

QuEChERS – 超高效液相色谱 – 串联质谱法 测定酥油中 17 种真菌毒素

严晓贤^{1,2}, 吴兴强¹, 夏 寒^{1,2}, 仝凯旋¹, 常巧英¹, 范春林¹, 朱浙辉³, 陈 辉¹

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176; 2. 河北大学 化学与材料科学学院, 河北 保定 071002;

3. 西藏自治区产品质量监督检验所, 拉萨 850000)

摘要:旨在为酥油中真菌毒素污染风险的监测与防控提供技术支撑, 建立了 QuEChERS 技术结合超高效液相色谱 – 串联质谱法 (UPLC – MS/MS) 测定酥油中 17 种真菌毒素的检测方法。酥油样品经过 3% 甲酸水和 3% 甲酸乙腈溶液分步提取后, 加入 MgSO_4 和 NaCl 进行盐析处理, 通过 0 °C 低温离心和正己烷除脂, 以 N – 丙基乙二胺 (PSA) 和十八烷基键合硅胶 (C18) 吸附剂作为净化填料净化后, 经 ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) 实现分离, 采用多反应监测 (MRM) 模式检测, 基质匹配曲线外标法定量。结果表明: 17 种真菌毒素在相应质量浓度范围内呈良好的线性关系, 决定系数 (R^2) 均大于 0.999 1, 该方法的检出限 (LOD) 为 0.15 ~ 3.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限 (LOQ) 为 0.50 ~ 10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 在 1、2、10 倍 LOQ 加标水平下, 17 种真菌毒素的回收率为 72.3% ~ 112.2%, 相对标准偏差 (RSD) 均不大于 8.0%; 应用该方法对 20 批次酥油样品进行检测, 在 3 批次样品中检出了伏马毒素 B₂, 2 批次样品中检出 T – 2 毒素。综上, 该方法具有灵敏度高, 准确度高的特点, 可作为酥油中真菌毒素的日常监测方法。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱 – 串联质谱; 酥油; 真菌毒素

中图分类号: TS225.2; TS227 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003 – 7969 (2025) – 07 – 0130 – 08

Determination of 17 mycotoxins in ghee by QuEChERS – ultra – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry

YAN Xiaoxian^{1,2}, WU Xingqiang¹, XIA Han^{1,2}, TONG Kaixuan¹,
CHANG Qiaoying¹, FAN Chunlin¹, ZHU Zhehui³, CHEN Hui¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. College of Chemistry and Materials Science, Hebei University, Baoding 071002, Hebei, China; 3. Xizang Autonomous Region Product Quality Supervision and Inspection Institute, Lhasa 850000, China)

Abstract: In order to provide technical support for the monitoring, prevention and control of the risk of mycotoxin contamination in ghee, a method for the determination of 17 mycotoxins in ghee by QuEChERS technique combined with ultra – high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC – MS/MS) was developed. The ghee sample was extracted with 3% formic acid in water and 3% formic acid in acetonitrile in a stepwise manner, and then salted with MgSO_4 and NaCl . After centrifugation at 0 °C and defatting with *n* – hexane, the extract was purified with N – propylethylenediamine (PSA)

and octadecylsilyl silica gel (C18) to obtain the test sample. The test sample was then analyzed on an ACQUITY UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) column to achieve the separation, and detected in multiple reaction monitoring (MRM) mode and quantified by standard method with matrix matching curve external. The results

收稿日期: 2024 – 04 – 18; 修回日期: 2025 – 03 – 31

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目 (2023JK001)

作者简介: 严晓贤 (1997), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测 (E-mail) yan_xiaoxian@163.com。

通信作者: 陈 辉, 研究员, 博士 (E-mail) ciquhuichen@163.com; 朱浙辉, 副研究员 (E-mail) 13518906214@163.com。

showed that the 17 mycotoxins demonstrated good linearity in the corresponded mass concentration ranges with the coefficients of determination (R^2) greater than 0.999 1. The limits of detection (LOD) and the limits of quantification (LOQ) of the method were in the range of 0.15 – 3.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.50 – 10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The recoveries of the 17 mycotoxins ranged from 72.3% to 112.2% at 1, 2 and 10 times LOQ spiked levels with relative standard deviations (RSD) less than 8.0%. Twenty batches of ghee samples were analyzed and tested by this method, and fumonisin B₂ was detected in three batches, while T – 2 toxin was detected in two batches. In summary, the method is sensitive, accurate, and effective for routine monitoring of mycotoxins in ghee.

Key words: QuEChERS; UPLC – MS/MS; ghee; mycotoxin

酥油是通过热鲜奶(牦牛奶或羊奶)加入盐后在木桶中反复搅打数百次,待油水分离后取出上层淡黄色油脂并冷却制成的。酥油作为西藏饮食文化的重要组成部分,是当地人民生活中不可或缺的食品^[1]。研究表明,我国饲草(料)样品中可能存在多种真菌毒素污染,例如杂色曲霉毒素(STE)、赭曲霉毒素 A(OTA)、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮(ZEN)、黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素 G₂(AFG₂)等^[2]。这些真菌毒素能够通过食物链污染鲜奶,并且即使经过高温或杀菌处理,也无法被有效破坏。真菌毒素能够对人体的肾脏、肝脏、胃肠道等造成破坏,具有致癌、致畸、致突变、免疫毒性等多种危害,严重威胁人类健康安全^[3-4]。此外,市售酥油多以纸质包装、塑料桶包装等形式储存于室温或冰箱中,但由于储运条件(如温度、湿度等)的影响,酥油易受到真菌毒素的污染^[5]。因此,酥油在生产、加工和储运过程中均存在被真菌毒素污染的风险,需引起重视。

目前,国内外常用的真菌毒素检测方法包括薄层色谱法(TLC)^[6]、液相色谱 – 串联质谱法(LC – MS/MS)^[7]、酶联免疫吸附法(ELISA)^[8]等。其中 LC – MS/MS 具有分离能力强、灵敏度高、抗干扰能力强及稳定性好等优点,已成为食品中真菌毒素检测的主要方法^[9]。例如,GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》^[10]中第一法至第三法均采用高效液相色谱 – 串联质谱法对目标物进行检测。作为一种样品前处理方法,QuEChERS 技术具有高效、快速、简便和低成本的优势,已被广泛用于食品中真菌毒素检测领域。Pinto 等^[11]采用 QuEChERS – LC – MS/MS 同时测定植物奶中的 9 种真菌毒素,该方法相较于免疫亲和柱法成本更低,且无需烦琐的净化和预浓缩步骤。Rodríguez – Cañas 等^[12]通过优化 QuEChERS 提取净化和超高效液相色谱 – 串联质谱法(UPLC – MS/

MS)检测相结合的方法,实现了对奶酪中 32 种真菌毒素的定量定性分析,该方法具有较高的精密度和准确度,并成功应用于 38 批市售奶酪样品的检测。目前真菌毒素的检测主要集中在粮谷、饲料、乳品和中药材等基质^[13-14],针对酥油中真菌毒素的检测鲜有报道。因此,亟需开发一种适用于酥油中多种真菌毒素的检测方法,以期对酥油的安全性评估和日常监测提供可靠依据。

本文以乳及乳制品中常检出的 17 种真菌毒素^[15-16]作为研究对象,通过优化 QuEChERS 前处理和 UPLC – MS/MS 测定条件建立了一种针对酥油中 17 种真菌毒素的检测方法,以期对酥油中真菌毒素污染风险的监测与防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料与试剂

酥油,西藏本地市场;乙腈、甲醇、乙酸,色谱纯,美国 Thermo Fisher 公司;甲酸、甲酸铵,质谱级,上海麦克林生化科技股份有限公司;氯化钠、无水硫酸镁,分析纯,西陇科学股份有限公司;N – 丙基乙二胺(PSA)、十八烷基键合硅胶(C18),上海安谱实验科技股份有限公司。

14 种真菌毒素单标溶液(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,纯度 $\geq 95\%$),分别为 AFB₁、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)、AFG₂、黄曲霉毒素 M₁(AFM₁)、伏马毒素 B₁(FB₁)、伏马毒素 B₂(FB₂)、T – 2 毒素(T – 2)、OTA、柄曲霉素(ST)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、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)、ZEN; 3 种真菌毒素单标溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,纯度 $\geq 95\%$),分别为 HT – 2 毒素(HT – 2)、STE、新茄病镰刀菌烯醇(NEO),天津阿尔塔科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

Waters ACQUITY 超高效液相色谱仪联用 Xevo

TQ-S Cronos 三重四极杆质谱仪,美国 Waters 公司; Milli-Q 超纯水机,美国 Millipore 公司; N-EVAP112 氮吹浓缩仪,美国 Organomation Associates 公司; SR-2DS 型水平振荡器,日本 TATEC 公司; Allegra X-30R 离心机,美国 Beckman Coulter 公司; PL602-L 电子天平,瑞士 Mettler-Toledo 公司; SYZDQ-001 水浴恒温振荡器,中国荣华仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液配制

混合标准储备液:分别准确移取 0.10 mL 14 种各真菌毒素标准溶液于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,摇匀后得到质量浓度为 10.0 mg/L 混合标准储备液,于 4℃ 避光保存。

混合标准工作液:分别准确移取 1.00 mL 混合标准储备液和 0.10 mL 3 种真菌毒素标准溶液于同一 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成质量浓度为 1.00 mg/L 的混合标准工作液,于 4℃ 避光保存。

1.2.2 样品前处理

将酥油于 45℃ 水浴加热熔化为液态,精确称取 2.00 g 液态酥油于 50 mL 离心管中,加入 1 颗均质转子,加入 15 mL 3% (体积分数) 甲酸水溶液,45℃ 恒温振荡 10 min,加入 10 mL 3% (体积分数) 甲酸乙腈溶液、1.0 g NaCl 和 4.0 g MgSO₄,涡旋振荡 5 min,离心 (10 000 r/min, 0℃) 10 min。取上清液于 50 mL 离心管内,再加入 4.0 mL 正己烷涡旋 1 min,离心 5 min (10 000 r/min) 后,弃去上层正己烷层,取下层乙腈层至 15 mL 离心管 (含 900 mg MgSO₄, 200 mg C18, 100 mg PSA) 内,涡旋振荡 5 min,离心 5 min (10 000 r/min)。取上清液于 10 mL 玻璃离心管内,40℃ 水浴氮吹至干后,用 1.0 mL 甲醇-水溶液 (体积比 3:2) 超声复溶,经 0.22 μm 滤膜过滤后,供 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.3 UPLC-MS/MS 条件

UPLC 条件: ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40℃; 进样量 2 μL; 流速 0.3 mL/min; 流动相 A 为 0.1% 甲酸水 (含 2 mmol/L 甲酸铵) 溶液, 流动相 B 为甲醇; 梯度洗脱程序为 0~0.2 min 2% B, 0.2~1.5 min 2%~30% B, 1.5~3.0 min 30%~40% B, 3.0~4.5 min 40%~45% B, 4.5~7.5 min 45%~65% B, 7.5~9.0 min 65%~98% B, 9.0~11.0 min 98% B, 11.01~15.0 min 2% B。

MS 条件: 电喷雾离子源, 正离子扫描 (ESI⁺); 离子源温度 150℃; 电喷雾电压 2.0 kV; 脱溶剂气温度 550℃; 脱溶剂气流速 800 L/h; 锥孔气流速 50 L/h; 多重反应监测 (MRM) 模式。

采用保留时间定性, 外标法定量。

2 结果与分析

2.1 MS 条件的优化

本研究采用直接进样的方式, 将质量浓度为 100 μg/mL 的单标溶液注入 MS 仪中, 在正离子电喷雾模式下对真菌毒素的 MS 条件进行优化。在全扫描 (MS Scan) 模式下, 对母离子的锥孔电压进行优化, 以得到最优的响应值。在最优锥孔电压条件下, 通过子离子扫描 (Daughter Scan) 模式进行二级 MS 扫描得到子离子, 对子离子的碰撞能进行优化, 选择两个具有较好峰型和响应值的子离子作为定性离子和定量离子。优化后 17 种真菌毒素的保留时间和 MS 参数见表 1。

表 1 17 种真菌毒素的保留时间和 MS 参数

Table 1 Retention time and mass spectrometry parameters of 17 mycotoxins

化合物	保留时间/ min	离子对 (m/z)	碰撞能/ eV	锥孔电压/ V
15-ADON	4.83	339.1/137.1 [*] 339.1/261.1	9,10	50
3-ADON	4.81	339.1/231.1 [*] 339.1/203.1	10,15	55
AFB ₁	6.60	313.1/285.1 [*] 313.1/241.1	30,50	25
AFB ₂	6.14	315.1/259.0 [*] 315.1/287.1	40,35	25
AFG ₁	5.73	329.1/243.1 [*] 329.1/311.0	20,25	20
AFG ₂	5.31	331.1/313.2 [*] 331.1/245.1	25,25	25
AFM ₁	5.39	329.1/273.0 [*] 329.1/259.0	22,23	30
DON	3.41	297.1/249.0 [*] 297.1/203.0	10,16	20
FB ₁	8.82	722.4/334.4 [*] 722.4/352.3	40,36	40
FB ₂	9.73	706.4/336.3 [*] 706.4/318.3	36,38	40
HT-2	8.45	442.3/215.1 [*] 442.3/263.1	10,10	20
NEO	4.12	400.2/305.1 [*] 400.2/184.9	12,20	10
OTA	9.73	404.1/239.1 [*] 404.1/221.0	19,39	20

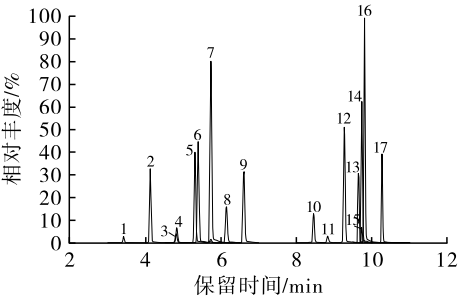
续表 1

化合物	保留时间/ min	离子对(<i>m/z</i>)	碰撞能/ eV	锥孔电压/ V
STE	9.80	325.1/310.0 [*]	25,26	22
		325.1/281.1		
T-2	9.27	484.2/305.1 [*]	15,22	20
		484.2/215.1		
ZEN	9.64	319.2/283.2 [*]	10,19	20
		319.2/187.1		
ST	10.27	386.3/178.2 [*]	40,30	80
		386.3/150.2		

注: * 表示定量离子
Note: *. Quantitative ions

2.2 UPLC 条件的优化

流动相的选择对目标物的分离和检测至关重要,由于所有目标化合物均在正离子扫描模式下检测,因此可在流动相中加入适量的甲酸(促进质子化)和甲酸铵(增强信号稳定性),从而改善峰型,提高目标化合物的响应值、灵敏度和离子化效率^[17]。基于目标化合物易溶于甲醇或水的特性,本文考察了甲醇-0.01% 甲酸水(含 2 mmol/L 甲酸铵)、甲醇-0.1% 甲酸水(含 2 mmol/L 甲酸铵)、甲醇-0.2% 甲酸水(含 2 mmol/L 甲酸铵)、甲醇-0.1% 甲酸水(含 5 mmol/L 甲酸铵)4 组不同流动相对 17 种真菌毒素的分离效果、响应值和峰型的影响。结果发现:随着水相中甲酸体积分数的增加,FB₁ 和 FB₂ 响应值增加且峰型改善,但当甲酸体积分数为 0.2% 时,除 FB₁、FB₂ 外,AFB₁ 等其他真菌毒素响应值降低;在甲酸体积分数为 0.1% 时,与甲酸铵浓度为 2 mmol/L 相比,甲酸铵浓度为 5 mmol/L 时 AFB₁、FB₁、FB₂ 等真菌毒素响应值降低。因此,最终选用甲醇-0.1% 甲酸水(含 2 mmol/L 甲酸铵)作为流动相。17 种真菌毒素总离子流图如图 1 所示。



注:1. DON;2. NEO;3. 3-ADON;4. 15-ADON;5. AFG₂;6. AFM₁;7. AFG₁;8. AFB₂;9. AFB₁;10. HT-2;11. FB₁;12. T-2;13. ZEN;14. FB₂;15. OTA;16. STE;17. ST

图 1 17 种真菌毒素总离子流图
Fig.1 TIC of 17 mycotoxins

2.3 样品前处理条件的优化

2.3.1 提取条件优化

2.3.1.1 提取溶剂的选择

本研究先采用纯水对水溶性较强的真菌毒素(如 FB₁、FB₂) 进行提取,考察不同体积纯水(0、5、10、15、20 mL) 对真菌毒素回收率的影响。结果表明:不加纯水时,FB₁ 和 FB₂ 的回收率均低于 15%;随着纯水用量的增加,15-ADON、FB₁、FB₂、NEO、OTA、ST 的回收率逐渐升高,而 AFB₁、AFG₁、AFM₁、HT-2 和 STE 的回收率则逐渐降低,其余真菌毒素回收率则无明显变化;当纯水用量从 10 mL 增加至 15 mL 时,有 11 种真菌毒素的回收率增加;当纯水用量为 20 mL 时,AFB₁ 和 STE 的回收率均低于 70%。因此,综合考虑各真菌毒素的回收情况,最终选择先使用 15 mL 纯水对目标物进行第一次提取。

酥油中的成分丰富多样,包括脂肪、蛋白质、水分、还原糖等物质。其中,脂肪含量高达 83.4%^[18]。基于这些成分的特性,当选择真菌毒素提取溶剂时,乙腈显示出优越的适用性,这是由于乙腈可以减少亲脂性物质和蛋白质的提取,且具有较强提取不同极性分子的能力,已被广泛用于真菌毒素的提取^[19-20]。因此,本文选取乙腈对目标物进行二次提取。另外,根据相关文献^[21] 报道,在提取溶剂中加入适量的酸性物质,可以显著提高真菌毒素的提取效率。因此,选择添加甲酸的纯水和乙腈为提取溶剂进行目标物的提取。

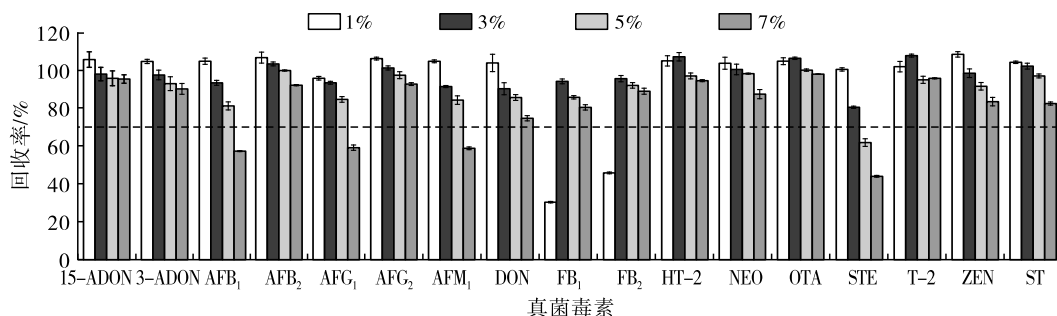
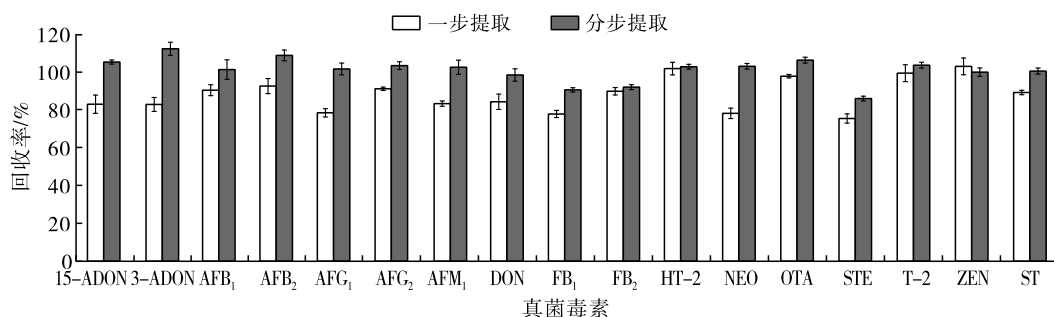
2.3.1.2 甲酸体积分数的选择

在 15 mL 甲酸水和 10 mL 甲酸乙腈溶液中,考察甲酸体积分数对真菌毒素回收率的影响,结果见图 2。

由图 2 可知,随着甲酸体积分数的增加,DON、AFB₁ 等大部分真菌毒素的回收率呈逐渐降低趋势。当甲酸体积分数小于 3% 时,FB₁ 和 FB₂ 的回收率均低于 70%,这是由于伏马毒素类物质对酸变化敏感,不加酸或较低酸量均会导致其提取效果显著降低。当甲酸体积分数大于 5% 时,STE、AFB₁、AFG₁、AFM₁ 的回收率同样低于 70%。当甲酸体积分数为 3% 时,所有真菌毒素均能得到较好的回收率(70%~120%)。因此,最终选择纯水和乙腈中甲酸体积分数为 3%。

2.3.1.3 提取方式的选择

在提取溶剂为 15 mL 3% 甲酸水和 10 mL 3% 甲酸乙腈的条件下,对比了一步提取(25 mL 体积比 40:57:3 的乙腈-水-甲酸溶液) 和分步提取(15 mL 3% 甲酸水溶液一次提取和 10 mL 3% 甲酸乙腈溶液二次提取)2 种方式对 17 种真菌毒素提取效果的影响,结果如图 3 所示。

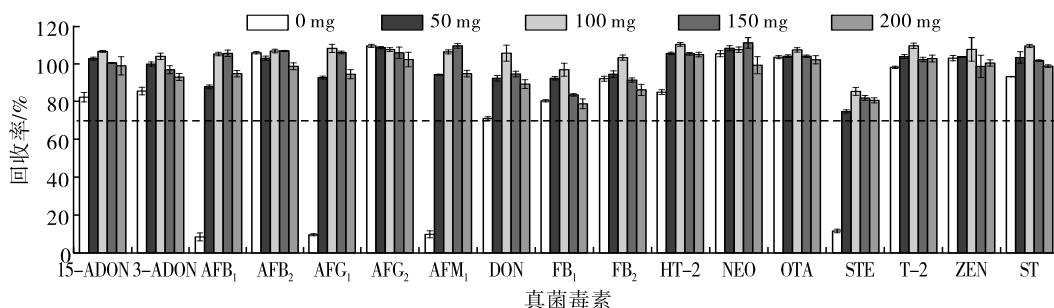
图2 甲酸体积分数对 17 种真菌毒素回收率的影响 ($n=3$)Fig. 2 Effect of formic acid volume fraction on the recovery rates of 17 mycotoxins ($n=3$)图3 提取方式对 17 种真菌毒素回收率的影响 ($n=3$)Fig. 3 Effect of extraction methods on the recovery rates of 17 mycotoxins ($n=3$)

由图 3 可知,分步提取相较于一步提取具有更佳的提取效果,能显著提高 3-ADON 和 FB_1 等大部分真菌毒素的回收率。因此,最终选择采用 15 mL 3% 甲酸水溶液一次提取和 10 mL 3% 甲酸乙腈溶液二次提取的分步提取方式。

2.3.2 净化填料优化

酥油中饱和脂肪酸与不饱和脂肪酸的比例约为 62:38^[18],鉴于饱和脂肪酸的凝固点较高,先采用 0℃ 低温高速离心初步除脂,之后再加入正己烷萃取除脂。但是,仍发现样品提取液中残留有少量油脂。因此,为了提高检测的准确度和灵敏度,减少

脂质等杂质,对样品提取液进行净化是必要的步骤。当前,常用净化吸附剂主要有 PSA、C18 等,其中 PSA 与 C18 组合的净化填料能有效去除脂肪酸、脂质等化合物^[22]。考虑到酥油成分的特殊性,选取 PSA-C18 组合作为净化填料。在酥油中真菌毒素的添加水平为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,对净化填料中的 PSA 和 C18 的含量进行优化。在 C18 含量为 150 mg 的情况下,按 1.2.2 方法进行样品前处理,考察 PSA 含量对 17 种真菌毒素回收率的影响,结果如图 4 所示。

图4 PSA 含量对 17 种真菌毒素回收率的影响 ($n=3$)Fig. 4 Effect of PSA contents on the recovery rates of 17 mycotoxins ($n=3$)

由图 4 可知,当未添加 PSA 情况下, AFB_1 、 AFG_1 、 AFM_1 和 STE 回收率均低于 20%。对于大部分真菌毒素,如 15-ADON、3-ADON、DON、 FB_1 、 FB_2 等,其回收率随着 PSA 含量增加呈先增后减的

趋势。当 PSA 含量为 100 mg 时,除 AFG_2 、 AFM_1 和 NEO 外,其余真菌毒素回收率均达到最优。因此,选取 100 mg PSA 进行后续优化。

在 PSA 含量为 100 mg 的条件下,按 1.2.2 方法

进行样品前处理,考察 C18 含量对 17 种真菌毒素回收率的影响,结果如图 5 所示。

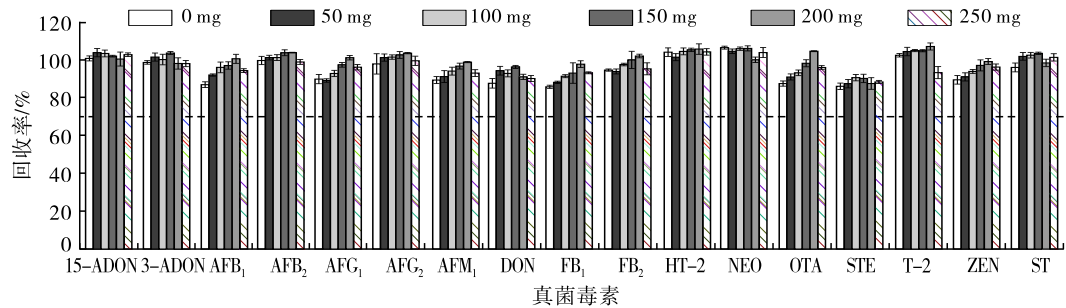


图 5 C18 含量对 17 种真菌毒素回收率的影响 (n = 3)

Fig.5 Effect of C18 contents on the recovery rates of 17 mycotoxins (n = 3)

由图 5 可知:随着 C18 含量的增加,AFB₁、AFG₂、AFM₁、FB₁、OTA、ZEN 等真菌毒素回收率呈先增加后减少的趋势;C18 含量的变化对 15-ADON、HT-2、NEO 的回收率无显著影响;当 C18 含量为 150 mg 时,3-ADON、DON、ST 的回收率达到最优,再增加 C18 用量其回收率无显著变化;AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、FB₁、FB₂、OTA、T-2、ZEN 的回收率均在 C18 含量为 200 mg 时达到最优。因此,选用 200 mg C18 作为吸附剂的最佳用量。

综上,本文最终选取 100 mg PSA 和 200 mg C18 作为净化填料。

2.4 基质效应

较强的基质效应 (ME) 会影响仪器检测的灵敏度和准确度,进而造成检测结果的偏差。因此,采用酥油空白基质提取液按 1.2.2 方法进行处理得到的上清液对该方法的 ME 进行评价。使用酥油空白基质提取液将真菌毒素混合标准工作液稀释成一系列不同质量浓度的基质标准溶液,上机测定一系列不同质量浓度的基质标准溶液和对应质量浓度的溶剂标准溶液峰面积,分别绘制基质匹配标准曲线和溶剂标准曲线。通过计算 ME 值[(基质匹配标准曲线的斜率/溶剂匹配标准曲线的斜率 - 1) × 100%]来评估酥油的 ME,结果如图 6 所示。

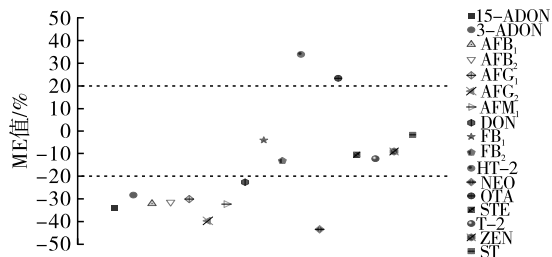


图 6 酥油基质中 17 种真菌毒素的 ME

Fig.6 Matrix effects of 17 mycotoxins in ghee matrix

由图 6 可以看出,HT-2 和 OTA 表现为基质增强现象,其余真菌毒素均表现为基质抑制现象。其中 FB₁、FB₂、STE、T-2、ZEN 和 ST 的 ME 绝对值低

于 20%,属于弱 ME,其余真菌毒素的 ME 绝对值均在 20% ~ 50% 之间,属于中等 ME。为了避免 ME,确保酥油中 17 种真菌毒素的准确定量,本文采用基质匹配标准曲线外标法进行定量分析。

2.5 方法学验证

2.5.1 线性范围、决定系数、检出限和定量限

使用酥油空白基质提取液将真菌毒素的混合标准工作液稀释成一系列不同质量浓度的基质标准溶液,以目标化合物的质量浓度 (x) 为横坐标,峰面积 (y) 为纵坐标,绘制基质匹配标准曲线,以 3 倍信噪比计算检出限 (LOD)、10 倍信噪比计算定量限 (LOQ),17 种真菌毒素的线性范围、决定系数、LOD 和 LOQ 见表 2。

表 2 17 种真菌毒素的线性范围、决定系数、LOD 和 LOQ
Table 2 Linear ranges, coefficients of determination, LOD, and LOQ of 17 mycotoxins

化合物	线性范围/ (μg/L)	决定系 数(R ²)	LOD/ (μg/kg)	LOQ/ (μg/kg)
15-ADON	2.0 ~ 200.0	0.999 7	1.50	5.00
3-ADON	2.0 ~ 200.0	0.999 1	1.50	5.00
AFB ₁	0.4 ~ 200.0	0.999 9	0.30	1.00
AFB ₂	2.0 ~ 200.0	0.999 6	1.50	5.00
AFG ₁	0.4 ~ 200.0	0.999 7	0.30	1.00
AFG ₂	0.2 ~ 200.0	0.999 8	0.15	0.50
AFM ₁	0.2 ~ 200.0	0.999 9	0.15	0.50
DON	4.0 ~ 200.0	0.999 4	3.00	10.00
FB ₁	4.0 ~ 200.0	0.999 9	3.00	10.00
FB ₂	0.4 ~ 200.0	0.999 2	0.30	1.00
HT-2	0.4 ~ 200.0	0.999 1	0.30	1.00
NEO	0.8 ~ 200.0	0.999 3	0.60	2.00
OTA	0.2 ~ 200.0	0.999 8	0.15	0.50
STE	0.4 ~ 200.0	0.999 7	0.30	1.00
T-2	0.2 ~ 200.0	0.999 9	0.15	0.50
ZEN	0.8 ~ 200.0	0.999 6	0.60	2.00
ST	0.2 ~ 200.0	0.999 6	0.15	0.50

由表 2 可看出,17 种真菌毒素在相关质量浓度范围内获得的基质标准曲线的线性关系良好, R^2 在 0.999 1~0.999 9 之间,LOD 和 LOQ 的范围分别为 0.15~3.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.50~10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》^[23] 中对乳及乳制品仅对 AFM₁ 进行了限量要求,为不大于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$,对动物油脂的真菌毒素含量未设定限量要求,而本研究中 AFM₁ 的 LOD 为 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$,LOQ 为 0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,表明该方法能够满足酥油中真菌毒素日常监测要求。

2.5.2 回收率和精密度

通过向酥油样品中分别添加 1、2、10 倍 LOQ 水平的混合标准工作液进行空白加标实验,计算回收率和相对标准偏差(RSD),考察方法的准确度与精密度,结果如表 3 所示。

表 3 酥油中真菌毒素的加标回收率和 RSD

Table 3 Recovery rate and RSD of mycotoxins in ghee %

化合物	1 倍 LOQ		2 倍 LOQ		10 倍 LOQ	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
15-ADON	88.3	1.8	104.5	3.9	105.2	4.1
3-ADON	75.2	0.4	91.4	4.6	112.2	0.6
AFB ₁	97.9	3.2	91.7	2.4	87.6	8.0
AFB ₂	75.6	1.9	87.0	6.0	108.7	2.6
AFG ₁	94.6	1.3	82.1	2.0	88.8	3.7
AFG ₂	103.5	2.8	91.9	3.2	105.3	2.3
AFM ₁	101.4	1.2	100.8	2.3	104.9	1.3
DON	84.3	3.9	93.6	3.9	92.5	1.8
FB ₁	103.7	2.9	82.1	1.6	83.6	1.3
FB ₂	97.6	2.4	86.6	1.8	104.2	2.6
HT-2	84.3	2.7	100.8	0.2	94.2	3.0
NEO	100.8	1.9	110.2	1.2	95.0	4.1
OTA	87.4	6.3	103.2	3.8	107.6	1.3
STE	75.6	4.6	76.7	4.8	72.3	4.5
T-2	100.6	5.7	101.5	1.0	105.7	1.9
ZEN	107.0	1.8	96.6	6.8	90.8	1.9
ST	97.8	2.7	91.5	2.4	103.6	1.6

由表 3 可知,17 种真菌毒素在 1、2、10 倍 LOQ 加标水平下的回收率范围分别为 75.2%~107.0%、76.7%~110.2%、72.3%~112.2%,RSD 均不大于 8.0%。结果表明,该方法具有良好的准确度和精密度。

2.6 实际样品检测

采用本文建立的方法对市售 20 批酥油样品中的 17 种真菌毒素进行检测,结果共有 5 批次样品中检测出真菌毒素,其中 3 批次样品检出 FB₂,含量范

围为 2.73~2.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$,2 批次样品中检出 T-2,含量分别为 0.54 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其他真菌毒素均未检出。鉴于所检出的真菌毒素在 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中未设定明确的限量标准,且可能存在潜在的健康风险。因此,有必要对酥油中的真菌毒素污染物进行有效风险监测,从而确保酥油食品质量安全,保障消费者的健康权益。

3 结论

本文建立了 QuEChERS 结合 UPLC-MS/MS 同时测定酥油中 17 种真菌毒素的方法。该方法中样品经过 3% 甲酸水和 3% 甲酸乙腈溶液分步提取后,提高了不同极性真菌毒素的提取效率,并通过 0℃ 低温离心和加入正己烷的方式,有效减少了样品提取液中脂质含量,采用 PSA 和 C18 为组合的填料净化,进一步降低了基质效应。所建方法表现出令人满意的线性范围、LOD、LOQ、回收率和精密度,满足真菌毒素检测技术要求。该方法简单快速、准确可靠,并有效降低了基质效应的干扰,对酥油中真菌毒素的风险防范以及日常监测具有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 喻峰,熊华,吕培蕾. 西藏牦牛酥油脂肪酸成分分析及功能特性评价[J]. 中国油脂, 2006, 31(11): 35-38.
- [2] 魏娜. 拉萨主要饲草(料)真菌毒素污染现状[J]. 饲料研究, 2019, 42(10): 79-82.
- [3] ROCCHETTI G, GHILARDELLI F, BONINI P, et al. Changes of milk metabolomic profiles resulting from a mycotoxins-contaminated corn silage intake by dairy cows [J/OL]. Metabolites, 2021, 11(8): 475 [2024-04-18]. <https://doi.org/10.3390/metabo11080475>.
- [4] STOEVE S D. Food security, underestimated hazard of joint mycotoxin exposure and management of the risk of mycotoxin contamination[J/OL]. Food Control, 2024, 159: 110235 [2024-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110235>.
- [5] 达娃卓玛. 浅谈酥油生产过程中微生物污染及防控[J]. 西藏农业科技, 2015, 37(3): 6-8.
- [6] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素 B₁[J]. 现代畜牧科技, 2018(8): 20.
- [7] STEINER D, MALACHOVÁ A, SULYOK M, et al. Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants[J]. Anal Bioanal Chem, 2021, 413(1): 25-34.
- [8] 李靖靖. 酶联免疫吸附法在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2023(30): 154-156.
- [9] ABOU DIB A, ASSAF J C, DEBS E, et al. A comparative

- review on methods of detection and quantification of mycotoxins in solid food and feed: A focus on cereals and nuts[J]. *Mycotoxin Res*, 2023, 39(4): 319–345.
- [10] 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定: GB 5009.22—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [11] PINTO L, SANTOS A, VARGAS E, et al. Validation of an analytical method based on QuEChERS and LC-MS/MS to quantify nine mycotoxins in plant-based milk[J]. *World Mycotoxin J*, 2021, 14(3): 339–346.
- [12] RODRÍGUEZ-CAÑAS I, GONZÁLEZ-JARTÍN J M, ALVARIÑO R, et al. Detection of mycotoxins in cheese using an optimized analytical method based on a QuEChERS extraction and UHPLC-MS/MS quantification[J/OL]. *Food Chem*, 2023, 408: 135182 [2024-04-18]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135182>.
- [13] BOSHRA M H, EL-HOUSSEINY G S, FARAG M M S, et al. Innovative approaches for mycotoxin detection in various food categories[J/OL]. *AMB Express*, 2024, 14(1): 7 [2024-04-18]. <https://doi.org/10.1186/s13568-024-01662-y>.
- [14] QU X, WANG P, ZHU K. Research progress in simultaneous detection of mycotoxins in traditional Chinese medicine[C/OL]//SHS web conference. *Les Ulis: EDP Sciences*, 2023, 179: 05002 [2024-04-18]. <https://doi.org/10.1051/shsconf/202317905002>.
- [15] FLORES-FLORES M E, GONZÁLEZ-PEÑAS E. An LC-MS/MS method for multi-mycotoxin quantification in cow milk[J]. *Food Chem*, 2017, 218: 378–385.
- [16] 何卓霖, 穆蕾, 王涛, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速测定乳及乳制品中 21 种真菌毒素[J]. *食品工业科技*, 2022, 43(6): 302–310.
- [17] 李蓉, 何春梅, 杨璐齐, 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焙烤食品及其原料中 11 种真菌毒素[J]. *色谱*, 2017, 35(8): 808–815.
- [18] 李赵敏, 祝亚辉, 杨林, 等. 酥油真空包装贮藏基本营养成分和脂肪酸含量变化研究[J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(8): 15–17, 28.
- [19] 瞿广胜, 李显娉, 徐林, 等. QuEChERS-UPLC-MS/MS 法测定豆类及制品中 6 种真菌毒素[J]. *贵州农业科学*, 2021, 49(6): 99–107.
- [20] 秦富, 汪文龙, 钟佳静, 等. QuEChERS-液相色谱-串联质谱测定坚果中 40 种真菌毒素[J]. *中国口岸科学技术*, 2023, 5(1): 40–52.
- [21] JO H W, PARK M K, HEO H M, et al. Simultaneous determination of 13 mycotoxins in feedstuffs using QuEChERS extraction[J/OL]. *Appl Biol Chem*, 2021, 64(1): 34 [2024-04-18]. <https://doi.org/10.1186/s13765-021-00602-9>.
- [22] 钟冬莲, 岳超, 喻宁华, 等. QuEChERS-高效液相色谱/串联质谱法同时测定茶油中 21 种农药残留[J]. *分析试验室*, 2021, 40(10): 1201–1205.
- [23] 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.
-
- (上接第 129 页)
- [5] CALEB J, ALSHANA U. Supramolecular solvent-liquid-liquid microextraction followed by smartphone digital image colorimetry for the determination of curcumin in food samples[J/OL]. *Sustain Chem Pharm*, 2021, 21: 100424 [2024-03-23]. <https://doi.org/10.1016/j.secp.2021.100424>.
- [6] FIRDAUS M, APRIAN A, MEILEZA N, et al. Smartphone coupled with a paper-based colorimetric device for sensitive and portable mercury ion sensing[J/OL]. *Chemosensors*, 2019, 7(2): 25 [2024-03-23]. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7020025>.
- [7] 薛斌, 徐斐, 曹文明. 特异性定量测定油脂和含油食品酸价的新铜皂比色法[J]. *中国油脂*, 2021, 46(8): 110–118.
- [8] RESENDE L M B, MAGALHÃES E J, NUNES C A. Optimization and validation of a smartphone-based method for the determination of total sterols in selected vegetable oils by digital image colorimetry[J/OL]. *J Food Compos Anal*, 2023, 117: 105111 [2024-03-23]. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105111>.
- [9] ANCONI A C S A, DE JESUS FONSECA J L, ANTÔNIO NUNES C. A digital image-based colorimetric method for measuring free acidity in edible vegetable oils[J/OL]. *Food Chem*, 2024, 443: 138555 [2024-03-23]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138555>.
- [10] DE MORAIS COUTINHO C, CHIU M C, BASSO R C, et al. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review[J]. *Food Res Int*, 2009, 42(5/6): 536–550.
- [11] KUNTZLEMAN T S, JACOBSON E C. Teaching beer's law and absorption spectrophotometry with a smart phone: A substantially simplified protocol[J]. *J Chem Educ*, 2016, 93(7): 1249–1252.
- [12] KOVALENKO I V, RIPPKKE G R, HURBURGH C R. Measurement of soybean fatty acids by near-infrared spectroscopy: Linear and nonlinear calibration methods[J]. *J Am Oil Chem Soc*, 2006, 83(5): 421–427.