

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240228004

超高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬汁类及其 饮料中 22 种镰刀菌属毒素

邵瑞婷*, 丁学妍, 姜 洁

[北京市食品检验研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(食品安全重大综合保障关键技术), 北京 100041]

摘 要: **目的** 建立果蔬汁类及其饮料中 22 种镰刀菌属毒素的超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)检测的分析方法。**方法** 样品经水和乙腈提取, QuEChERS 净化, 氮吹至近干, 1 mL 80%乙腈水(体积分数)复溶, 采用 Waters ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl 反相色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)梯度分离, 以乙腈和 0.1%甲酸水(2 mmol/L 甲酸铵)为流动相进行梯度洗脱, UPLC-MS/MS 在正、负离子模式下多反应监测, 基质配制外标法定量。**结果** 22 种镰刀菌属毒素在线性范围内, 线性关系良好, 决定系数(R^2)均大于等于 0.985, 回收率在 60.1%~119.7%之间, 相对标准偏差在 2.64%~15.53%之间。**结论** 该分析方法具有前处理方式简单、分析时间短、灵敏度好、准确度高、杂质干扰小等特点, 可以用于果蔬汁类及其饮料中 22 种镰刀菌属毒素的检测。

关键词: 果蔬汁类及其饮料; QuEChERS 净化; 超高效液相色谱-串联质谱法; 镰刀菌属毒素

Determination of 22 kinds of *Fusarium* toxins in fruit and vegetable juices and beverages by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SHAO Rui-Ting*, DING Xue-Yan, JIANG Jie

[Beijing Institute of Food Inspection and Research, National Key Laboratory of Market Regulation (Key Technologies of Major Comprehensive Guarantee of Food Safety), Beijing 100041, China]

ABSTRACT: Objective To establish an analytical method for the detection of 22 kinds of *Fusarium* toxins in fruit and vegetable juices and their beverages using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted with water and acetonitrile, purified by QuEChERS, blown to near dry with nitrogen, redissolved with 1 mL of 80% acetonitrile water (volume fraction), separated by gradient on Waters ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl reverse phase chromatographic column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m), gradient eluted with acetonitrile and 0.1% formic acid water (2 mmol/L ammonium formate) as mobile phase, multi-reaction monitoring by UPLC-MS/MS in positive and negative ion modes, and matrix preparation external standard method quantitative. **Results** The 22 kinds of *Fusarium* toxins were within a linear range, with a good

基金项目: 国家市场监督管理总局科技创新人才计划(CXTD202307)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Talents Program of the State Administration of Market Supervision (CXTD202307)

*通信作者: 邵瑞婷, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: rtshao@126.com

*Corresponding author: SHAO Rui-Ting, Senior Engineer, No.64, Shixing Ave, Shijingshan District, Beijing 100041, China. E-mail: rtshao@126.com

linear relationship. Coefficient of determination (R^2) was greater than or equal to 0.985, and the recovery rates were between 60.1% and 119.7%. The relative standard deviations were between 2.64% and 15.53%. **Conclusion** This analysis method has the characteristics of simple pre-treatment, short analysis time, good sensitivity, high accuracy, and low impurity interference. It can be used for the detection of 22 kinds of *Fusarium* toxins in fruit and vegetable juices and their beverages.

KEY WORDS: fruit and vegetable juices and beverages; QuEChERS purification; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Fusarium* toxin

0 引言

果蔬汁类及其饮料是以水果和(或)蔬菜等为原料,经加工或发酵制成的液体饮料。因其口感良好、营养、便携、饮用方便,具有保护心血管、维持骨骼健康、提升大脑认知等方面的益处^[1-2],受到人们的喜爱。我国作为果业大国,年产量和种植面积均居于世界首位,为果蔬汁类及其饮料产业的发展提供了可靠保障^[3]。由于果蔬中含有较高的糖分和水分,因此在生长、采摘、储存、运输、销售、加工过程等环节易受到病原真菌尤其是镰刀菌的污染,导致果蔬腐烂并积累大量真菌毒素^[4]。有资料表明,每年约有 20%~30% 的水果会受到真菌毒素的污染而导致腐烂^[5-6]。

镰刀菌属毒素是由镰刀菌属真菌产生的多种次生代谢产物的总称,是危险的食品污染物。常见的镰刀菌属毒素主要有玉米赤霉烯酮、单端孢霉毒素、串珠镰刀菌素和伏马菌素等,普遍具有多种毒性作用,包括器官毒性、神经毒性、致突变性、致癌性、致畸性,并可能影响免疫系统和生殖系统,引起生长阻滞等^[7-9]。误食镰刀菌污染的食物,可能导致中毒,甚至可能引发具有流行病特征的人类疾病,如 T-2 毒素常引起胃肠道刺激、呕吐、腹泻等症状,严重情况下可致人死亡,其造成的白细胞减少症曾出现在前苏联,这种疾病的临床表现是进行性的造血系统功能衰退^[10];脱氧雪腐镰刀菌烯醇对人和动物可造成消化和神经系统中毒,严重时可能损害其造血系统甚至导致死亡^[11];另外,串珠镰刀菌素、白僵菌素和恩镰孢菌素等作为新型毒素的代表因频频被发现而引起了较大的关注^[12],其中常见的恩镰孢菌素有恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B 和恩镰孢菌素 B₁^[13],它们主要污染谷物、水果及其相关制品等^[14]。镰刀菌属毒素的存在对食品安全和人类健康构成了潜在威胁。为了避免这些毒素的危害,有必要建立快速筛查分析的检测技术,避免食用或采取适当的处理措施来去除毒素危害。

现有文献资料报道中,真菌毒素检测常用方法有酶联免疫法^[15-16]、薄层色谱法^[17]、液相色谱法^[18]、气相色谱-质谱法^[19]、放射免疫法^[20]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[21-22]等,其中 LC-MS/MS 因具有高通量、无需衍生化、灵敏度高、准确度高、抗干扰能力强等特点^[23],已成为目前同时

检测多种真菌毒素的主流分析方法。由于食品基质组成成分复杂,因此样品的前处理成为检测实验的关键控制点。真菌毒素检测中常用的前处理方法有固相萃取技术^[24]、液液萃取技术^[25]、QuEChERS 方法^[26-27]、加速溶剂萃取技术等方法^[28]。QuEChERS 方法具有提取真菌毒素范围广、速度快、操作简单等特点,在真菌毒素检测方面应用广泛^[29]。目前,水果真菌毒素研究多集中于新鲜水果及其干果制品,且局限于 1 种或 1 类真菌毒素^[30-31],尚未制定果蔬汁类及其饮料中多种镰刀菌属毒素的标准检测方法,因此建立一种简单、快速、灵敏、准确的检测方法具有重要意义。本研究建立以 QuEChERS 为前处理方法,结合超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)对果蔬汁类及其饮料中 T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、杂色曲霉毒素、柄曲霉毒素、镰刀菌酸、白僵菌素、恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B₁、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、HT-2 毒素、伏马菌素 B₁、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮、串珠镰刀菌素进行检测的方法,为果蔬汁类及其饮料产品中 22 种镰刀菌属毒素污染筛查分析提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

乙腈、甲醇、乙酸铵、甲酸铵(色谱纯,美国 Thermo Fisher Scientific 公司);甲酸[质谱级,阿拉丁试剂(上海)有限公司];T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、杂色曲霉毒素、柄曲霉毒素、镰刀菌酸、白僵菌素、恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B₁、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、HT-2 毒素、伏马菌素 B₁、 β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮、串珠镰刀菌素标准品(100 $\mu\text{g/mL}$, 天津阿尔塔科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

Waters ACQUITYTM 超高效液相色谱仪 TQ-S 质谱

仪、ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、QuEChERS 管(1860048)、Prime HLB 固相萃取柱(150 mg 6 mL)、GHP Minispike, 0.2 μm 微孔滤膜(美国 Waters 公司); S18N-10G 均质器(德国 IKA 公司); 75004250 X1R 高速冷冻离心机、Titan3 PTFE, 0.2 μm 微孔滤膜、Titan3 Nylon, 0.2 μm 微孔滤膜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Centrifuge 5424 小型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); DL1028H 超声波提取仪(德国 Banoelin 公司); BT25S 万分之一电子天平(精度 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司); CAPCELL PAK C18 色谱柱(MGn 50 mm×2.0 mm, 3 μm)(大阪曹达集团); Agela Nylon, 0.22 μm 微孔滤膜(天津 Agela Technologies 公司); QuEChERS 管(5982-4921)、Agilent RC, 0.2 μm 微孔滤膜、Agilent Nylon, 0.2 μm 微孔滤膜(美国 Agilent Technologies 公司); C18 固相萃取柱(1 mL, 北京迪马科技有限公司); Millex-GV PVDF, 0.22 μm 微孔滤膜(德国默克密理博公司); xiboshi Nylon, 0.20 μm 微孔滤膜(天津市希波氏科技有限公司); Jinteng Nylon, 0.22 μm 微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

称取 2.00 g 试样(精确 0.01 g)置于 25.0 mL 具塞全刻

度试管, 加入 2.0 mL 水, 乙腈定容至 20.0 mL, 涡旋振荡, 超声提取 40 min, 冷却至室温后, 以 10000 r/min 离心 10 min, 取 10.0 mL 提取液用 QuEChERS 管净化, 取上清液氮吹至近干, 用 1.0 mL 80%乙腈水溶液复溶, 过 PTFE 0.2 μm 滤膜后供仪器检测。

空白基质溶液: 称取 6 个 2.00 g(精确 0.01 g)的同一阴性果蔬汁样品, 与试样同批同法处理, 制得空白基质试样溶液, 备用。

1.3.2 色谱分析条件

色谱柱: ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 30℃; 进样体积: 5 μL; 流速: 0.3 mL/min; 流动相: A 为乙腈、B 为 0.1%甲酸水(2 mmol/L 甲酸铵), 梯度洗脱程序: 0~0.5 min, A 保持 10%, 0.5~1.5 min, A 由 10%线性升到 40%, 1.5~3.5 min, A 保持 40%, 3.5~5 min, A 由 40%线性升到 60%, 5~8 min, A 由 60%线性升到 80%, 8~9 min, A 由 80%线性升到 90%, 9~11 min, A 相保持 90%, 11~12 min, A 由 90%线性降到 50%, 12~13 min, A 由 50%线性降到 10%, 13~15 min, A 相保持 10%。

1.3.3 质谱分析条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 毛细管电压: 3.2 kV, 锥孔电压: 20 V, 离子源温度: 150℃, 脱溶剂气温度: 350℃, 脱溶剂气流速: 650 L/h, 锥孔气流速: 150 L/h, 碰撞气流速: 0.15 mL/min, 其他质谱条件参数见表 1。

表 1 22 种镰刀菌属毒素多反应监测参数
Table 1 Multiple reaction monitoring parameters of 22 kinds of *Fusarium* toxins

毒素序号	目标化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 /eV	保留时间 /min	扫描方式 ESI+/-
1	T-2 毒素	484.3	305.2*	15	4.94	ESI+
			185.1	17		
2	赭曲霉毒素 A	404.1	239.0*	27	6.20	ESI+
			358.1	13		
3	杂色曲霉毒素	386.3	178.2*	36	5.05	ESI+
			95.8	54		
4	柄曲霉素	325.1	310*	20	5.81	ESI+
			253.2	46		
5	镰刀菌酸	180.1	92.1*	25	2.81	ESI+
			134.2	14		
6	白僵菌素	784.6	244.2*	28	7.36	ESI+
			134.2	98		
7	恩镰孢菌素 A	682.6	210.2*	24	7.35	ESI+
			100.2	54		
8	恩镰孢菌素 A ₁	668.6	210.3*	28	7.20	ESI+
			100.2	54		
9	恩镰孢菌素 B	640.6	196.2*	24	7.04	ESI+
			86.2	54		

表 1(续)

毒素序号	目标化合物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞能量 /eV	保留时间 /min	扫描方式 ESI+/-
10	恩镰孢菌素 B ₁	654.6	196.2* 100.2	28 54	6.95	ESI+
11	3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	339.2	231.2* 203.1	13 13	2.67	ESI+
12	15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	339.1	231.1* 137.1	7 9	2.65	ESI+
13	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	297.2	249.1* 203.2	11 18	2.20	ESI+
14	HT-2 毒素	442.1	215.2* 263.2	12 12	3.43	ESI+
15	伏马菌素 B ₁	722.5	334.4* 352.4	40 32	2.53	ESI+
16	β-玉米赤霉醇	321.1	277.2* 303.2	20 20	4.04	ESI-
17	α-玉米赤霉醇	321.1	277.2* 303.2	20 20	4.84	ESI-
18	α-玉米赤霉烯醇	319.1	275.1* 301.1	22 22	4.17	ESI-
19	β-玉米赤霉烯醇	319.1	275.1* 301.1	22 22	5.06	ESI-
20	玉米赤霉酮	319.1	275.1* 161.0	22 22	5.68	ESI-
21	玉米赤霉烯酮	317.1	174.9* 131	28 22	5.73	ESI-
22	串珠镰刀菌素	96.8	41.0*	10	4.03	ESI-

注: *为定量离子。

1.3.4 基质匹配标准工作曲线的绘制

精密吸取各类液体标准品,用乙腈定容至 10 mL,配制 成 含 T-2 毒 素、串 珠 镰 刀 菌 素 0.5 μg/mL、赭 曲 霉 毒 素 A、杂色曲霉毒素、柄曲霉素、白僵菌素、恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A₁、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B₁、玉米赤霉烯酮、玉米赤霉酮、α-玉米赤霉烯醇、β-玉米赤霉烯醇、α-玉米赤霉醇、β-玉米赤霉醇 0.1 μg/mL、镰刀菌酸、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、HT-2 毒素 1 μg/mL、伏马菌素 B₁ 0.7 μg/mL 的混合标准溶液,避光、-18℃下保存。

吸取混合标准溶液 2.5 mL,于 50 mL 容量瓶中,乙腈定容至刻度线,配制 成 混 合 标 准 使 用 液,混 匀,备 用。

分别吸取混合标准溶液 0.01、0.02、0.05、0.08、0.10、0.20 mL,用空白基质溶液定容至 1 mL,配制 成 混 合 标 准 溶 液 系 列 工 作 液。

1.4 数据处理

UPLC-MS/MS 数据采集使用 Waters TQ-S MassLynx V4.2 软件,处理数据和绘图采用 Excel 2016 软件。

2 结果与分析

2.1 复定溶液的选择

参照 T/NAIA 0117—2022《玉米及其产品中 11 种真菌毒素的测定 液相色谱-质谱联用法》、LS/T 6133—2018《粮油检验 主要谷物中 16 种真菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》、T/AFFI 038—2023《葡萄干中 8 种真菌毒素残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》等同时测定多种毒素的标准,本研究优先考虑乙腈/水作为复定溶液,比对了 10%乙腈水、20%乙腈水、30%乙腈水、40%乙腈水、50%乙腈水、60%乙腈水、70%乙腈水、80%乙

腈水、90%乙腈水、乙腈作为复定溶液。结果表明: 80%乙腈水作为复定溶液时, 22 种镰刀菌属毒素峰型更尖锐, 柱保留和分离效果良好, 出峰时间均在 2 min 之后, 且回收率在 60%~120%范围数量最多。22 种镰刀菌属毒素的回收率分别在<60%、60%~120%、>120%范围的数量分布图见图 1。

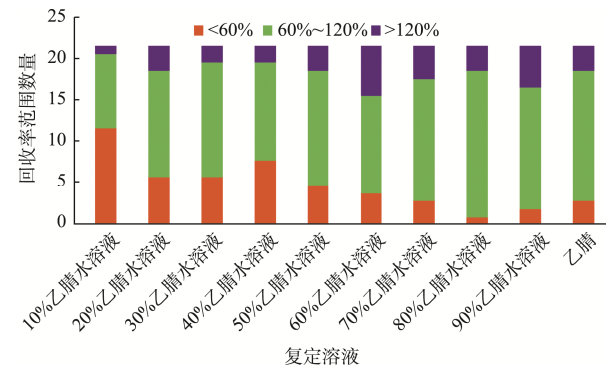


图1 不同复定溶液条件下22种镰刀菌属毒素回收率数量分布图
Fig.1 The quantitative distribution of 22 kinds of *Fusarium* toxin recovery rates under different conditions

2.2 微孔滤膜的选择

在研究过程中发现, 不同材质、不同厂家的微孔滤膜对 22 种镰刀菌属毒素有不同程度的吸附作用, 并不是所有材质的微孔滤膜都适用。为了筛选出适用的微孔滤膜, 排除其对回收率的影响, 本研究对比了 9 种微孔滤膜对 22 种目标化合物的回收率的影响。分别吸取 1 mL 混合标准使用液通过 Titan3 PTFE、Titan3 Nylon、GHP Minispikes、Millex-GV PVDF、Agela Nylon、xiboshi Nylon、Agilent RC、Agilent Nylon、Jinteng Nylon 滤膜后供仪器检测, 通过 9 种微孔滤膜后 22 种目标化合物的回收率分别在<60%、60%~120%、>120% 3 种范围的数量占比图详见图 2, 观察

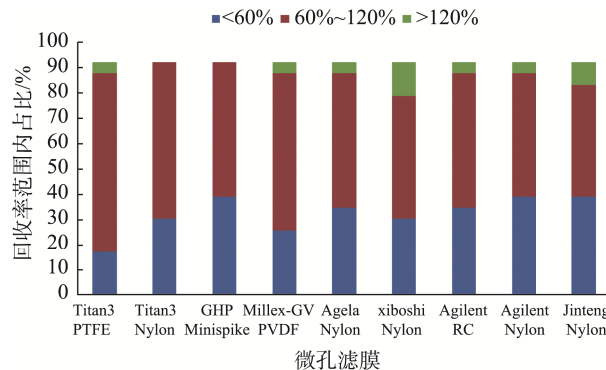


图2 不同微孔滤膜22种镰刀菌属毒素回收率
Fig.2 Recovery rates of 22 kinds of *Fusarium* toxins from different microporous membranes

可知, 采用 Titan3 PTFE 滤膜各目标化合物回收率在 60.0%~120.0%范围的占比最高。故在本研究中, 选取 Titan3 PTFE 滤膜作为微孔滤膜。

2.3 提取试剂的选择

称取 10 个 2.00 g 的阴性果蔬汁样品置于 25 mL 具塞全刻度试管, 各加入混合标准溶液 0.1 mL, 涡旋振荡, 分别加入 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18 mL 水、用乙腈定容至 20 mL, 涡旋混匀后, 超声提取 40 min, 冷却至室温后, 以 10000 r/min 离心 10 min, 取 10 mL 上清液氮吹至近干, 用 1 mL 80%乙腈水溶液复溶, 以 12000 r/min 离心 5 min, 取上清液供仪器检测。以 T-2 毒素、恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B₁、串珠镰刀菌素为例的提取实验回收率对比图如图 3 所示。观察可知, 在加入水 ≥ 4 mL 时, T-2 毒素、恩镰孢菌素 B₁、串珠镰刀菌素提取回收率明显下降, 加入 2 mL 水比加入 0 mL 水时, 恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 B 的提取回收率更优, 故本研究提取试剂选择加入 2 mL 水后乙腈定容至 20 mL。

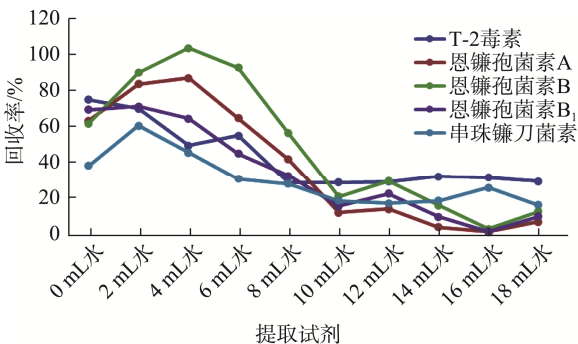
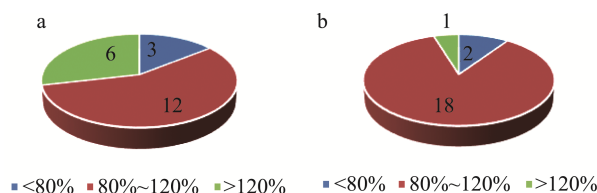


图3 不同提取试剂条件下5种镰刀菌属毒素回收率
Fig.3 Recovery rates of 5 kinds of *Fusarium* toxins under different extraction reagent conditions

2.4 净化柱的选择

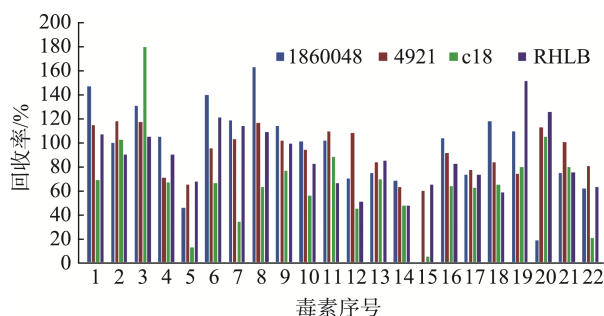
基质效应(matrix effect, ME)是指样品中除了目标分析物以外的其他成分对待测物测定值的影响。采用 $ME = (\text{基质匹配标准曲线的斜率} / \text{溶剂标准曲线的斜率}) \times 100\%$ 的计算方法对 22 种镰刀菌属毒素的基质效应进行评价。一般来说, 当 ME 在 80%~120%之间时, 表明基质效应不明显, 在实际检测中可忽略不计; 反之则应考虑基质效应的影响。22 种镰刀菌属毒素在样品中的基质效应分布情况如图 4a 所示, 多种化合物检测受到基质效应的影响较大。为降低基质效应的影响, 本研究从净化样品提取液入手, 比较了便于批量操作、成本较低且普适性强的 QuEChERS 管(1860048)、QuEChERS 管(5982-4921)、C18 固相萃取柱、Prime HLB 固相萃取柱 4 种成品对 22 种镰刀菌属毒素的净化效果, 回收率见图 5。1860048 管对恩镰孢



注: a: 净化前基质效应; b: 净化后基质效应。

图4 净化前、净化后样品中22种镰刀菌毒素基质效应率图

Fig.4 Matrix effect rate diagram of 22 kinds of *Fusarium* toxins in the samples before and after purification



注: 毒素序号同表1。

图5 不同净化柱条件下22种目标物回收率

Fig.5 Recovery rates of 22 kinds of target substances under different purification column conditions

菌素 A₁、伏马菌素 B₁ 等净化效果不理想; C18 柱对杂色曲霉毒素、镰刀菌酸等净化效果不理想; Prime HLB 柱对 HT-2 毒素、 β -玉米赤霉烯醇等净化效果不理想; 5982-4921 管对 22

种镰刀菌毒素净化回收率范围在 60.9%~119.7%。故本研究选用 QuEChERS 管(5982-4921)对提取液进行净化处理, 净化后基质效应分布情况如图 4b 所示, 基质效应有明显改善。

2.5 色谱条件的优化

2.5.1 质谱条件优化

将混合标准溶液系列工作液, 不接色谱柱, 直接注射, 在正离子(ESI+)和负离子(ESI-)模式下进行全扫描以选择适当的电离方式, 结果表明: β -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉醇、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、玉米赤霉酮、玉米赤霉烯酮、串珠镰刀菌素在负离子模式下, 离子化效率较高, 灵敏度较好; 其他 15 种化合物均在正离子模式下, 离子化效率较高, 灵敏度较好。故本研究选取正、负离子模式, 并结合多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式采集目标化合物的离子信息。

2.5.2 色谱条件优化

(1) 色谱柱优化

研究比较了 ACQUITY UPLC HSS T3 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μ m) 色谱柱、ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl (100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m) 色谱柱和 CAPCELL PAK C18 (MGn 50 mm×2.0 mm, 3 μ m) 色谱柱, 在相同参数条件下, 以 2 离子通道为例的离子色谱图如图 6 所示。结果表明, HSS T3 和 CAPCELL PAK C18 色谱柱分离效果不佳; 而 CSH Phenyl-Hexyl 色谱柱的峰形尖锐目标化合物响应高, 且分离效果明显优于 HSS T₃ 和 CAPCELL PAK C18 色谱柱。故在本研究中, 选择 CSH Phenyl-Hexyl 色谱柱。

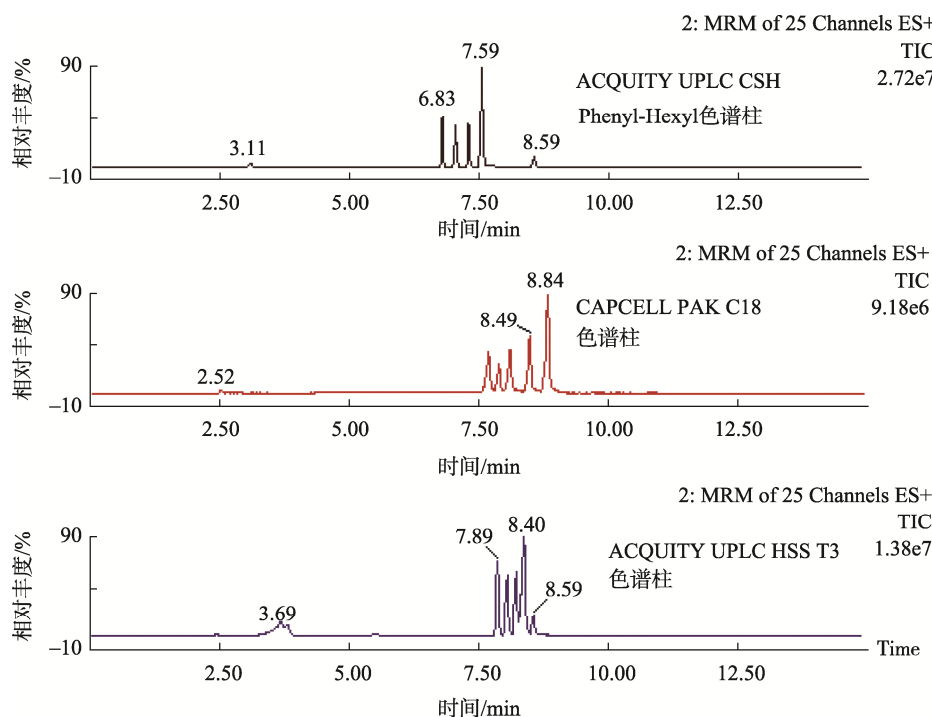


图6 不同色谱柱条件下2离子通道为例的离子色谱图

Fig.6 Ion chromatograms of variegated 2 ion channels under different column conditions

(2)流动相优化

研究比较了甲醇:0.1%甲酸水(2 mmol/L 甲酸铵)、甲醇:水、甲醇:0.1%甲酸水(2 mmol/L 乙酸铵)、甲醇:0.1%甲酸水、乙腈:0.1%甲酸水(2 mmol/L 甲酸铵)、乙腈:0.1%甲酸水、乙腈:0.1%甲酸水(2 mmol/L 乙酸铵)、乙腈:水 8 组流动相,在相同参数条件下,以 α -玉米赤霉烯醇、杂色曲霉毒素为例的离子色谱图如图 7 所示。结果表明乙腈:0.1%甲酸水(2 mmol/L 甲酸铵)为流动相时,可以更好分离各目标化合物且峰型尖锐,故本研究中,选取乙腈:0.1%甲酸水(2 mmol/L 甲酸铵)作为流动相。

2.6 方法学实验

2.6.1 检出限、定量限与线性范围

将混合标准溶液系列工作液,设置进样量为 5 μ L,浓度从低到高进样,UPLC-MS/MS 分析。在 MRM 模式下,分别以各目标化合物的峰面积(Y)为纵坐标,质量浓度(X, ng/mL)为横坐标绘制标准曲线回归方程。以目标化合物定性离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于 3 来确定

方法检出限(limit of detection, LOD),以定量离子对的重构离子色谱峰的信噪比大于或等于 10 来确定方法定量限(limit of quantitation, LOQ)。结果表明,22 种镰刀菌属毒素在线性范围内线性关系良好,决定系数(R^2)均大于 0.985,具体结果详见表 2。

2.6.2 方法回收率及精密度

称取阴性果蔬汁样品,按照定量限、2 倍定量限、5 倍定量限进行 3 水平添加实验($n=8$),按照 1.3 进行样品处理和检测,计算回收率及相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。如表 3 所示,本研究加标回收率在 60.1%~119.7%之间,RSDs 在 2.64%~15.53%之间。回收率及精密度均符合 GB/T 27417—2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》的相关要求。

2.7 实际样品检测

随机抽取市售的果蔬汁类及其饮料 10 份,应用本方法进行测定,检测结果均为阴性。阴性样品图见图 8。

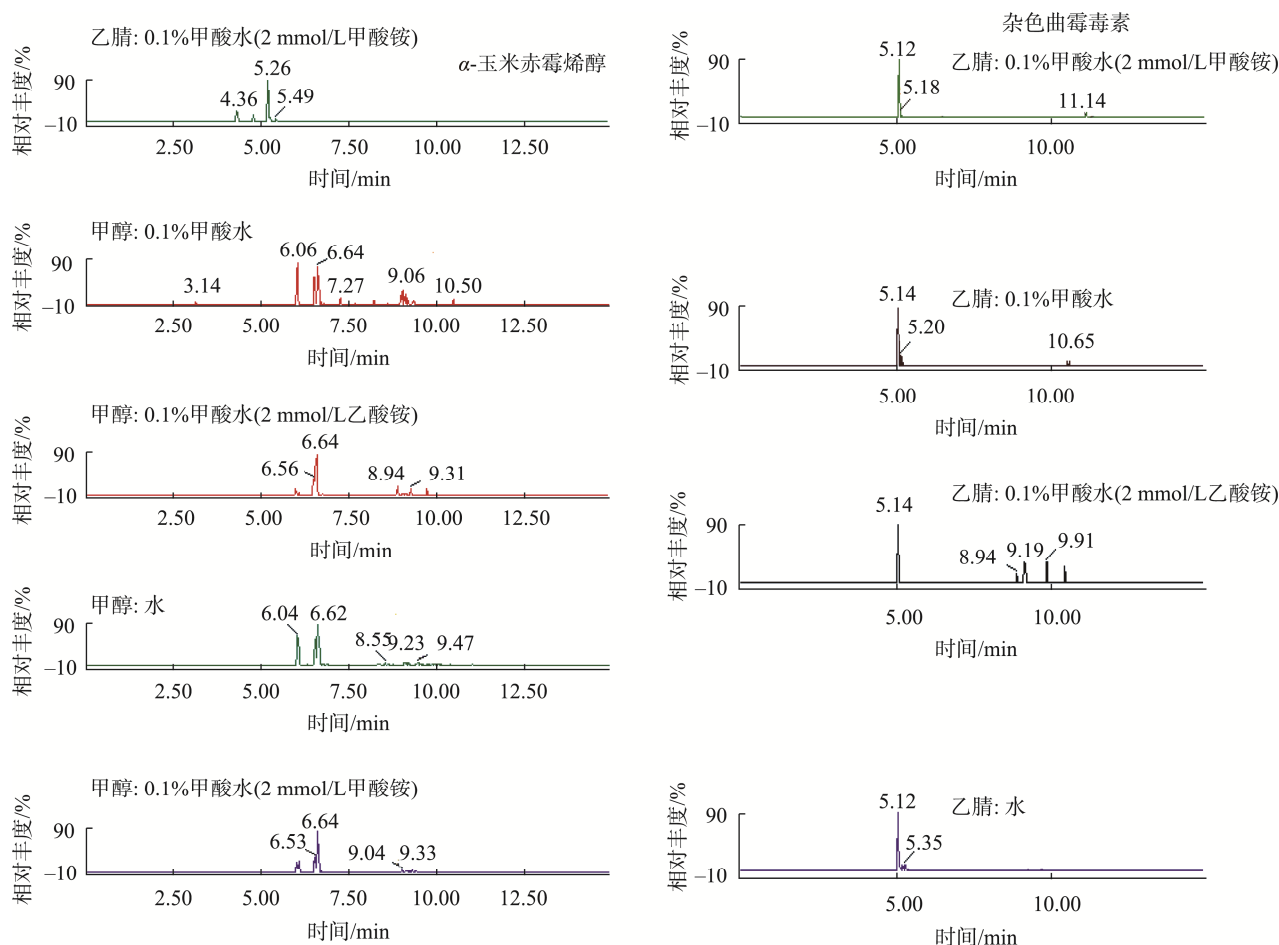


图7 不同流动相条件下以 α -玉米赤霉烯醇、杂色曲霉毒素为例的离子色谱图

Fig.7 Ion chromatograms of α -zearalenol and variegated *Aspergillus* under different mobile phase conditions

表 2 22 种镰刀菌属毒素的线性方程及检出限、定量限
Table 2 Linear equation, LOD and LOQ of 22 kinds of *Fusarium* toxins

目标化合物	线性方程	R^2	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/($\mu\text{g/kg}$)
T-2 毒素	$Y=6883.32X-1020.74$	0.992	5.0	15.0
赭曲霉毒素 A	$Y=829.154X-7.87115$	0.985	1.0	2.0
杂色曲霉毒素	$Y=32423.7X-3879.34$	0.986	1.0	2.0
柄曲霉素	$Y=17346.9X-576.625$	0.995	1.0	2.0
镰刀菌酸	$Y=1928.87X+321.694$	0.987	10.0	20.0
白僵菌素	$Y=26496.4X-1960.25$	0.994	1.0	2.0
恩镰孢菌素 A	$Y=3180.96X+33.5263$	0.995	1.0	2.0
恩镰孢菌素 A ₁	$Y=11545.4X-1504.89$	0.995	1.0	2.0
恩镰孢菌素 B	$Y=5435.26X-1272.1$	0.988	1.0	2.0
恩镰孢菌素 B ₁	$Y=4161.41X-631.209$	0.986	1.0	2.0
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y=7489.8X-234.501$	0.989	10.0	20.0
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y=8819.46X-689.834$	0.988	10.0	20.0
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y=13038.2X+2305.28$	0.993	10.0	20.0
HT-2 毒素	$Y=2768.93X-31.1171$	0.997	10.0	20.0
伏马菌素 B ₁	$Y=16841.3X-587.203$	0.989	7.0	20.0
β -玉米赤霉醇	$Y=430.081X+147.422$	0.988	1.0	2.0
α -玉米赤霉醇	$Y=1621.18X+287.648$	0.989	1.0	2.0
α -玉米赤霉烯醇	$Y=383.119X+13.6065$	0.992	1.0	2.0
β -玉米赤霉烯醇	$Y=1152.81X-29.9422$	0.997	1.0	2.0
玉米赤霉酮	$Y=2265.11X-65.4825$	0.985	1.0	2.0
玉米赤霉烯酮	$Y=1996.08X-303.443$	0.988	1.0	2.0
串珠镰刀菌素	$Y=191.318X-25.8766$	0.985	5.0	10.0

表 3 方法加标回收率及 RSDs (n=8)
Table 3 Recoveries and RSDs of the developed method (n=8)

目标化合物	添加水平/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	RSDs/%
T-2 毒素	15	84.8	11.37
	30	87.5	11.54
	75	98.6	9.95
赭曲霉毒素 A	2	66.6	11.62
	4	88.7	12.52
	10	97.5	11.22
杂色曲霉毒素	2	87.5	8.32
	4	94.3	10.75
	10	93.9	11.91
柄曲霉素	2	78.5	8.40
	4	95.6	8.33
	10	94.4	8.70
镰刀菌酸	20	72.3	14.02
	40	85.9	12.28
	100	100.5	11.75
白僵菌素	2	94.0	9.21
	4	82.9	13.08
	10	92.1	12.92

表 3(续)

目标化合物	添加水平/(μg/kg)	回收率/%	RSDs/%
恩镰孢菌素 A	2	80.4	12.47
	4	77.3	14.90
	10	75.1	12.40
恩镰孢菌素 A ₁	2	89.9	15.53
	4	73.0	14.54
	10	85.6	14.42
恩镰孢菌素 B	2	99.1	13.53
	4	90.7	13.83
	10	87.3	13.46
恩镰孢菌素 B ₁	2	65.4	13.86
	4	60.1	13.04
	10	72.4	14.92
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	20	73.4	10.58
	40	93.5	14.50
	100	92.1	8.97
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	20	103.7	2.64
	40	114.1	3.41
	100	79.3	3.72
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	20	98.7	6.50
	40	105.6	9.87
	100	113.5	4.98
HT-2 毒素	20	75.1	14.92
	40	84.5	12.34
	100	82.8	13.81
伏马菌素 B ₁	20	90.3	14.40
	40	105.4	13.90
	100	106.9	13.13
β-玉米赤霉醇	2	92.3	12.40
	4	108.8	14.09
	10	119.1	12.76
α-玉米赤霉醇	2	88.6	14.09
	4	83.7	13.49
	10	97.8	12.78
α-玉米赤霉烯醇	2	90.9	14.32
	4	91.7	14.34
	10	98.4	14.70
β-玉米赤霉烯醇	2	83.8	13.70
	4	103.7	11.60
	10	104.7	8.03
玉米赤霉酮	2	91.0	12.68
	4	81.4	14.25
	10	93.5	9.30
玉米赤霉烯酮	2	104.0	14.43
	4	108.3	14.01
	10	119.7	14.73
串珠镰刀菌素	10	72.8	8.38
	20	98.2	10.04
	50	94.6	14.96

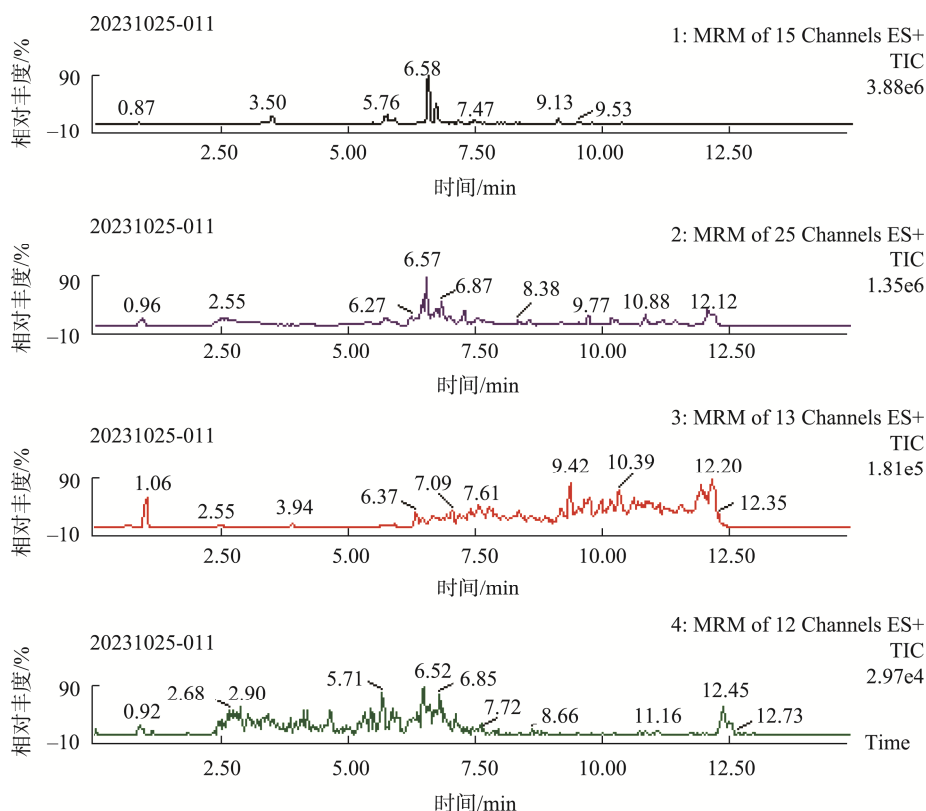


图8 阴性样品离子色谱图

Fig.8 Negative sample ion chromatogram

3 结 论

本研究选用超高效液相色谱-串联质谱法,建立了同时测定果蔬汁类及其饮料中 22 种镰刀菌属毒素的方法。通过优化色谱条件和质谱参数得到了最优的检测条件;优化样品复定溶液、微孔滤膜、提取溶液及净化管对目标化合物实现了较好的提取和富集。该分析方法样品前处理操作简单,灵敏度高、准确度高、重现性好,可为果蔬汁类及其饮料中的质量安全监管提供技术支持。

参考文献

- [1] 王建华, 王建良, 杨鲁见. 果蔬汁及其饮料标准体系现状探析[J]. 中国食品工业, 2023, (18): 51-53, 56.
WANG JH, WANG JL, YANG LJ. Analysis on the status quo of the standard system of fruit and vegetable juice and its beverage [J]. China Food Ind, 2023, (18): 51-53, 56.
- [2] SCHEFFERS FR, BOER J, VERSCHUREN WMM, *et al.* Pure fruit juice and fruit consumption and the risk of cvd: The European prospective investigation into cancer and nutrition-netherlands(epic-nl) study [J]. Br J Nutr, 2019, 121(3): 351-359.
- [3] SEPTEMBRE-MALATERRE A, REMIZE F, POUCHERETP. Fruits and vegetables, as a source of nutritional compounds and phytochemicals: Changes in bioactive compounds during lactic fermentation [J]. Food Res Int, 2018, 104: 86-99.
- [4] 赖文珊, 武爱波, 刘弘, 等. 果蔬常见病原菌及真菌毒素的防控技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(4): 1286-1293.
LAI WS, WU AIB, LIU H, *et al.* Progress on prevention and control methods of common pathogens and mycotoxins in fruits and vegetables [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(4): 1286-1293.
- [5] 周明, 魏颖, 晏永球, 等. 发酵果蔬的功能及应用现状[J]. 中国果菜, 2021, 41(9): 1-5, 26.
ZHOU M, WEI Y, YAN YQ, *et al.* Function and application of fermented fruits and vegetables [J]. China Fruit Veg, 2021, 41(9): 1-5, 26.
- [6] 王珂雯, 徐贞贞, 翟鹏贵, 等. 果蔬汁及其饮料标准体系现状分析[J]. 中国标准化, 2020, (11): 97-103.
WANG KW, XU ZZ, ZHAI PG, *et al.* Analysis of the present situation of fruit and vegetable juice standards system in China [J]. Stand China, 2020, (11): 97-103.
- [7] PINTON P, OSWALD IP. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: A review [J]. Toxins, 2014, 6(5): 1615-1643.
- [8] 朱萍, 钟建军, 李占明, 等. T-2毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4511-4518.
ZHU P, ZHONG JJ, LI ZM, *et al.* Research progress on detection assay of T-2 toxin [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(14): 4511-4518.
- [9] 石超, 吕长鑫, 冯叙桥, 等. 果蔬汁饮料现状及发展前景分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(3): 970-976.
SHI C, LV CX, FENG XQ, *et al.* Analysis on prospects and current situation of fruit and vegetable juice beverages [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(3): 970-976.
- [10] 宋佳, 范寰, 闫雪, 等. T-2毒素的危害及脱毒研究进展[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(5): 194-199.
SONG J, FAN H, YAN X, *et al.* Research progress on the toxicity and detoxification of T-2 toxin [J]. Sci Technol Cere Oils Foods, 2020, 28(5): 194-199.
- [11] WANG YX, HU JQ, DAI YJ, *et al.* Design and characterization of an artificial two-strain bacterial consortium for the efficient biodegradation of deoxynivalenol [J]. Biol Control, 2023, 179: 105172.

- [12] 黄晓静,王少敏,毛丹,等.镰刀菌属真菌毒素的毒性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3117-3128.
HUANG XJ, WANG SM, MAO D, *et al.* Research progress on toxicity of *Fusarium* mycotoxins [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(8): 3117-3128.
- [13] 邓涛,吉小凤,肖英平,等.高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素[J].宁波大学学报(理工版),2023,6(36):50-56.
DENG T, JI XF, XIAO YP, *et al.* Determination of high-performance liquid chromatography and *Beauveria bassiana* in fruit juices by tandem mass spectrometry [J]. J Ningbo Univ (Nat Sci Eng Ed), 2023, 6(36): 50-56.
- [14] YANG Y, LI GL, WU D, *et al.* Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs [J]. Trends Food Sci Technol, 2020, 96: 233-252.
- [15] BEYENE AM, DU XW, SCHRUNK ED, *et al.* High-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay techniques for detection and quantification of aflatoxin B₁ in feed samples: A comparative study [J]. BMC Res Notes, 2019, 12(1): 492.
- [16] 周颖琴,熊瑛,吴榛青,等.酶联免疫吸附法测定药食同源中药饮片中的黄曲霉毒素的研究[J].现代食品,2022,28(18):163-168.
ZHOU YQ, XIONG Y, WU SQ, *et al.* Study on the determination of aflatoxin in traditional Chinese medicine slices with the homology of medicine and food by enzyme linked immunosorbent assay [J]. Mod Food, 2022, 28(18): 163-168.
- [17] 方真,曲粟,古淑青,等.加速溶剂萃取-QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定药食同源食品中16种真菌毒素[J].色谱,2020,38(7):782-790.
FANG Z, QU L, GU SQ, *et al.* Determination of 16 mycotoxins in drug and food homologous products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with accelerated solvent extraction and QuEChERS [J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(7): 782-790.
- [18] 杨琳,张宇昊,马良.高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素[J].食品科学,2010,31(24):250-254.
YANG L, ZHANG YH, MA L. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in cereal grains by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2010, 31(24): 250-254.
- [19] FONT G, RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, MOLTÓ JC, *et al.* Monitoring *Alternaria* mycotoxins and pesticide residues in tomato by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Toxicol Lett, 2013, 221: S122.
- [20] 闫磊,李卓,张燕.牛奶中黄曲霉毒素的放射免疫法检测[J].食品研究与开发,2010,31(1):135-137.
YAN L, LI Z, ZHANG Y. Aflatoxins in milk by radio immunoassay method [J]. Food Res Dev, 2010, 31(1): 135-137.
- [21] 赵淑娥,肖庚鹏,袁璐,等. QuEChERS 提取快速液相色谱-串联质谱法同时测定食品中多种真菌毒素[J].江西化工,2023,39(6):37-40,44.
ZHAO SE, XIAO GP, YUAN L, *et al.* Simultaneous determination of several mycotoxins in food by QuEChERS extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Jiangxi Chem Ind, 2023, 39(6): 37-40, 44.
- [22] 狄慧,陈佳琛,贺丽霞,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测粮谷类食品中15种真菌毒素[J].中国食品工业,2022,(22):58-62.
DI H, CHEN JC, HE LX, *et al.* Detection of 15 fungal toxins in grains and cereals by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. China Food Ind, 2022, (22): 58-62.
- [23] 牛灿杰,叶素丹,胡玉霞,等.谷物及制品中真菌毒素前处理及检测技术研究进展[J].食品与机械,2023,39(5):203-210,214.
NIU CJ, YE SD, HU YX, *et al.* Research progress in detection technologies of mycotoxins in cereals and cereal-based products [J]. Food Mach, 2023, 39(5): 203-210, 214.
- Mach, 2023, 39(5): 203-210, 214.
- [24] 陈悦铭,黄景初,徐婷,等.多功能免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速检测咖啡豆中的11种真菌毒素[J].食品工业科技,2021,42(16):285-293.
CHEN YM, HUANG JC, XU T, *et al.* Rapid determination of 11 mycotoxins in coffee bean through multifunctional purification and immunoaffinity column coupled to high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(16): 285-293.
- [25] SLOBODCHIKOVA I, VUCKOVIC D. Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for monitoring of 17 mycotoxins in human plasma for exposure studies [J]. J Chromatogr A, 2018, 1548: 51-63.
- [26] 孙卫明,王权帅.多功能净化柱-超高效液相色谱-串联质谱法测定挂面、方便面中4种真菌毒素[J].中国卫生检验杂志,2021,31(6):662-665.
SUN WM, WANG QS. Determination of 4 kinds of mycotoxins in dried noodles and instant noodles by multifunctional columns-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2021, 31(6): 662-665.
- [27] 孙伟华,杨欢,曹赵云,等.基于分散固相萃取液相色谱-串联质谱法测定大米中8种真菌毒素[J].分析测试学报,2017,36(1):47-53.
SUN WH, YANG H, CAO ZY, *et al.* Determination of eight mycotoxins in rice by dispersive solid phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(1): 47-53.
- [28] 徐潇颖,刘柱,朱炳祺,等. QuEChERS 提取-高效液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中29种除草剂的残留量[J].理化检验(化学分册),2019,55(4):420-426.
XU XY, LIU Z, ZHU BQ, *et al.* Determination of 29 residual herbicides in vegetables by HPLC-MS/MS with QuEChERS extraction [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2019, 55(4): 420-426.
- [29] 汪薇,余婷婷,张莉,等. QuEChERS 联合 UPLC-Orbitrap/MS 同时测定检测坚果和干制水果中60种真菌毒素[J].中国食品卫生杂志,2022,34(4):707-714.
WANG W, YU TT, ZHANG L, *et al.* Sixty mycotoxins in nuts and dried fruits simultaneously detected by QuEChERS combined with UPLC-Orbitrap/MS [J]. Chin J Food Hyg, 2022, 34(4): 707-714.
- [30] 许娇婷,蔡增轩,王军淋,等.新鲜水果真菌毒素多组分检测方法研究[J].预防医学,2022,34(6):555-560.
XU JJ, CAI ZX, WANG JL, *et al.* Development of an approach for simultaneous determination of multimycotoxins in fresh fruits [J]. China Prev Med J, 2022, 34(6): 555-560.
- [31] WANG YJ, NIE JY, YAN Z, *et al.* Multi-mycotoxin exposure and risk assessments for Chinese consumption of nuts and dried fruits [J]. Integr Agric, 2018, 17(7): 1676-1690.

(责任编辑:张晓寒 韩晓红)

作者简介

邵瑞婷,高级工程师,主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: rtshao@126.com