DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260105001
引用格式: 许秀琴, 凌淑萍, 章豪. 分子印迹固相柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定小麦粉中玉米赤霉烯酮[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(12): 114–121.
XU XQ, LING SP, ZHANG H. Determination of zearalenone in *Triticum aestivum* L powder by molecularly imprinted solid-phase column purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(12): 114–121. (in Chinese with English abstract).

分子印迹固相柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定小麦粉中玉米赤霉烯酮

许秀琴*, 凌淑萍, 章　豪
(宁波市农业科学研究院, 宁波市特色农产品质量安全检测与控制重点实验室, 宁波　315040)

摘　要: 目的　建立分子印迹固相柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定小麦粉中玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)的分析方法。**方法**　小麦粉中的 ZEN 用乙酸乙腈/水提取, 经 ZEN 分子印迹固相柱净化、以 Luna®Omega Polar C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm)分离, 乙腈-5 mmol/L 乙酸铵为流动相进行梯度洗脱, 流速 0.5 mL/min, 经 UPLC-MS/MS 测定, 采用电喷雾负离子模式采集的多反应监测模式, 进行定性和定量分析。**结果**　ZEN 在 1.0~50.0 μg/L 范围内, 峰面积与含量呈线性相关, 决定系数(r^2)为 0.9997。在 3.00、6.00、30.00 μg/kg 的加标水平下, ZEN 在小麦粉中的回收率为 80.2%~95.8%, 最大相对标准偏差为 7.6%, 检出限为 3.0 μg/kg。**结论**　本研究建立了一种应用分子印迹固相柱净化法测定小麦粉中 ZEN 的高效分析方法, 该方法可有效地去除小麦粉基质效应, 并富集浓缩样液中的 ZEN, 具有较高的精密度和准确度, 为制定小麦粉中 ZEN 的测定标准及相关质量控制规范提供了可靠的技术支持和实验数据支撑。

关键词: 超高效液相色谱-串联质谱法; 分子印迹固相柱; 玉米赤霉烯酮; 小麦粉

Determination of zearalenone in *Triticum aestivum* L powder by molecularly imprinted solid-phase column purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Xiu-Qin*, LING Shu-Ping, ZHANG Hao
(*Ningbo Academy of Agricultural Sciences*, *Ningbo Key Laboratory of Testing and Control for Characteristic Agro-product Quality and Safety*, *Ningbo* 315040, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish an analytical method for the determination of zearalenone (ZEN) in *Triticum aestivum* L powder by molecularly imprinted solid-phase column purification-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods**　The ZEN from *Triticum aestivum* L powder samples were extracted with acetonitrile/water containing acetic acid, purified by a ZEN-specific molecularly

收稿日期: 2026-01-05
基金项目: 宁波市公益性研究计划项目(2025S094, 2024S011); 宁波市乡村振兴团队科技特派员项目(2024S205)
第一作者/*通信作者: 许秀琴(1980—), 女, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: 1538894297@qq.com

imprinted solid-phase extraction column method, eluted with the mobile phase of 5 mmol/L ammonium acetate solution and acetonitrile, separated on the Luna®Omega Polar C_{18} column (100 mm×2.1 mm, 3 μm) at a flow rate of 0.5 mL/min. The analysis was conducted using UPLC-MS/MS and then analyzed in negative ion mode of electrospray ionization source with multiple reaction monitoring mode for qualitative and quantitative analysis. **Results** In the range of 1.0–50.0 μg/L, the peak area of ZEN was linearly correlated with the content, and the determinationn coefficient (r^2) was 0.9997. Meanwhile, the average recoveries of ZEN in *Triticum aestivum* L powder were 80.2%–95.8% with the maximum relative standard deviations of 7.6% at the spiked concentration of 3.00, 6.00 and 30.00 μg/kg. The limit of detection was 3.0 μg/kg. **Conclusion** This study establishes an efficient detection method for ZEN in *Triticum aestivum* L powder using molecularly imprinted solid-phase extraction purification. This method effectively removes matrix interference and enriches ZEN in the sample, demonstrating high precision and accuracy. The research results provide reliable technical support and experimental data for establishing detection standards and quality control guidelines for ZEN in *Triticum aestivum* L powder.

KEY WORDS: ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; molecularly imprinted solid-phase column; zearalenone; *Triticum aestivum* L powder

0　引　言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)属于一种由真菌分泌的大环内酯类毒素化合物[1], 该类物质具有较为复杂的多环分子结构, 其系统命名为 4-羟基-4-氢-呋喃[-3,2c]-吡喃-2(6)-酮, 相对分子质量为 318.36, 具体分子结构式如图 1 所示。ZEN 是一种由镰刀菌属(*Fusarium* spp.)真菌, 在田间或储藏过程中产生的一种非甾体类雌激素性真菌毒素[2]。由于其化学结构与哺乳动物的雌激素相似, ZEN 能够竞争性地与雌激素受体结合, 从而表现出强烈的雌激素活性, 干扰内分泌系统[3–4]。长期或高剂量摄入被 ZEN 污染的食物或饲料, 可导致人畜生殖功能紊乱、免疫抑制、遗传毒性甚至潜在的致癌风险[5]。

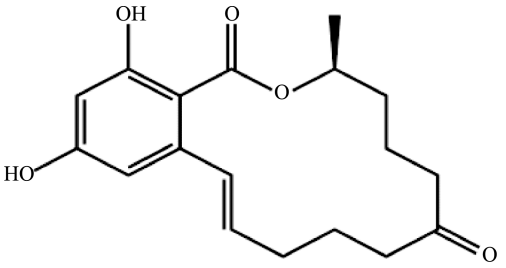


图 1　ZEN 结构式
Fig.1　Structure formula of ZEN

小麦作为全球最重要的粮食作物和饲料原料之一, 其生长和储存环境极易受到镰刀菌的侵染, 是ZEN污染的重灾区[6–8]。世界各国及相关国际组织, 如联合国粮农组织、世界卫生组织以及中国、欧盟、美国等国家和地区, 均对食品和饲料中 ZEN 的最高限量做出了严格规定[9–12]。我国现行的 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》, 明确规定小麦粉中 ZEN 的限量为 60 μg/kg。因此, 发展和优化高灵敏度、高准确性、高效率的 ZEN 检测技术, 对于保障全球食品供应链安全、维护公众健康、促进畜牧业可持续发展具有至关重要的现实意义和战略价值[13–15]。

目前, ZEN 的主流检测方法主要有超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)[16–18]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)[19–20]、胶体金免疫层析法(lateral flow immunochromatographic assay, LFIA)[21–22]、高效液相色谱-荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD)[23–24]等。HPLC-FLD 是成熟且应用广泛的经典定量技术, 经免疫亲和柱(immunoaffinity column, IAC)净化后, 定量限可达 10.02 μg/kg[25], 适用于准确定量; 在快速筛查领域, ELISA 凭借操作简便和高通量优势, 回收率稳定在 85%~110%之间, 适合大批量初筛; LFIA 则以其便携性实现了 10 min 内的现场定性或半定量检测, 检出限约为 60 μg/kg[26]。UPLC-MS/MS 凭借其极高的特异性、灵敏度和强大的多残留同时分析能力, 已成为当前复杂基质中痕量 ZEN 及其衍生物分析的主流方法。该方法能够有效克服传统检测手段在复杂基质中灵敏度不足、抗干扰能力弱的局限性, 广泛应用于谷物、饲料等食品安全领域的日常监测与风险评估。

本研究聚焦于应用 UPLC-MS/MS 测定时的基质效应问题, 创新性地提出将分子印迹固相萃取(molecularly imprinted polymer-solid-phase extraction, MIP-SPE)技术与 UPLC-MS/MS 联用。MIP-SPE 技术[27–28]通过模拟抗体识别机制, 可对复杂基质中痕量 ZEN 进行富集、净化, 显著降低溶液的基质效应并可有效提升 ZEN 测定的灵敏度。本研

究应用乙酸乙腈/水溶液提取、MIP-SPE 柱萃取净化后, UPLC-MS/MS 进行测定。与传统的免疫亲和柱或普通固相萃取柱相比, MIP-SPE 柱对 ZEN 具有更高的选择性和吸附容量, 能够更彻底地去除小麦粉中的色素、脂类、蛋白质等复杂基质成分, 从而显著降低基质效应干扰。该方法既保留了 UPLC-MS/MS 高特异性、多残留同时分析的优势, 又通过 MIP-SPE 的前处理强化, 使得在复杂基质中也能够达到极低的定量限, 从而满足日益严格的国际食品安全法规对痕量检测的高要求。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小麦粉来自宁波市的超市、粮仓。

ZEN 标准溶液、$^{13}C_7$-ZEN 同位素内标标准溶液(7 个 C 原子被 ^{13}C 同位素取代)(纯度>99%, 上海安谱科学仪器公司); 乙酸铵、乙腈、甲醇(色谱纯, 美国莫克公司); 实验用水为 Mili Q 超纯水仪所制超纯水; 冰乙酸(分析纯, 国药集团上海有限公司)。

1.2 仪器与设备

Acquity UPLC-MS/MS 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司); SIGMA3K15 离心机(北京博励行有限公司); Mili Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司); KS4000ic 恒温振荡器、GENIUS3 旋涡混合器(德国 IKA 公司); N-EVAPTM 112 氮吹仪(美国 Organomation 公司); XPE205 十万分之一电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); ZEN 分子印迹固相柱(北京普析通用仪器有限公司); 色谱柱 Luna®Omega Polar C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm)(美国 Phenomenex 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

(1)标准储备液

准确移取质量浓度为 100.00 mg/L 的 ZEN 及其内标标准品溶液 0.10 mL, 以乙腈为稀释剂定容至 10.00 mL 容量瓶中, 所得溶液质量浓度为 1.00 mg/L。该储备液置于 –18 ℃低温环境中储存, 有效期为 3 个月。

(2)标准工作液

采用起始流动相作为稀释溶剂(乙腈:5 mmol/L 乙酸铵=5:95, *V*:*V*), 依次稀释制备质量浓度为 1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/L 系列的 ZEN 标准工作液系列。各工作液中添加 20.0 μg/L 的 ZEN 内标溶液, 现配现用。

1.3.2 样品前处理

(1)样品提取

精确称量 5.00 g 小麦粉置于 50 mL 离心管内, 向其中加入 100 μL 同位素内标溶液。涡旋振荡 1 min, 室温静置 15 min。随后加入 20 mL 提取溶剂(70%乙腈/水含 1%乙酸), 再次涡旋混合 1 min, 随后进行 30 min 振荡提取。提取完成后, 以 6000 r/min 的离心速度离心 10 min, 收集 4 mL 上清液用于后续净化。

(2)样品净化

分子印迹固相柱使用前用酸醇溶液(乙酸:甲醇=1:9, *V*:*V*)淋洗 1 次, 每次 3 mL: 用甲醇 3 mL 活化, 流干; 再加入 3 mL 乙腈流干; 将预处理得到的提取液 5 mL 加入到印迹固相柱中, 使上样液缓慢流过柱子(流速约 0.3 mL/min), 流干; 用超纯水 1 mL 淋洗柱子, 流干; 用酸醇溶液(乙酸:甲醇=1:9, *V*:*V*) 3 mL 洗脱, 收集洗脱液, 40 ℃氮气吹干, 用 1 mL 流动相复溶。复溶后, 过 0.2 μm 的聚四氟乙烯滤膜, 上机测试。

1.3.3 仪器条件

(1)液相色谱条件

进样体积为 5 μL; 柱温设定为 40 ℃; 采用 Luna®Omega Polar C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm); 流动相体系由 5 mmol/L 乙酸铵(A)与乙腈(B)组成, 采用梯度洗脱模式, 具体洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 Gradient elution procedures

时间/min	流速/(mL/min)	A/%	B/%
初始	0.5	95	5
1.0	0.5	95	5
2.0	0.5	60	40
3.0	0.5	30	70
4.0	0.5	0	100
6.0	0.5	0	100
6.1	0.5	95	5
7.0	0.5	95	5

(2)质谱条件

质谱采集参数设置如下: 离子源温度为 150 ℃; 毛细管电压设定为 3.5 kV; 脱溶剂气流量为 1000 L/h; 去溶剂气温度为 500 ℃; 采用多反应监测(multi-reaction monitoring, MRM)模式进行数据采集, ZEN 电离方式: 电喷雾负离子源(electrospray ionization negative, ESI–): ZEN 定量离子对 317.1>130.8(碰撞能量: 30.0 V, 锥孔电压: 30.0 V); ZEN 定性离子对 317.1>175(碰撞能量: 25.0 V, 锥孔电压: 30.0 V); ZEN 内标电离方式: ESI–, ZEN 内标定量离子对 335.1>185(碰撞能量: 15.0 V, 锥孔电压: 30 V)。

1.3.4 添加回收实验

选用阴性基质样品开展加标回收试验, 设置 3 个浓度梯度: 3.00、6.00 和 30.00 μg/kg, 各浓度水平进行 3 次重复。样品经 70%乙腈/水(含 1%乙酸)提取后, 采用分子印迹固相柱进行净化处理, 随后实施定量检测分析。最终依据检测结果计算各加标浓度的平均回收率及相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。

1.4　数据处理

实验数据的采集与分析采用 Waters Masslynx 4.1 工作站软件系统, 数据后期整理利用 WPS 365 工具进行处理。标准曲线建立时每个校准浓度点执行 3 次重复进样操作, 线性拟合计算基于 3 次重复检测所得峰面积的算术平均值进行。

2　结果与分析

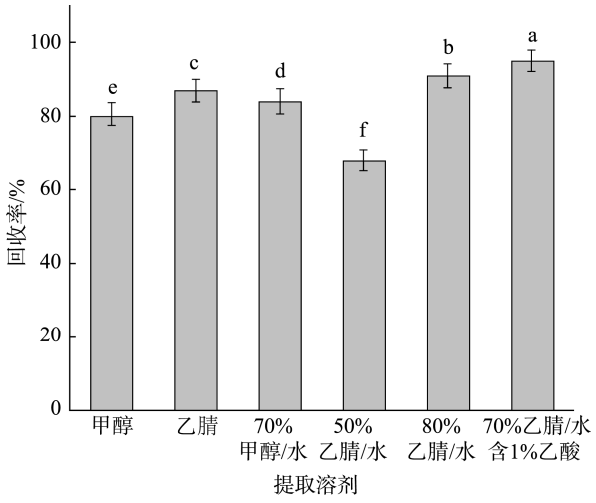
2.1　样品前处理过程的优化

2.1.1　提取液的选择

ZEN 的分子结构包含一个疏水性的大环内酯骨架和一个具有弱酸性的酚羟基, 这使其整体呈现中等极性。因此, 纯的非极性溶剂(如四氯化碳)或强极性溶剂(如纯水)对 ZEN 的溶解度均不理想。中等极性的有机溶剂如甲醇、乙腈或有机溶剂与水混合来提取样品基质中的 ZEN, 成为必然选择。本研究考察了 70%乙腈/水含 1%乙酸、乙腈/水、甲醇/水、甲醇、乙腈对 ZEN 的提取效果, 其 3 次重复实验平均回收率如图 2 所示。实验结果表明, 提取液的选择对 ZEN 的加标回收率影响非常显著。小麦粉基质极为复杂, 含有大量水溶性糖类、蛋白质以及脂溶性脂肪等干扰物。理想的溶剂应能最大化 ZEN 的溶解, 同时最小化这些干扰物的共提取。本研究发现, 应用甲醇作为提取液时, 提取液容易乳化, 导致提取液中含有大量的基质, 对后续的样品净化工作有很大的影响, 且回收率较低; 而乙腈相比甲醇, 在提取农药和真菌毒素时, 通常能沉淀更多的蛋白质和多糖, 共提取的脂类物质也较少, 因此净化效果更优。水的加入不仅调节了溶剂的整体极性, 更有助于穿透湿润的植物细胞壁, 促进目标物与有机溶剂的接触。然而, 不同溶剂及其配比的差异, 都会导致提取效率和基质共提物量的巨大变化, 进而直接影响样品的提取效率。50%的乙腈浓度过低, 导致体系极性过强, 所以对中等极性的 ZEN 溶解能力不足, 回收率最低; 随着乙腈比例上升, 提取效率逐渐增大, 当乙腈浓度为 80%时, 回收率达到 91%; 当使用 70%乙腈/水含 1%乙酸溶液进行提取时, 酸的存在不仅确保了 ZEN 处于易于提取的分子形式, 还有助于破坏植物细胞壁的某些结构, 进一步促进 ZEN 的释放。结果表明, 应用 70%乙腈/水含 1%乙酸溶液进行提取, 回收率最高, 可达到 95%, 故本研究选用 70%乙腈/水含 1%乙酸溶液作为提取液。

2.1.2　萃取时间的选择

本研究采用乙腈、乙酸和水的混合溶液(70%乙腈/水含 1%乙酸溶液)作为萃取剂, 考察萃取振荡时间对加标样品提取效率的影响。实验在室温条件下进行, 先对加标样品进行涡旋混合, 以确保样品与萃取剂充分接触。随后, 设置不同的提取时间(5、10、15、20、30、45 min), 并对每个时间点进行 3 次重复实验, 计算其平均回收率, 见图 3。实验结果显示, 随着提取时间的延长, 萃取效率呈现快速上升趋势。当提取时间从 5 min 延长至 30 min 时, 回收率显著提高(P<0.05)。然而, 当提取时间超过 30 min 后, 萃取效率趋于平台期, 进一步延长时间至 45 min 对回收率的提升已无明显影响。这一现象可从液-液萃取的动力学机制进行解释。在萃取初始阶段, 溶剂与样品的接触尚未充分, 目标组分的浓度差较大, 导致传质动力强, 此时延长萃取时间可显著提高效率。随着萃取过程的进行, 样品相中目标组分的浓度逐渐降低, 迁移速率随之减慢。当系统接近“动态平衡”状态时, 样品相中目标物的溶出速率与萃取相中目标物的扩散速率趋于一致, 此时继续延长萃取时间已无法克服热力学限制, 因而回收率不再随时间增加而显著提升。综合考虑萃取时间对于样品回收率的影响, 本研究选择提取时间为 30 min。



注: 不同小写字母表示差异显著(P<0.05)。

图 2　不同提取溶剂的回收率效果比较(n=3)

Fig.2　Comparison of recovery rates of different extraction solvents (n=3)

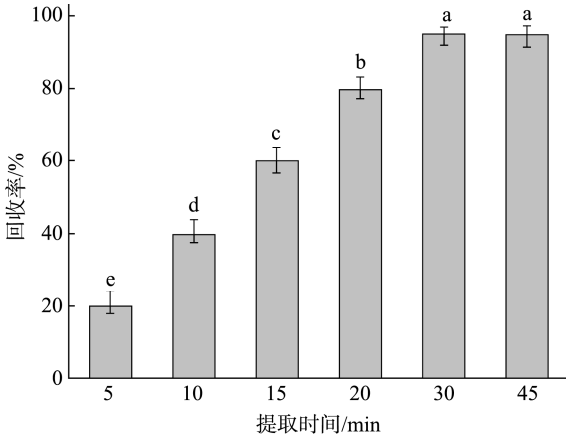


图 3　不同提取时间的提取效果比较(n=3)

Fig.3　Comparison of extraction effects of different extraction times (n=3)

2.1.3 流动相体系的选择

流动相的优化对 ZEN 的测定至关重要，其组成直接影响目标物的离子化效率与基质效应控制。因此，为筛选并优化 ZEN 的 UPLC-MS/MS 分析方法，本研究系统考察不同溶剂与添加剂的组合，基于色谱分离度、峰形、响应强度与稳定性等指标进行选择，以实现对 ZEN 的灵敏、准确分析。ZEN 分子中的酚羟基使其易于在负离子模式下形成[M-H]离子，理论上碱性条件有利于该过程，但高 pH 流动相常与色谱柱及质谱仪的兼容性较差，故实践中多依赖电喷雾过程中的微环境变化实现去质子化。为缓解基质效应，一方面可通过优化梯度程序，使 ZEN 与早期极性化合物及晚期非极性脂类在色谱上分离，从而在清洁窗口出峰；另一方面，选择合适的添加剂如乙酸铵可特异性提升 ZEN 离子化效率，有效抑制基质干扰。本研究共构建了 4 个备选体系用于初步筛选，分别以含 0.1%甲酸或 5 mmol/L 乙酸铵的水溶液为 A 相，以甲醇或乙腈为 B 相。在进样质量浓度为 50 μg/L 的 ZEN 标准溶液分析中，以乙腈为有机相的体系获得了更优的峰形和更高的响应值，如图 4 所示。进一步对比发现，采用乙腈-5 mmol/L 乙酸铵水溶液时，响应值、分离效果、进样重复性均更佳，且空白残留更低，因而被确定为最终流动相。究其原因，研究发现乙腈洗脱能力更强，可在更低比例下洗脱 ZEN，其非质子性与甲醇的质子性亦带来不同的选择性，对分离 ZEN 及其结构类似物更为有利。乙腈因表面张力低、挥发性高，有利于电喷雾离子化，缓冲盐添加剂乙酸铵具有多重功能：提供加合离子、稳定 pH 以改善保留时间重现性、通过离子对作用改善峰形，并可能通过形成特异加合物来规避基质抑制，因此获得更佳的峰型以及更好的灵敏度。

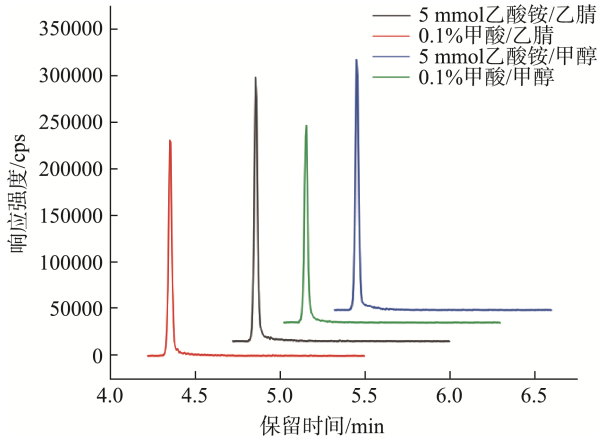


图 4 流动相的选择

Fig.4 Selection of mobile phase

2.1.4 样品稳定性

ZEN 的分子结构含有 β-树脂酚酸内酯环和酚羟基，具有一定的极性，在酸碱环境中可能发生水解或异构化。在提取过程中，乙酸乙腈作为中等极性有机溶剂，能有效萃取 ZEN；尽管 ZEN 在该溶剂中的稳定性低于纯乙腈，但基于酸性条件对提取效率的显著提升作用，实际应用中通常优先选用酸性溶剂体系。实验研究表明，将 ZEN 置于含 70%乙腈/水含 1%乙酸溶液中，于 4 ℃避光保存 7 d，其降解率低于 5%；此外，进样溶液在 15 ℃下放置 24 h 后进行分析，未观察到显著的信号衰减现象。以上结果表明，该酸性溶剂体系在常规实验时间范围内可保持 ZEN 的稳定性，兼顾提取效率与样品保存的可靠性。

2.2 基质效应

小麦粉作为一种复杂的食品基质，其成分包含蛋白质、淀粉、纤维素、色素、脂肪、真菌代谢产物及样品前处理过程中可能引入的杂质。即便经过常规净化处理，仍可能存在与 ZEN 结构相似或保留时间相近的共流出物，在液相系统分离中与 ZEN 一同流出色谱柱。在后续的电喷雾离子化过程中，这些共流出物会与目标物竞争液滴表面的电荷，不仅减少 ZEN 的有效离子化数量，还会阻碍雾化液滴的进一步分裂，从而引发显著的离子抑制效应。具体而言，当大量易电离的基质组分(如磷脂、有机酸、盐类、糖类及多肽等)与 ZEN 同时进入离子源时，它们会优先“抢占”有限的电荷或质子，导致 ZEN 的离子化效率下降，检测信号受到抑制。其中，小麦粉中富含的磷脂和非极性脂质被认为是引起离子抑制的主要因素。此外，提取溶剂中的添加剂及缓冲盐残留等也可能对检测过程产生干扰。为有效消除基质效应对定量结果的影响，本研究采用 ZEN 分子印迹固相柱对样品提取液进行净化。该柱填料能够特异性识别并吸附 ZEN 分子，同时将绝大多数干扰物质洗脱去除，净化效果显著，可最大程度地降低基质干扰。同时，在样品前处理阶段，本研究通过添加 ZEN 同位素内标溶液进一步校正基质效应。由于同位素内标与 ZEN 的化学性质几乎完全一致，其在样品处理及离子化过程中所经历的基质效应与目标物高度一致。通过计算目标物与内标物的响应峰面积比值进行定量分析，可系统校正从提取至检测全过程中的目标物损失及基质效应的影响。本研究采用基质效应因子(matrix factor, MF)评估基质干扰程度，该因子定义为目标物在基质溶液与纯溶剂中的响应峰面积比值。进一步地，通过计算 ZEN 与其同位素内标的 MF 比值，得到内标归一化 MF。由于两者在绝对基质效应上相近，该比值可有效抵消 ZEN 所受的基质抑制。为评价同位素内标校正策略的可靠性，本研究以内标归一化 MF 的 RSD—即变异系数(variable coefficient, CV)作为衡量指标。CV 越小，表明基质对定量结果准确度的影响越低，方法可靠性越高。本研究测得 CV 为 3.8%，低于欧洲药品管理局指导原则所规定的 15%、免疫亲和柱净化样品的 5.1%、未净化样品的 60%。该结果表明，分子印迹固相柱的特异性识别与捕获机制能够高效清除样品中的干扰物质，最大限度地消除基

质效应对分析测定的影响, 从而确保了分析方法的精密度与准确性。

2.3　仪器条件优化

在 ESI 正负电离模式下, 应用 1.0 mg/L 的 ZEN 及其内标标准溶液进行全扫描分析以优化仪器条件。最终结果表明, 负离子模式下的[M-H]$^-$离子(m/z=317.1)是响应最强的母离子。这一发现的根本原因在于 ZEN 分子结构中的酚羟基易于去质子化, 形成酚氧负离子, 其负电荷可以通过共轭效应在整个苯环上离域, 从而大大分散了电荷, 使得该离子结构异常稳定。相比之下, 正离子模式下形成的[M+H]$^+$, 其正电荷主要局域在某个氧原子上, 稳定性相对较差。在质谱分析中, 离子化过程的效率与产物离子的稳定性密切相关。产物离子越稳定, 其生成的趋势就越强, 在离子源中能够存活并被传输到检测器的数量就越多, 最终表现为更高的信号强度。同时, 对其他仪器条件如锥孔电压、离子源温度、脱溶剂气流速、毛细管电压、脱溶剂气温度等参数进行优化。最终确定锥孔电压为 30 V、离子源温度为 150 ℃、脱溶剂气流速为 1000 L/Hr、去溶剂温度为 500 ℃。在优化后的碰撞能量(30 V)下, 对碎片离子进行二级质谱扫描, 选择丰度较高的两个碎片离子分别作为定性和定量离子, 并优化相应的碰撞能, 使仪器的灵敏度、稳定性处于最佳状态, 质谱条件见表 2。在优化完质谱方法后, 对液相方法进行优化。最终, 本研究选择 5 mmol/L 乙酸铵-乙腈作为流动相, 最终梯度洗脱程序见表 1。

表 2　MRM 条件
Table 2　Conditon of MRM

化合物	保留时间/min	母离子(m/z)	子离子(m/z)	驻留时间/s	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
ZEN	4.86	317.1	130.8*	0.050	30.0	30.0
ZEN	4.86	317.1	175.0	0.050	30.0	25.0
ZEN 内标	4.86	335.1	185.0	0.050	30.0	15.0

注: *为定量离子。

2.4　定性与定量分析

采用优化后的质谱条件和表 1 的液相条件, 对质量浓度为 50 μg/L ZEN 标准溶液与 20 μg/L 的 ZEN 同位素内标($^{13}C_7$-ZEN)进行测定, 得到的 ZEN 及其内标色谱图见图 5。如图 5 所示, ZEN 在 Polar C_{18} 色谱柱上的保留时间为 4.86 min。ZEN 分子中含有两个酚羟基和一个羰基, 这些基团能与色谱柱的固定相形成氢键, 从而增加其在柱上的保留时间。通过精细调控流动相的有机相比例、pH 和梯度程序来实现, 使得 ZEN 能从复杂的样品基质和其他性质相近的霉菌毒素中有效地分离出来, 获得尖锐、对称的色谱峰, 从而进行准确定量和定性分析。针对小麦粉基质样品(加标浓度 10.0 μg/kg), 经分子印迹固相柱净化后, 得到加标样品的色谱图, 见图 6。

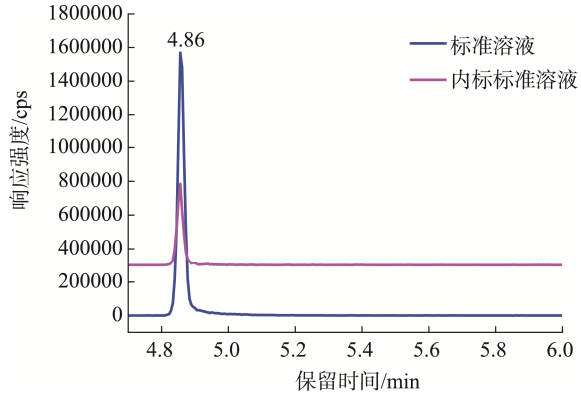


图 5　ZEN 及其内标的标准溶液色谱图
Fig.5　Chromatograms of standard solutions of ZEN and its internal standard

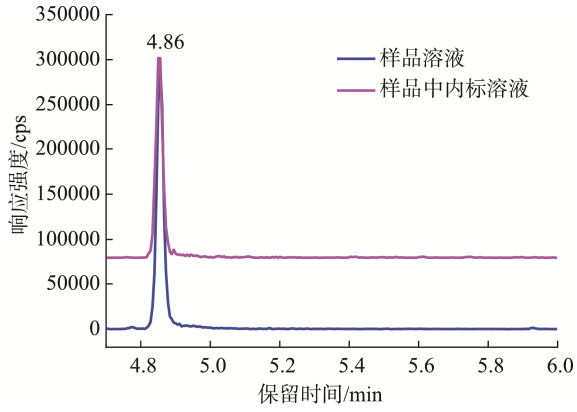


图 6　实际样品中 ZEN 及其内标色谱图
Fig.6　Chromatogram of ZEN and its internal standard in samples

由图 6 可知, 实验样品中 ZEN 的出峰时间与标准工作液相同, 均为 4.86 min, 可作为该物质的确认依据。此外, 加标基质样品的谱图显示背景噪声及杂质峰极为微弱, 证明了 MIP-SPE 技术在复杂食品基质净化方面的高效性与选择性。

2.5　方法学考察

2.5.1　线性范围和检出限

对添加浓度为 3.0 μg/kg 的阳性加标样品进行检测, 通过色谱谱图计算信噪比(S/N)。鉴于所测得的 S/N 满足大于 3 的最低检出条件, 据此确立本研究方法的检出限为 3.0 μg/kg。此检出限远远低于液相色谱法的 15 μg/kg[29]、酶联免疫法的 8.61 μg/kg[30], 纳米金适配体传感器法的

10 μg/kg[31]。采用内标法定量，以不同质量浓度的 ZEN 标准溶液(1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0 μg/L)构建标准工作曲线。将 ZEN 与内标物峰面积的比值作为 Y 轴，ZEN 浓度(μg/L)作为 X 轴进行线性拟合。所得线性回归方程为 Y=0.7213X–0.2704，决定系数 r^2 为 0.9997。实验结果表明，ZEN 在 1.00~50.00 μg/L 的质量浓度区间内具有良好的线性响应关系。

2.5.2 准确度和精密度

采用加标回收的方法来验证实验的准确度和精密度。准确称取 5.00 g 样品，添加 3 个水平的 ZEN 标准物质(分别为 3.00、6.00、30.00 μg/kg)，进行提取、净化、每个添加水平平行测定 3 次，每个浓度重复进样 3 次，进行定量分析。研究结果显示：平均回收率为 80.2%~95.8%，说明该方法在不同浓度水平下均具有良好的回收性能，能有效反映样品中的真实含量；精密度 RSDs 在 4.9%~7.6%之间，表明实验重复性良好，数据分散度较小，符合定量分析方法的精密度要求。

2.6 实际样品的检测

运用本研究所建立的分析方法，对从市场上采购的 50 批次小麦粉样本进行了检测评估。分析结果表明，其中 12 批次小麦粉样本中检测到 ZEN 的存在，其含量为 3.60~980.00 μg/kg；其余 38 批次样本中未发现 ZEN 检出。经调查研究发现，ZEN 含量超标的小麦粉为散装小麦粉，究其超标原因是小麦粉储存不当。为验证本方法的可靠性，采用 LS/T 6133—2018《主要粮谷中 16 种真菌毒素的测定液相色谱串联质谱法》对这 50 批次小麦粉样品进行验证，测得的 ZEN 含量为 3.15~920.00 μg/kg，所得结果稍低于本研究所得结果。采用 LS/T 6133—2018 测得的回收率在 75.2%~89.6%之间，精密度 RSDs 在 5.2%~9.8%之间，其回收率与精密度均低于本方法。究其原因，LS/T 6133—2018 标准方法的净化步骤存在不足，未能充分去除谷物基质中的共提取杂质。这种杂质残留会引发明显的基质效应，干扰目标物质谱响应信号的准确性，从而导致加标回收率低于预期水平。因此，本研究建立的方法在准确度和精密度方面均优于行业标准法。

3 结 论

本研究成功建立了一种基于分子印迹固相柱富集、净化结合 UPLC-MS/MS 法分析小麦粉中 ZEN 的定量检测新方法。通过对样品前处理过程及液相色谱与质谱分析条件进行系统优化，最终构建了以同位素标记 ZEN 为内标的定量分析方案，显著提高了方法的准确性与可靠性。在提取溶剂优化过程中，发现采用含 70%乙腈/水含 1%乙酸作为提取剂时，ZEN 的提取回收率最高，可达 95%，表现出优异的提取效率。稳定性实验进一步表明，在 15 ℃条件下保存 24 h，目标物的仪器响应未见明显衰减，说明该方法具有良好的样品前处理稳定性。针对小麦粉基质组成复杂、干扰物较多的特点，本研究引入分子印迹固相柱对提取液进行选择性净化。通过引入分子印迹固相柱进行选择性净化，通过净化柱中的填料对 ZEN 的特异性识别能力，极大降低了复杂基质的干扰，使基质效应 CV 控制在 3.8%以内，远优于传统的 ELISA、LFIA 及液相色谱法。该方法不仅在灵敏度和抗干扰能力上表现出显著优势，还具备成本低、操作简便的特点，展现出极强的推广价值与技术贡献。展望未来，该前处理技术具备潜力可拓展应用至粮食、农产品、食品、饲料等各种复杂基质中真菌毒素的测定，并有望与实时质谱监测仪或多重免疫捕获技术结合，为食品安全风险监测与控制提供更广阔的技术支持与创新方向。同时也为相关食品安全限量标准的修订与完善提供了有力的技术支撑，在食品安全风险监测与控制领域具有较好的应用前景。

参考文献

[1] 房文苗, 王小兰, 季德媛, 等. 高效液相色谱法测定玉米中玉米赤霉烯酮[J]. 现代食品, 2023, 29(5): 133–135.
FANG WM, WANG XL, JI DY, *et al*. Determination of zearalenone in corn by high-performance liquid chromatography [J]. Modern Food, 2023, 29(5): 133–135.

[2] 张辉珍, 马爱国, 李惠颖, 等. 免疫亲和层析净化高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮[J]. 理化检验(化学分册), 2009, 45(11): 1323–1325, 1328.
ZHANG HZ, MA AIG, LI HY, *et al*. Determination of zearalenone in corn by immunoaffinity chromatography purification high-performance liquid chromatography [J]. Physical Testing and Chemical Analysis (Part B:Chemical Analysis), 2009, 45(11): 1323–1325, 1328.

[3] 魏玉霞, 张思静, 左郡, 等. 玉米粉中 3 种玉米赤霉烯酮真菌毒素的检测及其膳食暴露风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(14): 24–29.
WEI YX, ZHANG SJ, ZUO J, *et al*. Development of determination procedure and dietary exposure risk assessment for 3 kinds of zearalenone mycotoxins in maize flour [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(14): 24–29.

[4] 刘峰良, 赵志辉, 谢晶. 谷物中真菌毒素的研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, 39(19): 115–119.
LIU FL, ZHAO ZH, XIE J. Research progress of mycotoxins in cereals [J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(19): 115–119.

[5] WANG S, NIU R, YANG Y, *et al*. Development and evaluation of a rapid immunomagnetic extraction for effective detection of zearalenone in agricultural products [J]. Food Control, 2020, 110: 106973.

[6] HE Y, AHMAD D, ZHANG X, *et al*. Genome-wide analysis of family-1 UDP glycosyltransfer- ases (UGT) and identification of UGT genes for FHB resistance in *Triticum aestivum* L. [J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 67.

[7] 吴本刚, 孙宝胜, 徐存宽, 等. 小麦中呕吐毒素和玉米赤霉烯酮与赤霉病粒关系研究[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(7): 105–108.
WU BG, SUN BS, XU CK, *et al*. Study on relationship of DON content, ZEN content and gibberella damaged kernels in wheat [J]. Cereals & Oils, 2017, 30(7): 105–108.

[8] 何慧慧. 赤霉病小麦湿法加工产物中真菌毒素的分布研究[D]. 郑州: 河南工业大学, 2016.
HE HH. Distribution of fungal toxins in wet-processed products of wheat

scab [D]. Zhengzhou: Henan University of Technology, 2016.

[9] WEI T, REN P, HUANG L, *et al*. Simultaneous detection of aflatoxin B_1, ochratoxin A, zearalenone and deoxynivalenol in corn and wheat using surface plasmon resonance [J]. Food Chemistry, 2019, 300: 125176.

[10] 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.
LIU M, ZHANG JX, LIU SS, *et al*. Research progress on detection methods of zearalenone in grain and oil crops [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2021, 40(5): 12–20.

[11] 刘敏, 王晓伟, 朱大伟, 等. HPLC 法测定粮食中玉米赤霉烯酮不同前处理方法对比研究[J]. 食品安全导刊, 2025(17): 66–68.
LIU M, WANG XW, ZHU DW, *et al*. Comparative study on different pretreatment methods for determination of zearalenone in grain by HPLC [J]. Journal of Food Safety Guide, 2025(17): 66–68.

[12] 蔡亚玲, 张志岐, 董芳, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米和小麦中玉米赤霉烯酮和玉米赤霉烯酮-14-葡萄糖苷检测方法的建立[J]. 上海农业学报, 2024, 40(4): 86–91.
CAI YL, ZHANG ZQ, DONG F, *et al*. Establishment of a method for simultaneous determination of zearalenone and zearalenone-14-glucoside in corn and wheat by UPLC-MS/MS [J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2024, 40(4): 86–91.

[13] CHUN HS, CHOI EH, CHANG HJ, *et al*. A fluorescence polarization immunoassay for the detection of zearalenone in corn [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 639(1-2): 83–89.

[14] HU M, GE W, LIU X, ZHU Y. Preconcentration and determination of zearalenone in corn oil by a one-step prepared polydopamine-based magnetic molecularly imprinted polymer (MIP) with high-performance liquid chromatography with fluorescence (HPLC-FLD) detection [J]. Analytical Letters, 2022, 55(3): 343–354.

[15] 吴宇, 叶金, 李丽, 等. 免疫亲和柱全自动净化-超高效液相色谱-串联质谱-全碳标记内标法精确测定粮油中玉米赤霉烯酮[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 267–272.
WU Y, YE J, LI L, *et al*. Accurate determination of zearalenone in grain and oil by automatic immunoaffinity column purification coupled with UPLC-MS/MS using uniformly ^{13}C-labeled internal standard [J]. Food Science, 2020, 41(24): 267–272.

[16] 索德成, 肖志明, 安志新, 等. 液相色谱-四极杆线性离子阱质谱法测定动物饲料、血液和肌肉中玉米赤霉烯酮及其隐蔽型[J]. 动物营养学报, 2025, 37(8): 5514–5523.
SUO DC, XIAO ZM, AN ZX, *et al*. Determination of zearalenone and its hidden forms in animal feed, blood and muscle by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2025, 37(8): 5514–5523.

[17] HE QR, PENG HW, YANG JY, *et al*. QuEChERS extraction followed by enzyme-linked immune-sorbent assay for determination of deoxynivalenol and zearalenone in cereals [J]. Food & Agricultural Immunology, 2017, 28(8): 1477–1495.

[18] HUANG LC, ZHENG N, ZHENG BQ, *et al*. Simultaneous determination of aflatoxin M_1, ochratoxin A, zearalenone and α-zearalenol in milk by UHPLC-MS/MS [J]. Food Chemistry, 2014, 146: 242–249.

[19] 王婷. 玉米赤霉烯酮和伏马菌素 B_1 单克隆抗体的制备及其酶联免疫吸附分析法的建立[D]. 苏州: 苏州大学, 2024.
WANG T. Preparation of monoclonal antibodies against zearalenone and fumonisin B_1 and establishment of ELISA [D]. Suzhou: Suzhou University, 2024.

[20] YANG QQ, ZHU JG, MA F, *et al*. Quantitative determination of major capsaicinoids in serum by ELISA and time-resolved fluorescent immunoassay based on monoclonal antibodies [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 81: 229–235.

[21] 何方洋, 万宇平, 崔廷婷, 等. 谷物中玉米赤霉烯酮残留的胶体金免疫层析法测定[J]. 食品工业, 2019, 40(5): 308–311.
HE FY, WAN YP, CUI YT, *et al*. Determination of zearalenone residues in cereals by colloidal gold immunochromatography [J]. The Food Industry, 2019, 40(5): 308–311.

[22] 贺丽丽. 胶体金免疫层析技术快速检测谷物中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素[J]. 食品安全导刊, 2019(10): 46–49.
HE LL. Rapid detection of aflatoxin, zearalenone, and deoxynivalenol in cereals using colloidal gold immunochromatography [J]. Journal of Food Safety Guide, 2019(10): 46–49.

[23] 李文君, 郭晶, 李正刚, 等. 免疫亲和柱净化-高效液相色谱-荧光检测器测定芡实药材中玉米赤霉烯酮含量[J]. 中国卫生工程学, 2025, 24(6): 801–802, 805.
LI WJ, GUO J, LI ZG, *et al*. Determination of zearalenone content in medicinal material euryale ferox by immunoaffinity column purification, high-performance liquid chromatography, fluorescence detection [J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2025, 24(6): 801–802, 805.

[24] DRZYMALA SS, WEIZ S, HEINZE J, *et al*. Automated solid-phase extraction coupled online with HPLC-FLD for the quantification of zearalenone in edible oil [J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(12): 3489–3497.

[25] 曲涵婷, 李正刚, 程焱, 等. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定白扁豆中玉米赤霉烯酮的含量[J]. 中国民族民间医药, 2025, 34(5): 40–42.
QU HT, LI ZG, CHENG Y, *et al*. Determination of zearalenone content in white hyacinth bean by immunoaffinity column purification, high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Ethnomedicine and Ethnopharmacy, 2025, 34(5): 40–42.

[26] 牟钧, 潘蓓, 杨军, 等. 胶体金免疫层析法快速测定玉米和小麦中玉米赤霉烯酮[J]. 粮油食品科技, 2011, 19(5): 43–45.
MOU J, PAN B, YANG J, *et al*. Rapid determination of zearalenone in corn and wheat by colloidal gold immunochromatography [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2011, 19(5): 43–45.

[27] 莫凡, 姚婷, 胡深, 等. 免疫磁珠高通量全自动净化结合高效液相色谱快速测定饲料中玉米赤霉烯酮含量[J]. 动物营养学报, 2024, 36(11): 7454–7466.
MO F, YAO T, HU S, *et al*. High-throughput automatic purification combined with HPLC for rapid determination of zearalenone in feed [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2024, 36(11): 7454–7466.

[28] LUCCI P, DERRIEN D, ALIX F, *et al*. Molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for detection of zearalenone in cereal sample extracts [J]. Analytica Chimica Acta, 2010, 672(1-2): 15–19.

[29] LIU G, HAN Z, NIE D, *et al*. Rapid and sensitive quantitation of zearalenone in food and feed by lateral flow immunoassay [J]. Food Control, 2012, 27(1): 200–205.

[30] 刘媛, 刘贤进, 余向阳, 等. 玉米赤霉醇人工抗原合成及其多克隆抗体的制备[J]. 分析科学学报, 2006, 22(1): 1–4.
LIU Y, LIU XJ, YU XY, *et al*. Synthesis of zearalanol artificial antigen and preparation of polyclonal antibodies [J]. Journal of Analytical Science, 2006, 22(1): 1–4.

[31] SUN S, ZHAO R, FENG S, *et al*. Colorimetric zearalenone assay based on the use of an aptamer and of gold nanoparticles with peroxidase-like activity [J]. Microchim Acta, 2018, 185(12): 535.

(责任编辑: 安香玉　蔡世佳)