

基于氨基化多壁碳纳米管-d-SPE-LC-MS/MS 测定油籽油料中的10种真菌毒素

王思源¹, 吴小勇², 姚伟琴³, 舒圣元¹, 巩志国³, 王静静^{3*}

(1. 新疆农业大学食品科学与药学院, 新疆乌鲁木齐 830052)

(2. 咸阳市食品药品检验检测中心, 陕西咸阳 712000) (3. 乌鲁木齐海关技术中心, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘要: 为了快速检测油籽油料中的10种真菌毒素, 以氨基化多壁碳纳米管 (Aminated Multi-walled Carbon Nanotubes, NH₂-MWCNTs) 作为分散固相萃取 (Dispersive Solid Phase Extraction, d-SPE) 的吸附剂, 采用液相色谱串联质谱法 (Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry, LC-MS/MS) 同时测定油籽油料中10种真菌毒素。通过X射线衍射 (X-Ray Diffraction, XRD)、傅里叶红外光谱分析 (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR)、透射电子显微镜分析 (Transmission Electron Microscopy, TEM) 等表征方法表明了改性后的NH₂-MWCNTs表面缺陷明显增多; 以NH₂-MWCNT作为d-SPE的吸附剂, 对影响提取效率的提取液种类、净化剂类型及添加量等因素进行了优化, 对所建立的检测方法进行了方法学考察。结果表明: 2%体积分数的甲酸的乙腈-水 (80:20) 作为提取液, 20 mg NH₂-MWCNTs作为净化剂时为最优前处理条件; 10种真菌毒素在1~20 µg/kg范围内线性关系良好, 方法的检出限 (Limit of Detection, LOD) 在0.04~0.19 µg/kg之间, 定量限 (Limit of Quantitation, LOQ) 在0.13~0.63 µg/kg之间, 加标回收率和相对标准偏差分别为70.33%~111.67%和0.55%~9.60%。该方法操作简便快捷、大大缩短了前处理时间、有机溶剂消耗少、整个过程绿色环保, 适用于油籽油料中多种真菌毒素的测定。

关键词: 真菌毒素; 油籽油料; 多壁碳纳米管; 液相色谱串联质谱

文章编号: 1673-9078(2025)06-309-317

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.6.0499

Determination of 10 Mycotoxins in Oilseeds by d-SPE-LC-MS/MS using Amine-functionalized Multi-walled Carbon Nanotubes

WANG Siyuan¹, WU Xiaoyong², YAO Weiqin³, SHU Shengyuan¹, GONG Zhiguo³, WANG Jingjing^{3*}

(1. College of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(2. Xianyang Food and Drug Inspection and Testing Center, Xianyang 712000, China)

(3. Technical Center of Urumqi Customs, Urumqi 830000, China)

Abstract: Mycotoxin contamination in oilseeds is of particular concern because of their potential adverse effects, hence reliable analytical methods are required for detection and quantification. This study aims to develop a rapid method for

引文格式:

王思源, 吴小勇, 姚伟琴, 等. 基于氨基化多壁碳纳米管-d-SPE-LC-MS/MS测定油籽油料中的10种真菌毒素[J]. 现代食品科技, 2025, 41(6): 309-317.

WANG Siyuan, WU Xiaoyong, YAO Weiqin, et al. Determination of 10 mycotoxins in oilseeds by d-SPE-LC-MS/MS using amine-functionalized multi-walled carbon nanotubes [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(6): 309-317.

收稿日期: 2024-04-16

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2021D01A34)

作者简介: 王思源 (1999-), 女, 硕士, 研究方向: 食品、油脂方面的检测, E-mail: wsyyy0101@163.com

通讯作者: 王静静 (1982-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: wjjyezi@163.com

the detection of ten mycotoxins in oilseeds using amine-functionalized multi-walled carbon nanotubes (NH₂-MWCNTs) as adsorbents for dispersive solid-phase extraction (d-SPE) coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The structural and morphological characteristics of NH₂-MWCNTs were analyzed using X-ray diffraction method, fourier transform infrared spectroscopy, and transmission electron microscopy, confirming increased surface defects after modification. The optimal pretreatment conditions were identified as 2% (V/V) formic acid in acetonitrile-water (80:20) as the extraction solvent and 20 mg NH₂-MWCNTs as the adsorbent. The 10 mycotoxins exhibited good linearity within 1-20 µg/kg. The detection and quantitation limits ranged from 0.04 to 0.19 µg/kg and 0.13 to 0.63 µg/kg, respectively. The spiked recovery rates were 70.33%~111.67% and 0.55%~9.60%, respectively. The proposed method is simple, rapid, and environmentally friendly, substantially reducing pre-treatment time and organic solvent consumption. Utilization of NH₂-MWCNTs could be an effective approach for determining various mycotoxins in oilseeds.

Key words: mycotoxins; oilseeds; multi-walled carbon nanotubes; LC-MS/MS

真菌毒素, 又称霉菌毒素, 是产毒真菌在高温、高湿的环境条件下产生的次级代谢产物^[1,2]。油籽油料在生产、储存和运输过程中, 极易受到真菌毒素污染。其中备受关注的真菌毒素有黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AF)、赭曲霉毒素 (Ochratoxins, OT)、杂色曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN)、T-2、HT-2 和伏马毒素 (Fumonisin, FB) 等, 这些毒素对人体和动物的健康危害极大, 能损坏人的肝肾功能、引起生殖异常以及抑制免疫反应, 具有很强的致畸、致癌作用, 摄入超过一定限量后, 可导致急性或慢性中毒^[3-5]。各国针对植物油脂中的真菌毒素含量, 制定了严格的限量标准, 以确保食品安全和消费者健康。GB 2761-2017《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量》明确指出, 食用植物油中的黄曲霉毒素 B₁ 含量不得超过 10 µg/kg, 花生油和玉米油不得超过 20 µg/kg^[6]。油籽油料中除含有大量脂质、蛋白质, 还含有维生素 E、色素、甾醇等成分, 基质成分复杂, 因此从油籽油料样品中提取痕量的真菌毒素尤为困难^[7]。

目前, 液相色谱串联质谱法 (LC-MS/MS) 已广泛应用于真菌毒素的检测, 由于色谱分析的良好分离效率和质谱分析的高选择性, 该方法表现出良好的准确度和灵敏度^[8,9]。但该方法的准确性和灵敏度在很大程度上受到前处理过程中基质净化效果的影响。为确保检测结果的准确性, 必须在前处理阶段有效去除基质中的杂质和其他干扰因素。当前, 常用于测定食品中真菌毒素的前处理方法有液液萃取法^[10]、固相萃取法 (Solid Phase Extraction, SPE)^[11]、免疫亲和层析法^[12,13]和酶联免疫分析法^[14,15]等。这些前处理方法耗时较长, 操作过程复杂, 检测效率低, 成本高, 并且只对一种或一类结构相

似的真菌毒素提取效果好, 但对高油脂样品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同时快速检测油籽油料中多种真菌毒素的新方法。

分散固相萃取 (d-SPE) 作为一种高效、简便的绿色前处理方法, 近年来受到了广泛的关注。该方法集提取与净化于一体, 显著减少了有机溶剂消耗量, 并且无需使用特殊设备。d-SPE 在样品前处理领域展现出了巨大的优势和应用前景。此外, 多壁碳纳米管 (Multi-walled Carbon Nanotubes, MWCNTs) 作为一种新型前处理净化吸附材料, 由于其独特的中空结构, 高比表面积、良好的吸附能力和稳定的化学性质^[16], 在复杂食品样品前处理中有较大的应用潜力。但 MWCNTs 表面缺少活性官能基团, 不易溶于水和有机溶剂, 易缠结团聚, 从而限制了其作为吸附剂的应用^[17]。因此, 常通过在其表面引入氨基基团, 改善其表面的亲水性和极性, 从而提高吸附效率^[18]。

本研究考虑到油籽油料样品基质复杂, 选用氨基化多壁碳纳米管 (NH₂-MWCNTs) 作为净化吸附剂, 代替了传统 d-SPE 的吸附剂, 能够更加有效的吸附干扰物, 建立一种快速、简便、经济的油籽油料中多种真菌毒素的分析检测方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

羧基化多壁碳纳米管 (Carboxylated Multi-walled Carbon Nanotubes, COOH-MWCNTs) (直径 8~15 nm, 长度 50 µm, -COOH 含量 2.56 wt.%) 购买自江苏先丰纳米材料科技有限公司; 葵花籽、亚麻籽、红花籽等油籽油料样品, 市售。

黄曲霉毒素混合标准溶液 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)；玉米赤霉烯酮 (ZEN)；赭曲霉毒素 A(OTA)；赭曲霉毒素 B(OTB)；T-2 毒素 (T-2)，均为 100 μg/mL 于乙腈，1 mL；伏马毒素 B₁ (FB₁)；伏马毒素 B₂ (FB₂) 均为 100 μg/mL 于甲醇，1 mL。

乙腈、甲醇、甲酸（均为色谱纯），德国默克公司；无水硫酸镁、氯化钠（分析纯），国药集团化学试剂有限公司。

1.1.2 仪器与设备

LC-30AD 高效液相色谱仪，日本岛津公司；QTRAP 6500 三重四极杆质谱仪，美国 AB Sciex 公司；MSA225S-CE 电子天平，德国 Sartorius Group 公司；IKA-MS3-basic 涡旋混匀器，德国 IKA 公司；CR22G 型落地式高速离心机，德国 Eppendorf 公司；Milli-Q Reference 超纯水器，美国 Millipore 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制

各类真菌毒素标准品现用甲醇：水（1:1）逐级稀释至 1 μg/mL，再分别用基质提取液配制成 1、2、5、10、20 μg/kg 五个浓度的标准工作溶液，现配现用。

1.2.2 氨基化多壁碳纳米管的制备

参考孙俊芬等^[19]的方法制备氨基化多壁碳纳米管复合材料，具体步骤如下：首先，向三口烧瓶中加入约 20 mg COOH-MWCNTs、0.1 g 缩合剂二环己基碳二亚胺 (Dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 和 20 mL 乙二胺 (Ethylenediamine, EDA)，随后超声处理 30 min，使这些组分混匀分散并混合。接着在 120 °C 油浴中进行加热。反应完成后，用无水乙醇进

行超声洗涤，以去除反应过程中产生的副产物，随后，将洗涤后的混合物通过 0.22 μm 滤膜，最后将过滤后得到的碳管置于真空环境下干燥 24 h，得到 NH₂-MWCNTs。

1.2.3 样品的提取与净化

将样品粉碎均匀，精确称取 5.0 g（0.01 g）于 50 mL 的离心管中，加入 20 mL 乙腈 / 水（80:20，体积分数 2% 的甲酸）溶液，剧烈涡旋 1 min；随后加入 4 g 无水硫酸镁，1 g 氯化钠，剧烈涡旋 1 min，8 000 r/min 离心 5 min。取 1.0 mL 上清液并加入 20 mg NH₂-MWCNTs，剧烈涡旋 1 min 后过 0.22 μm 滤膜，待 LC-MS/MS 分析。

1.2.4 LC-MS/MS分析条件

色谱条件：XDB-C₁₈ 柱（100 mm×2.1 mm×1.8 μm）；流量：0.25 mL/min；柱温：40 °C；进样量：3 μL；流动相：A 为体积分数 0.1% 的甲酸－水溶液，B 为体积分数 0.1% 的甲酸－甲醇溶液；正负离子模式洗脱梯度如表 1 所示。

表 1 正负模式下流动相的洗脱程序梯度

Table 1 Gradient elution procedure of the mobile phase in positive-negative mode

模式	时间/ min	流动相比比例		模式	时间/ min	流动相比比例	
		A/%	B/%			A/%	B/%
正离子	1	70	30	负离子	1	85	15
	2.5	70	30		2.5	85	15
	3.5	25	75		3.5	5	95
	7	25	75		7.5	5	95
	7.5	70	30		8	85	15
	9	70	30		9.5	85	15

表 2 10种真菌毒素的质谱参数

Table 2 LC-MS/MS parameters for the ten mycotoxins

真菌毒素	保留时间/min	去簇电压/V	定量离子		定性离子		离子源模式
			离子对	碎裂能/V	离子对	碎裂能/V	
AFB ₁	4.65	110	313.1/285.1	33	313.1/241.1	48	ESI ⁺
AFB ₂	4.58	140	315.1/287.0	35	315.1/259.1	42	ESI ⁺
AFG ₁	4.57	130	329.1/243.2	35	329.1/215.0	42	ESI ⁺
AFG ₂	4.5	110	331.1/245.1	42	331.1/189.0	55	ESI ⁺
FB ₁	4.38	60	722.5/334.3	55	722.5/352.3	49	ESI ⁺
FB ₂	4.48	70	706.4/336.2	55	706.4/318.3	55	ESI ⁺
T-2	5.01	50	489.1/245.2	25	489.1/387.1	21	ESI ⁺
ZEN	5.39	-118	317.3/174.9	-31	317.3/131.0	-33	ESI ⁻
OTA	5.38	-85	402.2/358.1	-27	402.2/166.9	-50	ESI ⁻
OTB	5.24	-84	368.1/324.0	-23	368.1/214.9	-32	ESI ⁻

质谱条件：离子源：电喷雾离子源（ESI）；离子源温度：550℃；离子喷雾电压：5 500 V（正模式）/-4 500（负模式）；采用多反应监测（MRM）模式进行监测，10 种真菌毒素正、负模式 MRM 参数见表 2，色谱图如图 1 所示。

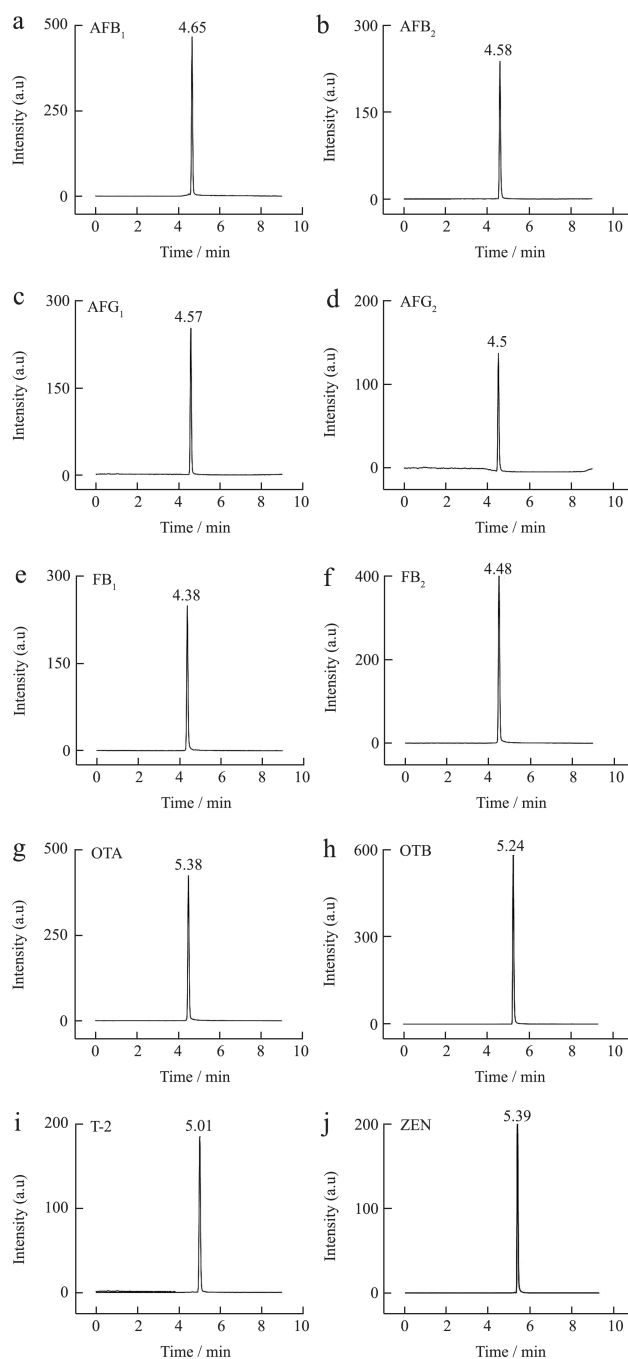


图 1 10 种真菌毒素的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 10 kinds of mycotoxins

1.3 数据处理

采用 Microsoft Excel 对数据进行处理、统计；采用 Origin 2021 软件绘制图表。

2 结果与讨论

2.1 氨基化多壁碳纳米管的表征

2.1.1 X射线衍射测试（XRD）

X 射线衍射法是一种研究碳材料结构的有效方法之一。通过图 2 可以观察到，羧基化多壁碳纳米管和氨基化多壁碳纳米管的 XRD 曲线均呈现两个特征衍射峰，分别是位于 $2\theta=26^\circ$ 的（002）衍射峰和位于 $2\theta=44^\circ$ 的（100）衍射峰，这两个特征峰在两种碳纳米管中均出现在相同的位置。进一步分析发现，在引入氨基基团前后，碳纳米管的特征 X 射线衍射峰的峰形和峰位并未发生显著变化，这一结果表明，在氨基化的过程中，碳纳米管的晶型结构未受到破坏。

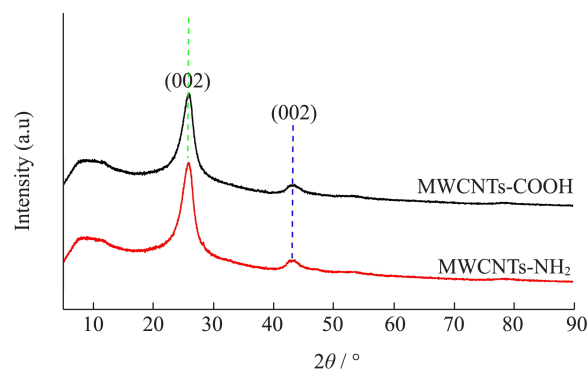


图 2 碳纳米管的 XRD 谱图

Fig.2 XRD spectra of CNTs

2.1.2 傅里叶红外光谱分析（FT-IR）

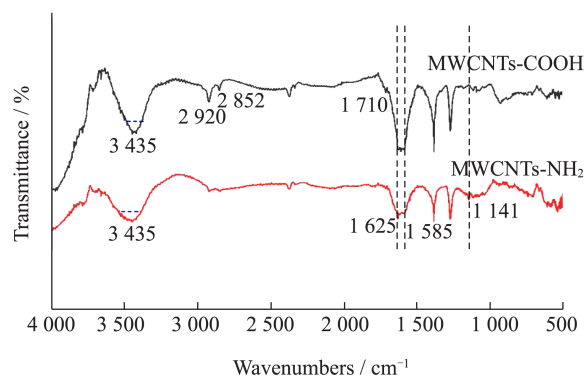


图 3 碳纳米管的红外光谱图

Fig.3 FT-IR spectra of CNTs

图 3 分别为羧基化多壁碳纳米管（COOH-MWCNTs）和氨基化多壁碳纳米管（NH₂-MWCNTs）的红外光谱图，由图中可知，在 2 920 cm⁻¹ 附近和 2 852 cm⁻¹ 附近出现的吸收峰，分别归因于 CH₂ 的对称和非对称伸缩振动峰。在引入氨基基团后，

1 710 cm^{-1} 处羧基的吸收峰消失, 1 625 cm^{-1} 和 1 585 cm^{-1} 左右出现的峰为酰胺官能团中的 C=O 伸缩振动峰和 N-H 伸缩振动峰, 1 141 cm^{-1} 处出现了 C-N 的伸缩振动峰, 3 435 cm^{-1} 处的 N-H 的伸缩振动吸收峰和 O-H 的吸收峰重合。这表明氨基基团已成功通过缩合反应引入到羧基化多壁碳纳米管表面。此外, COOH-MWCNTs 和 NH_2 -MWCNTs 具有相似的红外图谱, 表明制备后 NH_2 -MWCNTs 的基本结构没有发生变化。

2.1.3 透射电子显微镜分析 (TEM)

图 4 为官能团修饰前后多壁碳纳米管用透射电子显微镜观察到的相貌。由图 4a、4b 可以看出未经氨基基团修饰前的 COOH-MWCNTs 的管壁由 7~10 层石墨片卷曲而成, 表面相对完整, 这为接下来的氨基化修饰创造了条件。在经过乙二胺修饰后, NH_2 -MWCNTs 表面缺陷明显增多 (图 4c), 端部腐蚀较为严重, 端帽已被腐蚀打开, 部分外层管壁被腐蚀脱落 (图 4d)。整体来说, 改性后的功能化 MWCNTs 长度没有明显截短, 而管壁表面的缺陷增加, 因此更有利于 NH_2 -MWCNTs 作为 d-SPE 的吸附材料来吸附目标分析物。

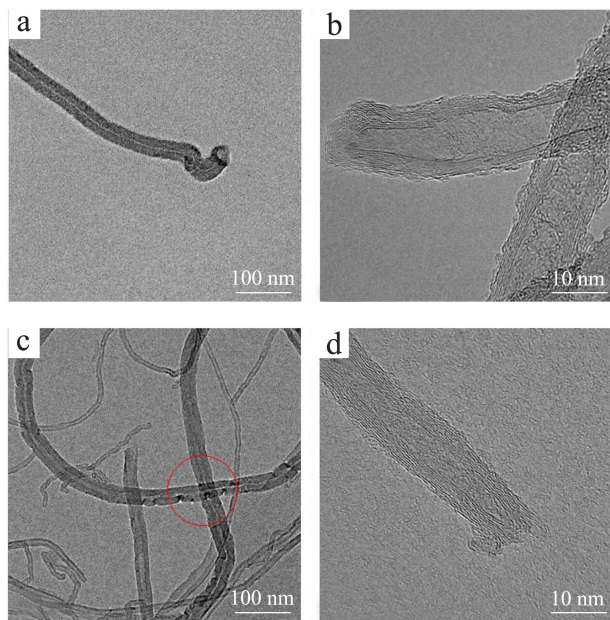


图 4 碳纳米管的透射电镜图

Fig.4 TEM spectra of CNTs

注: a 和 b 为羧基化多壁碳纳米管, c 和 d 为氨基化多壁碳纳米管。

2.2 甲酸含量的优化

在油籽油料样品的前处理过程中, 有效提取目

标分析物是核心步骤。提取液中水的存在能够充分润湿样品基质, 进而增强有机溶剂的渗透能力, 这有利于有机溶剂的渗入及提取, 提高对目标化合物的提取效率, 因此采用有机溶剂与水的混合液作为提取溶液^[17]。真菌毒素大多具有脂溶性, 易溶于甲醇、乙酸乙酯、乙腈、丙酮等有机溶剂, 但由于乙酸乙酯和丙酮的毒性大, 对环境及人体健康有害, 前期研究表明, 乙腈对大部分真菌毒素的提取效果较好、对蛋白的沉淀作用较强且共提物 (杂质) 较少、适用范围更广泛^[20], 因此, 本试验选择乙腈-水 (80:20) 作为提取溶液。通过试验发现, 在乙腈-水提取液中加入适当的甲酸, 含有羧基的 OTA、OTB 的回收率会随着甲酸浓度的增加而增加^[21]。按 1.2.3 方法, 以空白葵花籽为样品, 通过加入不同体积分数 (1%、2%、5%) 的甲酸测定提取液对 10 种真菌毒素的提取效果, 结果如图 5 所示, 含 2% 体积分数的甲酸的乙腈-水 (80:20) 作为提取液时, 10 种真菌毒素可获得较为满意的回收率。

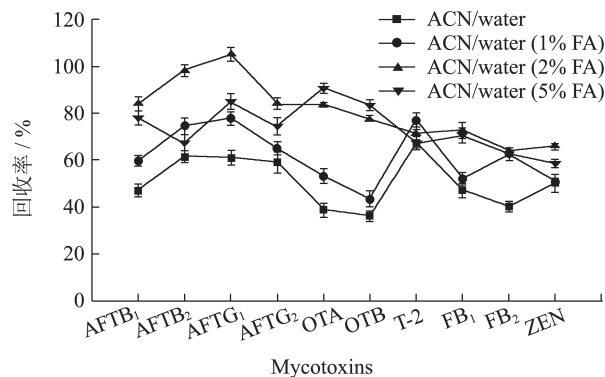


图 5 提取液种类对真菌毒素提取效率的影响

Fig.5 The effect of extraction solvent on extraction efficiency of mycotoxins ($n=3$)

注: 其它 d-SPE 条件: 20 mg NH_2 -MWCNTs。

2.3 净化剂的种类

考虑到葵花籽、亚麻籽、红花籽等油籽油料样品中含有大量的蛋白质、脂肪及其他脂肪伴随物, 这些化合物会影响真菌毒素的检测分析, 为了消除杂质的干扰, 按 1.2.3 方法, 以空白葵花籽为样品, 采用分散固相萃取 (d-SPE) 作为样品前处理的提取方法, 并比较了不同类型的多壁碳纳米管作为 d-SPE 吸附剂的净化效果。多壁碳纳米管的种类包括 MWCNTs、COOH-MWCNTs、 NH_2 -MWCNTs 以及常用净化剂 C_{18} +PSA 的组合。结果如图 6 所示, NH_2 -MWCNTs 作为吸附剂时,

获得最佳提取效率，10 种真菌毒素的回收率在 67.68%~108.50% 范围内。

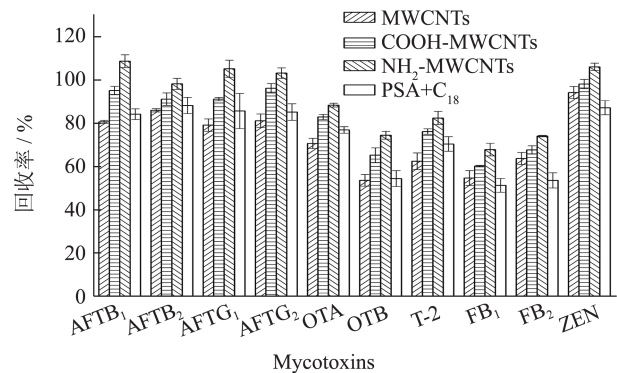


图 6 吸附剂种类对真菌毒素提取效率的影响

Fig.6 The effect of adsorbent types on extraction efficiency of mycotoxins (n=3)

注：其它 d-SPE 条件：2% 体积分数的甲酸的乙腈 - 水 (80:20)；20 mg 净化剂添加量。

2.4 净化剂的添加量

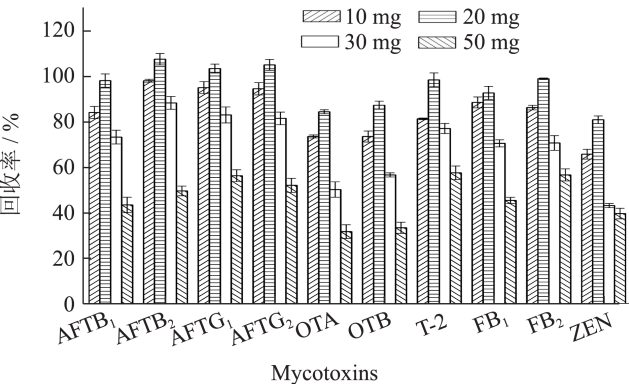


图 7 吸附剂添加量对真菌毒素提取效率的影响

Fig.7 The effect of NH₂-MWCNTs amount on extraction efficiency of mycotoxins (n=3)

注：其它 d-SPE 条件：2% 体积分数的甲酸的乙腈 - 水 (80:20)；NH₂-MWCNTs 作为净化剂。

随后，按 1.2.3 方法，以空白葵花籽为样品，考察了不同 NH₂-MWCNTs 用量（10、20、30、50 mg）对 10 种真菌毒素提取效率的影响。结果如图 7 所示，分析表明，当吸附剂添加量从 10 mg 增加至 20 mg 时，10 种真菌毒素的回收率呈现上升趋势，这一现象主要归因于真菌毒素中的 π 电子数量相对较少，这一特性加强了杂质与吸附剂之间的 π - π 吸附作用，从而减少了脂质及蛋白质等杂质对目标物的干扰^[17]；然而，当吸附剂用量进一步增加至 50 mg 时，目标化合物的回收率均低于 60%，这可能是由于过量的

NH₂-MWCNTs 能够吸附真菌毒素，进而影响了提取效率。因此，在吸附剂添加量为 20 mg 时，10 种真菌毒素均获得最佳的回收率，综上所述，本试验选择 20 mg NH₂-MWCNTs 作为 d-SPE 的吸附剂。

2.5 基质效应

本试验对不同油籽油料（亚麻籽、葵花籽仁、红花籽）的基质效应进行了评价，采用基质标准曲线与溶剂标准曲线的比值来评价基质效应（ME），当 ME 的绝对值在 0~20% 范围内认为是弱基质效应，在 20%~50% 范围内为中等基质效应，当 ME >50% 时认为是强基质效应^[22,23]。由表 3 可知，AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、ZEN、OTA 在亚麻籽、葵花籽仁或红花籽中有强基质效应，为了消除基质效应的影响，本方法采用基质标准曲线进行定性、定量。

表 3 三种油籽油料中真菌毒素的基质效应

Table 3 Matrix effects of mycotoxins in three kinds of oilseeds

真菌毒素	基质效应		
	亚麻籽/%	葵花籽仁/%	红花籽/%
AFB ₁	12	91	75
AFB ₂	10	89	71
AFG ₁	11	99	38
AFG ₂	75	71	85
FB ₁	25	35	35
FB ₂	28	20	42
T-2	16	23	39
ZEN	43	65	75
OTA	62	21	86
OTB	25	24	46

2.6 方法学考察

2.6.1 线性方程及检出限、定量限

本研究采用基质匹配外标法来进行定量分析，以响应值峰面积（Y）对浓度（X）进行线性回归；在 1~20 $\mu\text{g/kg}$ 范围内，各类真菌毒素的线性关系良好，相关系数（ R^2 ）均大于 0.997 8。本研究采用 3 倍信噪比（S/N=3）和 10 倍信噪比（S/N=10）估算该方法的检出限（LOD）和定量限（LOQ），以确保结果的准确性和可靠性。LOD 和 LOQ 分别为 0.04~0.19、0.13~0.63 $\mu\text{g/kg}$ 。10 种目标分析物的线性方程、相关系数、LOD 和 LOQ 见表 4。

表 4 真菌毒素的线性方程、 R^2 、LOD和LOQ

Table 4 The linear equation, correlation coefficient, LOD and LOQ

真菌毒素	线性方程	R^2	LOD/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/ ($\mu\text{g/kg}$)
AFB ₁	$y=3.57\times10^4x$	0.997 8	0.05	0.16
AFB ₂	$y=1.88\times10^4x$	0.999 6	0.05	0.17
AFG ₁	$y=2.05\times10^4x$	0.999 5	0.05	0.17
AFG ₂	$y=6.00\times10^3x$	0.999 1	0.06	0.20
FB ₁	$y=1.30\times10^4x$	0.999 8	0.12	0.4
FB ₂	$y=1.77\times10^4x$	0.999 6	0.14	0.5
T-2	$y=1.66\times10^4x$	0.997 9	0.06	0.19
ZEN	$y=7.19\times10^3x$	0.999 5	0.04	0.13
OTA	$y=1.45\times10^4x$	0.999 0	0.17	0.56
OTB	$y=3.93\times10^4x$	0.997 9	0.19	0.63

2.6.2 样品的加标回收率

分别向空白葵花籽样品中添加低（1.0 $\mu\text{g/kg}$ ）、中（5 $\mu\text{g/kg}$ ）、高（20 $\mu\text{g/kg}$ ）三个浓度的混合标准品，利用 LC-MS/MS 平行测定 6 次（ $n=6$ ），计算 6 次加标试验的平均回收率和相对标准偏差（RSD）。结果见表 5，10 种真菌毒素的平均回收率在 70.33%~111.67% 之间，回收率的 RSD 在 0.55%~9.60%（ $n=6$ ）。

表 5 真菌毒素的加标回收率及RSD

Table 5 The recoveries and RSD of mycotoxins ($n=6$)

真菌毒素	1.0 $\mu\text{g/kg}$		5 $\mu\text{g/kg}$		20 $\mu\text{g/kg}$	
	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
AFB ₁	76.13	3.35	83.30	2.41	87.57	2.01
AFB ₂	80.97	2.97	81.70	1.65	85.80	4.45
AFG ₁	80.33	7.08	102.00	0.98	106.33	6.40
AFG ₂	79.72	6.88	105.37	2.01	111.67	5.09
OTA	79.01	5.80	86.00	3.08	104.33	9.60
OTB	70.33	2.17	78.00	5.88	72.97	0.55
T-2	91.67	5.38	103.67	6.84	93.83	7.19
FB ₁	82.37	2.81	89.03	4.25	87.63	2.98
FB ₂	83.67	4.21	91.80	2.00	83.00	9.50
ZEN	94.67	3.71	100.67	5.10	101.33	3.74

表 6 类似前处理方法对比

Table 6 Comparison of similar pretreatment methods

基质类型	前处理方法	前处理时间/min	有机溶剂用量/mL	回收率/%	检出限/($\mu\text{g/kg}$)	参考文献
谷物、油料及其制品	SPE	>60	>30	—	0.03	[24]
谷物、油料及其制品	免疫亲和层析法	>30	>100	—	1.0	[25]
花生及其制品	d-SPE	>45	>20	72.70~126.30	0.1~15	[26]
3 种油籽油料	d-SPE	<10	20	70.33~111.67	0.04~0.19	本方法

2.6.3 不同前处理方法的对照分析

为了评价当前方法的有效性，我们将其与现行的食品安全国家标准检测方法及常规的前处理方法进行了比较。我们基于样品基质的类型、前处理方法及时间、有机溶剂用量、方法回收率及检出限等各个方面进行了比较，表 6 举例说明了这些结果。

GB 5009.22-2016 第一法与 GB 5009.96-2016 第一法分别采用固相萃取法（SPE）和免疫亲和层析法来提取、净化前处理样品，与传统的前处理方法相比，本研究建立的改良 d-SPE 方法无需淋洗、洗脱、氮吹等步骤，最大程度地减少了有机溶剂的消耗（20 mL），同时显著缩短了前处理时间，整个实验能在 10 min 之内完成，操作过程更加简便快捷、高效和环保。同时，该方法采用 $\text{NH}_2\text{-MWCNTs}$ 复合材料代替了常用的吸附剂（ C_{18} 、PSA），与 C_{18} 、PSA 相比，改性多壁碳纳米管（ $\text{NH}_2\text{-MWCNTs}$ ）作为一种新型纳米材料，其表面缺陷更多、孔径更大，对样品中的杂质具有更强的吸附能力。因此，它们适合用作改性 d-SPE 的吸附剂。这种方法不仅能节省时间，还能降低检测限，同时在一定程度上减少高油脂样品中杂质对仪器设备的污染。

表 7 实际样品中真菌毒素的含量检测值
Table 7 Detection of mycotoxins in real sample (n=3)

真菌毒素	实际样品检测/(μg/kg)											
	亚麻籽 1	RSD%	亚麻籽 2	RSD%	葵花籽仁 1	RSD%	葵花籽仁 2	RSD%	红花籽 1	RSD%	红花籽 2	RSD%
AFB ₁	ND	—	0.15	9.43	ND	—	ND	—	ND	—	0.19	7.66
AFB ₂	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	0.17	9.17	0.32	9.70
AFG ₁	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—
AFG ₂	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—
FB ₁	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—
FB ₂	ND	—	ND	—	2.21	5.46	ND	—	ND	—	ND	—
T-2	ND	—	ND	—	ND	—	2.62	4.73	ND	—	ND	—
ZEN	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—
OTA	ND	—	ND	—	ND	—	0.91	3.67	ND	—	ND	—
OTB	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—	ND	—

注: ND 为测定结果小于 LOQ。

2.7 实际样品的应用

从本地大型批发市场购买的亚麻籽、葵花籽和红花籽,共6批次样品,采用本方法测定其中10种真菌毒素含量,每个样品均平行测定3次,结果如表7所示。结果表明,所检测的6个油籽油料中,黄曲霉毒素B₁的含量均小于2 μg/kg,符合欧盟及我国对油脂及其制品中黄曲霉毒素B₁的限量要求。

3 结论

本实验采用NH₂-MWCNTs作为吸附剂,建立了d-SPE和LC-MS/MS联用同时检测油籽油料中多种类真菌毒素的方法。在优化条件下,真菌毒素的标准曲线线性良好,其回收率在70.33%~111.67%之间,RSD为0.55%~9.60%;方法的检出限在0.04~0.19 μg/kg之间,定量限在0.13~0.63 μg/kg之间。与传统前处理方法相比,该方法不仅简便高效、成本低廉,而且避免了大量有机溶剂的消耗,操作过程更加绿色环保。综上所述,该方法能够满足高油脂样品基质中真菌毒素在日常快速检测的要求。

参考文献

[1] MALACHOVAA, STRANSKA M, VACLAVIKOVA M, et al. Advanced LC-MS based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2018, 410(3): 801-825.

[2] CHILAKA C A, BOEVRE D M, ATANDA O O, et al. Quantification of fusarium mycotoxins in nigerian traditional

beers and spices using a multi-mycotoxin LC-MS/MS method [J]. Food Control, 2018, 87: 203-210.

[3] ALBERTS J, SCHATZMAYR G, MOLL W D, et al. Detoxification of the fumonisin mycotoxins in maize: an enzymatic approach [J]. Toxins, 2019, 11(9): 523-538.

[4] 霍炳帆,马磊,厉佳丽,等.基于荧光纳米颗粒的免疫层析技术同步快速检测药食同源药材中的3种真菌毒素[J].现代食品科技,2024,40(7):227-235.

[5] 王序,卢迪莎,曾道平,等.时间分辨荧光免疫层析法定量检测谷物中黄曲霉毒素B₁和玉米赤霉烯酮残留[J].现代食品科技,2021,37(4):252-261.

[6] GB 2761-2017,食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S].

[7] 李莉,李硕.分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米油中4种黄曲霉毒素[J].化学分析计量,2020,29(6):10-14.

[8] 宋月,杨丽君,吴平谷,等.复合柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定粮油中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮类毒素[J].中国食品卫生杂志,2020,32(1):39-44.

[9] LI N, QIU J, QIAN Y. Polyethyleneimine-modified magnetic carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the analysis of multi-class mycotoxins in milk via liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Separation Science, 2021, 44(2): 9-13.

[10] 张宇,李俊玲,王书舟,等.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].中国卫生检验杂志,2021,31(16):1921-1926.

[11] ZHOU R Z, JIANG J, MAO T, et al. Multiresidue analysis of environmental pollutants in edible vegetable oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Chemistry, 2016, 207: 43-50.

[12] 胡文尧,龙美名,胡玉斐,等.食品中真菌毒素样品前处理

- 方法的研究进展[J].色谱,2020,38(3):307-316.
- [13] 陈昊文,周春霞,陈金,等.QuEChERS结合超高效液相色谱-串联质谱法测定砂仁中4种黄曲霉毒素[J].现代食品科技,2023,39(12):286-294.
- [14] 陈聪聪,常春立,李超.室温对酶联免疫法测定玉米中真菌毒素的影响[J].现代食品,2022,28(12):165-168.
- [15] 刘梅,张晋欣,刘沙沙,等.粮油作物中玉米赤霉烯酮检测方法研究进展[J].食品与生物技术学报,2021,40(5):12-20.
- [16] ZACS D, ROZENTALE L, et al. Multi-walled carbon nanotubes as effective sorbents for rapid analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils using dispersive solid-phase extraction (d-SPE) and gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) [J]. Food Analytical Methods, 2018, 11(9): 2508-2517.
- [17] 彭晓俊,曾丽珠,伍长春,等.基于QuEChERS法提取液相色谱-串联质谱法测定新会陈皮中的9种真菌毒素和农药残留[J].分析测试学报,2017,36(6):738-743.
- [18] SHUAI M, MENG W, et al. Using Magnetic multiwalled carbon nanotubes as modified QuEChERS adsorbent for simultaneous determination of multiple mycotoxins in grains by UPLC-MS/MS. [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67(28): 8035-8044.
- [19] 孙俊芬,郑龙,李云华,等.氨基化多壁碳纳米管的制备与研究[J].成都纺织高等专科学校学报,2018,35(1):118-122.
- [20] CAO M R, WANG J, WANG M T, et al. Simultaneous detection of 22 mycotoxins in grape by QuEChERS and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry [J]. Journal of Future Foods, 2024, 4(4): 369-375.
- [21] 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
- [22] WANG Q, LIAN J, HUA Z, et al. Hybrid nanomaterial based on magnetic multiwalled carbon nanotube-octadecylphosphonic acid modified zirconia for magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from edible oils [J]. Analytical Methods, 2018, 10(46): 5516-5523.
- [23] 陈杰,王桂泉,胡惠茗.气相色谱法测定柑橘中农药的基质效应研究[J].中国果菜,2023,43(6):49-55.
- [24] 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[S].
- [25] GB 5009.96-2016,食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素A的测定[S].
- [26] 李俊玲,王冬梅,张宇,等.花生及其制品中16种真菌毒素的超高效液相色谱串联质谱测定法[J].现代预防医学, 2022,49(19):3590-3597.