

# QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定 玉米油中伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>

李 莉, 李 硕\*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘 要:** **目的** 建立 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定玉米油中伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>3</sub> 的分析方法。**方法** 样品经酸化的乙腈水溶液混合振荡提取, 然后进行盐析液体分配, 通过 QuEChERS 净化柱净化, 以乙腈和水为流动相, C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm)进行分离, 多反应监测模式检测, 采用基质匹配标准曲线进行定量分析。**结果** 3 种伏马毒素在 0.5~100.0 μg/L 线性范围内线性关系良好, 相关系数  $r^2>0.99$ , 检出限和定量限分别为 0.12~0.70 μg/kg 和 0.42~2.40 μg/kg。在 3 个添加水平下, 3 种伏马毒素的平均加标回收率为 83.2%~108.0%( $n=6$ ), 相对标准偏差为 1.9%~4.6%。**结论** 本方法操作简便、检测成本低、定量准确, 适于玉米油样品中伏马毒素的快速检测。

**关键词:** QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 玉米油; 伏马毒素

## Determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn oil by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Li, LI Shuo\*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the simultaneous determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in corn oils by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The samples were extracted with acidified acetonitrile aqueous solution, and the extracts of samples were purified by QuEChERS method after liquid liquid partition using salts. Fumonisins were separated by UPLC with acetonitrile-water gradient elution in a C<sub>18</sub> chromatography column (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm), and were identified by multi-reaction detection mode. Matrix matching standard curve was used for quantitative analysis. **Results** The 3 kinds of fumonisins had good linear relationship in range of 0.5–100.0 μg/L, correlation coefficient  $r^2>0.99$ , and the limit of detection and limit of quantity were 0.12–0.70 μg/kg and 0.42–2.40 μg/kg, respectively. The average recoveries of fumonisins at 2 spiked levels were 83.2%–108.0% ( $n=6$ ), and relative standard deviations were 1.9%–4.6%. **Conclusion** This method is simple, cost-effective and quantitatively accurate, which is suitable for quick analysis of fumonisins in corn oils.

**KEY WORDS:** QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; corn oil;

基金项目: 国家重点研发计划项目(2017YFC1601103)

Fund: Supported by National Key Research and Development Project(2017YFC1601103)

\*通讯作者: 李硕, 工程师, 主要研究方向为食品、化妆品检测。E-mail: pahayokolide@sina.com

\*Corresponding author: LI Shuo, Engineer, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China. E-mail: pahayokolide@sina.com

fumonisins

## 1 引 言

伏马毒素主要是由串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、多育镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)和轮状镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)等真菌在一定的温度和湿度下产生的代谢产物,是一类由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的,结构相类似的双酯类物质的总称<sup>[1]</sup>。目前发现的伏马毒素有 53 种<sup>[2]</sup>,其中以 B 族的伏马毒素 B<sub>1</sub>(fumonisin B<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub>)、伏马毒素 B<sub>2</sub>(fumonisin B<sub>2</sub>, FB<sub>2</sub>)和伏马毒素 B<sub>3</sub>(fumonisin B<sub>3</sub>, FB<sub>3</sub>)为主要存在形式<sup>[3]</sup>。其中伏马毒素 B<sub>1</sub>毒性最强,污染最普遍。伏马毒素在玉米及其制品中污染最为严重<sup>[4]</sup>,其他如小麦及其制品、大米及其制品、坚果、饲料及中草药等中也有污染<sup>[5,6]</sup>。流行病学研究发现,食品中的伏马毒素与人类食道癌的发病率相关<sup>[7]</sup>。国际癌症研究机构将其列为 2B 类致癌物质(即人类可能致癌物)<sup>[8]</sup>。由于其对某些家畜产生急性毒性及对人类潜在的致癌性,伏马毒素已成为继黄曲霉毒素之后的又一研究热点,世界各国开展了污染分布状况、膳食暴露和风险评估方面的研究,部分发达国家和地区陆续制定了食品中伏马毒素的限量要求。欧盟对未加工玉米、直接食用的玉米和制品、玉米制成的早餐谷物和点心和婴幼儿、儿童食用谷物制品制定的限量标准分别为 4.0、1.0、0.8 和 0.2 mg/kg,美国规定食用玉米中伏马毒素最高限量为 2 mg/kg<sup>[9]</sup>。我国在伏马毒素方面的研究相对较少,目前尚未制定食品中伏马毒素的限量标准<sup>[10]</sup>。

目前,伏马毒素的检测方法主要有酶联免疫法<sup>[11,12]</sup>、高效液相色谱法<sup>[13-15]</sup>、高效液相色谱质谱联用法<sup>[16-18]</sup>等。其中高效液相色谱质谱联用技术以其灵敏度高、选择性好、抗干扰能力强的优点,已成为近年来伏马毒素检测的主要方法。在样品前处理方面,伏马毒素的提取净化方法目前主要有免疫亲和柱法、固相萃取柱法、多功能净化柱等,但这些方法都存在一定缺点,如提取净化步骤繁琐,对操作者要求高,可能存在交叉反应,适用范围窄,价格昂贵等。QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)是一种用于农产品检测的快速样品前处理技术方法,最早应用于农药残留的检测,因其快速、简单、廉价、高效和环境友好的特点,目前已迅速扩展至其他领域的检测。本研究应用 QuEChERS 技术,开发了简单快速的样品前处理方法,同时结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测技术,测定玉米油中伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>和 B<sub>3</sub>的含量,以期为玉米油中伏马毒素批量样品的快速检测提供技术参考。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂

LCMS-8060 型超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(日本岛津公司);AL 204 型分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ-3200DE 型超声波清洗器(江苏昆山市超声仪器有限公司);Vortex Genie 2 涡旋混匀器(美国 Scientific Industries 公司);恒温培养振荡器(上海智诚分析仪器有限公司);CF 16RXII 离心机(日本日立公司);Advance RO+Pro VF 超纯水纯化系统(德国 Sartorius 公司)。

伏马毒素 B<sub>1</sub>、伏马毒素 B<sub>2</sub>、伏马毒素 B<sub>3</sub>、伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 混合标准溶液(50 μg/mL, 青岛普瑞邦公司);乙腈(色谱纯,德国 Merck 公司);甲酸(质谱级,美国 Fisher Scientific 公司);无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,国药集团);LUMTECH MPFC-QuEChERS 超滤型净化柱(高脂类,北京绿绵公司);Waters DisQuE 净化管(2 mL, 美国 Waters 公司);实验用水均为超纯水;玉米油(购自超市或网络平台)。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Infinity Poroshell 120 SB-C<sub>18</sub> (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm);流动相: A 为含有 0.1% 甲酸的水溶液, B 为含有 0.1% 甲酸的乙腈溶液;梯度洗脱程序: 0~2 min, 10%~40% B; 2~5.5 min, 40%~45% B; 5.6~7 min, 90% B; 7.1~8 min, 10% B。流速为 0.3 mL/min, 进样量为 5 μL, 柱温: 40 °C。

#### 2.2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electron spray ionization, ESI);检测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式, 雾化气流量 3 L/min, 干燥气流量 10 L/min, 加热气流量 10 L/min, 接口温度 300 °C, 接口电压 4.0 kV。

#### 2.2.3 标准溶液的制备

取伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 混合标准溶液 0.2 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用 50% 的乙腈水溶液稀释并定容至刻度,配制成质量浓度为 1 μg/mL 的标准储备溶液。取标准储备溶液 1 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用 50% 的乙腈水溶液稀释并定容至刻度,配制成质量浓度为 100 ng/mL 的中间标准溶液。取适量中间标准溶液置于 10 mL 容量瓶中,用 50% 的乙腈水溶液稀释得到质量浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 和 100.0 μg/L 的标准系列溶液。

#### 2.2.4 样品前处理方法

##### (1) QuEChERS 方法

准确称取 5 g(精确至 0.001 g)样品于 50 mL 离心管中



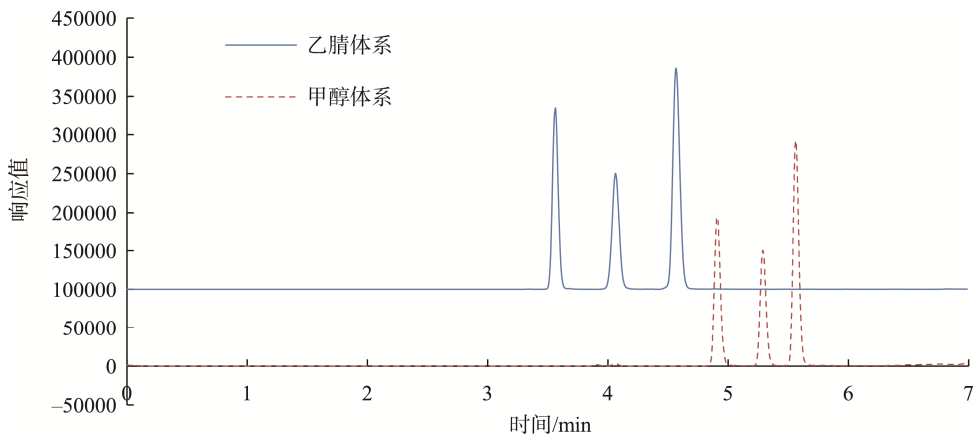


图 1 2 种流动相体系下的伏马毒素色谱图  
Fig.1 Chromatogram of fumonisins with 2 kinds of mobile phase

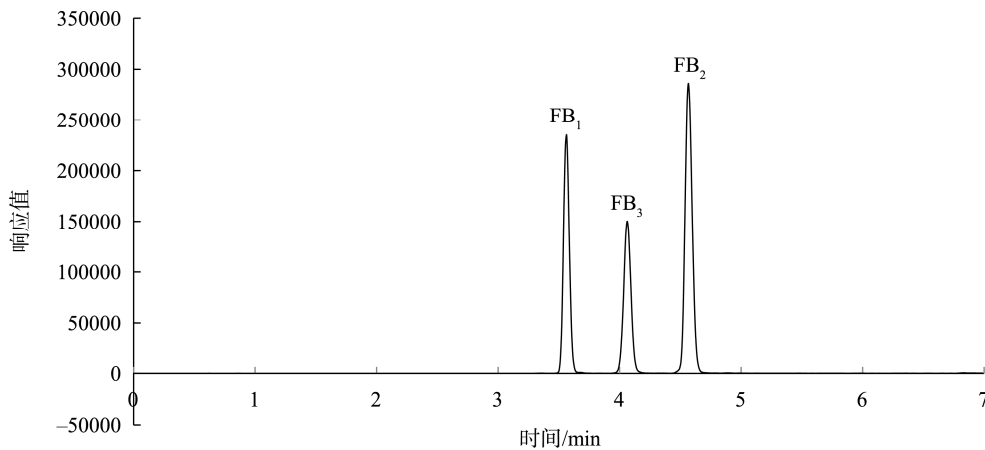
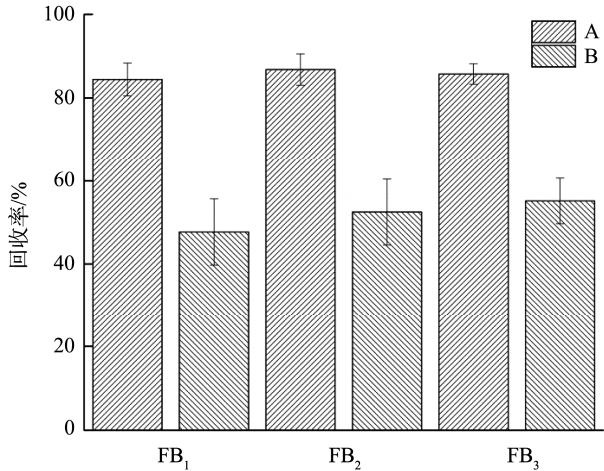


图 2 伏马毒素总离子流色谱图  
Fig.2 Total ion chromatography of fumonisins

3.3.2 净化条件优化

实验考察了 2 种 QuEChERS 样品前处理方法净化方式 (LUMTECH MPFC-QuEChERS 高脂类超滤型净化柱净化和 Waters DisQuE 净化管净化)对 3 种伏马毒素的提取回收率,以不含伏马毒素的玉米油为基质,添加水平为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,按照 2.3.4 样品前处理方式提取净化后上机测定,计算加标回收率(结果见图 3)。对 3 种伏马毒素采用 2 种净化方式净化的回收率结果做显著性分析,可得  $P_{\text{FB1}}=0.00022$ ,  $P_{\text{FB2}}=0.00036$ ,  $P_{\text{FB3}}=0.00014$ , 3 组  $P$  值均小于 0.05,说明 2 种净化方式回收率结果差异显著,采用 LUMTECH MPFC-QuEChERS 高脂类超滤型净化柱净化的回收率要高于 Waters DisQuE 净化管净化的回收率,且平行样品的标准差更小。传统 QuEChERS 方法常用净化材料有 PSA、C<sub>18</sub>、中性氧化铝等,PSA 有助于除去脂肪酸等杂质,但对伏马毒素的回收率也有一定的影响,LUMTECH MPFC-QuEChERS 超滤型净化柱采用新型复合材料,比表面积大、去除基质中其他大分子干扰物优于 PSA、C<sub>18</sub> 等,因此能够取得较好的净化效果,同时回收率也可以满足实验要求。



注: A: LUMTECH MPFC-QuEChERS (高脂类)超滤型净化柱; B: Waters DisQuE 净化管。

图 3 不同净化方式下 3 种伏马毒素的回收率( $n=6$ )  
Fig.3 Recoveries of fumonisins under different purification conditions( $n=6$ )

3.4 基质效应

通过对比空白基质加标、提取液加标与纯溶剂标准溶液的响应值,考察样品基质对伏马毒素定量分析结果的影响。实验结果表明,与标准溶液相比,净化后的玉米油的基质抑制效应约为 20%~30%,而未经 QuEChERS 净化的基质抑制效应高达 90%以上。基质匹配标准曲线校正法是目前常用的测定食品中毒素含量时校正基质效应的方法,为了获得更准确的定量效果,实验采取基质匹配标准曲线校正的方法。

3.5 线性关系考察

分别取 2.3.4 中的系列标准工作溶液各 5 μL 按上述条件测定,以目标物质的峰面积为纵坐标,相应浓度为横坐标,绘制标准曲线,计算伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 的回归方程和相关系数。结果显示,伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 在

0.5~100 μg/mL 范围内线性关系均良好。以 3 倍信噪比确定化合物的检出限(limit of detection, LOD)、10 倍信噪比确定化合物的定量限(limit of quantitation, LOQ),相关技术指标见表 2,检出限和定量限分别为 0.12~0.70 μg/kg 和 0.42~2.40 μg/kg,方法灵敏度较高。

3.6 加标回收率

分别在不含伏马毒素的玉米油为基质中,添加 10、40 和 100 μg/kg 3 个浓度水平的伏马毒素混合标准溶液进行加标回收率测定,每个添加水平平行测定 6 次。计算平均回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),结果见表 3,测定结果的平均回收率为 83.2%~108.0%,相对标准偏差为 1.9%~4.6%,表明该方法准确度和重现性良好,满足日常检测要求。

表 2 伏马毒素相关技术指标  
Table 2 Related technical index of method for detection of fumonisins

| 伏马毒素            | 线性范围/(μg/mL) | 基质校正线性方程         | 相关系数   | LOD/(μg/kg) | LOQ/(μg/kg) |
|-----------------|--------------|------------------|--------|-------------|-------------|
| FB <sub>1</sub> | 0.5~100      | Y=69156X-5617.1  | 0.9997 | 0.22        | 0.75        |
| FB <sub>2</sub> | 0.5~100      | Y=152205X-4600.5 | 0.9998 | 0.12        | 0.42        |
| FB <sub>3</sub> | 0.5~100      | Y=100593X+27994  | 0.9998 | 0.70        | 2.40        |

表 3 回收率实验结果(n=6)  
Table 3 Results of recovery rate(n=6)

| 伏马毒素            | 添加水平/(μg/kg) | 平均回收率/% | RSD/% |
|-----------------|--------------|---------|-------|
| FB <sub>1</sub> | 10           | 108.0   | 3.6   |
|                 | 40           | 83.2    | 1.9   |
|                 | 100          | 84.4    | 3.9   |
| FB <sub>2</sub> | 10           | 103.6   | 2.0   |
|                 | 40           | 91.0    | 4.2   |
|                 | 100          | 86.8    | 2.5   |
| FB <sub>3</sub> | 10           | 106.7   | 2.2   |
|                 | 40           | 92.0    | 4.6   |
|                 | 100          | 85.7    | 2.9   |

3.7 实际样品测定

根据建立的方法对 10 批玉米油样品进行分析,10 批玉米油中均未检出伏马毒素。

4 结 论

本研究采用 QuEChERS 的方法对样品进行提取净化,并结合 UPLC-MS/MS 技术,建立了玉米油中伏马毒素的

快速筛查方法,方法操作简便、灵敏度高、定量准确、重现性好,可以实现批量样品的检测,提高检测的效率,适合玉米油中伏马毒素类的定性确证与定量检测。

参考文献

[1] 张凡,姜琳,李芳芳,等. 伏马菌素毒性及其毒性机制研究进展[J]. 中国药物警戒,2018,15(10): 617-622.  
Zhang F, Jiang L, Li FF, et al. Research progress on toxicity and its mechanisms of fumonisin [J]. Chin J Pharmacov, 2018, 15(10): 617-622.

[2] Eunkyong S, Yohan Y, Kim K, et al. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in agricultural products consumed in South Korea: An exposure assessment [J]. J Food Prot, 2009, 72(2): 436-440.

[3] 周贻兵,吴坤,李磊,等. 超高效液相色谱串联质谱法测定啤酒中伏马毒素的含量[J]. 中国酿造,2016,35(1): 152-155.  
Zhou YB, Wu K, Li L, et al. Determination of fumonisin contents in beer by UPLC-MS/MS [J]. China Brew, 2016, 35(1): 152-155.

[4] Nestor PG, Sergio O, Serna S, et al. Fumonisin and their analogs in contaminated corn and its processed foods-a review [J]. Food Addit Contam, 2018, 35(11): 2183-2203.

[5] Han Z, Ren Y, Liu X, et al. A reliable isotope dilution method for simultaneous determination of fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in traditional Chinese medicines by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Sep Sci, 2010, 33(17-18): 2723-2733.

[6] 郭耀东,刘艺茹,袁亚宏,等. 我国主要食品中伏马菌素污染水平分析与风险评估[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(1): 78-82.

- Guo YD, Liu YR, Yuan YH, *et al.* Fumonisin contamination in major food products and its dietary risk assessment in China [J]. *J Northwest A F Univ (Nat Sci Ed)*, 2014, 42(1): 78–82.
- [7] 赵丹霞, 丁晓雯. 伏马菌素对食品的污染及毒性[J]. *现代食品科技*, 2005, 21(2): 206–209.
- Zhao DX, Ding XW. The toxicity of fumonisins and its contamination in food [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2005, 21(2): 206–209.
- [8] World Health Organization. WHO global strategy for food safety: Safer food for better health [Z]. 2002.
- [9] 刘青, 邹志飞, 余场扬, 等. 食品中真菌毒素法规限量标准概述[J]. *中国酿造*, 2017, 36(1): 12–17.
- Liu Q, Zou ZF, Yu YY, *et al.* Review of regulations of mycotoxins limit standard in foods [J]. *China Brew*, 2017, 36(1): 12–17.
- [10] GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].  
GB 2761-2011 National food safety standard-Limit of mycotoxin in food [S].
- [11] 王雨晨, 王君, 王元凯, 等. 伏马毒素 B<sub>1</sub> 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法的建立[J]. *上海交通大学学报*, 2011, 29(2): 69–74.
- Wang YC, Wang J, Wang YK, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies and development of an indirect competitive ELISA for fumonisin B<sub>1</sub> detection [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ*, 2011, 29(2): 69–74.
- [12] 何庆华, 许杨, 刘师文. 直接竞争化学发光酶免疫法检测谷物中的伏马菌素 B<sub>1</sub> [J]. *食品科学*, 2012, 33(22): 173–176.
- He QH, Xu Y, Liu SW. Determination of fumonisin B<sub>1</sub> in cereal samples by direct competitive chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. *Food Sci*, 2012, 33(22): 173–176.
- [13] 王军淋, 胡玲玲, 蔡增轩, 等. 超高压液相色谱法同时检测玉米中的伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> [J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(1): 216–223.
- Wang JL, Hu LL, Cai ZX, *et al.* Simultaneous determination of fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> and B<sub>3</sub> in maize by ultra pressure liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2013, 4(1): 216–223.
- [14] 宫慧芝, 那磊, 李岩溪, 等. 玉米中伏马菌素 B<sub>1</sub> 高效液相色谱检测[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(3): 381–382.
- Gong HZ, Na L, Li YX, *et al.* Determination of fumonisin B<sub>1</sub> in maize by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Publ Health*, 2008, 24(3): 381–382.
- [15] 马丽艳, 袁长梅, 石文婷, 等. 高效液相色谱法测定膨化玉米制品中的伏马菌素 FB<sub>1</sub> 和 FB<sub>2</sub> [J]. *上海农业学报*, 2010, 26(1): 88–91.
- Ma LY, Yuan CM, Shi WT, *et al.* Determination of fumonisins in puffed corn products by HPLC [J]. *Acta Agric Shanghai*, 2010, 26(1): 88–91.
- [16] 马俊美, 刘东, 张雷雷, 等. 在线固相萃取-液相色谱-串联质谱法快速测定玉米粉和面粉中伏马毒素[J]. *食品科学*, 2017, 38(20): 300–305.
- Ma JM, Liu D, Zhang LL, *et al.* Online solid phase extraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of fumonisins in corn and wheat flour samples [J]. *Food Sci*, 2017, 38(20): 300–305.
- [17] 魏云计, 冯民, 黄娟, 等. 固相萃取/高效液相色谱-串联质谱法快速测定饲料中的 3 种伏马毒素[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(6): 729–733.
- Wei YJ, Feng M, Hang J, *et al.* Rapid determination of three fumonisins in feeds by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid phase extraction [J]. *J Instrum Anal*, 2018, 37(6): 729–733.
- [18] 李永刚, 张瑞, 聂晓明, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定玉米油中的伏马毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(3): 336–338, 343.
- Li YG, Zhang R, Nie XM, *et al.* Determination of fumonisins in corn oil by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2017, 27(3): 336–338, 343.

(责任编辑: 李磅礴)

## 作者简介

李 莉, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: lili\_nicpbp@126.com

李 硕, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品、化妆品检测。

E-mail: pahayokolide@sina.com