

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定坚果中 20 种真菌毒素

倪 杨, 杨军军, 石 磊, 张莹莹, 熊 融*

[北京市农林科学院林业果树研究所, 北京市落叶果树工程技术研究中心, 农业农村部果品及苗木质量监督检验测试中心(北京), 北京 100093]

摘要: 目的 建立 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定坚果中 20 种真菌毒素含量的分析方法。**方法** 粉碎后的样品加水稀释, 经乙腈溶液超声提取, 氯化钠和无水硫酸铵盐析后, 用 C₁₈ 吸附剂净化。色谱柱为 ACQUITY BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 以 0.05% 甲酸水溶液和乙腈为流动相梯度洗脱, 在电喷雾离子源正、负离子切换扫描模式下, 采用多反应监测模式进行检测, 外标法进行定量。**结果** 在相应的质量浓度范围内, 20 种真菌毒素均呈现良好线性关系, 相关系数均大于 0.992, 检出限和定量限分别为 0.03~2.25 μg/kg 和 0.11~7.50 μg/kg。在不同基质中加入低、中、高 3 个添加水平, 平均加标回收率为 77.5%~114.9%, 相对标准偏差为 1.0%~6.5% (n=6)。**结论** 本方法稳定、准确、灵敏、快速, 适用于不同坚果基质中多种真菌毒素的快速检测和分析确证。

关键词: QuEChERS; 超高效液相色谱-串联质谱法; 真菌毒素; 坚果

Simultaneous determination of 20 kinds of mycotoxins in nuts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

NI Yang, YANG Jun-Jun, SHI Lei, ZHANG Ying-Ying, XIONG Rong*

[Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing Engineering Research Center for Deciduous Fruit Trees, Inspection and Testing Laboratory of Fruits and Nursery Stocks (Beijing) Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100093, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 20 kinds of mycotoxins in different nuts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with QuEChERS extraction. **Methods** After homogenization, the nut samples were ultrasonic extracted by acetonitrile solution after diluted with water, salted out with sodium chloride and anhydrous ammonium sulphate, and purified with C₁₈ adsorbent. An ACQUITY BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was used, with 0.05% formic acid aqueous solution-acetonitrile as mobile phase for gradient elution. In the electrospray ionization positive and negative ion switching scanning mode, the samples were analyzed by multiple reaction monitoring and quantified by external

基金项目: 北京市科技计划项目(Z201100008920007)、北京市农林科学院科技创新能力建设专项(KJCX20200302)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan of Beijing City (Z201100008920007), and the Scientific and Technological Innovation Capacity Building Project of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences (KJCX20200302)

*通信作者: 熊融, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为植物资源评价与检测技术研究。E-mail: rong_xiong@hotmail.com

*Corresponding author: XIONG Rong, Master, Senior Engineer, Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, No.12, Minzhuang Road, Haidian District, Beijing 100093, China. E-mail: rong_xiong@hotmail.com

standard method. **Results** All the 20 kinds of mycotoxins showed good linear relationships in their respective mass concentration ranges, and the correlation coefficients were greater than 0.992. The limits of detection and limits of quantification were 0.03–2.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.11–7.50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The average recoveries of 20 kinds of mycotoxins in different matrices at low, medium and high spiked levels were ranged from 77.5%–114.9% ($n=6$), with relative standard deviations in the range of 1.0%–6.5%. **Conclusion** This method is stable, accurate, sensitive and rapid, and suitable for the rapid detection and analysis of multi-mycotoxins in different nut substrates.

KEY WORDS: QuEChERS; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; mycotoxins; nuts

0 引言

我国木本坚果品种丰富,是世界第二大生产国,占世界总产量的 10%,主品种有核桃、板栗、松子、开心果等,富含生物活性成分酚类物质、酸类物质和功能性油脂,具有降低心脑血管疾病风险、延缓衰老、抑制肥胖以及预防糖尿病等多重保健功效^[1],备受消费者青睐。然而,坚果在整个生长周期以及采后贮藏、销售过程中,在适宜的温湿度条件下极易受丝状真菌感染,青霉属(*Penicillium* sp.)、曲霉属(*Aspergillus* sp.)、镰刀菌属(*Fusarium* sp.)、链格孢菌属(*Alternaria* sp.)等真菌是引起坚果霉变的主要病原菌^[2-6],能够轻易突破果皮的防御,在果仁上增殖并产生、积累多种具有毒性的次级代谢产物,如青霉属和曲霉属的多种菌株可产生黄曲霉毒素(aflatoxin, AFs)、赭曲霉毒素(ochratoxin, OTs)、展青霉素(patuline, PAT)、橘青霉素(citrinine, CIT)等多种毒素,镰刀菌属真菌可产生单端孢霉烯族毒素(trichothecene toxin),链格孢菌属真菌可产生链格孢毒素(*Alternaria* toxin)等^[7-13],这些毒素大多具有细胞毒性、胚胎毒性、致畸性、致癌性等多种毒性,并可在人体内富集,给人类健康造成极大危害和安全隐患。

鉴于真菌毒素的危害,许多国家和机构均制定了相应的限量标准,且对坚果中的 AFs 关注度较高,大多数国家制定的黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)限量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB₁与黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂)的总限量为 10 或 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 欧盟规定直接食用的坚果中, AFB₁限量值为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB₁与 AFB₂、AFG₁、AFG₂的总限量为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,经分拣或物理处理的坚果中 AFB₁限量值为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, AFB₁与 AFB₂、AFG₁、AFG₂的总限量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 个别国家对指定产品的毒素限量比欧盟更为严格,如摩洛哥规定开心果和杏仁中 AFB₁的限量为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,克罗地亚规定杏仁、榛子、核桃中 AFB₁与 AFB₂、AFG₁、AFG₂的总限量为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[14]。此外,有 3 个国家对玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)制定了限量标准,乌克兰规定坚果中的 ZEN 限量为 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,亚美尼亚、智利规定所有果品中的 ZEN 限量分别为 1000 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11]。我国在 NY/T 1042—2014《绿色食品 坚果》中规定坚果及其果仁中 AFB₁

含量应小于等于 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,而在 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中,仅规定了熟制坚果及籽类(花生及其制品除外)中 AFB₁限量为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

在对真菌毒素检测技术的探索中,基于抗体的免疫化学方法已发展得较为完善,准确的快速定性检测体系已基本建成^[14-17]。而在精准定量检测方面,超高效液相色谱法、高效液相色谱法等作为主流色谱技术的代表,尤其与质谱技术联用,凭借强大的分离能力和较好的灵敏度、准确性,已经发展成为真菌毒素检测领域最为可靠的定性定量分析方法。CUNHA 等^[18]改进了 QuEChERS 前处理技术,以花生为代表基质,建立了超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定坚果中 16 种真菌毒素的分析方法,各毒素在 1.25~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 范围内相关系数大于 0.9787,检出限(limits of detection, LODs)均小于 3.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。HIDALGO-RUIZ 等^[19]同样选择花生作为代表,以 QuEChERS 前处理技术结合 UPLC-MS/MS 建立了坚果中 6 种真菌毒素的检测方法,其中 4 种 AFs 的定量限(limits of quantification, LOQs)均为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, α -玉米赤霉烯醇和玉米赤霉烯酮的 LOQs 为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。OUAKHSSASE 等^[20]采用 QuEChERS 前处理技术,使用 LC-MS/MS 对杏仁中 AFs 进行测定,各毒素在 0.125~20 g/kg 范围内线性关系良好,LOQs 为 0.34~0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。国内学者王玉娇等^[9]以核桃为代表基质,采用 10 mmol/L 柠檬酸-乙腈溶液为提取剂,以 QuEChERS-UPLC-MS/MS 建立了干果中 16 种真菌毒素的测定方法,各毒素在 1~200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内相关系数大于 0.9981,LODs 为 0.02~1.00 $\mu\text{g}/\text{L}$,LOQs 为 0.10~5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。王权帅等^[21]通过优化流动相、色谱柱和洗脱梯度条件,采用同位素内标-UPLC-MS/MS 对板栗中的 16 种真菌毒素进行测定,LODs 和 LOQs 分别为 0.10~15、0.30~45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

由于我国坚果种类多样,基质较为复杂,前期研究较多选择花生或核桃作为代表基质用于坚果中多组分真菌毒素检测方法的研究,适用范围并不能覆盖所有坚果产品,且目标毒素多为 AFs、OTs、单端孢霉烯族毒素等谷物、粮油中的常见种类,坚果作为一类果品,其生长发育过程、采后加工方式以及贮藏环境条件均与谷物不同,受多种毒素污染的潜在风险更大。因此,本研究综合利用 QuEChERS 前

处理技术和 UPLC-MS/MS 的优势, 在借鉴以往文献中有关真菌毒素提取、净化等处理方法的基础上^[22-25], 进一步优化色谱质谱条件, 选用 6 种坚果基质, 建立坚果中 20 种主要真菌毒素的测定分析方法, 以期为监测、评估坚果中多组分毒素的污染风险和痕量确证分析提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

坚果样品购自北京本地农贸市场, 粉碎后于 -20°C 保存。

20 种真菌毒素标准品/标准溶液见表 1(恩镰孢菌素 B 标准品纯度大于 98%, 其他真菌毒素标准溶液浓度见表 1, 北京曼哈格生物科技有限公司); ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm)、ACQUITY BEH HILIC 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) (美国 Waters 公司); 十八烷基硅烷键合硅胶(C_{18} , 60 μm)、乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(primary secondary amine, PSA, 60 μm)、农残级弗罗里硅土(Florisoril[®] PR, FL-PR, 100 目)、亲水亲脂共平衡聚合物反相填料(hydrophilic lipophilic balance, HLB, 30 μm) (日本岛津公司); 微孔过滤膜(尼龙, 13 mm \times 0.22 μm , 北京迪科马科技有限公司); 乙腈、甲酸、甲醇(色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 乙酸铵、NaCl、无水 Na_2SO_4 、无水 MgSO_4 、无水 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司); 氩气(纯度大于 99.9%, 北京氮普北分气体工业有限公司); 实验用水为超纯水(电阻率大于 18.2 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$, 由 Milli-Q 超纯水机制备)。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC I-Class 液相色谱仪、Xevo TQ-S 质谱仪(配有 ESI 及 Masslynx4.1 数据处理系统, 美国 Waters 公司); Milli-Q 超纯水机(美国 Millipore 公司); GL-20G-II 型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); BSA224S-CW 型电子天平(感量 0.1 mg, 德国 Sartorius 公司); PL2002 型电子天平(感量 0.01 g)、FE20 型实验室 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); KQ-600DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); RE-2000B 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂); ZD-85 型气浴恒温振荡器(常州国华电器有限公司); QL-8BB 型涡旋混合器(海口市其林贝尔仪器制造有限公司); BJ-500A 型粉碎机(德清拜杰电器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

基于参考文献中研究建立的前处理方法^[9,26]进行适当改进: 称取 5 g(精确到 0.01 g)粉碎样品置于 50 mL 离心管中, 加入 5 mL 蒸馏水涡旋混匀, 再加入 10 mL 乙腈溶液超声提取 5 min, 然后加入 1.0 g 氯化钠和 3.0 g 无水硫酸铵, 涡旋振荡 0.5 min, 5000 r/min 离心 5 min。吸取 5 mL 有机相

置于内含 0.2 g C_{18} 的 10 mL 离心管中, 涡旋振荡 0.5 min 后, 室温静置 3 min。吸取 4 mL 上清液于茄型瓶中, 旋转蒸发至干, 加入 2 mL 甲醇复溶, 过 0.22 μm 有机滤膜于 2 mL 样品瓶中, 待测分析。

加标阴性样品前处理: 选取经检测不含 20 种真菌毒素的 6 种空白样品(核桃、板栗、松籽、杏仁、开心果、腰果各 1 份), 分别在 50 mL 离心管中称取 5 g(精确到 0.01 g)粉碎试样, 根据需要加入一定体积的混合标准溶液后, 按照上述方法进行样品前处理。

1.3.2 溶液配制

ENB 标准溶液: 称取 1 mg(精确到 0.1 mg) ENB 标准品于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解后定容, 充分混匀后得到 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液, 于 -20°C 冰箱中避光保存。吸取 1 mL ENB 标准储备液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容得到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液, 于 4°C 下避光保存。

混合标准溶液: 分别移取一定体积的 20 种真菌毒素标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 加入适量甲醇稀释并定容至刻度线, 得到混合标准溶液, 其中 PAT、ZEN 质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{L}$, 其余 18 种真菌毒素质量浓度均为 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

空白基质溶液: 另取经检测不含 20 种真菌毒素的 6 种空白样品(核桃、板栗、松籽、杏仁、开心果、腰果各 1 份), 按照 1.3.1 节进行样品前处理, 制备空白基质溶液以待用。

基质混合标准溶液: 分别移取一定体积的 20 种真菌毒素标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 加入适量空白基质溶液稀释并定容至刻度线, 配制不同质量浓度的系列基质混合标准工作液, 现用现配。其中, PAT、ZEN 的标准工作曲线溶液质量浓度分别为 5、10、50、100、250、500 $\mu\text{g}/\text{L}$, 其余 18 种真菌毒素的标准工作曲线溶液质量浓度均为 1、2、10、20、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

0.1%甲酸水溶液: 吸取 1 mL 甲酸于 1 L 容量瓶中, 加入超纯水稀释并定容至刻度线。

5 mmol/L 乙酸铵水溶液: 称取 0.385 g(精确到 0.1 mg) 乙酸铵于 1 L 容量瓶中, 加入超纯水溶解并定容至刻度线。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: ACQUITY BEH C_{18} 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40°C ; 进样量: 2 μL ; 流速: 0.2 mL/min; 流动相: A 为乙腈, B 为 0.05% 甲酸水; 梯度洗脱程序: 0~0.5 min、90% B; 0.5~1.0 min、90%~40% B; 1.0~3.0 min、40%~10% B; 3.0~4.0 min、10% B; 4.0~8.0 min、90% B。

1.3.4 质谱条件

电离源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正、负离子同时扫描; 检测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 毛细管电压: 2.5 kV; 离子源温度: 150°C ; 锥孔电压: 30 V; 脱溶剂气温度: 350°C ; 脱溶剂气流量: 650 L/h; 碰撞气: 氩气。

1.4 数据处理

通过 Waters Masslynx 仪器配置工作站系统进行数据采集, 利用 Excel 软件、R 语言进行数据分析及图形绘制。

2 结果与分析

2.1 质谱条件的优化

混合标准工作液直接进样, 利用 Q1 MS Scan 母离子全扫模式进行一级质谱碎片离子母离子质荷比(m/z)的寻找, 获得目标化合物的母离子信息。利用 Q2 MS/MS daughter Scan 子离子扫描模式进行二级质谱碎片离子的寻找, 选择两个响应较强的碎片离子作为子离子。通过手动调节碰撞能量和锥孔电压, 获得目标化合物的质谱参数。实验发现 PAT、ZAN、ZEN 在负离子模式下响应值高, 分子离子峰为[M-H]⁻; 其他 17 种化合物在正离子模式下响应值高, 其中 T-2、HT-2、BEA、ENB 分子离子峰为[M+NH₃]⁺, 其余均为[M+H]⁺, 20 种真菌毒素多反应监测模式质谱参数如表 1 所示。

2.2 色谱条件的优化

本研究比较了 ACQUITY BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)、ACQUITY HSS T3 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)、ACQUITY BEH HILIC 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)对

目标化合物的分离效果。结果发现, 使用 HSS T3 柱时, HT-2、ENB、ALT、TeA 和 PAT 峰形较差, 响应值较低, 且 ENB 为驼峰; 使用 BEH HILIC 柱时, ALT、TeA、ZAN 3 种化合物均不出峰; 而 BEH C₁₈ 柱能够在 6 min 内较好的分离 20 种化合物, 且峰型更加对称, 故选定 ACQUITY BEH C₁₈ 柱作为分析色谱柱。

在反相液相色谱中, 最常用的流动相体系为甲醇-水、乙腈-水, 并通过水相中添加少量甲酸、乙酸、甲酸铵、乙酸铵等降低流动相 pH 来改善峰形、提高质谱离子化效率^[27-28]。因此, 本研究以甲醇、乙腈分别与纯水、0.1% 甲酸水溶液、5 mmol/L 乙酸铵水溶液组成流动相, 比较 20 种真菌毒素的色谱峰分离效果及峰形情况。结果表明, 甲醇与水相混合后柱压升高, 且保留时间延迟, 而乙腈的洗脱能力较强, 柱压不会明显升高, 在 6 min 内即出峰完毕。以乙腈为有机相, 分别与纯水、5 mmol/L 乙酸铵水组合时, OTA、ALT、CIT、TeA 的峰形较差, 丰度和灵敏度较低, 并且乙酸铵水溶液需要过膜处理, 易产生结晶堵塞管路。使用乙腈-0.1% 甲酸水时, 峰形对称性明显得到改善, 并且响应值增强, 进一步考察不同浓度甲酸(0.01%、0.05%、0.1%)对被测组分的影响, 当以乙腈-0.05% 甲酸水作为流动相时, 20 种真菌毒素的色谱峰形和响应强度最好, 保留时间稳定(见图 1)。

表 1 20 种真菌毒素质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters for 20 kinds of mycotoxins

真菌毒素	缩写	标准溶液质量浓度/(μg/mL)	离子模式	保留时间/min	质核比(m/z)		锥孔电压/V	碰撞能量/eV
					母离子	子离子		
T-2 毒素(T-2 toxin)	T-2	100	[M+NH ₃] ⁺	3.41	483.8	169.1/185.1*	25	20; 20
HT-2 毒素(HT-2 toxin)	HT-2	100	[M+NH ₃] ⁺	3.11	442.2	215.1/263.1*	25	10; 10
白僵菌素(beauvericin)	BEA	100	[M+NH ₃] ⁺	4.89	801.4	244.2*/262.2	30	35; 20
恩镰孢菌素 B (enniatiin B)	ENB	/	[M+NH ₃] ⁺	5.05	657.0	196.0*/215.0	30	30; 30
黄曲霉毒素 B ₁ (aflatoxin B ₁)	AFB ₁	2	[M+H] ⁺	3.03	313.0	241.2*/285.2	35	25; 20
黄曲霉毒素 B ₂ (aflatoxin B ₂)	AFB ₂	0.5	[M+H] ⁺	2.96	315.1	259.2*/287.2	35	25; 20
黄曲霉毒素 G ₁ (aflatoxin G ₁)	AFG ₁	2	[M+H] ⁺	2.95	329.0	200.2/215.2*	35	25; 25
黄曲霉毒素 G ₂ (aflatoxin G ₂)	AFG ₂	0.5	[M+H] ⁺	3.22	331.0	189.2*/217.2	35	25; 25
赭曲霉毒素 A (ochratoxine A)	OTA	10	[M+H] ⁺	3.52	404.1	239.1*/358.1	30	25; 20
赭曲霉毒素 B (ochratoxine B)	OTB	10	[M+H] ⁺	3.22	370.1	103.1*/205.1	25	25; 30
青霉素(penicillic acid)	PeA	100	[M+H] ⁺	2.70	171.1	125.1*/153.1	15	10; 8
橘青霉素(citrinin)	CIT	100	[M+H] ⁺	3.14	251.2	191.1*/205.2	30	25; 20
交链孢烯(altenuene)	ALT	10	[M+H] ⁺	3.09	293.1	239.1*/257.0	30	20; 15
交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether)	AME	100	[M+H] ⁺	3.50	273.1	128.0/258.0*	30	35; 35
交链孢酚(alternariol)	AOH	99.9	[M+H] ⁺	2.89	259.0	185.0*/213.0	30	28; 25
细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid)	TeA	100	[M+H] ⁺	3.46	198.2	125.0*/139.0	30	18; 20
腾毒素(tentoxin)	TEN	100	[M+H] ⁺	3.04	415.1	256.0/312.1*	30	20; 20
展青霉素(patuline)	PAT	100	[M-H] ⁻	2.30	153.0	81.0*/108.9	-15	-11; -7
玉米赤霉酮(zearalanone)	ZAN	10	[M-H] ⁻	3.49	317.1	130.8/175.1*	-30	-20; -20
玉米赤霉烯酮(zearalenone)	ZEN	99.8	[M-H] ⁻	3.52	319.1	205.3/275.1	-30	-20; -20

注: *为定量离子, /表示未有此项。

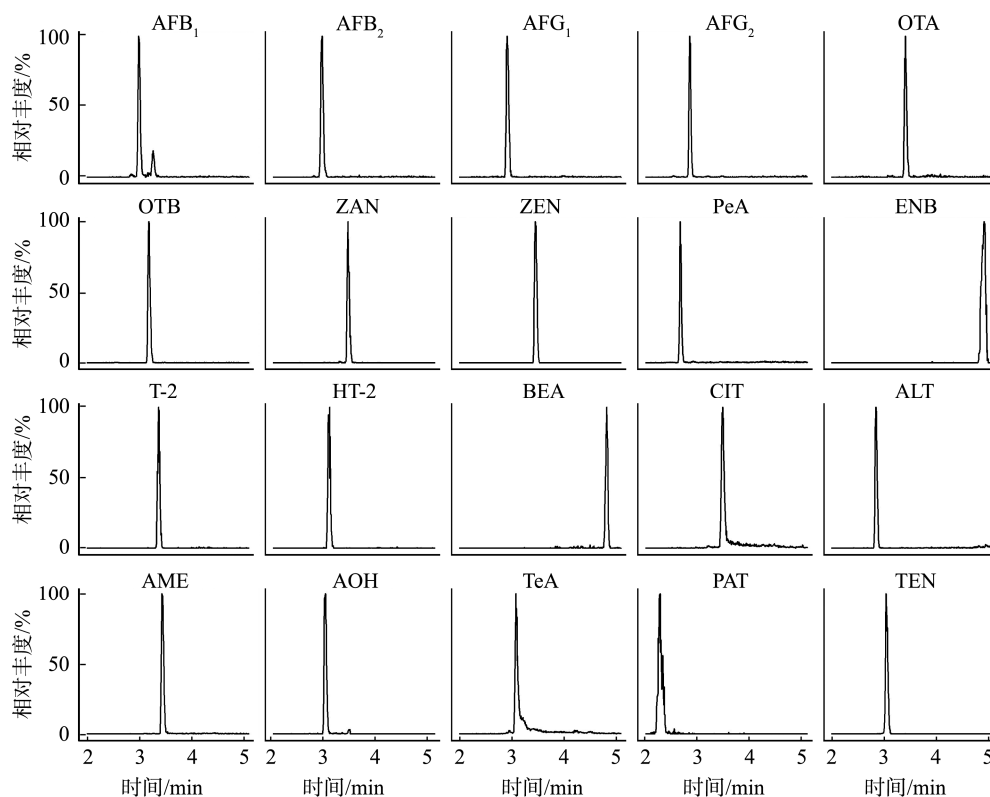


图 1 20 种真菌毒素的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 20 kinds of mycotoxions

2.3 样品前处理的优化

大多数真菌毒素易溶于有机溶剂, 甲醇和乙腈是目前最常用的两种提取溶剂^[29], 甲醇比乙腈具有更好的溶解性, 易将样品中的酸、酚、蛋白、脂肪等物质提取出来, 致使提取液中杂质较多, 不利于后续的盐析和净化, 而乙腈对蛋白的沉淀作用较强且共提物少^[30], 因此选择乙腈作为提取剂。

QuEChERS 前处理过程中加入盐析剂(1 g NaCl 和 4 g 无水 $MgSO_4$)^[31]可以促进目标化合物由水相分配至有机相, 利于水相与有机相分层, 防止样品中水分和杂质进入提取液, 从而提高目标化合物的回收率^[32]。本研究以空白核桃样品的加标回收实验, 考察了 NaCl、无水 $MgSO_4$ 、无水 Na_2SO_4 和无水 $(NH_4)_2SO_4$ 对目标化合物回收的影响。结果发现, 盐析剂单独使用时, 多种毒素回收率较低, 无法满足实验要求。NaCl 常用作水相与有机相溶液的分层, 添加 1.0 g 即可使两相溶液分层完全、清透, 实验进一步比较了 1.0 g NaCl 与其他 3 种盐析剂组合使用对毒素回收率的影响。结果如表 2 所示, 当 NaCl 与无水 $(NH_4)_2SO_4$ 组合盐析时, 多数毒素的回收率显著优于 NaCl 与无水 $MgSO_4$ 、无水 Na_2SO_4 组合, 且随着无水 $(NH_4)_2SO_4$ 用量的增加, 回收率随之增加, 在最优组合下 20 种真菌毒素回收率达到 88.7%~98.2%, 因此本方法采用 1.0 g NaCl 与 3.0 g 无水 $(NH_4)_2SO_4$ 组合作为盐析剂。

在目标物提取过程中, 坚果中的蛋白质、脂质等组分也会被部分提取, 不仅影响痕量目标物的检测, 也会对色谱、质谱系统造成污染, 为降低基质效应, 需要对提取液进行净化除杂。参考文献[9,29]并以空白核桃样品的加标回收实验, 比较了不同用量(50、100、200、300)的 C_{18} 、PSA、FL-PR、HLB 对 20 种真菌毒素净化回收的效果($n=3$)。结果发现, 使用 50~300 mg 的 PSA、FL-PR、HLB 对 AFB₂、AFG₁、ALT、CIT、ZEN 等多种毒素均有较强吸附, 最高回收率仅为 31.4%~65.5%, 达不到实验要求。当使用 200 mg C_{18} 作为吸附剂时, 20 种毒素的加标回收率最优, 达到 86.0%~97.5%, 因此选用 200 mg C_{18} 对提取液进行净化处理。

2.4 基质效应

为评价基质效应, 采用基质标与溶剂标曲线斜率的比值考察了 20 种真菌毒素在核桃、板栗、松籽、杏仁、开心果和腰果中的信号增强/抑制程度(signal suppression/enhancement, SSE), SSE 值大于 1.2 表示基质增强效应, 小于 0.8 表示基质抑制效应, 在 0.8~1.2 之间则视为基质效应影响不大^[30]。如表 3 所示, 在 6 种坚果基质中, ENB 基质增强效应明显(SSE 值为 1.223~1.268), ZEN、PeA、CIT 和 ALT 基质抑制效应明显(SSE 值为 0.571~0.717), 其余 15 种真菌毒素的基质效应均在可接受范围内。因此本研究采用空白基质外标曲线法进行定量, 以补偿基质效应。

表 2 盐析剂对 20 种真菌毒素回收率的影响(% , n=3)
Table 2 Effects of different salting-out agents on the recoveries of 20 kinds of mycotoxins (% , n=3)

真菌毒素	A	B	C	D	E	F	G	H	I
AFB ₁	71.2±2.1 ^b	79.1±2.6 ^b	90.1±3.5 ^a	63.2±3.6 ^b	65.0±2.9 ^b	68.0±1.0 ^b	72.2±2.6 ^b	69.8±2.2 ^b	66.0±2.6 ^b
AFB ₂	92.9±3.6 ^a	91.6±1.9 ^a	92.6±1.6 ^a	92.6±3.0 ^a	94.4±1.6 ^a	90.7±3.3 ^a	93.3±1.8 ^a	94.1±2.0 ^a	96.9±1.6 ^a
AFG ₁	105.1±1.6 ^a	94.1±2.0 ^a	94.1±2.6 ^a	93.5±2.3 ^a	92.3±2.1 ^a	96.9±2.9 ^a	90.6±3.2 ^a	92.5±2.7 ^a	91.6±2.6 ^a
AFG ₂	90.3±3.2 ^a	93.6±2.6 ^a	92.5±2.2 ^a	91.3±3.6 ^a	93.1±4.1 ^a	93.9±1.9 ^a	89.9±4.1 ^a	95.2±2.8 ^a	93.5±2.3 ^a
OTA	62.0±4.5 ^{bc}	70.8±3.9 ^b	92.6±4.1 ^a	44.5±4.3 ^d	46.3±5.2 ^d	48.6±4.9 ^d	62.5± ^{bc}	59.6±3.6 ^c	69.3±4.9 ^b
OTB	50.0±3.3 ^{bc}	54.2±2.6 ^{bc}	91.8±3.0 ^a	43.3±2.7 ^c	45.2±3.6 ^c	44.8±4.6 ^c	66.6±3.9 ^b	60.9±4.5 ^b	54.5±4.3 ^{bc}
ZAN	69.8±3.9 ^b	76.8±2.6 ^b	91.5±2.5 ^a	53.8±2.6 ^c	55.6±3.4 ^c	68.9±4.2 ^b	50.5±1.9 ^c	60.8±3.7 ^{bc}	62.6±4.2 ^{bc}
ZEN	76.0±3.1 ^b	87.3±4.5 ^a	90.2±3.1 ^a	62.5±3.6 ^c	64.3±4.2 ^c	71.7±3.4 ^{bc}	70.5±4.6 ^{bc}	79.2±2.2 ^b	80.2±1.6 ^b
PeA	52.8±2.7 ^d	76.5±3.2 ^b	90.2±1.6 ^a	46.2±2.6 ^d	48.1±3.8 ^d	63.5±5.2 ^c	66.5±2.9 ^c	70.8±4.1 ^{bc}	78.3±2.6 ^b
ENB	81.6±3.2 ^b	84.7±3.8 ^b	96.8±4.3 ^a	79.8±5.6 ^b	81.6±3.6 ^b	76.7±3.8 ^b	78.2±4.4 ^b	75.3±2.9 ^b	79.0±2.7 ^b
T-2	93.0±3.3 ^{ab}	99.4±4.5 ^a	98.2±2.7 ^a	86.7±4.6 ^b	84.6±3.8 ^b	87.7±4.2 ^b	71.6±2.9 ^c	78.9±4.6 ^{bc}	79.2±4.3 ^{bc}
HT-2	58.2±2.8 ^b	85.4±3.7 ^a	91.2±2.9 ^a	85.1±2.0 ^a	86.9±3.6 ^a	51.3±2.9 ^b	62.6±2.7 ^b	59.8±4.3 ^b	47.1±3.9 ^b
BEA	76.2±3.5 ^{bc}	78.6±2.9 ^{bc}	95.1±1.0 ^a	83.0±2.6 ^b	84.9±2.0 ^b	85.1±3.1 ^b	62.6±2.9 ^c	72.2±3.0 ^{bc}	75.6±1.9 ^{bc}
CIT	58.1±2.9 ^b	53.8±3.9 ^{bc}	93.5±3.0 ^a	45.0±4.1 ^c	46.9±2.9 ^c	47.1±3.8 ^c	55.5±4.1 ^{bc}	62.2±3.3 ^b	56.5±2.9 ^{bc}
ALT	87.2±1.3 ^a	89.4±1.9 ^a	92.1±2.4 ^a	86.6±2.4 ^a	88.4±3.3 ^a	86.8±1.9 ^a	66.6±3.7 ^c	76.5±1.7 ^b	85.9±1.1 ^a
AME	64.6±2.8 ^c	73.8±4.9 ^{bc}	95.1±3.7 ^a	69.7±3.9 ^{bc}	71.5±4.2 ^{bc}	84.0±4.6 ^b	60.8±3.6 ^c	65.5±3.6 ^c	74.3±3.6 ^{bc}
AOH	68.3±2.2 ^b	63.3±3.3 ^b	88.7±1.6 ^a	64.0±3.5 ^b	65.8±2.9 ^b	68.2±1.9 ^b	60.5±3.5 ^b	62.5±4.9 ^b	68.7±4.1 ^b
TeA	55.8±3.6 ^c	60.5±2.9 ^c	89.6±4.2 ^a	57.6±4.1 ^c	59.4±2.9 ^c	72.3±3.5 ^b	50.8±3.7 ^c	64.6±3.6 ^{bc}	65.8±2.9 ^{bc}
PAT	66.8±3.2 ^c	86.6±4.4 ^a	92.6±1.7 ^a	63.0±2.9 ^c	88.2±3.6 ^a	86.3±4.1 ^a	62.6±3.6 ^c	64.6±3.6 ^c	75.3±2.6 ^b
TEN	83.7±4.1 ^{ab}	85.2±2.4 ^a	93.3±3.6 ^a	70.3±3.5 ^c	80.2±2.7 ^{bc}	78.7±3.1 ^{bc}	80.9±3.6 ^b	82.5±3.3 ^b	84.5±4.2 ^{ab}

注: 同行小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$); A: 1 g NaCl+1 g 无水(NH₄)₂SO₄; B: 1 g NaCl+2 g 无水(NH₄)₂SO₄; C: 1 g NaCl+3 g 无水(NH₄)₂SO₄; D: 1 g NaCl+1 g 无水 MgSO₄; E: 1 g NaCl+2 g 无水 MgSO₄; F: 1 g NaCl+3 g 无水 MgSO₄; G: 1 g NaCl+1 g 无水 Na₂SO₄; H: 1 g NaCl+2 g 无水 Na₂SO₄; I: 1 g NaCl+3 g 无水 Na₂SO₄。

表 3 20 种真菌毒素在 6 种坚果中的基质效应
Table 3 Matrix effects of the 20 kinds of mycotoxins in 6 kinds of nuts

真菌毒素	SSE 值	真菌毒素	SSE 值	真菌毒素	SSE 值
AFB ₁	0.904~0.930	ZEN	0.603~0.645	ALT	0.603~0.717
AFB ₂	0.863~0.943	PeA	0.589~0.635	AME	1.098~1.141
AFG ₁	0.888~0.947	ENB	1.223~1.268	AOH	1.071~1.122
AFG ₂	0.894~0.922	T-2	1.061~1.096	TeA	1.056~1.097
OTA	0.947~0.978	HT-2	0.864~0.892	PAT	0.818~0.831
OTB	1.086~1.125	BEA	0.944~0.982	TEN	1.105~1.136
ZAN	0.808~0.822	CIT	0.571~0.645		

2.5 线性关系、LODs 与 LOQs

取 6 种空白坚果样品, 按照 1.3.1 进行样品前处理, 分别配制一系列浓度的基质混合标准工作液, 上机测定后, 以色谱峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度为横坐标(X, μg/L), 绘制 20 种真菌毒素的基质标准曲线, 并以定性通道的 3 倍信噪比(S/N=3)、定量通道的 10 倍信噪比(S/N=10)确定各化合物的 LODs 和 LOQs^[26]。结果显示, 20 种真菌毒素在各自质量浓度范围内, 峰面积与质量浓度呈现良好线性关系, 相关系数均大于 0.992。由表 4 可知, 各毒素在核桃、板栗、松籽、杏仁、开心果、腰果 6 种坚果基质中的 LODs 和 LOQs 分别为 0.03~2.25 μg/kg 和 0.11~7.50 μg/kg, 本方法具有良好的定性和定量分析能力。

2.6 回收率与相对标准偏差

选取空白核桃、板栗、松籽、杏仁、开心果、腰果样品, 分别按照低、中、高 3 个浓度水平加入适量 20 种真菌毒素标准工作液, 每个浓度做 6 个平行样, 以本研究上述方法处理样品并测定浓度, 计算加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)。结果表明, 6 种坚果基质中, 各毒素在低水平添加量下的平均回收率为 77.5%~114.9%, RSDs 为 1.2%~6.5%; 在中水平添加量下的平均回收率为 79.6%~104.6%, RSDs 为 1.0%~4.2%; 在高水平添加量下的平均回收率为 80.2%~113.6%, RSDs 为 1.1%~3.9%, 满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》的相关要求。

表 4 20 种真菌毒素的线性范围、LODs 和 LOQs ($r=6$)
Table 4 Linear ranges, LODs and LOQs of 20 kinds of mycotoxins ($r=6$)

真菌毒素	核桃			板栗			杏仁			开心果			腰果		
	范围/ ($\mu\text{g/L}$)	LODs/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/ ($\mu\text{g/kg}$)	范围/ ($\mu\text{g/L}$)	LODs/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/ ($\mu\text{g/kg}$)	范围/ ($\mu\text{g/L}$)	LODs/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/ ($\mu\text{g/kg}$)	范围/ ($\mu\text{g/L}$)	LODs/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/ ($\mu\text{g/kg}$)	范围/ ($\mu\text{g/L}$)	LODs/ ($\mu\text{g/kg}$)	LOQs/ ($\mu\text{g/kg}$)
AFB ₁	1~100	0.46	1.55	1~100	0.40	1.34	1~100	0.45	1.49	1~100	0.42	1.40	1~100	0.40	1.33
AFB ₂	1~100	0.15	0.51	1~100	0.13	0.42	1~100	0.17	0.55	1~100	0.14	0.48	1~100	0.13	0.42
AFG ₁	1~100	0.08	0.28	1~100	0.09	0.29	1~100	0.08	0.25	1~100	0.07	0.23	1~100	0.07	0.22
AFG ₂	1~100	0.11	0.37	1~100	0.10	0.32	1~100	0.11	0.35	1~100	0.11	0.38	1~100	0.10	0.32
OTA	1~100	0.50	1.68	1~100	0.43	1.42	1~100	0.53	1.78	1~100	0.46	1.52	1~100	0.40	1.32
OTB	1~100	0.38	1.27	1~100	0.31	1.04	1~100	0.40	1.34	1~100	0.37	1.24	1~100	0.32	1.08
ZAN	1~100	0.59	1.97	1~100	0.56	1.87	1~100	0.61	2.02	1~100	0.49	1.63	1~100	0.50	1.68
ZEN	5~500	1.20	4.01	5~500	1.02	3.41	5~500	1.06	3.52	5~500	0.97	3.24	5~500	1.23	4.09
PeA	1~100	0.49	1.63	1~100	0.55	1.84	1~100	0.42	1.41	1~100	0.48	1.61	1~100	0.45	1.51
ENB	1~100	0.04	0.15	1~100	0.05	0.17	1~100	0.05	0.16	1~100	0.04	0.12	1~100	0.05	0.18
T-2	1~100	0.59	1.97	1~100	0.47	1.58	1~100	0.64	2.14	1~100	0.46	1.54	1~100	0.50	1.66
HT-2	1~100	1.08	3.60	1~100	1.16	3.88	1~100	0.96	3.21	1~100	1.07	3.55	1~100	0.95	3.17
BEA	1~100	0.04	0.14	1~100	0.05	0.18	1~100	0.04	0.12	1~100	0.05	0.17	1~100	0.05	0.17
CIT	1~100	0.14	0.47	1~100	0.12	0.41	1~100	0.15	0.51	1~100	0.12	0.39	1~100	0.12	0.41
ALT	1~100	0.07	0.25	1~100	0.06	0.21	1~100	0.08	0.26	1~100	0.06	0.19	1~100	0.07	0.24
AME	1~100	0.13	0.42	1~100	0.11	0.37	1~100	0.15	0.48	1~100	0.11	0.36	1~100	0.12	0.41
AOH	1~100	0.85	2.84	1~100	0.72	2.39	1~100	0.97	3.22	1~100	0.61	2.04	1~100	0.80	2.66
TeA	1~100	0.56	1.88	1~100	0.66	2.21	1~100	0.52	1.74	1~100	0.56	1.85	1~100	0.50	1.65
PAT	5~500	2.05	6.84	5~500	2.25	7.50	5~500	2.17	7.22	5~500	1.88	6.26	5~500	2.25	7.51
TEN	1~100	0.37	1.22	1~100	0.49	1.64	1~100	0.65	2.17	1~100	0.42	1.38	1~100	0.32	1.07

表5 20种真菌毒素的回收率和相对标准偏差(n=6)
Table 5 Recoveries and RSDs of 20 kinds of mycotoxins(n=6)

真菌毒素	添加量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%	RSDs 范围/%	真菌毒素	添加量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率范围/%	RSDs 范围/%
	2.0	78.6~87.9	1.2~2.9		5.0	79.8~91.1	1.2~2.5
AFB ₁	5.0	82.5~92.5	1.5~3.5	T-2	10.0	83.9~91.6	1.3~3.2
	10.0	86.9~94.8	1.7~3.7		50.0	92.5~96.2	1.6~2.8
	1.0	80.5~89.2	1.8~3.8		5.0	80.5~88.9	3.5~6.5
AFB ₂	5.0	85.5~90.7	1.6~2.8	HT-2	10.0	82.3~92.5	2.4~3.4
	10.0	91.3~92.2	1.3~2.3		50.0	89.6~96.6	1.3~3.3
	1.0	79.6~83.6	1.8~3.9		1.0	82.5~90.7	1.8~3.5
AFG ₁	5.0	79.8~93.1	1.3~2.7	BEA	5.0	86.8~94.4	1.2~3.8
	10.0	86.9~96.4	1.1~2.8		10.0	88.3~108.3	1.9~2.3
	1.0	78.5~91.9	1.8~3.8		1.0	78.7~90.0	1.5~2.8
AFG ₂	5.0	82.5~87.3	2.1~2.9	CIT	5.0	79.7~91.4	1.9~2.6
	10.0	80.6~96.2	2.2~2.8		10.0	80.2~94.1	1.2~2.2
	2.0	82.7~96.6	1.7~1.8		1.0	78.2~86.7	1.9~3.5
OTA	5.0	92.3~94.4	1.2~1.6	ALT	5.0	82.6~90.3	1.2~4.2
	10.0	92.6~109.6	1.2~2.2		10.0	80.2~96.6	1.6~2.8
	2.0	83.4~90.2	2.5~3.5		1.0	79.6~114.9	2.5~4.0
OTB	5.0	82.8~89.4	1.1~3.1	AME	5.0	79.6~94.3	2.2~3.4
	10.0	86.5~96.4	2.6~3.9		10.0	86.6~98.4	1.8~3.3
	2.0	80.6~89.8	1.3~2.5		5.0	85.2~93.5	1.6~2.4
ZAN	5.0	88.6~94.8	1.0~2.8	AOH	10.0	82.5~104.6	1.2~3.7
	10.0	89.6~93.9	1.7~2.2		50.0	86.7~113.6	1.4~3.4
	10.0	77.5~92.3	2.1~3.2		2.0	78.5~87.1	2.7~3.5
ZEN	50.0	79.6~90.8	1.4~2.6	TeA	5.0	80.2~94.5	1.5~3.1
	100.0	80.6~93.6	1.5~2.5		10.0	80.3~90.2	1.6~2.7
	2.0	77.6~85.3	1.2~1.8		10.0	79.9~87.3	2.8~3.6
PeA	5.0	79.8~91.2	1.8~3.9	PAT	50.0	88.6~90.2	1.1~3.1
	10.0	82.6~88.4	1.7~2.8		100.0	82.8~92.8	1.6~2.6
	1.0	80.2~90.1	1.5~2.9		2.0	78.6~95.2	1.6~2.4
ENB	5.0	85.5~96.3	1.2~3.5	TEN	5.0	79.6~92.1	1.8~3.7
	10.0	81.6~93.5	1.7~2.7		10.0	85.6~94.1	1.6~3.4

2.7 实际样品检测

采用本方法对北京市售的核桃、板栗、松籽、杏仁、开心果和腰果共30份样品(每种坚果5份样品)进行检测,结果如表6所示,6种坚果均受到不同程度的真菌毒素污染,

检出率高达40%,共检出10种真菌毒素,检出频率居前三的毒素分别为 AFB₂ (23.33%)、AFG₂ (16.67%)、BEA (13.33%)和 TEN (13.33%),检测含量居前三的毒素分别为 BEA (8.67 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、AFG (8.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、TeA (5.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。本

表6 市售坚果中的真菌毒素含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Table 6 Content of mycotoxins in commercial nuts ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

样品	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA	ENB	BEA	AME	AOH	TeA	TEN
核桃 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	2.28
核桃 2	0.85	/	0.42	/	/	1.63	/	3.23	5.62	0.44
板栗 1	/	1.43	/	/	1.23	2.67	/	/	/	/
板栗 2	1.07	3.90	/	/	3.70	8.67	1.92	/	/	/
松子 1	0.27	/	0.15	0.66	/	/	/	/	/	/
杏仁 1	1.61	/	/	/	/	/	/	/	/	/
杏仁 2	0.86	/	/	/	/	/	/	/	/	/
杏仁 3	2.27	/	/	/	/	/	/	/	/	/
开心果 1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	0.77
开心果 2	0.31	/	0.22	/	/	/	/	/	/	0.85
腰果 1	/	/	2.09	/	/	2.98	/	/	/	/
腰果 2	/	/	8.38	/	/	/	/	/	/	/

注: /为未检出。

批次样品中, 同时检出 3 种及以上真菌毒素的有核桃 1 例、板栗 2 例、松籽 1 例、开心果 1 例, 其中核桃最多检出 6 种毒素, 含量为 0.42~5.62 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。检测结果提示, 市售坚果中存在一定的真菌毒素污染风险, 尤其是毒性较强的 AFs, 检出率和含量值较高, 应给予持续关注。

3 结 论

本研究利用 QuEChERS 技术实现了复杂基质快速高效的前处理过程, 并通过质谱、色谱条件的优化, 建立了 UPLC-MS/MS 同时测定坚果中 20 种真菌毒素的分析方法。该方法利用 UPLC-MS/MS 的高解析度、高灵敏度特点, 在驻留时间 6 min 内可同时对 20 种目标化合物进行有效分离和定性定量分析, 方法检出限、精密度、准确度等技术参数均能达到确证检测和痕量分析的要求。与已有的文献资料相比^[9,21], 本研究覆盖的真菌毒素种类更多, 适用的坚果产品范围更广, 且本研究所建立的方法操作简便、精密度好、灵敏度高、分析速度快, 适用于坚果中多种真菌毒素的快速筛查和痕量确证分析, 为真菌毒素污染风险的监测和评估提供有效的技术手段。

参 考 文 献

- [1] 张书光. 坚果的主要生物活性成分及其保健作用分析[J]. 现代食品, 2019, (8): 123-125.
ZHANG SG. Analysis of the main bioactive components of nuts and health care effects [J]. Mod Food, 2019, (8): 123-125.
- [2] 李勇鹏, 潘莉, 宁德鲁, 等. 冷藏期间鲜食核桃霉菌总数变化及主要种类鉴定[J]. 西部林业科学, 2021, 50(3): 87-91.
LI YP, PAN L, NING DL, *et al.* Change of total number of fungi in fresh walnut during storage and identification of the dominant moulds [J]. J West China Forest Sci, 2021, 50(3): 87-91.
- [3] 林珊宇, 朱桂宁, 贤小勇, 等. 广西石漠化地区核桃主要病害调查及病原菌鉴定[J]. 西南农业学报, 2021, 34(10): 2158-2166.
LIN SY, ZHU GN, XIAN XY, *et al.* Investigation and pathogen identification of main diseases of walnut in karst areas in guangxi [J]. Southwest China J Agric Sci, 2021, 34(10): 2158-2166.
- [4] 李琳玲, 李政, 华娟, 等. 罗田板栗储存后期致腐真菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(10): 2305-2308, 2314.
LI LL, LI Z, HUA J, *et al.* Isolation and identification of the pathogenic fungi in rotted chestnut from luotian county in later storage period and research on the pathogenicity [J]. Hubei Agric Sci, 2013, 52(10): 2305-2308, 2314.
- [5] 韩盛, 玉山江·麦提提, 潘俨, 等. 鲜杏采后病原菌鉴定及室内药剂筛选研究[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(5): 866-876.
HAN S, MAIMAITI YSJ, PAN Y, *et al.* Identification of postharvest pathogens and screening of fungicides for fresh apricot in Xinjiang [J]. Xinjiang Agric Sci, 2016, 53(5): 866-876.
- [6] PRENCIPE S, SICILIANO I, GATTI C, *et al.* Several species of *Penicillium* isolated from chestnut flour processing are pathogenic on fresh chestnuts and produce mycotoxins [J]. Food Microbiol, 2018, 76: 396-404.
- [7] SOARES-MATEUS AR, BARROS S, PENA A, *et al.* Mycotoxins in pistachios (*Pistacia vera* L.): Methods for determination, occurrence, decontamination [J]. Toxins, 2021, 13(10): 682-722.
- [8] 陈燕. 一氧化氮熏蒸对干果贮藏期病害抑制及毒素清除作用的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2020.
CHEN Y. Nitric oxide fumigation on disease inhibition and mycotoxin removal in dried fruit during storage [D]. Wulumuqi: Xinjiang University, 2020.
- [9] 王玉娇, 聂继云, 闫震, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测干果中 16 种真菌毒素[J]. 分析化学, 2017, 45(10): 1556-1563.
WANG YJ, NIE JY, YAN Z, *et al.* Simultaneous determination of 16 kinds of mycotoxins in common dried fruits by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2017, 45(10): 1556-1563.
- [10] 王刘庆, 王瑶, 王多, 等. 坚果和干果中黄曲霉毒素的污染、检测与控制[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5791-5798.
WANG LQ, WANG Y, WANG D, *et al.* Contamination, determination and control of aflatoxin in nuts and dry fruits [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(22): 5791-5798.
- [11] 李志霞, 聂继云, 闫震, 等. 果品主要真菌毒素污染检测、风险评估与控制研究进展[J]. 中国农业科学, 2017, 50(2): 332-347.
LI ZX, NIE JY, YAN Z, *et al.* Progress in research of detection, risk assessment and control of the mycotoxins in fruits and fruit products [J]. Sci Agric Sin, 2017, 50(2): 332-347.
- [12] PATEL A, PANDEY AK, MISHRA RP. Qualitative and quantitative analysis of aflatoxins in dry fruits and nuts from central india [J]. Def Life Sci J, 2020, 5(4): 278-282.
- [13] KIM DB, PARK JS, YOO MY. Method development for determination of trichothecene mycotoxins in nuts by LC-MS/MS [J]. J Food Hyg Saf, 2018, 33(5): 354-360.
- [14] VALERA E, GARCIAFEBRERO R, ELLIOTT CT, *et al.* Electrochemical nanoprobe-based immunosensor for deoxynivalenol mycotoxin residues analysis in wheat samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2019, 411(9): 1915-1926.
- [15] HOU SL, MA JJ, CHENG YQ, *et al.* One-step rapid detection of fumonisin B₁, dextrovalenol and zearalenone in grains [J]. Food Control, 2020, 117:107-113.
- [16] OPLATOWSKA-STACHOWIAK M, REIRING C, SAJIC N, *et al.* Development and in-house validation of a rapid and simple to use ELISA for the detection and measurement of the mycotoxin sterigmatocystin [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410(12): 3017-3023.
- [17] 胡高爽, 吴天琪, 苏丹, 等. 基于新型标记材料的免疫分析技术在真菌毒素检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(12): 398-404.
HU GS, WU TQ, SU D, *et al.* Research progress on application of new labeling materials based immunoassay on the detection of mycotoxin [J]. Sci Technol Food Ind, 2021, 42(12): 398-404.
- [18] CUNHA SC, SÁ SVM, FERNANDES JO. Multiple mycotoxin analysis in nut products: Occurrence and risk characterization [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 114: 260-269.
- [19] HIDALGO-RUIZ JL, ROMERO-GONZÁLEZ R, VIDAL JLM, *et al.* Determination of mycotoxins in nuts by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Looking for a representative matrix [J]. J Food Comp Anal, 2019, 82: 103228-103234.
- [20] OUAHSSASE A, FATINI N, ADDI EA. A simple extraction method with no lipid removal for the determination of aflatoxins in almonds by liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. Food

- Addit Contam Part A, 2021, 38(9): 1561–1570.
- [21] 王权帅, 孙卫明. 同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定板栗中16种真菌毒素[J]. 食品科技, 2021, 46(11): 307–313.
WANG QS, SUN WM. Simultaneous determination of 16 kinds of mycotoxins in chestnut using isotope internal standard-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci Technol, 2021, 46(11): 307–313.
- [22] ZHANG Y, PEI F, FANG Y, *et al.* Comparison of concentration and health risks of 9 *Fusarium* mycotoxins in commercial whole wheat flour and refined wheat flour by multi-IAC-HPLC [J]. Food Chem, 2019, 275: 763–769.
- [23] PAKSHIR K, MIRSHAKARI Z, NOURAEI H, *et al.* Mycotoxins detection and fungal contamination in black and green tea by HPLC-based method [J]. J Toxicol, 2020. DOI: 10.1155/2020/2456210
- [24] LIANG JY, NING MX, GUAN S, *et al.* Risk assessment of multiple-mycotoxin exposure for consumers of chestnuts in Shandong Province markets in China [J]. Food Addit Contam Part A, 2021, 38(12): 2137–2150.
- [25] 方真, 曲栗, 古淑青, 等. 加速溶剂萃取-QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定药食同源性食品中16种真菌毒素[J]. 色谱, 2020, 38(7): 782–790.
FANG Z, QU L, GU SQ, *et al.* Determination of 16 mycotoxins in drug and food homologous products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry combined with accelerated solvent extraction and QuEChERS [J]. Chin J Chromatogr, 2020, 38(7): 782–790.
- [26] 范楷, 唐占敏, 聂冬霞, 等. 超高效液相色谱串联质谱测定常见农产品中40种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(19): 7019–7029.
FAN K, TANG ZM, NIE DX, *et al.* Simultaneous determination of 40 mycotoxins in common agricultural products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(19): 7019–7029.
- [27] 齐春艳, 许秀丽, 国伟, 等. QuEChERS结合UPLC-Q/Orbitrap HRMS法测定小麦粉中9种真菌毒素[J]. 食品科学, 2022, 43(4): 315–320.
QI CY, XU XL, GUO W, *et al.* Determination of 9 mycotoxins in wheat flour by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry [J]. Food Sci, 2022, 43(4): 315–320.
- [28] 邢家溧, 张子庚, 郑睿行, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测婴幼儿奶粉中的7种链格孢霉毒素[J]. 色谱, 2022, 40(2): 156–164.
XING JS, ZHANG ZG, ZHENG RH, *et al.* Determination of seven *Alternaria* toxins in infant milk powder by solid phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2022, 40(2): 156–164.
- [29] 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.
ZHANG XN, MA LY, PAN SC, *et al.* Simultaneous determination of 11 mycotoxins in minor food legumes by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) [J]. Food Sci, 2019, 40(8): 306–310.
- [30] 刘文静, 黄彪, 傅建炜, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定陈年老茶中16种真菌毒素残留[J]. 食品科学, 2021, 42(2): 299–305.
LIU WJ, HUANG B, FU JW, *et al.* Simultaneous determination of 16 mycotoxin residues in aged tea by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2021, 42(2): 299–305.
- [31] ANASTASSIADES M, LEHOTAY SJ, ŠTAJNBAHER D, *et al.* Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. J AOAC Int, 2003, 86(2): 412–431.
- [32] 陈岑, 黄柳倩, 程巧鸳, 等. 基于QuEChERS提取的高效液相色谱-串联质谱法同时测4种不同基质类型化妆品中15种硝基咪唑类禁用药物[J]. 分析测试学报, 2019, 38(11): 1285–1293.
CHEN C, HUANG LQ, CHENG QY, *et al.* Simultaneous determination of 15 prohibited nitroimidazoles in 4 matrixes of cosmetics by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with QuEChERS extraction [J]. J Instrum Anal, 2019, 38(11): 1285–1293.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)

作者简介



倪 杨, 博士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品质量安全。

E-mail: niyang6@163.com



熊 融, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为植物资源评价与检测技术研究。

E-mail: rong_xiong@hotmail.com