

高效液相色谱法测定食用植物油中 6种真菌毒素

徐洪文^{1,2}, 朱瑜³, 徐华², 孙嘉笛¹, 纪剑¹, 孙秀兰¹, 张瑶²

(1. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室, 食品安全与营养协同创新中心, 江苏无锡 214122;

2. 广州广电计量检测股份有限公司, 广州 510627; 3. 汉中市质量技术监督检验检测中心, 陕西汉中 723000)

摘要:建立了基于分散液液微萃取技术(DLLME)的高效液相色谱法同时测定食用植物油中6种真菌毒素的方法。样品经石油醚脱脂, 乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)超声提取, CHCl₃为萃取剂液液萃取净化及柱前衍生化后, 以Agilent XDB-C₁₈色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm)分离, 梯度洗脱, 经荧光检测器检测。结果表明:食用植物油中6种真菌毒素的线性关系良好, 相关系数均大于0.999, 方法检出限为0.2~0.5 μg/kg, 样品的平均加标回收率为75.88%~105.25%, 相对标准偏差为0.5%~9.5%。该方法可用于食用植物油中黄曲霉毒素(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)以及赭曲霉毒素(OTA、OTB)6种真菌毒素的同时检测。

关键词:真菌毒素; 高效液相色谱法; 液液萃取技术; 食用植物油

中图分类号:TS225.1; TS206.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-7969(2020)11-0077-07

Detection of six mycotoxins in edible vegetable oil by high performance liquid chromatography

XU Hongwen^{1,2}, ZHU Yu³, XU Hua², SUN Jiadi¹, JI Jian¹,
SUN Xiulan¹, ZHANG Yao²

(1. Synergetic Innovation Center of Food Safety and Nutrition, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Guangzhou GRG Metrology and Test Co., Ltd., Guangzhou 510627, China; 3. Hanzhong Quality Technical Inspection and Testing Center, Hanzhong 723000, Shaanxi, China)

Abstract: A method for simultaneous determination of six mycotoxins in edible vegetable oil by high performance liquid chromatography (HPLC) based on dispersion liquid-liquid microextraction technology (DLLME) was established. The sample was defatted with petroleum ether, ultrasound-extracted with acetonitrile-water-acetic acid (volume ratio 84:15:1), purified by liquid-liquid extraction with CHCl₃ as extractant and pre-column derived. Then, it was separated by Agilent XDB-C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm) with gradient elution, and detected by fluorescence detector. The results showed that the linear relationships of the six mycotoxins in edible vegetable oil were good and the correlation coefficients were all more than 0.999. The detection limit of the method was 0.2-0.5 μg/kg. The average recovery of the samples was 75.88%-105.25%, and the relative standard deviation was 0.5%-9.5%. This method could be used for the simultaneous detection

收稿日期:2020-02-22;修回日期:2020-06-18

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(2018YFC1604206);
国家自然科学基金(31772069)

作者简介:徐洪文(1995),男,在读硕士,研究方向为食品中
真菌毒素检测与防控研究(E-mail)2017170657@qq.com。

通信作者:孙秀兰,教授(E-mail)sxlzyz@jiangnan.edu.cn。

of six mycotoxins including aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) and ochratoxin (OTA, OTB) in edible vegetable oil.

Key words: mycotoxins; high performance liquid chromatography; liquid-liquid extraction technology; edible vegetable oil

食用植物油因油料作物生长、收获及油脂精炼、储存和消费过程中受到异常气候、储藏环境和运输条件等影响造成的真菌污染而容易产生有害的真菌毒素^[1]。食用植物油中常见的真菌毒素有黄曲霉毒素、单端孢霉烯族类毒素、伏马类毒素、赭曲霉毒素等^[2-4]。大多数的真菌毒素具有肝毒性、致畸性、致癌性、肾毒性、出血性、破坏免疫系统及生殖系统等危害^[5]，摄入量超过一定限量后，会危害人类及其他生物健康，甚至危害生命^[6]。因此，检测食用植物油中真菌毒素对食品安全监管及疾病预防控制具有重要意义。

目前，食用植物油中真菌毒素的检测方法主要有薄层层析色谱法^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8]、液相色谱-质谱联用^[9-12]、气相色谱-质谱联用^[13-14]、酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析法^[15]等。薄层层析色谱法灵敏度低、重现性较差，其应用受到一定的限制；酶联免疫吸附法半定量筛查检测，其假阳性率高，不能作为确证实验；相对来说 HPLC 方法较为简便实用，仪器普及易于推广。

真菌毒素样品前处理方法主要有液液萃取法、固相萃取法(SPE)、免疫亲和层析法、QuEChER 法、直接稀释法、分散液液微萃取法(OLLME)^[16-17]。其中，SPE(包括 IAC 和 MFC)是应用最广泛、技术最成熟的一种前处理方法，但通常 SPE 操作过程烦琐、所需时间较长，材料成本较高。目前，这些前处理方法对一种或一类真菌毒素提取效果好，但对食用植物油中多种真菌毒素同步提取的研究较少，因此需要建立一种能够有效、同步检测食用植物油中多种真菌毒素的方法。本研究建立了一种能够同时测定食用植物油中多种真菌毒素的高效液相色谱-荧光检测分析方法(HPLC-FLD)，在样品前处理方面，对分散液液微萃取技术(DLLME)进行改进和条件优化，以增加其在食用植物油中的适用性，为完善食用植物油的真菌毒素检测和质量控制提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

5 种食用植物油(大豆油、玉米油、菜籽油、花生油以及食用调和油)共 28 个样，市售。黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)标准品(纯度 ≥ 99%)、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)标准品(纯度 ≥ 99%)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)标准品(纯度 ≥ 99%)、黄曲霉毒素 G₂(AFG₂)标准品(纯度 ≥ 99%)、赭曲霉毒素 A(OTA)标准品(纯度 ≥ 99%)、赭曲霉毒素 B(OTB)标准品(纯度 ≥ 99%)，购于 Sigma-Aldrich 公司；乙

腈、甲醇，色谱纯，购于上海国药集团；正己烷、三氯甲烷、石油醚、乙酸，分析纯，购于上海国药集团；甲酸，色谱级，购于阿拉丁公司；三氟乙酸，分析纯，购于上海麦克林公司。

1.1.2 仪器与设备

Agilent 1260 高效液相色谱仪(荧光检测器(FLD)，美国 Agilent 公司)；Lab Dancer 旋涡仪；SCIENTZ-10LS 真空离心浓缩仪；SCIENTZ-10N 普通型冷冻干燥机；Centrifuge 5424 R 高速冷冻离心机，美国 Eppendorf 公司；SCIENTZ-5200 DTD 超声波清洗机；Milli-Q 超纯水纯化系统，美国 Millipore 公司；DZF-6096 真空干燥箱；LC-DCY-24G 干式氮吹仪；电热恒温鼓风干燥箱。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件

Agilent XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm)；柱温 40 ℃；流动相流速 0.6 mL/min；进样量 10 μL；荧光检测器。

1.2.2 标准溶液的制备

用甲醇将各标准品配制成一定质量浓度的储备液，分别准确吸取 6 种标准储备液适量，用甲醇-乙腈(体积比 50:50)稀释得 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 质量浓度均为 1.00、2.00、5.00、10.00、25.00、50.00 μg/L，OTA 和 OTB 质量浓度均为 2.00、4.00、10.00、20.00、50.00、100.00 μg/L 的混合标准工作液。

1.2.3 样品前处理

1.2.3.1 样品提取

参考吴宇等^[18]的样品提取方法。准确称取 5.0 g(精确至 0.01)油样放入 50 mL 离心管中，再加入 10 mL 石油醚，涡旋混匀 1 min，加提取液乙腈-水-乙酸(体积比 84:15:1)10 mL，涡旋 1 min 后，超声提取 20 min，静置，室温下 8 000 r/min 离心 10 min，取下层提取液置于 15 mL 离心管中，待用。取上述提取液 1 mL 于 10 mL 离心管中，加等体积的水，涡旋 1 min，静置，4 ℃、12 000 r/min 下离心 10 min，取上清液过膜备用。

1.2.3.2 DLLME 步骤

取 1 mL 三氯甲烷(用作萃取剂)加入 1 mL 1.2.3.1 过膜后的提取液(用作分散剂)，充分混匀。将混合物迅速注入装有 5 mL 超纯水(pH 3)的离心管中，萃取剂、分散剂与水相充分混合，将混合溶液涡旋振荡 1 min，然后 6 000 r/min、室温离心 10 min 后，将离心管底部三氯甲烷取出，重复上述操作，反

复萃取3次,萃取液经氮气(40℃,1 mL/min)吹干后,供柱前衍生化。

1.2.3.3 柱前衍生化

在1.2.3.2盛有残留物的离心管中加入衍生试剂200 μL正己烷和100 μL三氟乙酸,振荡30 s,40℃烘箱条件下衍生化15 min。衍生化后的溶液经氮气(40℃,1 mL/min)吹干,残留物用200 μL乙腈复溶,涡旋混匀后供高效液相色谱仪分离检测。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 流动相的选择

A相选择甲醇、乙腈,B相选择0.05%甲酸、0.05%乙酸、0.05%三氟乙酸,设计6组实验。根据6组实验结果比较可知,乙腈作为流动相A时,由于具有强洗脱能力使得各组分保留时间较短,分离度较差,而甲醇的洗脱能力较弱,6种真菌毒素都能进行基线分离,各组分保留时间适中,同时分别对含相同比例不同酸的水溶液流动相进行比较,发现0.05%乙酸作为B相时,OTA和OTB分离度较低,并且目标峰的峰形不佳,而0.05%三氟乙酸作为B相时,基线扰动较大,且存在拖尾的现象,选择0.05%甲酸作为B相时各组分能够很好地分离,且基线扰动较小,因此选择甲醇作为A相,0.05%甲酸作为B相时,6种真菌毒素能够达到很好的分离效果。为了提高分析检测效率,缩短检验时间,本研究进一步考虑采用梯度洗脱,经过实验确定最佳的流动相梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A相/%	B相/%
0~3	10	90
3~6	10~25	90~75
6~9	25~45	75~55
9~12	45	55
12~15	45~65	55~35
15~24	65	35
24~24.5	65~10	35~90
24.5~32	10	90

2.1.2 检测波长的选择

取200 μL质量浓度为25 μg/L的AFB₁、AFB₂、

AFG₁、AFG₂和200 μL质量浓度为50 μg/L的OTA和OTB标准品溶液,分别进行各毒素全波长扫描,优化确定同步检测的波长。AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂最佳激发波长360~380 nm,AFB₁和AFB₂最佳发射波长450 nm,AFG₁和AFG₂最佳发射波长470 nm,确定4种黄曲霉毒素的激发波长为365 nm,发射波长为460 nm;OTA和OTB激发波长为327 nm,发射波长为460 nm,有利于提高分析的灵敏度。

2.2 提取过程的优化

以下优化实验样品AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂加标量5 μg/kg,OTA和OTB加标量10 μg/kg。

2.2.1 提取液的选择及比例优化

多数的真菌毒素易溶于甲醇、乙腈等极性有机溶剂^[19],因此植物油中真菌毒素的提取溶剂一般选用甲醇或乙腈或两种溶剂的混合溶液。以玉米油为例,本研究考察了甲醇-水-乙酸(体积比84:15:1)、甲醇-水-甲酸(体积比84:15:1)、乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)、乙腈-水-甲酸(体积比84:15:1)、甲醇-水(体积比84:16)、乙腈-水(体积比84:16)6种常见的提取液对玉米油中6种真菌毒素加标回收率的影响,结果见图1。

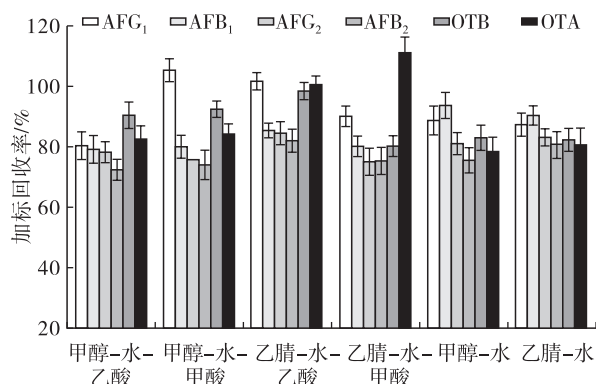


图1 不同提取液对食用植物油中6种真菌毒素加标回收率的影响

由图1可知,乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)对食用植物油中6种真菌毒素的加标回收率均较好,因此选择乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)作为最佳提取液。然后,进一步对乙腈-水-乙酸的比例进行了优化,真菌毒素加标回收率结果见表2。

表2 提取液比例对食用植物油中6种真菌毒素加标回收率的影响

乙腈-水-乙酸	加标回收率/%					
	AFG ₁	AFB ₁	AFG ₂	AFB ₂	OTB	OTA
体积比80:19:1	76.25	76.26	74.75	70.36	80.29	82.47
体积比84:15:1	90.46	86.37	87.66	82.25	92.85	91.27
体积比70:29:1	70.63	80.38	76.55	74.75	72.33	80.53
体积比50:49:1	78.28	81.88	75.34	77.82	86.26	75.82

由表2可以看出,当采用乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)提取时,6种真菌毒素的加标回收率在82.25%~92.85%之间,因此实验采用乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)作为油样中真菌毒素检测的提取液。

2.2.2 提取方式的选择

以玉米油为例,考察高速均质(12 000 r/min,5 min)、涡旋振荡(10 min)、超声(20 min)、摇床(20 min)4种提取方式对玉米油中6种真菌毒素加标回收率的影响,以确定最佳的提取方式,结果如图2所示。

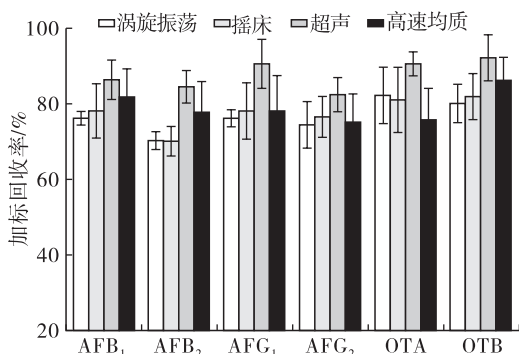


图2 不同提取方式对食用植物油中6种真菌毒素加标回收率的影响

由图2可知,超声提取对食用植物油中6种真菌毒素加标回收率均在80%以上,加标回收率高于涡旋振荡、摇床和高速均质。对于油样中真菌毒素的提取,高速均质难以操作,且会造成样品量损失,摇床和涡旋振荡两种提取方式效率较低,超声提取加标回收率高,因此本研究选取超声作为样品中真菌毒素的提取方式。

2.3 DLLME条件的优化

在DLLME萃取过程中,萃取剂种类显著影响萃取效率,通常要求萃取剂有适合的极性、对待测物有良好

的溶解度。因此,以玉米油为例,对几种不同密度、极性的卤代烃的萃取效果进行了考察,包括 CH_2Cl_2 、 CHCl_3 和 CCl_4 。对玉米油进行加标实验,AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂加标量5 μg/kg,OTA和OTB加标量10 μg/kg。1.0 mL提取液中加入5.0 mL水(pH 3)和1.0 mL待评估有机溶剂(萃取剂),每组实验设置3次平行,真菌毒素加标回收率结果如图3所示。

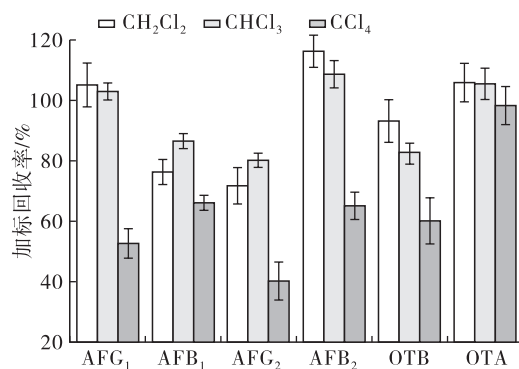


图3 DLLME不同萃取剂对食用植物油中6种真菌毒素加标回收率的影响

由图3可知: CCl_4 作为萃取剂时各真菌毒素的加标回收率除OTA高于80%外,其余均低于80%,可不予考虑;尽管 CH_2Cl_2 作为萃取剂时AFB₂、AFG₁、OTB和OTA回收率较高,但与 CHCl_3 萃取效果比较不显著, CHCl_3 作为萃取剂时AFB₁、AFG₂的加标回收率优于 CH_2Cl_2 的。因此,本实验采用 CHCl_3 作为DLLME过程的萃取剂。

2.4 柱前衍生化对真菌毒素检测信号响应的影响

对6种混合真菌毒素进行柱前衍生化,AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂质量浓度为25 μg/L,OTA和OTB质量浓度为50 μg/L,6种真菌毒素在衍生化前后的标准品色谱图比较见图4。

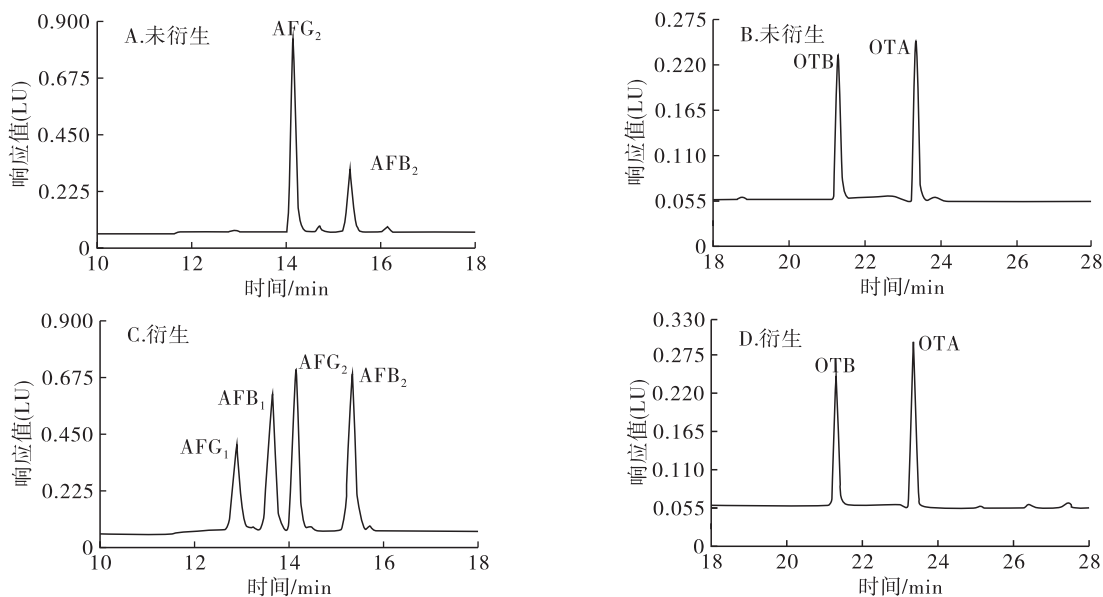


图4 6种真菌毒素标准品色谱图

由图4A和图4B可知,6种真菌毒素标准溶液未进行柱前衍生化直接检测时得到的色谱图中,AFG₂、AFB₂、OTA和OTB均有较高的荧光响应,而AFG₁和AFB₁荧光响应非常弱,在色谱图中几乎看不到二者的色谱峰。由图4C和图4D可知,6种真菌毒素的标准溶液进行柱前衍生化后,AFB₁和AFG₁的荧光信号大幅增强,其他4种真菌毒素的荧光信号除了AFB₂有增加外,其余3种没有明显变化。AFB₁和

AFG₁在紫外光照射下能发生光化学反应产生具有强荧光的产物,从而使荧光信号大幅度的增强,实现10⁻⁹级的定量检测^[20]。本实验利用这一特性,采用柱前衍生化对AFB₁和AFG₁进行处理,从而能对其进行有效的测定。

2.5 线性范围、检出限和定量限

用HPLC-FLD在最优条件下测定配制的系列质量浓度标准溶液并绘制标准曲线。结果见表3。

表3 6种真菌毒素的线性回归方程、相关系数、检出限及定量限

真菌毒素	线性范围/($\mu\text{g/L}$)	线性方程	相关系数(R^2)	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	定量限/($\mu\text{g/kg}$)
AFB ₁	1~50	$y = 0.1476x - 0.0262$	0.9993	0.2	0.6
AFB ₂	1~50	$y = 0.1617x - 0.0475$	0.9991	0.2	0.6
AFG ₁	1~50	$y = 0.1266x - 0.0571$	0.9991	0.2	0.6
AFG ₂	1~50	$y = 0.1379x - 0.0249$	0.9994	0.2	0.6
OTA	2~100	$y = 0.0230x - 0.0209$	0.9994	0.5	1.5
OTB	2~100	$y = 0.0160x - 0.0023$	0.9994	0.5	1.5

由表3可知,AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂及OTA、OTB分别在1~50 $\mu\text{g/L}$ 、2~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内线性关系良好, R^2 均大于0.999,方法检出限(以信噪比 ≥ 3 计)为0.2~0.5 $\mu\text{g/kg}$,定量限(以信噪比 ≥ 10 计)为0.6~1.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.6 回收率与精密度

在空白玉米油、空白大豆油、空白菜籽油、空白调和油、空白花生油样品中加入高、中、低3个加标

量的混合标准溶液,在最优条件下对加标样品进行提取、萃取、衍生化处理等,经HPLC-FLD进行分析,每个加标水平进行6次重复实验,计算加标回收率和精密度,结果见表4。由表4可知,5种油样中6种真菌毒素3个添加水平下的回收率在75.88%~105.25%之间,相对标准偏差(RSD)在0.5%~9.5%之间,说明该方法对AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA和OTB有良好的准确度和精密度。

表4 5种油样中6种真菌毒素加标回收率及相对标准偏差($n=6$)

真菌毒素	加标量/ ($\mu\text{g/kg}$)	大豆油		花生油		玉米油		调和油		菜籽油	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
AFB ₁	2	78.35	1.3	84.46	2.8	78.46	3.5	80.76	2.8	76.52	1.2
	5	82.48	5.2	90.62	0.8	85.46	2.1	85.42	2.4	80.86	5.4
	10	82.38	1.8	82.75	2.2	83.63	2.8	90.43	1.1	84.48	4.1
AFB ₂	2	76.79	1.2	80.40	1.7	82.38	6.5	75.88	1.0	78.34	9.5
	5	83.56	4.8	81.34	5.3	78.24	1.1	84.12	8.4	79.21	5.1
	10	86.32	3.6	83.26	4.1	76.58	4.3	80.98	1.3	82.72	4.2
AFG ₁	2	83.78	1.7	86.12	2.5	82.36	6.8	79.12	8.8	78.89	1.3
	5	83.54	6.2	80.52	6.4	79.67	1.2	92.45	6.2	89.45	1.6
	10	85.42	0.9	83.54	1.7	83.82	2.5	87.12	7.5	98.74	1.2
AFG ₂	2	98.21	2.3	101.98	1.8	76.56	2.8	86.36	1.2	85.31	4.2
	5	84.81	7.2	94.31	4.4	80.82	5.1	103.21	6.1	78.35	4.7
	10	76.85	4.6	83.58	7.2	86.74	7.1	80.89	5.1	89.54	1.1
OTA	4	90.32	2.3	78.74	2.8	92.48	4.2	90.49	2.8	82.43	6.8
	10	95.04	4.5	102.32	5.1	105.25	0.5	84.25	5.2	90.02	3.2
	20	103.21	1.9	95.44	1.4	90.06	7.2	85.56	4.8	105.12	4.2
OTB	4	80.43	0.6	83.19	4.9	86.35	1.4	82.75	1.2	89.78	2.4
	10	89.78	1.3	79.22	5.8	82.24	2.3	101.22	1.6	86.28	6.6
	20	102.56	3.5	82.82	4.1	95.23	4.2	92.88	4.6	90.13	6.2

2.7 实际样品的测定

2019年实验室采用该方法对食品安全风险监

测中28个食用油样品(包括玉米油、花生油、大豆油、菜籽油和调和油)进行6种真菌毒素测定,结果

见表5。由表5可知,在9个食用油样品中检出 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA 和 OTB 6 种真菌毒素(并不是每个油样都同时检出6种真菌毒素),检出率达到32.14%。其检出样品中 AFB₁ 的检出率为14.29%,含量为0.601~2.620 μg/kg; AFB₂ 的

检出率为3.57%,含量为0.745 μg/kg; AFG₁ 的检出率为3.57%,含量为0.751 μg/kg; AFG₂ 的检出率为10.71%,含量为0.618~0.775 μg/kg; OTA 的检出率为7.14%,含量为3.330~4.387 μg/kg; OTB 的检出率为25.00%,含量为1.519~4.644 μg/kg。

表5 28个食用油样品中真菌毒素 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA 和 OTB 的含量 μg/kg

样品编号	样品	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA	OTB
1	花生油	1.329	ND	ND	0.775	ND	3.331
2	花生油	2.620	0.745	0.751	0.618	ND	ND
3	玉米油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	玉米油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	玉米油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	1.519
9	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
11	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	1.956
16	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	大豆油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	菜籽油	0.685	ND	ND	ND	ND	ND
20	菜籽油	0.601	ND	ND	ND	4.387	3.269
21	菜籽油	ND	ND	ND	ND	ND	1.644
22	菜籽油	ND	ND	ND	ND	3.330	4.644
23	菜籽油	ND	ND	ND	0.681	ND	1.581
24	菜籽油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
25	调和油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	调和油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
27	调和油	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28	调和油	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注: ND 表示未检出。

3 结论

以加标回收率为指标,优化了6种真菌毒素 HPLC 同步检测的分析条件,探究了前处理步骤中提取液及比例、萃取剂、提取方式以及流动相梯度洗脱条件、流动相等对真菌毒素 HPLC 检测的影响。前处理最优条件为:乙腈-水-乙酸(体积比84:15:1)作为提取液、超声作为提取方式以及 CHCl₃ 作为 DLLME 过程的萃取剂。HPLC 分析最优条件为:流动相 A 甲醇,流动相 B 0.05% 甲酸,采用梯度洗脱,流速 0.6 mL/min, AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 激发波长为 365 nm,发射波长为 460 nm,OTA 和 OTB 激发波长为 327 nm,发射波

长为 460 nm。在最优条件下6种真菌毒素线性关系良好, R^2 均大于 0.999,方法检出限为 0.2~0.5 μg/kg,定量限为 0.6~1.5 μg/kg;样品的平均加标回收率为 75.88%~105.25%,相对标准偏差为 0.5%~9.5%。该方法可有效同步检测6种真菌毒素。

采用该方法对市售的28个食用植物油样品进行了检测,检出含有 AFB₁ 的样品4个,含有 AFB₂ 和 AFG₁ 的样品各1个,含有 AFG₂ 的样品3个,含有 OTA 和 OTB 的样品分别为2个和7个。本方法可有效、准确地定性定量分析食用植物油中的6种真菌毒素。

参考文献:

- [1] HIDALGO - RUIZ J L, ROMERO - GONZÁLEZ R, VIDAL J L M, 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 Chem*, 2019, 288: 22 - 28.
- [2] 王丽娟, 李超, 陈嘉杰, 等. QuEChERS 结合高效液相色谱 - 串联质谱法测定粮谷中 16 种真菌毒素 [J]. *酿酒科技*, 2020(23): 86 - 92.
- [3] 刘伟伟, 孙秀兰, 张银志, 等. 超顺磁性免疫磁珠体系用于植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的检测研究 [J]. *分析测试学报*, 2011, 30(12): 1345 - 1350.
- [4] 邓春丽, 李承龙, 谢丹, 等. 植物油中赭曲霉毒素和伏马毒素的污染调查分析 [J]. *卫生研究*, 2016, 45(6): 1007 - 1009.
- [5] 李双青, 李晓敏, 张庆合. 植物油中真菌毒素检测技术的研究进展 [J]. *色谱*, 2019, 37(6): 569 - 580.
- [6] 胡文彦, 许磊, 杨军, 等. 基于 QuEChERS 提取的快速液相色谱 - 串联质谱法测定婴幼儿谷基辅助食品中的 9 种真菌毒素 [J]. *色谱*, 2014, 32(2): 133 - 138.
- [7] ZHANG H X, LIU Q F, ZIMMERMAN L J, et al. Methods for peptide and protein quantitation by liquid chromatography - multiple reaction monitoring mass spectrometry [J/OL]. *Mol Cell Proteomics*, 2011, 10(6): M110.006593[2020 - 02 - 22]. <http://www.mcponline.org/cgi/doi/10.1074/mcp.M110.006193>.
- [8] OMURTAG G Z, BEYOGLU D. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in Turkey detected by HPLC [J]. *Food Control*, 2007, 18(2): 163 - 166.
- [9] 宋月, 吴平谷, 胡争艳, 等. 复合柱净化 - 超高效液相色谱串联质谱法测定植物油及谷类制品中玉米赤霉烯酮和 α - 玉米赤霉烯醇 [J]. *卫生研究*, 2018, 47(4): 615 - 620.
- [10] 邵瑞婷, 张丽华, 史娜, 等. 免疫亲和净化 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定食品中玉米赤霉烯酮类真菌毒素 [J]. *食品科学*, 2017, 38(16): 274 - 279.
- [11] 王丽英, 任贝贝, 路杨, 等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法检测玉米油中的黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(12): 3924 - 3928.
- [12] 吴亚凉, 熊丽云, 潘建伟. 超高效液相色谱 - 三重四级杆质谱串联法测定粮谷中的玉米赤霉烯酮类真菌毒素的研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2018(8): 58 - 61.
- [13] RODRÍGUEZ - CARRASCO Y, BERRADA H, FONT G, et al. Multi - mycotoxin analysis in wheat semolina using an acetonitrile - based extraction procedure and gas chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1270: 28 - 40.
- [14] RODRÍGUEZ - CARRASCO Y, MOLTÓ J C, MANES J, et al. Exposure assessment approach through mycotoxin/creatinine ratio evaluation in urine by GC - MS/MS [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 72: 69 - 75.
- [15] 周妍, 张圆圆, 刁晨曦, 等. 玉米赤霉烯酮检测方法的研究进展 [J]. *中国饲料*, 2017(16): 35 - 39.
- [16] SHIZUKA S S, NAO K, KOUJI S, et al. Development of an analytical method for determination of total ethofumesate residues in foods by gas chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2020, 313: 126 - 132.
- [17] KAZUTAKA T, KUNINORI M, SETSUKO K, et al. Systematic approach to optimize a pretreatment method for ultrasensitive liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis of multiple target compounds in biological samples [J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(16): 3212 - 3220.
- [18] 吴宇, 叶金, 张冰, 等. 稳定同位素稀释 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法快速测定植物油中 16 种真菌毒素 [J]. *分析化学*, 2018, 46(6): 975 - 984.
- [19] 赵晓娟, 洗燕萍, 罗海英, 等. 液相色谱 - 串联质谱法同时检测花生油中 4 种黄曲霉毒素 [J]. *食品科学*, 2011, 32(14): 194 - 197.
- [20] 张成. 中药中多种真菌毒素同步检测及黄曲霉毒素 B₁ 快速检测新技术研究 [D]. 江苏镇江: 江苏大学, 2018.