

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241128001

引用格式: 李心恬, 黄科, 黄刚, 等. QuEChERS dSPE EMR-Lipid-液相色谱-四极杆飞行时间质谱法定性筛查粮谷中 29 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 76–83.

LI XT, HUANG K, HUANG G, *et al.* Qualitative screening of 29 kinds of mycotoxins in grain by QuEChERS dSPE EMR-Lipid and liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 76–83. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS dSPE EMR-Lipid-液相色谱-四极杆飞行时间质谱法定性筛查粮谷中 29 种真菌毒素

李心恬¹, 黄 科¹, 黄 刚², 张建莹^{1*}, 罗 耀¹, 张 毅³, 吕 飞²

(1. 深圳海关食品检验检疫技术中心, 深圳 518045; 2. 惠州海关综合技术中心, 惠州 516006;
3. 深圳职业技术大学材料与环境工程学院, 深圳 518055)

摘 要: 目的 建立 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 结合液相色谱-四极杆飞行时间质谱法定性筛查粮谷中 29 种真菌毒素残留的方法。**方法** 样品经 20 mL 70%乙腈(含 1%甲酸)水溶液提取, 改良 QuEChERS 法净化, 电喷雾电离, 正离子扫描, 顺序窗口采集所有理论质谱模式。**结果** 建立了包含一级精确质量、二级质谱和保留时间的数据库, 该方法实现了黄大豆、玉米、大米和小麦中 29 种真菌毒素的快速筛查, 筛查检出限分布在 0.005~0.050 mg/kg 之间, 均能满足筛查基本要求。**结论** 该方法操作简便、特异性好、稳定可靠, 较短时间内完成黄大豆、玉米、大米和小麦中大批量样品的处理及定性筛查, 具有较高的应用价值。

关键词: 液相色谱-四极杆飞行时间质谱法; QuEChERS; 真菌毒素; 粮谷; 定性筛查

Qualitative screening of 29 kinds of mycotoxins in grain by QuEChERS dSPE EMR-Lipid and liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry

LI Xin-Tian¹, HUANG Ke¹, HUANG Gang², ZHANG Jian-Ying^{1*}, LUO Yao¹,
ZHANG Yi³, LV Fei²

(1. Food Inspection & Quarantine Center, Shenzhen Customs, Shenzhen 518045, China; 2. Comprehensive Technology Center of Huizhou Customs, Huizhou 516006, China; 3. School of Materials and Environmental Engineering, Shenzhen Polytechnic University, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: Objective To establish a qualitative screening method for 29 kinds of mycotoxins in grains based on QuEChERS dSPE EMR-Lipid and liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry. **Methods** The sample was extracted by 20 mL 70% acetonitrile (containing 1% formic acid), purified by modified QuEChERS

收稿日期: 2024-11-28

基金项目: 深圳市基础研究学科布局项目(JCYJ20180508152311822); 跨境电商进口食品中苯乙胺类新型精神活性物质的鉴别技术研究项目(2024SZHK006)

第一作者: 李心恬(1970—), 男, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 13902911521@139.com

*通信作者: 张建莹(1977—), 男, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品中残留和污染物检测。E-mail: zhangjianying1001@163.com

method, electrospray ionization, positive ion sweeping, sequential window acquisition of all theoretical mass spectra.

Results The established method included a database of primary precision mass, secondary mass spectrometry, and retention time. This method enabled rapid screening of 29 kinds of mycotoxins in soybean, corn, rice, and wheat. The screening limits of detection of ranged from 0.005 to 0.050 mg/kg. The method met the basic screening requirements.

Conclusion The method is simple, specific, stable and reliable. The method enables the processing and qualitative screening of large volumes of samples from soyabean, corn, rice and wheat in a short time. It has high application value.

KEY WORDS: liquid chromatography-quadrupole time of flight-mass spectrometry; QuEChERS; mycotoxins; grain; qualitative screening

0 引言

真菌毒素是真菌产生的有毒次级代谢产物,是粮谷的主要污染源之一,对人和动物具有致癌、致畸、致突变、免疫毒性和雌激素效应等^[1]。我国是粮谷进口大国,主要进口黄大豆、玉米、大米和小麦四大类粮谷^[2]。真菌毒素是粮食安全的主要指标,监测粮谷中的真菌毒素具有重要意义。GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定了粮谷中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 M₁ (aflatoxin M₁, AFM₁)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol, DON)、赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)及玉米赤霉烯酮等限量。

近年来,真菌毒素检测方法主要包括酶联免疫吸附法、高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、胶体金免疫层析法、近红外光谱分析技术等^[3-5]。高效液相色谱-串联质谱法作为主流的检测方法,虽有较好的灵敏度和特异性,但是其分辨率较低,遇到样品基质复杂,容易出现假阳性结果。诸多文献表明,基于高效液相色谱-串联质谱法的真菌毒素检测需依赖同位素内标法解决回收率低的缺陷,其检测成本高昂,对检测人员要求较高^[6-8]。随着质谱技术逐渐发展成熟,液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(liquid chromatography quadrupole time of flight mass spectrometry, LC-Q/TOF-MS)可以在不降低灵敏度的前提下大幅提高分辨率,抗复杂基质干扰能力更强,对目标化合物具有更好的鉴别能力^[9],其在定性鉴别真菌毒素领域具有应用前景,但目前鲜少有相关研究报道。

本研究采用 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 为前处理方法技术,该技术无复杂的前处理步骤,无需采用内标检测,依赖 LC-Q/TOF-MS 的高选择性,结合顺序窗口采集所有理论质谱模式(sequential window acquisition of all theoretical mass spectra, SWATH),构建了29种真菌毒素的质谱库,建立的黄大豆、玉米、大米和小麦等中29种真菌毒素的快速筛查方法可用于进口大宗粮谷的真菌毒素监测,为防范风险提供更多有力选择。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

黄大豆、玉米、大米、小麦为随机抽检样品。

甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵(色谱纯,德国 Merck 公司);萃取盐包(4 g MgSO₄、1 g NaCl、1 g 柠檬酸钠、0.5 g 三水合二柠檬酸二钠)(分析纯,上海安谱实验科技股份有限公司);15 mL Bond Elut EMR-Lipid dSPE 净化管(美国 Agilent 公司)。

29 种真菌毒素标准:15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-deoxynivalenol, 15-A-DON)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-deoxynivalenol, 3-A-DON)、AFB₁、黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂)、AFM₁、交链孢酚(alternariol, AOH)、链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)、黄绿青霉素(citreoviridin, CIT)、桔霉素(citrinin, CIN)、环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid, CPA)、DON、二乙酰基草镰刀菌烯醇(diacetoxyscirpenol, DAS)、伏马毒素 B₁ (fumonisin B₁, FB₁)、伏马毒素 B₂ (fumonisin B₂, FB₂)、伏马毒素 B₃ (fumonisin B₃, FB₃)、镰刀菌酮 X (fusarenon X, FU-X)、茄病镰刀菌烯醇(neosolaniol, NEO)、雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)、OTA、赭曲霉毒素 B (ochratoxin B, OTB)、青霉酸(penicillic acid, PA)、青霉震颤素 A (penitrem A, PEA)、树脂毒素(RSF-resiniferatoxin, RTX)、杂色曲毒素(sterigmatocystin, ST)、T-2 毒素(T-2 toxin, T-2)、腾毒素(tentoxin, TEN)、细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TA)(质量浓度均为 50 mg/L, 天津阿尔塔科技有限公司)。

1.2 仪器与设备

X500R 液相色谱-四极杆飞行时间质谱仪(美国 AB SCIEX 公司);AL204 精密电子天平(精密密度 0.1 mg, 瑞士梅特勒托利多公司);SDC-4000 涡旋振荡仪(深圳逗点生物技术有限公司);Allegra X-30R 高速冷冻离心机(美国贝克曼库尔特公司);Milli-Q 高纯水发生器(德国默克公司);AUTO EVA-60 氮吹浓缩仪(睿科集团股份有限公司);0.22 μm 亲

水 PTFE 有机滤膜(上海安谱实验科技股份有限公司); ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(150 mm×2.1 mm, 1.8 μm , 美国 Waters 公司)。

1.3 样品处理

1.3.1 样品提取

准确称取 5 g(精确至 0.01 g)粮谷(黄大豆、玉米、大米、小麦)试样于 50 mL 离心管中, 放入一颗陶瓷均质子, 加入 20 mL 含 1%甲酸的 70%乙腈水溶液(V:V), 涡旋振荡 3 min, 9500 r/min 离心 5 min。吸取上清液至 50 mL 离心管中, 放置-30 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 1 h 后加入萃取盐包, 涡旋振荡 3 min, 9500 r/min 离心 5 min, 移取全部上清液至 15 mL 离心管中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹浓缩至略低于 5 mL, 乙腈定容为 5.00 mL, 混匀, 待净化。

1.3.2 净化

移取待净化液至 15 mL Bond Elut EMR-Lipid dSPE 净化管(使用前, 加入 5.00 mL 水, 涡旋混匀 30 s 活化), 涡旋混匀 2 min, 迅速在 10 $^{\circ}\text{C}$ 和 9500 r/min 下离心 5 min, 吸取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 供 LC-Q/TOF-MS 检测。

1.4 仪器条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)。流动相 A: 含 0.1%甲酸水溶液; 流动相 B: 含 0.1%甲酸的 50%乙腈甲醇溶液(V:V)。梯度洗脱程序: 0~3.0 min, 5% B; 3.0~5.0 min, 5%~40% B; 5.0~9.0 min, 40%~99% B; 9.0~15.0 min, 99% B; 15.1~20.0 min, 5% B; 流速: 0.3 mL/min; 进样量: 10 μL 。

1.4.2 质谱条件

采集模式: 正离子; 喷雾电压: 5500 V; 离子源温度: 550 $^{\circ}\text{C}$; 雾化气压: 0.379 MPa; 辅助气压: 0.414 MPa; 气帘气压: 0.241 MPa; 扫描模式: SWATH/TOF-MS/TOF-MS/MS。TOF-MS 参数: 采集范围 150~785 m/z ; 去簇电压: 80 V; 碰撞能: 20、35、50 eV。TOF-MS/MS 参数: 采集范围 50~785 m/z , 根据实际分布, 平均拆分成 10 段。每 5 针进样进行一次自动校准。

1.5 数据处理

质谱数据、方法学考察数据处理采用 SCIEX OS 2.0.1 软件分析, 样品含量计算采用 WPS 2024, 绘图采用 Origin 2022。每组样品均设置平行重复 6 次。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、Agilent Poroshell 120 EC- C_{18} (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm)、Shimadzu Shim-pack Velox C_{18} (100 mm×2.1 mm,

2.7 μm)测试, 29 种真菌毒素在 3 种 C_{18} 柱均有较好的保留和分离, 峰形尖锐对称, 且稳定, 满足检测需求。29 种真菌毒素大部分为弱极性化合物, 个别化合物中等极性, 考虑到 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (150 mm×2.1 mm, 1.8 μm) 是在 C_{18} 键合极性修饰基团, 增强对极性分子的反相保留能力, 延长目标物的保留时间, 可以排除更多极性干扰物, 故最终选择采用此款色谱柱在正模式下进行检测。

2.2 流动相的选择

本研究对 29 种真菌毒素在乙腈-水、甲醇-水和 50% 乙腈/甲醇-水流动相体系[水相和有机相中均分别添加 0.1%甲酸、0.005 mol/L 乙酸铵(含 0.1%甲酸, pH 约为 3.2) 和 0.005 mol/L 乙酸铵(含 0.01%甲酸, pH 约为 4.5)]的色谱分离效果进行对比研究。在不同流动相条件下目标化合物的分离度存在差异, 且质谱响应强弱不同。在甲醇流动相体系中, 大多化合物响应较强, 分离度相对较好, 但个别化合物峰型稍差。在乙腈流动相条件下, 较多化合物峰型较好, 但部分结构相似物质的分离度较差。50%乙腈/甲醇混合流动相的优点是结构相似物质分离更好, 兼顾峰形和分离度。结果表明, 0.1%甲酸水-50%甲醇/乙腈溶液(含 0.1%甲酸)混合溶液为流动相时获得了最优的色谱峰形及质谱响应, 由图 1 可见, 29 种真菌毒素在色谱柱中保留分布较好, 分离效果达到理想状态。

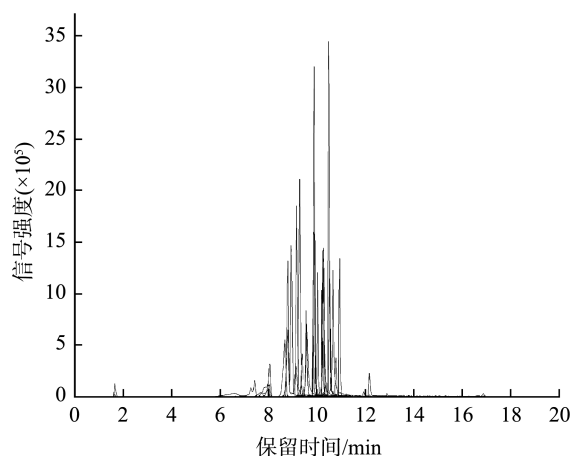


图 1 29 种真菌毒素标液的提取离子流色谱图(100 $\mu\text{g/L}$)

Fig.1 Extraction ion flow chromatogram of the 29 kinds of mycotoxins standard solution (100 $\mu\text{g/L}$)

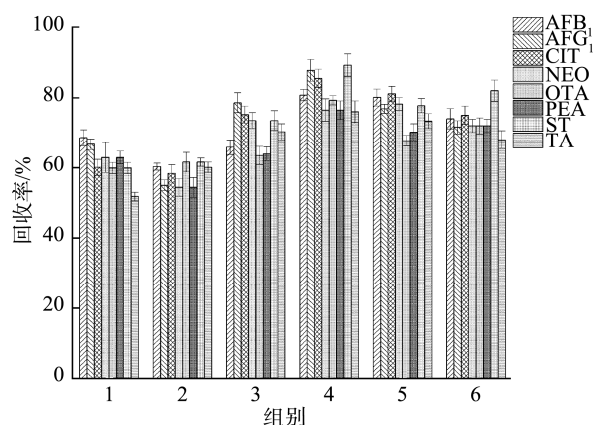
2.3 样品前处理方法的优化

2.3.1 提取溶剂的优化

本研究 29 种真菌毒素的极性差异较大, 选择提取溶剂时需考虑溶剂性质和样品基质特点。常用提取试剂有乙腈、甲醇、乙酸乙酯和水等。乙腈的极性适中, 提取目标化合物的极性范围更宽。通过适当酸化可促进真菌毒素从组织中溶出, 改善提取效率, 乙腈水可增加极性化合物的

提取效率^[10-12]。

本研究分别考察了 6 种提取溶剂: 乙腈/水(50:50, V:V)、乙腈/水/甲酸(50:49:1, V:V:V)、乙腈/水(70:30, V:V)、乙腈/水/甲酸(70:29:1, V:V:V)、乙腈/水(84:16, V:V)、乙腈/水/甲酸(84:15:1, V:V:V), 对 29 种真菌毒素在黄豆中的加标(0.100 mg/kg)回收率作为比较指标。如图 2, 结果表明, 乙腈占比越大, 越适用于大多数毒素的提取(乙腈体积比为 70%和 84%的提取试剂好于体积比 50%的乙腈提取试剂)。酸性条件下能较好的提取大多数毒素, 除 FB₁、FB₂、FB₃、DON、AME、DAS、PA、AOH 的提取回收率较低, 其余 19 种毒素的回收率均超过了 60%。最终选定提取溶剂为乙腈/水/甲酸(70:29:1, V:V:V)。



注: 1. 乙腈/水(50:50, V:V); 2. 乙腈/水/甲酸(50:49:1, V:V:V);
3. 乙腈/水(70:30, V:V); 4. 乙腈/水/甲酸(70:29:1, V:V:V);
5. 乙腈/水(84:16, V:V); 6. 乙腈/水/甲酸(84:15:1, V:V:V)。

图 2 不同提取溶剂时典型真菌毒素的回收率

Fig.2 Recovery rates of typical mycotoxins in different extraction solvents

2.3.2 净化条件的选择

免疫亲和柱分析多种包括黄曲霉毒素在内的多种真菌毒素^[13-16], 但免疫亲和柱价格昂贵, 作为定性筛查不是最好的选项。QuEChERS 方法针对样品采用简单的 3 步流程(萃取、净化和分析), 该方法在谷物和乳制品中包括黄曲霉毒素在内的多种不同分析物和基质的前处理方面极具前景^[17-19]。

QuEChERS 常用净化剂十八烷基硅胶(C₁₈)和乙二胺基-N-丙基(ethylenediamine-N-propyl, PSA)在处理高脂质样品时有一定限制^[20-23], 净化剂本身与目标物非选择性作用, 脂类物质去除能力不足, 加大了污染检测仪器的可能性, 影响数据的准确度和精密度。增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 是一种新型吸附剂, 它结合了体积排阻和吸附剂与长脂肪链官能团之间的疏水作用, 可选择性吸附液中的直链烃类结构化合物(包括游离脂肪酸、甘油三酯和磷

脂等), 有助于实现简单高效的净化^[24-25]。

本研究的样品基质为富含脂质的粮谷样品, 如前处理净化不当会影响仪器检测。考察了提取液经 EMR-Lipid dSPE 新型吸附剂净化(第一组), 未经净化(第二组), 经传统 QuEChERS(提取液加入 900 mg MgSO₄, 150 mg PSA 和 150 mg C₁₈ dSPE 净化粉末)净化(第三组)后, 采用 LC-MS/TOF 进行全扫描得到的色谱图进行比较。结果显示(见图 3), 第一组可获得出色的基质去除效果。

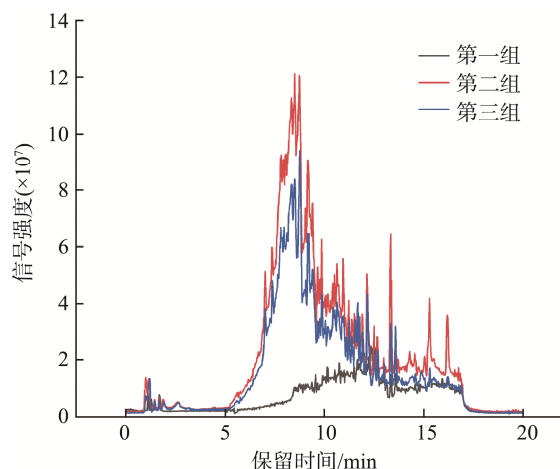


图 3 经不同前处理样液的全扫描色谱图比较

Fig.3 Comparison of full scan chromatogram with different pre-treated samples

2.4 质谱条件的优化

2.4.1 一级精确质量数据库

在上述仪器条件下进标准溶液, 对 29 种真菌毒素逐一进行 Q1 全扫描, 记录保留时间、母离子质荷比、质量偏差以及离子化形式等主要质谱信息^[26-27]。在软件中输入化合物的名称、分子式, 选择加荷方式, 软件自动计算母离子理论质量质荷比, 建立 29 种真菌毒素的一级精确质量数据库(见表 1)。

2.4.2 二级精确质量数据库

29 种真菌毒素在保留时间窗口的响应值超过阈值, 则自动触发在不同碰撞能量下采集二级碎片谱图, 由此建立二级信息谱库, 包括母离子提取离子色谱图、母离子同位素分布图、不同碰撞能量下的叠加二级质谱图等信息^[28-29], 如图 4。

2.5 基于谱库的定性筛查和确证

欧盟最新版 SANTE/11945/2015《食品和饲料中农残分析的质量控制和方法确认的指导文件》的决议, 使用高分辨质谱确证时: 至少需要 1 个高分辨母离子及 1 个特征碎片离子, 且质量偏差 ≤ 5 ppm, 一级母离子 $m/z < 200$ 时, 其绝对偏差 ≤ 1 mDa。《农业农村部公告第 312 号饲料中

表 1 29 种真菌毒素的质谱信息、保留时间与检出限
Table 1 Mass spectrometry informations, retention times and limits of detection of the 29 kinds of compounds

序号	名称	分子式	加荷方式	测定质量数	理论质量数	典型二级离子	保留时间/min	质量数误差/(ppm/mDa)
1	15-A-DON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	[M+H] ⁺	339.1438	339.1438	231.1027, 137.0606	8.66	0.0
2	3-A-DON	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	[M+H] ⁺	339.1438	339.1438	231.1028, 175.0766	8.66	0.0
3	AFB1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	313.0704	313.0707	285.0767, 214.0635	9.28	-0.9
4	AFB2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	[M+H] ⁺	315.0858	315.0863	287.0921, 259.0620	9.15	-1.7
5	AFG1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	329.0654	329.0656	311.0554, 243.0657	8.94	-0.6
6	AFG2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	331.0810	331.0812	313.0716, 245.0820	8.79	-0.8
7	AFM1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	329.0654	329.0656	311.0554, 215.0712	8.94	-0.6
8	AOH	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	[M+H] ⁺	259.0598	259.0601	213.0557, 185.0609	9.85	-1.2
9	AME	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	[M+H] ⁺	273.0753	273.0757	230.0590, 184.0534	10.53	-1.5
10	CIT	C ₂₃ H ₃₀ O ₆	[M+H] ⁺	403.2114	403.2115	297.1492, 139.0398	10.21	-0.2
11	CIN	C ₁₃ H ₁₄ O ₅	[M+H] ⁺	251.0912	251.0914	233.0816, 191.0708	10.26	-0.9
12	CPA	C ₂₀ H ₂₀ N ₂ O ₃	[M+H] ⁺	337.1544	337.1547	196.1114, 182.0821	10.66	-0.7
13	DON	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	[M+H] ⁺	297.1330	297.1333	231.1025, 175.0761	1.65	-0.9
14	DAS	C ₁₉ H ₂₆ O ₇	[M+H] ⁺	367.1753	367.1751	307.1549, 201.1275	9.35	0.6
15	FB1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	[M+H] ⁺	722.3959	722.3957	704.3903, 546.3655	9.13	0.2
16	FB2	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	[M+H] ⁺	706.4007	706.4008	688.3968, 512.3628	9.56	-0.1
17	FB3	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	[M+H] ⁺	706.4017	706.4008	688.3909, 336.3270	9.38	1.2
18	FU-X	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	355.1388	355.1387	229.0867, 137.0602	7.97	0.2
19	NEO	C ₁₉ H ₂₆ O ₈	[M+NH ₄] ⁺	400.1966	400.1966	305.1398, 185.0973	8.04	0.0
20	NIV	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	[M+H] ⁺	313.1283	313.1282	175.0744, 115.0527	1.65	0.3
21	OTA	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	[M+H] ⁺	404.0897	404.0895	358.0847, 239.0107	10.25	0.5
22	OTB	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	[M+H] ⁺	370.1280	370.1285	205.0494, 131.0485	9.88	-1.3
23	PA	C ₈ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺	171.0647	171.0652	125.0584, 110.0350	8.02	-0.0005
24	PEA	C ₃₇ H ₄₄ ClNO ₆	[M+H] ⁺	634.2930	634.2930	558.2416, 332.1214	10.78	0.0
25	RTX	C ₃₇ H ₄₀ O ₉	[M+H] ⁺	629.2748	629.2745	311.1648, 223.1130	10.93	0.4
26	ST	C ₁₈ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	325.0698	325.0707	310.0463, 281.0440	10.49	-2.6
27	T-2	C ₂₄ H ₃₄ O ₉	[M+NH ₄] ⁺	484.2539	484.2541	215.1052, 169.0995	10.03	-0.4
28	TEN	C ₂₂ H ₃₀ O ₄ N ₄	[M+H] ⁺	415.2331	415.234	312.1715, 256.1807	9.89	-2.1
29	TA	C ₁₀ H ₁₅ NO ₃	[M+H] ⁺	198.1120	198.1125	153.0893, 125.0220	9.59	-0.0005

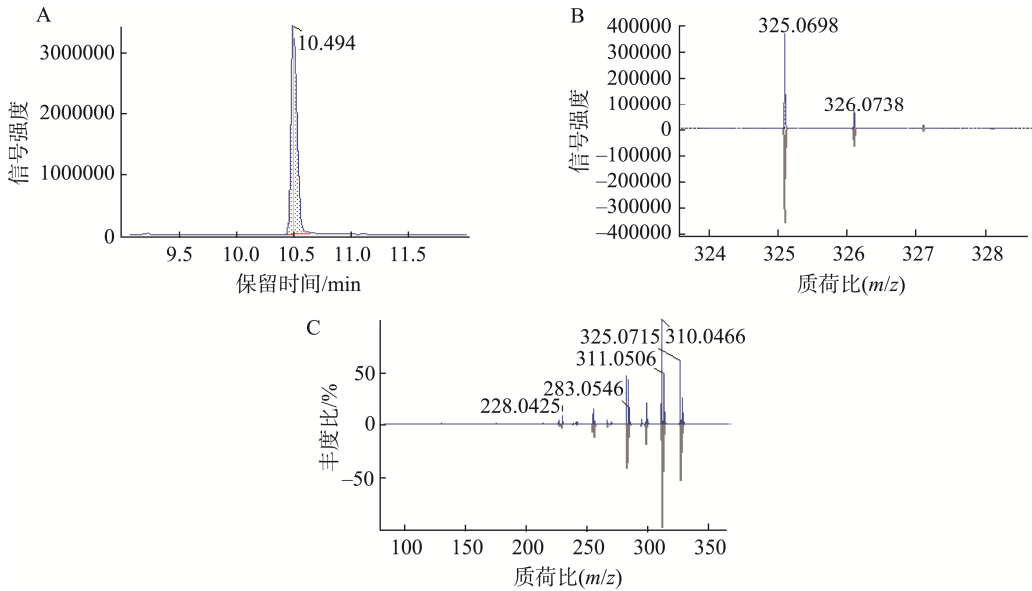


图 4 杂色曲霉素的母离子提取离子色谱图(A)、TOF-MS (B)和 TOF-MS/MS (C)质谱图
Fig.4 Parent ion extraction ion chromatogram (A), TOF-MS (B) and TOF-MS/MS (C) mass spectra of sterigmatocystin

风险物质的筛查与确认导则液相色谱-高分辨质谱法(LC-*HRMS*)》目标物筛查判定条件为采样点数: 单个目标物峰不少于 5 个采样点; 信号响应要求: 信噪比(*S/N*)存在时, 应使 $S/N \geq 3$; 质量准确性: 一级母离子 $m/z \geq 200$ 时, 其相对偏差应 ≤ 10 ppm; 一级母离子 $m/z < 200$ 时, 其绝对偏差应 < 1 mDa。

参考上述文件要求, 筛查规则定为: 母离子和一个特征碎片离子的质量偏差 ≤ 5 ppm(母离子 $m/z < 200$, 绝对偏差 < 1 mDa), 保留时间 $\leq 2.5\%$ (最大不超过 0.5 min), 母离子的同位素分布差异 $\leq 10\%$, 二级谱库相似度 $\geq 80\%$, 4 个关键因子占总得分的 30%、30%、10%、30%, 且仪器自动综合打分不低于 90 分。为考察方法的可靠性, 添加了 29 种真菌毒素标准品的样品按 1.3、1.4 进行检测, 目标化合物的综合得分为 91.4~99.7 分, 所得结果均大于定性筛查的最低分(90 分)。

2.5.1 基质效应

质谱的基质效应主要由分析物共流组分影响离子化效率所致, 表现为离子增强或抑制。试验考察了黄豆、大米、玉米、小麦的基质效应, 在纯试剂和不同基质提取液中添加标准溶液, 比较目标物在纯试剂和基质液中的信号峰面积, 可按公式对基质效应进行量化评估: 基质效应(matrix effects, ME)/%=[(基质匹配校准曲线斜率/纯溶剂标准曲线斜率)-1]×100%。 $|ME| < 20\%$ 为弱基质效应, 可忽略而无需采取补偿措施; $20\% \leq |ME| \leq 50\%$ 为中等程度基质效应, $|ME| > 50\%$ 为强基质效应, 须采取措施补偿基质效应^[30-32]。DAS、NEO、RTX、PEA 表现为基质增强效应, 其他项目表现为基质抑制效应。29 种真菌毒素在 4 种基质中的基质效应情况见表 2(用 $|ME|$ 表示), 尽管采用优化的净化方法能有效减少样品提取液中的干扰组分, 但大部分 $|ME|$ 均大于 20%, 故本研究以基质匹配法检测。

2.5.2 特异性

本研究选择了黄大豆、玉米、大米、小麦来进行方法适用性验证, 按 1.3 前处理方法操作, 质谱数据采集后分析, 结果表明: 4 种基质不存在对 29 种真菌毒素产生影响的假阳性化合物。

2.5.3 检出限

分别取黄大豆、玉米、大米、小麦空白基质样品, 添加不同体积的混合标准溶液, 按 1.3 样品前处理方法制备加样溶液, 以符合定性结果判定方法所述检出结果的最低质量浓度作为检出限。结果表明, NIV 在 4 种基质中检出限 0.050 mg/kg, 15-A-DON 和 3-A-DON 在 4 种基质中检出限 0.025 mg/kg, AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁ 在 4 种基质中检出限 0.005 mg/kg, 其他真菌毒素在 4 种基质中检出限 0.010 mg/kg。

2.6 实际样品分析

采集深圳地区市售黄大豆、玉米、大米、小麦各 10

批次, 采用本研究建立的方法对其进行 29 种真菌毒素的筛查分析, 结果表明: 22 批次粮谷中检出 DON, 检出值 0.02~0.10 mg/kg; 7 批次粮谷中检出 FB₁, 检出值 0.02~0.06 mg/kg; 5 批次粮谷中检出 FB₂, 检出值 0.03~0.05 mg/kg; 6 批次粮谷中检出 FB₃, 检出值 0.01~0.05 mg/kg。

表 2 29 种真菌毒素在 4 种基质中的 MEs(%)
Table 2 MEs of 29 kinds of mycotoxins in 4 kinds of different matrices (%)

化合物	黄大豆	大米	玉米	小麦
15-A-DON	23	28	31	24
3-A-DON	21	26	27	26
AFB ₁	18	16	22	18
AFB ₂	22	14	19	18
AFG ₁	25	14	22	23
AFG ₂	15	12	20	19
AFM ₁	24	31	30	30
AOH	31	29	29	30
AME	20	18	13	22
CIT	14	16	25	38
CIN	25	37	33	37
CPA	40	31	35	29
DON	16	20	25	28
DAS	23	27	32	30
FB ₁	25	29	28	40
FB ₂	16	10	10	17
FB ₃	25	33	33	19
FU-X	18	28	26	26
NEO	27	36	33	34
NIV	16	15	18	19
OTA	28	20	26	29
OTB	21	24	15	26
PA	16	11	11	10
PEA	20	12	16	15
RTX	31	26	40	31
ST	30	31	37	40
T-2	15	20	29	24
TEN	23	31	31	21
TA	25	20	27	18

3 讨论与结论

本研究利用 LC-Q/TOF 20 min 内可完成黄大豆、玉米、大米、小麦中 29 种真菌毒素的快速筛查。样品提取液经 QuEChERS dSPE EMR-Lipid 简单快速的方法净化, 有效地消减了基质干扰。以精确相对分子质量、二级质谱图和相对保留时间为基础, 构建了筛查数据库, 建立快速筛查方法, 利用高分辨质谱的检测, 极大提高了方法定性的

准确性。该方法在粮谷的真菌毒素快速筛查中可以得到广泛应用。

本研究覆盖的真菌毒素度尚小, 可通过此研究路线构建更大的本地筛查数据库, 通过优化色谱分离技术, 更加准确地定性部分同分异构体真菌毒素, 使此研究方法更具使用价值。

参考文献

- [1] 朱燕, 姚香澳, 宫智勇. 稻谷中真菌毒素的暴露污染、检测技术及防控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(15): 264–274.
ZHU Y, YAO XAO, GONG ZY. Research progress on exposure pollution, detection technology, and prevention and control of mycotoxins in rice [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(15): 264–274.
- [2] 胡青江, 杜紫琼. 中国粮食贸易进口特征、问题及应对策略[J]. 北方经贸, 2024(8): 32–38.
HU QJ, DU ZQ. Characteristics of China's grain trade imports, problems and coping strategies [J]. Northern Economy and Trade, 2024(8): 32–38.
- [3] 温慧娇, 廖芷晴, 靳贵英. 真菌毒素检测方法进展[J]. 中国药品标准, 2023, 24(5): 465–475.
WEN HJ, LIAO ZQ, JIN GY. Advances in mycotoxin detection methods [J]. Drug Standards of China, 2023, 24(5): 465–475.
- [4] 程裕贵, 胡靖康, 江湖, 等. 粮食中主要真菌毒素及分析方法研究进展[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(6): 225–234.
CHENG YG, HU JK, JIANG H, *et al.* Mycotoxins contamination in cereals and analytical methods [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2024, 39(6): 225–234.
- [5] KHADIJE A, SARA K, LEYLA A, *et al.* The mycotoxins in edible oils: An overview of prevalence, concentration, toxicity, detection and decontamination techniques [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 24(5): 500–511.
- [6] 王韶颖, 吕波, 沈飞, 等. 同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法检测花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 及其生物可给性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(22): 8643–8650.
WANG SY, LV B, SHEN F, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanuts and its products by isotope internal standard-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and study on its bioaccessibility [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(22): 8643–8650.
- [7] 何卓霖, 李子琨, 穆蕾, 等. 同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法同时测定小麦和玉米中 19 种真菌毒素[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(7): 150–157.
HE ZL, LI ZK, MU L, *et al.* Simultaneous determination of isotope internal standard-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry 19 mycotoxins in wheat and corn [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(7): 150–157.
- [8] 吴雪莹, 戴琴, 付睿婕, 等. 高效液相色谱-质谱法测定 6 种玉米赤霉醇类真菌毒素[J]. 食品工业, 2024, 45(7): 296–301.
WU XY, DAI Q, FU RJ, *et al.* Simultaneous determination of 6 zearmycotoxins in foods by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. The Food Industry, 2024, 45(7): 296–301.
- [9] 李俊玲, 王冬梅, 张宇, 等. 花生及其制品中 16 种真菌毒素的超高效液相色谱串联质谱测定法[J]. 现代预防医学, 2022, 49(19): 3590–3597.
LI JL, WANG DM, ZHANG Y, *et al.* Rapid determination of 16 mycotoxins in peanut and its products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Modern Preventive Medicine, 2022, 49(19): 3590–3597.
- [10] 马桂娟, 朱燕燕, 汤丽华, 等. QuEChERS-HPLC-MS/MS 法同时测定葡萄酒中 12 种真菌毒素[J]. 分析仪器, 2024(4): 24–30.
MA GJ, ZHU YY, TANG LH, *et al.* Simultaneous determination of twelve fungal toxins residues in wine by QuEChERS-HPLC-MS/MS [J]. Analytical Instrumentation, 2024(4): 24–30.
- [11] 程龙, 李云飞, 吴思超, 等. 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱测定三七中九种真菌毒素[J]. 湖北农业科学, 2024, 63(6): 187–192.
CHENG L, LI YF, WU SC, *et al.* Determination of nine mycotoxins in panax notoginseng by ultra high performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Hubei Agricultural Sciences, 2024, 63(6): 187–192.
- [12] 朱怡平, 戴承兵, 赵佳伟, 等. 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法测定咖啡中 21 种真菌毒素[J]. 分析测试学报, 2024, 43(9): 1458–1466.
ZHU YP, DAI CB, ZHAO JW, *et al.* Determination of 21 mycotoxins in coffee by solid phase extraction coupled with UPLC-MS/MS [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(9): 1458–1466.
- [13] 章璐幸, 黄朝辉, 罗淑青, 等. 应用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法建立谷物中 18 种真菌毒素非靶向筛查数据库及确证方法[J]. 色谱, 2021, 115(9): 66–75.
ZHANG LX, HUANG ZH, LUO SQ, *et al.* Application of ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry to establish a database for non-targeted screening of 18 mycotoxins in cereals and a method for their confirmation [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2021, 115(9): 66–75.
- [14] 张烁, 周爽, 裴晓燕, 等. 免疫亲和柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 16 种真菌毒素比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(3): 234–242.
ZHANG S, ZHOU S, PEI XY, *et al.* Comparative determination of 16 mycotoxins in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity columns [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(3): 234–242.
- [15] 付骋宇, 李莹, 孔祥虹, 等. 高效液相色谱-柱后衍生法测定植物油脂中 4 种黄曲霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(11): 4428–4432.
FU CY, LI Y, KONG XH, *et al.* Determination of four aflatoxins in vegetable fats and oils by high performance liquid chromatography with post-column derivatisation [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2015, 6(11): 4428–4432.
- [16] 孟春杨, 吴玉田, 邹璐, 等. 免疫亲和柱净化-超高效液相色谱串联质谱法同时测定火锅底料中的 5 种真菌毒素[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 334–339.
MENG CY, WU YT, ZOU L, *et al.* Simultaneous determination of five mycotoxins in hotpot base by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry coupled with immunoaffinity column clean-up [J]. Food Science and Technology, 2024, 49(2): 334–339.
- [17] 曹晶晶, 刘莹, 王雅楠, 等. 全自动免疫磁珠法与免疫亲和柱法测定食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的对比研究[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(3): 153–158.
CAO JJ, LIU Y, WANG YN, *et al.* Comparison of fully automated immunomagnetic bead method and immunoaffinity column method for the

- determination of aflatoxin B₁ in edible oils [J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2023, 31(3): 153–158.
- [18] 倪杨, 杨军军, 石磊, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定坚果中20种真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(13): 4107–4116.
- NI Y, YANG JJ, SHI L, *et al.* Simultaneous determination of 20 mycotoxins in nuts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(13): 4107–4116.
- [19] 吴基任, 潘望, 谭高好, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定花生及土榨花生油中9种真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 3927–3935.
- WU RJ, PAN W, TAN GH, *et al.* Determination of 9 kinds of mycotoxins in peanuts and flavor peanut oil by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(10): 3927–3935.
- [20] 吴琴燕, 张文文, 梁红芳, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS法检测粮食中的黄曲霉毒素[J]. *粮油食品科技*, 2024, 32(2): 145–150.
- WU QY, ZHANG WW, LIANG HF, *et al.* Determination of aflatoxins in grains by QuEChERS-UPLC-MS/MS [J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2024, 32(2): 145–150.
- [21] 谭洁, 韦卓才, 黄丽, 等. QuEChERS-气相色谱-串联质谱检测水牛乳中27种农药残留[J]. *粮食与油脂*, 2024, 37(9): 152–157.
- TAN J, WEI ZC, HUANG L, *et al.* Determination of 27 pesticide residues in buffalo milk by QuEChERS-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Cereals & Oils*, 2024, 37(9): 152–157.
- [22] 张晓敏, 孟根花, 蔺婷娟, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定牛乳中6种农药残留[J]. *乳业科学与技术*, 2022, 45(2): 8–12.
- ZHANG XM, MENG GH, LIN TJ, *et al.* Determination of six pesticide residues in cow's milk by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2022, 45(2): 8–12.
- [23] 薛荣旋, 黄诚, 温伊蕾, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中氨基甲酸酯类农药残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(1): 187–191.
- XUE RX, HUANG C, WEN YL, *et al.* Determination of carbamate pesticide residues in milk by QuEChERS-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(1): 187–191.
- [24] TAN XT, LI ZM, DENG LG, *et al.* Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(9): 2163–2174.
- [25] 胡珀, 卜媛媛, 金鹏, 等. QuEChERS EMR-Lipid 净化结合同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂房及其制剂中10种真菌毒素[J]. *食品与药品*, 2024, 26(4): 316–322.
- HU P, PU YY, JIN P, *et al.* Simultaneous determination of 10 mycotoxins in honeycomb and its preparations by QuEChERS EMR-Lipid clean-up combined with isotope dilution and ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food and Drug*, 2024, 26(4): 316–322.
- [26] 梁艳婷, 杨奉筠, 贾艳丰, 等. 基于自建数据库的超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱法定量测定玉米中5种真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(20): 279–287.
- LIANG YT, YANG FJ, JIA YF, *et al.* Determination of 5 kinds of mycotoxins in zea mays by ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry based on self-established database [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(20): 279–287.
- [27] 朱峰, 吉文亮, 刘华良, 等. 超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱法用于食物中毒的快速筛查与确证[J]. *色谱*, 2017, 35(9): 957–962.
- ZHU F, JI WL, LIU HL, *et al.* Rapid screening and identification of food poisonings by ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time flight mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2017, 35(9): 957–962.
- [28] 庞雯辉. 基于UPLC-Q-TOF-HRMS技术的柠檬生物活性成分筛查定量方法的建立与应用[D]. 成都: 西南大学, 2021.
- PANG WH. Establishment and application of the screening and quantitative method of bioactive compounds in lemons by UPLC-Q-TOF-HRMS [D]. Chengdu: Southwest University, 2021.
- [29] 张凌云, 刘匡一. UPLC-QTOF/MS法鉴定蕨麻中化学成分[J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(8): 1995–2000.
- ZHANG LY, LIU KY. Identification on chemical constituents in potentilla radix by UPLC-QTOF/MS [J]. *Drugs & Clinic*, 2024, 39(8): 1995–2000.
- [30] 聂文丁, 帅思婕, 胡珂, 等. 基于棒状核-壳结构的磁性沸石咪唑酯骨架复合材料的磁固相萃取-气相色谱-质谱法检测茶饮料中16种多环芳烃[J]. *分析化学*, 2024, 52(9): 1355–1367.
- NIE WD, SHUAI SJ, HU K, *et al.* Determination of sixteen kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea beverages by MHNTs@ZIF-8-based magnetic solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2024, 52(9): 1355–1367.
- [31] 蒋文佳, 胡蓉, 李真, 等. LC-MS/MS快速检测粮食中3种真菌毒素的方法研究[J]. *粮食与油脂*, 2023, 36(6): 153–157.
- JIANG WJ, HU R, LI Z, *et al.* Study on the rapid determination method of three mycotoxins in grain by LC-MS/MS [J]. *Cereals & Oils*, 2023, 36(6): 153–157.
- [32] 肖泳, 曾小明, 李政, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法测定鸡蛋中94种农药残留[J]. *食品与发酵工业*, 2024, 50(21): 333–340.
- XIAO Y, ZENG XM, LI Z, *et al.* Determination of 94 kinds of pesticide residues in eggs by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2024, 50(21): 333–340.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)