

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240322004

分散固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法 同时测定水果中 7 种链格孢霉毒素的含量

汪弘康, 高猛峰, 沈斯文, 王 霞, 王 敏, 童金蓉, 梅 博, 黄祎雯,
邓 波, 俞 奔, 张维谊*

(上海市农产品质量安全中心, 上海 201708)

摘 要: **目的** 建立分散固相萃取净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速、准确地同时检测水果中 7 种链格孢霉毒素的方法。**方法** 试样用酸化乙腈提取, 无水硫酸镁除水, 氯化钠盐析, 上层清液经 C_{18} 与石墨化碳黑分散固相萃取净化后, 采用超高效液相色谱-串联质谱法测定, 基质匹配标准溶液外标法定量。**结果** 7 种链格孢霉毒素在 0.005~0.500 mg/L 范围内线性关系好($r^2>0.99$), 检出限为 0.005 mg/kg, 定量限为 0.01 mg/kg, 回收率在 77.30%~114.34%之间, 批内相对标准偏差为 0.65%~14.81%, 批间相对标准偏差为 0.03%~18.59%。**结论** 该方法简单、高效, 精密度及准确度高, 适用于水果中 7 种链格孢霉毒素的测定。**关键词:** 链格孢霉毒素; 分散固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins in fruits by dispersive solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Hong-Kang, GAO Meng-Feng, SHEN Si-Wen, WANG Xia, WANG Min, TONG Jin-Rong,
MEI Bo, HUANG Yi-Wen, DENG Bo, YU Ben, ZHANG Wei-Yi*

(Shanghai Center of Agri-products Quality and Safety, Shanghai 201708, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid and accurate method for the simultaneous determination of 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins by dispersive solid phase extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in fruits. **Methods** Samples were extracted with acidified acetonitrile, dehydrated by anhydrous magnesium sulfate and salted out with sodium chloride, and the supernatant was cleaned up by dispersive solid-phase extraction with C_{18} and graphitized carbon black. Then determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, quantitated by substrate matching and external standard calibration method. **Results** The linearity of the method was good in the range of 0.005~0.500 mg/L ($r^2>0.99$) and the limits of detection were 0.005 mg/kg, the limits of quantification were 0.01 mg/kg. The recoveries ranged from 77.30% to 114.34% with the relative standard deviation within batches from 0.65% to 14.81% and the relative standard deviation between batches from 0.03% to 18.59%. **Conclusion** The method is simple, efficient, precise

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”项目(21N31900600)

Fund: Supported by the Project of Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (21N31900600)

*通信作者: 张维谊, 硕士, 研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。E-mail: zhangharewei@163.com

*Corresponding author: ZHANG Wei-Yi, Master, Professor, Shanghai Center of Agri-products Quality Safety, Shanghai 201708, China. E-mail: zhangharewei@163.com

and accurate and can be used for the determination of the 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins in fruits.

KEY WORDS: *Alternaria* mycotoxins; dispersive solid-phase extraction; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

链格孢霉菌(*Alternaria* species)是一种广泛存在于泥土、腐烂物等环境中的病原体和腐生菌,能通过田间侵染、贮存接触等途径污染农作物,是水果、蔬菜等农产品在低温运输或储存过程中腐烂、霉变的主要原因之一^[1]。链格孢霉毒素(*Alternaria* mycotoxins)是链格孢霉菌产生的代谢产物,目前已发现 70 余种毒素及其衍生物^[2],其对人或牲畜具有诱变性、致癌性和致畸性等慢性或急性毒性作用^[3-6],且与我国食管癌的高发病率有所关联^[7-8]。近年来,蔬菜、水果中链格孢霉毒素的研究受到越来越多研究者的关注,国内外关于链格孢霉毒素的污染情况已有相关报道^[9-12],我国的国家食品安全风险评估中心也连续多年对小麦、番茄和樱桃等农产品或食品中的链格孢霉毒素开展了风险监测和评估,以评估其膳食暴露风险。相较于其他真菌毒素,中国和其他大部分国家一样,目前还未对链格孢霉毒素制订安全限量要求^[13],对链格孢霉毒素研究仍然较为薄弱^[14]。因此,亟需建立一种快速、方便、准确、灵敏的测定链格孢霉毒素的筛查方法和定量方法,保障农产品质量安全。

目前,链格孢霉毒素的检测主要有酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法^[15-16]、薄层色谱法^[17-18]、气相色谱法^[19]、气相色谱质谱法^[20]、液相色谱法^[21]、液相色谱质谱法^[22-26]等方法。ELISA 方法操作简单、快速,但容易出现假阳性结果;薄层色谱法简单快速,但重复性差;气相色谱法和气相色谱质谱法灵敏度优异,但需要衍生,操作复杂,重复性差,耗时且成本高^[27];液相色谱法和液相色谱-串联质谱法是目前链格孢霉毒素最常用的测定方法,但样本处理步骤复杂、烦琐,不适合快速检测。QuEChERS 处理法是近几年受检测工作者欢迎的一种前处理技术,快速、简单、便宜、高效、耐用和安全,与传统的液液萃取、固相萃取等样品前处理技术相比,该法分析速度快、溶剂使用量少、操作及装置简单且回收率、准确度高、成本低廉^[28-30],近年来在真菌毒素、农兽药残留等领域获得了广泛应用^[31]。因此,本研究选用结合 QuEChERS 处理法和液相色谱质谱法来检测链格孢霉毒素,大大缩短了处理时间和分析时间。同时相较于目前其他的检测方法,本研究也扩充了检测对象至多种水果,也将难以检测但检出较多的细交链孢菌酮酸、细格菌素、格孢毒素 I 等一同纳入检测目标。

本研究以细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)、交链

孢酚(alternariol, AOH)、交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)、细格菌素(altenusin, ALS)、交链孢霉烯(altenuene, ALT)、赭毒素(tentoxin, TEN)、格孢毒素 I(altertoxin I, ATX-I) 7 种链格孢霉毒素为分析对象,优化 QuEChERS 处理过程中的最佳提取试剂和净化剂,并使用超高效液相色谱-串联质谱法进行测定,建立一种能同时检测水果中 7 种链格孢霉毒素的检测方法,以期为大规模批量快速检测提供一定技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

TeA、AOH、AME、ALS、ALT、TEN、ATX-I 标准品(100 µg/mL, 天津阿尔塔科技有限公司);乙腈、甲酸(色谱纯,德国 Merck 公司);无水硫酸镁、氯化钠、碳酸氢铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);十八烷基硅烷键合硅胶(C₁₈)、石墨化碳黑(graphitized carbon black, GCB)、疏水性聚四氟乙烯滤膜(polytetrafluoroethylene, PTFE, 有机相, 0.22 µm)(上海安谱实验科技股份有限公司)、ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈(100 mm × 2.1 mm, 1.7 µm)(美国沃特世公司)。

Qtrap 6500 液相色谱-串联质谱仪(配有电喷雾离子源,美国 Sciex 公司);分析天平(感量 0.01 g, 瑞士 Mettler Toledo 公司);STD. MINI VORTEXER 涡旋混合器(最大转速为 10000 r/min, 美国 Talboys 公司);Multifuge X1R 离心机(最大转速为 10000 r/min, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Milli-Q 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液的配制

标准储备溶液:准确吸取 1 mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中,乙腈定容,配成 10 mg/L 的标准储备液,避光-18℃以下条件保存。混合标准工作溶液:准确吸取 1 mL 各标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中,乙腈定容,配成 1.0 mg/L 的混合标准工作溶液,避光-18℃以下条件保存。

基质匹配标准曲线溶液:将空白样品经本研究的前处理方法处理,分别制备各样品的空白基质溶液,然后吸取一定量混合标准工作溶液,用空白基质溶液逐级稀释至 0.005、0.010、0.020、0.050、0.100、0.200、0.500 mg/L 的系列基质匹配标准曲线溶液。

1.2.2 溶液配制

1%甲酸乙腈溶液:量取 10 mL 甲酸于 100 mL 乙腈中,加乙腈稀释至 1000 mL,混匀。1 mmol/L 碳酸氢铵溶液:称取 0.0791 g 碳酸氢铵,用水溶解并稀释至 1000 mL。

1.2.3 样品处理

称取 10 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 塑料离心管中,加入 10.0 mL 1%甲酸乙腈溶液,剧烈振荡 1 min,加入 6 g 无水硫酸镁、1.5 g 氯化钠,剧烈振荡 1 min,10 000 r/min 离心 5 min。吸取一定量上清液加入净化材料(每毫升提取液加入 10 mg C₁₈,对于颜色较深的试样每毫升提取液另加入 1 mg GCB),涡旋混匀 1 min,过 PTFE 滤膜后供液相色谱-串联质谱测定。

1.2.4 色谱质谱条件

色谱条件:色谱柱:ACQUITY™ UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm,1.7 μm);柱温:40℃;进样体积:2 μL;流速:0.4 mL/min;流动相 A:1 mmol/L 碳酸氢铵溶液,流动相 B:乙腈,梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相及梯度洗脱条件
Table 1 Mobile phase and gradient elution conditions

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	95.0	5.0
0.50	95.0	5.0
3.50	5.0	95.0
6.00	5.0	95.0
6.10	95.0	5.0
8.00	95.0	5.0

质谱条件:离子源:电喷雾离子源;扫描方式:负离子扫描;检测方式:多反应监测;离子化电压:4.5 kV;离子化温度:450℃;喷雾气:55 psi;辅助加热气:55 psi。监测离子对、锥孔电压和碰撞电压见表 2。

表 2 监测离子对、锥孔电压和碰撞电压质谱参数
Table 2 Monitor ions, cone voltage and collision voltage for mass spectral parameters

化合物	保留时间/ min	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 /V	碰撞电压 /V
TeA	2.47	196.0	111.9	-75	-31
			139.0	-75	-28
ALS	3.23	289.1	245.0	-60	-22
			230.0	-60	-28
ALT	3.91	291.1	229.0	-67	-20
			247.1	-67	-23
AOH	3.97	257.0	215.2	-80	-36
			213.1	-80	-32
ATX-I	4.16	351.1	315.0	-110	-19
			305.0	-110	-26
TEN	4.30	413.4	141.0	-140	-24
			271.2	-140	-22
AME	4.65	271.1	256.1	-80	-30
			228.1	-80	-40

1.3 数据处理

试样中各链格孢霉素含量以质量分数 ω 计,单位为 mg/kg,单点校正法按公式(1)或标准曲线法按公式(2)计算:

$$\omega=\frac{\rho_1\times A\times V}{A_s\times m}\times\frac{1000}{1000}$$
 (1)

$$\omega=\frac{\rho_2\times V}{m}\times\frac{1000}{1000}$$
 (2)

式中 ω : 试样中被测组分含量的数值,mg/kg; ρ_1 : 基质匹配标准工作溶液中被测组分的质量浓度的数值,mg/L; ρ_2 : 从基质匹配标准工作曲线中得到的试样溶液中被测组分的质量浓度的数值,mg/L; A : 试样溶液中的被测组分的质量色谱图峰面积; A_s : 基质匹配标准工作溶液中被测组分浓度的质量色谱图峰面积; V : 提取液体积的数值,mL; m : 试样质量的数值,g。

2 结果与分析

2.1 色谱-质谱条件的建立

多数链格孢霉素在质谱检测中既可以正离子扫描,也可以负离子扫描,将标准溶液分别注入质谱仪,获得各离子质荷比及离子通道,并调整质谱条件。发现 ATX-I 在正离子扫描中响应很低,所以选择以负离子扫描作为扫描方式。

在不同流动相条件下峰型及响应值差异大。本研究比较了水-乙腈体系、2 mmol/L 甲酸铵(含 0.01%甲酸)-乙腈体系、5 mmol/L 乙酸铵(含 0.01%氨水)-乙腈体系、0.1%甲酸-乙腈体系和 1 mmol/L 碳酸氢铵-乙腈体系等流动相。结果表明,在水-乙腈、2 mmol/L 甲酸铵(含 0.01%甲酸)-乙腈条件下,TeA 的响应及峰型不佳,峰宽过大且有严重拖尾,类似杂峰,无法准确定性;在 5 mmol/L 乙酸铵(含 0.01%氨水)-乙腈条件下,TeA 结构因碱性条件发生改变,其在色谱柱上无保留,在死时间出峰;在 0.1%甲酸-乙腈和 1 mmol/L 碳酸氢铵-乙腈条件下,各化合物峰型都较好,但因甲酸对负离子扫描有一定抑制作用,使用 1 mmol/L 碳酸氢铵时的各目标物响应值较 0.1%甲酸高,所以选择 1 mmol/L 碳酸氢铵-乙腈作为流动相体系,所得的监测离子对色谱图见图 1。

2.2 提取、净化条件的优化

植物源性食品常使用有机溶剂提取目标物,无水硫酸镁除水,氯化钠盐析等提取剂。本研究参考常见 QuEChERS 方法,试验比较了乙腈、1%甲酸乙腈溶液和 1%乙酸乙腈溶液提取,试验结果见图 2。1%乙酸乙腈对 ALS 及 TeA 回收率不佳,乙腈对 TeA 回收率不佳,1%甲酸乙腈对 7 种链格孢霉素回收率都较好。酸性体系增强了 TeA 的电离性,使其更容易被提取,所以本研究选择使用 1%甲酸乙腈溶液作为提取剂。

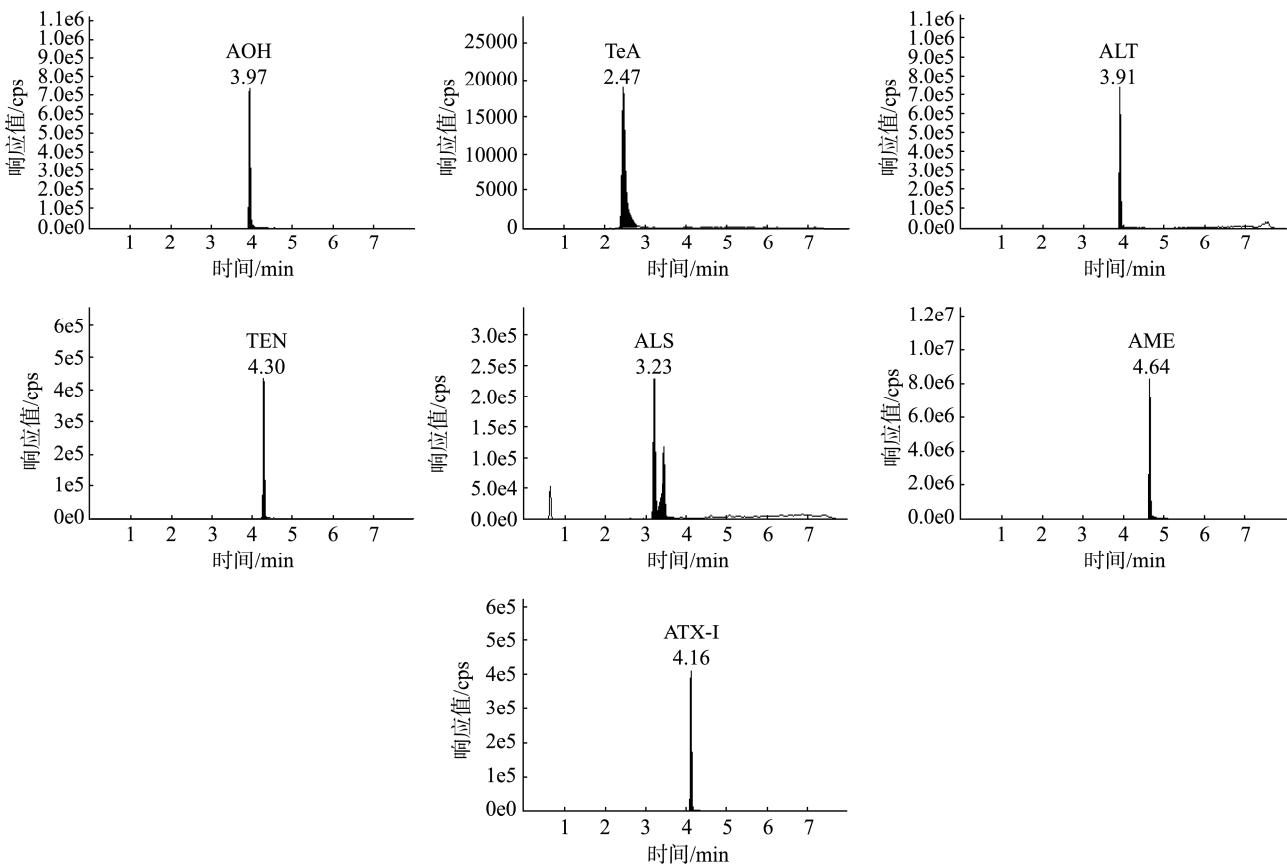


图 1 1 mmol/L 碳酸氢铵-乙腈体系下 7 种链格孢霉毒素监测离子对色谱图

Fig.1 Chromatogram of 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins in 1 mmol/L ammonium bicarbonate-acetonitrile system

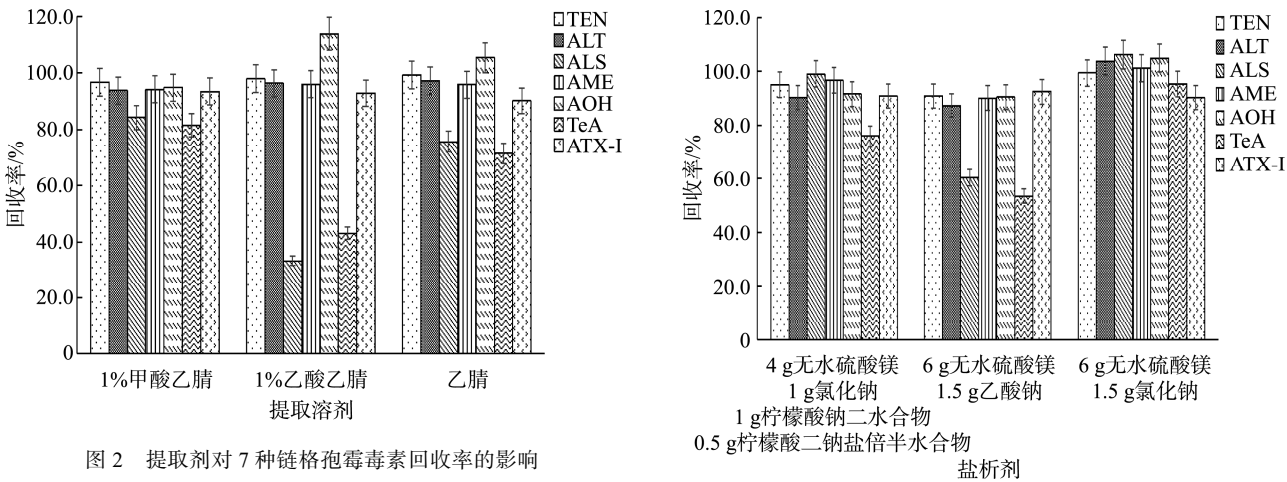


图 2 提取剂对 7 种链格孢霉毒素回收率的影响

Fig.2 Effects of extraction solvents on the recoveries of 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins

QuEChERS 方法常用无水硫酸镁除水, 钠盐盐析, 使化合物萃取至乙腈相中。本研究参考常见 QuEChERS 方法, 比较了 3 种盐析剂, 4 g 无水硫酸镁、1 g 氯化钠、1 g 柠檬酸钠二水合物、0.5 g 柠檬酸二钠盐倍半水合物^[32]; 6 g 无水硫酸镁、1.5 g 乙酸钠; 6 g 无水硫酸镁、1.5 g 氯化钠。结果见图 3。组合 C 的回收率整体最高, 组合 B 对 ALS 和 TeA 回收率大幅降低。柠檬酸钠和乙酸钠皆为弱碱性物

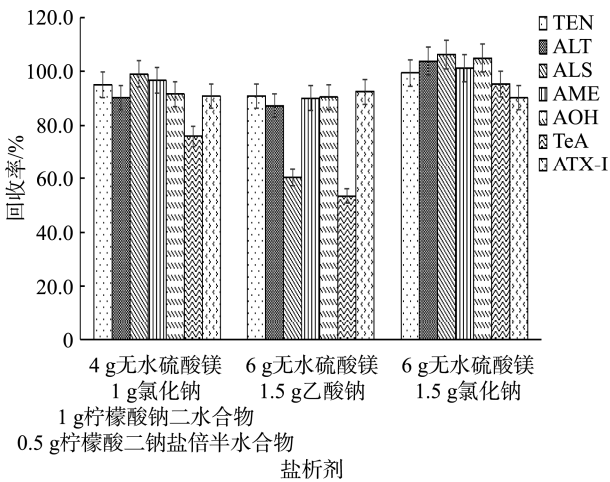


图 3 除水剂、盐析剂对 7 种链格孢霉毒素回收率的影响

Fig.3 Effects of dewatering or salting agents on the recoveries of 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins

质, 对于需要酸性电离环境提取的 TeA 有一定的抑制作用, 造成 TeA 回收率降低。所以本研究采用 6 g 无水硫酸镁、1.5 g 氯化钠作为除水盐析剂。

植物源性食品净化多使用 C₁₈ 吸附脂肪等非极性干扰物; PSA 吸附糖类、脂肪、色素和其他极性有机酸; GCB

吸附平面结构杂质、色素和甾醇等；氧化铝(Al_2O_3 ，中性 N、酸性 A、碱性 B)吸附脂肪、色素等干扰物。经试验发现，在复杂、深色基质中，高添加量的净化剂对链格孢霉毒素的影响不大，而在简单、浅色基质中，随着净化剂的添加量增多，部分链格孢霉毒素的回收率快速下降。在复杂基质中，链格孢霉毒素同干扰杂质与净化剂竞争吸附，净化剂吸附杂质已饱和，所以对链格孢霉毒素回收率影响不大；而简单基质中干扰杂质少，净化剂吸附杂质后仍未饱和，开始吸附链格孢霉毒素，造成回收率下降。试验结果表明， C_{18} 对 TeA 吸附作用最大，PSA 对 ALS 和 TeA 吸附

作用最大，GCB 对 AOH 和 AME 吸附作用最大， Al_2O_3 则对 ALT、ALS、AME、AOH、TeA、ATX-I 都有较强吸附作用，试验结果详见图 4。因此，选择每毫升提取液加入 10 mg C_{18} 作为净化剂，在深色试样中，每毫升提取液另再加入 1 mg GCB 净化。

此外，本研究还考察了常见的有机相尼龙滤膜和疏水性 PTFE 滤膜对结果的影响。结果发现，PTFE 滤膜对 7 种链格孢霉毒素没有吸附，尼龙滤膜对 ALS、AOH 和 TeA 都有较严重吸附，吸附率可达约 95%、50%和 40%，故本研究后续使用疏水性 PTFE 滤膜过滤样本溶液。

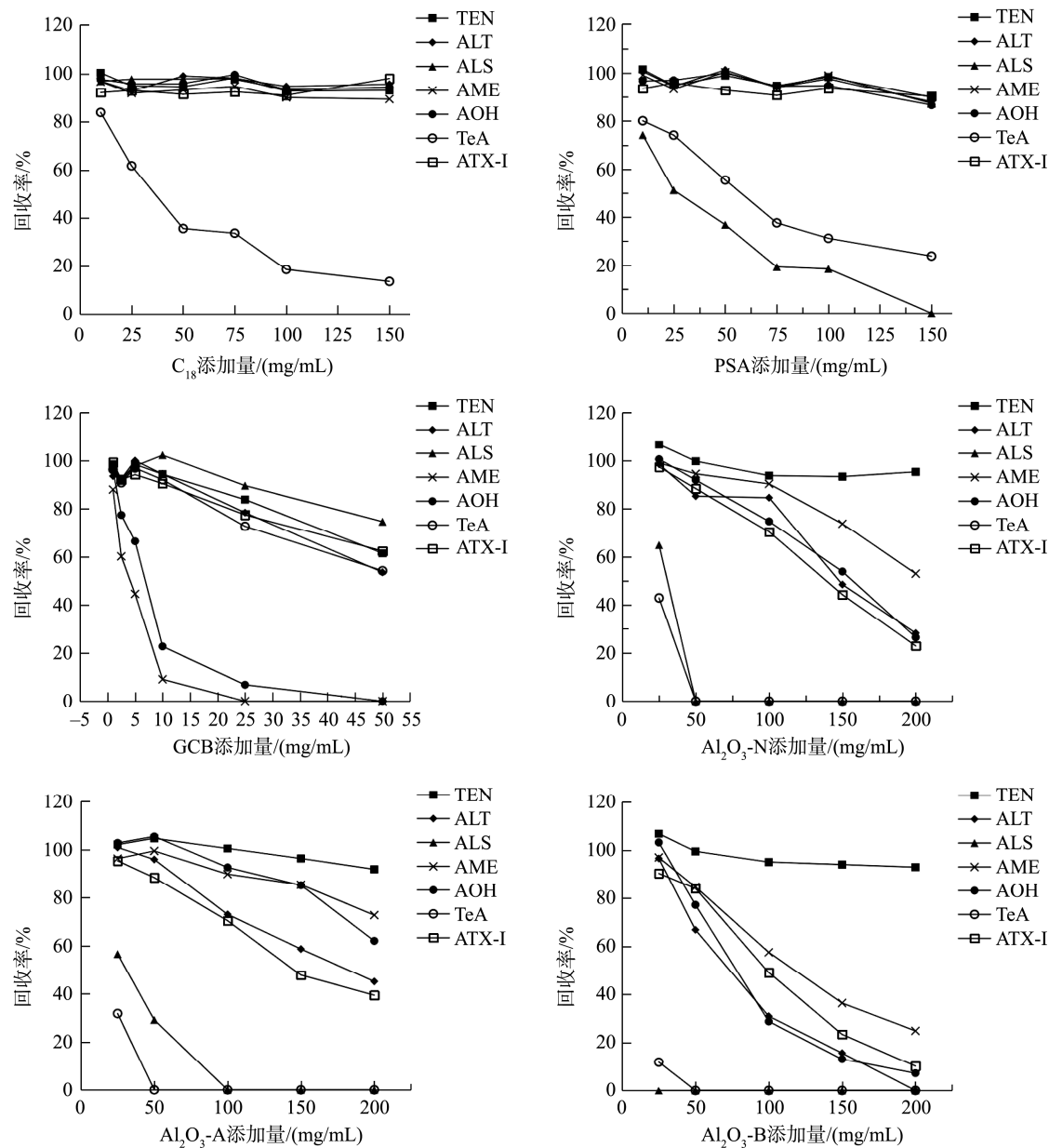


图 4 净化剂对 7 种链格孢霉毒素回收率的影响
Fig.4 Effects of purifying agents on the recoveries of 7 kinds of *Alternaria* mycotoxins

2.3 基质效应评价

由于样品基质复杂, 含有大量的内源性化合物, 在液相色谱-串联质谱的使用中, 内源性化合物与待测物一同进入色谱柱, 会干扰目标化合物的检测, 因此需要对基质效应进行研究^[33]。为考察 7 种链格孢霉毒素在目前的分析条件下, 样品基质对目标物响应值的影响, 用各水果的阴性试样按照上述前处理条件制作成空白基质液, 用空白基质液配制浓度为 10 ng/mL 的基质标准溶液, 同时用 1%甲酸乙腈溶液配制相同质量浓度的标准溶液, 同等条件下进行上机测定, 比较基质对各组分响应值的影响, 测定结果详见表 3。基质效应计算公式为: 基质效应(%)= $B/A \times 100\%$ (A : 在纯溶剂中化合物的响应值, B : 样品基质中添加的相同含量化合物响应值), 当基质效应值在 80%~120%之间时, 则表明基质效应影响不大, 当其高于 120%时则表明有基质增强效应, 当其低于 80%时则表示基质抑制效应^[34]。结果发现, 多数链格孢霉毒素在不同基质都有一定的基质效应, ALS 在多数基质中有较强的基质增强效应, ALT、AME、AOH 和 AME 则有较强的基质抑制效应。因此, 为校正基质效应对测定结果的影响, 本方法采用空白基质溶液配制标准溶液进行定量。

表 3 不同基质中链格孢霉毒素的基质效应
Table 3 Matrix effects of *Alternaria* mycotoxins in different substrates

基质	TEN	ALT	ALS	AME	AOH	TeA	ATX-I
桃	80.0	55.0	114.5	76.5	44.8	118.0	108.2
葡萄	85.1	83.9	138.9	84.6	80.3	109.2	100.3
蓝莓	79.4	37.5	118.6	77.4	66.0	122.6	101.9
樱桃	81.1	58.6	118.6	76.2	36.0	99.2	117.7
草莓	75.4	55.2	108.5	77.4	42.9	113.6	104.5

2.4 方法学评价

2.4.1 线性范围、检出限、定量限

根据 1.2 中的标准溶液的配制, 绘制标准曲线, 线性范围 0.005 mg/L 至 0.500 mg/L, 得到不同基质下的 7 种链格孢霉毒素的线性关系和相关系数。用阴性试样加标, 经本方法处理后用仪器测定, 以监测离子对大于 3 倍信噪比确定本方法各毒素的检出限, 大于 10 倍信噪比确定各毒素的定量限。7 种链格孢霉毒素的线性范围、相关系数、检出限、定量限如表 4 所示。结果显示, 7 种链格孢霉毒素线性关系良好, 线性相关系数都大于 0.99, 检出限可达 0.005 mg/kg, 定量限为 0.01 mg/kg。

表 4 不同基质中链格孢霉毒素的线性范围
Table 4 Linear range of *Alternaria* mycotoxins in different substrates

基质	化合物	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
草莓	AOH	$Y=17203.56954X+9365.63948$	0.99883	0.005	0.01
	TeA	$Y=1516.85410X-151.24358$	0.99816	0.005	0.01
	ALT	$Y=3.68897e4X+7043.48202$	0.99976	0.005	0.01
	TEN	$Y=13509.89997X+8312.98931$	0.99945	0.005	0.01
	AME	$Y=3.38114e5X+4.68680e5$	0.99257	0.005	0.01
	ALS	$Y=6.28462e4X+4.43262e4$	0.99898	0.005	0.01
	ATX-I	$Y=19158.54044X+5865.62929$	0.99865	0.005	0.01
蓝莓	AOH	$Y=16963.72823X+3435.53208$	0.99883	0.005	0.01
	TeA	$Y=1374.84070X-1505.24418$	0.99707	0.005	0.01
	ALT	$Y=3.03014e4X+11760.00949$	0.99958	0.005	0.01
	TEN	$Y=12961.12931X+6180.17071$	0.99807	0.005	0.01
	AME	$Y=2.98624e5X+5.01076e5$	0.99787	0.005	0.01
	ALS	$Y=3.68178e4X-10322.49156$	0.99969	0.005	0.01
	ATX-I	$Y=16208.89670X+3005.15634$	0.99873	0.005	0.01
葡萄	AOH	$Y=21202.78739X+11268.03525$	0.99848	0.005	0.01
	TeA	$Y=1683.68650X-896.13348$	0.99964	0.005	0.01
	ALT	$Y=3.85668e4X+20786.47786$	0.99920	0.005	0.01
	TEN	$Y=13833.45342X+10247.49847$	0.99914	0.005	0.01
	AME	$Y=3.90747e5X+4.24462e5$	0.99666	0.005	0.01
	ALS	$Y=6.67873e4X+25881.66683$	0.99835	0.005	0.01
	ATX-I	$Y=19922.17671X+11097.99854$	0.99751	0.005	0.01
桃	AOH	$Y=3.46489e4X+23769.02493$	0.99754	0.005	0.01
	TeA	$Y=2969.00036X-490.66316$	0.99226	0.005	0.01
	ALT	$Y=6.06021e4X+27438.56403$	0.99532	0.005	0.01
	TEN	$Y=26426.82732X+16268.17133$	0.99747	0.005	0.01

表 4(续)

基质	化合物	线性方程	相关系数(r^2)	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)
樱桃	AME	$Y=6.07871e5X+6.63884e5$	0.99769	0.005	0.01
	ALS	$Y=7189.46750X+10050.97987$	0.99509	0.005	0.01
	ATX-I	$Y=3.25183e4X+21120.42089$	0.99800	0.005	0.01
	AOH	$Y=16022.39449X+13574.67524$	0.99717	0.005	0.01
	TeA	$Y=1360.44890X-1296.50616$	0.99632	0.005	0.01
	ALT	$Y=28114.36598X+3.04862e4$	0.99901	0.005	0.01
	TEN	$Y=17774.44449X-33.28573$	0.99953	0.005	0.01
	AME	$Y=2.63036e5X+2.39360e5$	0.99769	0.005	0.01
	ALS	$Y=25613.26518X-3.71385e4$	0.99383	0.005	0.01
	ATX-I	$Y=14864.90991X+10783.44624$	0.99797	0.005	0.01

2.4.2 精密度与准确度

在各空白基质中分别以 0.01、0.02 和 0.1 mg/kg 3 个添加水平, 每个添加水平平行测定 6 次, 做加标回收试验, 并计算回收率及相对标准偏差, 并分 3 d 重复加标回收试

验, 以验证精密度与准确度, 结果见表 5。结果表明, 回收率在 77.30%~114.34% 之间, 批内相对标准偏差为 0.65%~14.81%, 批间相对标准偏差为 0.03%~18.59%, 符合检验检测方法要求。

表 5 不同基质中链格孢霉毒素的精密度与准确度
Table 5 Precision and accuracy of *Alternaria* mycotoxins in different substrates

基质	化合物	平均回收率/%	批内相对标准偏差/%	批间相对标准偏差/%
草莓	TeA	83.60~92.42	3.86~12.00	2.06~9.50
	AOH	97.45~114.10	1.32~8.63	0.39~10.12
	AME	104.07~114.34	0.97~5.84	0.99~2.11
	ALS	103.91~113.68	3.92~11.50	0.59~6.70
	ALT	98.85~103.40	2.28~8.64	0.31~1.88
	TEN	96.18~104.33	1.61~4.45	0.56~4.27
	ATX-I	100.73~108.36	2.15~14.08	1.81~2.78
樱桃	TeA	82.52~89.09	5.10~14.59	0.62~7.41
	AOH	101.70~112.08	2.28~6.49	3.29~5.52
	AME	89.39~111.45	3.85~7.02	5.98~17.11
	ALS	79.22~97.84	4.06~13.11	10.09~17.24
	ALT	100.48~109.59	1.28~4.28	2.89~7.38
	TEN	88.66~101.88	2.42~10.05	5.45~11.62
	ATX-I	101.40~109.73	0.83~4.85	2.70~4.88
蓝莓	TeA	94.34~97.32	4.58~9.07	0.25~2.67
	AOH	105.45~113.97	1.82~5.15	0.03~3.94
	AME	105.92~112.64	1.66~5.60	0.49~1.69
	ALS	91.21~112.09	1.49~12.62	1.02~14.48
	ALT	100.28~107.71	1.42~4.23	0.20~5.04
	TEN	92.95~107.80	2.18~10.35	2.41~14.80
	ATX-I	104.37~110.62	1.10~5.12	0.07~2.83
葡萄	TeA	86.76~100.64	8.50~13.90	6.79~10.96
	AOH	101.62~112.38	1.61~3.28	0.53~4.47
	AME	96.55~113.35	1.42~2.83	1.54~2.68
	ALS	82.16~97.94	2.45~14.81	2.87~11.63
	ALT	102.37~105.93	1.03~3.91	0.14~1.33
	TEN	97.62~106.03	2.07~4.21	1.60~3.38
	ATX-I	102.16~108.89	0.65~3.12	0.54~1.53
桃	TeA	77.30~90.37	5.76~13.77	7.57~14.85
	AOH	98.58~103.36	2.63~8.78	0.33~2.69
	AME	96.46~111.02	1.31~6.13	6.10~11.77
	ALS	86.11~109.58	4.27~13.78	2.06~18.24
	ALT	94.94~103.61	1.75~6.09	0.69~8.00
	TEN	82.29~102.26	3.10~12.66	15.00~18.59
	ATX-I	96.52~103.62	2.21~4.72	3.45~5.33

2.4.3 实际样品分析

本研究随机选取市售草莓、樱桃、蓝莓、桃及葡萄共 150 批次(每种水果各 30 批次), 按试验方法进行测定。结果显示, 有 23 批次样品中检出了 TeA (16 批次)和 AOH (7 批次), 其他毒素均未检出。其中蓝莓的检出批次最多, 为 13 批次, 检出率达到 43.3%; 桃的检出批次为 6 批次, 检出率为 20.0%; 葡萄和草莓分别检出 2 批次, 检出率为 6.67%。TeA 的检出率达到了 10.7%, 平均检出值为 0.079 mg/kg, 最高检出值为 0.25 mg/kg; AOH 的检出率则为 4.67%, 平均检出值为 0.22 mg/kg, 最高检出值为 0.34 mg/kg。由此可见, 水果中 TeA 和 AOH 的污染情况较为严重。

3 结 论

本研究建立了一种可同时测定 5 种水果中 7 种链格孢霉毒素的超高效液相色谱-串联质谱检测方法。样品中的链格孢霉毒素通过酸化乙腈提取, 无水硫酸镁除水, 氯化钠盐析, 提取液经 C₁₈ 与 GCB 分散固相萃取净化后, 超高效液相色谱-串联质谱测定。该方法简单高效、准确灵敏, 满足检验检测要求。与现有的其他文献及检测标准相比, 本研究增加了 TeA、ALS 和 ATX-I 3 种较难检测的化合物, 且具有一定的通用性, 适用于多种水果基质中的 7 种链格孢霉毒素的测定。

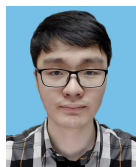
参考文献

- [1] 郭润婷. 主要蔬菜链格孢病原菌的鉴定与新病害研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [2] GUO RT. The identification of *Alternaria* on vegetable and the research of new diseases in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences Dissertation, 2018.
- [3] LI L, MA H, ZHENG F, *et al.* The transcription regulator ACTR controls ACT-toxin biosynthesis and pathogenicity in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata* [J]. Microbiol Res, 2021, 248: 126747.
- [4] 姜冬梅, 王瑶, 姜楠, 等. 农产品及其制品中交链孢酚和交链孢酚单甲醚研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 287–293.
- [5] JIANG DM, WANG Y, JIANG N, *et al.* Review on alternariol and alternariol monomethyl ether in agro-products [J]. Food Sci, 2017, 38(21): 287–293.
- [6] FERNÁNDEZ-BLANCO C, JUAN-GARCÍA A, JUAN C, *et al.* Alternariol induce toxicity via cell death and mitochondrial damage on Caco-2 cells [J]. Food Chem Toxicol, 2016, 88, 32–39.
- [7] BENSASSI F, GALLERNE C, DEIN ESO, *et al.* Mechanism of alternariol monomethyl ether-induced mitochondrial apoptosis in human colon carcinoma cells [J]. Toxicology, 2011, 290(2/3): 230–240.
- [8] 吴春生, 马良, 江涛, 等. 链格孢霉毒素细交链孢菌酮酸的研究进展[J]. 食品科学, 2014, 35(19): 295–301.
- [9] WU CS, MA L, JIANG T, *et al.* A review on tenuazonic acid, a toxic produced by *Alternaria* [J]. Food Sci, 2014, 35(19): 295–301.
- [10] 安玉会, 卢荣华, 冯文舟, 等. 林县交链孢霉毒素——交链孢醇单甲醚和交链孢烯的协同毒性和致畸作用研究[J]. 癌症, 1988, (1): 54–55.
- [11] AN YH, LU RH, FENG WZ, *et al.* Studies on the synergistic toxicity and teratogenicity of sympatric mycotoxins, sympatricin monomethyl ether and sympatricin in Linxian County [J]. Chin J Cancer, 1988, (1): 54–55.
- [12] 韩绍印, 杨胜利, 马刚军, 等. 酶联免疫吸附试验检测食管癌高、低发区粮食中交链孢酚单甲醚的研究[J]. 河南医科大学学报, 1995, (3): 219–221.
- [13] HAN SY, YANG SL, MA GJ, *et al.* ELISA for the detection of cross-streptophanol monomethyl ether in grains from high and low incidence areas of esophageal cancer [J]. J Henan Med Univ, 1995, (3): 219–221.
- [14] 赵凯. 食品中交链孢霉毒素污染、生物利用及风险评估研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2015.
- [15] ZHAO K. Natural occurrence, bioavailability and risk assessment of *Alternaria* mycotoxins in foods [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2015.
- [16] SEBASTIAN H, MARIAN B, SEYMA E, *et al.* Survey of *Alternaria* toxin contamination in food from the German market, using a rapid HPLC-MS/MS approach [J]. Mycotoxin Res, 2016, (32): 7–18.
- [17] 陈蓓, 吉文亮, 朱峰, 等. 江苏省内小麦粉中 4 种交链孢霉毒素污染情况调查[J]. 中国公共卫生, 2018, 34(3): 393–395.
- [18] CHEN B, JI WL, ZHU F, *et al.* Contamination of four *Alternaria* toxins in wheat flour sampled in Jiangsu province [J]. Chin J Public Health, 2018, 34(3): 393–395.
- [19] 张林伟. 市售小麦制品中链格孢霉毒素残留和膳食暴露评估[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
- [20] ZHANG LW. Residual and dietary exposure assessment of *Alternaria* toxins in commercially available wheat products [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2023.
- [21] MEENA M, SAMAL S. *Alternaria* host-specific (HSTs) toxins: An overview of chemical characterization, target sites, regulation and their toxic effects [J]. Toxicol Rep, 2019, 6: 745–758.
- [22] 于松, 朱怡平, 邹连蓬, 等. 链格孢霉毒素危害及防控措施的研究进展[J/OL]. 中国食品卫生杂志: 1–9. [2024-03-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3156.R.20230914.1143.002.html>
- [23] YU S, ZHU YP, ZOU LP, *et al.* Research progress on hazards and control measures of *Alternaria* toxin in food [J/OL]. Chin J Food Hyg: 1–9. [2024-03-07]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3156.R.20230914.1143.002.html>
- [24] WANG J, PENG T, ZHANG X, *et al.* A novel hapten and monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for simultaneous analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in wheat [J]. Food Control, 2018, 94: 65–70.
- [25] 钟红, 马良, 张宇昊, 等. 细交链孢菌酮酸间接竞争酶联免疫检测方法及配套试剂盒的研制[J]. 分析科学学报, 2017, 33(2): 195–200.
- [26] ZHONG H, MA L, ZHANG YH, *et al.* Study on indirect competitive enzyme immunoassay and rapid detection kit for tenuazonic acid [J]. J Anal Sci, 2017, 33(2): 195–200.
- [27] MATYSIK G, GIRYN H. Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of *Alternaria* mycotoxins [J]. Chromatographia, 1996, 42(9–10): 555–558.
- [28] HASAN, HA H. *Alternaria* mycotoxins in black rot lesion of tomato fruit: conditions and regulation of their production [J]. Acta Microbiol Et Imm H, 1995, 130(3): 171–177.

- [19] HARVAN DJ, PEROW RW. Gas chromatographic analysis of the *Alternaria* metabolite, tenuazonic acid [J]. *J Chromatogr A*, 1974, 101(1): 222–224.
- [20] SCOTT P, WEBER D, KANHERE S. Gas chromatography-mass spectrometry of *Alternaria* mycotoxins [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 765(2): 255–263.
- [21] 陈月萌. 液相色谱法测定水果中链格孢毒素含量的研究[D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
- CHEN YM. Determination of *Alternaria* toxin in fruits by liquid chromatography [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2012.
- [22] 倪杨, 杨建军, 石磊, 等. 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[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(13): 4107–4116.
- NI Y, YANG JJ, SHI L, *et al.* Simultaneous determination of 20 kinds of mycotoxins in nuts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(13): 4107–4116.
- [23] 邢家漂, 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 种链格孢毒素[J]. *色谱*, 2022, 40(2): 156–164.
- XING JL, ZHANG ZG, ZHENG RH, *et al.* Determination of 7 kinds of *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.
- [24] 吴希, 邢家漂, 郑睿行, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测麦类中典型链格孢毒素[J]. *食品科学*, 2022, 43(12): 317–324.
- WU X, XING JL, ZHENG RX, *et al.* Rapid determination of typical *Alternaria* toxins in wheat by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2022, 43(12): 317–324.
- [25] 张环宇, 朱连勤, 陈甫, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测家禽配合饲料中 4 种链格孢毒素[J]. *中国畜牧杂志*, 2023, 59(10): 336–341.
- ZHANG HY, ZHU LQ, CHEN F, *et al.* Determination of 4 kinds of *Alternaria* toxins in poultry feed by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anim Sci*, 2023, 59(10): 336–341.
- [26] 李子豪, 林芳, 王昌钊, 等. 超高效液相色谱-四极杆串联离子阱复合质谱法筛查和定量玉米中 5 种链格孢毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(12): 3762–3770.
- LI ZH, LIN F, WANG CZ, *et al.* Screening and quantitation of 5 kinds of *Alternaria* toxins in maize by ultra performance liquid chromatography-Q-trap-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(12): 3762–3770.
- [27] 何国鑫, 邓青芳, 周欣. 链格孢毒素的分析方法及其毒理机制研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(4): 342–346, 352.
- HE GX, DENG QF, ZHOU X. Research progress of analytical methods and toxicological mechanisms for *Alternaria* mycotoxins [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2018, 39(4): 342–346, 352.
- [28] 周贻兵, 兰优, 李磊, 等. SPE 和 QuEChERS 净化测定番茄中链格孢毒素方法比较[J]. *食品研究与开发*, 2019, 40(22): 175–179, 196.
- ZHOU YB, LAN Y, LI L, *et al.* Comparison of solid phase extraction and QuEChERS for the determination of *Alternaria* toxins in tomato [J]. *Food Res Dev*, 2019, 40(22): 175–179, 196.
- [29] ZHOU J, XU J, CAI Z, *et al.* Simultaneous determination of five *Alternaria* toxins in cereals using QuEChERS-based methodology [J]. *J Chromatogr B*, 2017, 1068–1069: 15–23.
- [30] XING LJ, ZOU LZ, LUO RF, *et al.* Determination of five *Alternaria* toxins in wolfberry using modified QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2019, 311(C): 125975.
- [31] 陈建彪, 董丽娜, 刘娇, 等. QuEChERS 在食品中真菌毒素检测的研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(11): 286–291.
- CHEN JB, DONG LN, LIU J, *et al.* Advances in application of QuEChERS for mycotoxin analysis in foods [J]. *Food Sci*, 2014, 35(11): 286–291.
- [32] 王昌钊, 李子豪, 张亚莉, 等. 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法同时筛查和测定番茄中 11 种真菌毒素[J/OL]. *食品科学*: 1–14. [2023-08-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220916.1342.022.html>
- WANG CZ, LI ZH, ZHANG YL, *et al.* Simultaneous screening and determination of 11 kinds of mycotoxins in tomato by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high-resolution mass spectrometry [J/OL]. *Food Sci*: 1–14. [2023-08-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220916.1342.022.html>
- [33] WALRAVENS J, MIKULA H, RYCHLIK M, *et al.* Development and validation of an ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of free and conjugated *Alternaria* toxins in cereal-based foodstuffs [J]. *J Chromatogr A*, 2014, 1372: 91–101.
- [34] FRENICH AG, ROBERTO R, MARÍA LG, *et al.* Multi-mycotoxin analysis in eggs using a QuEChERS-based extraction procedure and ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(28): 4349–4356.

(责任编辑: 蔡世佳 张晓寒)

作者简介



汪弘康, 助理畜牧师, 主要研究方向为农产品质量与安全。

E-mail: whk945hh@163.com



张维维, 硕士, 农业技术推广研究员, 主要研究方向为农产品质量与安全。

E-mail: zhangharewei@163.com