

超高效液相色谱串联质谱法测定花生、 粮油中 18 种真菌毒素

宫小明¹, 任一平², 董静¹, 孙军¹, 李健³, 金超¹, 于金玲¹

(1. 潍坊出入境检验检疫局, 山东 潍坊 261041; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051; 3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

摘要: 采用同位素稀释法并结合凝胶色谱净化技术, 建立了花生、粮油中 18 种常见真菌毒素污染的超高效液相色谱串联质谱分析方法。样品中添加同位素内标 U- $^{13}\text{C}_{17}$ -黄曲霉毒素 B1 和 U- $^{13}\text{C}_{15}$ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 经乙腈-水溶液(84:16, 体积比)均质提取, 凝胶渗透色谱净化, Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈ 色谱柱分离, 串联四极杆质谱多反应离子监测方式检测, 同位素稀释内标法定量。结果表明, 18 种真菌毒素在各自的线性范围内线性关系良好, 相关系数均不低于 0.996; 其中 12 种化合物的定量下限为 0.02~0.4 μg/kg, 6 种负离子的定量下限为 0.06~1.0 μg/kg; 低、中、高 3 个加标水平的回收率为 80%~96%, 相对标准偏差为 10.5%~19.6%。该方法具有前处理简单、净化效果好、灵敏度高的优点, 适用于复杂基质样品中多组分真菌毒素残留的确认和定量检测。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱; 凝胶渗透色谱; 同位素内标; 真菌毒素

中图分类号: O657.63; S852.44 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2011)01-0006-07

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.01.002

Determination of 18 Mycotoxin Contaminants in Peanuts and Oils by Gel Permeation Chromatography and Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry

GONG Xiao-ming¹, REN Yi-ping², DONG Jing¹, SUN Jun¹, LI Jian³, JIN Chao¹, YU Jin-ling¹

(1. Weifang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Weifang 261041, China; 2. Zhejiang Provincial Centre for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310051, China; 3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Qingdao 266071, China)

Abstract: A method for the analysis of common mycotoxins in peanuts and oils was developed using ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), based on isotope dilution and gel permeation chromatography (GPC) purification. The homogenized sample was spiked with U- $^{13}\text{C}_{17}$ -aflatoxin B1 and U- $^{13}\text{C}_{15}$ -deoxynivalenol, and extracted with acetonitrile-water (84:16, by volume), then purified by GPC. The targeted compounds were detected by MS/MS system with electrospray ionization (ESI) under multi-reaction monitoring (MRM) mode and quantified by the internal standard calibration curve of isotope dilution technique. The result indicated that the LOQ of 12 positive ions ranged from 0.02 μg/kg to 0.4 μg/kg, the LOQ of 6 negative ions ranged from 0.06 μg/kg to 1.0 μg/kg. Meanwhile, the high correlation coefficients ($r \geq 0.996$) of 18 mycotoxins were obtained within their respective linear ranges. The average recoveries at low, intermediate and high spiked levels ranged from 80% to 96% with relative standard deviations (RSD) of 10.5% - 19.6%. This method was suitable for the identification and quantification of multi-component mycotoxin contaminants in complex matrixes with advantages of simple pretreatment, good purification and high sensitivity.

Key words: ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); gel permeation chromatography (GPC); isotope internal standard; mycotoxins

收稿日期: 2010-08-12; 修回日期: 2010-10-20

基金项目: 山东检验检疫局科研基金资助项目 (SK200822)

通讯作者: 宫小明, Tel: 0536-8582599, E-mail: gongxiaoming@yahoo.com

真菌毒素(Mycotoxins)是产毒真菌在一定环境条件下产生的次级代谢产物,广泛污染农作物、食品及饲料等植物源性产品。可引起人类和动物急性或慢性中毒,部分已被证实具有致癌、致畸、致细胞突变的“三致”作用^[1-2]。目前已知的真菌毒素有200多种,按其产生毒菌种可分为曲霉菌毒素(如黄曲霉毒素、棕曲霉毒素等)、青霉菌毒素和镰刀菌毒素(如T-2毒素、HT-2毒素、二乙酰蔗镰刀菌烯醇、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等)等几大类。

现有的检测方法分为快速筛选法和确证法两大类。快速筛选法主要是酶联免疫法,此方法具有特异性强、灵敏度高、前处理简单、无需昂贵仪器、易于推广等优点,但此法存在一定的假阳性,不能作为最终的确证方法。真菌毒素检测的确证方法有薄层层析色谱法(TIC)、液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)以及LC、GC与质谱联用检测法等。TIC法在确证新发现真菌毒素和检测方法学研究方面,具有一定的优越性,但此法精确度低、操作过程复杂,近年来的应用受到限制。GC-FID和GC-MS技术常用于分析热稳定、易挥发性的化合物,但大多数真菌毒素对热不稳定,故气相色谱法分析的毒素种类有限,主要用来检测单端孢霉烯族化合物^[3-5]。高效液相色谱法结合紫外或荧光检测器法可用于大多数真菌毒素的分析,具有稳定可靠、灵敏度高等特点,但只能检测同一类毒素的异构体或同系物,无法做到多组分的同时分析^[6-12]。

液相色谱串联质谱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,对净化要求低、灵敏度高、适合多组分同时分析等特点^[13-15]。凝胶渗透色谱净化法是近年来兴起的残留检测前处理技术,具有自动化程度高、净化效果好、适合多残留检测等优点。本文利用凝胶渗透色谱对样品进行净化,并借助超高效液相色谱质谱法对花生和粮油中的青霉酸、胶黏毒素等18种真菌毒素同时检测,可满足国际上对真菌毒素的检测要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

超高效液相色谱-质谱/质谱仪(UPLC-Premier,美国Waters公司),配有电喷雾离子源;Accu-Prep凝胶渗透色谱(美国J2公司,264 nm固定波长紫外检测器,定量线圈:5 mL,层析柱:30 mm × 210 mm,填料:Bio-Beads SX-3填充);5810R冷冻离心机(德国Eppendorf公司),转速不低于10 000 r/min;天平:感量0.1 mg和0.001 g;均质器;振荡器;氮吹仪。

甲醇、乙腈为色谱纯;醋酸铵、氨水、甲酸为分析纯;乙酸乙酯、环己烷为农残级;青霉酸、胶黏毒素、黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2、杂色曲霉毒素、T-2毒素、HT-2毒素、二乙酰蔗镰刀菌烯醇(DAS)、桔青霉毒素、疣孢漆斑菌原、展青霉毒素、玉米赤霉烯酮、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-ADON)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-ADON)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、雪腐镰刀菌烯醇纯度均不低于99%(Biopure公司Tulin Austria);同位素内标:U-[¹³C₁₇]-黄曲霉毒素B1标准品0.529 mg/L,溶于乙腈中-20℃保存;U-[¹³C₁₅]-脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准品25.4 mg/L,溶于乙腈中2~8℃避光保存(Biopure公司Tulin Austria)。

标准溶液的配制:用甲醇将黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2配成0.01 g/L的标准储备液,其余真菌毒素用甲醇配成0.1 g/L的标准储备液,以10 mmol/L的醋酸铵-甲醇(1:1,体积比)梯度稀释,配成一系列的标准溶液,每个标准溶液中含有2.645 μg/L的U-[¹³C₁₇]-黄曲霉毒素B1和127 μg/L的U-[¹³C₁₅]-脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素内标。

1.2 样品预处理方法

1.2.1 提取 准确称取10 g(精确至0.01 g)样品于100 mL离心管中,加入0.529 mg/L的U-[¹³C₁₇]-黄曲霉毒素B1和25.4 mg/L的U-[¹³C₁₅]-脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素内标各20 μL,固体样品加入20 mL乙腈-水溶液(84:16,体积比),液体样品加入20 mL乙腈,均质提取3 min或振荡器中摇振1 h,以10 000 r/min于4℃下离心10 min,准确吸取8 mL上清液于玻璃试管中,在50℃下用氮气吹干,再用8 mL乙酸乙酯-环己烷(50:50,体积比)溶解样品,过0.45 μm的微孔膜,供凝胶色谱净化用。

1.2.2 凝胶色谱净化 层析柱:30 mm × 210 mm,填料:填充23 g Bio-Beads SX-3填料(中性、多孔的聚苯乙烯-二乙烯基苯微球体);流动相:乙酸乙酯-环己烷(50:50);流速:4.7 mL/min;样品定量

环: 5 mL; 收集时间: 6~15 min; 取“1.2.1”得到的8 mL上清液按上述条件净化, 收集洗脱液于玻璃离心管中, 在50 °C下氮气吹干, 用甲醇-醋酸铵水溶液(50:50)定容至1 mL。

1.3 高效液相色谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLCTM BEH C₁₈柱(2.1 mm × 100 mm, 粒径1.7 μm或相当者); 柱温: 40 °C; 进样体积: 10 μL; 流速: 300 μL/min。正离子模式下, 流动相: A为10 mmol/L醋酸铵+0.1%甲酸, B为甲醇, 梯度洗脱程序: 0~4.8 min, 35%~90% B; 4.8~6.0 min, 90% B; 6.1 min, 35% B, 平衡2 min; 负离子模式下, 流动相: A为0.1%氨水, B为甲醇, 梯度洗脱程序: 0~5.0 min, 25%~90% B; 5.0~6.0 min, 90% B; 6.1 min, 25% B, 平衡2 min。

1.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 检测方式: 多反应监测; 毛细管电压: 3.0 kV; 离子源温度: 110 °C; 锥孔反吹气流速: 50 L/h; 脱溶剂气温度: 380 °C; 脱溶剂气流速 600 L/h; 碰撞池压力: 0.435 Pa; 扫描方式、监测离子对(*m/z*)和其他参数见表1。

表1 18种真菌毒素及两种内标的监测离子对、锥孔电压、碰撞能量、离子化方式
Table 1 Qualitative ion pair, quantitative ion pair, cone voltage, collision energy and ionization mode of 18 mycotoxins

Compound	Qualitative ion pair(<i>m/z</i>)	Cone voltage	Collision energy	Ionization mode
		<i>U/V</i>	<i>E/eV</i>	
Penicillic acid(青霉菌酸)	170.5/124.9*, 170.5/153.0	18	12, 10	ESI ⁺
Glitoxin(胶黏毒素)	326.8/262.4*, 326.8/245.3	10	20, 10	ESI ⁺
Aflatoxin B1(黄曲霉毒素 B1)	313.5/241.5*, 313.5/285.2	50	34, 22	ESI ⁺
Aflatoxin B2(黄曲霉毒素 B2)	315.5/259.3*, 315.5/287.4	50	27, 25	ESI ⁺
Aflatoxin G1(黄曲霉毒素 G1)	328.9/243.3*, 328.9/283.2	48	25, 25	ESI ⁺
Aflatoxin G2(黄曲霉毒素 G2)	331.5/245.3*, 331.5/217.4	48	26, 28	ESI ⁺
Sterigmatocystin(杂色曲霉毒素)	325.2/310.2*, 325.2/281.2	46	25, 35	ESI ⁺
HT-2 Toxin(HT-2 毒素)	447.3/345.2*, 447.3/285.2	42	18, 20	ESI ⁺
T-2 Toxin(T-2 毒素)	489.3/245.2*, 489.3/387.1	50	27, 21	ESI ⁺
Citrinin(桔青霉毒素)	250.7/232.9*, 250.7/159.0	20	18, 22	ESI ⁺
DAS(二乙酰蔗镰刀菌烯醇)	384.4/307.3*, 384.4/247.2	20	12, 13	ESI ⁺
Verruculogen(疣孢漆斑菌原)	534.0/392.0*, 534.0/191.5	25	15, 20	ESI ⁺
Patulin(展青霉毒素)	152.9/108.9*, 152.9/81.0	10	10, 10	ESI ⁻
Nivalenol(雪腐镰刀菌烯醇)	311.4/281.1*, 311.4/205.2	23	10, 15	ESI ⁻
Deoxynivalenol(脱氧雪腐镰刀菌烯醇)	295.3/265.1*, 295.3/137.7	21	11, 14	ESI ⁻
3-Acetyl deoxynivalenol(3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇)	337.4/307.2*, 337.4/173.3	22	12, 10	ESI ⁻
15-Acetyl deoxynivalenol(15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇)	337.4/150.0*, 337.4/219.2	20	16, 11	ESI ⁻
Zearalenone(玉米赤霉烯酮)	317.4/130.9*, 317.4/175.1	45	30, 25	ESI ⁻
U-[¹³ C ₁₇]-Aflatoxin B1([¹³ C ₁₇]-黄曲霉毒素 B1)	330.5/301.4	50	22	ESI ⁺
U-[¹³ C ₁₅]-Deoxynivalenol([¹³ C ₁₅]-脱氧雪腐镰刀菌烯醇)	310.5/261.3	25	12	ESI ⁻

* quantitative ion pair

2 结果与讨论

2.1 流动相的选择

在液相色谱-质谱联用中液相的分离与质谱的离子化是一对矛盾体, 选择流动相时应兼顾分离效果及各分离组分进入质谱前的离子化效率, 以获得最佳的分辨率和最高的灵敏度。对各毒素标准品进行质谱全扫描发现: 青霉菌酸、胶黏毒素、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、杂色曲霉毒素、T-2 毒素、HT-2 毒素、二乙酰蔗镰刀菌烯醇、桔青霉毒素、疣孢漆斑菌原 12 种毒素可在 ESI⁺ 方式下生成加氢或加钠离子, 在纯水-甲醇组成的流动相中, 各种毒素的加钠和加钾离子强度明显高于加氢, 当加入 10 mmol/L 醋酸铵时, 母离子的加氢峰迅速增高, 经离子化后获得高灵敏度。其余 6 种毒素在 ESI⁻ 方式下生成负离子, 当以纯水-甲醇为流动相时, 离子化效率较差, 在水相中加入 0.1% 的氨水后, 离子化效率明显提高。

由于真菌毒素易溶于甲醇或乙腈, 本实验分别选择甲醇和乙腈作为强洗脱流动相。用乙腈作为流动相, 在正负两种监测模式下的洗脱效果均明显低于甲醇作为流动相时的效果, 因此最终选择甲醇作为强洗脱流动相。

2.2 质谱条件的选择

2.2.1 母离子的选择 将各真菌毒素配成1 g/L的单标, 根据各化合物分子的化学电离性质, 分别选用ESI⁺和ESI⁻作为离子化模式, 通过直接进样法, 在优化质谱参数的基础上, 确定各毒素的母离子质量数。结果发现青霉酸、胶黏毒素、黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素B2、黄曲霉毒素G1、黄曲霉毒素G2、杂色曲霉毒素、T-2毒素、HT-2毒素、二乙酰蔗糖镰刀菌烯醇、桔青霉毒素、疣孢漆斑菌原12种真菌毒素在ESI⁺方式下, 可获得较高的灵敏度; 展青霉毒素、玉米赤霉烯酮、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、雪腐镰刀菌烯醇在ESI⁻模式下的灵敏度明显高于ESI⁺。

2.2.2 子离子的选择及碰撞电压的优化 欧盟(2002/657/EC)指令^[16]规定低分辨率质谱联用检测应在确定母离子的基础上选择两个以上的子离子。在确定各真菌毒素的母离子后, 采用子离子扫描的方式对子离子及碰撞能量进行优化。随着碰撞能量的不断增加, 选择能产生最高丰度子离子的碰撞能量作为CID最佳碰撞电压。18种真菌毒素及两种内标的监测离子对、锥孔电压、碰撞能量、离子化方式见表1; 其多反应监测(MRM)色谱图见图1。

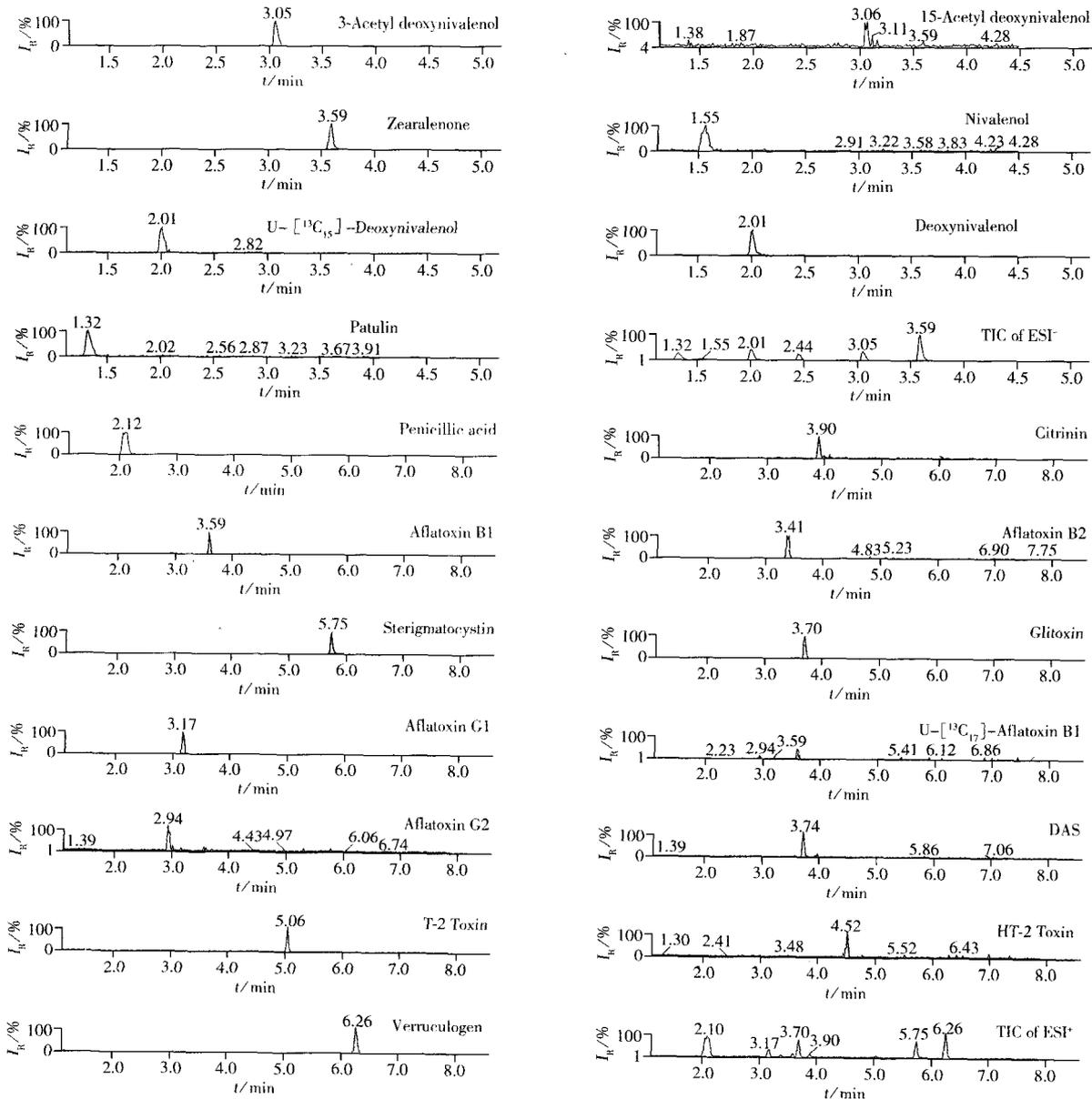


图1 18种真菌毒素标准品及同位素内标物的多反应监测(MRM)色谱图

Fig.1 Chromatograms of 18 mycotoxin standards and the isotope labeled standards under multiple reaction mode(MRM)

2.3 凝胶渗透色谱条件的优化

2.3.1 凝胶渗透色谱收集时间的选择 本文目标物的相对分子质量为 154 ~ 533, 考虑到真菌毒素的紫外吸收强度、毒性等因素, 选择相对分子质量比 533 大的莫西菌素(640)的出峰时间为起始收集的时间, 以 170(展青霉毒素)出峰结束的时间为结束收集的时间, 此时间段可将所有真菌毒素组分收集。为保证收集时间的准确性, 本文采取分段收集, 对每段收集到的样品进行 LC-MS/MS 检测, 结果与 GPC 检测结果相吻合。莫西菌素和展青霉毒素标准品的 GPC 谱图见图 2, 花生和玉米油样品的 GPC 色谱图见图 3。从图上可见, 杂质的出峰时间主要集中在 3.5 ~ 10 min 之间, 而 3.5 ~ 5.5 min 为杂质出峰最为集中的时间段。综合考虑, 最终确定组分的收集时间为 6.0 ~ 15 min。

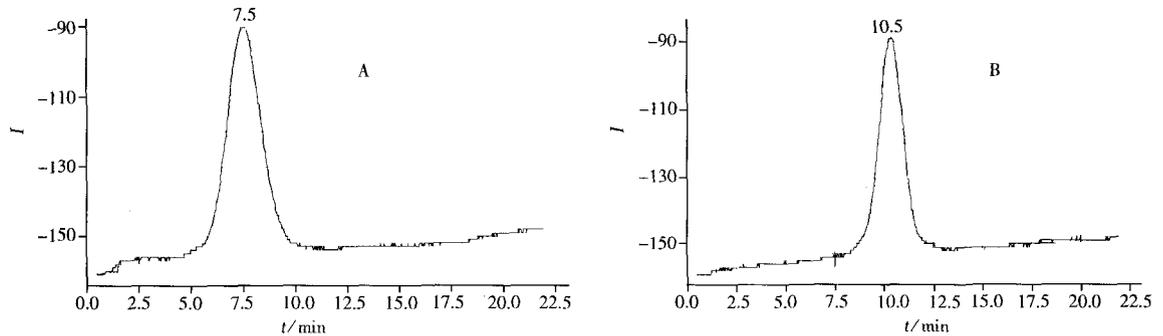


图2 莫西菌素标准品(A)与展青霉毒素标准品(B)的 GPC 色谱图
Fig. 2 GPC chromatograms of moxidectin(A) and patulin standard(B)

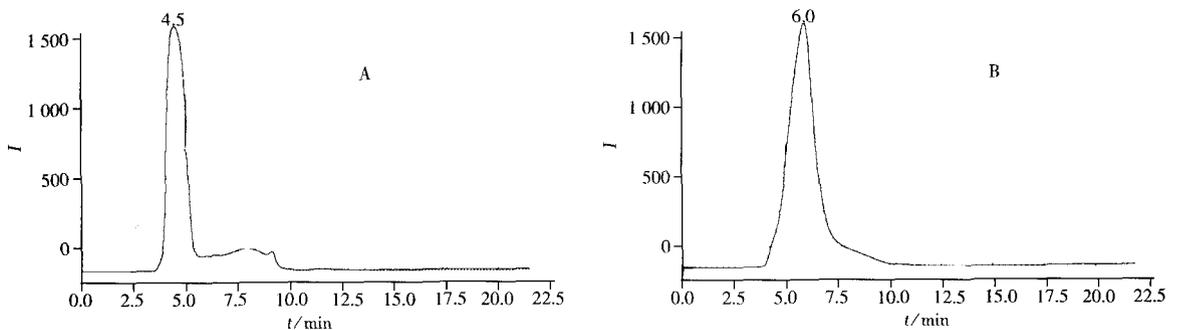


图3 花生样品提取液(A)与玉米油样品提取液(B)的 GPC 色谱图
Fig. 3 GPC chromatograms of peanut extract(A) and corn oil extract(B)

2.3.2 凝胶渗透色谱净化效果的研究 凝胶渗透色谱净化主要是去除样品中的色素、脂肪、蜡质等大分子物质。在考察 GPC 净化效果时, 采用全扫描方式, 重点监测 m/z 在 750 ~ 1 250 之间的杂质峰。由于利用了分子切割的原理, 因而对特定分子量区间的杂质具有非常好的净化效果。对比图 4A 和图 4B 可以看出, 经 GPC 净化后, 花生样品中 m/z 722.55、743.63、764.06、864.74、1 043.77、1 069.13、1 152.99、1 224.32 等主要杂质峰几乎被完全去除。

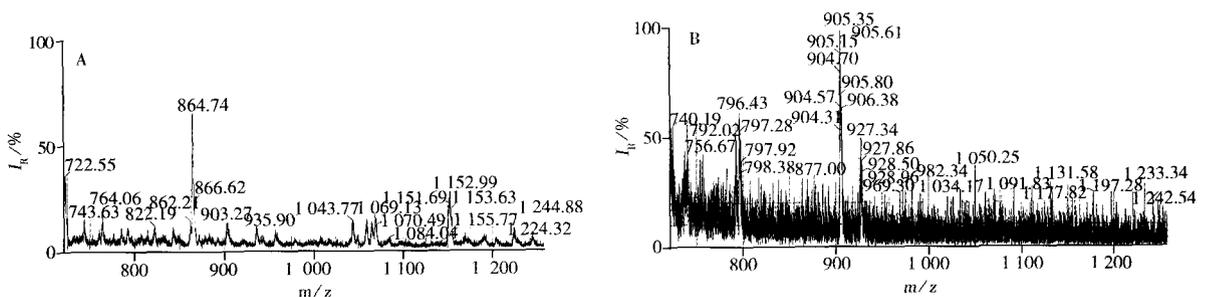


图4 GPC 净化前(A)后(B)的花生提取液的全扫描图
Fig. 4 MS scan chromatograms of peanut extract without(A) and with(B) GPC purification

2.3.3 凝胶渗透色谱净化与多功能净化柱的比较 多功能净化柱法是目前国内外真菌毒素多组分残留检测中常用的净化方法,其原理是提取液通过不同类型的吸附剂装填而成的柱体,吸附剂吸附杂质,不吸附目标物,从而完成样品的净化。由于目标物的化学性质不尽相同,可能引起吸附剂对部分目标物有一定的吸附作用,造成部分真菌毒素的回收率偏低。而凝胶渗透色谱净化基于化合物的分子大小,本文涉及的真菌毒素分子量范围在154~533之间,而大部分真菌毒素的分子量均在此范围内,同时此净化方法对花生、粮油等基质中的脂肪、色素等大分子杂质具有很好的去除效果,因此凝胶渗透色谱净化非常适合花生、粮油中真菌毒素的多组分残留分析。

2.4 内标的选择

本实验根据各化合物的性质选择内标,青霉酸、胶黏毒素、黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、杂色曲霉毒素、T-2 毒素、HT-2 毒素、二乙酰蔗糖刀菌烯醇、桔青霉毒素、疣孢漆斑菌原以 U-[¹³C₁₇]-黄曲霉毒素 B1 为内标,其余6种真菌毒素以 U-[¹³C₁₅]-脱氧雪腐镰刀菌烯醇为内标。实验结果表明,以上两种同位素为内标获得的结果准确可靠。

2.5 方法的线性范围与定量下限

以待测化合物和内标的峰面积比值为纵坐标,待测化合物的标示浓度为横坐标进行回归分析,得到线性回归方程、线性范围及相关系数(见表2)。由表2可知,采用同位素内标法定量,各化合物的线性关系良好,相关系数 r 值均不低于0.996,且可较好地克服样品提取、净化及上机测定过程造成的误差。

用花生空白样品作为基质,添加不同量的真菌毒素标准品后按“1.2”处理后测定,根据10倍信噪比计算定量下限(见表2)。各真菌毒素的检出限(LOD, $S/N > 3$)和定量下限(LOQ)均远低于欧盟、日本等国家规定的最大残留限量。

表2 18种真菌毒素的线性方程、线性范围、相关系数、检出限与定量下限
Table 2 Linear equations, linear ranges, correlation coefficients(r), LODs and LOQs of 18 mycotoxins

Compound	Linear equation	Linear range $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	r	LOD $w/$ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	LOQ $w/$ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Spiked $w/$ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
Penicillic acid	$Y=1.348X-0.932$	0.05~50	0.998	0.01	0.03	0.5, 2, 10	83, 84, 85	15.3, 12.6, 13.5
Glitoxin	$Y=1.394X-0.558$	0.05~50	0.996	0.01	0.03	0.5, 2, 10	85, 84, 86	18.5, 16.4, 15.8
Aflatoxin B1	$Y=1.492X-0.094$	0.05~50	0.999	0.007	0.02	0.5, 2, 10	95, 93, 96	12.3, 10.5, 10.9
Aflatoxin B2	$Y=1.986X-0.861$	0.05~50	0.999	0.007	0.02	0.5, 2, 10	89, 90, 91	13.5, 12.8, 11.7
Aflatoxin G1	$Y=2.842X-0.374$	0.05~50	0.999	0.007	0.02	0.5, 2, 10	86, 86, 90	16.9, 12.8, 10.5
Aflatoxin G2	$Y=1.037X-0.921$	0.05~50	0.998	0.01	0.04	0.5, 2, 10	90, 91, 92	17.9, 18.5, 15.8
Sterigmatocystin	$Y=1.037X-0.865$	0.05~50	0.999	0.01	0.04	0.5, 2, 10	82, 83, 84	16.3, 15.8, 12.4
HT-2 Toxin	$Y=0.837X-0.035$	0.1~100	0.999	0.1	0.4	0.5, 2, 10	86, 83, 84	18.3, 18.5, 16.4
T-2 Toxin	$Y=1.021X-0.153$	0.05~50	0.999	0.02	0.06	0.5, 2, 10	90, 92, 92	18.4, 15.6, 14.9
Citrinin	$Y=0.982X-0.054$	0.1~100	0.999	0.1	0.4	0.5, 2, 10	81, 82, 84	16.9, 15.4, 12.8
DAS	$Y=1.856X-0.267$	0.05~50	0.997	0.02	0.06	0.5, 2, 10	80, 81, 83	14.5, 12.3, 11.8
Verruculogen	$Y=1.037X+0.482$	0.05~50	0.999	0.02	0.06	0.5, 2, 10	80, 81, 83	15.8, 14.7, 12.8
Patulin	$Y=0.312X-0.354$	0.05~50	0.998	0.02	0.06	10, 20, 50	82, 83, 84	17.8, 16.5, 14.9
Nivalenol	$Y=0.0321X+0.032$	0.1~100	0.999	0.3	0.8	10, 20, 50	80, 85, 88	19.6, 18.2, 17.5
DON	$Y=0.0261X+0.568$	0.1~100	0.999	0.33	1.0	10, 20, 50	82, 85, 88	18.5, 16.7, 14.9
3-ADON	$Y=0.0281X-0.023$	0.1~100	0.999	0.33	1.0	10, 20, 50	84, 87, 90	17.5, 16.2, 14.8
15-ADON	$Y=0.0235X+0.051$	0.1~100	0.998	0.33	1.0	10, 20, 50	83, 86, 87	18.1, 17.9, 16.8
Zearalenone	$Y=0.041X-0.0231$	0.1~100	0.999	0.3	0.8	10, 20, 50	89, 82, 84	15.4, 14.8, 10.8

* Y : peak area ratio of analyte to internal standard; X : concentration of analyte

2.6 方法的回收率与精密度

取花生空白样品,正离子分别在0.5、2、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$,负离子在10、20、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平上进行加标实验,每个加标水平平行测定5次,计算各种真菌毒素的回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表2。结果表明,方法的回收率为80%~96%,相对标准偏差为10.5%~19.6%。

2.7 实际样品的检测

取本地市场销售的花生酱样品20份进行检测,检出真菌毒素6种,分别为黄曲霉毒素 B1、黄曲

霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、杂色曲霉毒素和桔青霉毒素。检出的 8 份阳性样品中均含有黄曲霉毒素 B1, 含量在 0.2 ~ 21.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间。图 5 为黄曲霉毒素 B1 含量为 21.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的阳性样品的多反应监测色谱图。

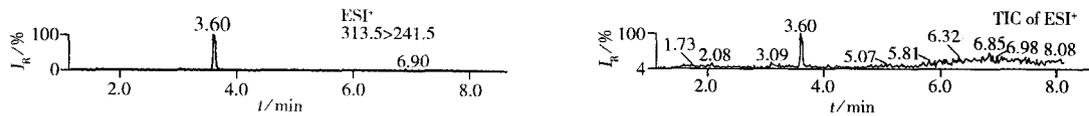


图 5 黄曲霉毒素 B1 (21.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 污染的花生酱样品的多反应监测色谱图
Fig. 5 MRM chromatograms of peanut butter contaminated by aflatoxin B1 (21.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

3 结论

本文建立了花生、粮油中常见真菌毒素的凝胶渗透色谱净化, 超高效液相色谱串联质谱检测方法。该方法具有灵敏度高、自动化程度高、重复性及净化效果好等特点, 适于多组分真菌毒素低含量残留的定量检测与定性确证, 能够满足欧盟、日本等国家和地区对于真菌毒素污染检测的限量要求。

参考文献:

- [1] 李鹏, 赖卫华, 金晶. 食品中真菌毒素的研究[J]. 农产品加工, 2005, 34(3): 12 - 15.
- [2] Council for Agricultural Science and Technology(CAST)[S]. Mycotoxins: Risks in plant, animal and human systems. Task force report, No. 139, CAST, Ames, Iowa, 2003.
- [3] European Commission, Scientific Committee on Food. Opinion on fusarium toxins Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol[S]. http://www.europa.eu.int/comm/food/food/chemical_safety/contaminants/fusarium_en.htm.
- [4] Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs[S]. Official Journal of the European Union, L70/12, 2006.
- [5] EKE Z, KENDE A, TORKOS K. Simultaneous detection of A and B trichothecenes by gas chromatography with flame ionization or mass selective detection[J]. Microchem J, 2004, 78(2): 211 - 216.
- [6] JESTOI M, RITIENI A, RIZZO A. Validation of a method for analysing the fusarium - mycotoxins fusaproliferin and trichothecenes in grains using gas chromatography - mass spectrometry (GC - MS) [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(6): 1464 - 1469.
- [7] PAPP E, H - OTTA K, ZARAY G, MINCSOVICS E. Liquid chromatographic determination of aflatoxins[J]. Microchem J, 2002, 73(1/2): 39 - 46.
- [8] AMEZQUETA S, GONZALEZ - PENAS E, MURILLO M, DE CERAIN A. Validation of a high-performance liquid chromatography analytical method for ochratoxin A quantification in cocoa beans[J]. Food Addit Contam, 2004, 21(11): 1096 - 1106.
- [9] SUGITA - KONSIHI Y, TANAKA T, TABATA S. Validation of an HPLC analytical method coupled to a multifunctional clean-up column for the determination of deoxynivalenol[J]. Mycopathologia, 2006, 161(4): 239 - 243.
- [10] EN ISO 15141 - 1. Determination of ochratoxin A in cereals and cereal products - Part 1: High performance liquid chromatographic method with silica - gel clean-up[S].
- [11] FAZEKAS B, TAR A. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography[J]. J AOAC Int, 2001, 84(5): 1453 - 1459.
- [12] VISCONTI A, PASCALE M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity cleanup and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr: A, 1998, 815(1): 133 - 140.
- [13] MERITXELL V, ANTONIO G, IANAYA J, FRANCESC B, MONTSERRAT A, LLU C. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr: A, 2004, 1048(1): 25 - 29.
- [14] 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.
- [15] BISELLI S, HUMMERT C. Development of a multicomponent method for fusarium toxins using LC - MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples[J]. Food Addit Contam, 2005, 22(8): 752 - 760.