

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定 小麦中的4种限量真菌毒素

邵亮亮^{1*}, 黄珊², 邢嘉琪³, 应美蓉¹, 杜京霖¹, 赵美凤¹

(1. 浙江省粮油产品质量检验中心, 杭州 310012; 2. 国家林业和草原局竹子研究开发中心, 杭州 310012;
3. 杭州谱胜检测科技有限责任公司, 杭州 310006)

摘要: 目的 建立复合免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定小麦中4种限量真菌毒素的分析方法。**方法** 小麦样品粉碎后, 通过80%的乙腈水溶液(V:V)提取后, 采用复合免疫亲和柱净化, 并利用超高效液相色谱串联质谱的多反应监测模式进行测定分析。色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以10 mmol/L乙酸铵(含0.1%甲酸)-甲醇为流动相梯度洗脱, 在电喷雾电离模式下正、负离子同时扫描检测, 采用外标法定量。**结果** 在8.0 min内可以完成4种真菌毒素的测定, 在相应的线性范围内, 回归方程的相关系数均超过0.999, 3个加标水平下, 回收率为82.0%~103.0%, 相对标准偏差为5.2%~9.7%。**结论** 该方法快速、准确、高效, 适用于小麦及其制品中4种限量真菌毒素的同时测定。

关键词: 真菌毒素; 小麦; 超高效液相色谱-串联质谱法; 免疫亲和柱净化

Simultaneous determination of 4 limited mycotoxins in wheat by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SHAO Liang-Liang^{1*}, HUANG Shan², XING Jiang-Qi³, YING Mei-Rong¹,
DU Jing-Lin¹, ZHAO Mei-Feng¹

(1. Grain and Oil Products Quality Inspection Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China; 2. China National Bamboo Research Center, Hangzhou 310012, China; 3. Hangzhou Pro-solution Analysis Technology Co., Ltd., Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of 4 limited mycotoxins in wheat by immunoaffinity column purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Wheat samples were extracted by 80% (V:V) acetonitrile aqueous solution after crushing, purified by combination immunoaffinity column, and determined by multi-reaction monitoring mode of ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. An ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was used, with 10 mmol/L ammonium acetate (0.1% formic acid)-methanol as mobile phase for gradient elution. In the electrospray ionization mode, positive and negative ions were used for scan at the same time. External standard method was adopted for quantitative analysis. **Results** The determination of 4 mycotoxins was completed within 8.0 min. In the linear ranges, the correlation coefficients of regression equations were all over 0.999. The recoveries

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGN18C200004)

Fund: Supported by the Basic Public Welfare Research Project of Zhejiang Province (LGN18C200004)

*通信作者: 邵亮亮, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品和农产品质量安全与检测。E-mail: shaolly@163.com

*Corresponding author: SHAO Liang-Liang, Master, Senior Engineer, Grain and Oil Products Quality Inspection Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China. E-mail: shaolly@163.com

were 82.0%–103.0% at 3 levels, and the relative standard deviations were 5.2%–9.7%. **Conclusion** This method is rapid, accurate and efficient, and is suitable for the simultaneous determination of 4 limited mycotoxins in wheat and its products.

KEY WORDS: mycotoxin; wheat; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; immunoaffinity column purification

0 引言

真菌毒素(mycotoxin)是丝状真菌在适宜环境下生长产生的毒性次级代谢产物^[1]。目前已确认化学结构的真菌毒素有 400 多种,包脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素等^[2-3]。脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)又称呕吐毒素(vomitoxin),是对粮食污染最普遍的毒素^[4],具有细胞毒性及免疫抑制性质^[5];玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)又称 F-2 毒素,具有很强的雌性激素作用,并有免疫毒性和基因毒性^[6];黄曲霉毒素 B₁(aflatoxins B₁, AFB₁)是迄今发现的毒性最强的一类真菌毒素,被定为 I 类致癌物,对人类具有极高的毒性、致癌性、致畸性^[7];赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)主要侵害动物肝脏与肾脏,并被认为与人类的巴尔干肾病和泌尿系统肿瘤有关^[8],4 种毒素的结构式见图 1。这些真菌毒素是威胁我国粮食质量安全的最重要的因素之一,能够在生产、加工、运输、储藏等各环节污染粮食,进而威胁人畜健康^[9-10]。

为了严格控制真菌毒素污染,我国食品安全国家标准 GB 2761—2017《食品中真菌毒素限量》^[11]对粮食中 DON、ZEN、AFB₁、OTA 4 种主要真菌毒素规定了限量规定和检验方法^[12-15]。真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法^[16]、酶联免疫吸附法^[17]、胶体金免疫层析法^[18]、高效液相色谱法^[19]、高效液相色谱-串联质谱法^[20-21]。其中薄层色谱法灵敏度低、重现性差,目前使用较少;酶联免疫吸附法、胶体金法定量准确性差,常用于快速筛查;高效液相色谱法测定不同真菌毒素所用的实验条件不同,因此很难同时测定;超高效液相色谱串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)因灵敏度高,选择性强,定量准确,适用于多种真菌毒素的同时测定。目前,尚无 4 种限量真菌毒素同时测定的国标检测方法,而文献报道的多种真菌毒素同时测定方法存在前处理复杂、分析时间长等问题^[22-24]。由于粮食同时受几种真菌毒素污染的现象普遍存在,基层检测机构每年需要对大量的小麦样品进行多种真菌毒素的测定,因此,建立实用的 UPLC-MS/MS 方法,实现快速、准确、高效地同时测定小麦中的主要真菌毒素,可以大幅度提高检测效率,降低检测成本。

本研究选择专属性很强的四合一复合免疫亲和柱用

于提取液净化,通过超高效液相色谱串联质谱法检测分析,建立小麦中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 B₁、赭曲霉毒素 A 4 种限量真菌毒素的同时测定方法,拟满足基层检测机构对 4 种毒素的快速检测要求。

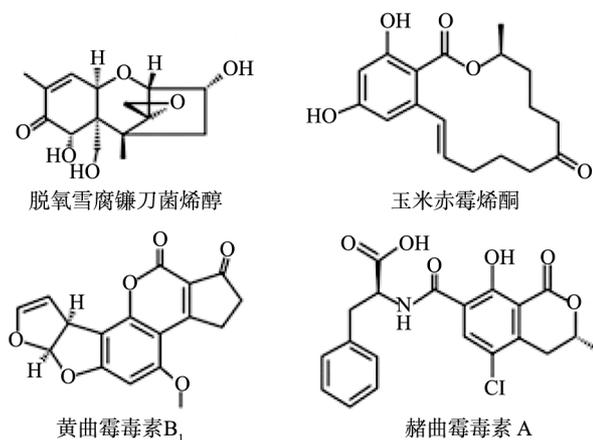


图 1 4 种真菌毒素结构式
Fig.1 Structural formulas of 4 mycotoxins

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器与设备

ACQUITY UPLC I-Class 液相色谱仪、Xevo TQ-D 质谱仪(配有电喷雾离子源,美国 Waters 公司); 4204 型电动分样器(美国 Gamet 公司); LM3100 型锤式实验室粉碎磨(瑞典 Perten 公司); PL202-L 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); WS-150D 型振荡器(德国 Wiggins 公司); N-EVAP-111 型氮吹仪(美国 Organomation 公司); XW-80A 型涡旋混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.1.2 材料与试剂

小麦样品由浙江省内种植农户提供。

4 种真菌毒素标准溶液: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 [(199±10) mg/L]、玉米赤霉烯酮 [(50.1±1.5) mg/L]、黄曲霉毒素 B₁ [(3.1±0.2) mg/L]、赭曲霉毒素 A [(10.4±0.3) mg/L](上海安谱实验科技股份有限公司)。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇/玉米赤霉烯酮/黄曲霉毒素 B₁/赭曲霉毒素 A 四合一复合免疫亲和柱(北京华安麦科生物技术有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,德国 Merck

公司); 甲酸、乙酸(色谱纯, 上海安谱实验科技股份有限公司); 氯化钠(分析纯, 广东西陇科学股份有限公司); 玻璃纤维滤纸(英国 Whatman 公司); 0.22 μm 微孔滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

分别准确移取 0.50、0.20、0.33、0.10 mL 的 DON、ZEN、AFB₁、OTA 标准溶液至 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 配制成 4 种真菌毒素的混合中间液, 浓度分别为 10000.00、1000.00、100.00、100.00 ng/mL。分别准确移取 0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mL 混合中间液于 10 mL 容量瓶中, 用 50% 的甲醇水溶液定容, 配制成系列混合标准工作液, 各浓度水平见表 1。

表 1 4 种真菌毒素混合标准系列浓度
Table 1 Mixed standard concentrations of 4 mycotoxins

真菌毒素	浓度水平/(ng/mL)					
	1	2	3	4	5	6
DON	50.00	100.00	200.00	500.00	1000.00	2000.00
ZEN	5.00	10.00	20.00	50.00	100.00	200.00
AFB ₁	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00
OTA	0.50	1.00	2.00	5.00	10.00	20.00

1.2.2 样品前处理

小麦样品通过电动分样器进行混合并缩分至 500 g 左右, 清杂后通过锤式实验室粉碎磨粉碎, 过 2 mm 分样筛; 准确称取 25.00 g 粉样于具塞三角瓶中, 加入 5 g 氯化钠, 并加入 125 mL 提取液(80%乙腈-水溶液, V:V) 提取, 置摇床上 250 r/min 剧烈振荡 20 min; 提取液静置 2 min, 用快速定性滤纸过滤, 收集滤液; 取 10 mL 滤液

加入 70 mL 水稀释, 混匀, 再用玻璃纤维滤纸过滤, 并收集滤液作为上样液; 移取 20 mL 上样液过复合免疫亲和柱, 用去离子水淋洗免疫亲和柱 2 次, 每次 10 mL, 待液体排干后, 用 2.0 mL 洗脱液(甲醇:乙酸=49:1, V:V) 洗脱。收集洗脱液, 于 50 °C 下氮气吹干, 用 1.0 mL 50% 的甲醇水溶液(V:V) 复溶, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后供超高效液相色谱串联质谱仪测定。

1.2.3 超高效液相色谱-串联质谱条件

(1) 超高效液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 柱温 40 °C, 流速 0.2 mL/min; 进样量 10 μL , 流动相 A 为 10 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸), 流动相 B 为甲醇, 梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱条件
Table 2 Gradient elution conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	90.0	10.0
2.50	90.0	10.0
4.00	20.0	80.0
4.50	20.0	80.0
5.50	90.0	10.0
8.00	90.0	10.0

(2) 质谱条件

电离源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 扫描方式: 为正、负离子同时扫描; 毛细管电压: ESI⁺ 3.50 kV, ESI⁻ 3.0 kV, 离子源温度: 150 °C; 碰撞气: 氩气; 脱溶剂温度: 350 °C; 脱溶剂气流: 800 L/h, 锥孔气流: 50 L/h; 检测方式: 多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM); 4 种真菌毒素的定性与定量离子对、锥孔电压、碰撞能量等质谱参数见表 3。

表 3 MRM 监测模式下真菌毒素的质谱参数
Table 3 Mass spectrometric parameters of mycotoxins in MRM monitoring mode

真菌毒素	分子量	离子模式	母离子(m/z)	离子对(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V	保留时间/min
DON	296.3	ESI ⁺	297.1[M+H] ⁺	249.2*	24	10	4.63
				203.2	24	14	
ZEN	318.4	ESI ⁻	317.2[M-H] ⁻	175.1*	56	24	6.04
				273.2	46	18	
AFB ₁	312.3	ESI ⁺	313.0[M+H] ⁺	241.0*	56	38	5.37
				285.0	52	22	
OTA	403.2	ESI ⁺	404.1[M+H] ⁺	239.0*	28	24	5.84
				221.0	28	36	

注: *表示定量离子。

2 结果与分析

2.1 质谱条件优化

为了获得最佳的灵敏度和响应值,分别选用 ESI⁺和 ESI⁻模式,将 4 种真菌毒素高浓度的单标溶液直接进样,进行母离子全扫描,优化质谱条件,选择各真菌毒素相对分子质量附近的准分子离子峰作为母离子,结果发现 DON、AFB₁、OTA 在 ESI⁺模式下灵敏度和响应强度高于 ESI⁻,而 ZEN 在 ESI⁻模式下灵敏度和响应强度明显高于 ESI⁺,因此 DON、AFB₁、OTA 选用 ESI⁺模式,ZEN 选用 ESI⁻模式。确定母离子质量数后,进行子离子扫描,每个化合物选择 2 对特征离子对,其中相对丰度高、稳定性强的子离子作为定量离子,干扰小、特征性强的子离子作为定性离子。最后在 MRM 模式下优化相应离子对的锥孔电压和碰撞能量等质谱参数,表 1 中浓度水平 4 的 4 种真菌毒素混合标准溶液的定量离子 MRM 图见图 2。

2.2 色谱条件的优化

2.2.1 流动相的选择

由于质谱分析采用 ESI⁺和 ESI⁻模式同时扫描的方

式进行,因此流动相的选择需兼顾 ESI⁺和 ESI⁻模式下真菌毒素的分离效果和灵敏度。液相分离的流动相通常由有机相和水相组成。采用乙腈作有机相时,4 种真菌毒素保留时间均比甲醇靠前,但 DON 峰型很差,而改用甲醇作有机相,DON 峰型良好,因此有机相选择甲醇。以纯水作为水相时,AFB₁与 OTA 的总离子流图响应值较低,灵敏度较差,而水相中添加甲酸或氨水能提高离子化效率^[25-26],因此本研究比较了 0.1%氨水、0.2%氨水、0.1%甲酸、0.5%甲酸作为水相的分离效果,结果表明无论是添加甲酸还是氨水,低浓度时离子化效率更好、灵敏度更高,但 OTA 与 ZEN 在 0.1%氨水中保留时间均提前,与 DON 和 AFB₁ 保留时间非常接近,分离度较差,在 0.1%甲酸中,OTA 与 DON、AFB₁ 能有效分离,但与 ZEN 保留时间几乎重叠。进一步研究发现,10 mmol/L 乙酸铵作为水相,ZEN 保留时间不变,而 OTA 保留时间提前至 AFB₁ 附近,在 10 mmol/L 乙酸铵添加 0.1%甲酸能够使 OTA 与 AFB₁ 完全分离,且能提高 DON、AFB₁、OTA 的响应值。因此综合考虑分离效果和灵敏度,选择 10 mmol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸)-甲醇作为流动相。流动相的选择和分离效果,结果见表 4。

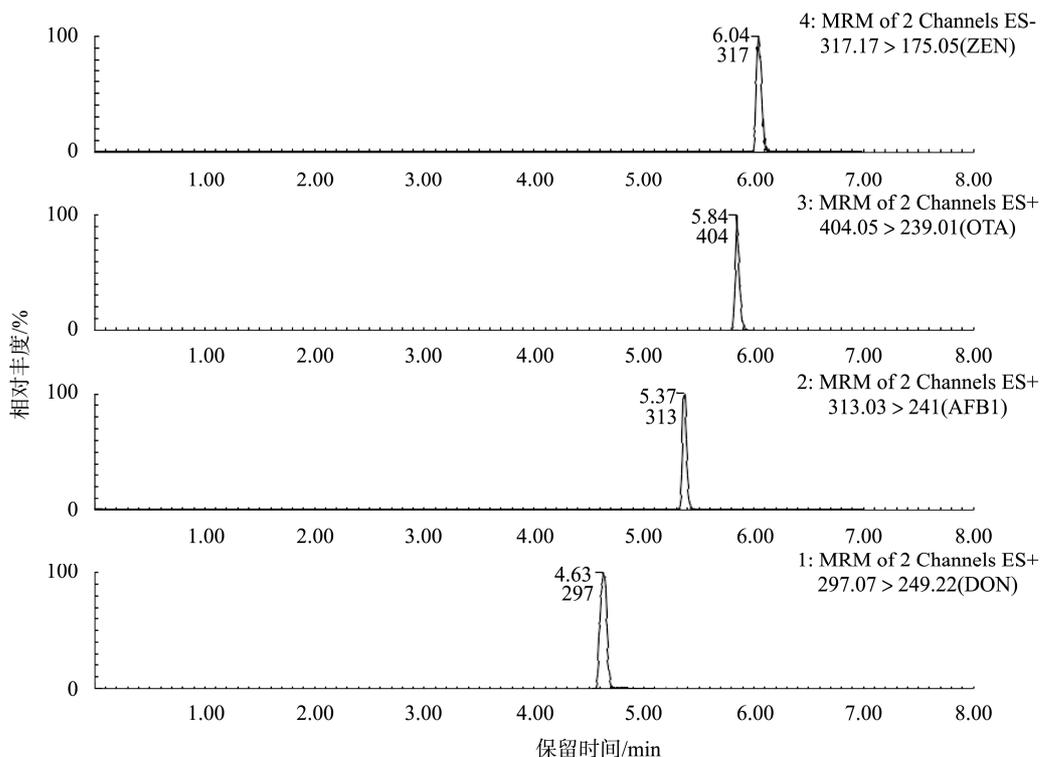


图 2 4 种真菌毒素标准溶液的 MRM 图

Fig.2 MRM chromatograms of standard solution of 4 mycotoxions

表 4 不同流动相洗脱方式 4 种真菌毒素的分离效果
Table 4 Separation of 4 mycotoxins by different elution methods

流动相	分离效果
有机相	4 种真菌毒素峰型良好
甲醇	
乙腈	DON 峰型差
水	AFB ₁ 与 OTA 灵敏度较低
0.1% 氨水	灵敏度高, 但 DON 与 OTA, AFB ₁ 与 ZEN 分离度较差
0.2% 氨水	灵敏度较高, 但 AFB ₁ 与 ZEN 分离度较差
水相	灵敏度高, 但 OTA、ZEN 分离度差
0.1% 甲酸	
0.5% 甲酸	灵敏度较高, 但 OTA、ZEN 分离度差
10 mmol/L 乙酸铵	OTA 与 AFB ₁ 灵敏度低, 且分离度差
10 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸)	OTA 与 AFB ₁ 灵敏度高, 4 种毒素分离度好

2.2.2 流动相梯度洗脱的优化

10 mmol/L 乙酸铵(含 0.1% 甲酸)-甲醇作为流动相对 4 种真菌毒素的洗脱能力不同, 因此每种毒素在合适的保留时间内进行洗脱时所用的有机相比例也不同。DON 在甲醇比例为 10% 时具有最佳的保留时间和峰型, 继续提高甲醇比例, 峰型逐渐变差。另一方面, AFB₁、ZEN 和 OTA 要求具有较高的有机相才能正常出峰, 纯甲醇洗脱时, 峰型良好, 但 ZEN 和 OTA 保留时间接近, 分离度不足, 80% 的甲醇能够保证 3 种真菌毒素具有良好的分离度和峰型, 继续降低甲醇比例至 60%~70%, 虽然能进一步提高分离度, 但 ZEN 和 OTA 保留时间延长, 且峰型很差, 甚至不出峰。可见 4 种真菌毒素无法通过等度洗脱完成分离, 因此本研究设置梯度洗脱程序, 在甲醇比例较低时先进行等度洗脱, 再提高甲醇比例进行梯度洗脱(表 2), 4 种真菌毒素在 8 min 内可获得理想的保留时间、分离度和峰型。

2.3 前处理条件的优化

由于真菌毒素在不同籽粒、不同部位的分布和含量差异很大, 因此为了保证试样的代表性和检测结果的准确性, 本研究试样通过大量样品分取和制备得到。4 种真菌毒素溶解性各不相同, DON 能溶于水, OTA 微溶于水, ZEN 和 AFB₁ 则均不溶于水, 而溶于甲醇和乙腈等有机溶剂, 因此小麦中真菌毒素常用的提取液为甲醇-水或乙腈-水的混合溶剂^[27-28]。提取液加入水使试样提取时分散性更好^[29], 也有利于降低免疫亲和柱净化前的稀释倍数, 因此, 提取液常用的有机相比例为 80%。本研究对同一小麦粉加标样品分别采用 80% 甲醇水溶液和 80% 乙腈水溶液进行真菌毒素的提取, 比较相应的提取效率, 结果见图 3。通过 80% 甲醇水溶液时, ZEN 和 OTA 回收率偏低, 而通过 80% 乙腈水溶液进行提取, 4 种的真菌毒素回收率均超过 90%, 满足测定的技术要求^[30]。此

外, 实验前处理过程中, 试样通过提取液提取后, 在甲醇水溶液中沉降速度较慢, 提取液过滤速度和净化速度很慢, 而在乙腈水溶液中能快速分层, 便于过滤和净化, 因此最终选择 80% 乙腈水溶液作为提取液。

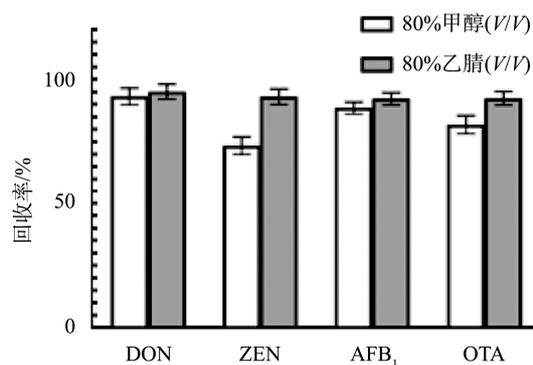


图 3 不同提取液提取后 4 种真菌毒素的回收率(n=3)

Fig.3 Recoveries of 4 mycotoxins extracted from different extracts (n=3)

2.4 复合免疫亲和柱净化条件的优化

由于提取液是强极性的乙腈水溶液, 试样提取过程中除了真菌毒素, 还有大量干扰物质也被提取, 这些干扰物质的存在会影响真菌毒素的分离和定量。现有研究表明, 使用 C₁₈ 固相萃取小柱、HLB 固相萃取小柱净化时回收率偏低^[31], 本研究采用定制的四合一复合免疫亲和柱, 通过抗原抗体的高选择性结合特性, 可以同时净化提取液中 DON、ZEN、AFB₁、OTA 4 种真菌毒素, 且避免了常规液液萃取中大量有机溶剂的使用。净化前提取液需要进行稀释, 降低甲醇含量, 以避免真菌毒素未完全吸附而流失。本研究比较了提取液加水进行 3 倍、5 倍、8 倍稀释方法回收率的差异, 结果发现, 随着稀释倍数的增加, 能够提高 4 种真菌毒素的回收率, 提取液

进行8倍稀释时(10 mL提取液+70 mL水),4种真菌毒素回收率均超过90%。但稀释倍数进一步增加时,回收率上升不明显,却增加了大量上柱液,降低了净化速度,因此最终选择提取液稀释倍数为8倍。

四合一复合免疫亲和柱的填料高度比单柱高很多,因此需要在洗脱时增加甲醇洗脱液的用量,但洗脱液用量过多会增加氮吹时间。本研究比较了甲醇洗脱液用量分别为1、2、3 mL时的洗脱效果,结果发现当洗脱液为1 mL时,大部分毒素未能洗脱,当洗脱液达2 mL时,回收率达到了90%以上,洗脱液用量达3 mL时,回收率几乎没有进一步提高,而增加的洗脱液用量会增加氮吹时间。因此,最终选择洗脱液用量选择为2 mL。但2 mL的洗脱液作为定容体积仍然较大,其中的真菌毒素含量较低,且由于洗脱液中不含水相,直接进样分析DON峰形较差,因此通过

氮吹浓缩后,以1.0 mL 50%的甲醇水溶液复溶后测定,能兼顾4种真菌毒素峰型和上机浓度。

2.5 方法的线性范围、回归方程及检出限

根据4种真菌毒素的限量值、常见含量和仪器响应强弱,配制不同质量浓度的混合标准工作液。在优化的前处理方法和仪器条件下,对表1中的系列混合标准工作液进行测定,分别以4种真菌毒素的峰面积为纵坐标(Y),对应的质量浓度为横坐标(X),进行线性回归分析,计算回归方程和相关系数,并根据信噪比(S/N)确定检出限($S/N \geq 3$)和定量限($S/N \geq 10$),结果见表5。4种真菌毒素线性关系良好,相关系数(r)均大于0.999,检出限为0.03~6.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为0.1~20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,均达到了国家标准方法的要求,表明方法具有较好的灵敏度。

表5 4种真菌毒素的线性范围、回归方程、相关系数、检出限及定量限

Table 5 Concentration ranges, linear regression equations, correlation coefficients, limits of detection and limits of quantitation of 4 mycotoxins

真菌毒素	线性范围/(ng/mL)	回归方程	r	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
DON	50.00~2000.00	$Y=8.2534X+13.6741$	0.9997	6.50	20.0
ZEN	5.00~200.00	$Y=3.7329X-5.9206$	0.9993	0.60	2.0
AFB ₁	0.50~20.00	$Y=564.0680X-12.7154$	0.9998	0.03	0.1
OTA	0.50~20.00	$Y=308.0510X-46.9205$	0.9999	0.06	0.2

2.6 回收率及精密度实验

选用空白小麦样品为本底,对4种真菌毒素进行低、中、高3个浓度水平的加标回收实验,在优化的实验条件下,每个加标水平重复测定6次,分别计算加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD),结果见表6。3个浓度水平下,平均加标回收率为82.0%~103.0%,RSD为5.2%~9.7%。方法的加标回收率均大于80.0%,相对标准偏差均小于10.0%,符合GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范食品理化检测》^[30]的技术要求,表明方法具有良好的准确度和精密度。

2.7 与国家标准方法的对比验证

以空白小麦粉样品通过加标得到5个限量值(DON、ZEN、AFB₁、OTA分别为1000、60、5.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)附近的不同含量的加标样品,分别采用本方法和国家标准法(HPLC法)测定4种真菌毒素含量,并通过 t 检验和Kendall一致性检验比较测定结果的差异性和方法的一致性,结果见表7。通过SPSS配对 t 检验可知,采用本方法和国标法,4种真菌毒素测定结果均没有显著差异($P>0.05$);继续通过Kendall一致性检验可以判断2种测定方法的一致程度,由于Kendall渐进显著性 $P<0.05$,因此2种方法测定结果具有显著的一致性,且一致性水

平很高(Kendall 协同系数 ≥ 0.9),可见本方法与国家标准法测定结果没有显著差异,2种方法在测定4种真菌毒素时高度一致。

表6 方法的加标回收率和精密度($n=6$)

Table 6 Recoveries of standard addition and precisions of the method ($n=6$)

真菌毒素	加标量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率/%	RSD/%
DON	10.0	10.3 \pm 1.0	103.0	9.7
	100.0	89.3 \pm 7.5	89.3	8.4
	1000.0	938.2 \pm 48.6	93.8	5.2
ZEN	5.0	4.2 \pm 0.4	84.0	9.5
	50.0	45.6 \pm 4.0	91.2	8.8
	200.0	175.4 \pm 13.6	87.7	7.8
AFB ₁	0.5	0.41 \pm 0.03	82.0	7.3
	5.0	4.5 \pm 0.3	90.0	6.7
	20.0	18.8 \pm 1.1	94.0	5.9
OTA	0.5	0.42 \pm 0.04	84.0	9.5
	5.0	4.6 \pm 0.3	92.0	6.5
	20.0	18.7 \pm 1.0	93.5	5.3

表 7 本方法与国家标准法测定结果比较
Table 7 Comparison of the results between this method and national standard method

真菌毒素	本方法/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	国标法/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	t 值	P 值	Kendall 渐进显著性	Kendall 协同系数
DON	926.1 \pm 210.8	939.6 \pm 197.8	-0.904	0.417		
ZEN	57.8 \pm 15.4	55.7 \pm 14.2	1.901	0.130	0.006	0.998
AFB ₁	4.7 \pm 1.7	4.8 \pm 1.4	-0.310	0.772		
OTA	4.7 \pm 1.4	4.8 \pm 1.6	-1.395	0.235		

另外, 考虑到国家标准方法测定每种真菌毒素时均需单独前处理和进样分析, 试剂耗材消耗量大, 仪器条件也需要反复切换, 而本方法实现了一次前处理和一次进样分析, 不仅减少了试剂消耗, 测定过程可以节约四分之三以上的时间, 大大提高了检测效率。

2.8 实际样品测定

采用本方法对 2019 年浙江生产的 70 个小麦样品进行 4 种真菌毒素的检测分析, 结果见表 8。70 个小麦样品中 4 种真菌毒素污染状况差异较大, 其中 DON 检出率最高, 达到 90.0%, 检出值为 20.0~3937.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ZEN 检出率达 68.6%, 检出值为 2.0~77.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB₁ 和 OTA 检出率很低, 分别为 2.9% 和 4.3%, 2 种毒素检出值分别为 0.3~0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.8~1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

我国食品安全国家标准 GB 2761—2017《食品中真菌毒素限量》^[1]规定了小麦中 DON、ZEN、AFB₁、OTA 4 种主要真菌毒素的限量, 分别为 1000、60、5.0、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。70 个小麦样品中, DON 超标最严重, 超标率达到 41.4%, ZEN 虽然检出率较高但超标率很低, 只有 2.9%, AFB₁ 和 OTA 均未发现超标样品。可见浙江 2019 年生产的小麦样品, 4 种限量真菌毒素中 DON 污染最普遍, 超标最严重, 应重点监测和防控; ZEN 检出率也较高, 但污染水平较低, 仅个别样品超过了国家标准限量要求; AFB₁ 和 OTA 污染程度相对较轻, 仅在个别样品中检出 2 种真菌毒素。

表 8 小麦样品中 4 种真菌毒素的检测结果

Table 8 Detection results of 4 mycotoxins in wheat samples

真菌毒素	最低检出值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最高检出值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出率 /%	超标率 /%
DON	20.0	3937.5	90.0	41.4
ZEN	2.0	77.8	68.6	2.9
AFB ₁	0.3	0.6	2.9	0.0
OTA	0.8	1.2	4.3	0.0

3 结 论

本研究建立了一种复合免疫亲和柱净化超高效液

相色谱串联质谱法同时测定小麦中呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 B₁、赭曲霉毒素 A 4 种限量真菌毒素的分析方法。目前, 小麦中限量真菌毒素的测定大多采用国家标准方法的 HPLC 或 HPLC-MS/MS 方法, 但多种毒素均需单独前处理, 单独进样分析, 检测效率较低。本方法通过改进前处理和仪器条件实现了 4 种限量真菌毒素的同时前处理和同时测定, 简化了实验流程, 减少了试剂消耗, 提高了检测效率。小麦试样中的 4 种限量真菌毒素通过乙腈水溶液提取, 采用四合一复合免疫亲和柱净化, 并通过超高效液相色谱串联质谱仪进行分析, 8.0 min 内可以完成快速测定, 在相应的线性范围内, 线性关系良好, 相关系数 r 均超过 0.999, 检出限和定量限均达到了国家标准方法的要求; 4 种毒素的平均加标回收率为 82.0%~103.0%, 重复测定 RSD 为 5.2%~9.7%, 符合食品理化测定的技术要求; 通过与国家标准方法的对比验证, 本方法测定结果与国家标准方法高度一致。本方法准确度、精密度高、灵敏度好, 适用于小麦及其制品中 4 种限量真菌毒素的快速测定, 可以满足基层检测机构对小麦中多种真菌毒素同时测定的要求。

应用本方法对浙江 2019 年生产的小麦进行 4 种真菌毒素污染情况的分析, 结果表明 4 种真菌毒素污染情况差异较大, 其中呕吐毒素污染最普遍, 超标最严重, 应重点监测和防控。

参考文献

- [1] HUSSEIN SH, JEFFREY MB. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. *Toxicology*, 2001, 167(2): 103–134.
- [2] BINDER EM. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production [J]. *Anim Feed Sci Technol*, 2007, 133(1–2): 149–166.
- [3] 陈丽星. 真菌毒素研究进展[J]. 河北工业科技, 2006, 23(2): 124–126.
CHEN LX. Mycotoxins and their research progress [J]. *Hebei J Ind Sci Technol*, 2006, 23(2): 124–126.
- [4] WU L, LI JJ, LI YH, et al. Aflatoxin B₁, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from different province in China [J]. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017, 8(2): 428–437.
- [5] JAMES JP. Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance [J]. *Arch Toxicol*, 2010, 84(9): 663–679.

- [6] KAROLINA K, DOMINIKA E, AGNIESZKA W. Zearalenone as an endocrine disruptor in humans [J]. *Environ Toxicol Phar*, 2016, 48: 141–149.
- [7] BLAKE RR, MUSTAFA IS. Aflatoxin B₁: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 124(1): 81–100.
- [8] ANNIE P, RICHARD AM. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(1): 61–99.
- [9] 杨世亚, 邱景富. 食品中真菌毒素的污染状况与检测方法研究进展[J]. *现代预防医学*, 2012, 39(22): 5897–5900.
YANG SY, QIU JF. Research progress of pollution condition and detecting methods in mycotoxins in the food [J]. *Mode Prev Med*, 2012, 39(22): 5897–5900.
- [10] 景绍红, 胡占云, 景绍中. 真菌毒素的危害及其防治[J]. *猪业科学*, 2017, 34(12): 88–90.
JING SH, HU ZY, JING SZ. The harm and prevention of mycotoxins [J]. *Swine Ind Sci*, 2017, 34(12): 88–90.
- [11] 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—Limits of mycotoxins in food [S].
- [12] GB 5009. 111—2016 食品安全国家标准食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定[S].
GB 5009. 111—2016 National food safety standard—Determination of deoxynivalenol and its acetylated derivatives in food [S].
- [13] GB 5009. 209—2016 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定[S].
GB 5009. 209—2016 National food safety standard—Determination of zearalenone in food [S].
- [14] 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 aflatoxins B and aflatoxins G in food [S].
- [15] GB 5009. 96—2016 食品安全国家标准食品中赭曲霉毒素 A 的测定[S].
GB 5009. 96—2016 National food safety standard—Determination of ochratoxin A in food [S].
- [16] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素 B₁[J]. *现代畜牧科技*, 2018, (8): 20.
FENG L. Determination of aflatoxin B₁ in corn by thin layer chromatography [J]. *Mod Anim Husb Sci Technol*, 2018, (8): 20.
- [17] 冯莉. 酶联免疫法测定大豆中赭曲霉毒素 A[J]. *现代畜牧科技*, 2018, (8): 26.
FENG L. ELISA for determination of ochratoxin A in soybean [J]. *Mod Anim Husb Sci Technol*, 2018, (8): 26.
- [18] LS/T 6113—2015 粮油检测粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定胶体金快速定量法[S].
LS/T 6113 — 2015 Inspection of grain and oils—Detection of deoxynivalenol in grain—Rapid quantitative method of colloidal gold technique [S].
- [19] 邵亮亮, 赵美凤, 宁晖, 等. 高效液相色谱法测定小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的不确定度评定[J]. *食品科学*, 2016, 37(12): 232–237.
SHAO LL, ZHAO MF, NING H, *et al.* Uncertainty evaluation for determining deoxynivalenol in wheat by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2016, 37(12): 232–237.
- [20] DAVID R, EVA MM, RUFINO MC, *et al.* Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC–MS/MS and UPLC–QTOF–MS [J]. *Food Chem*, 2018, 267(30): 140–148.
- [21] ANTONIA GF, JOSE LM, ROBERTO RG, *et al.* Simple and high-throughput method for the multimycotoxin analysis in cereals and related foods by ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2009, 117(4): 705–712.
- [22] 刘家阳, 张月辉, 贾宏新. 凝胶渗透色谱净化-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测玉米粉中 10 种真菌毒素[J]. *中国食品卫生杂志*, 2016, 28(6): 763–768.
LIU JY, ZHANG YH, JIA HX. Simultaneous determination of ten mycotoxins in corn flour by gel permeation chromatography-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2016, 28(6): 763–768.
- [23] 肖全伟, 吴文林, 刘玲利. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定小麦中的 8 种真菌毒素[J]. *四川农业大学学报*, 2018, 36(5): 584–591.
XIAO QW, WU WL, LIU LL. Determination of eight mycotoxins in wheat by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 2018, 36(5): 584–591.
- [24] 谭莉, 孟繁磊, 范宏, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米中 9 种真菌毒素[J/OL]. *食品工业科技*, [2020–11–14]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050057>
TAN L, MENG FL, FAN H, *et al.* Determination of 9 mycotoxins in maize by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J/OL]. *Sci Technol Food Ind*, [2020–11–14]. <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2020050057>
- [25] 李文廷, 张瑞雨, 张秀清, 等. 大米中 16 种真菌毒素同时检测分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12): 3886–3894.
LI WT, ZHANG RY, ZHANG XQ, *et al.* Simultaneous detection and analysis of 16 mycotoxins in rice [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(12): 3886–3894.
- [26] 朱群英, 索莉莉, 胡美华. 液质联用同位素内标法同时测定小麦粉中 7 种真菌毒素[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(23): 4362–4365, 4377.
ZHU QY, SUO LL, HU MH. Simultaneous determination of 7 mycotoxins in wheat flour by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using isotope internal standard [J]. *Mod Prev Med*, 2014, 41(23): 4362–4365, 4377.
- [27] 张新娜, 马丽艳, 潘赛超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定杂粮豆类中 11 种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2019, 40(8): 306–310.
ZHANG XN, MA LY, PAN SC, *et al.* Simultaneous determination of 11 mycotoxins in minor food legumes by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) [J]. *Food Sci*, 2019, 40(8): 306–310.
- [28] REN YP, ZHANG Y, SHAO SL, *et al.* Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1143(1–2): 48–64.
- [29] 何晓明, 倪娟楨, 赵月钧, 等. MSPE-UPLC-MS/MS 法测定植物油中 8 种真菌毒素[J]. *食品工业*, 2019, 40(5): 318–322.
HE XM, NI JZ, ZHAO YJ, *et al.* Determination of 8 mycotoxins in vegetable oil by MSPE-UPLC-MS/MS [J]. *Food Ind*, 2019, 40(5):

318-322.

[30] GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
 GB/T 27404—2008 Criterion on quality control of laboratories—Chemical testing of food [S].

[31] 施琦, 杨嘉丽, 王雅玲, 等. 液相色谱-串联质谱法测定虾饲料中 7 种真菌毒素[J]. 分析测试学报, 2019, 38(3): 334-338.
 SHI Q, YANG JL, WANG YL, *et al.* Determination of 7 mycotoxins in shrimp feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(3): 334-338.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



邵亮亮, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品和农产品质量与安全检测。

E-mail: shaolly@163.com



食品加工工艺优化及应用研究

随之人类对自身健康的关注及生活水平的提高, 加工食品因保持其原色、原味及食品营养成分的优越性备受关注。越来越多的新工艺新方法应用于食品加工业, 尤其是多种工艺的综合利用, 对食品行业的发展起到了巨大的推动作用。

鉴于此, 本刊特别策划“食品加工工艺优化及应用研究”专题, 主要围绕加工工艺优化(提取工艺优化、配方优化、纯化优化、制备优化、响应面法优化等)、食品加工的综合利用及评价等问题展开讨论, 计划在 2021 年 2/3 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心 吴永宁 研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力, 综述及研究论文均可。请在 2021 年 1 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题食品加工工艺优化及应用研究):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2020 专题: 食品加工工艺优化及应用研究”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: 食品加工工艺优化及应用研究专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部