



QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定薏苡仁中8种真菌毒素含量

方嘉豪¹,潘项捷²,尹峰¹,张水锋²,高童³,冯庭辉⁴,张朝军⁵,
蔡烈涛⁵,梁宗锁¹,张晓丹¹

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院,杭州 310018;2. 浙江方圆检测集团股份有限公司,杭州 310018;

3. 陕西中医药大学药学院,陕西咸阳 712046;4. 西北农林科技大学生命科学院,陕西杨凌 712100;

5. 浙江康莱特药业有限公司,杭州 310018)

摘要: 薏苡仁在种植、加工、运输及贮存过程中极易受真菌毒素污染而影响下游产品的质量安全,因此该实验建立同时检测薏苡仁中8种真菌毒素含量的方法,探究薏苡仁中真菌毒素污染情况及毒素含量,为同时检测薏苡仁中8种真菌毒素含量提供有效方法。通过 QuEChERS(Quick easy cheap effective rugged safe)提取法作为前处理方法,使用体积分数 0.1% 甲酸和 84% 乙腈溶液为提取溶剂,以氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠作为盐析试剂,以共价有机框架材料(Coalent organic framework materials, COFs)、十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈)和 N-丙基乙二胺(PSA)作为分散固相萃取净化剂,通过多反应监测模式进行检测,并以外标法进行定量。结果表明:黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 及 M₁,脱氧雪腐镰刀菌烯醇,玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素 8 种真菌毒素的标准曲线线性关系 $R^2 > 0.99$,3 种加标浓度下回收率为 62.76%~111.10%,检出限为 0.025~0.150 $\mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 0.08~0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,灵敏度高,相对标准偏差为 0.38%~7.01%,稳定性好。薏苡仁样品中玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出率较高,其他毒素检出率低甚至无检出,加入 COFs 净化材料,可吸附截留薏苡仁样品中复杂的油脂、糖分和色素等基质,降低基质干扰,满足回收率要求。

关键词: QuEChERS;真菌毒素;液质联用;分散固相萃取;共价有机框架材料

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2025)03-0254-09

引文格式: 方嘉豪,潘项捷,尹峰,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定薏苡仁中8种真菌毒素含量[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2025,53(2):254-262.

Reference Format: FANG Jiahao, PAN Xiangjie, YIN Feng, et al. Simultaneous determination of eight fungal toxins in coix seeds by QuEChERS ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2025, 53(2): 254-262.

Simultaneous determination of eight fungal toxins in coix seeds by QuEChERS ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

FANG Jiahao¹, PAN Xiangjie², YIN Feng¹, ZHANG Shuifeng², GAO Tong³, FENG Tinghui⁴,
ZHANG Chaojun⁵, CAI Lietao⁵, LIANG Zongsuo¹, ZHANG Xiaodan¹

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Fangyuan Test Group Co., Ltd., Hangzhou 310018, China; 3. College of Pharmacy,

Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 4. College of Life Sciences,

Northwest A&F University, Yangling 712100, China; 5. Zhejiang Kanglaite Pharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310018, China)

Abstract: The coix seed is highly susceptible to fungal toxin contamination during cultivation, processing, transportation, and storage, which can affect the quality and safety of downstream products.

收稿日期: 2024-06-04 网络出版日期: 2024-09-13

基金项目: 中央本级重大增减支项目(2060302)

作者简介: 方嘉豪(1998—),男,浙江嘉兴人,硕士研究生,主要从事真菌毒素方面的研究。

通信作者: 张晓丹, E-mail: zhangxiaodanzstu@163.com

Therefore, this article established a method for simultaneously detecting the content of eight fungal toxins in coix seeds, so as to explore the contamination and toxin content of fungal toxins in coix seeds, and provide an effective method for simultaneously detecting the content of eight fungal toxins in coix seeds. The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) extraction method was used as a pretreatment method, with a volume concentration of 0.1% formic acid and 84% acetonitrile solution as extraction solvents, sodium chloride, anhydrous magnesium sulfate, and anhydrous sodium sulfate as salting-out reagents, covalent organic framework materials (COFs), octadecylsilane bonded silica gel (C_{18}), and N-propylethylenediamine (PSA) as dispersed solid-phase extraction purification agents. The detection was performed by using a multi-reaction monitoring mode and quantified by using an external standard method. The results showed that the standard curves of the eight fungal toxins, namely aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , and M_1 , deoxynivalenol, zearalenone, and T-2 toxin, had a linear relationship of $R^2 > 0.99$. The recovery rates were in the range of 62.76% and 111.10% at three spiked concentrations, with a detection limit of 0.025-0.150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and a quantification limit of 0.08-0.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The sensitivity was high, and the relative standard deviation ranged from 0.38% to 7.01%, indicating good stability. The detection rates of zearalenone and deoxynivalenol in coix seed samples are relatively high, while the detection rates of other toxins are low or even non-existent. Adding COFs purification materials can adsorb and intercept complex substrates such as oil, sugar, and pigments in coix seed samples, reduce substrate interference, and meet the recovery requirements.

Key words: QuEChERS; fungal toxins; UPLC-MS; dispersed solid-phase extraction; covalent organic framework materials

0 引 言

薏苡仁是禾本科植物薏苡 (*Coix lacryma-jobi* L.) 的干燥成熟种仁^[1], 又称薏米、苡仁等^[2]。在中国贵州、福建等多地都有种植^[3-4]。薏苡仁营养价值高, 有着禾本科之王的美誉。薏苡仁在种植、收获直至贮藏加工的整个周期中, 时间跨度长、环节众多, 极易受到真菌的侵袭, 进而发生霉变和真菌毒素积累, 误食对动植物生长和人类健康产生危害^[5-7]。2020 版《中华人民共和国药典》对薏苡仁中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮的含量有明确的限量标准^[8-9], 但是真菌毒素种类繁多, 毒性强弱不一, 药典提出的含量限度信息不够全面, 因此建立检测范围广、检测种类全面与灵敏度高的薏苡仁中多种真菌毒素含量同时测定的检测方法尤为重要。

目前关于真菌毒素含量的检测方法, 主要以高效液相色谱、酶联免疫吸附法和液质联用为主。前处理方式主要有固相萃取^[10-12]、液-液萃取^[13]以及免疫亲和柱层析^[14-16], 这类检测方法的相对繁琐, 存在耗时长、成本高、特异性强等缺点, 无法完成覆盖种类更全面的真菌毒素含量的高通量检测, 只适合较单一的真菌毒素含量检测。QuEChERS (Quick easy cheap effective rugged safe) 提取

法^[17-18]相较酶联免疫吸附法有着高效、安全、快速、简单等优势, 广泛应用于食品和果蔬的农药残留提取^[31], 结合高效液相色谱、超高效液相色谱-串联质谱、气相色谱-串联质谱等检测方法, 可以检测上百种农药残留量和真菌毒素含量^[19-20]。因此本文将 QuEChERS 提取法应用于谷物类杂粮——薏苡仁的真菌毒素前处理, 对其提取溶剂、盐析试剂和净化试剂等条件进行优化, 可以有效检测薏苡仁中多种真菌毒素含量。此外, 传统检测方法在检测真菌毒素的过程中, 因存在强大的基质效应导致回收率不能满足要求, 本文通过 QuEChERS 提取法结合分散固相萃取进行样品的前处理, 对提取试剂进行优化, 盐析过程中加入氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠并优化其比例, 使有机相与水相分离, 促进真菌毒素转移进入有机相, 并在净化过程中采用磁性共价有机框架材料^[21] (Covalent organic framework materials, COFs), 使其能对有机物进行吸附, 与十八烷基硅烷键合硅胶 (C_{18}) 和 N-丙基乙二胺 (PSA) 联合作用, 能高效截留样品中的蛋白质、有机酸和色素等, 从而降低基质效应, 得到良好的回收率。

本文通过改进 QuEChERS 提取法以及优化色谱-质谱联用分析条件, 对黄曲霉毒素 B_1 、黄曲霉毒

素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、黄曲霉毒素 M₁、T-2 毒素 8 种真菌毒素进行全面检测。通过使用磁性共价有机框架材料结合一定比例的 C₁₈ 和 PSA 作为分散固相萃取净化试剂,降低了检测过程中薏苡仁基质的影响,建立了一种检测范围广泛、检测种类全面和灵敏度高的薏苡仁中 8 种真菌毒素含量的检测方法。

1 实验部分

1.1 仪器设备

液质联用仪 Waters Xevo TQ-XS(美国 Waters 公司)、电子天平(德国 Sartorius 公司)、远红外快速干燥箱 XY-GZH-500(上海昕仪仪器仪表有限公司)、全自动高通量平行浓缩仪(北京 LabTech 公司)、超声波清洗机(广东固特超声股份有限公司)、Milli-Q Integral 超纯水仪(美国 Millipore 公司)、高速冷冻离心机 ST16R(Thermo Fisher 公司)、调速振荡器 HY-2A(江苏金坛荣华仪器制造有限公司)、涡旋混合器 VORTEX GENIUS3(IKA 公司)和手提式高速万能粉碎机(温岭市林大机械有限公司)。

1.2 标准品和试剂

黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 混合标准溶液(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)和黄曲霉毒素 M₁(AFM₁)购自北京振翔科技有限公司,玉米赤霉烯酮(ZEN)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)和 T-2 毒素购自坛墨质检科技股份有限公司。

色谱纯乙腈和甲醇购自德国 Merck 公司,色谱纯甲酸购自上海麦克林生化科技有限公司,N-丙基乙二胺(PSA)和十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈)购自月旭科技(上海)股份有限公司,共价有机框架材料(Covalent organic framework materials, COFs)由浙江方圆检测集团股份有限公司提供。

1.3 样品前处理

将薏苡仁样品通过烘箱 50 °C 烘干,经过高速药材万能粉碎机粉碎,过 60 目筛,得到薏苡仁粉末备用。称取 1.00 g 薏苡仁粉末样品于 50 mL 聚乙烯离心管中,加入 1 mL 水,然后涡旋,使样品粉末均匀分散,再加入含体积分数 0.1% 甲酸的乙腈溶液,涡旋 30 s 使提取液和样品充分混匀,在振荡仪上振荡 5 min,超声提取 20 min,加入混合盐析试剂氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠(质量比为 1:2:2),充分涡旋后,置于冷冻高速离心机中 12000 r/min 离

心 5 min,将上清液吸出置于新的 50 mL 聚乙烯离心管中,加入磁性共价有机框架材料(COFs) 0.02 g、十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈) 0.15 g 和 N-丙基乙二胺(PSA) 0.15 g,充分涡旋后,置于冷冻高速离心机中 12000 r/min 离心 5 min,将上清液吸出置于新的 50 mL 聚乙烯离心管中,置于浓缩仪中吹干,以甲醇-乙腈-水溶液体系(体积比为 8:1:1),定容到 1 mL,经 0.22 μm 有机系滤膜过滤后备用。

1.4 空白基质溶液的制备

选取不含上述 8 种真菌毒素的薏苡仁样品,按照 1.3 步骤,得到空白基质溶液,用于稀释真菌毒素中间标准溶液。

1.5 标准溶液的配制

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 混合标准溶液和黄曲霉毒素 M₁ 标准溶液,用色谱级乙腈稀释至 100 μg/L,作为中间标准溶液备用;将玉米赤霉烯酮标准溶液,用色谱级乙腈稀释至 1000 μg/L,作为中间标准溶液备用;将脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液和 T-2 毒素标准溶液,用色谱级乙腈稀释至 2000 μg/L,作为中间标准溶液备用。各标准溶液中间液置于 -18 °C 冰箱避光保存。

吸取中间标准溶液适量,用空白基质溶液配制混合系列基质标准溶液,其中黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂ 和黄曲霉毒素 M₁ 标准溶液的质量浓度为 0.25、0.50、1.00、2.50、5.00 μg/L 和 10.00 μg/L,玉米赤霉烯酮质量浓度为 2.5、5.0、10.0、25.0、100.0、300.0、400.0 μg/L 和 500.0 μg/L,脱氧雪腐镰刀菌烯醇质量浓度为 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/L 和 150.0 μg/L,T-2 毒素质量浓度为 2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、150.0、250.0 μg/L 和 300.0 μg/L。

1.6 液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC® BEN C18 (1.7 μm, 2.1×100 mm);流动相:A 为 0.1% 甲酸-水,B 为乙腈;流速:0.3 mL/min;柱温 40 °C;进样量 3 μL,梯度洗脱程序见表 1。

1.7 质谱条件

离子源:电喷雾离子源;检测方式:多反应监测模式;脱溶剂温度:450 °C;脱溶剂:800 L/h;锥孔气:150 L/h;喷雾器:7 Bar。液质联用法测定 8 种真菌毒素含量的过程中,各真菌毒素的母离子、子离子、锥孔电压和碰撞能量的参数如表 2 所示。

2 结果与讨论

2.1 分析仪的条件优化

真菌毒素种类繁多、结构复杂不一,针对复杂的真菌毒素,通过调整质谱条件和流动相配比等参数,以确保真菌毒素在分析仪器上获得较好的响应与分离效果。对质谱参数中的毛细管电压、锥孔电压和碰撞能量进行调整,使得真菌毒素能够碎片化,并在质谱中有较好的响应强度,结果如图 1 所示。图 1 显示:8 种真菌毒素均能被检测,且有较好的响应强度;当流动相为乙腈-0.1%甲酸-水时,8 种真菌毒素在正负离子检测模式下呈现的总离子流图,各个峰分离效果极佳,峰形对称,根据保留时间可区分真菌毒素种类。

表 1 液相梯度洗脱程序

时间/min	流速/(mL·min ⁻¹)	A 的体积 分数/%	B 的体积 分数/%
0.0	0.3	90	10
0.5	0.3	65	35
2.0	0.3	65	35
2.5	0.3	60	40
4.0	0.3	60	40
4.5	0.3	55	45
5.5	0.3	55	45
6.0	0.3	50	50
7.0	0.3	50	50
7.5	0.3	40	60
9.0	0.3	40	60
9.5	0.3	90	10
12.0	0.3	90	10

表 2 8 种真菌毒素质谱参数

真菌毒素	扫描模式	母离子(<i>m/z</i>)	锥孔电压/V	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV
黄曲霉毒素 B ₁	ESI+	313.1	40	285.0 [*]	21
				241.0	35
黄曲霉毒素 B ₂	ESI+	315.1	54	287.0 [*]	25
				259.0	29
黄曲霉毒素 G ₁	ESI+	329.1	55	311.0	19
				243.0 [*]	26
黄曲霉毒素 G ₂	ESI+	331.1	65	313.0	23
				245.0 [*]	26
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	ESI+	297.1	6	248.9 [*]	10
				230.8	12
玉米赤霉烯酮	ESI-	317.1	13	174.7 [*]	-24
				130.5	-32
T-2 毒素	ESI+	489.3	25	387.2 [*]	19
				245.0	27
黄曲霉毒素 M ₁	ESI+	329.1	52	273.0 [*]	16
				258.9	24

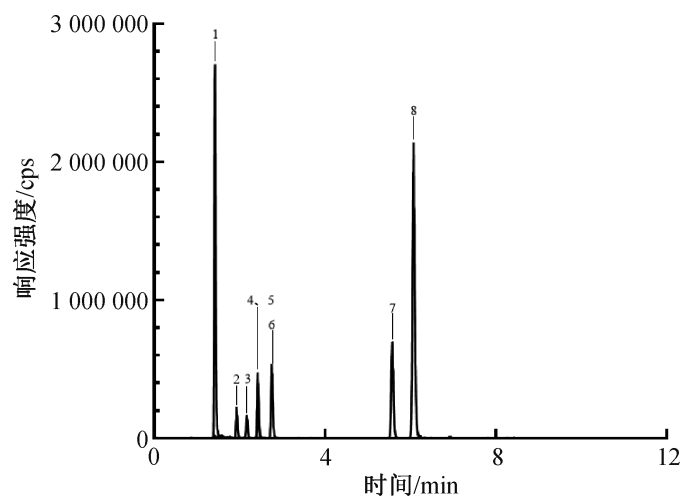
注: * 表示定量离子对。

2.2 薏苡仁真菌毒素检测用样品前处理优化

2.2.1 提取溶剂优化

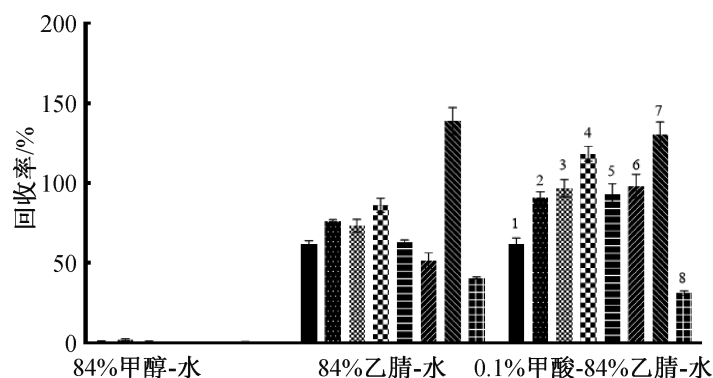
提取溶剂极性越强,提取出薏苡仁样品中的化合物组成越复杂,会产生强烈的基质效应,最终影响真菌毒素目标检测物在仪器中的响应,干扰检测的结果^[22-23]。为了筛选基质效应相对较弱,且能提高真菌毒素提取效率的提取溶剂,分别选用体积分数的 84%甲醇-水、84%乙腈-水和 0.1%甲酸-84%乙腈-水为提取溶剂,比较不同提取溶剂的真菌毒素回收率,从而确定最佳提取溶剂,结果如图 2 所示。图 2 表明:使用 84%甲醇-水作为提取溶剂时,真菌毒素回收率低,效果不理想,可能是薏苡仁中复杂的蛋白质、脂肪、淀粉等基质经甲醇共提取出来,导致在后续盐析过程难实现水相和有机相的分层,净化过程和氮吹后的定容也同样受到水相的干扰,从而导致真菌毒素无法获得良好的回收率;84%乙腈-水作为提取溶剂得到的真菌毒素的回收率为 51.56%~138.88%,比 0.1%甲酸-84%乙腈-水作为提取溶剂得到的回收率低。以上结果说明,酸性条件下乙腈作为提取溶剂对黄曲霉毒素等回收率有明显的提升效果,可以保护碱敏感的真菌毒素,并且在色谱图中显示出较好的峰形。

通过调整提取溶剂中乙腈的体积分数,分别为 0.1%甲酸-84%乙腈-水、0.1%甲酸-30%乙腈-水、0.1%甲酸-50%乙腈-水和 0.1%甲酸-80%乙腈-水,来进行真菌毒素的回收率检测,结果如图 3 所示。由图 3 可知:当乙腈体积分数在 30%和 50%



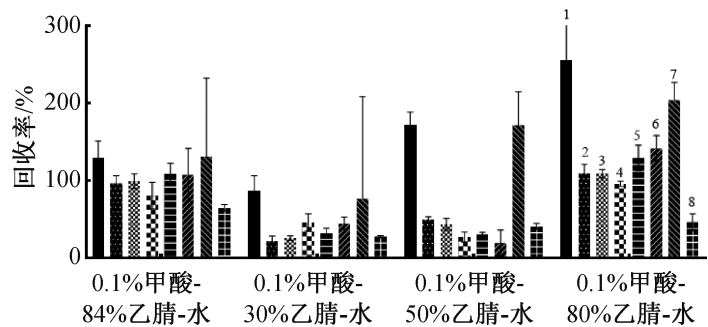
1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN

图1 8种真菌毒素正负离子模式下MRM总离子流图



1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN

图2 不同体积分数的提取溶剂下真菌毒素的回收率



1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN

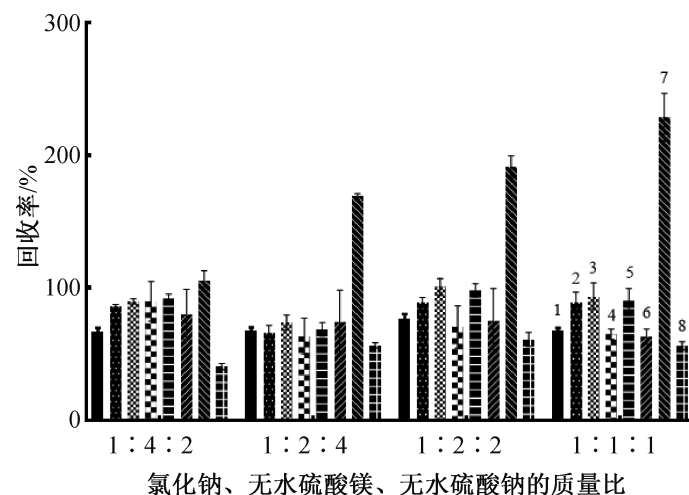
图3 不同体积分数乙腈提取溶剂对真菌毒素的回收率

时,真菌毒素的回收率较低,这可能是由于水比例的提高会导致样品中更多的化合物被提取出来,且在盐析过程中溶于水相的真菌毒素无法较充分地转移到有机相中;乙腈体积分数在80%和84%时,0.1%甲酸-84%乙腈-水为作为提取溶剂,薏苡仁中的真菌毒素有较稳定的回收率,8种真菌毒素回收率约为100%。

2.2.2 盐析试剂优化

采用了不同配比的氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠作为盐析试剂,对盐析试剂及其添加比例进行优化,结果图4所示。图4显示:使用不同比例的氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠作为盐析试剂时,检测到真菌毒素不同的回收率,当氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠的质量比为1:4:2和1:2:4时,回收

率偏低,这可能是由于无水硫酸镁和无水硫酸钠用量过多,吸水效果明显导致的;当氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠的质量比为1:1:1时,有机相和水相不易完全分层,导致部分真菌毒素在水相中无法富集,回收率也略微偏低;当氯化钠、无水硫酸镁和无水硫酸钠的质量比为1:2:2时,效果最好,大部分的真菌毒素都有较好的回收率,回收率约为100%。



1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN

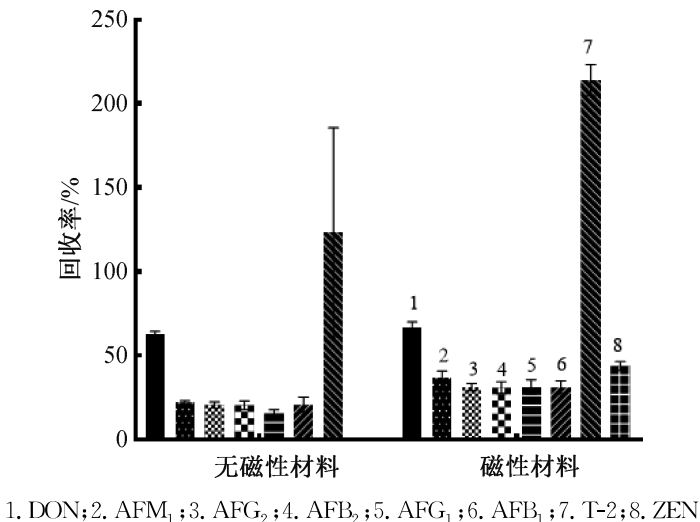
图4 不同质量比的盐析试剂下真菌毒素的回收率

2.2.3 净化试剂优化

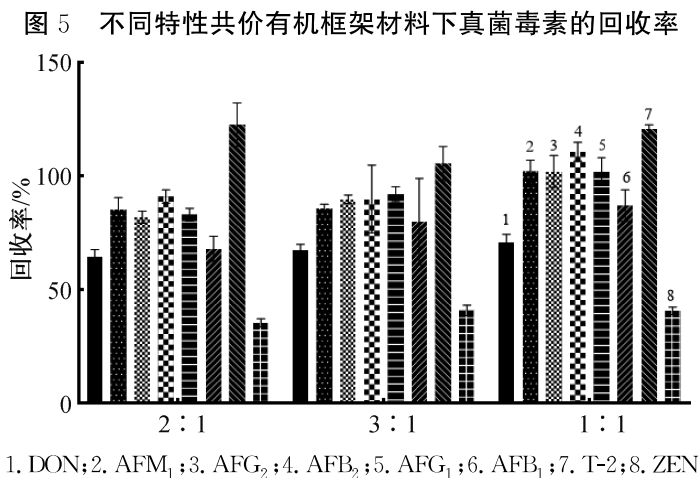
PSA 和 C₁₈ 是 QuEChERS 提取法中最常用到的净化材料^[16], PSA 可吸附样品中的有机酸、脂肪酸、糖类、部分色素等基质^[24], C₁₈ 表面较多残留的硅羟基提供了额外的极性相互作用,使疏水性的键合硅胶与极性较大的萃取物之间接触更加紧密,增强了对碱性化合物和极性物质的保留能力^[25]。本文采用由 C₁₈ 和 PSA 组成的新型共价有机框架材料,以高效吸附截留样品中的油脂、糖分与色素等复杂基质,进而降低基质效应,结果如图5所示。图5表明:使用具有磁性的共价有机框架材料时,回收率比使用无磁性的共价有机框架材料更高,说明其能更好地吸附薏苡仁样品中的蛋白质、油脂、色素等复杂基质,减小基质对真菌毒素在检测中的干扰,因此,本文选择具有磁性吸附效果的共价有机框架材料和 C₁₈ 以及 PSA 联合对样品进行前处理。

本文进一步对 PSA 和 C₁₈ 的用量配比进行回收率分析,结果如图6所示。由图6可知:PSA 和 C₁₈ 的质量比为2:1时,黄曲霉毒素整体回收率偏低;当 PSA 和 C₁₈ 的质量比为3:1时,真菌毒素回收率有所提高;当 PSA 和 C₁₈ 的质量比为1:1时,净化试剂对薏苡仁样品中的复杂基质具有最好的吸附作用,大多数真菌毒素的回收率约为100%,效果最好,因此,本文选用了磁性共价有机框架材料联合质

量比 1:1 的 C₁₈ 和 PSA 作为净化试剂。



1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN



1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN

图 5 不同特性共价有机框架材料下真菌毒素的回收率

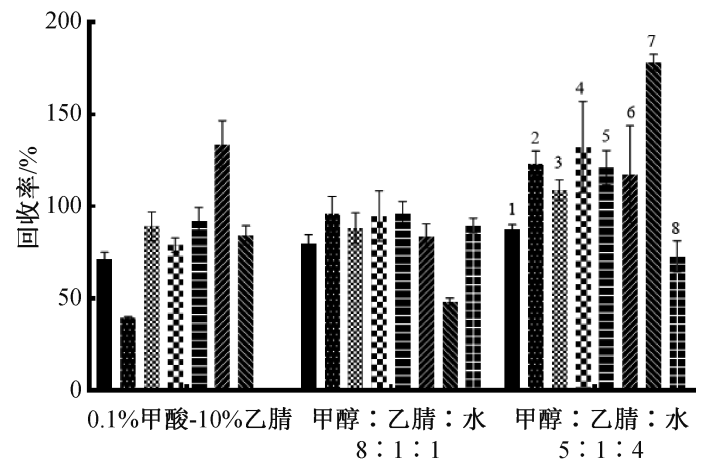
2.2.4 定容试剂优化

经过提取、盐析和净化的前处理过程后,薏苡仁样品中的复杂基质与待检测的真菌毒素充分提取并分离,本文考察了不同配比定容试剂对真菌毒素回收率的影响,结果如图 7 所示。图 7 表明:当使用初始流动相 0.1%甲酸-10%乙腈溶液作为定容试剂时,回收率较低,玉米赤霉烯酮回收率差;当使用甲醇:乙腈:水的体积比为 5:1:4 的条件下定容时,真菌毒素回收率偏高,个别真菌毒素回收率超过 120%;当使用甲醇:乙腈:水的体积比为 8:1:1 的条件下定容时,具有最稳定的回收率,大部分真菌毒素的回收率均约为 100%。

2.3 基质效应

薏苡仁样品基质复杂,在前处理过程中会伴随真菌毒素一起被提取,从而对被测物真菌毒素的分析测定造成显著干扰,因此,本实验也对薏苡仁中真菌毒素测定方法的基质效应进行了考察。通过真菌毒素标准溶液配制溶剂标准曲线和基质标准曲线,通过两者标准曲线斜率的比值,验证薏苡仁对真菌毒素的基质效应^[26-27],基质效应在 80%~120%之

间说明没有明显的基质抑制或基质增强作用。薏苡仁的基质考察结果如表 3 所示,薏苡仁样品对于大部分真菌毒素的基质效应分布在 15.28%~42.29%,这说明薏苡仁对大部分真菌毒素有明显的基质抑制作用;脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基质效应为 88.94%,说明薏苡仁对脱氧雪腐镰刀菌烯醇无明显基质增强或抑制作用;T-2 毒素的基质效应在 221.18%,说明薏苡仁对 T-2 毒素有明显的基质增强作用。而基质效应对回收率有较大的影响,可以采用配制基质标准溶液、添加内标校正等方法来减小基质效应的影响。由于内标法较为费时,且成本较高,因此本实验采用简单且成本低的外标法配制基质标准溶液来消除大部分真菌毒素的基质效应。



1. DON; 2. AFM₁; 3. AFG₂; 4. AFB₂; 5. AFG₁; 6. AFB₁; 7. T-2; 8. ZEN

图 7 不同定容试剂下真菌毒素的回收率

2.4 方法学验证

将未检测出真菌毒素的薏苡仁样品作为空白基质样品,按照相同的前处理方法,制备基质提取液,用来配置基质标准溶液。由表 3 可知:各个真菌毒素的标准曲线均具有良好的线性关系,即 $R^2 > 0.99$ 。根据各个真菌毒素在色谱图上的出峰时间和响应强度,以仪器的 3 倍信噪比和 10 倍信噪比作为检出限(Limit of detection, LOD)和定量限(Limit of quantification, LOQ),检出限为 0.025~0.150 $\mu\text{g/kg}$,定量限为 0.080~0.500 $\mu\text{g/kg}$ 。

用未检测出真菌毒素的薏苡仁样品,添加低、中、高 3 个浓度水平的真菌毒素混合标准溶液,进行 6 次水平实验,计算 6 次加标实验的平均回收率以及相对标准偏差,结果如表 4 所示。由表 4 可知:回收率在 60%~120% 之间,相对标准偏差在 0.38%~7.01%,以上线性关系、回收率以及精密度等符合《实验室质量控制规范 食品理化检测》(GB/T 27404—2008)规定。

表 3 检出限、定量限以及基质效应

化合物	线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	相关系数 R^2	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	LOQ/($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	线性回归方程	基质效应/%
AFM ₁	0.25~10.00	0.9935	0.025	0.080	$y=5766.12x-1355.68$	21.40
AFB ₁	0.25~10.00	0.9952	0.070	0.250	$y=4130.08x-605.972$	25.26
AFB ₂	0.25~10.00	0.9971	0.050	0.166	$y=3516.9x-503.305$	17.65
AFG ₁	0.25~10.00	0.9953	0.070	0.250	$y=4377.27x-979.036$	20.56
AFG ₂	0.25~10.00	0.9975	0.150	0.500	$y=1262.42x-181.107$	15.28
ZEN	2.5~500.0	0.9990	0.125	0.400	$y=1431.45x-127.85$	42.29
T-2	2.5~300.0	0.9935	0.070	0.250	$y=1331.94x-1524.37$	221.18
DON	2.5~150.0	0.9996	0.070	0.250	$y=1996.01x+1099.72$	88.94

表 4 加标回收率、稳定性和精密度

真菌毒素	加标水平/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率/%	相对标准 偏差/%
DON	10.0	81.05	3.18
	20.0	101.43	4.61
	100.0	75.86	2.15
AFB1	0.5	103.05	3.91
	1.0	81.86	4.21
	5.0	85.26	2.29
AFB2	0.5	74.19	5.13
	1.0	67.03	4.06
	5.0	86.77	4.99
AFM1	0.5	111.10	7.01
	1.0	91.03	3.58
	5.0	98.25	5.69
AFG1	0.5	102.42	6.81
	1.0	73.90	2.45
	5.0	73.58	3.71
AFG2	0.5	85.76	3.90
	1.0	77.44	6.30
	5.0	81.44	5.04
T-2	10.0	92.68	5.98
	20.0	88.47	3.09
	100.0	103.44	5.61
ZEN	2.5	62.93	4.46
	5.0	76.64	0.38
	25.0	62.76	5.30

综上所述,该方法采用液质联用进行检测,相较于传统的药典方法,该分析方法无需紫外检测,无需抗原抗体的特异性结合,检出限和定量限精度更高,灵敏度更好。前处理过程将 QuEChERS 提取法作为基础,结合分散固相萃取,操作简单快速,成本低廉,无需费时费力进行固相萃取柱的活化,在净化过程中加入具有磁性共价有机框架材料,能高效吸附复杂的基质,减小基质效应的影响。本方法能同时高通量地检测 8 种真菌毒素,是高效便捷的检测方法。

3 样品检测

为了验证该方法的可行性,对 37 份不同产地薏苡仁样品按照上述建立的检测方法进行提取、盐析、净化、定容和上机检测,结果如表 5 所示。由表 5 可知:脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出率最高,检出含量为 0.116~303.439 $\mu\text{g}/\text{kg}$;其次是玉米赤霉烯酮,含量达到 0.343~129.767 $\mu\text{g}/\text{kg}$;黄曲霉毒素 B1 仅在一份样品中检出,含量为 2.556 $\mu\text{g}/\text{kg}$;T-2 毒素未在样品中检出,说明该方法切实可行,可同时检测薏苡仁中 8 种真菌毒素,灵敏度高,操作简单方便快捷。

4 结 论

本文采用 QuEChERS 提取法,结合分散固相萃取技术进行提取前处理,检测方法采用超高效液相色谱串联质谱,对薏苡仁进行真菌毒素含量检测方法的开发,主要结论如下:

- a)针对 QuEChERS 提取法进行前处理的优化,以 0.1%甲酸 84%乙腈水溶液作为提取溶剂,氯化钠:无水硫酸镁:无水硫酸钠(质量比 1:2:2)作为盐析试剂,使用具有磁性的共价有机框架材料(COFs)、C₁₈ 和 PSA 作为净化剂(质量比 1:1),上清液经氮吹后使用甲醇:乙腈:水(体积比 8:1:1)作为定容试剂,可以有效地提取薏苡仁中的 8 种目标真菌毒素,并且降低薏苡仁基质对目标真菌毒素含量检测的影响;
- b)检测对象包含 8 种真菌毒素,黄曲霉毒素 B₁、黄曲霉毒素 B₂、黄曲霉毒素 G₁、黄曲霉毒素 G₂、玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 M₁、T-2 毒素和脱氧雪腐镰刀菌烯醇,8 种真菌毒素在仪器中均有较好的响应,分离效果好,根据保留时间可明显区分;
- c)操作简单方便,能在 12 min 内快速高效地检

表 5 薏苡仁样品中真菌毒素检出含量										μg/kg
编号	样品产地	DON 质量分数	AFB ₁ 质量分数	AFB ₂ 质量分数	AFM ₁ 质量分数	AFG ₁ 质量分数	AFG ₂ 质量分数	T-2 质量分数	ZEN 质量分数	
1	云南曲靖富源	3.593±0.158	—	—	—	—	—	—	26.177±1.184	
2	湖南郴州桂东	0.720±0.033	—	—	—	—	—	—	—	
3	贵州兴仁巴铃	303.439±14.185	—	—	—	—	—	—	129.767±12.591	
4	贵州安龙	2.222±0.073	—	—	—	—	—	—	22.680±1.935	
5	贵州兴义	1.471±0.094	—	—	—	—	—	—	0.979±0.203	
6	贵州六盘水盘州	8.266±0.136	—	—	—	—	—	—	11.177±0.460	
7	贵州黔西南晴隆	80.676±0.714	—	—	—	—	—	—	0.343±0.107	
8	福建(采收前 45 d)	—	—	—	—	—	—	—	—	
9	福建宁化石壁镇	0.120±0.207	—	—	—	—	—	—	—	
10	西双版纳革勒	21.776±0.377	—	—	—	—	—	—	—	
11	贵州兴仁屯脚	1.519±0.073	—	—	—	—	—	—	3.750±0.273	
12	贵州黔西南普安	6.612±0.271	—	—	—	—	—	—	8.330±0.126	
13	福建莆田仙游	0.130±0.225	—	—	—	—	—	—	—	
14	勐海县曼帕代	0.264±0.231	—	—	—	—	—	—	15.424±1.306	
15	云南富源下铁翅	20.227±1.053	—	0.464±0.185	—	—	—	—	120.046±6.837	
16	福建(采收前 1 d)	—	—	—	—	—	—	—	—	
17	福建(采收前 15 d)	—	—	—	—	—	—	—	—	
18	福建(采收前 30 d)	—	—	—	—	—	—	—	—	
19	勐海县曼派勒	0.981±0.051	2.556±0.194	0.081±0.006	—	—	—	—	16.294±0.497	
20	西双版纳坝达	22.752±0.300	—	—	—	—	—	—	0.392±0.152	
21	湖北黄冈蕲春	—	—	0.057±0.050	—	—	—	—	—	
22	云南曲靖罗平	11.003±0.233	—	0.422±0.058	—	—	0.029±0.050	—	101.306±9.686	
23	广东揭阳惠来	1.106±0.133	—	—	—	—	—	—	—	
24	辽宁辽阳太子河	1.787±0.066	—	—	—	—	—	—	—	
25	广西百色西林	189.216±3.62	—	—	—	—	—	—	5.203±0.108	
26	河南唐河	4.712±0.373	—	0.184±0.017	—	—	0.041±0.072	—	20.734±0.885	
27	云南红河蒙自	76.562±2.767	—	—	—	—	—	—	25.805±2.119	
28	云南德宏梁河	0.562±0.049	—	—	—	—	—	—	—	
29	勐海县曼燕坎	0.402±0.03	—	—	—	—	—	—	1.082±0.111	
30	贵州兴仁城北街道	4.507±0.188	—	—	—	—	—	—	0.784±0.104	
31	山东烟台栖霞	5.768±0.058	—	—	—	—	—	—	—	
32	福建宁化方田乡	0.118±0.204	—	—	—	—	—	—	—	
33	福建宁化淮土镇	0.304±0.274	—	—	—	—	—	—	—	
34	福建宁化湖村镇	0.269±0.234	—	—	—	—	—	—	—	
35	浙江丽水缙云	0.117±0.203	—	—	—	—	—	—	—	
36	湖南汝城	0.256±0.222	—	—	—	—	—	—	—	
37	西藏林芝察隅	0.116±0.2	—	—	—	—	—	—	—	

测薏苡仁样品中的 8 种真菌毒素,且具有良好的回收率、稳定性,检出限为 0.025~0.150 μg/kg,定量限为 0.08~0.50 μg/kg,灵敏度高。

加强薏苡仁中药材中真菌毒素的检测并增加真菌毒素的检测种类,是薏苡仁原料及相关食品药品产品质量安全的重要保障。本文为薏苡仁中真菌毒素含量的检测提供有力的技术支持,为后续薏苡仁中药材种植、加工、运输及贮存全过程中的质量安全监测提供理论指导。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版: 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020: 393-394.

[2] 吴静雨,陈晓凡,徐万爱,等. 薏苡仁活性成分研究进展[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(6): 1474-1484.

[3] 袁青松,肖承鸿,张小波,等. 2021 年贵州省中药材种植时空分布分析[J]. 中国现代中药, 2023, 25(11): 2378-2384.

[4] 毕天琛,杨国宁,马海春. 中药薏苡仁化学成分及药理活性研究进展[J]. 海峡药学, 2019, 31(11): 52-56.

[5] 戴海蓉,梁思慧,王春民,等. 同时检测食品中多种类真菌毒素

- 的研究进展[J]. 中国食品学报, 2022, 22(8): 398-415.
- [6] 陈鑫璐, 邱月, 张建友, 等. 国内外谷物中多种真菌毒素限量和同步检测标准及方法研究进展[J]. 中国粮油学报, 2021, 36(12): 194-202.
- [7] Makun H A, Adeniran A L, Mailafiya S C, et al. Natural occurrence of ochratoxin A in some marketed Nigerian foods[J]. Food Control, 2013, 31(2): 566-571.
- [8] 诸寅, 毛伟峰, 季申, 等. 上海市售薏苡仁中玉米赤霉烯酮的污染状况及暴露评估[J]. 卫生研究, 2020, 49(5): 840-843.
- [9] 王晓红, 豆金彦, 肖正国. 不同储藏条件下薏苡仁中真菌毒素含量变化的研究[J]. 西部中医药, 2018, 31(8): 20-23.
- [10] 朱青, 曹美萍, 李梦贝, 等. 超高效液相色谱-质谱联用法检测地理标志产品松江大米中8种真菌毒素的含量[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(5): 189-195.
- [11] 李凤华, 李作华, 杨丽, 等. 药食同源中药材中16种真菌毒素的测定与分析[J]. 食品工业科技, 2022, 43(9): 268-275.
- [12] Wu Y, Ye J, Xuan Z H, et al. Development and validation of a rapid and efficient method for simultaneous determination of mycotoxins in coix seed using one-step extraction and UHPLC-HRMS [J]. Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2021, 38(1): 148-159.
- [13] 张新娜, 马丽艳, 潘赛超, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定杂粮豆类中11种真菌毒素[J]. 食品科学, 2019, 40(8): 306-310.
- [14] 牛灿杰, 叶素丹, 胡玉霞, 等. 谷物及制品中真菌毒素前处理及检测技术研究进展[J]. 食品与机械, 2023, 39(5): 203-210, 240.
- [15] Kong W J, Li J Y, Qiu F, et al. Development of a sensitive and reliable high performance liquid chromatography method with fluorescence detection for high-throughput analysis of multi-class mycotoxins in Coix seed[J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 799: 68-76.
- [16] Sun S J, Yao K, Zhao S J, et al. Determination of aflatoxin and Zearalenone analogs in edible and medicinal herbs using a group-specific immunoaffinity column coupled to ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2018, 1092: 228-236.
- [17] 赵淑娥, 肖庚鹏, 袁璐, 等. QuEChERS提取快速液相色谱-串联质谱法同时测定食品中多种真菌毒素[J]. 江西化工, 2023, 39(6): 37-40.
- [18] 邵丽, 王晓, 张伟, 等. QuEChERS方法应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2023, 51(24): 9-18.
- [19] 陈勇, 毛永琼, 薛雨琴, 等. 农药残留 QuEChERS前处理方法研究进展及应用探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(9): 111-121.
- [20] 覃冬杰, 丘莹, 王宏虹, 等. 马蹄金中10种真菌毒素 UPLC-MS/MS检测方法的建立[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2023, 49(5): 530-536.
- [21] 吴润松, 叶聪, 胡绮萍, 等. 中药材真菌毒素污染检测研究进展[J]. 广东化工, 2024, 51(4): 76-79.
- [22] 程媛媛, 马陇君, 安宁. 共价有机框架材料应用进展[J]. 化学通报, 2024, 87(2): 129-140.
- [23] Liao X F, Li Y, Long N, et al. Multi-mycotoxin detection and human exposure risk assessment in medicinal foods[J]. Food Research International, 2023, 164: 112456..
- [24] Liao C D, Wong J W, Zhang K, et al. Multi-mycotoxin analysis of finished grain and nut products using high-performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(20): 4771-4782.
- [25] 赵芮, 黄晴雯, 余智颖, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中36种真菌毒素[J]. 色谱, 2023, 41(9): 760-770.
- [26] 王庆, 邱彬, 周亮, 等. 四种常见保健药材中16种真菌毒素的测定和污染状况研究[J]. 湘南学院学报(医学版), 2022, 24(2): 13-20.
- [27] 张伟, 李会荣, 朱娜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中黄曲霉毒素B1和玉米赤霉烯酮含量的研究[J]. 饲料研究, 2023, 46(3): 126-129.
- [28] 唐振涛, 于刚, 刘菲, 等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱同时检测苦荞中10种真菌毒素[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(1): 188-193.

(责任编辑:张会巍)