

DOI: 10.20098/j.cnki.1001-5132.2022.1006

高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素

邓涛¹, 吉小凤², 肖英平², 汪雯², 吕文涛², 王小骊², 吴振^{1*}, 杨华²

(1. 宁波大学 食品与药学学院, 浙江 宁波 315832;

2. 浙江省农业科学院 农产品质量安全与营养研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要: 建立高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素检测方法。样品用 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{甲酸})$ 混合液(79:20:1)提取, QuEChERS 填料包(4 g 无水 MgSO_4 、0.5 g 无水 CH_3COONa 和 0.5 g NaCl)盐析, 100 mg C_{18} 净化, 经过液相色谱柱分离, $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液-甲醇为流动相梯度洗脱, 由 ESI 源扫描, 多反应监测模式, 基质外标法定量分析。该方法中, 恩镰孢菌素 A(ENA)、恩镰孢菌素 B(ENB)和白僵菌素(BEA)在 $0.1 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及恩镰孢菌素 A1(ENA1)和恩镰孢菌素 B1(ENB1)在 $1 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 且线性相关系数(R^2)均大于 0.998 9, 相对标准偏差范围为 1.7%~11.7%。3 个不同加标浓度的添加回收率为 88.0%~114.1%, 样品检测限为 $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 样品定量限为 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本文建立的方法简单、高效、准确, 满足果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素污染筛查需求。

关键词: 果汁; 恩镰孢菌素; 白僵菌素; 食品安全

中图分类号: O675.63; TS201.6 **文献标志码:** A

文章编号: 1001-5132 (2023) 06-0050-07

我国是水果种植和消费大国, 除鲜食外, 还生产许多以水果为主要原料的加工产品(如果汁、果酱、果干、果粉等)。果汁是以水果为原料经过物理方法处理得到的汁液产品。按照浓度可分为 100% 纯果汁、高浓度果汁、低浓度果汁。但果品在加工、贮运等过程中极易发生真菌性病害, 引起腐烂或腐败, 部分真菌还可能产生真菌毒素, 对人体健康造成潜在危害。真菌毒素主要是由曲霉属、镰刀菌属和青霉属等丝状真菌在适宜条件下产生的次级代谢产物^[1]。恩镰孢菌素(Enniatins, ENNs)和白僵菌素(Beauvericin, BEA)是近年来被报道的新型真菌毒素, 也是镰刀菌属产生的次级代谢产物, 主要污染谷物、水果及其相关制品等^[2], 其中常见的恩镰孢菌素有恩镰孢菌素 A(EnniatinA, ENA)、恩镰孢菌素 A1(EnniatinA1, ENA1)、恩镰孢菌素 B(EnniatinB, ENB)和恩镰孢菌素 B1(EnniatinB1,

ENB1)^[1-2]。研究调查表明, ENNs 和 BEA 对人和动物具有遗传毒性和细胞毒性, 而且还有可能与其他生物毒素产生协同毒害作用, 具体表现形式有激素紊乱、免疫抑制等^[1-5]。

现有文献资料报道中, 真菌毒素检测常用方法有酶联免疫法^[6-7]、薄层色谱法^[8-9]、气相色谱-质谱联用法^[10-11]、液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)^[12-14]等, 其中 LC-MS/MS 因具有高通量、无需衍生化、灵敏度高、准确度高、抗干扰能力强等特点^[12], 已成为目前同时检测多种真菌毒素的主流分析方法。由于食品基质组成成分复杂, 因此样品的前处理成为检测实验的关键步骤之一。真菌毒素检测中常用的前处理方法有固相萃取技术^[15-16]、液液萃取技术^[17]、QuEChERS 方法^[18-21]、加速溶剂萃取技术^[21]等方法。QuEChERS 方法具有提取真菌毒素范围广、速度快、操作简单等特点, 在真菌

收稿日期: 2022-10-12.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journalg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 科技部国家重点研发计划政府间合作项目(2019YFE0103900)。

第一作者: 邓涛(1997-), 男, 安徽滁州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 食品安全与营养。E-mail: dengtao8822@163.com

*通信作者: 吴振(1985-), 男, 河南新乡人, 博士/副教授, 主要研究方向: 食品加工与安全。E-mail: wuzhen@nbu.edu.cn

毒素检测方面应用广泛^[20]。我国尚未制定果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素的标准检测方法,因此建立一种简单、快速、灵敏、准确的检测方法具有重要意义。本文建立 QuEChERS 前处理方法,同时结合超高效液相色谱-串联质谱法对果汁中 ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 进行检测,以期为果汁产品中恩镰孢菌素和白僵菌素污染筛查分析提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 均为标准品,奥地利 RomeLab 公司;果胶酶(纯度 95%),美国 Sigma Aldrich 公司;QuEChERS 填料包(分析纯无水 MgSO_4 、无水 CH_3COONa 和 NaCl)、C18 吸附剂,山东美正生物科技有限公司;乙酸铵(质量纯度 $\geq 99\%$),华东医药股份有限公司;分析纯甲酸(体积纯度 $\geq 88\%$),上海凌峰化学试剂有限公司;色谱纯甲醇和乙腈,美国 Merck 公司。

LC 30AD 超高效液相色谱仪,日本岛津公司;AB SCIEX 6500 Qtrap 超高效液相色谱-质谱仪,美国 AB SCIEX 公司;ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm),美国 Waters 公司;KQ-250B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;BIOFUGE PRIMO R 型高速离心机,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;微孔板振荡器,维根技术(北京)有限公司;Milli-Q A10 超纯水系统,美国 Millipore 公司;0.22 μm 有机滤膜,北京颇赛科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的制备

标准储备液:用乙腈将 ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 标准品分别配置成 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准储备液。置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 下,避光保存,下同。

混合标准储备液:从 100.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 标准储备液中分别移取 1 mL 至 100 mL 的容量瓶中,用乙腈定容至刻度,混匀,配制成 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合标准储备液。

标准系列工作溶液:用 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})$ 混合液(1:1)按比例稀释混合标准储备液,配制成质量浓度为 0.1、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0

$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准系列工作溶液。配制基质空白标准系列工作溶液,则将 $V(\text{甲醇}):V(\text{水})$ 混合液(1:1)更换为本文前处理方法所制备的空白基质溶液,其余步骤不变。

1.2.2 样品提取和净化

在 50 mL 离心管中准确称取果汁样品 5.00 g(准确至 0.01 g),依次加入 200 μL 果胶酶和 25 mL $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{甲酸})$ 混合液(79:20:1),常温超声提取 30 min,置于多管漩涡振荡器中振荡提取 5 min,加入 QuEChERS 填料包(4 g 无水 MgSO_4 、0.5 g 无水 CH_3COONa 和 0.5 g NaCl),振荡混匀 1 min,高速离心 5 min (8 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),准确移取 1.5 mL 上清液于 2 mL 的离心管中,加入 100 mg C18 净化,并涡旋震荡 30 s,然后高速离心 3 min (12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),取 1 mL 上清液,0.22 μm 有机滤膜过滤后 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.3 仪器条件

色谱: ACQUITY UPLC[®] HSS T3 色谱柱(2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.8 μm),柱温 $40\text{ }^\circ\text{C}$,流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液,进样体积为 5 μL 。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 恩镰孢菌素和白僵菌素的梯度洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%	流速/($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)
1.0	5	95	0.2
4.0	95	5	0.2
8.0	95	5	0.2
8.1	5	95	0.2
10.0	5	95	0.2

质谱:电喷雾离子源(ESI);多反应监测(Multiple reaction monitoring, MRM);正离子扫描(ESI^+);喷雾电压(IS)5 500 V;离子源温度(TEM)为 $500\text{ }^\circ\text{C}$;气帘气(CUR)压力为 40 psi;雾化气(Gas1)压力为 55 psi;辅助气(Gas2)压力为 50 psi;离子源气体为空气,碰撞气体为高纯度氮气(纯度 99.99%),该气体由 Peak Scientific(英国)氮气发生器提供。

1.2.4 数据处理与结果计算

采用 Multiquant V3.0.3 软件和 Microsoft Excel 2019 软件进行试验数据分析,Origin 2018 软件绘制目标化合物的色谱图。果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素含量按下式计算: $X = \rho V / m$,式中: X 为试样中恩镰孢菌素和白僵菌素的相对含量, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;

ρ 为从基质外标法定量中得到试样测定液中恩镰孢菌素和白僵菌素的质量浓度, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; V 为试样测定液最终定容体积, mL; m 为试样质量, g.

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择及优化

2.1.1 色谱条件的优化

流动相选择需与目标化合物的信号响应值、分离程度和离子化效果等因素密切相关. 在 ESI^+ 模式下, 水相中加入少量乙酸铵可以促进部分化合物的电离效果, 提高灵敏度以及改善峰型等^[22]. 本文以甲醇为有机相, 比较 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液作为水相时的分离效果, 结果表明, 当水相为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵水溶液时, 4 种恩镰孢菌素和白僵菌素分离效果更好, 响应值更高.

2.1.2 质谱条件的优化

分别配制浓度为 $1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 的标准溶液. 全扫描模式下, 当目标化合物的单标进入离子源内部后, 进行一级质谱扫描, 获得目标化合物在质谱仪上的母离子和质荷比(m/z). 随后进行子离子扫描, 调节不同数值的碰撞能量, 选择 2 个丰度最高、最稳定的子离子为定性、定量离子. 最后在多反应监测模式(Multiple Reaction Monitoring, MRM)下, 优化去簇电压(DP)和碰撞能量(CE)在质谱仪上的最佳参数. 优化后的具体参数见表 2.

2.2 样品前处理方法优化

2.2.1 提取溶剂

经查阅文献, 水果类基质中真菌毒素的提取多以乙腈体系为主, 加入适量的水可以促进有机溶剂在基质中的渗透, 而酸的加入可以破坏基质中存在的糖和蛋白质等^[13,23]. 在此基础上, 本文考察了 $V(\text{乙腈}):V(\text{水})$ 混合液(80:20)(混合液①)、 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{乙酸})$ 混合液(79:20:1)(混合液②)、 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{甲酸})$ 混合液(79:20:1)(混合液③)、 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{甲酸})$ 混合液(78:20:2)(混合液④)以及 $V(\text{乙腈}):V(\text{水}):V(\text{甲酸})$ 混合液(77:20:3)(混合液⑤)为提取液, 研究对果汁中 4 种 ENNs 和 BEA 添加回收率的影响. 实验结果表明(图 1), 5 种提取液对 ENA、ENA1 和 BEA 差异不显著($P>0.05$), 添加回收率 88.3%~118.6%; 混合液①对 ENB 和 ENB1 存

表 2 恩镰孢菌素和白僵菌素质谱参数

真菌毒素	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量/eV	保留时间/min	ESI 扫描方式
ENA	699.4	682.3*	40	23.5	7.36	ESI^+
		228.1	40	39.0		
ENA1	668.6	210.2*	125	29.1	7.27	ESI^+
		541.2	125	30.2		
ENB	657.4	640.3*	40	24.1	7.08	ESI^+
		196.1	40	39.6		
ENB1	654.7	196.2*	100	35.6	7.17	ESI^+
		210.2	100	30.2		
BEA	801.3	784.5*	50	23.3	7.15	ESI^+
		243.9	50	39.0		

注: *为定量离子.

在明显基质干扰现象, 添加回收率分别为 125.5% 和 132.7%, 且与混合液③、混合液④和混合液⑤对 ENB 和 ENB1 添加回收率的影响差异显著($P<0.01$). 在混合液中加入酸后, ENB 和 ENB1 的基质干扰现象得到抑制, 其中混合液②使得 2 种真菌毒素的添加回收率下降 8.8%和 4.3%, 混合液③使得 2 种真菌毒素的添加回收率下降 21.6%和 40.1%, 显示后者提取效果明显优于前者. 继续增加甲酸浓度后, 发现 4 种恩镰孢菌素和白僵菌素的添加回收率波动较小, 即混合液③、混合液④和混合液⑤作为提取液, 对其添加回收率影响差异不显著($P>0.05$), 添加回收率在 92.6%~118.6%之间. 因此, 本文确定混合液③为提取溶剂.

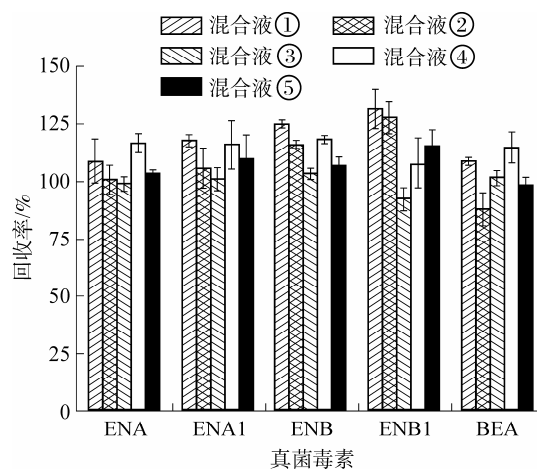


图 1 提取溶剂对恩镰孢菌素和白僵菌素回收率的影响(加标相对质量浓度 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

2.2.2 提取溶剂体积

提取溶剂体积与待测样品之间的接触面积、溶解和扩散程度等都与样品基质中真菌毒素的提取效果间存在一定相关性. 因此, 本文比较了15、20、25 mL的提取溶剂体积对5 g果汁样品中4种ENN_S和BEA的提取效果. 实验结果表明(图2), 提取溶剂体积对BEA的提取效果呈上升趋势, 当体积为15、20、25 mL时, BEA的添加回收率分别为68.5%、77.0%、102.7%. 4种ENN_S在3种提取溶剂体积下的添加回收率为99.2%~121.4%, 差异不显著($P>0.05$). 最终确定提取溶剂体积为25 mL.

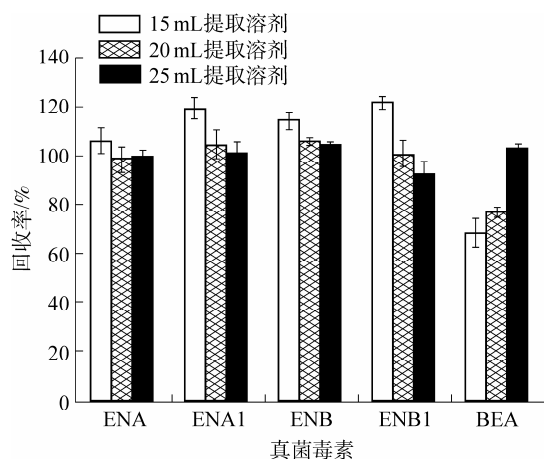


图2 提取液体积对恩镰孢菌素和白僵菌素回收率的影响(加标相对质量浓度 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

2.2.3 果胶酶用量

鉴于果汁中通常会存在悬浮的果胶固体, 并且有部分果胶固体还会与真菌毒素相结合, 造成难以被有机溶剂提取^[24]. 但果胶酶可以将果胶和淀粉等复杂的多糖分解成简单小分子, 还能将真菌毒素从植物组织中释放出来, 提高提取效果. 因此, 本文比较150、200、250 μL 果胶酶用量对果汁中4种ENN_S和BEA添加回收率的影响. 实验结果表明(图3), 3种果胶酶用量对4种ENN_S的影响较小, 添加回收率在92.6%~110.6%之间; 但果胶酶用量为150 μL 时, BEA添加回收率为72.8%, 当果胶酶用量为200 μL 和250 μL 时, 添加回收率增加了29.9%和35.1%, 且与前者差异显著($P<0.01$). 最终选择果胶酶用量为200 μL .

2.2.4 盐析剂

QuEChERS方法一般会加入盐, 通过盐析作用去除提取溶剂中水分, 降低有机相在水中的溶解

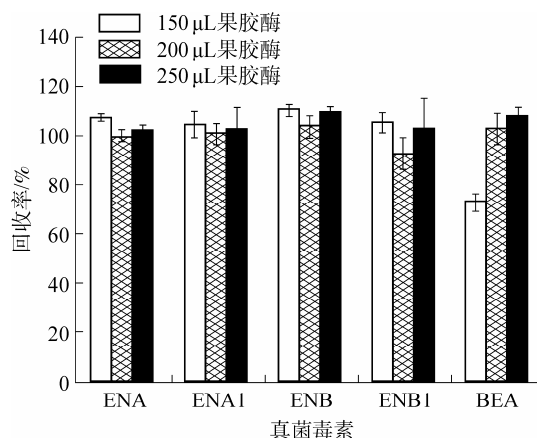


图3 果胶酶用量对恩镰孢菌素和白僵菌素回收率的影响(加标相对质量浓度 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

度^[20]. 本文以4 g无水 MgSO_4 +1 g NaCl、4 g无水 MgSO_4 +0.5 g无水 CH_3COONa +0.5 g NaCl为盐析剂, 比较2种盐析剂对果汁中4种ENN_S和BEA添加回收率的影响. 实验结果表明(图4), 2种盐析剂对4种ENN_S影响较小, 添加回收率为92.6%~112.6%; 但4 g无水 MgSO_4 +0.5 g无水 CH_3COONa +0.5 g NaCl为盐析剂时, BEA的添加回收率为102.7%, 比4 g无水 MgSO_4 +1 g NaCl为盐析剂时的BEA添加回收率增加30.6%, 且两者之间差异显著($P<0.01$). 最终本文选择盐析剂为4 g无水 MgSO_4 +0.5 g无水 CH_3COONa +0.5 g NaCl.

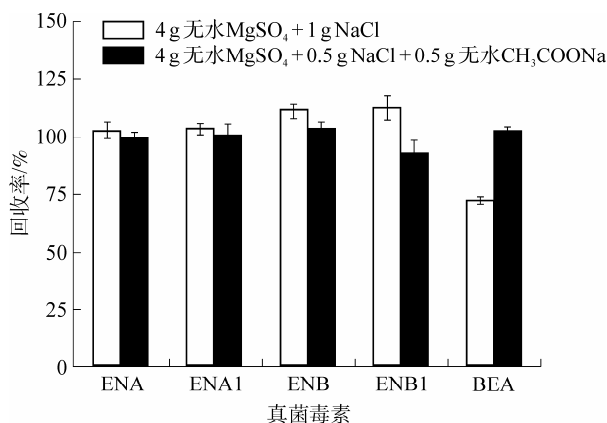


图4 盐析剂选择对恩镰孢菌素和白僵菌素回收率的影响(加标相对质量浓度 $100\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

2.2.5 净化剂

由于食品基质的复杂性, QuEChERS方法在样品盐析后, 通常用石墨化炭黑、乙二胺-N-丙基硅烷和碳18(carbon 18, C18)等净化剂去除色素、有机酸和果胶等杂质^[20]. 因此, 本文比较0、100、200、

300 mg 的 C18 净化剂对果汁中 4 种 ENNs 和 BEA 添加回收率的影响. 实验结果表明(图 5), 未净化的 4 种恩镰孢菌素和白僵菌素的添加回收率在 67.3%~83.6%之间, 存在明显的基质干扰现象, 且与加入 100、200、300 mg 用量的 C18 净化后的添加回收率差异显著($P < 0.01$); C18 净化后 4 种恩镰孢菌素和白僵菌素的添加回收率为 92.6%~108.9%, 基质干扰可接受, 且 100、200、300 mg 用量的 C18 之间差异不显著($P > 0.05$). 最终本文选择 C18 净化剂的用量为 100 mg.

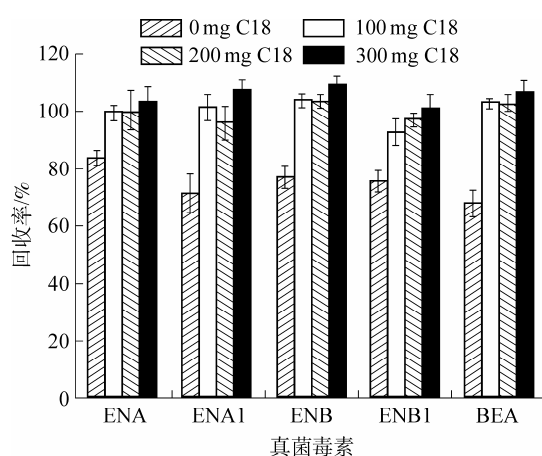


图5 C18 用量对恩镰孢菌素和白僵菌素添加回收率的影响(加标相对质量浓度 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

2.3 方法学评价

2.3.1 线性关系、检测限和定量限

取空白果汁样品, 通过前处理方法得到基质溶液, 配制 0.1、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准系列工作溶液. 以 4 种 ENNs 和 BEA 的质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制基质匹配标准溶液校正曲线. 实验结果表明, ENA、ENB 和 BEA 在 0.1~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 ENA1 和 ENB1 在 1~200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内线性关系良好, 且线性相关系数(R^2)均大于 0.998 9(表 3). 以 3 倍和 10 倍信噪比确定果汁样品中 4 种 ENNs 和 BEA 的检测限

(Limits of Detection, LOD)和定量限(Limits of Quantification, LOQ), 而样品检测限和定量限分别为 $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (表 3).

2.3.2 加标回收率和精密度

按优化后的方法进行前处理, 取空白果汁样品分别添加 5、25、100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 相对质量浓度水平的 ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 混合标准溶液, 每个加标水平进行 6 次平行试验($n=6$), 连续 3 d 进行测定, 得到 ENNs 和 BEA 的添加回收率、日内精密度和日间精密度, 验证结果见表 4. 由表 4 数据可见, ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 的 3 个浓度水平添加回收率在 88.0%~114.1%之间, 相对标准偏差(RSD)在 1.7%~11.7%之间. 由此可见, 本文建立的 QuEChERS 方法满足果汁中 ENNs 和 BEA 的检测要求.

2.3.3 基质效应

基质效应(Matrix Effect, ME)是指样品中存在的内源性物质或其他过程中产生的非目标化合物, 在离子源中与目标化合物发生物理或化学反应, 影响离子化效率, 造成目标化合物响应值升高或降低的现象^[25]. 本文以基质空白标准系列工作溶液和标准系列工作溶液校正曲线斜率的比值来评价基质效应. ME 值越接近 1, 基质干扰小; 反之, 基质增强或基质减弱^[22]. 实验结果表明, ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 的 ME 值在 74.0%~102.4%之间, 其中 ENB1 的 ME 值为 74.0%, 存在一定的基质抑制效应, 其余 4 种真菌毒素 ME 值在 88.4%~102.4%之间, 受基质效应的影响较小. 因此, 为减少基质抑制效应对实验结果准确性的影响, 本文采用基质外标法定量分析实验结果.

2.4 实际样品检测

本文采用建立的 QuEChERS 方法对市场随机抽取的 30 份果汁样品(如苹果汁、桔梗梨汁、芒果汁、橙汁、番石榴果汁、菠萝汁、香蕉苹果汁、

表3 恩镰孢菌素和白僵菌素的线性关系、检出限、定量限

真菌毒素	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	线性方程	相关系数	样品检测限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	样品定量限/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
ENA	0.1~200	$y = 2 \times 10^6 x - 361388$	0.999 7	1.5	5.0
ENA1	1~200	$y = 38634x - 73093$	0.998 9	1.5	5.0
ENB	0.1~200	$y = 3 \times 10^6 x + 3 \times 10^6$	0.999 7	1.5	5.0
ENB1	1~200	$y = 11687x - 1546.1$	0.999 5	1.5	5.0
BEA	0.1~200	$y = 648083x - 255512$	0.999 9	1.5	5.0

表 4 恩镰孢菌素和白僵菌素的回收率和精密度

真菌毒素	加标浓度/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率/%	RSD/%	
			日内/($n=6$)	日间/($n=18$)
ENA	5	88.0	4.9	7.7
	25	109.5	3.9	6.1
	100	99.8	2.2	2.6
ENA1	5	95.2	5.2	8.8
	25	106.8	7.1	11.7
	100	101.1	4.6	7.5
ENB	5	114.0	1.7	3.6
	25	111.4	2.3	4.0
	100	103.9	1.8	1.9
ENB1	5	109.2	2.6	10.0
	25	114.1	11.2	11.7
	100	92.6	4.5	11.3
BEA	5	110.0	6.1	7.2
	25	102.5	3.4	5.0
	100	102.7	1.7	2.4

胡萝卜苹果汁、桑葚汁、梨汁、杨梅汁、荔枝果汁等)进行检测分析. 实验结果发现, 均未检出 4 种 ENNs 和 BEA.

3 结论

本文对色谱条件、质谱条件、提取溶剂种类、提取溶剂体积、果胶酶用量、盐析剂和净化剂选择进行了优化, 建立了 QuEChERS 前处理方法, 同时结合 UPLC-MS/MS 方法测定果汁中恩镰孢菌素 A、恩镰孢菌素 A1、恩镰孢菌素 B、恩镰孢菌素 B1 和白僵菌素. 本方法具有简单、快速、回收率高, 灵敏度高等特点, 适用于果汁中恩镰孢菌素和白僵菌素定性和定量分析, 补充了水果类制品中多种真菌毒素的定量确证检测方法.

参考文献:

[1] 史文景. 柑橘和果汁中链格孢霉毒素检测技术研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.

[2] Yang Y, Li G L, Wu D, et al. Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 96: 233-252.

[3] 王玉娇. 坚果和干果真菌毒素污染及风险评估研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.

[4] Maranghi F, Tassinari R, Narciso L, et al. *In vivo* toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins: Combined approach to study *in vivo* toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB)[J]. EFSA Supporting Publications, 2018, 15(5):1-18.

[5] Stanciu O, Juan C, Miere D, et al. Analysis of enniatins and beauvericin by LC-MS/MS in wheat-based products [J]. Journal of Food, 2017, 15(3):433-440.

[6] 秦露, 张磊, 蒋佳伊, 等. 基于酶联免疫分析法高通量筛查中药材中赭曲霉毒素 A 的污染研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(23):5072-5077.

[7] Beyene A M, Du X W, Schrunck E D, et al. High-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay techniques for detection and quantification of aflatoxin B₁ in feed samples: A comparative study[J]. BMC Research Notes, 2019, 12(1):492.

[8] Rizzo I, Vedoya G, Maurutto S, et al. Assessment of toxigenic fungi on Argentinean medicinal herbs[J]. Microbiological Research, 2004, 159(2):113-120.

[9] 谭洪波. 粮油中真菌毒素检测技术及其应用解析[J]. 现代食品, 2019(21):166-168.

[10] Font G, Rodríguez-Carrasco Y, Moltó J C, et al. Monitoring *Alternaria* mycotoxins and pesticide residues in tomato by dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Toxicology Letters, 2013, 221:S122.

[11] 李春扬, 张晓磊, 田菲菲, 等. 气相色谱-串联质谱技术在食品分析中的应用研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(8):3291-3299.

[12] Dias J V, da Siva R C, Pizzutti I R, et al. Patulin in apple and apple juice: Method development, validation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and survey in Brazilian south supermarkets[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2019, 82:103242.

[13] 王远, 邢丽杰, 李先义, 等. UPLC-MS/MS 法测定番茄酱中 5 种链格孢霉毒素[J]. 食品工业, 2021, 42(7):323-327.

[14] Prella A, Spadaro D, Garibaldi A, et al. A new method for detection of five alternaria toxins in food matrices based on LC-APCI-MS[J]. Food Chemistry, 2013, 140(1/2): 161-167.

[15] Wang M, Jiang N, Xian H, et al. A single-step solid phase extraction for the simultaneous determination of 8 mycotoxins in fruits by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1429:22-29.

- [16] 李磊, 韦柳丹, 周贻兵, 等. 固相萃取净化-超高效液相色谱串联质谱法测定菜籽油中交链孢霉毒素含量[J]. 中国油脂, 2021, 46(8):119-122; 139.
- [17] 阳曦, 刘玮, 向世杰. 液液萃取-全碳同位素标记-液质联用法测定酱油中玉米赤霉烯酮[J]. 中国调味品, 2021, 46(11):151-154.
- [18] 蒋林惠, 陈彬, 周易枚, 等. QuEChERS-液质联用技术同时测定大米中的 4 种真菌毒素及 5 种农药残留量方法的研究[J]. 粮食与食品工业, 2021, 28(5):54-58.
- [19] Jo H W, Park M K, Heo H M, et al. Simultaneous determination of 13 mycotoxins in feedstuffs using QuEChERS extraction[J]. Applied Biological Chemistry, 2021, 64(1):1-12.
- [20] 赵英莲, 张梓琪, 赵鑫, 等. QuEChERS 技术在食品真菌毒素检测中的研究进展[J]. 中国酿造, 2020, 39(1):1-5.
- [21] 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源性食品中 16 种真菌毒素[J]. 色谱, 2020, 38(7):782-790.
- [22] 许娇娇, 黄百芬, 周健, 等. 直接稀释-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定谷物及其制品中 16 种真菌毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(6):708-715.
- [23] Ji X F, Li R, Yang H, et al. Occurrence of patulin in various fruit products and dietary exposure assessment for consumers in China[J]. Food Control, 2017, 78:100-107.
- [24] Li X J, Li H M, Li X M, et al. Determination of trace patulin in apple-based food matrices[J]. Food Chemistry, 2017, 233:290-301.
- [25] Trufelli H, Palma P, Famigliini G, et al. An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Mass Spectrometry Reviews, 2011, 30(3):491-509.

Determination of enniatins and beauvericin in fruit juice by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

DENG Tao¹, JI Xiaofeng², XIAO Yingping², WANG Wen², LÜ Wentao², WANG Xiaoli², WU Zhen¹, YANG Hua²

(1. College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

2. Institute of Agro-Product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed for the simultaneous determination of enniatins and beauvericin in fruit juices. Samples were extracted with $V(\text{acetonitrile}):V(\text{water}):V(\text{formic acid})$ mixture solution (79:20:1), salted out extraction by QuEChERS packed packages (4 g anhydrous MgSO_4 , 0.5 g anhydrous CH_3COONa and 0.5 g NaCl), purified by 100 mg C18, and separated by liquid chromatography column with $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ammonium acetate aqueous solution-methanol as mobile phase gradient elution. ESI positive ion mode scanning, multiple response monitoring mode detection, and matrix external standard method quantitative analysis were employed. The linearity was in the range of $0.1\text{--}200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for ENA, ENB and BEA, and the linearity was in the range of $1\text{--}200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for ENA1 and ENB1, with the correlation coefficients (R^2) greater than 0.998 9 and relative standard deviations ranging from 1.7% to 11.7%. The recoveries were ranged from 88.0% to 114.1%. The samples' limits of detection were $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and their limits of quantitation were $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The method established in this study is demonstrated as being simple, efficient, and accurate, which can satisfy the requirements of screening tests for enniatins and beauvericin in fruit juice samples.

Key words: fruit juice; enniatins; beauvericin; food safety

(责任编辑 章践立)