

## 实验技术与方法

## 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

汪薇<sup>1,2,3</sup>,余婷婷<sup>1,2,3</sup>,张莉<sup>1,2,3</sup>,范志勇<sup>1,2,3</sup>,江丰<sup>1,2,3</sup>,王会霞<sup>1,2,3</sup>

(1. 湖北省食品质量与安全监督检验研究院,湖北武汉 430075;2. 国家市场监督管理总局重点实验室 动物源性食品中重点化学危害物检测技术,湖北武汉 430075;3. 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心,湖北武汉 430075)

**摘要:**目的 本文针对混合坚果和干制水果类休闲食品,建立同时测定该类食品中60种真菌毒素的方法。方法 选择富含油脂和糖分的花生和葡萄干两种典型食品基质,样品经QuEChERS(900 mg MgSO<sub>4</sub>、150 mg PSA、150 mg C<sub>18</sub>)净化,采用超高效液相色谱-串联静电场轨道阱高分辨质谱的一级全扫描结合二级数据依赖扫描模式进行分析。以保留时间和母离子精确质量数定性,母离子色谱峰面积定量,同时以二级特征碎片离子进行确证。结果 提取溶液pH值会显著影响真菌毒素的解离状态,进而影响其提取回收率。通过QuEChERS净化能有效除去样品中糖类和脂类等组分的干扰,提高定性定量的准确性。采用空白基质匹配标准曲线进行校正可以减小基质效应以达到定量分析要求,真菌毒素在各自的质量浓度范围内线性关系良好(决定系数 $R^2>0.95$ ),回收率60%~120%,相对标准偏差小于20%,另外有7种真菌毒素线性决定系数小于0.95,进行定性分析。结论 该方法灵敏度高,结果准确、可靠,适用于坚果和干制水果60种真菌毒素的定性定量分析。

**关键词:**真菌毒素;坚果;干制水果;超高效液相色谱-串联静电场轨道阱高分辨质谱;QuEChERS

**中图分类号:**R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2022)04-0707-08

**DOI:**10.13590/j.cjfh.2022.04.012

### Sixty mycotoxins in nuts and dried fruits simultaneously detected by QuEChERS combined with UPLC-Orbitrap/MS

WANG Wei<sup>1,2,3</sup>, YU Tingting<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Li<sup>1,2,3</sup>, FAN Zhiyong<sup>1,2,3</sup>, JIANG Feng<sup>1,2,3</sup>, WANG Huixia<sup>1,2,3</sup>

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Hubei Wuhan 430075, China;

2. Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Hubei Wuhan 430075, China; 3. Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Hubei Wuhan 430075, China)

**Abstract: Objective** A qualitative and quantitative method was established for the simultaneous detection of 60 mycotoxins in nuts and dried fruits. **Methods** Peanuts and raisins, two typical food substrates rich in fat and sugar, were pre-processed by QuEChERS technique (900 mg MgSO<sub>4</sub>, 150 mg PSA, 150 mg C<sub>18</sub>), and analyzed by ultra-high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (UPLC-Orbitrap/MS) with full scan and data-dependent scanning (dd-MS<sup>2</sup>) mode. It was qualitatively determined by the retention time and accurate mass of mycotoxins, the chromatographic peak area was quantified, and the fragment ion information was used for confirmation. **Results** The results showed that the pH value of the extraction solution significantly affected the dissociation state of mycotoxins, which in turn affected the recovery rate. The interference of components such as carbohydrates and lipids in the sample was effectively removed by QuEChERS purification, and the accuracy of qualitative and quantitative analysis was improved. A blank matrix-matched standard curve was used for calibration to reduce the matrix effect and meet the quantitative analysis requirements. The mycotoxins had a good linear relationship within their respective mass concentration ranges (correlation coefficient  $R^2>0.95$ ), and the recoveries were 60%-120% with relative standard

收稿日期:2021-12-30

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1602302)

作者简介:汪薇 女 高级工程师 研究方向为食品中危害物分析 E-mail: wangwei\_hbqt@163.com

通信作者:余婷婷 女 高级工程师 研究方向为食品中危害物分析 E-mail: 271377735@qq.com

deviation less than 20%. The other seven mycotoxins with  $R^2$  less than 0.95 can be qualitatively analyzed. **Conclusion** Compared with the detection method based on triple quadrupole mass spectrometry, the high-resolution mass spectrometry method is easier to quantify, and there is no need to optimize the parent ion, product ion and collision energy for the target one by one, which can effectively reduce the difficulty and time consuming for multi-target analysis. The method has high sensitivity, accuracy and reliable results, and is suitable for the qualitative and quantitative analysis of 60 mycotoxins in nuts and dried fruits.

**Key words:** Mycotoxins; nuts; dried fruits; UPLC-Orbitrap/MS; QuEChERS

真菌毒素是一类由产毒丝状真菌产生的有毒次生代谢产物,具有致癌、致畸和致突变及细胞毒性等危害,对人类健康造成极大威胁<sup>[1-2]</sup>。2019年,欧盟食品和饲料快速预警系统(Rapid alert system for food and feed, RASFF)对华食品通报的产品类型中,坚果类制品和种子、水果的被通报次数排前三位<sup>[3]</sup>。近年来,由核桃仁、花生仁、葡萄干等坚果仁和干制水果混合搭配而成的休闲食品被广受消费者青睐。由于干制水果的含水量相对较高,与坚果混装会加快坚果受潮霉变的速度<sup>[4]</sup>。混合坚果和干制水果富含油脂和糖分,涉及的真菌毒素种类繁多且协同共生<sup>[5-6]</sup>,给定性定量分析带来极大挑战。

真菌毒素的检测方法有免疫法、色谱法、质谱法及色谱/质谱联用等,多针对单个或单类真菌毒素进行检测<sup>[2,7-8]</sup>。基于三重四极杆质谱的多反应监测模式(Multiple reactions monitoring, MRM)作为定量的“金标准”仍是使用最广泛的方法, QIU等<sup>[9-10]</sup>采用超高液相色谱串联质谱(Ultra-high performance liquid chromatography-MS/MS, UHPLC-MS/MS)实现了43种真菌毒素同时定量分析,需要逐一对化合物的仪器参数进行优化。静电场轨道阱质谱(Orbitrap/MS)是高分辨质谱,串联四级杆质谱,既可以采集母离子精确分子量,也可采集全谱碎片信息,可有效减少样品基质和共流出物的干扰<sup>[11-12]</sup>,且扫描速度能够满足多种真菌毒素的同时定性筛选和定量测定。与传统的检测方法相比,在检测的通量和准确度方面具有很大的优势<sup>[12-14]</sup>。食品基质复杂,真菌毒素一般含量较低,且物化性质差异较大, QuEChERS技术是高通量检测方法首选的前处理技术之一<sup>[8,15-16]</sup>。本研究利用 QuEChERS前处理技术,结合 UPLC-Orbitrap/MS法同时检测坚果和干制水果中易受污染、国内外关注度高且毒性强的黄曲霉毒素类、赭曲霉毒素类、伏马毒素类、单端孢霉烯类、青霉素类等60种真菌毒素,针对混合坚果和干制水果这类高糖、高脂的食品基质,改进 QuEChERS前处理方法,建立真菌毒素高通量检测方法,有助于提高食品中多真菌毒素的检测效率,保障食品安全。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与材料

四极杆-静电场轨道阱-线性离子阱三合一组合式高分辨质谱仪、UltiMate 3 000超高效液相色谱仪、Xcalibur和TraceFinder软件(美国赛默飞世尔科技公司)。

黄曲霉毒素 $B_1$ 等60种真菌毒素标准品均购于美国Romer Labs公司,纯度 $\geq 98\%$ ,基本信息详见表1。甲醇、乙腈、甲酸(均为HPLC级),德国Merck公司。硫酸镁、氯化钠等(均为分析纯),国药集团化学试剂有限公司,乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(Primary secondary amine, PSA)、十八烷基键合硅胶吸附剂( $C_{18}$ )、石墨化炭黑(Graphitized carbon black, GCB),美国Supelco公司。市售每日坚果及混合水果坚果燕麦片等12批次样品来购于湖北省武汉市超市。

### 1.2 样品前处理

以花生仁、葡萄干为典型的食品基质进行方法研究,称取2g样品,准确加20mL乙腈水溶液(84:16, V/V),振荡提取20min,加入4g硫酸镁、1g氯化钠、1g柠檬酸钠、0.5g柠檬酸氢二钠,涡旋1min,离心,上清液待净化。取上清液13mL,加入900mg硫酸镁、150mg PSA和150mg  $C_{18}$ ,涡旋1min,离心,准确移取10mL上清液氮吹至近干,1mL 50%甲醇水溶液复溶,经微孔滤膜过滤,上机测定。

### 1.3 液相色谱-质谱条件

#### 1.3.1 色谱条件

ACQUITY UPLC HSS  $T_3$ 柱(2.1mm $\times$ 100mm, 1.8 $\mu$ m);柱温:35 $^{\circ}$ C。进样量:5 $\mu$ L。流动相:A:0.1%甲酸水溶液(含5mmol/L乙酸铵),B:甲醇,流速:0.3mL/min。梯度洗脱条件:0~2min, 5%B; 2~12min, 5%~95%B; 12~17min, 95%B; 17~17.1min, 95%~5%B; 17.1~20min, 5%B。

#### 1.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI源)。质谱扫描方式:正离子模式。采集模式:全扫描/数据依赖二级扫描(FullMS/ddMS<sup>2</sup>)。喷雾电压:3000V;鞘气:40Arb;辅助气:10Arb;离子传输管温度:325 $^{\circ}$ C;雾化器温度:350 $^{\circ}$ C。一级扫描分辨率70000,扫描范围 $m/z$

50~900,RF Lens 60%,自动增益控制目标离子数为 $5 \times 10^5$ 。二级扫描分辨率30 000,起始质量数 $m/z$  50,高能碰撞诱导裂解(Higher energy collision induced dissociation,HCD)能量为 $40\% \pm 15\%$ 。

### 1.4 统计学分析

试验重复3次,通过Xcalibur采集质谱数据,Tracefinder软件进行真菌毒素的定性和定量分析。应用SAS 9.0软件和GraphPad Prism 5对实验数据

进行统计分析和绘图。

## 2 结果

### 2.1 质谱条件的优化

本研究采用高分辨质谱全扫描/数据依赖二级扫描(FullIMS/ddMS<sup>2</sup>)采集方式,得到各真菌毒素的保留时间、母离子精确质量数和特征子离子精确质量数,见表1。

表1 化合物中文名称、CAS号、保留时间、相关的质谱信息及方法学数据

Table 1 Name, CAS number, retention time, mass spectral parameters and methodological data of compounds

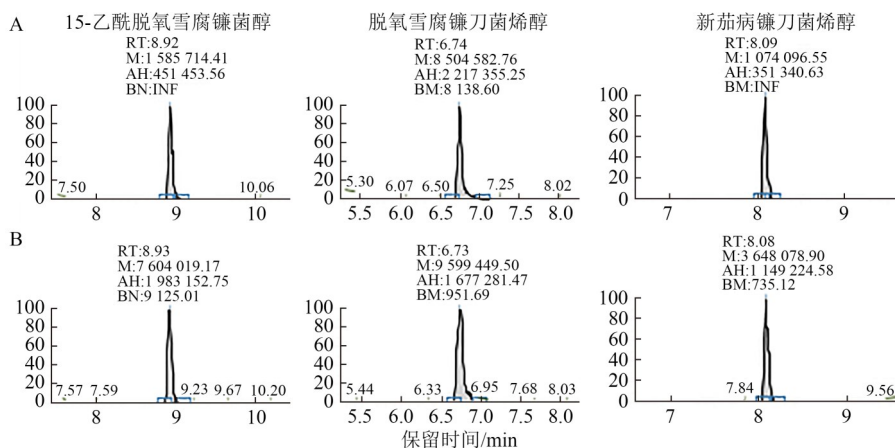
中文名称	CAS号	母离子理论质量数/Da	保留时间/min	离子加合	母离子精确质量数/Da	子离子精确质量数/Da			$R^2$	检出限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
						子离子1	子离子2	子离子3			
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	1162-65-8	313.070 66	10.33	[M+H] <sup>+</sup>	313.070 37	285.074 46	241.048 66	269.043 43	0.998 2	0.135	0.270
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	7220-81-7	315.086 31	10.11	[M+H] <sup>+</sup>	315.085 94	287.090 18	259.059 02	297.074 40	0.945 8	0.3	0.6
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	1165-39-5	329.065 58	9.76	[M+H] <sup>+</sup>	329.065 31	243.064 24	283.058 81	311.053 74	0.996 4	0.075	0.150
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	7241-98-7	331.081 23	9.46	[M+H] <sup>+</sup>	331.080 20	285.074 83	245.080 05	217.085 34	0.997 2	0.083	0.165
黄曲霉毒素 M <sub>1</sub>	6795-23-9	329.065 58	9.54	[M+H] <sup>+</sup>	329.065 67	273.075 38	259.059 54	229.049 24	0.982 3	0.1	0.2
赭曲霉毒素 A	303-47-9	404.089 54	12.28	[M+H] <sup>+</sup>	404.089 26	239.009 92	257.070 36	341.056 30	0.999	2.5	5.0
赭曲霉毒素 B	4825-86-9	370.128 51	11.56	[M+H] <sup>+</sup>	370.128 00	205.049 01	223.059 52	187.038 54	0.999 8	2.5	5.0
赭曲霉毒素 C	4865-85-4	432.120 84	13.16	[M+H] <sup>+</sup>	432.120 64	257.020 23	239.009 75	358.082 64	0.997 9	1.25	2.50
赭曲霉毒素 $\alpha$	16281-39-3	257.021 13	10.15	[M+H] <sup>+</sup>	257.021 00	239.009 66	193.004 43	137.014 82	0.999 4	2.5	5.0
胶霉毒素	67-99-2	327.046 77	10.33	[M+H] <sup>+</sup>	327.046 30	245.090 84	111.054 89	227.080 02	0.999 1	2.5	5.0
柄曲霉毒素	10048-13-2	325.070 66	12.54	[M+H] <sup>+</sup>	325.070 40	310.046 11	281.043 52	297.074 77	0.998 7	5	10
伏马菌素 B <sub>1</sub>	116355-83-0	722.395 75	11.02	[M+H] <sup>+</sup>	722.395 57	334.310 67	352.321 17	159.028 44	定性分析	25	—
伏马菌素 B <sub>2</sub>	116355-84-1	706.400 83	11.83	[M+H] <sup>+</sup>	706.400 70	336.326 45	318.315 77	354.337 52	定性分析	5	—
伏马菌素 B <sub>3</sub>	116355-84-1	706.400 83	11.44	[M+H] <sup>+</sup>	706.400 12	336.325 96	318.315 37	354.336 46	定性分析	25	—
烟曲霉毒素	23110-15-8	459.237 72	12.99	[M+H] <sup>+</sup>	459.237 12	131.048 80	177.054 08	413.233 35	0.997	5	10
HT-2毒素	26934-87-2	425.216 99	13.83	[M+H] <sup>+</sup>	425.217 04	365.192 08	281.134 70	89.059 49	定性分析	25	—
T-2四醇	34114-99-3	316.175 46	5.47	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	316.175 29	187.111 65	147.079 97	105.069 57	定性分析	25	—
T-2毒素	21259-20-1	484.254 11	11.74	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	484.254 06	185.095 54	215.105 93	169.100 65	0.998 5	1.5	3.0
T-2三醇	34114-98-2	383.206 43	13.44	[M+H] <sup>+</sup>	383.206 33	327.140 26	267.119 38	281.134 92	定性分析	25	—
新茄病镰刀菌烯醇	36519-25-2	383.170 65/ 400.196 6	8.06	[M+H] <sup>+</sup> / [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	383.170 14/ 400.196 59	121.064 70	197.095 54	245.116 85	0.9927	5	10
二乙酰镰草镰刀菌烯醇(蛇形菌素)	2270-40-8	384.206 18/ 367.175 13	10.33	[M+H] <sup>+</sup> / [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	384.206 18/ 367.175 11	105.069 64	199.111 21	229.121 58	0.999	2.5	5.0
15-乙酰蛇形菌素	2623-22-5	325.164 33/ 342.191 11	9.55	[M+H] <sup>+</sup> / [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	325.164 28/ 342.190 64	173.332 00	163.023 20	324.123 50	0.997 2	2.5	5.0
15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	88337-96-6	339.143 83/ 361.125 77	8.89	[M+H] <sup>+</sup>	339.142 46/ 361.125 77	59.013 39	96.959 21	199.849 91	0.998 8	2.25	4.50
3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇	50722-38-8	339.129 28	7.18	[M+H] <sup>+</sup>	339.129 18	173.060 09	217.086 30	107.049 58	0.998 8	2.25	4.50
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	51481-10-8	295.118 71/ 297.133 26	6.73	[M+H] <sup>+</sup>	297.132 81	125.059 39	175.074 95	203.106 09	0.997 7	2.5	5.0
雪腐镰刀菌烯醇	23282-20-4	357.119 11	5.10	[M+H] <sup>+</sup>	357.119 02	281.102 14	191.070 53	203.070 82	定性分析	25	—
去环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇	88054-24-4	281.138 35	6.73	[M+H] <sup>+</sup>	281.137 94	159.079 94	187.111 13	105.069 56	0.994 7	10	20

续表

中文名称	CAS号	母离子理论 质量数/Da	保留时 间/min	离子加合	母离子精确 质量数/Da	子离子精确质量数/Da			$R^2$	检出限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	定量限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
						子离子 1	子离子 2	子离子 3			
脱氧雪腐镰刀											
菌烯醇-3- 葡萄糖苷	131180-21-7	476.213 73	5.37	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	476.212 59	297.132 23	249.111 21	231.100 30	0.9717	10	20
疣孢菌醇类	2198-92-7	284.185 63	8.40	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	284.185 45	81.069 85	159.116 18	173.335 14	0.997	5	10
玉米赤霉酮	5975-78-0	321.170 75	10.32	$[\text{M}+\text{H}]^+$	321.169 49	303.158 29	69.069 86	123.043 88	0.992 6	5	10
玉米赤霉烯酮	17924-92-4	319.155 09	10.38	$[\text{M}+\text{H}]^+$	319.153 84	187.074 87	203.069 75	283.132 02	0.996 7	2.25	4.50
$\alpha$ -玉米 赤霉烯醇	36455-72-8	321.169 65	12.10	$[\text{M}+\text{H}]^+$	321.169 62	81.069 91	95.085 53	161.059 60	0.999 1	2.5	5.0
$\beta$ -玉米 赤霉烯醇	71030-11-0	321.169 65	11.59	$[\text{M}+\text{H}]^+$	321.169 43	81.069 79	173.331 76	193.049 04	0.999 1	2.5	5.0
恩镰孢菌素 B	917-13-5	657.443 31	14.18	$[\text{M}+\text{H}]^+/[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	640.417 66/ 657.443 30	86.096 39	196.132 84	214.143 37	0.993 5	5	10
恩镰孢菌素 B <sub>1</sub>	19914-20-6	671.458 96	14.40	$[\text{M}+\text{H}]^+/[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	671.458 92/ 654.432 56	86.096 67	196.133 61	210.149 20	0.983 7	5	10
交链孢稀	29752-43-0	293.101 96	10.11	$[\text{M}+\text{H}]^+$	293.101 84	257.080 08	229.085 30	201.090 58	0.999 4	2.5	5.0
链格孢酚	641-38-3	259.060 10	11.39	$[\text{M}+\text{H}]^+$	259.060 03	185.059 22	213.054 02	241.048 83	0.978 4	2.5	5.0
链格孢酚甲醚	23452-05-3	273.075 75	12.63	$[\text{M}+\text{H}]^+$	273.075 69	167.048 83	184.051 83	199.075 22	0.997	5	10
赈毒素	28540-82-1	415.233 98	11.39	$[\text{M}+\text{H}]^+$	415.233 92	312.169 80	132.080 58	256.180 15	0.998 9	1.25	2.50
细交链格孢菌 酮酸	75652-74-3	198.112 47	10.46	$[\text{M}+\text{H}]^+$	198.112 49	83.012 72	97.028 32	115.038 86	0.991 6	2.5	5.0
桔霉素	518-75-2	251.091 4	10.99	$[\text{M}+\text{H}]^+$	251.091 49	233.080 09	205.085 40	191.069 64	0.998 3	2.5	5.0
青霉素酸	90-65-3	171.065 19	7.78	$[\text{M}+\text{H}]^+$	171.065 20	125.059 37	114.971 18	110.035 99	0.998 2	2.5	5.0
青霉菌生物碱	71751-77-4	434.182 28	9.95	$[\text{M}+\text{H}]^+$	434.182 40	261.076 42	289.071 17	334.0925 0	0.993 4	5	10
黄绿青霉素	25425-12-1	403.211 52	12.33	$[\text{M}+\text{H}]^+$	403.211 46	139.038 59	83.049 02	297.146 94	0.997 6	2.5	5.0
霉酚酸	24280-93-1	321.133 26	10.60	$[\text{M}+\text{H}]^+$	321.133 21	207.064 82	177.054 37	159.048 20	0.998 4	2.5	5.0
异烟曲霉素 C	58735-64-1	390.192 45	10.64	$[\text{M}+\text{H}]^+$	390.192 60	193.071 72	322.129 21	165.076 86	0.990 2	10	20
田麦角碱	548-42-5	239.154 28	8.21	$[\text{M}+\text{H}]^+$	239.154 16	154.065 11	168.080 86	183.09138	0.997 3	2.5	5.0
双氢麦角克碱 (双氢麦角汀)	17479-19-5	612.318 05	10.38	$[\text{M}+\text{H}]^+$	612.318 66	270.160 37	253.133 97	210.091 80	0.992 9	5	10
麦角柯宁碱 (麦角考宁)	564-36-3	562.302 4	9.89	$[\text{M}+\text{H}]^+$	562.302 67	268.143 46	223.122 28	208.075 04	0.988 8	5	10
麦角异柯宁碱	564-37-4	562.302 40	10.36	$[\text{M}+\text{H}]^+$	562.302 61	223.123 21	227.154 57	305.128 63	0.994 5	2.5	5.0
麦角克碱	511-08-0	610.302 4	10.36	$[\text{M}+\text{H}]^+$	610.302 73	208.076 51	223.123 67	268.144 96	0.995	2.5	5.0
麦角异克碱	511-07-9	610.302 4	10.76	$[\text{M}+\text{H}]^+$	610.302 25	223.123 17	192.080 99	243.112 95	0.965 9	2.5	5.0
麦角克普汀 (麦角卡里碱)	511-09-1	576.318 05	10.31	$[\text{M}+\text{H}]^+$	576.318 18	233.122 48	268.143 71	208.075 24	0.99	5	10
异麦角克普汀 (麦角异卡里碱)	511-10-4	576.318 05	10.65	$[\text{M}+\text{H}]^+$	576.318 24	233.123 11	208.075 96	291.170 35	0.969 5	2.5	5.0
麦角生碱 (麦角辛)	561-94-4	548.286 75	9.84	$[\text{M}+\text{H}]^+$	548.286 74	223.122 99	208.075 70	268.144 35	0.988 7	5	10
麦角异生碱	596-88-3	548.286 75	9.37	$[\text{M}+\text{H}]^+$	548.286 93	223.123 15	208.075 90	249.102 43	0.995 3	5	10
麦角胺	113-15-5	582.271 10	9.90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	582.271 08	223.122 60	208.075 39	268.143 83	0.997 3	5	10
蕈青霉素	57186-25-1	436.242 58	13.45	$[\text{M}+\text{H}]^+$	436.247 74	130.064 77	182.095 90	421.218 84	0.997 2	2.5	5.0
震颤真菌毒素	12771-72-1	512.239 13	12.79	$[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$	494.226 9	352.128 7	255.081 0	227.081 7	0.970 3	10	20
湿曼青霉素	19545-26-7	429.154 94	10.46	$[\text{M}+\text{H}]^+$	429.154 60	295.096 37	283.096 41	313.106 96	0.992 2	5	10

如表 1 所示,各真菌毒素的母离子实测精确质量数与理论精确质量数相对偏差均小于 5 ppm。采用全扫描模式对目标物的不同加合离子进行考察,选择响应最高的加合离子作为定量离子。实验中观察到 HT-2 等目标毒素的 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 峰信号较强,但考虑到加钠离子不易碎裂,难以进行二级定性分析,因此选择 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 峰和 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰进行比较。在正离子扫描模式下,镰刀菌毒素系列如 T-2、恩镰孢菌素 B 等目标毒素的 $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 峰的信号更强,而

其他毒素均为加氢峰信号更强,选择质谱信号响应最佳且能形成稳定碎片的加合离子作为定量离子进行分析。大部分毒素在正离子模式下响应值高于负离子模式,正负离子同时扫描会降低方法的灵敏度,综合考虑选择正离子模式扫描,母离子精确质量数、保留时间、二级特征碎片等相关参数进行匹配定性,母离子峰面积定量,提高定性定量结果的可信度。



注:A:0.1%甲酸水和甲醇;B:0.1%甲酸水(含5 mmol/L乙酸铵)和甲醇

图1 真菌毒素在不同流动相体系下的提取离子流图

Figure 1 Ion chromatograms of mixed standard solution of mycotoxins at different mobile phases

### 2.2 流动相的优化

比较不同流动相体系下,各真菌毒素的质谱信号响应和峰型。结果显示,在正离子模式下,流动相中加入0.1%甲酸能促进多种真菌毒素的离子化效率,具有较好的离子响应,大部分真菌毒素有较好的响应,峰型对称,无拖尾,但镰刀菌系列毒素出现峰分叉、拖尾等。加入5 mmol/L乙酸铵后,镰刀菌毒素峰型改善,减少次级保留,且乙酸铵的加入可以有效抑制[M+Na]<sup>+</sup>峰,提高分析灵敏度<sup>[17]</sup>,因此选择0.1%甲酸水溶液(含5 mmol/L乙酸铵)和甲醇作为流动相,梯度洗脱,得到60种真菌毒素相应的提取离子色谱图见图2,各目标化合物在5~18 min出峰,色谱峰出峰时间段分布均匀,峰型较好。

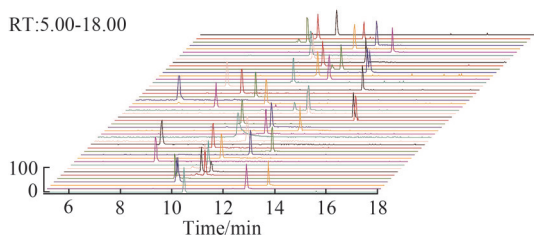
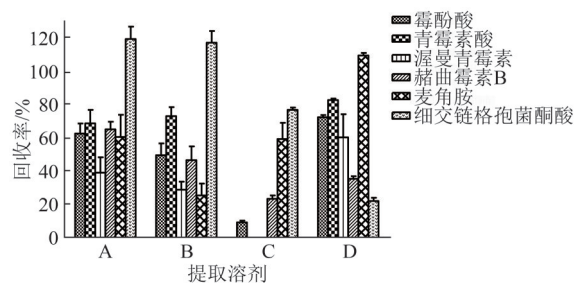


图2 60种真菌毒素提取离子色谱图

Figure 2 Ion chromatograms of mixed standard solution of 60 mycotoxin

不同真菌毒素理化性质差异大,需要对提取溶剂进行优化,考察不同溶剂提取对各真菌毒素回收率的影响,结果见图3。提取溶液pH值会显著影响真菌毒素的解离状态,进而影响其回收率。物质的解离度跟该物质的pKa和环境pH值有关<sup>[18]</sup>,对于含羧基毒素,如霉酚酸等真菌毒素,结构上含有一个羧基,当提取溶剂加入1%甲酸能使样品保持较低pH值,进而抑制待测物的离子化使其更易溶于有机相,以达到增高提取效率和保持稳定回收率



注:A:乙腈-水(84+16);B:乙腈-水-甲酸(84+15+1);

C:5%氨水乙腈;D:乙腈

图3 真菌毒素在不同提取溶剂的回收率

Figure 3 Recovery rate of mycotoxins in different extraction solvents

的目的。而用5%氨水乙腈提取时,霉酚酸呈离子状态,根据相似相容原理,当盐析使乙腈和水分层时,霉酚酸会进入水层,导致回收率低;对于含氨基的毒素如麦角胺,在碱性环境下有利于提高这类毒素的回收率。对于极性较大的毒素,如细交链格孢菌酮酸,纯乙腈提取回收率仅22%,乙腈-水提取能大大增加其回收率,说明对于极性较大的毒素,提取溶剂需要含水相以增加提取溶剂的极性,且水使得食品基质溶胀,有利于毒素的溶出。考虑多毒素通量性的问题,选择乙腈-水(84+16)作提取溶剂。

### 2.3 净化方式的优化

选取花生仁、葡萄干作为典型食品基质,花生仁油脂含量较高,葡萄干含有较高糖分,提取时食品基质中的糖、油脂等组分会不可避免的与真菌毒素共萃取出来,干扰质谱信号,选择合适的样本净化方式必不可少<sup>[19]</sup>。首先考察不同净化剂对真菌毒素吸附的影响,结果表明净化剂在吸附基质中杂质的同时也会不同程度地吸附目标毒素。PSA、C<sub>18</sub>对各真菌毒素的吸附较少,而GCB对毒素的吸附较强,加入GCB后大部分毒素回收率都显著下降,麦角生碱、麦角柯宁碱、链格孢酚甲醚、玉米赤霉酮回

收率为0,赭曲霉毒素等的回收率低于10%。GCB虽有助于除去较多的色素,但对平面分子结构的真菌毒素有较强的吸附作用<sup>[19]</sup>,从而影响这类真菌毒素的回收效果。综合样品的净化效果及各目标化合物的回收率,对净化剂的用量进行优化,最终确定加入900 mg硫酸镁、150 mg PSA和150 mg C<sub>18</sub>对坚果和干制水果基质进行净化。通过对样品提取液净化前后的真菌毒素回收率数据进行统计比较如图4,回收率在80%~120%的化合物个数显著增加,如霉酚酸、链格孢酚、交链孢霉烯、玉米赤霉酮、黄绿青霉素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇等,以脱氧雪腐镰刀菌烯醇为例,未净化时在花生和葡萄干基质中回收率分别为29.9%和28.7%,净化后回收率分别提高了30%和50%,说明净化是必要且有效的。

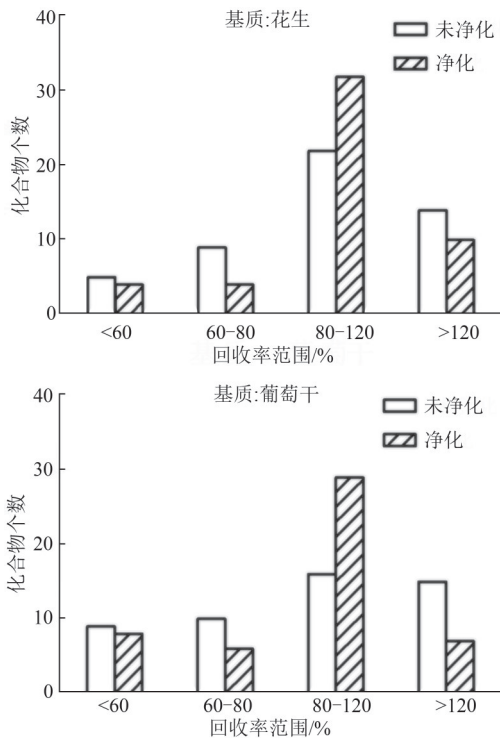


图4 净化对典型基质中真菌毒素回收率的影响  
Figure 4 Effects of purification on mycotoxin recovery in typical substrates

#### 2.4 基质效应

本研究采用标准曲线法考察基质效应,将样品的基质匹配标准曲线斜率与相应的标准曲线斜率进行比较<sup>[16]</sup>。试验结果表明,大部分真菌毒素为基质抑制效应,少数真菌毒素如伏马菌素类呈现基质增强效应。伏马菌素类基质增强效应的原因可能是与真菌毒素共流出物中含有质子供体化合物,使得该类毒素均为基质增强效应<sup>[20]</sup>。采用空白基质匹配标准曲线进行定量,可以减小基质效应以达到检测分析要求,如链格孢酚,试剂标曲加标回收率只有15%~30%,通过基质标曲校正后回收率可达

到70%以上。

#### 2.5 方法学考察

根据GB/T 27417—2017<sup>[21]</sup>,本研究采用空白基质液逐级稀释方法获得真菌毒素的检出限(Limit of detection, LOD, S/N≥3)和定量限(Limit of quantitation, LOQ, S/N≥10)。如表1所示,真菌毒素在各自线性浓度范围内线性良好,决定系数( $R^2$ )>0.95,其检出限、定量限低于欧盟和我国真菌毒素限量中规定的指标<sup>[22]</sup>,满足检测的要求。另外有7种真菌毒素线性 $R^2$ <0.95,进行定性分析(表1)。对于定性检测的7种化合物,通过在空白样品中添加不同浓度水平的标准溶液,每个水平分别随机检测10次,记录检出结果的阳性率和阴性率,确定阳性检测结果具备100%可靠性时的临界值作为检出限。

取阴性花生、葡萄干样品,分别添加3个浓度水平的标准溶液(LOQ、2倍LOQ、10倍LOQ),按样品处理方法进行处理,每个加标水平进行6次重复实验,3个添加水平回收率在60%~120%之间;变异系数在3%~15%之间,真菌毒素的回收率和变异系数均符合GB/T 27404—2008的要求<sup>[23]</sup>。

#### 2.6 实际样品测定

为了进一步验证本方法的准确性和适用性,采用所建方法对市售每日坚果及混合水果坚果燕麦片等12批次产品中60种真菌毒素进行测定,其中1批次样品检出赭曲霉毒素A(2.662 μg/kg),其余未检出。与精确质量数据库匹配以及二级碎片谱库匹配,综合得分高于85分,实际样品中赭曲霉毒素A碎片离子谱图与数据库谱图镜像比对如图5所示。

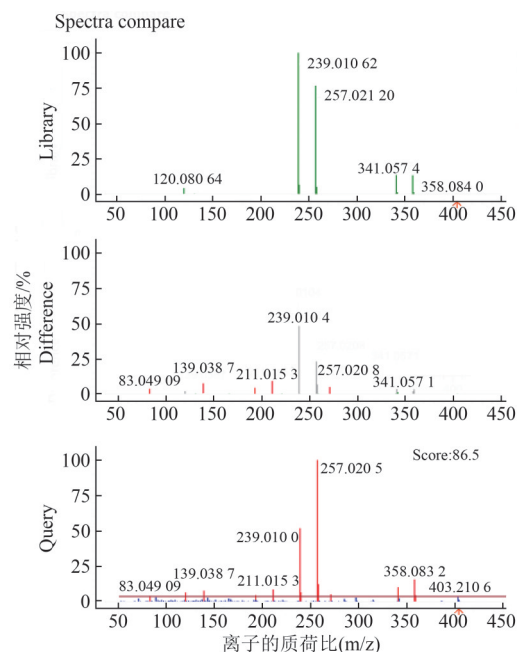


图5 样品中赭曲霉毒素A的碎片离子镜像信息  
Figure 5 Fragment ion information of ochratoxin-A in the sample

### 3 结论

本文利用 QuEChERS 联合 UPLC-Orbitrap/MS 筛查和确证坚果和干制水果中 60 种真菌毒素,显著提高了目标物定性和定量结果的准确性。该方法快速、灵敏、准确,可满足混合坚果和干制水果产品中真菌毒素的大通量快速筛查和确证,水果坚果麦片混合型产品也可参考该方法进行真菌毒素的筛查确证。

### 参考文献

- [1] CUNHA S C, SÁ S V M, FERNANDES J O. Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2018, 114: 260-269.
- [2] YANG Y, LI G L, WU D, et al. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2020, 96: 233-252.
- [3] 李润妍,潘琳,柳家鹏,等. 2010—2019年欧盟食品和饲料快速预警系统对华通报食品真菌毒素污染分析及应对策略[J]. *核农学报*, 2021, 35(8): 1883-1892.
- LI R Y, PAN L, LIU J P, et al. Analysis and countermeasures of notifications on mycotoxin contamination in food from China by EU rapid alert system for food and feed (RASFF) from 2010 to 2019 [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2021, 35(8): 1883-1892.
- [4] 陈龙,高军龙,郑超鹏. 混合果仁制品水分迁移控制方法探究[J]. *南方农业*, 2018, 12(12): 192-193.
- CHEN L, GAO J L, ZHENG C P. Hunhe guoren zhipin shuifin qianyi kongzhi fangfa yanjiu [J]. *South China Agriculture*, 2018, 12(12): 192-193.
- [5] 李志霞,聂继云,闫震,等. 果品主要真菌毒素污染检测、风险评估与控制研究进展[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(2): 332-347.
- LI Z X, NIE J Y, YAN Z, et al. Progress in research of detection, risk assessment and control of the mycotoxins in fruits and fruit products [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(2): 332-347.
- [6] 王玉娇. 坚果和干果真菌毒素污染及风险评估研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- WANG Y J. Study on contamination and risk assessment of mycotoxins in nuts and dried fruits [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2018.
- [7] HIDALGO-RUIZ J L, ROMERO-GONZÁLEZ R, MARTÍNEZ VIDAL J L, et al. A rapid method for the determination of mycotoxins in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2019, 288: 22-28.
- [8] GONZÁLEZ-JARTÍN J M, ALFONSO A, RODRÍGUEZ I, et al. A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer[J]. *Food Chemistry*, 2019, 275: 703-710.
- [9] GONZÁLEZ-JARTÍN J M, RODRÍGUEZ-CAÑÁS I, ALFONSO A, et al. Multianalyte method for the determination of regulated, emerging and modified mycotoxins in milk: QuEChERS extraction followed by UHPLC-MS/MS analysis[J]. *Food Chemistry*, 2021, 356: 129647.
- [10] QIU N N, SUN D L, ZHOU S, et al. Rapid and sensitive UHPLC-MS/MS methods for dietary sample analysis of 43 mycotoxins in China total diet study[J/OL]. *Journal of Advanced Research*, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.10.008>
- [11] RODRÍGUEZ-CARRASCO Y, CASTALDO L, GASPARI A, et al. Development of an UHPLC-Q-Orbitrap HRMS method for simultaneous determination of mycotoxins and isoflavones in soy-based Burgers[J]. *LWT*, 2019, 99: 34-42.
- [12] CHO H D, SUH J H, FENG S, et al. Comprehensive analysis of multi-class mycotoxins in twenty different species of functional and medicinal herbs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Control*, 2019, 96: 517-526.
- [13] ZHAO Y, YUAN Y C, BAI X L, et al. Multi-mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC-Q-Exactive HRMS after magnetic solid-phase extraction based on PEGylated multi-walled carbon nanotubes[J]. *Food Chemistry*, 2020, 305: 125429.
- [14] JIA W, SHI L, ZHANG F, et al. Multiplexing data independent untargeted workflows for mycotoxins screening on a quadrupole-Orbitrap high resolution mass spectrometry platform [J]. *Food Chemistry*, 2019, 278: 67-76.
- [15] ZHANG C Y, DENG Y C, ZHENG J F, et al. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 118: 517-537.
- [16] MIRÓ-ABELLA E, HERRERO P, CANELA N, et al. Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2017, 229: 366-372.
- [17] 齐春艳,许秀丽,国伟,等. QuEChERS结合UPLC-Q/Orbitrap HRMS法测定小麦粉中9种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2022, 43(4): 315-320.
- QI C Y, XU X L, GUO W, et al. Determination of Nine Mycotoxins in Wheat Flour by QuEChERS-Ultra-high Performance Liquid Chromatography-Quadrupole/Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry[J]. *Food Science*, 2022, 43(4): 315-320.
- [18] 于海瀛,陈伟,袁泉,等. 有机小分子化合物解离常数 $pK_a$ 的预测研究进展[J]. *科学通报*, 2015, 60(14): 1261-1271, 1.
- YU H Y, CHEN W, YUAN Q, et al. A review on predicting  $pK_a$  values of small organic compounds [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2015, 60(14): 1261-1271, 1.
- [19] SANTANA-MAYOR Á, SOCAS-RODRÍGUEZ B, HERRERA-HERRERA A V, et al. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 116: 214-235.
- [20] 王少敏,杜春晓,刘贤贤,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定三七中26种真菌毒素[J]. *世界中医药*, 2019, 14(4): 798-804.
- WANG S M, DU C X, LIU X X, et al. Simultaneous determination of 26 Mycotoxins in Notoginseng Radix et Rhizoma by QuEChERS-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry full text replacement [J]. *World Chinese Medicine*, 2019, 14(4): 798-804.

- [21] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 合格评定化学分析方法确认和验证指南: GB/T 27417—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Conformity assessment—Guidance on validation and verification of chemical analytical methods: GB/T 27417—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. National Food Safety Standard—Maximum Levels of Mycotoxins in Foods: GB 2761—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.
- [23] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范食品理化检测: GB/T 27404—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.  
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Criterion on quality control of laboratories—Chemical testing of food: GB/T 27404—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.