

- 596-600.
- [14] 王浩, 杨红梅, 郭启雷, 等. 液相色谱-串联质谱法快速同时测定婴幼儿配方乳粉中氯霉素、三聚氰胺、甲硝唑和洛硝达唑 [J]. 分析化学, 2013, 41(2): 283-287.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 21311—2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱-串联质谱法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 22338—2008 动物源性食品中氯霉素类药物残留量测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [17] 中华人民共和国农业部. 动物性食品中甲硝唑、地美硝唑及其代谢物残留检测 液相色谱-串联质谱法(农业部 1025 号公告-2—2008) [S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [18] 刘正才, 杨方, 余孔捷, 等. 兽药粉剂中氯霉素类和硝基呋喃类药物的液相色谱-串联质谱分析方法的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(9): 40-43.
- [19] 张立坚, 张俊杰, 张良滔, 等. 液相色谱-质谱法检测渔业养殖水中硝基呋喃及氯霉素药物 [J]. 质谱学报, 2011, 32(4): 207-210.
- [20] 赵善仓, 李增梅, 刘宾, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定畜产品中硝基呋喃类抗生素代谢物残留的研究 [J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(7): 17-21.

实验技术与方法

QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法 测定婴幼儿谷类辅助食品中 12 种真菌毒素

苏碧玲, 谢维平, 欧阳燕玲, 陈林刚

(泉州市疾病预防控制中心, 福建泉州 362000)

摘要: 目的 建立 QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷类辅助食品中 12 种真菌毒素的方法。方法 样品用乙腈-水-乙酸(84:15:1, V/V)提取, 提取液经 QuEChERS 方法净化, 采用 Synergi 4 μ Fusion-RP C₁₈ 色谱柱(50 mm × 2.0 mm, 4 μ m)进行分离, 用超高效液相色谱-串联质谱仪进行检测, 基质外标法定量。结果 12 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)均不低于 0.999, 回收率在 80.5% ~ 106.4% 之间, 相对标准偏差在 5.3% ~ 9.5% 之间。结论 该方法快速简便, 可用于婴幼儿谷类辅助食品中真菌毒素多残留成分的检测。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 真菌毒素; 婴幼儿谷类辅助食品; 食品污染物; 检测

中图分类号: R155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2016)04-0467-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.04.012

Determination of twelve mycotoxins in cereal-based complementary foods for infants and young children by ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry using QuEChERS approach

SU Bi-ling, XIE Wei-ping, OUYANG Yan-ling, CHEN Lin-gang

(Quanzhou Center for Disease Control and Prevention, Fujian Quanzhou 362000, China)

Abstract: Objective A method was developed for the determination of twelve mycotoxins in cereal-based complementary foods for infants and young children by ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry using QuEChERS approach. **Methods** Sample was extracted with acetonitrile-water-acetic acid (84:15:1, V/V). The extracted solution was purified by QuEChERS approach and separated by using Synergi 4 μ Fusion-RP C₁₈ (50 mm × 2.0 mm, 4 μ m) chromatographic column, then was determined by ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Matrix-matched calibration was used for the quantification. **Results** Twelve mycotoxins had good linear relationships in the certain correlation ranges with the correlation coefficients all above 0.999. The average recoveries of 12 mycotoxins at three spiked levels ranged from 80.5% to 106.4% with relative standard deviations of 5.3% -9.5%. **Conclusion** The method is rapid, simple and can be used for the determination of

mycotoxins in cereal-based complementary foods for infants and young children.

Key words: QuEChERS; ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry; mycotoxins; cereal-based complementary foods for infants and young children; food contaminant; test

真菌毒素是由某些真菌在生长过程中产生的有毒次级代谢产物,目前已知的种类有300多种。有30多种真菌毒素对人类和动物有强毒性,包括黄曲霉毒素、T-2毒素、玉米赤霉烯酮和伏马毒素等,这些毒素可广泛污染食物、农作物及其制品等^[1]。据联合国粮食与农业组织估计,每年全世界约有25%的粮食作物受到真菌毒素的污染,造成的经济损失达数千亿美元,而在发展中国家存在的问题要远远大于发达国家。因此,在人们密切关注食物卫生质量和安全的今天,真菌毒素对食物的污染已成为不可忽视的问题,而婴幼儿谷类辅助食品作为6个月以上婴儿食物重要的组成部分,安全问题更不容忽视。所以亟需建立婴幼儿谷类辅助食品中真菌毒素的检测方法。

经典的真菌毒素检测方法有酶联免疫法(ELISA)^[2-3]、薄层色谱法(TLC)^[4]、气相色谱法(GC)^[5]及高效液相色谱法(HPLC)^[6-8]等。薄层色谱法简便、成本低,但是灵敏度不高,通常用于半定量分析;酶联免疫吸附法操作简单、速度快,但是容易出现假阳性,通常用于筛选试验;气相色谱法要衍生,操作复杂;高效液相色谱法效率高、速度快,能同时测定多种真菌毒素,但是当样品基质复杂时,会产生干扰^[9]。然而,超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)可同时提供目标化合物的保留时间和分子结构信息,具有杂质影响小、灵敏度高、适合多组分同时分析等优点^[10]。本试验采用QuEChERS净化方法,结合超高效液相色谱-串联质谱进行检测,建立了婴幼儿谷类辅助食品中多种真菌毒素的检测方法,取得了理想效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

25份婴幼儿谷类辅助食品为2015年泉州市食品风险监测项目抽检样品,采样过程符合国家标准要求。样品经多功能粉碎机粉碎后,密封备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

1290 Infinity超高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies)、4000 Q-Trap三重四级杆质谱系统(美国AB SCIEX)、MycoSpin 400多功能净化柱(美国Romer)、离心机、Milli-Q超纯水系统、旋转蒸发仪、超声波清洗器、振荡器。

黄曲霉毒素(AFB_1 :1162-65-8、 AFB_2 :7220-81-7、 AFG_1 :1165-39-5、 AFG_2 :7241-98-7)、伏马毒素(FB_1 :116355-83-0、 FB_2 :116355-84-1)、二乙酰镰草镰刀菌烯醇(DAS,2270-40-8)、HT-2毒素(26934-87-2)、T-2毒素(21259-20-1)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON,51481-10-8)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-ADON,50722-38-8)、玉米赤霉烯酮(ZON,17924-92-4)12种标准品均购自国家标准物质中心(纯度均不低于99%),甲醇、乙腈均为色谱纯,乙酸铵。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制及样品测定

FB_1 和 FB_2 用乙腈-水(1:1,V/V)配成5.0 mg/L的标准储备液,其余10种真菌毒素用甲醇配成1.0 mg/L的标准储备液,再用20%甲醇水溶液稀释,配制混合标准序列溶液(标准序列范围: AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 、 AFG_2 、DAS、HT-2、T-2、DON、3-ADON、ZON:0.50~50.0 μg/L; FB_1 、 FB_2 :25.0~250 μg/L)。标准溶液与样品各进样10 μl,以峰面积对浓度作标准曲线,外标法定量,标准溶液色谱图见图1。

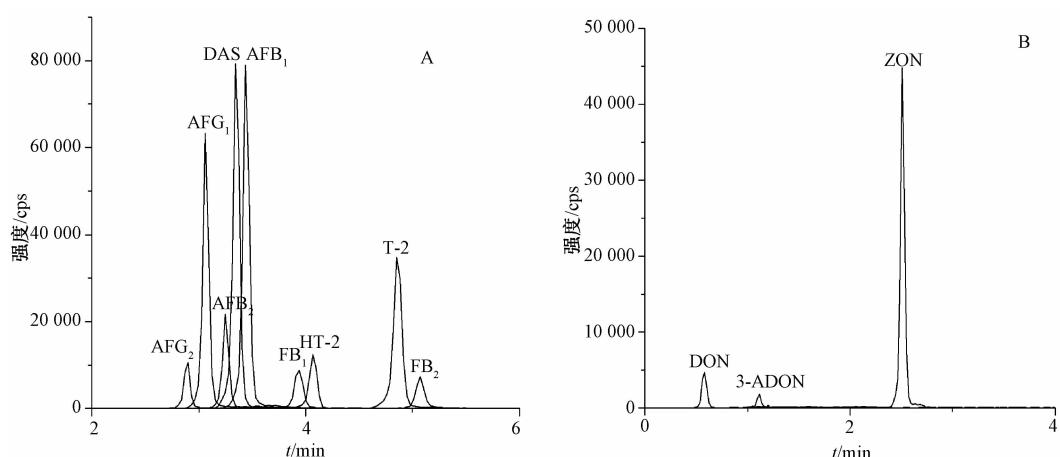
1.2.2 提取净化

精确称取2.00 g样品于50 ml塑料离心管中,加入10 ml乙腈-水-乙酸(84:15:1,V/V),在振荡器上以240次/min振摇10 min,然后置于-10℃冰箱冷却10 min,加入3 g无水硫酸镁及2 g氯化钠(产生盐析效应,降低基质中亲水性物质的溶解度和提取液中水分的含量),立即混匀,70 000 r/min离心5 min。取1 ml乙腈层于QuEChERS净化管(含有50 mg C₁₈吸附剂,50 mg弗罗里硅土及300 mg无水硫酸镁),漩涡混匀1 min,上清液经0.22 μm有机相滤膜过滤,取0.6 ml在40℃下用氮气吹干,最后用0.3 ml 20%甲醇水溶液溶解残渣,置于有内衬管的进样瓶。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:色谱柱为Synergi 4μ Fusion-RP C₁₈(50 mm×2.0 mm,4 μm),柱温40℃,进样体积10 μl,流速300 μl/min。正离子模式下,流动相:A为2 mmol/L醋酸铵-0.1%甲酸,B为甲醇,梯度洗脱程序:0~2.0 min,20%~50%;2.0~6.0 min,50%~75%;6.1 min,20%;平衡3 min;负离子模式下,流动相:A为5 mmol/L醋酸铵,B为甲醇,梯度洗脱程序:0~3.0 min,30%~95%;3.0~6.0 min,95%;6.1 min,30%;平衡3 min。

质谱条件:电喷雾离子源,多反应监测方式,离



注:A 为正离子模式;B 为负离子模式

图 1 混合标准溶液的多反应离子监测色谱图

Figure 1 MRM chromatograms of mixture standard solution

子喷射电压 (IS) -4 500 V, 离子源温度 550 °C, 源内气体 1 (Gas1) 压力 4.48×10^5 Pa, 源内气体 2 (Gas2) 压力 4.48×10^5 Pa, 气帘气体 (CUR) 压力 2.76×10^5 Pa, 碰撞气 (CAD) 压力 4.14×10^4 Pa, 扫描方式、监测离子对 (m/z) 和其他参数见表 1。

表 1 12 种真菌毒素的质谱检测参数

Table 1 Mass detection parameters for twelve mycotoxins

化合物	离子对 / (m/z)	碰撞电压/V	碰撞能量/eV	扫描模式
AFB ₁	313.1/241.1 *	70	7	ESI +
	313.1/285.0	70	25	
AFB ₂	315.1/259.1 *	70	39	ESI +
	315.1/287.2	70	29	
AFG ₁	329.0/243.0 *	70	31	ESI +
	329.0/311.0	70	25	
AFG ₂	331.1/245.1 *	70	41	ESI +
	331.1/313.0	70	27	
DAS	384.3/307.4 *	50	15	ESI +
	384.3/247.2	50	18	
HT-2	442.3/323.3 *	50	11	ESI +
	442.3/263.3	50	16	
T-2	484.3/245.2 *	50	18	ESI +
	484.3/365.2	50	13	
FB ₁	722.7/352.5 *	90	47	ESI -
	722.7/334.7	90	56	
FB ₂	706.9/336.5 *	90	49	ESI +
	706.9/354.4	90	42	
DON	355.2/59.2 *	-40	-36	ESI -
	355.2/295.2	-40	-13	
3-ADON	337.2/307.1 *	-46	-15	ESI -
	337.2/173.1	-46	-13	
ZON	317.1/175.0 *	-80	-34	ESI -
	317.1/130.9	-80	-41	

注: * 表示定量离子对

2 结果与分析

2.1 样品提取与净化

本试验依次考察了甲醇、乙腈以及不同比例的

甲醇-水混合溶液、乙腈-水混合溶液,发现当水溶液中乙腈的体积分数达到 80% ~ 85% 时, 提取效率最高, 这和已有报道^[11]基本一致。该试验还对比了提取液中加入 1% 乙酸和不加酸时各真菌毒素的回收率, 试验表明, 不加酸时, FB₁ 和 FB₂ 的回收率低于 40%, 而加入 1% 乙酸后, 两者的回收率均大于 80%, 其他 10 种真菌毒素的回收率无明显差异。因此选用乙腈-水-乙酸 (84:15:1, V/V) 作为提取溶液。QuEChERS 净化法是近年来兴起的具有快速、简单、便宜、有效、可靠和安全等特点的样品前处理技术, 初期主要应用于农残分析, 近几年正逐渐扩大到其他领域, 其中也包括真菌毒素的分析。该试验对比了经过不同吸附剂后真菌毒素的回收率, 结果表明, C₁₈、弗罗里硅土和无水硫酸镁不仅能起到良好的净化效果, 还能得到较高的回收率, 因此, 选用 C₁₈、弗罗里硅土和无水硫酸镁混合填料作为 QuEChERS 净化吸附剂。

2.2 仪器条件优化

对流动相进行优化, 比较了甲醇-水和乙腈-水两种体系, 试验发现大部分真菌毒素在甲醇-水体系中响应较高。在正离子模式下, 当加入 0.1% 甲酸可提高真菌毒素在正离子电喷雾离子源中的离子化效率, 提高灵敏度。同时, 还发现用 0.1% 甲酸-甲醇作为流动相时, FB₁ 和 FB₂ 没有出峰, 而当加入 2 mmol/L 醋酸铵时, FB₁ 和 FB₂ 就出峰。因此, 选用 2 mmol/L 醋酸铵-0.1% 甲酸水溶液和甲醇作为流动相。在负离子模式下, 选用 5 mmol/L 醋酸铵水溶液和甲醇作为流动相。由于分析物种类较多, 基质比较复杂, 因此采用梯度洗脱进行分析, 不仅能缩短出峰时间, 还能有效地去除色谱柱中残留的杂质。

2.3 标准曲线与检测限

配制12种真菌毒素系列混合标准溶液进行测定,以峰面积(y)对浓度(x , $\mu\text{g/L}$)进行线性回归,其线性关系良好,相关系数在0.999 1~0.999 9之间。根据信噪比 $S/N=3$ 计算检测限(LOD), $S/N=10$ 计算定量限(LOQ),结果见表2。

2.4 方法的回收率与精密度

取1份阴性的婴幼儿谷类辅助食品进行添加回收率和精密度试验,样品分别添加不同浓度的12种真菌毒素混合标准溶液,摇匀,静置30 min,使标准溶液被样品充分吸收,然后按本方法进行前处理和测定,每个浓度测定3次,计算其平均加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表3。

表2 12种真菌毒素的线性方程、相关系数、检测限和定量限

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficient, detection limit and quantification limit of twelve mycotoxins

分析物	线性方程	相关系数 r	LOD /($\mu\text{g/kg}$)	LOQ /($\mu\text{g/kg}$)
AFB ₁	$y = 23583x + 1023$	0.999 6	0.1	0.3
AFB ₂	$y = 22719x + 343$	0.999 5	0.3	1.0
AFG ₁	$y = 20101x - 648$	0.999 4	0.1	0.3
AFG ₂	$y = 9718x - 575$	0.999 3	0.3	1.0
DAS	$y = 24036x - 1236$	0.999 8	0.1	0.3
HT-2	$y = 3687x - 862$	0.999 4	0.3	1.0
T-2	$y = 12639x + 985$	0.999 6	0.2	0.5
FB ₁	$y = 857x - 138$	0.999 3	7.5	22.5
FB ₂	$y = 726x - 124$	0.999 2	7.5	22.5
DON	$y = 1388x + 271$	0.999 4	0.6	2.0
3-ADON	$y = 642x - 198$	0.999 1	1.5	5.0
ZON	$y = 12267x + 956$	0.999 9	0.2	0.5

表3 12种真菌毒素加标回收率与精密度($n=3$)

Table 3 Recoveries of samples and relative standard deviation of twelve mycotoxins

分析物	加标浓度/($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%	RSD/%
AFB ₁	0.3,1.0,5.0,25.0	82.6,86.2,90.5,87.9	9.4,9.1,8.2,6.3
AFB ₂	1.0,2.0,10.0,50.0	83.7,83.5,92.1,93.4	7.2,6.8,7.9,,8.1
AFG ₁	0.3,1.0,5.0,25.0	87.8,90.6,102.3,85.7	9.0,8.2,9.5,5.3
AFG ₂	1.0,2.0,10.0,50.0	81.9,82.8,86.9,86.1	8.2,6.4,9.3,7.2
DAS	0.3,1.0,5.0,25.0	90.5,96.1,92.5,92.6	8.3,5.9,7.8,8.3
HT-2	1.0,2.0,10.0,50.0	85.6,89.2,86.8,84.1	8.7,8.2,6.3,5.6
T-2	0.5,1.0,5.0,25.0	84.8,86.5,106.4,88.6	6.3,6.8,8.7,5.2
FB ₁	22.5,50.0,100.0,500.0	82.4,87.3,84.6,93.4	7.5,8.2,7.2,5.7
FB ₂	22.5,50.0,100.0,500.0	83.9,85.4,82.9,81.8	6.8,7.2,8.4,9.5
DON	2.0,5.0,10.0,50.0	82.8,84.5,91.2,80.5	8.1,7.5,8.8,9.3
3-ADON	5.0,10.0,25.0,125.0	85.7,86.1,93.1,84.8	6.3,6.5,6.9,8.5
ZON	0.5,1.0,5.0,25.0	81.5,80.6,92.6,81.2	7.2,5.8,8.9,7.6

2.5 实际样品的检测

用本方法对2015年泉州市食品风险监测项目抽检的25份婴幼儿谷类辅助食品进行12种真菌毒素残留量的检测。结果表明,10份样品中检出不同浓度水平的脱氧雪腐镰刀菌稀醇,含量在12.1~179.0 $\mu\text{g/kg}$ 之间,均未超过国家标准规定的限量要求^[12];3份样品中检出玉米赤霉烯酮,含量在0.3~1.8 $\mu\text{g/kg}$ 之间,均未超过国家标准规定的限量要求;除此以外的其余毒素均未检出。

3 小结

本试验采用乙腈-水-乙酸溶液提取,QuEChERS方法进行净化,超高效液相色谱-串联质谱法测定了婴幼儿谷类辅助食品中真菌毒素的含量。该方法具有灵敏度高、净化效果好、快速简便和实用性强等优点,适合于婴幼儿谷类辅助食品中真菌毒素多残留成分的快速检测。

参考文献

[1] 徐飞,刘峰,张亚军,等.液相色谱-串联质谱法测定粮食中的

玉米赤霉烯酮[J].中国食品卫生杂志,2015,27(2):124-126.

[2] 梁迪思,李建生.酶联免疫法(ELISA)测定婴幼儿配方奶粉中的黄曲霉毒素M₁方法改进[J].现代食品科技,2010,26(12):1421-1423.

[3] 周晓,谢体三,刘运龙.ELISA技术在食品真菌毒素检测中的应用[J].粮食与食品工业,2007,14(5):49-52.

[4] 中华人民共和国卫生部.GB 5009.24—2010食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素M₁和B₁的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.

[5] 胡娜,徐玲.真菌毒素检测方法研究进展[J].食品科学,2007,28(8):563-565.

[6] 谢刚,王松雪,张艳.粮食中呕吐毒素含量的免疫亲和柱净化超高效液相色谱法快速测定[J].分析测试学报,2011,30(12):1362-1366.

[7] 刘柱,陈万勤,沈潇冰,等.多功能柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测玉米和花生中9种真菌毒素[J].分析科学学报,2014,30(2):168-172.

[8] 曹娅,孙利,王明林,等.粮谷中8种痕量真菌毒素的定量分析方法[J].分析测试学报,2013,32(2):150-155.

[9] 王炼,王希希,张新申.同位素稀释-液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中6种玉米赤霉醇类化合物[J].中国食品卫生杂志,2015,27(5):530-534.

[10] 梁颖,刘邻渭,张春晖.液质联用同时检测小麦中三种镰刀菌

- 毒素[J].中国粮油学报,2006,21(6):160-162.
- [11] REN Y P, ZHANG Y, SHAO S L, 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.

- [12] 中华人民共和国卫生部. GB 2761—2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

实验技术与方法

全自动固相萃取-气相色谱-三重四级杆质谱法检测 蔬菜中23种农药残留

刘苗,甘平胜,朱惠扬,李晓晶,杨荣,彭荣飞

(广州市疾病预防控制中心,广东广州 510440)

摘要:目的 建立蔬菜中有机磷类、拟除虫菊酯类共23种农药残留的分析方法。方法 样品加丙酮-二氯甲烷(1:1,V/V)混合溶剂提取后经全自动固相萃取仪净化,采用气相色谱-三重四级杆串联质谱的多反应监测模式进行检测,内标法定量。结果 23种农药在0.05~0.80 mg/L范围内线性良好,相关系数均大于0.993 3;加标回收率在75.0%~105.5%之间;方法的检出限为0.02~0.70 mg/kg。在少量蔬菜样品中发现氯氟菊酯和氯氟氰菊酯超标。结论 该方法适用于蔬菜中多种农药残留的快速筛查测定。

关键词:全自动固相萃取;气相色谱-三重四级杆串联质谱;农药残留;蔬菜;食品污染物;食品安全

中图分类号:R155.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-8456(2016)04-0471-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.04.013

Determination of 23 pesticide residues in vegetables by automatic solid phase extraction and gas chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry

LIU Miao, GAN Ping-sheng, ZHU Hui-yang, LI Xiao-jing, YANG Rong, PENG Rong-fei

(Guangzhou Center for Disease Prevention and Control, Guangdong Guangzhou 510440, China)

Abstract: Objective A method was developed for the determination of 23 pesticides residues in vegetables, including organophosphorus and pyrethroid pesticides. **Methods** The pesticides in samples were extracted with acetone/dichloromethane (1:1, V/V) and cleaned up by automatic solid-phase extraction. The collected solution was analyzed by triple quadrupole gas chromatography-tandem mass spectrometry using multiple reaction monitoring (MRM) with internal standard. **Results** It showed good linearity with the correlation coefficients above 0.993 3 in the range of 0.05-0.80 mg/L, the recoveries were in the range of 75.0%-105.5%, and the limits of detection (LOD) were 0.02-0.70 mg/kg. The residues of cypermethrin and cyhalothrin exceeded the standard in a few vegetable samples. **Conclusion** The method could be applied to the routine analysis for various pesticides in vegetable samples.

Key words: Automatic solid-phase extraction; gas chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry; pesticide residues; vegetable; food contaminant; food safety

农药残留污染等食品安全问题已严重危害到人们的身体健康,一些研究结果表明,菊酯类及有机磷农药等可引发癌症、免疫系统、神经系统疾病和激素功能破坏等健康问题^[1]。蔬菜是与人类生活息息相关的食物之一,因此蔬菜的食用安全成为检测人员的重要关注目标。传统的农药残留主要

采用振荡、超声、加速溶剂萃取等^[2-3]手段进行样品提取,再通过固相萃取、固相微萃取^[4]、基质分散固相萃取^[5]等技术进行样品净化,再借助气相色谱^[6]、气相色谱-质谱^[7-8]、液相色谱-串联质谱^[9]等仪器进行检测。气相色谱定性能力较差,液相色谱-串联质谱设备昂贵,普及程度不高,而气相色谱-串联质谱(GC-MS/MS)具有成本相对低和定性、定量能力强的特点。目前农药残留检测存在前处理操作繁琐等缺点,需使用大量的有机溶剂,操作人员