON、OTA 和 ZEN, 多毒素同时污染现象较为普遍。最大浓度分别为

小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 1 425 μg/kg、3 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 512.0 μg/kg、玉米中玉米赤霉烯酮为 189.1 μg/kg、15 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇为 451.0 μg/kg, 见表 8, 同时检出脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇和黄曲霉 B₁ 的玉米样品和空白样品的总离子流图见图 6, 对于真菌毒素产生的原因及其对在粮食作物中的残留对人体的危害需进一步通过实验验证。

表 8 实际样品中 15 种真菌毒素的检测结果
Table 8 Analytical results for the determination of 15 mycotoxins in real sample ug/kg

真菌毒素	小麦 (n=53)		玉米 (n=51)		藜麦 (n=31)	
	检出率/%	含量/(ug/kg)	检出率/%	含量/(ug/kg)	检出率/%	含量/(ug/kg)
展青霉毒素	ND	ND	2(3.8%)	0~11.2	1(3.2%)	0~10.3
黄曲霉毒素 B ₁	11(20.8%)	0~5.13	2(3.8%)	0~4.21	2(6.5%)	0~2.11
黄曲霉毒素 B ₂	11(20.8%)	0~1.25	2(3.8%)	0~1.22	2(6.5%)	0~1.03
黄曲霉毒素 G ₁	ND	ND	ND	ND	ND	ND
黄曲霉毒素 G ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND
赈曲霉毒素 A	9(17.0%)	0~6.32	2(3.8%)	0~8.12	11(35.5%)	0~10.2
玉米赤霉烯酮	13(24.5%)	0~49.3	23(45%)	0~189.1	4(12.9%)	0~69.1
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	47(88.7%)	0~1425	37(72.5%)	0~1023	13(41.9%)	0~1123
3 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	32(60.4%)	0~512.0	12(23.5%)	0~131.1	ND	ND
15 乙酰-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	27(50.9%)	0~215.2	26(51.0%)	0~451.0	3(9.7%)	0~231.5
伏马毒素 B ₁	23(43.4%)	0~35.5	11(21.6%)	0~38.1	9(29.0%)	0~21.3
伏马毒素 B ₂	21(39.6%)	0~21.5	9(17.6%)	0~21.5	8(25.8%)	0~17.6
伏马毒素 B ₃	21(39.6%)	0~15.9	9(17.6%)	0~17.6	ND	ND
T-2 毒素	11(20.8%)	0~25.3	8(15.7%)	0~35.6	5(16.1%)	0~32.1
HT-2 毒素	11(20.8%)	0~31.5	6(11.8%)	0~22.5	ND	ND

注: ND 表示未检出。

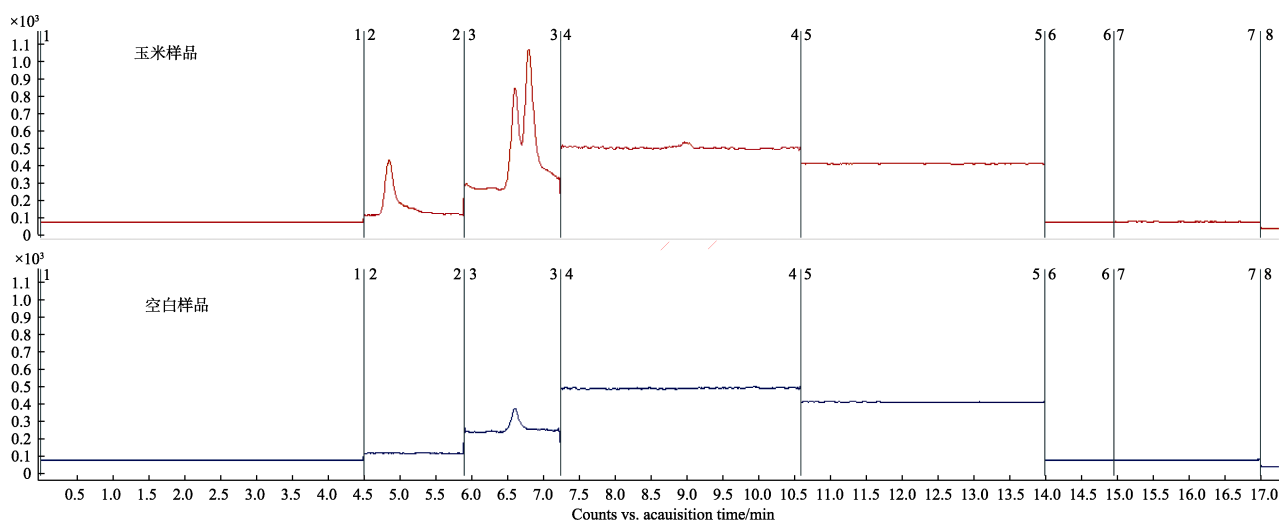



图 6 检出多毒素的玉米样品和空白样品的总离子流图
Fig.6 Total ionflow diagrams of Maize samples and blank samples were obtained

3 结论

本研究通过优化提取溶液体系, 有效提高粮食基质中 15 种真菌毒素残留的回收率, 通过固相萃取净化, 建立了回收率高、稳定性强的高效液相色谱-串联质谱法快速筛查和定量测定粮食中 15 种真菌毒素的方法。样品采用电喷雾多反应监测模式, 以同位素内标法进行定量分析, 15 种真菌毒素在各自浓度范围内线性良好, 线性相关系数均大于 0.996, 检出限为 0.2~10, 定量限为 0.8~30, 以藜麦、小麦、玉米三种基质分别进行 3 水平加标回收实验, 回收率在 76.9%~116.1%, 相对标准偏差 (RSD) 为 1.4%~10.4%, 通过对基质标准物质进行验证, 检测结果均落在证书范围内, 本方法实现多种真菌毒素的同时分析检测, 稳定性高、灵敏度高、专一性强、再现性好, 可实现粮食中 15 种真菌毒素的快速筛查和准确定量, 为真菌毒素的检验检测提供了实用的技术手段。针对随机购买市售粮食 135 批, 共有 97 批样品检出真菌毒素, 检出率为 71%, 多毒素同时污染现象比较普遍, 应当引起监管的重视。

参考文献:

- [1] COVARELLI L, BECCARI G, PRODI A, et al. Fusarium species, chemotype characterisation and trichothecene contamination of durum and soft wheat in an area of central Italy[J]. *J Sci of Food Agric*, 2015, 95(3): 540-551.
- [2] VALERIA S, GABRIELLA A, GASPARE C, et al. Climate, soil management, and cultivar affect Fusarium head blight incidence and deoxynivalenol accumulation in durum wheat of southern Italy[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1014.
- [3] European Commission. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products: 2013/165/EU[S/OL]. 2013-03-27. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1419933627492&uri=CELEX:32013H0165>.
- [4] SULTANOV, BERTHILLER, KRASKAR, et al. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(18): 2649-2659.
- [5] 黄思瑜, 董宪兵, 邓宇杰, 等. 重庆地区辣椒、花椒、八角中真菌毒素污染状况分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, (11)21: 8119-8124.
HUANG S Y, DONG X B, DENG Y J, et al. Survey on mycotoxin contamination situation in pepper, prickly ash and star anise in Chongqing[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 21(11): 8119-8124.
- [6] 卫生部. 食品中真菌毒素限量: GB2761—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
The Ministry of Health. National Standard for Food Safety, limit of mycotoxins in food: GB2761—2017[S]. Beijing: China Standard Press, 2017.
- [7] *Mass Spectrometry*, 2007, 21(20): 3253-3261. DOI:10.1002/rcm.3210.
- [8] 廉慧锋, 赵笑天, 王蓉珍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米、花生、麦仁中的 9 种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 360-366.
LIAN H F, ZHAO X T, WANG R Z, et al. Simultaneous determination of 9 kinds of mycotoxins in maize, peanut and wheat by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *FOOD SCIENCE*, 2010, 31(20): 360-366.
- [9] 黎睿, 谢刚, 王松雪. 高效液相色谱法同时检测粮食中常见 8 种真菌毒素的含量[J]. *食品科学*, 2015, 36(6): 206-210. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201506039.
LI R, XIE G, WANG S X, et al. Simultaneous analysis of 8 mycotoxins in grains by high performance liquid chromatography[J]. *FOOD SCIENCE*, 2015, 36(6): 206-210. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201506039.
- [10] 辛媛媛, 张艳, 王松雪, 等. UPLC-MS/MS 法测定玉米中 13 种真菌毒素[J]. *中国粮油学报*, 2015(12): 126-130.
XIN Y Y, ZHANG Y, WANG S X, et al. Determination of 13 mycotoxins in corn by UPLC-MS/MS[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2015(12): 126-130.
- [11] 王蒙, 姜楠, 韦迪哲, 等. 自制固相萃取柱-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中的 8 种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2016, 37(10): 213-218. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201610037.
WANG M, JIANG N, WEI D Z, et al. A solid phase extraction ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 8 mycotoxins in fruits and vegetables[J]. *FOOD SCIENCE*, 2016, 37(10): 213-218. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201610037.
- [12] 吴宇, 辛媛媛, 叶金, 等. 全碳标记稳定同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法测定粮食中 16 种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2017, 38(18): 297-303.
WU Y, XIN Y Y, YE J, et al. Suitability of fully ¹³C isotope labeled internal standards for the simultaneous determination of 16 mycotoxins in grains by UPLC-MS/MS[J]. *FOOD SCIENCE*, 2017, 38(18): 297-303.
- [13] 符金华, 杨琳芬, 董泽民, 等. 同位素稀释技术结合超高效液相色谱-四极杆/线性离子阱质谱快速精准测定饲料及原料中 16 种霉菌毒素[J]. *中国饲料*, 2019(1): 72-79.
FU J H, YANG L F, DONG Z M, et al. Determination of 16 mycotoxins in feed and feedstuff by UPLC-Quadrupole/Trap mass spectrometry and stable isotope dilution technique[J]. *China Feed*, 2019(1): 72-79.
- [14] 裘钧陶, 钟世欢, 叶磊海, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法快速测定食品中多种真菌毒素含量的方法研究[J]. *农产品加*

- 工, 2019, 483(7): 62-66.
- QIU J T, ZHONG S H, YE L H, et al. Determination of mycotoxins in food chromatography-tandem by ultra performance liquid mass spectrometry[J]. *Farm Products Processing*, 2019, 483(7): 62-66.
- [15] 胥伟, 姜依何, 田双红, 等. 基于色谱-质谱技术分析高湿条件下霉变黑毛茶品质成分变化及真菌毒素残留[J]. *食品科学*, 2019, 40(20): 293-298.
- XU W, JIANG Y H, TIAN S H, et al. Analysis of quality components and mycotoxins residues in mildewed raw dark tea with high humidity by liquid chromatography and mass spectrometry[J]. *FOOD SCIENCE*, 2019, 40(20): 293-298.
- [16] 李双青, 李晓敏, 张庆合, 等. 植物油中真菌毒素检测技术的研究进展[J]. *色谱*, 2019, 37(6): 569-580.
- LI S Q, LI X M, ZHANG Q H, et al. Advances in the development of detection techniques for mycotoxins in vegetable oil[J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2019, 37(6): 569-580.
- [17] 王小丹, 梁江, 高芑婴, 等. 幼儿谷物辅助食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染水平及其风险评估[J]. *中国食品卫生杂志*, 2019, 31(3): 255-259.
- WANG X D, LIANG J, GAO P, et al. Contamination of deoxynivalenol in cereal-based complementary foods and its health risk in infants and young children[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019, 31(3): 255-259. 
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。