高效液相色谱-串联质谱法测定腐乳中 16 种真菌毒素

陈宁周[1], 颜玉婷[2], 王海波[1*], 莫紫梅[1], 王　警[1], 郑娟梅[1]

(1. 广西东盟-食品药品安全检验检测中心, 南宁　530021; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁　530200)

摘　要: 目的　建立高效液相色谱-串联质谱法快速筛查和定量测定腐乳中 16 种真菌毒素的方法。**方法**　腐乳样品用 QuEChERS 方法提取, 经 Oasis PRiME HLB 小柱净化后, 用 0.22 μm 聚四氟乙烯(polytetrafluoroethylene, PTFE)滤膜滤过, 滤液采用 Atlantis® T3 超高效液相色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3 μm)分析, 以 0.1%甲酸水溶液(A)~0.1%甲酸乙腈(B)作为流动相体系, 进行梯度洗脱分离, 在电喷雾(electrospray ionization, ESI)正负离子扫描模式下, 以多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)为基础, 高效液相色谱-串联质谱法对 16 种真菌毒素进行定量测定。**结果**　16 种真菌毒素在各自的浓度范围内, 线性相关性良好, 相关系数(r)均大于 0.996, 在高、中、低 3 个回收水平的回收率为 71.34%~117.60%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)处于 0.46%~8.31%之间(n=6)。**结论**　本方法灵敏度高, 再现性好, 适用于腐乳中黄曲霉毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、桔青霉素等 16 种真菌毒素的快速筛查与定量检测。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 腐乳; 真菌毒素; 快速检测; QuEChERS

Determination of 16 mycotoxins in sufu by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

CHEN Ning-Zhou[1], YAN Yu-Ting[2], WANG Hai-Bo[1*], MO Zi-Mei[1], WANG Jing[1], ZHENG Juan-Mei[1]

(1. *Guangxi-ASEAN Center for Food and Drug Safety Control*, *Nanning* 530021, *China*;
2. *College of Pharmacy*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530200, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for rapid screening and quantitative determination of 16 mycotoxins in sufu by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods**　Sufu were extracted by QuEChERS method, purified by the Oasis PRiME HLB column, filtrated by 0.22 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) ultrafiltrate membrane, and then separated by Atlantis® T3 ultra high performance liquid chromatography column (2.1 mm×150 mm, 3 μm) with a gradient elution of 0.1% formic acid (mobile phase A)–0.1% formic acid acetonitrile (mobile phase B) in electrospray (ESI) ion scanning mode, based on the multiple reaction monitoring (MRM). The quantitative determination of 16 kinds of mycotoxins was carried out by HPLC-MS/MS. **Results**　The 16 kinds of mycotoxins had good linear relationships in the certain concentrate, with the correlation coefficients (r) all over 0.996. The recoveries at the high, medium and low levels were 71.34%–117.60%, and the relative standard deviations (RSDs) were 0.46%–8.31% (n=6). **Conclusion**　This method

***通讯作者:** 王海波, 副主任药师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: E-mail: 76494235@qq.com

***Corresponding author:** WANG Hai-Bo, Master, Associate Chief Pharmacist, Guangxi Institute for Food and Drug Control, No.9, Qinghu Road, Qingxiu District, Nanning 530021, China. E-mail: 76494235@qq.com

has high sensitivity and good reproducibility, which is suitable for the rapid screening and quantitative detection of 16 mycotoxins such as aflatoxin, fumonisin, zearalenone, deoxynivalenol, and citrinin in sufu.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; sufu; mycotoxin; rapid detection; QuEChERS

1 引 言

腐乳是以大豆为原料, 经磨浆、过滤、定型制作成豆腐, 然后压干, 再经腌制或利用微生物发酵制成的一种性质类似奶酪的豆类食品[1]。其在我国已经具有一千多年的历史, 由于色泽鲜亮, 表里一致, 醇香绵滑, 去腻爽口, 且含有大量蛋白质、多种氨基酸、丰富的维生素(硫胺素、核黄素、烟酸,维生素 B_1、B_2 和 B_{12})及钙、磷、铁和锌等对人体有益的微量元素[2], 深受人民的喜爱。腐乳按外观颜色可粗分为红腐乳(红方)、白腐乳(白方)、青腐乳(青方)、酱腐乳和花色腐乳等, 其而按制作过程所使用的菌种的不同又可分为毛霉腐乳、根霉腐乳、无菌腐乳以及细菌腐乳等[3]。腐乳的主要原料是大豆, 若采用发霉的大豆为原料, 则会受黄曲霉毒素等有害毒素的污染[4], 对人体健康存在潜在性危害。此外, 在制作红腐乳时, 加入红曲, 红曲霉菌株在发酵时大部分会产生桔青霉素[5], 对人体存在潜在性的危害。因此建立腐乳中多种真菌毒素的检验检测方法, 形成相关检验标准, 构建多毒素筛查数据库, 为食品监管提供强有力的技术支撑, 对食品安全监管来说有巨大的现实意义。

真菌毒素是真菌在生长和繁殖过程中生成的代谢产物。真菌毒素一般都具有肝毒性、肾毒性、胃肠道毒性、致癌、致突变等危害[6]。许多食品容易遭受真菌毒素的污染, 故要重视真菌毒素的预防和检测工作。目前常见的真菌毒素检测技术包括薄层色谱法、酶联免疫法[7]、胶体金法[8]、气相色谱法[9]、高效液相法[10]、以及液质联用法[11−12]等, 其中液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)具备稳定性高, 灵敏度高, 专一性强, 再现性好的特点, 能测定被检物的质量数、保留时间和分子的结构信息。可同时定性和定量分析多种真菌毒素[13,14]。目前, 相关的真菌毒素标准有 GB 5009.22-2016 [7]、GB 5009.24-2016 [15]、GB 5009.25-2016 [16]、GB 5009.96-2016 [17]等近 10 个, 这些标准的局限之处就是针对单一真菌毒素进行检测, 且前处理方法互相独立, 若是针对某一样品检测这些真菌毒素, 则需进行近 10 次样品前处理以及在近 10 次不同色谱条件下进行进样分析, 严重影响日常食品监管工作的效率及时效性, 同时检测成本较高。

本实验建立了高效液相色谱-串联质谱法(High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)快速筛查和定量测定腐乳中黄曲霉毒素类、伏马毒素类、赭曲霉毒素 A、桔青霉素 16 种真菌毒素的方法, 该方法操作简便、安全、准确性高、重复性好, 有助于假阳性样品的排除, 满足多样品多通量的检测要求, 为腐乳中的真菌毒素检测提供有效检测的方法, 为食药安全提供有力的技术支持。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器设备

HR7628 飞利浦食品加工机(荷兰皇家飞利浦电子公司); XS205DU 型电子天平(精确至 0.01 mg, 瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q A10 超纯水机(美国 Milli-pore 公司); Multi Reax 多管式涡旋振荡器(50 mL/12 位, 10 mL/24 位, 德国 Heidolph 公司); Multifuge X3R 冷冻高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司); Multivap 氮吹仪(64 位, 美国 Organomation 公司); QTRAP 4500 液质联用仪(美国 AB SCIEX 公司)。

2.1.2 试 剂

标准品溶液见表 1。

乙腈、甲酸(色谱纯, 德国默克公司); QuEChERS 提取盐包(0.5 g 柠檬酸二钠盐、1.5 g 柠檬酸钠、1 g 氯化钠、4 g 硫酸镁, 美国 Agilent 公司); Oasis PRiME HLB 小柱(6 mL, 200 mg, 美国 WATERS 公司)。

2.1.3 腐乳样品

本次实验用到的腐乳样品是从南宁市超市购买的, 一共 7 个批次样品。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

粉碎: 将购买的腐乳及其腐乳液于食品加工机中粉碎, 得流体状腐乳样品, 备用。

提取: 将 2 g 样品称入 50 mL 离心管中, 先往里加入 10 mL 水和 10 mL 10%甲酸乙腈溶液, 后将离心管旋紧后置于涡旋混合器以 2000 r/min 的速度振摇 30 min。继而加入 QuEChERS 提取盐包, 激烈振摇 3 min, 在 8000 r/min 的转速下离心 5 min, 收集上清液备用。

净化: 吸取上清液流经 Oasis PRiME HLB 小柱, 并用 10 mL 离心管采集 2 mL 过柱后的溶液, 于氮吹仪上 40 ℃氮吹至近干, 用 40%乙腈溶液定容至 1 mL 刻度线, 涡旋混匀 5 min 使待测物充分溶解, 过聚四氟乙烯(PTFE)0.22 μm 滤膜, 即得。

2.2.2 标准溶液曲线的配制

混合标准溶液的配制: 分别取黄曲霉毒素 B_1、B_2、G_1、G_2混合标样, 玉米赤霉烯酮, 黄曲霉毒素 M_2各 0.5 mL; 伏马毒素 B_1、B_2、B_3 各 0.4 mL; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇

(deoxynivalenol, DON), 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A 各 0.1 mL; 黄曲霉毒素 M_1 0.05 mL; 桔青霉素 0.02 mL; T2 毒素 0.005 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用 40%乙腈定容至 10 mL 刻度线, 备用。

基质匹配混合标准曲线溶液的配制: 取空白腐乳样品 6 份, 按“2.2.1 样品前处理”制备, 至“用 10 mL 离心管收集 2 mL 过柱后的溶液”步骤后, 分别加入混合标准溶液 0.0125、0.0250、0.0500、0.1250、0.2500、0.500 mL, 40 ℃氮吹至近干后, 用 40%乙腈定容至 1 mL 刻度线, 涡旋混匀 5 min 溶解, 过聚四氟乙烯(PTFE)0.22 μm 滤膜后即得。各混合标准曲线溶液浓度如表 2 所示。

加标回收溶液的配制: 称取 2 g 空白腐乳样品, 装入

表 1　标准品溶液信息

Table 1　The information of standard solution

化合物名称	批号	浓度/(μg/mL)	厂家
黄曲霉毒素混标 AFB_1	L18204M	2.01	美国 biopure 公司
黄曲霉毒素混标 AFB_2	L18204M	0.501	美国 biopure 公司
黄曲霉毒素混标 AFG_1	L18204M	2.01	美国 biopure 公司
黄曲霉毒素混标 AFG_2	L18204M	0.502	美国 biopure 公司
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	L18232D	100	美国 biopure 公司
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	L17012C	101	美国 biopure 公司
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	L18314A	100.1	美国 biopure 公司
玉米赤霉烯酮	GBW(E)100301	20.522	国家粮食局科学研究院
伏马毒素 B_1	L18183F	50.2	美国 biopure 公司
伏马毒素 B_2	L18415B	50.0	美国 biopure 公司
伏马毒素 B_3	L18291F	50.3	美国 biopure 公司
黄曲霉毒素 M_1	L18291M	10	美国 o2si 公司
黄曲霉毒素 M_2	1H01J19	0.51	中国 Pribolab 公司
桔青霉素	L18442C	100.4	美国 biopure 公司
T2 毒素	L17492T	100	美国 biopure 公司
赭曲霉毒素 A	L18304B	10.05	美国 biopure 公司

表 2　16 种真菌毒素标准溶液曲线浓度

Table 2　The curves of standard solutions of 16 mycotoxins

化合物名称	浓度/(ng/mL)	标准曲线浓度/(ng/mL)					
黄曲霉毒素混标 AFB_1	100.5	1.256	2.512	5.025	12.56	25.12	50.25
黄曲霉毒素混标 AFB_2	25.05	0.3131	0.6262	1.252	3.131	6.262	12.52
黄曲霉毒素混标 AFG_1	100.5	1.256	2.512	5.025	12.56	25.12	50.25
黄曲霉毒素混标 AFG_2	25.1	0.3138	0.6275	1.255	3.138	6.275	12.55
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	1000	12.50	25.00	50.00	125.0	250.0	500.0
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	1010	12.620	25.25	50.50	126.2	252.5	505.0
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	1001	12.51	25.03	50.05	125.1	250.3	500.5
玉米赤霉烯酮	1026	12.82	25.65	51.30	128.2	256.5	513.0
伏马毒素 B_1	2008	25.10	50.20	100.4	251.0	502.0	1004
伏马毒素 B_2	2000	25.00	50.00	100.0	250.0	500.0	1000
伏马毒素 B_3	2012	25.15	50.30	100.6	251.5	503.0	1006
黄曲霉毒素 M_1	50	0.6250	1.250	2.500	6.250	12.50	25.00
黄曲霉毒素 M_2	25.50	0.3188	0.6375	1.275	3.188	6.375	12.75
桔青霉素	200.8	2.510	5.020	10.04	25.10	50.20	100.4
T2 毒素	50.00	0.6250	1.250	2.500	6.250	12.50	25.00
赭曲霉毒素 A	100.5	1.256	2.512	5.025	12.56	25.12	50.25

50 mL 离心管中，加入 0.25、0.50、1.25 mL 混合标准溶液，按步骤“2.2.1 样品前处理”制备，即得加标回收溶液。

2.2.3 色谱条件

色谱柱为 Atlantis® T3 色谱柱(2.1 mm×150 mm, 3 μm)；色谱柱流速: 0.3000 mL/min，柱温设为 35 ℃；进样体积为 10 μL。流动相 A: 0.1%甲酸水，流动相 B: 0.1%甲酸乙腈溶液，梯度洗脱条件如下：梯度一开始以 5%流动相 B 维持 1 min；随后在 4 min 内缓慢将流动相 B 的比例提高至 70%；迅速在 6 s 内将流动相 B 的比例由 70%提高至 95%并一直维持 95%比例的流动相 B 运行持续 7 min；随即在 6 s 内迅速将流动相 B 的比例下降至 5%，最后以 5%流动相 B 比例平衡 3min。

2.2.4 质谱条件

离子源：电喷雾离子(electrospray ionization, ESI)源；扫描模式：正负离子切换扫描；气帘气: 30.00 psi；碰撞气: Medium；离子化电压：正离子模式：5500 V；负离子模式：–4500 V；辅助气温度：550 ℃；雾化气：55 psi；辅助气：55 psi；入口电压: 10 V；碰撞室出口电压: 13 V

多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)参数(各化合物母离子、子离子及能量参数)设置如表 3 所示。

表 3 16 种真菌毒素保留时间、母离子、子离子及能量参数
Table 3 The retention time, parent ions, daughter ions and energy parameters of 16 mycotoxins

化合物名称	保留时间 /min	母离子 (*m*/*z*)	子离子 (*m*/*z*)	去簇电压 /V	碰撞能量 /V
黄曲霉毒素 B_1	6.15	313	285*	95	50
			241		33
黄曲霉毒素 B_2	5.98	315	287*	110	38
			259		42
黄曲霉毒素 G_1	5.97	329	243*	105	38
			283		33
黄曲霉毒素 G_2	5.78	331	245*	72	45
			285		39
脱氧雪腐镰刀	4.32	297	249*	40	16
菌烯醇			203		22
3-乙酰脱氧雪	5.35	339	231*	40	17
腐镰刀菌烯醇			203		21
15-乙酰脱氧雪	5.25	339	137*	40	27
腐镰刀菌烯醇			321		12
玉米赤霉烯酮	7.07	319	283.1*	80	16
			187		26
伏马毒素 B_1	5.25	722	334*	150	54
			352		50
伏马毒素 B_2	5.60	706	336*	170	51
			354		46
伏马毒素 B_3	5.47	706	336*	170	51
			354		46
黄曲霉毒素 M_1	5.51	329	273*	150	34
			259		34
黄曲霉毒素 M_2	5.32	331	273*	110	31
			259		34
桔青霉素	6.89	251	233*	56	23
			205.1		37
T2 毒素	6.88	484.2	305*	70	20
			245.1		16
赭曲霉毒素 A	6.99	402	358*	-50	-26
			167		-47

注：表中*表示定量离子。

3 结果与分析

3.1 样品前处理考察

3.1.1 提取溶剂的考察

在 50 mL 离心管中称取 2 g 空白腐乳样品，做平行的 4 份。2 份加入 0.25 mL 混合标准溶液后加入 10 mL 水和 10 mL 乙腈，另外 2 份加入 0.25 mL 混合标准溶液后加入 10 mL 水和 10 mL 10%甲酸乙腈溶液，后续均按步骤“2.2.1 样品前处理”制备，用回收率的均值来考察 2 种不同溶剂对样品提取效率的影响。发现单纯的水和乙腈提取时，伏马毒素 B_1、B_2、B_3 的回收率不高，仅有约 40%左右，当在提取溶剂为水和 10%甲酸乙腈时，伏马毒素 B_1、B_2、B_3 的回收率明显提高，都能达到 70%以上，更优的提取条件有待进一步考察。最终提取溶剂确定为水和 10%甲酸乙腈溶液。

3.1.2 提取时间的考察

称取 2 g 空白腐乳样品，装入 50 mL 离心管中。加入 0.25 mL 混合标准溶液后加入 10 mL 水和 10 mL 10%甲酸乙腈溶液，将样品置于涡旋混合器上以 2000 r/min 分别振摇 15、30 和 60 min，后续按步骤“2.2.1 样品前处理”制备，每个提取时间平行制备 2 份，取回收率的平均值，从而考察 3 个提取时间对回收率的影响。结果发现，涡旋振荡 15 min，回收率在 41.22%~92.19%，涡旋振荡 30 min，回收率在 75.53%~117.38%之间，涡旋振荡 60 min，回收率在 72.82%~114.05%之间，结果表明涡旋振摇 15 min 不足以让腐乳样品与提取溶剂充分的接触、混匀，导致回收率偏低。

涡旋振摇时间为 60 min 时的回收率与涡旋振摇 30 min 的回收率相差不大, 最终把提取时的涡旋振摇时间定为 30 min。粉碎之后的腐乳样品呈流体状, 30 min 可以提取得比较完全, 不像谷物类的样品需涡旋振摇 60 min 左右[18]。

3.2　质谱条件的优化

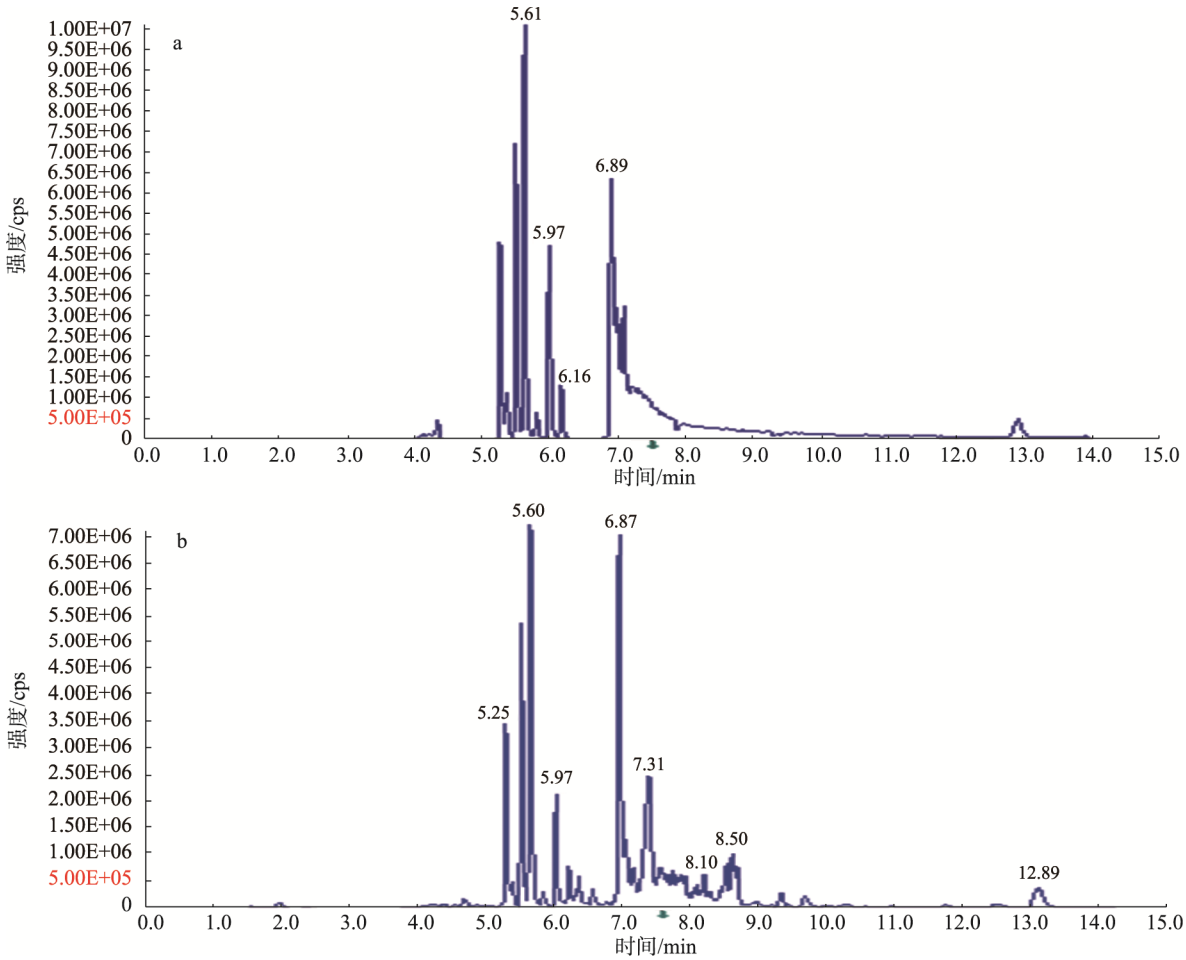
由于 16 种真菌毒素分子结构上存在差异, 通过把 16 种真菌毒素的标准品溶液分别经针泵上质谱分析, 选择响应较好、稳定的目标化合物母离子。由于 16 种真菌毒素都是属于极性化合物, 在电喷雾离子(ESI)源下都有较高的响应, 所以选用 ESI 模式。对化合物母离子在正、负离子模式的响应下做对比, 大部分真菌毒素在正离子模式下响应较高, 赭曲霉毒素 A 则是在负离子模式下灵敏度更好, 干扰较小, 固选择正负离子切换扫描模式(其中, 赭曲霉毒素 A 用负离子模式进行检测)。随后优化了去簇电压, 使母离子的传输效率达到最高, 同时在子离子模式下选择响应最好的 2 个子离子, 并在多反应监测模式下优化出最适合子离子产生的碰撞能量。

3.3　色谱条件的优化

由于 16 种真菌毒素大部分在正离子模式下响应更好, 为达到较好的灵敏度, 故选用 0.1%甲酸水-0.1%甲酸乙腈作为流动相。标准品溶液和腐乳样品的总离子流图如图 1 所示, 标准品溶液的 MRM 图如图 2 所示。

3.4　基质效应考察

液质联用中的基质效应(matrix effect, ME)通常是因为内源性物质(例如: 盐类、胺类、糖类, 色素、脂类、肽类等)或外源性物质(例如洗涤剂、离子对试剂、缓冲盐等)与目标化合物同时进入质谱时可影响目标化合物的雾化、电离, 导致目标化合物的响应值增大或减少。目标化合物响应值增大, 我们称之为基质增强。反之响应值减少则为基质抑制[19]。我们常用以下公式来评价基质效应: 基质效应 ME (%)=B÷A×100, A: 用纯溶剂配制的目标化合物标准曲线的斜率　B: 用提取的空白样品基质配制的目标化合物标准曲线的斜率。我们比较了以空白样品提取液、40%乙腈溶液配制的混合标准曲线的斜率, 大部分真菌毒素



注: (a)为标准品溶液总离子流图, (b)为加标腐乳样品总离子流图。

图 1　标准品溶液和加标腐乳样品的总离子流图

Fig.1　Total ion chromatograms of standard solutions and spiked sufu sample

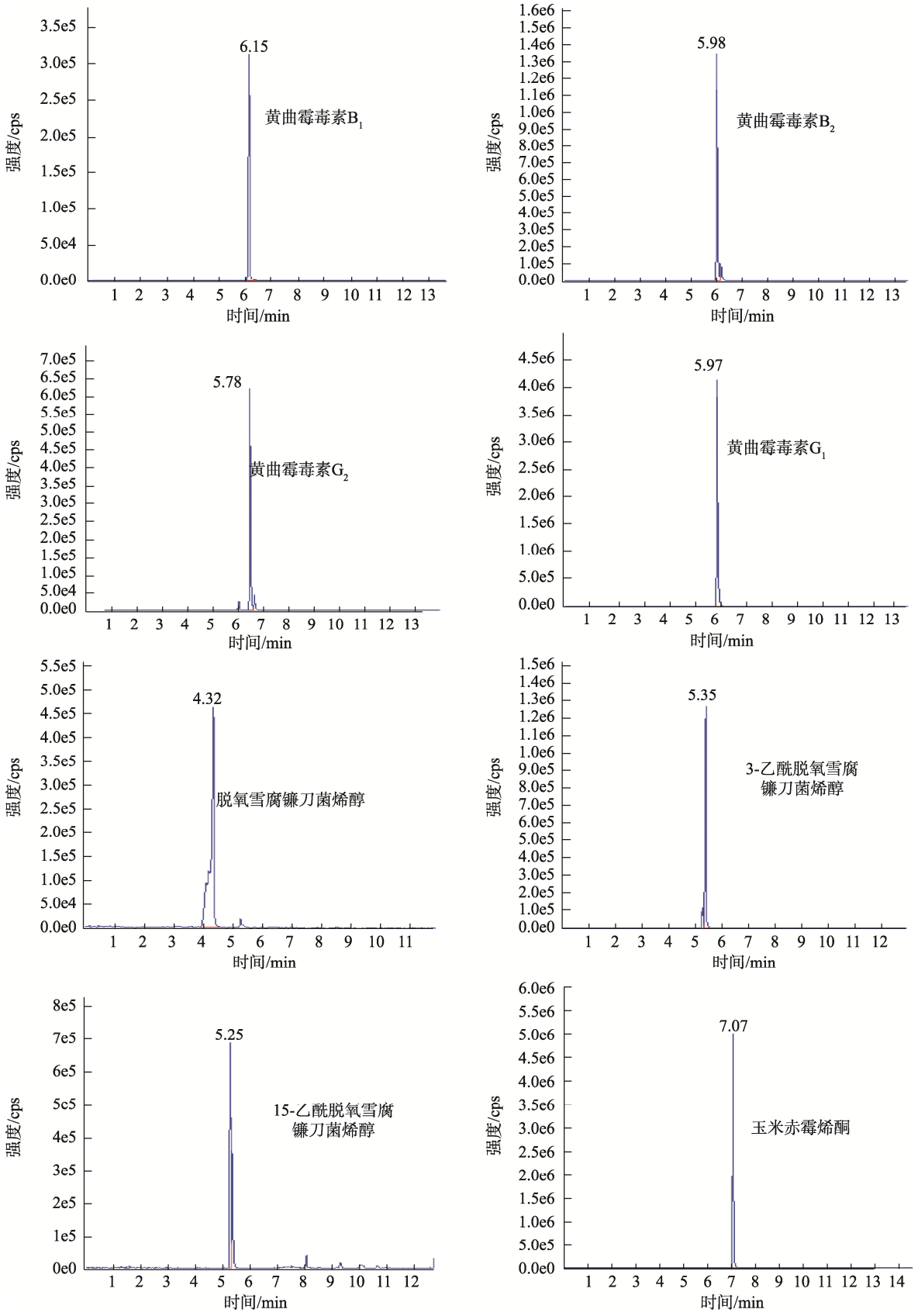
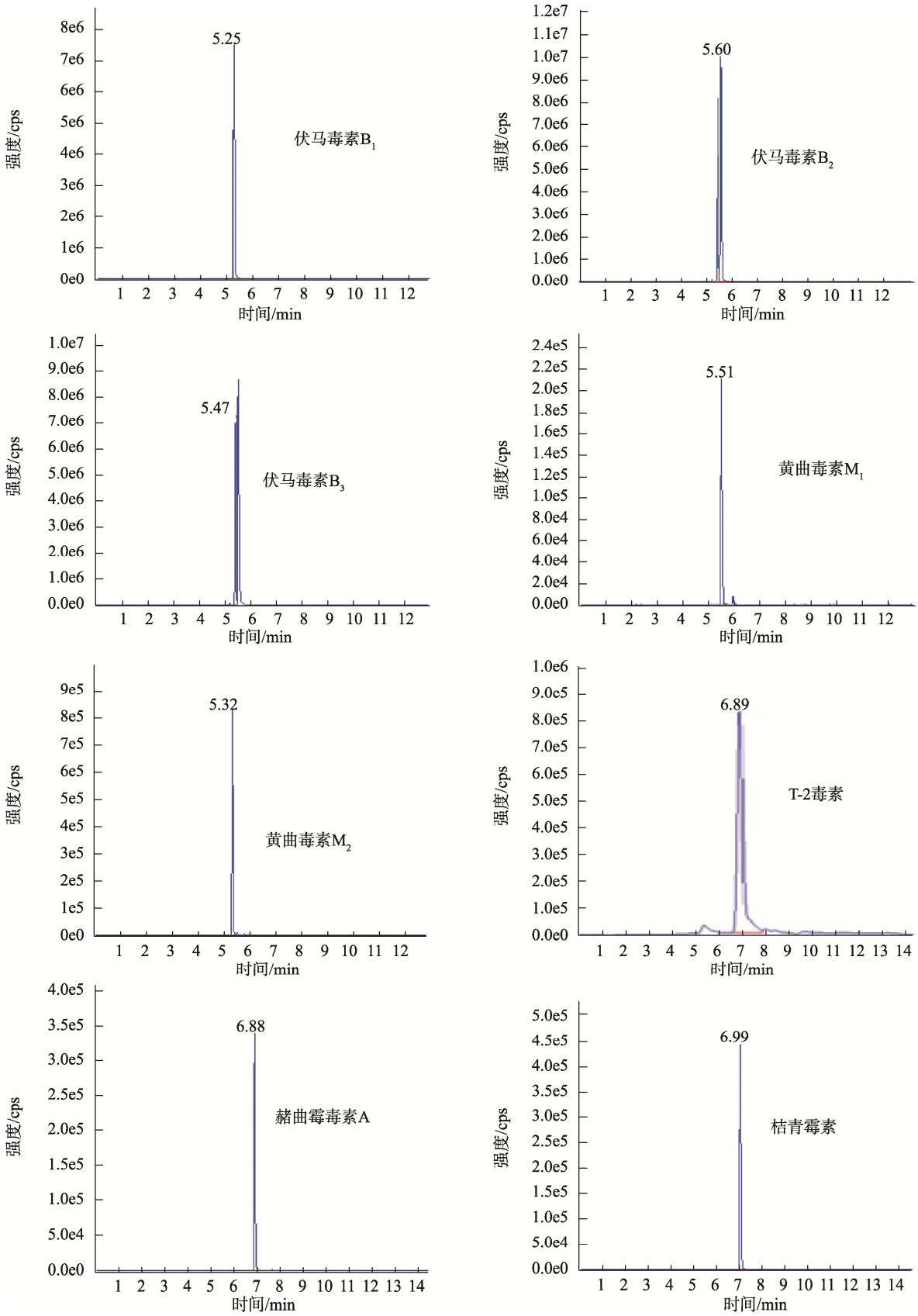


图 2 标准品溶液的 MRM 色谱图

Fig.2 MRM chromatograms of standard solutions



续图 2　标准品溶液的 MRM 色谱图

Fig.2　MRM chromatograms of standard solutions

(除伏马毒素 B_1、B_2、B_3 外)呈现出不同程度的离子抑制作用(ME(%)在 15.08%~62.49%之间)。文献里常见的降低基质效应的方法有选择同位素内标、改变色谱条件、改进样品前处理方法、质谱条件优化、配制基质标准曲线等。经过综合考虑，这里主要采用提取的空白样品基质配制混合标准曲线来降低基质效应的影响。此外，经过 Oasis PRiME HLB 小柱的净化，能有效地除掉腐乳样品中的蛋白质、脂类和磷脂，也能够达到降低基质效应影响的目的。

3.5 方法学验证

3.5.1 标准曲线

对基质匹配混合标准曲线溶液进行测定，绘制标准曲线，线性方程如表 4 所示。由表 4 可知 16 种真菌毒素在相应浓度范围内的相关系数(r)均大于 0.996，说明其线性良好。

3.5.2 加标回收率

称取 2 g 样品，装入 50 mL 离心管中，分别加入 0.25、0.50、1.25 mL 混合标准溶液，按“2.2.1 样品前处理”制备，每个水平平行制备 6 份，然后上机测定，按公式(回收率=(测得量-原有量)÷加入量)计算回收率，计算结果见表 4。由表 4 可知，样品加标回收率在 71.34%~117.60%之间，相对标准偏差均小于 8.31%。有个别真菌毒素的回收率偏小，可能影响的因素是基质效应，提取溶液的酸碱度等。

3.5.3 仪器检出限

以基质匹配混合标准曲线溶液的最低曲线点进样，各真菌毒素的信噪比均大于 3，按公式(检出限=添加水平(μg/kg)÷信噪比×3)计算信噪比为 3 时真菌毒素的浓度。检出限计算结果见表 4。

3.6 样品检测结果

7 种腐乳样品中 16 种真菌毒素的检测结果如表 5 所示。7 个样品中有 3 个样品检出含有脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)。现行的国家标准 GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》豆类及其制品中真菌毒素的限量只对黄曲霉毒素 B1 和赭曲霉毒素 A 做出规定，它们的限量都是 5.0 μg/kg[20]，并未对豆类及其制品中的 DON 限量做出规定。此次实验检出 DON 最大含量为 377 μg/kg，参考 GB 2761-2017 谷物及其制品中 DON 限量 1000 μg/kg[21]，

表 4 16 种真菌毒素的线性方程、加标回收率、RSD 及检出限(n=6)

Table 4 Linear equations, recoveries, RSDs, and limits of detection of 16 mycotoxins (n=6)

化合物名称	线性方程	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%	检出限/(μg/kg)
黄曲霉毒素	Y=62599.1X+2972.36	6.2800	78.60	1.40	0.02
B_1	(r=0.9998)	12.562	89.90	6.96	
		31.400	95.02	5.49	
黄曲霉毒素	Y=70628.7X–94401.9	1.5655	112.87	2.86	0.06
B_2	(r=0.9975)	3.1300	102.65	1.49	
		7.8275	91.91	2.05	
黄曲霉毒素	Y=868074X–180324	6.2800	96.34	5.50	0.003
G_1	(r=0.9996)	12.562	94.39	4.03	
		31.400	91.09	1.33	
黄曲霉毒素	Y=30454.6X–46389.2	1.5688	117.6	0.46	0.02
G_2	(r=0.9963)	3.1375	98.47	3.34	
		7.8450	83.19	3.05	
脱氧雪腐镰	Y=834.727X+75925.8	62.500	99.76	6.37	2.2
刀菌烯醇	(r = 0.9992)	125.00	90.79	6.12	
		312.50	87.64	6.83	
3-乙酰脱氧	Y=3053.85X+4905.13	63.125	94.37	8.31	1.0
雪腐镰刀菌	(r=0.9987)	126.25	96.92	1.32	
烯醇		315.50	106.07	6.66	
15-乙酰脱	Y=1359.66X+179260	62.575	105.60	6.45	1.6
氧雪腐镰刀	(r=0.9992)	125.12	102.80	6.72	

续表 4

化合物名称	线性方程	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSD/%	检出限/(μg/kg)
菌烯醇		312.75	105.19	2.90	
玉米赤霉烯	Y=7030.80X+14186.0	64.125	76.40	5.13	0.9
酮	(r=0.9994)	128.25	107.89	2.75	
		320.50	112.82	3.27	
伏马毒素	Y=18884.6X+215788	125.50	96.41	5.94	0.1
B_1	(r=0.9986)	251.00	105.85	1.19	
		627.50	113.87	3.72	
伏马毒素	Y=35614.3X+794163	125.00	88.06	6.72	0.07
B_2	(r=0.9970)	250.00	98.78	6.56	
		625.00	98.05	4.27	
伏马毒素	Y=19507.3X+50234.9	125.75	108.35	4.46	0.5
B_3	(r=0.9996)	251.50	100.72	3.15	
		628.75	103.49	3.57	
黄曲霉毒素	Y=13230.0X−690.838	3.1250	107.91	6.42	0.2
M_1	(r=0.9994)	6.2500	105.97	3.63	
		15.625	107.19	1.98	
黄曲霉毒素	Y=71297.8X−5274.16	1.5938	109.93	5.47	0.04
M_2	(r=0.9982)	3.1875	94.98	6.22	
		7.9700	97.47	5.65	
桔青霉素	Y=933482X+3092090	12.550	87.74	3.81	0.02
	(r=0.9997)	25.100	71.34	1.28	
		62.750	88.11	0.80	
T2 毒素	Y=144721X+88647.1	3.1250	93.03	4.94	0.05
	(r=0.9995)	6.2500	97.25	7.10	
		15.625	106.15	8.91	
赭曲霉毒素	Y=114185X−138098	6.2800	106.24	2.74	0.08
A	(r=0.9979)	12.562	89.53	3.02	
		31.408	81.04	2.05	

及我们日常对腐乳的摄入量, 检测出的 DON 含量不足以对人体健康造成危害, 但是过量摄入, 还是存在一定的风险。其中, 7 种腐乳样品中只有样品 5 检出含有桔青霉素, 因为样品 5 是红腐乳, 在其生产过程中加入了红曲, 红曲霉菌株在发酵时大部分会产生桔青霉素。国家标准对食品添加剂红曲红色素中的桔青霉素含量限定为 40 μg/kg[21], 样品 5 检出桔青霉素含量为 21 μg/kg, 国家标准并未对食品中的桔青霉素限量做出规定, 过量的桔青霉素对人体健康存在潜在性危害。建议国家尽快出台腐乳中桔青霉素的限量标准。

4 结　论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法快速筛查和定量测定腐乳中 16 种真菌毒素的方法。本方法稳定性高、

灵敏度高、专一性强、再现性好，为腐乳中多种真菌毒素的检测提供了实用的技术手段，可为国家起草腐乳中真菌毒素的限量标准提供依据。

表 5 对实际腐乳样品中 16 种真菌毒素的检测结果(μg/kg)
Table 5 Detection results of 16 mycotoxins in sufu (μg/kg)

样品序号	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	桔青霉素	其他毒素
1	–	–	–
2	69	–	–
3	–	–	–
4	314	–	–
5	377	21	–
6	–	–	–
7	–	–	–

注: –表示未检出。

参考文献

[1] 王岁楼. 提高腐乳生产技术水平的途径[J]. 中国调味品, 1987, (11): 7–9.
Wang SL. Ways to improve the technical level of fermented bean curd production [J]. China Condim, 1987, (11): 7–9

[2] 彭湘屏, 卢红梅. 腐乳研究新进展[J]. 江苏调味副食品, 2009, 26(4): 10–14.
Peng XP, Lu HM. New research progress on sufu [J]. Jiangsu Condim Subsid Food, 2009, 26(4): 10–14.

[3] 马清和. 中国调味品酿造技术[M]. 北京: 世界图书出版公司, 1993.
Ma QH. Chinese condiment brewing technology [M]. Beijing: World Publishing Corporation, 1993.

[4] 高何刚, 陈理, 任一平. 腐乳中 6 种黄曲霉毒素污染状况调查[J]. 浙江预防医学, 2014, 24(7): 721–722.
Gao HG, Chen L, Ren YP. Investigation on contamination of 6 aflatoxins in fermented bean curd [J]. Zhejiang Prev Med, 2014, 24(7): 721–722.

[5] 许赣荣, 卢晨, 穆晓青, 等. 部分红曲霉菌株产桔霉素的研究[J]. 无锡轻工大学报, 2000, (1): 59.
Xu GR, Lu C, Mu XQ, *et al.* Investigation of citrinin production by some *Monascus Spp* [J]. J Wuxi Univ Light Ind, 2000, (1): 59.

[6] 张思思, 陆继伟, 王少敏, 等. 国内外真菌毒素检测方法研究现状及进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(7): 2575–2586.
Zhang SS, Lu JW, Wang SM, *et al.* Current status and advances of domestic and international determination method of mycotoxins [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(7): 2575–2586.

[7] GB 5009.22-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定[S]
GB 5009.22-2016 National food safety standard-Determination of aflatoxin group B and group G in food [S].

[8] 曹德康, 苏建忠, 张瑛, 等. 胶体金免疫层析技术快速检测谷物中 3 种真菌毒素的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(3): 306–312.
Chao DK, Su JJ, Zhang Y, *et al.* Research on the rapid detection of three kinds of mycotoxin in grains by colloidal gold immunochromatographic method [J]. Chin J Food Hyg, 2017, 29(3): 306–312.

[9] 游淑珠. 小麦、玉米中 DON 气相色谱检测方法的建立及 OTA 单克隆抗体免疫亲和柱的研制[D]. 南昌: 南昌大学, 2005.
You SZ. Develop of a gas chromatographic method to determine deoxynivalenol in wheat and corn and preparation of monoclonal antibody immunoaffinity column for ochratoxin A [D]. Nanchang: Nanchang University, 2005.

[10] 林太凤, 传桂淑, 王惠琴, 等. 腐乳中桔青霉素的测定及安全评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(3): 603–608.
Lin TF, Chuan GS, Wang HQ. *et al.* Determination and safety evaluation of citrinin in sufu [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(3): 603–608.

[11] Sulyok M, Krska R, Schuhmacher. Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds [J]. Food Chem, 2010, 119(1): 408–416

[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 YY, 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 Sci, 2017, 38(18): 297–303.

[13] 王瑞国, 苏晓鸥, 王培龙, 等. 液相色谱-串联质谱法同时测定动物血浆中 21 种霉菌毒素或其代谢物残留[J]. 分析化学, 2017, 45(2): 231–237.
Wang RG, Su XO, Wang PL. *et al.* Simultaneous detection of 21 kinds of mycotoxins and their metabolites in animal plasma with impurity adsorption purification followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China J Anal Chem, 2017, 45(2): 231–237.

[14] 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, 30(12): 126–130.
Xin YY, Zhang Y, Wang SX, *et al.* Determination of 13 mycotoxins in corn by UPLC-MS/MS [J]. J Cere Oils Ass, 2015, 30(12): 126–130.

[15] GB 5009.24-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定[S].
GB 5009.24-2016 National food safety standard-Determination of aflatoxin group M in food [S].

[16] GB 5009.25-2016 食品安全国家标准 食品中杂色曲霉素的测定[S].
GB 5009.25-2016 National food safety standard-Determination of sterigmatocystin in food [S].

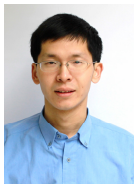
[17] GB 5009.96-2016 食品安全国家标准 食品中赭曲霉素 A 的测定[S].
GB 5009.96-2016 National food safety standard-Determination of ochratoxin A in food [S].

[18] 王海波, 莫紫梅, 陈宁周, 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, 199.
Wang HB, Mo ZM, Chen NZ, *et al*. High throughput screening and quantitative of various kinds of mycotoxins in cereals products by UPLC-Q-Trap MS [J]. J Food Res Dev, 2018, 39(22): 91−100, 199.
[19] 向平, 沈敏, 卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应[J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 753−756.
Xiang P, Shen M, Zhuo XY. Matrix effect in liquid chromatographic mass spectrometric analysis [J]. J Instrum Anal, 2009, 28(6): 753−756.
[20] GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]
GB 2761-2017 National food safety standard-Limit of mycotoxins in food [S].
[21] GB 1886.181-2016 食品安全国家标准 食品添加剂 红曲红[S].
GB 1886.181-2016 National food safety standard-Food additive-Monascus pigment [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



陈宁周, 主管药师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 61214497@qq.com

王海波, 副主任药师, 研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 76494235@qq.com