

超高效液相色谱串联质谱测定常见农产品中 40 种真菌毒素

范楷¹, 唐占敏¹, 聂冬霞¹, 祭芳², 徐剑宏², 钱鸣蓉³, 段劲生⁴, 赵志辉¹, 韩铮^{1*}

(1. 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403;
2. 江苏省农业科学院, 南京 210014; 3. 浙江省农业科学院, 杭州 310021;
4. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 合肥 230001)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)同时检测小麦、玉米、稻谷、番茄和桃等常见农产品中 40 种真菌毒素含量的分析方法。**方法** 谷物样品先后经水和含 1%(V/V)甲酸的乙腈溶液提取, 果蔬样品经 1%(V/V)甲酸的乙腈溶液提取, 氯化钠和无水硫酸镁盐析后, 取上清液氮吹至干, 残渣经 5 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈(80:20, V/V)复溶, 过膜后上机测定, 通过基质匹配标准曲线进行定量分析。**结果** 40 种真菌毒素在各自的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 0.2~10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.5~20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在低、中、高 3 个添加水平下, 5 种农产品基质中 40 种真菌毒素的平均加标回收率为 71.8%~118.6% 精密密度为 1.2%~16.9%($n=5$)。**结论** 本方法操作简单、灵敏度高、实用性强, 适用于小麦、玉米、稻谷、番茄和桃等常见农产品中 40 种真菌毒素的同时检测分析。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 真菌毒素; 农产品

Simultaneous determination of 40 mycotoxins in common agricultural products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

FAN Kai¹, TANG Zhan-Min¹, NIE Dong-Xia¹, JI Fang², XU Jian-Hong², QIAN Ming-Rong³, DUAN Jing-Sheng⁴, ZHAO Zhi-Hui¹, HAN Zheng^{1*}

(1. Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Institute for Agro-Food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China; 2. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3. Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China; 4. Institute of Plant Protection and Agro-Products Quality and Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230001, China)

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for simultaneous determination of 40 mycotoxins in different agricultural products (wheat, maize, rice, tomato and peach) by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The grain samples were extracted with water and acetonitrile containing 1% (V/V) formic acid. and tomato and peach samples were extracted with

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2019-02-08-00-12-F01148)

Fund: Supported by Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program of China (2019-02-08-00-12-F01148)

*通讯作者: 韩铮, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: hanzheng@saas.sh.cn

*Corresponding author: HAN Zheng, Professor, Institute for Agro-food Standards and Testing Technology, Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China. E-mail: hanzheng@saas.sh.cn

acetonitrile containing 1% (*V/V*) formic acid. After salted out with sodium chloride and anhydrous magnesium sulfate, an aliquot of the supernatant was dried by nitrogen gas, re-dissolved by 1 mL water containing 5 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile (80:20, *V:V*), filtrated and analyzed by UPLC-MS/MS. Accurate quantification was achieved by matrix-matched calibration curves. **Results.** Good linear relationships were obtained in respective linear ranges and the correlation coefficients (r^2) were greater than 0.99. The limits of detection and the limits of quantification in different matrices ranged from 0.2–10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and from 0.5–20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. Recoveries of 40 kinds of mycotoxins in five kinds of agriculture products at low, medium and high spiked levels were ranged from 71.8%–118.6% ($n=5$), with precisions in the range of 1.2%–16.9%. **Conclusion** This method is simple, rapid and practical, which is suitable for quantitative analysis of 40 kinds of mycotoxins in various agricultural products.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mycotoxins; agricultural products

1 引言

真菌毒素是由产毒真菌在一定环境条件下产生的有毒次级代谢产物,广泛存在于谷物、水果和蔬菜等农产品及其制品中^[1]。在已发现的 400 余种真菌毒素中,黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)、单端孢霉烯族毒素(trichothecenes, TCTs)、伏马毒素(fumonisin, FBs)、赭曲霉毒素(ochratoxin)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)等 40 种毒素较为常见,危害较大^[2],具有致癌、致畸、致突变以及肝细胞毒性、中毒性肾损害、生殖紊乱以及免疫抑制等毒性作用,对人体与动物的健康造成严重威胁^[3,4]。真菌毒素污染已成为世界性公共安全问题,其普遍性、严重性和防控的难度已经越来越引起人们的关注。世界卫生组织已将真菌毒素纳入农产品和食品安全体系重点监测对象^[5];我国也规定了一系列重要真菌毒素的限量和检测标准^[6],并不断加强农产品和食品中真菌毒素污染的监控力度。

谷物、果蔬等农产品中常呈现多种真菌、多种毒素复合污染的特征^[7]。然而,传统的真菌毒素检测方法,如酶联免疫吸附法^[8]、薄层色谱法^[9]、胶体金法^[10]、高效液相色谱法^[11]和气相色谱法^[12]等往往只适用于一种或一类真菌毒素的定性或定量分析,并不能满足实际农产品检测、监控等的需要。近年来,随着质谱技术的快速发展,超高效液相色谱-串联质谱法(ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)在真菌毒素检测方面的优势逐渐显现^[13]。通过保留时间和碎片离子共同完成定性定量分析,UPLC-MS/MS 结合了色谱分离度好和质谱灵敏度高的特点,已成为了谷物、果蔬等农产品中多种真菌毒素检测的理想和主流技术^[14]。

长三角地区位于东部季风区,是典型的亚热带季风气候,夏季高温多雨,农产品由于储存、运输等条件不当,非常容易被真菌感染而产生毒素^[15]。本研究选取小麦、玉米、稻谷、番茄和桃等该地区常见谷物和果蔬农产品,建

立了 UPLC-MS/MS 同时测定其中 40 种真菌毒素的分析方法,以期为农产品中多种真菌毒素的快速筛查和定量测定提供参考依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); TRIPLE QUADTM 5500 三重四级杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); 5804R 离心机(德国 Eppendorf 公司); HSC-24B 氮吹仪(上海楚定分析仪器有限公司); Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); AL104 分析天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); SK8210LHC 超声波清洗机(上海科导超声仪器有限公司); BJ-800A 食品粉碎机(杭州德清拜杰电器有限公司)。

甲醇、乙腈、甲酸、醋酸铵(色谱纯,德国 Merck 公司); 无水硫酸镁、氯化钠(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司); 40 种真菌毒素标准品和 5 种同位素内标见表 1(纯度均大于 99%,美国 Romer 公司); 实验用小麦、玉米、稻谷、番茄和桃样品购自上海本地超市、农户或农贸市场,粉碎后于-4℃保存。

2.2 实验方法

2.2.1 真菌毒素标准溶液的配制

分别移取适量 40 种真菌毒素标准品用乙腈稀释成浓度为 10 mg/L 的标准储备液,再用乙腈配制为质量浓度为 1 mg/L 的混合标准工作液,于 20℃保存;分别移取适量 5 种同位素内标标准品,用乙腈配制成 $^{13}\text{C}_{17}$ -黄曲霉毒素 B₁、 $^{13}\text{C}_{20}$ -赭曲霉毒素 A、 $^{13}\text{C}_{15}$ -伏马毒素 B₁、 $^{13}\text{C}_{15}$ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 $^{13}\text{C}_{18}$ -玉米赤霉烯酮浓度分别为 5、100、200、500 和 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合内标标准工作液,于-20℃保存。

2.2.2 样品前处理

基于实验室前期研究建立的分析方法^[16,17]进行适当改进,谷物(小麦、玉米和稻谷)和果蔬(番茄和桃)样品处理方法略有差异:

谷物: 称取 2 g (精确到 0.01 g) 试样于 50 mL 离心管中, 加入 200 μ L 同位素内标混合标准工作液, 于室温下静置 1 h 后, 加入 5 mL 水, 浸泡 5 min 后, 超声提取 40 min, 然后加入 8 mL 含 1% (*V/V*) 甲酸的乙腈溶液, 涡旋混匀 30 s 后, 超声提取 40 min, 加入 2.0 g 无水硫酸镁和 0.5 g 氯化钠, 立即剧烈振摇 30 s, 超声 10 min, 以 8000 r/min 离心 5 min。移取 4 mL 上清液, 于 40 $^{\circ}$ C 下氮气吹干, 用 1 mL 5 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈 (80:20, *V:V*) 溶解残渣, 涡旋 30 s, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 上机测定。

果蔬: 精密称取 2 g (精确到 0.01 g) 试样于 50 mL 离心管中, 于室温下静置 1 h 后, 加入 10 mL 含 1% (*V/V*) 甲酸的乙腈溶液, 涡旋混匀 30 s 后, 超声提取 40 min, 加入 2.0 g 无水硫酸镁和 0.5 g 氯化钠, 立即剧烈振摇 30 s, 超声 10 min, 以 8000 r/min 离心 5 min, 移取 5 mL 上清液, 于 40 $^{\circ}$ C 下氮气吹干, 用 1 mL 5 mmol/L 醋酸铵水溶液-乙腈 (80:20, *V:V*) 溶解残渣, 涡旋 30 s, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后, 上机测定。

2.2.3 UPLC-MS/MS 检测条件

色谱条件: 色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 3.0 mm, 2.7 μ m); 流动相: 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵溶液, 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1 min, 5%B; 1~5 min, 5%B~100%B; 5~6 min, 100%B; 6~6.5 min, 100%B~5%B; 6.5~8 min, 5%B; 流速 0.4 mL/min; 进样量 3 μ L; 柱温 40 $^{\circ}$ C。

质谱条件: 采用电喷雾电离源 (electron spray ionization, ESI) 正负离子模式同时扫描; 雾化气、辅助气均为高纯空气, 碰撞气为高纯氮气; 雾化气: 50 Psi; 辅助气: 50 Psi; 雾化温度: 500.0 $^{\circ}$ C; 喷雾电压: 5500 V; 喷雾电压气帘气: 35 Psi; 碰撞气: 8 Psi; 通过多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 模式对目标化合物进行定量。40 种目标真菌毒素及 5 种同位素内标的保留时间、母离子、子离子、碰撞电压等质谱参数见表 1。40 种真菌毒素在标准溶液中的 MRM 图谱和总离子流图如图 1 所示。

表 1 40 种真菌毒素及 5 种同位素内标的质谱参数
Table 1 MS/MS spectrometry parameters for 40 mycotoxins and 5 internal standards

真菌毒素	缩写	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞电压/eV	离子源
黄曲霉毒素 B ₁ (aflatoxin B ₁)	AFB ₁	5.54	313	241*/269	50/43	+
黄曲霉毒素 B ₂ (aflatoxin B ₂)	AFB ₂	5.40	315	287*/259	34/38	+
黄曲霉毒素 G ₁ (aflatoxin G ₁)	AFG ₁	5.21	329	243*/311	35/38	+
黄曲霉毒素 G ₂ (aflatoxin G ₂)	AFG ₂	5.05	331	285*/245	37/40	+
黄曲霉毒素 M ₁ (aflatoxin M ₁)	AFM ₁	5.06	329	273*/259	31/30	+
黄曲霉毒素 M ₂ (aflatoxin M ₂)	AFM ₂	5.05	331	216*/189	48/54	+
杂色曲霉毒素(sterigmatocystin)	SMC	6.91	325	310*/281	38/50	+
¹³ C ₁₇ -黄曲霉毒素 B ₁ (¹³ C ₁₇ -aflatoxin B ₁)	¹³ C ₁₇ -AFB ₁	5.54	330	301*/255	22/38	+
赭曲霉毒素 A(ochratoxin A)	OTA	5.89	404	358*/239	26/30	+
赭曲霉毒素 B(Ochratoxin B)	OTB	5.40	370	205*/187	28/48	+
赭曲霉毒素 C(ochratoxin C)	OTC	7.07	432	358*/238	25/42	+
赭曲霉毒素 α (ochratoxin α)	OT α	4.88	255	167*/211	30/30	-
交链孢霉烯(altenuene)	ALT	5.51	293	257*/232	20/29	+
腾毒素(tentoxin)	Ten	6.24	415	312*/256	30/40	+
细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)	TeA	3.40	196	112*/139	30/30	-
腐败菌素 A(destruxin A)	DA	6.39	578	437*/178	40/48	+
疣孢青霉原(verruculogen)	VER	7.04	512	352*/313	24/24	+
¹³ C ₂₀ -赭曲霉毒素 A(¹³ C ₂₀ -ochratoxin A)	¹³ C ₂₀ -OT A	5.89	424	240*/377	22/12	+
伏马毒素 B ₁ (fumonisin B ₁)	FB ₁	5.49	722	334*/352	55/50	+
伏马毒素 B ₂ (fumonisin B ₂)	FB ₂	6.28	706	336*/318	54/46	+
伏马毒素 B ₃ (fumonisin B ₃)	FB ₃	5.91	706	336*/318	50/53	+
蛇形毒素(diacetoxyscirpenol)	DAS	5.62	384	229*/307	21/15	+

续表 1

真菌毒素	缩写	保留时间/min	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞电压/eV	离子源
新茄镰孢菌醇(neosolaniol)	NEO	4.33	400	305*/215	17/24	+
胶黏毒素(gliotoxin)	GLI	5.63	327	215*/153	31/38	+
环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid)	CPA	5.74	335	140*/180	35/35	-
T-2 毒素(T-2 toxin)	T-2	6.43	484	185*/305	27/19	+
HT-2 毒素(HT-2 toxin)	HT-2	6.13	442	263*/215	43/43	+
¹³ C ₁₅ -伏马毒素 B ₁ (¹³ C ₁₅ -fumonisin B ₁)	¹³ C ₁₅ -FB ₁	5.48	756	356*/374	36/32	+
脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynevalenol)	DON	3.72	297	203*/161	23/31	+
镰刀菌烯酮(fusarenon X)	Fus X	4.25	413	353*/263	13/21	-
15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-acetyl-deoxynivalenol)	15-ADON	4.87	339	261*/137	16/15	+
3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-acetyl-deoxynivalenol)	3-ADON	4.87	339	231*/203	16/19	+
3-葡萄糖苷化脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol-3-glucoside)	D3G	3.68	517	457*/427	18/40	-
展青霉素(patulin)	PAT	2.91	155	95*/81	18/20	+
桔青霉素(citrinin)	CIT	5.57	249	113*/205	15/25	-
麦考酚酸(mycophenolic acid)	MPA	5.55	321	303*/207	12/30	+
¹³ C ₁₅ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (¹³ C ₁₅ -deoxynevalenol)	¹³ C ₁₅ -DON	3.72	312	263*/216	14/10	+
玉米赤霉烯酮(zearalenone))	ZEN	6.73	317	175*/131	35/40	-
玉米赤霉酮(zearalanone)	ZAN	6.65	319	205*/161	32/38	-
α-玉米赤霉烯醇(α-zearalenol)	α-ZOL	6.59	319	174*/130	38/45	-
β-玉米赤霉烯醇(β-zearalenol)	β-ZOL	6.31	319	174*/130	38/45	-
α-玉米赤霉醇(α-zearalanol)	α-ZAL	6.50	321	277*/161	31/40	-
β-玉米赤霉醇(β-zearalanol)	β-ZAL	6.18	321	277*/161	31/40	-
青霉酸(penicillic acid)	PCA	3.80	171	125*/153	17/11	+
¹³ C ₁₈ -玉米赤霉烯酮(¹³ C ₁₈ - zearalenone)	¹³ C ₁₈ -ZEN	6.73	335	140*/185	26/30	-

注: *为定量离子。

3 结果与分析

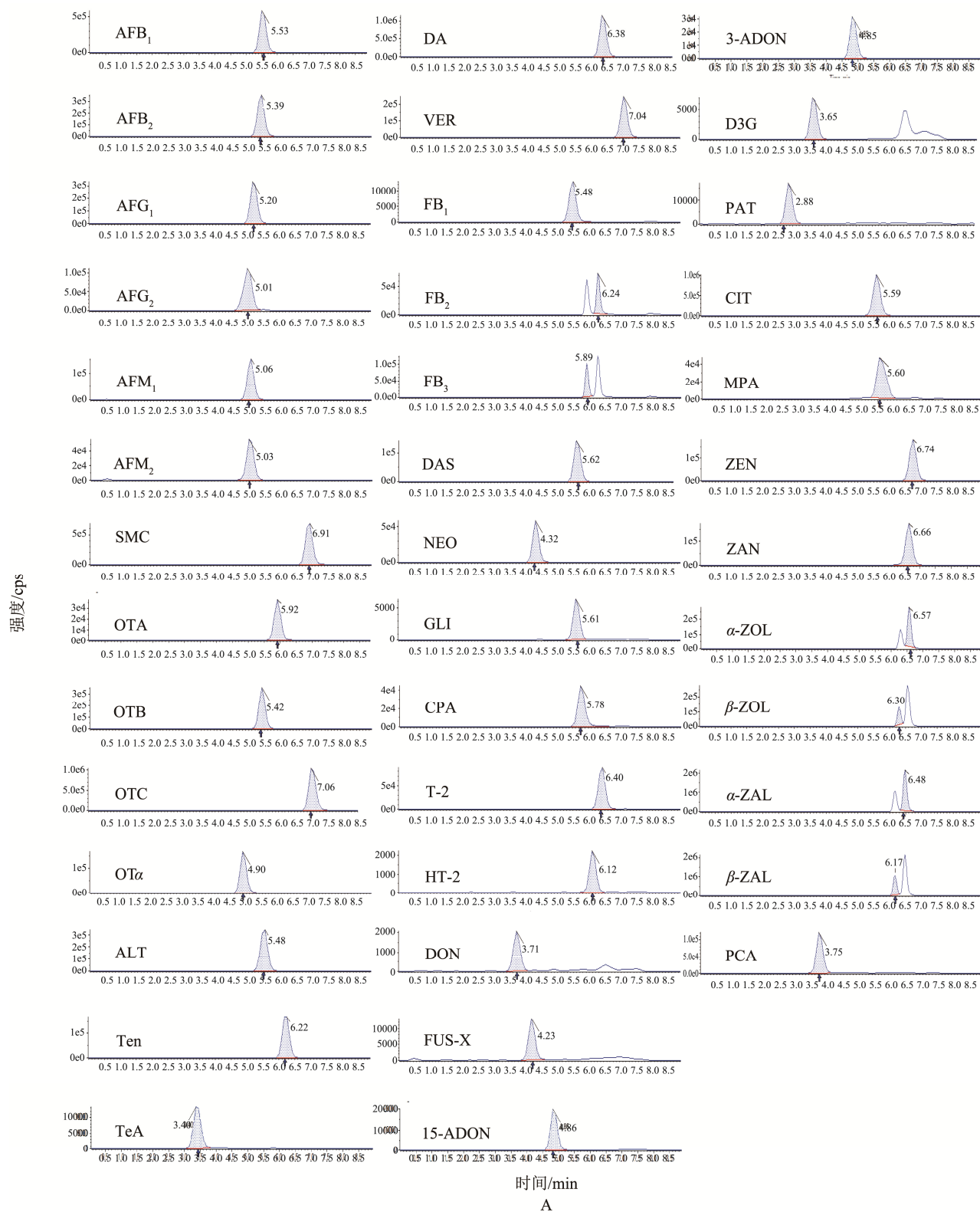
3.1 标准物质色谱图

40 种真菌毒素在标准溶液中的 MRM 图谱和总离子流图如图 1 所示, 可见各物质峰形区分度良好。

3.2 基质效应

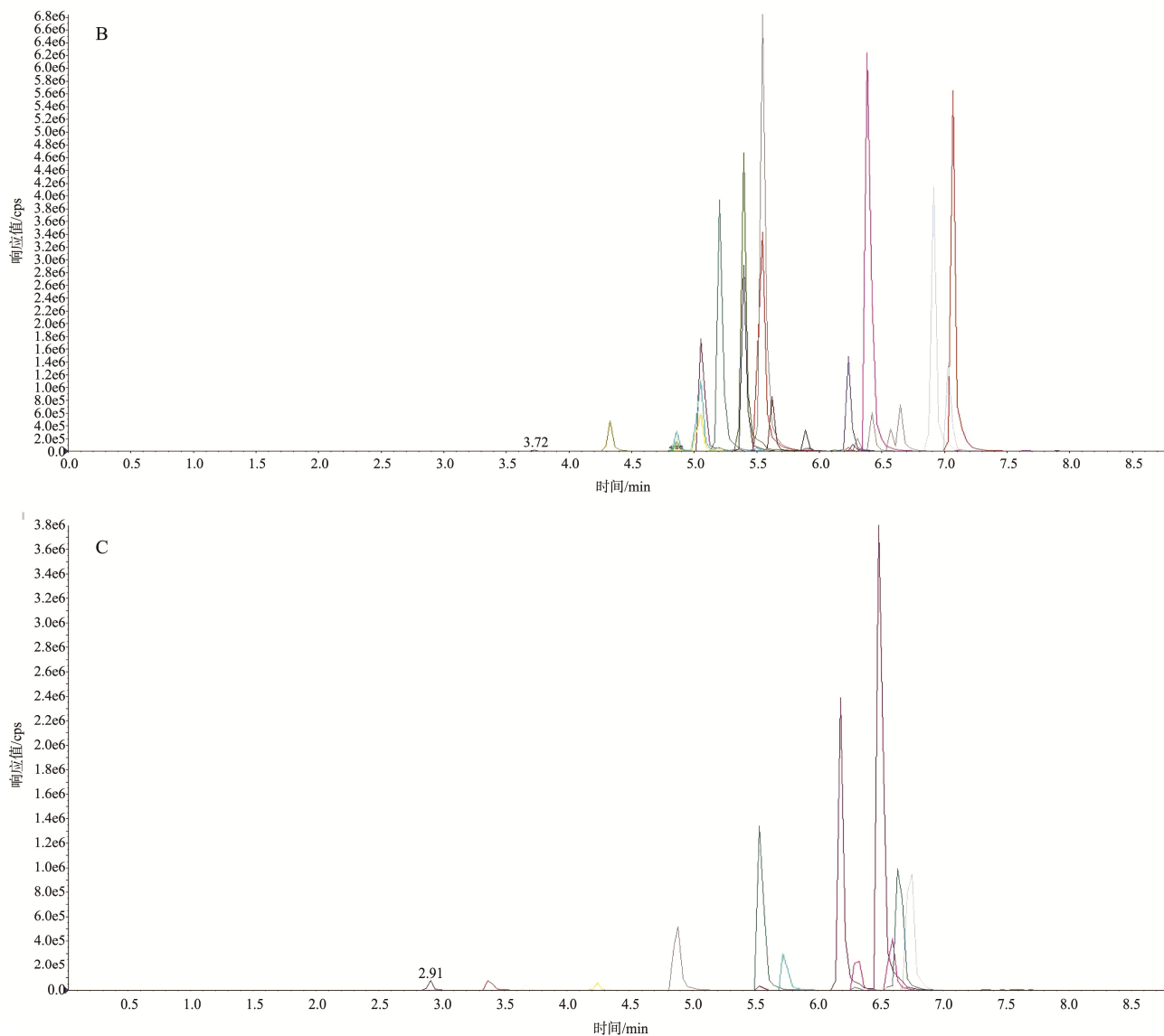
为评价基质效应, 本研究采用基质标准曲线斜率与溶剂标准曲线斜率的比值考察了目标毒素在小麦、玉米、稻谷、番茄和桃中的信号增强或抑制的程度 (signal suppression/enhancement, SSE)。SSE 值在 80%~120%之间表明基质效应影响不大, 当其高于 120%时显示基质增强效应,

当其低于 80%时显示基质抑制效应^[18]。如表 2 所示, 40 种真菌毒素在小麦、玉米、稻谷、番茄和桃基质中的 SSE 分别为 10.1%~121.4%, 2.2%~106.7%, 10.2%~137.5%, 5.0%~197.2% 和 2.0%~143.7%, 表明农产品中大多数毒素均呈现较强的基质效应。因此为保证准确性, 本研究采取基质标准曲线进行定量。然而基质加标后, 谷物农产品得到的回收率仍不能满足检测需求, 因此进一步采用同位素内标进行校正。将 5 种同位素内标的回收率 40 种真菌毒素的绝对回收率进行比较, 其回收率值相近的作为相应真菌毒素的内标, 用以校正该组目标物前处理过程的损失及基质效应^[16], 具体分组情况见表 1。而果蔬样品无需内标校正即可得到满意的回收率, 故采取基质标准曲线外标法定量。



注: A: MRM 图谱, B: 正离子, C: 负离子

图 1 标准溶液中 40 种真菌毒素的 MRM 图谱和总离子流图(100 µg/L)
Fig.1 MRM and total ion chromatograms of 40 mycotoxins in standard solution (100 µg/L)



注: A: MRM 图谱, B: 正离子, C: 负离子

续图 1 标准溶液中 40 种真菌毒素的 MRM 图谱和总离子流图(100 µg/L)

Fig.1 MRM and total ion chromatograms of 40 mycotoxins in standard solution (100 µg/L)

3.3 线性、检出限和定量限

取真菌毒素未污染的农产品样品,按 2.2.2 操作制备空白基质提取液。将适量的 40 种真菌毒素混合标准工作液和混合内标工作液混合,空白基质提取液稀释后得到不同浓度范围的基质标准溶液,建立 40 种真菌毒素的基质标准曲线。以定性通道的 3 倍信噪比(signal to noise ratio, S/N)确定化合物的检出限(limit of detection, LOD)、定量通道的 10 倍信噪比确定化合物的定量限(limit of quantitation, LOQ)。40 种真菌毒素在不同农产品中的线性范围、相关系数(r^2)、检出限和定量限如表 3 所示。结果显示,40 种真菌毒素在各自线性范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均 ≥ 0.99 ,其在空白基质小麦、玉米、稻谷、番茄和桃中的 LOD

和 LOQ 分别为 0.2~10 µg/kg 和 0.5~20 µg/kg,满足国家及行业相关限量标准的要求。

表 2 40 种真菌毒素在不同农产品中的基质效应
Table 2 Matrix effects of the 40 mycotoxins in different agricultural products

真菌毒素	基质效应/%				
	小麦	玉米	稻谷	番茄	桃
AFB ₁	79.4	15.7	18.4	14.6	2.9
AFB ₂	57.8	27.4	55.0	80.1	46.5
AFG ₁	73.9	17.5	18.8	79.2	14.8
AFG ₂	80.9	61.2	103.0	18.1	51.0

续表 2

真菌毒素	基质效应/%				
	小麦	玉米	稻谷	番茄	桃
AFM ₁	85.4	68.3	32.4	197.2	20.7
AFM ₂	65.3	41.6	68.9	129.9	47.3
SMC	64.0	6.9	40.0	5.0	2.0
OTA	85.1	91.1	103.4	11.7	67.2
OTB	74.8	46.9	93.8	144.5	73.3
OTC	87.5	2.2	91.0	45.9	51.3
OT α	112.0	105.4	105.7	60.4	79.8
ALT	97.3	87.2	89.5	44.3	113.0
Ten	72.3	56.9	87.9	137.1	30.8
TeA	65.2	91.3	89.7	32.7	83.8
DA	70.1	58.0	88.3	129.7	105.8
VER	83.6	6.6	61.8	48.6	143.7
FB ₁	95.6	62.6	88.7	32.2	60.6
FB ₂	121.4	45.4	137.5	50.9	38.0
FB ₃	92.9	50.8	91.9	34.5	54.9
DAS	109.5	96.5	74.7	68.0	63.8
NEO	92.3	54.5	62.3	112.2	36.2
GLI	84.3	78.9	84.0	101.1	90.5
CPA	54.0	4.2	55.5	21.6	3.9
T-2	87.3	77.2	92.4	96.3	33.1
HT-2	85.5	73.4	75.0	77.3	46.0
DON	62.5	58.4	35.6	23.1	52.1
Fus-X	97.4	91.7	69.5	18.9	52.7
15-ADON	92.9	71.9	60.0	66.6	42.2
3-ADON	97.2	74.2	60.8	68.0	42.3
D3G	104.2	78.1	18.8	43.4	14.7
PAT	103.6	106.7	79.0	49.1	25.7
CIT	60.9	30.0	91.0	94.1	24.4
MPA	10.1	7.1	10.2	8.0	9.8
ZEN	26.2	7.2	41.5	40.3	28.5
ZAN	34.5	13.2	46.2	48.3	23.2
α -ZOL	46.7	6.1	52.6	25.9	16.4
β -ZOL	24.9	7.1	36.9	44.2	19.8
α -ZAL	39.7	10.9	49.3	50.8	24.3
β -ZAL	35.2	13.0	34.2	57.9	19.5
PCA	95.0	101.6	88.7	80.9	53.8

3.4 回收率和精密度

采用加标回收实验法考察回收率和精密度。选取空白基质样品,按低、中、高 3 个水平加入适量的 40 种真菌毒素标准工作液,每个浓度选取 5 个平行样。按 2.2.2 和 2.2.3 处理样品和测定浓度,回收率为测定值和理论值的百分比,日内精密度和日间精密度分别为同一天和连续 5 天测定结果的相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。40 种真菌毒素在小麦中的平均回收率为 75.8%~111.4%,日内精密度为 1.5%~13.8%,日间精密度为 1.6%~14.9%;在玉米中的平均回收率 73.7%~117.8%,日内精密度为 2.2%~13.5%,日间精密度为 1.7%~15.0%;在稻谷中的平均回收率 75.2%~111.6%,日内精密度为 1.7%~13.7%,日间精密度为 1.7%~16.0%;在番茄中的平均回收率为 75.0%~116.4%,日内精密度为 2.2%~13.5%,日间精密度为 1.7%~15.0%;在桃中的平均回收率为 71.8%~118.6%,日内精密度为 1.2%~16.9%,日间精密度为 1.4%~15.4%。因此,该方法准确可靠,可用于小麦、玉米、稻谷、番茄和桃等农产品的实际分析检测。

3.5 实际样品检测

根据本研究中建立的方法,对来自上海地区不同超市、农贸市场和农家的 50 份农产品(小麦、玉米、稻谷、番茄和桃各 10 份)进行了 40 种真菌毒素测定,结果如表 4 所示。链格孢霉毒素中, Ten 在 100%小麦、40%稻谷和 10%桃中被检出,平均浓度为 0.64~35.26 $\mu\text{g}/\text{kg}$, TeA 则在 100%稻谷、60%番茄和 70%桃中被检出,平均浓度为 5.01~19.58 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。伏马毒素中, FB₁ 在玉米中检出率为 30%,平均浓度高达 333.97 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在其他农产品中检出率为 90%~100%,平均浓度为 3.02~59.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$; FB₂ 在小麦、玉米、番茄和桃中检出,检出率分别为 100%、40%、90%和 100%,而 FB₃ 则在小麦、番茄和桃中检出,检出率分别为 100%、60%和 100%。此外, DON 和 3-ADON 在 100%的小麦中检出,浓度分别为 63.8 和 4.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$; ZEN 在 1 份玉米样品中检出,浓度为 5.93 $\mu\text{g}/\text{kg}$; SMC、OTA、OTC 和 CIT 则在少量番茄样品中检出;其余真菌毒素均未检出。因此,上海地区农产品中链格孢霉毒素和伏马毒素污染较为普遍,值得引起人们关注。

4 结论与讨论

本研究建立了 UPLC-MS/MS 同时检测小麦、玉米、稻谷、番茄和桃等常见农产品中 40 种真菌毒素的方法。与传统方法相比,本方法具有操作简单、快速、毒素种类覆盖范围广等优点。方法学验证及实际样品检测结果表明该方法灵敏、准确、可靠、实用性强,能够满足相关国家和行业标准的要求,为农产品真菌毒素日常污染监测提供了一种高通量、高效率的检测方式。

表 3 40 种真菌毒素在不同农产品中的线性范围、 r^2 、检出限和定量限
 Table 3 Linear range, r^2 , LOD and LOQ of the 40 mycotoxins in different agricultural products

真菌毒素	小麦			玉米			稻谷			番茄			桃							
	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				
AFB ₁	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.3	0.5	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.994	0.2	0.5
AFB ₂	0.5~200	0.992	0.3	0.5	1~200	0.992	0.4	1.0	0.5~200	0.992	0.2	0.5	0.5~100	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5
AFG ₁	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.997	0.2	0.5
AFG ₂	0.5~200	0.999	0.2	0.5	1~200	0.991	0.3	1	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5
AFM ₁	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5	1~100	0.998	0.4	1.0
AFM ₂	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.993	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.997	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.3	0.5
SMC	0.5~200	0.999	0.2	0.5	1~200	0.995	0.4	1.0	0.5~200	0.993	0.3	0.5	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.99	0.2	0.5
OTA	1~200	0.997	0.4	1.0	2~200	0.994	0.8	2.0	0.5~200	0.994	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5
OTB	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.993	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5
OTC	0.5~200	0.994	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.992	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	1~200	0.993	0.4	1.0
OT α	1~200	0.999	0.4	1.0	1~200	0.999	0.3	1.0	1~200	0.999	0.3	1.0	1~200	0.997	0.5	1.0	0.5~200	0.999	0.3	0.5
ALT	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.998	0.3	0.5	1~200	0.994	0.3	1.0	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.994	0.2	0.5
Ten	0.5~200	0.997	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5
TeA	2~200	0.998	0.6	2.0	1~200	0.999	0.4	1.0	1~200	0.998	0.3	1.0	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5
DA	0.5~200	0.991	0.2	0.5	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5	0.5~200	0.991	0.2	0.5	0.5~200	0.992	0.2	0.5
VER	0.5~200	0.998	0.2	0.5	2~200	0.995	1.0	2.0	1~200	0.995	0.4	1.0	5~200	0.990	2.0	5.0	2~100	0.997	1.0	2.0
FB ₁	0.5~200	0.994	0.2	0.5	5~200	0.995	2.0	5.0	1~200	0.998	0.5	1.0	2~200	0.991	1.0	2.0	2~200	0.996	0.6	2.0
FB ₂	1~200	0.998	0.5	1.0	2~200	0.993	1.0	2.0	1~200	0.994	0.3	1.0	1~200	0.993	0.5	1.0	2~200	0.994	0.6	2.0
FB ₃	1~200	0.998	0.4	1.0	2~200	0.999	0.8	2.0	1~200	0.998	0.3	1.0	1~200	0.999	0.5	1.0	0.5~200	0.995	0.3	0.5
DAS	0.5~200	0.997	0.2	0.5	1~200	0.997	0.4	1.0	0.5~200	0.997	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5
NEO	0.5~200	0.999	0.2	0.5	1~200	0.999	0.5	1.0	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	2~200	0.998	1.0	2.0
GLI	1~200	0.992	0.5	1.0	10~500	0.994	5.0	10	5~200	0.996	2.0	5.0	5~200	0.998	2.0	5.0	2~200	0.99	1.0	2.0
CPA	1~200	0.997	0.4	1.0	5~200	0.991	2.0	5.0	1~200	0.995	0.4	1.0	2~200	0.992	0.8	2.0	20~2000	0.992	8.0	20.0
T-2	0.5~200	0.999	0.3	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5	0.5~200	0.997	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	1~200	0.993	0.2	1.0

续表 3

真菌毒素	小麦					玉米					稻谷					番茄					桃				
	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	范围/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	r^2	LOD/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
HT-2	10~500	0.997	5.0	10.0	10~500	0.994	5.0	10.0	5~200	0.993	2.0	5.0	5~200	0.995	2.0	5.0	20~1000	0.993	10.0	20.0	20~1000	0.993	10.0	20.0	
DON	10~500	0.991	3.0	10.0	10~500	0.992	5.0	10.0	10~500	0.994	5.0	10.0	10~500	0.995	4.0	10.0	20~1000	0.997	10.0	20.0	20~1000	0.997	10.0	20.0	
Fus X	5~200	0.992	2.0	5.0	10~500	0.996	4.0	10.0	10~500	0.993	5.0	10.0	5~200	0.994	2.0	5.0	2~200	0.996	0.6	2.0	2~200	0.996	0.6	2.0	
15-ADON	0.5~200	0.997	0.3	0.5	1~200	0.991	0.4	1.0	1~200	0.999	0.4	1.0	0.5~200	0.998	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	
3-ADON	0.5~200	0.997	0.2	0.5	1~200	0.996	0.5	1.0	1~200	0.999	0.4	1.0	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	
D3G	5~200	0.993	2.0	5.0	10~500	0.999	5.0	10.0	5~200	0.998	2.0	5.0	10~500	0.998	5.0	10.0	0.5~200	0.991	0.3	0.5	0.5~200	0.991	0.3	0.5	
PAT	2~200	0.999	1.0	2.0	5~200	0.997	2.0	5.0	5~200	0.998	2.0	5.0	10~500	0.997	4.0	10.0	0.5~200	0.994	0.3	0.5	0.5~200	0.994	0.3	0.5	
CIT	0.5~200	0.996	0.2	0.5	2~200	0.994	0.5	1.0	0.5~200	0.996	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5	1~100	0.997	0.4	1.0	1~100	0.997	0.4	1.0	
MPA	1~200	0.997	0.5	1.0	1~200	0.998	0.5	1.0	2~200	0.998	0.6	2.0	1~200	0.998	0.4	1.0	2~200	0.998	0.6	2.0	2~200	0.998	0.6	2.0	
ZEN	1~200	0.992	0.3	1.0	1~200	0.998	0.4	1.0	1~200	0.992	0.4	1.0	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5	0.5~200	0.996	0.2	0.5	
ZAN	0.5~200	0.997	0.2	0.5	1~200	0.993	0.4	1.0	1~200	0.992	0.3	1.0	0.5~200	0.997	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.995	0.2	0.5	
α -ZOL	2~200	0.998	0.9	2.0	5~200	0.992	2.0	5.0	2~200	0.992	0.8	2.0	1~200	0.993	0.4	1.0	0.5~200	0.995	0.3	0.5	0.5~200	0.995	0.3	0.5	
β -ZOL	2~200	0.999	1.0	2.0	5~200	0.991	2.0	5.0	2~200	0.991	1.0	2.0	1~200	0.994	0.5	1.0	0.5~200	0.991	0.3	0.5	0.5~200	0.991	0.3	0.5	
α -ZAL	1~200	0.999	0.4	1.0	2~200	0.995	1.0	2.0	1~200	0.995	0.4	1.0	0.5~200	0.995	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	0.5~200	0.999	0.2	0.5	
β -ZAL	1~200	0.999	0.5	1.0	2~200	0.994	1.0	2.0	1~200	0.997	0.5	1.0	0.5~200	0.996	0.3	0.5	0.5~200	0.998	0.3	0.5	0.5~200	0.998	0.3	0.5	
PCA	2~200	0.999	1.0	2.0	2~200	0.999	0.6	2.0	2~200	0.998	1.0	2.0	1~200	0.999	0.4	1.0	5~200	0.998	2.0	5.0	5~200	0.998	2.0	5.0	

表 4 实际农产品中 40 种真菌毒素的检测结果
Table 4 Determination results of 40 mycotoxins in real agricultural products

真菌毒素	小麦		玉米		稻谷		番茄		桃	
	检出率/%	均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率/%	均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
SMC	-	-	-	-	-	-	10%	8.62	-	-
OTA	-	-	-	-	-	-	10%	0.24	-	-
OTC	-	-	-	-	-	-	40%	0.43	-	-
Ten	100%	35.26	-	-	40%	1.80	-	-	10%	0.64
TeA	-	-	-	-	100%	19.58	60%	9.60	70%	5.01
FB ₁	100%	59.28	30%	333.97	100%	6.03	90%	3.02	100%	3.48
FB ₂	100%	6.99	40%	90.62	-	-	90%	3.04	100%	3.47
FB ₃	100%	9.08	-	-	-	-	60%	6.08	100%	3.45
DON	100%	63.80	-	-	-	-	-	-	-	-
3-ADON	100%	4.43	-	-	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	20%	0.30	-	-
ZEN	-	-	10%	5.93	-	-	-	-	-	-

注: -为小于方法检出限。

参考文献

- [1] Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, *et al.* Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, (60): 218–237.
- [2] Fan K, Xu JJ, Jiang KQ, *et al.* Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing, China [J]. *Environ Pollut*, 2019, (248): 865–873.
- [3] Brase S, Encinas A, Keck J, *et al.* Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites [J]. *Chem Rev*, 2009, 109(9): 3903–3990.
- [4] 李文廷, 梁志坚, 张瑞雨, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定谷物及其制品中 11 种真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3747–3755.
Li WT, Liang ZJ, Zhang RY, *et al.* Determination of 11 kinds of mycotoxins in grains and its products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(10): 3747–3755.
- [5] 王瑞国, 郭丽丽, 王培龙, 等. 杂质吸附型净化结合超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物和动物饲料中 37 种霉菌毒素[J]. *色谱*, 2020, 38(7): 817–825
Wang RG, Guo LL, Wang PL, *et al.* Simultaneous determination of 37 mycotoxins in grain and animal feed by impurity adsorption purification coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2020, 38(7): 817–825.
- [6] 张新中, 丁辉, 彭涛, 等. 真菌毒素检测与限量标准的现状与问题分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(18): 6149–6156.
Zhang XZ, Ding H, Peng T, *et al.* Current situation and problems of mycotoxin detection and limitation standards [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(18): 6149–6156.
- [7] Smith MC, Madec S, Coton E, *et al.* Natural co-occurrence of mycotoxins in foods and feeds and their *in vitro* combined toxicological effects [J]. *Toxins*, 2016, 8(4): 94.
- [8] Oplatońska-Stachowiak M, Reiring C, Sajic N, *et al.* Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410(12): 3017–3023.
- [9] Rocha DFL, Oliveira MDS, Furlong EB, *et al.* Evaluation of the TLC quantification method and occurrence of deoxynivalenol in wheat flour of southern Brazil [J]. *Food Addit Contam*, 2017, 34(12): 2220–2229.
- [10] 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.
Cao 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.
- [11] Cubero-Leon E, Bouten K, Senyuya H, *et al.* Determination of ochratoxin A in black and white pepper, nutmeg, spice mix, cocoa, and drinking chocolate by high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2017, 100(5): 1458–1468.
- [12] Kong W, Zhang X, Shen H, *et al.* Validation of a gas chromatography-electron capture detection of T-2 and HT-2 toxins in Chinese herbal medicines and related products after immunoaffinity column clean-up and pre-column derivatization [J]. *Food Chem*, 2012, 132(1): 574–581.
- [13] 胡文彦, 许磊, 杨军, 等. 基于 QuEChERS 提取的快速液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷基辅助食品中的 9 种真菌毒素[J]. *色谱*, 2014, 32(2): 133–138.
Hu WY, Xu L, Yang J, *et al.* QuEChERS-based extraction procedure and

- rapid resolution liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry for the determination of nine mycotoxins in cereal-based complementary foods for infants and young children [J]. *Chin J Chromatogr*, 2014, 32(2): 133–138.
- [14] Qian M, Yang H, Li Z, *et al.* Detection of 13 mycotoxins in feed using modified QuEChERS with dispersive magnetic materials and UHPLC-MS/MS [J]. *J Sep Sci*, 2018, 41(3): 756–764.
- [15] Selvaraj JN, Wang Y, Zhou L, *et al.* Recent mycotoxin survey data and advanced mycotoxin detection techniques reported from China: A review [J]. *Food Addit Contam*, 2015, 32(4): 440–452.
- [16] 范志辰, 韩铮, 郭文博, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定不同饲料中 30 种真菌毒素[J]. *色谱*, 2017, 35(6): 627–633.
- Fan ZC, Han Z, Guo WB, *et al.* Simultaneous determination of 30 mycotoxins in different feed products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2017, 35(6): 627–633.
- [17] Guo W, Fan K, Nie D, *et al.* Development of a QuEChERS-based UHPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six alternaria toxins in grapes [J]. *Toxins*, 2019, 11(2): 87.
- [18] Frenich AG, Romero-González R, Gómez-Pérez ML, *et al.*

Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(28): 4349–4356.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



范 楷, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: fankai1983@foxmail.com



韩 铮, 研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: hanzheng@saas.sh.cn