

实验技术与方法

固相净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定花生中6种链格孢毒素

陈静,谭璟慧,夏雨欣

(衡阳市疾病预防控制中心,湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 采用固相净化柱净化,建立超高效液相色谱-串联质谱法测定花生中6种链格孢毒素的含量。方法 样品经乙腈-水-甲酸提取,固相净化柱净化,采用甲醇-1.0 mmol/L 碳酸氢铵溶液为流动相、HSS T3 柱分离、电喷雾离子源负离子模式(ESI-)的检测条件,UPLC-MS/MS 测定,内标法定量。结果 6种链格孢毒素在各自的测定范围内线性关系良好(r 均 >0.999),方法检出限范围在0.02~0.23 $\mu\text{g/kg}$,相对标准偏差 $<3.5\%$,加标回收率为87.4%~117.7%。结论 该方法快速高效、灵敏度高、重现性好,适合同时快速检测花生中6种链格孢毒素的残留。

关键词:链格孢毒素;花生;超高效液相色谱-串联质谱;固相净化柱

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)07-0615-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.07.003

Determination of 6 alternaria toxins in peanuts by solid phase purification column purification-ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

CHEN Jing, TAN Jinghui, XIA Yuxin

(Hengyang Municipal Center for Disease Control and Prevention, Hu'nan Hengyang 421001, China)

Abstract: Objective To establish an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of 6 alternaria toxins in peanuts by solid phase purification column purification. **Methods** The sample was extracted with acetonitrile-water-formic acid, purified through solid phase purification columns. Using a mobile phase of methanol-1.0 mmol/L ammonium bicarbonate solution, a HSS T3 column for separation, and ESI- mode for detection, and determined by UPLC-MS/MS, with internal standard quantification. **Results** The six types of alternaria toxins showed good linear relationships within their respective determination ranges (all r values were greater than 0.999), the detection limit of this method were in the range of 0.02 to 0.23 $\mu\text{g/kg}$, the relative standard deviation was less than 3.5%, and the recoveries were 87.4%-117.7%. **Conclusion** This method is simple, fast, has good purification effects, high sensitivity, and good reproducibility, making it suitable for the rapid detection of residues of six types of alternaria toxins in peanuts simultaneously.

Key words: Alternaria toxins; peanut; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; solid phase purification column

链格孢霉菌广泛存在于泥土和各种农作物里,是污染谷物、油籽与果蔬的一种极为常见的条件致病菌和腐生丝状真菌。由于该菌能在潮湿、低温的环境下生长繁殖,环境适应能力较强,可以产生大量的次级代谢产物,这类代谢产物统称链格孢毒素(Alternaria toxins, ATs),典型代表包括细交链孢菌酮酸(Tenuzonic acid, TeA)、交链孢酚(Alternariasp, AOH)、腾毒素(Tentoxin, TEN)、交链孢酚单甲醚(Alternariol monomethyl ether, AME)、交链孢霉烯

(Atenuene alt, ALT)及交链孢毒素 I(Altetoxin I, ATX I)等。近年来研究表明,ATs 对人与动物均具有急性毒性、亚急性毒性及致畸致癌性^[1-2]等,对人畜的健康构成了严重威胁。因此,ATs 的监测对于人和动物的健康安全具有重要意义。

食品中链格孢毒素尚未出台具体的限量标准,我国正在开展针对食品中链格孢毒素污染现状风险监测,为制定食品中链格孢毒素的限量标准提供参考。现有的检验方法十分局限,相关文献的检测

收稿日期:2025-03-13

作者简介:陈静 女 主管技师 研究方向为食品和水质理化检验 E-mail: 503455674@qq.com

通信作者:谭璟慧 女 副主任技师 研究方向为食品和水质理化检验 E-mail: 379557551@qq.com

对象仅限于蔬果、粮油、饲料等。在我国,花生是一种比较常见的大田经济作物,作为一种食用广泛的坚果,具有丰富的营养价值。但花生在种植、储存、运输过程中极易受曲霉菌、青霉菌和链格孢霉菌等真菌的污染。目前,关于花生中真菌毒素污染研究主要集中在黄曲霉毒素、赭曲霉毒素及玉米赤霉烯酮等,而对于花生中链格孢毒素的检测研究非常匮乏^[3-4]。因此,为进一步加强食品安全风险监测,扩充检测对象和毒素种类,本研究选取花生作为检测对象,测定其中6种ATs(即TeA、AOH、TEN、AME、ALT及ATX I)。

目前,关于链格孢毒素的检测技术主要有薄层色谱法^[5]、气质联用技术^[6]及液质联用技术^[7-15]等,其中薄层色谱法灵敏度低、重复性差,酶联免疫吸附法易受基质干扰,容易产生假阳性,精密度较差,易受到温度等因素干扰;气相色谱法和气质联用技术需衍生,操作复杂,重复性差;液质联用技术具有灵敏度高、分析速度快等特点,相较于传统的液相色谱法更加适用于食品等复杂基质样品中霉菌毒素的分析。而同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法^[16-18]无需面对不同样品基质配置相应的基质匹配标准曲线,能够降低检测工作量,扩展方法的普适性,补偿检测过程中的基质效应和损失污染,得到了广泛的关注与应用。

本研究通过PriboFast[®] MFC331固相净化柱(别名多功能净化柱)净化样品,建立同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法对花生中6种链格孢毒素进行测定分析,固相净化柱净化与传统样品前处理方法相比,无需活化、淋洗、洗脱等复杂操作,减少有机试剂使用,仅需一步即可实现提取液的快速净化,绿色经济、专属性好,为评估食品中链格孢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 主要仪器与试剂

超高效液相色谱-串联质谱仪(UPLC-MS/MS):美国Thermo fisher, TSQ QUANTIS;全自动高通量平行浓缩仪:北京莱伯泰科, M32;1/千电子天平:北京赛多利斯, TB-403;涡旋振荡器:海门其林贝尔, QL-901;超声波清洗仪:昆山超声仪器, KQ-250DE;高速冷冻离心机:赛默飞, Sorvall ST 8R;多功能粉碎机:永康红太阳, 2500C。固相净化柱:普瑞邦, PriboFast[®] MFC331, 适用于粮谷和坚果中的链格孢毒素。

标准品: TeA (ROMER, 100 μg/mL)、AOH (ROMER, 100 μg/mL)、TEN (ROMER, 100 μg/mL)、AME (ROMER, 100 μg/mL)、ALT (Pribolab, 10 μg/mL)、

ATX I (Pribolab, 10 μg/mL); TeA-D₁₃ (TRC, 97%)、AOH-D₂ (TRC, 96%)、TEN-D₃ (TRC, 97%)、AME-D₃ (TRC, 97%)、¹³C₁₅-ALT (Pribolab, 5 μg/mL)、¹³C₂₀-ATX I (Pribolab, 10 μg/mL), 临用时用甲醇逐级稀释。甲醇(MERCK, 色谱纯);乙腈(MERCK, 色谱纯);碳酸氢铵(MERCK, 色谱纯);乙酸铵(CNW, 色谱纯);氨水(科密欧, 色谱纯);甲酸(科密欧, 色谱纯);乙酸(CNW, 色谱纯);实验用水为超纯水仪(Millipore, Milli-Q Advantage A10)制备的一级水。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

混合标准溶液(TeA: 500 ng/mL, AOH: 200 ng/mL, TEN: 100 ng/mL, AME: 20 ng/mL, ALT: 200 ng/mL, ATX I: 200 ng/mL)。混合内标溶液(TeA-D₁₃: 500 ng/mL, AOH-D₂: 200 ng/mL, TEN-D₃: 100 ng/mL, AME-D₃: 20 ng/mL, ¹³C₁₅-ALT: 200 ng/mL, ¹³C₂₀-ATX I: 200 ng/mL)。

取适量上述混合标准溶液和混合内标溶液,用甲醇和水配制成标准系列,其中TeA配制浓度为: 10、20、50、100、200和500 ng; AOH、ALT、ATX I配制浓度均为: 4.0、8.0、20、40、80和200 ng; TEN配制浓度为: 2.0、4.0、10、20、40和100 ng; AME配制浓度为: 0.4、0.8、2.0、4.0、8.0和20 ng; 标准系列各管含同位素内标浓度分别是TeA-D₁₃: 100 ng、TEN-D₃: 20 ng、AME-D₃: 4.0 ng, AOH-D₂、¹³C₁₅-ALT、¹³C₂₀-ATX I均为40 ng, 现用现配。

1.2.2 样品前处理

样品的制备与保存: 取一定量(新鲜干性样品1 kg左右), 样品用多功能粉碎机粉碎均匀, 再磨碎过40目筛, 四分法取样, 试样缩分后不少于500 g。所取的样品平均分为2份, 1份供测定, 另1份放置于-20℃冰箱中保存, 备用。

样品提取: 称取5 g制备样品, 于50 mL聚丙烯离心管中, 加入200 μL混合内标溶液, 涡旋混匀。加入20 mL的乙腈-水-甲酸(84+16+0.1)提取液, 控制温度30℃以下超声提取30 min, 提取液于4℃10 000 r/min离心10 min(为24 328×g, 离心半径8.5 cm), 上清液待净化。

样品净化: 取8.0 mL上清液于PriboFast[®] MFC331固相净化柱配套的试管中, 均速下压净化柱压杆, 使提取液通过柱体, 固相净化柱内含复合吸附填料(极性、非极性、离子交换等多类官能基团), 选择性地将样品中的脂类、蛋白类、色素等杂质复合截留吸附, 目标物(6种链格孢毒素)随样液通过填料, 30 s内完成快速净化和富集, 净化后的过滤液直接用于检测, 无需传统固相萃取方法中复杂的活化、淋洗和洗脱等步骤。

浓缩复溶:取4 mL待测液到10 mL聚丙烯离心管中,50 ℃温育下氮气吹干后用1 mL的10%甲醇水溶液复溶,于4 ℃ 10 000 r/min离心15 min(离心半径8.5 cm),上清液供UPLC-MS/MS分析。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱:Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.8 μm);流动相:A为甲醇,B为1.0 mmol/L 碳酸氢铵溶液;流速:0.25 mL/min;进样量:10 μL;柱温:40 ℃;梯度洗脱程序见表1。

质谱:离子源:电喷雾离子源负离子模式(ESI-);扫描方式:多反应监测(Multipule reaction monitoring,MRM);喷雾电压(V):2 500;离子传输管温度(℃):

表1 流动相梯度洗脱程序

Table 1 Mobile phase gradient elution conditions		
时间/min	A(甲醇)/%	B(1.0 mmol/L 碳酸氢铵溶液)/%
0.0	5	95
2.0	5	95
3.0	75	25
4.0	90	10
6.0	90	10
6.5	5	95
10	5	95

325;雾化温度(℃):350;鞘气流速(Arb):50;辅助气流速(Arb):10;吹扫气流速(Arb):1;Q1分辨率:0.7;Q3分辨率:0.7;碰撞气压力(mTorr):1.5。6种ATs及其对应的同位素内标质谱检测参数见表2。

表2 质谱检测参数

Table 2 MS parameters						
化合物	内标	母离子/(m/z)	RF电压/V	子离子/(m/z)	碰撞能量/V	保留时间/min
TeA	TeA-D ₁₃	196.1	93	139.0*	18.98	4.60
				112.0	23.45	
AOH	AOH-D ₂	257.1	163	213.0*	21.76	5.72
				147.0	31.83	
TEN	TEN-D ₃	413.3	123	141.1*	18.86	6.01
				271.2	14.90	
AME	AME-D ₃	271.1	131	256.0*	21.68	6.61
				228.0	28.59	
ALT	¹³ C ₁₅ -ALT	291.0	105	228.8*	13.93	5.62
				246.9	14.52	
ATX I	¹³ C ₂₀ -ATX I	351.0	83	314.9*	14.22	5.93
				332.9	9.42	
TeA-D ₁₃	—	209.1	103	143.0*	20.50	4.56
AOH-D ₂	—	259.1	148	215.0*	22.61	5.72
TEN-D ₃	—	416.2	127	141.1*	19.11	6.01
AME-D ₃	—	274.0	131	256.0*	22.35	6.60
¹³ C ₁₅ -ALT	—	306.0	105	243.0*	14.35	5.62
¹³ C ₂₀ -ATX I	—	371.0	86	335.0*	14.35	5.93

注:*为定量离子

2 结果与分析

2.1 质谱检测参数优化

目标物中包含酸类和酚类物质,在电喷雾离子源中易形成分子离子峰[M-H]⁻,且采用流动注射直接进样的方式,分别在ESI+、ESI-模式下进行Q1全扫描确定前体母离子,发现目标物在ESI-模式下响应比ESI+更好,因此选择负模式作为检测模式。调节离子源区各参数,使母离子信号响应具有一定的强度,再进行Q3二级扫描,在MRM模式下优化RF Lens电压和碰撞能量,在丰度、稳定性和干扰程度方面最为理想的产物离子选定为定量和定性子离子。具体的质谱检测参数见表2。

2.2 色谱条件优化

2.2.1 色谱柱的选择

结合链格孢毒素的性质,本研究考察了BEH

C18柱与HSS T3柱对目标物的分离效果,发现在相同梯度洗脱程序下,BEH C18柱在分离极性较强出峰靠前的TeA时,峰形扩展变宽易分叉且响应很低,而6种ATs在HSS T3柱上能获得更好的峰形和检测灵敏度,故选择更适合极性样品分离的HSS T3色谱柱。

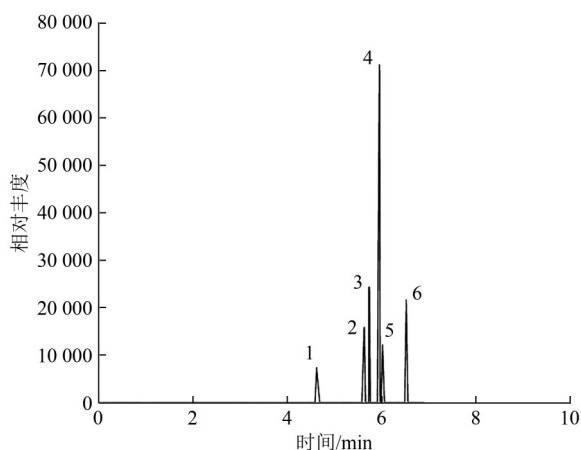
2.2.2 流动相的选择

本研究针对ESI-模式下常用的甲醇-1 mmol/L 乙酸铵、甲醇-1 mmol/L 碳酸氢铵和甲醇-1 mmol/L 氨水3种流动相体系对6种ATs的峰形及响应情况进行了考察。TeA为一元酸类化合物,结构会因碱性条件发生改变,但适当的弱碱性条件使各物质的响应增强峰形变好。结果发现,使用甲醇-1 mmol/L 乙酸铵体系时,TeA色谱峰有拖尾,并且各目标物响应较低;使用甲醇-1 mmol/L 氨水体系时,TeA出峰

过早且出现很长伸舌峰;使用甲醇-1 mmol/L 碳酸氢铵体系时,各物质的响应最高、峰形较好。

本研究也对碳酸氢铵浓度为 1~10 mmol/L 范围进行研究,随着碳酸氢铵浓度增大,响应没有明显增强,但是盐浓度增大,在梯度洗脱过程中压力增加,有堵塞分析系统的风险,太强的碱性环境也容易损坏色谱柱,故最终选择甲醇-1 mmol/L 碳酸氢铵溶液作为流动相。

结果显示,优化条件下 6 种 ATs 分离效果明显,色谱峰形和响应强度最好,保留时间稳定(图 1)。



注:1-TeA;2-ALT;3-AOH;4-ATX I;5-TEN;6-AME

图1 6种ATs的总离子流色谱图

Figure 1 Total ion current chromatogram of six alternaria toxins

2.3 样品前处理方法优化

2.3.1 净化方法的选择

真菌毒素样品的前处理净化方法多样,其中 QuEChERS 法和固相萃取法常被应用,但 QuEChERS 法常用的吸附剂(PSA、C18、GCB)对链格孢毒素都有不同程度的吸附,回收率较低,不适合复杂基质样品,而固相萃取法不仅需消耗大量的试剂,并且操作过程繁琐。相比之下,免疫亲和柱和固相净化柱在处理样品时展现出更高的专属性和富集能力。但免疫亲和柱的成本相对较高,限制了其在某些研究中的广泛应用。固相净化柱净化原理是采用多重复合材料吸附杂质,干扰物被截留在柱内的填充物中,而待测毒素不被吸附从而达到净化的目的。采用固相净化柱进行净化处理,省略了传统固相萃取复杂的活化、淋洗和洗脱程序,显著减少了有机溶剂的使用,简化操作步骤,且经济环保,在处理基质复杂的样品时依然能够实现高效净化。

2.3.2 样品提取液的选择

乙腈和甲醇是真菌毒素常见的提取溶剂,但乙腈沉淀蛋白效果比甲醇好。适量的水分加入可有效改善乙腈对非水相基材的渗透能力,从而提升样

品的提取效率。甲酸作为常见酸性提取剂,有助于提取对 pH 值和极性敏感的 TeA。但水和酸含量过高易带来过多的水溶性和酸性杂质,同时也会影响氮吹的浓缩效率。本研究针对性地考察了文献中真菌毒素提取常用的乙腈-甲酸(99+1)、乙腈-水-甲酸(84+16+0.1)、乙腈-水-甲酸(70+29+1)三种提取液对 6 种 ATs 的提取情况。结果表明(图 2),乙腈-水-甲酸(84+16+0.1)作为提取液时,回收率为 99.8%~103.5%,具有最佳的提取效率。因此,本方法选择乙腈-水-甲酸(84+16+0.1)作为样品提取液。

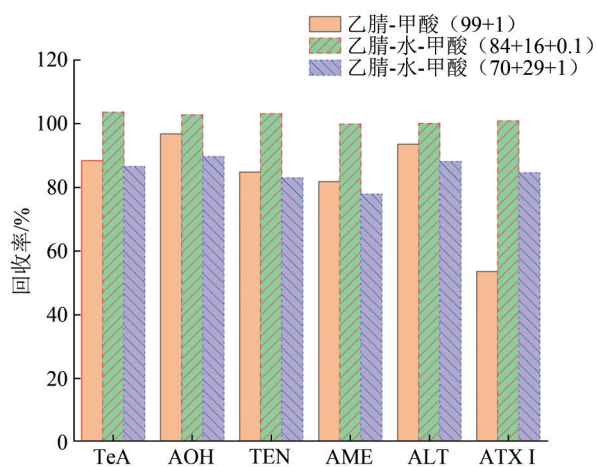


图2 不同提取液的回收率情况

Figure 2 Elution effect of different extraction solutions on the recoveries of six alternaria toxins

2.3.3 提取液体积优化

在真菌毒素的提取中,固液比例必须保持在一个合理范围内。提取液体积过少可能不足以将 ATs 完全提取出来,过多则不利于浓缩富集效果且浪费试剂。本研究针对样品称样量为 5 g 的条件下,分别考察了 15、20 和 25 mL 的提取液体积对 6 种 ATs 回收率的影响。结果显示(图 3),当提取液体积由 15 mL 增加到 20 mL 时,6 种 ATs 的回收率升至最高(99.8%~103.5%),进一步增加至 25 mL 时,回收率提高不明显,反而造成试剂浪费。因此,从提取效率和经济环保角度综合考虑,样量为 5 g 的条件下,本方法选择 20 mL 的提取液体积。

2.3.4 超声提取时间优化

在进行 ATs 提取时,超声时间的选择也非常关键。若时间过短,则可能导致 ATs 提取不充分;而时间过长,则可能溶出过多杂质,从而增强基质效应干扰检测。本研究分别测试了 15、30、45 min 的超声时间对 ATs 回收率的影响,结果显示,超声时间从 15 min 增加至 30 min 时,6 种 ATs 的回收率达最佳(99.8%~103.5%),继续延长时间,提取效率受基质效应影响反而不稳定。基于样品基质效应和

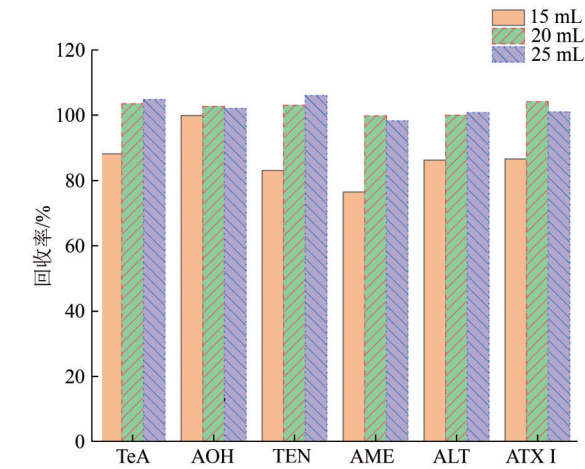


图3 提取液体积对6种ATs回收率的影响

Figure 3 Elution effect of different extraction liquid volume on the recoveries of six alternaria toxins

分析速度的考虑,本方法选定了超声提取时间为30 min。

表3 6种ATs的线性关系、线性范围、相关系数*r*、检出限及定量限

Table 3 Linear rangy, linear equation, coefficients of determination, detection limit and quantification limit of six alternaria toxins					
化合物	线性范围/(ng/mL)	线性方程	相关系数	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
TeA	1.0~50.0	$y=1.289e^{-1}x-4.395e^{-2}$	0.999 6	0.23	0.76
AOH	0.4~20.0	$y=2.588e^{-1}x-3.403e^{-2}$	0.999 7	0.15	0.49
TEN	0.2~10.0	$y=5.127e^{-1}x-5.595e^{-2}$	0.999 5	0.05	0.18
AME	0.04~2.0	$y=3.34e^0x-6.665e^{-2}$	0.999 6	0.02	0.05
ALT	0.4~20.0	$y=4.992e^{-1}x-1.35e^{-1}$	0.999 1	0.11	0.37
ATX I	0.4~20.0	$y=4.84e^{-1}x-1.207e^{-1}$	0.999 5	0.08	0.27

2.4.2 加标回收率和精密度

为了进一步评估该方法的可靠性,在空白花生样品基质中分别进行1、2和10倍定量限附近3水平加标试验,并且每个加标浓度水平分别在同一天和连续6天重复进行6次。结果(表4)表明本方法具有较好的准确度和精密度,6种ATs的相对回收率为87.4%~117.7%,相对标准偏差(Relative standard deviation,RSD)均<3.5%,可用于实际样品的测定。

2.4.3 方法选择性评估

为进一步评估检测方法的可行性,将本研究方法 与现有文献用于ATs检测的其他方法比较,由表5可见,本方法比QuEChERS法灵敏度更高、重复性更好,比固相萃取法步骤简单、试剂消耗少、回收率更高。此外,本研究方法线性范围较宽,检出限更低,检测通量更高,样品处理效率更快速,方法性能指标均符合技术要求,可用于花生样品中6种ATs的快速定性定量分析。

2.4.4 实际花生样品分析

利用上述实验确定的优化条件对市售21份花生样品进行分析,使用固相柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定,结果表明6种ATs中污染程度最高为ALT,检出率为100.0%,含量为1.05~3.84 μg/kg,

2.4 方法学验证

2.4.1 方法的线性范围和检出限

对建立的方法进行方法验证。用10%甲醇水溶液稀释6种ATs混标及其内标,配制成所需浓度的标准系列溶液,上机测定,得到6种ATs及其内标的色谱图和峰面积,以6种ATs的质量浓度为横坐标,6种ATs与对应内标的峰面积比值为纵坐标,绘制内标法的标准曲线。结果显示(表3),6种ATs在各自的测定范围内具有良好的线性,相关系数*r*均>0.999。按照样品分析的步骤,在空白花生样品基质中添加含量为估计方法检出限2~5倍的混合标准溶液连续平行测定20次,以3倍平行测定的标准差计算方法的检出限,10倍平行测定的标准差计算方法的定量限。检出限为0.02~0.23 μg/kg,定量限为0.05~0.76 μg/kg(按称样量为5 g计算,表3),说明本方法具有较高的灵敏度。

表4 6种ATs的相对回收率及精密度

Table 4 Recoveries and relative standard deviations of six alternaria toxins in peanut			
化合物	花生		
	加标量/(μg/kg)	相对回收率/%	RSD/%
TeA	1.0	87.4	1.0
	2.0	111.6	1.5
	10.0	97.7	2.3
AOH	0.4	90.4	3.0
	0.8	112.9	2.0
	4.0	97.6	3.0
TEN	0.2	106.8	2.9
	0.4	112.1	1.7
	2.0	98.0	1.9
AME	0.04	95.8	1.3
	0.08	111.0	2.2
	0.4	93.2	1.1
ALT	0.4	115.0	1.6
	0.8	117.7	1.5
	4.0	94.0	3.5
ATX I	0.4	110.3	1.8
	0.8	114.6	0.9
	4.0	94.8	1.3

平均含量2.17 μg/kg;其次为AOH和TeA,检出率分别为19.0%和14.3%,检出范围分别为0.78~1.71 μg/kg和0.89~1.90 μg/kg,平均含量分别为1.21 μg/kg和1.33 μg/kg,而TEN、AME、ATX I均未检出。由表6可见,6种链格孢毒素的平均值含

表 5 ATs 不同测定方法的比较
Table 5 Comparison of different methods for the determination of alternaria toxins

样品类别	化合物	检测方法	线性范围/ (ng/mL)	检出限/ (μg/kg)	相对回收率/%	RSD/%	参考文献
果汁、果酒	TeA、AOH、TEN、AME	QuEChERS-HPLC-MS/MS	0.07~5.0	0.3~1.5	84.60~108.39	1.03~6.39	[11]
番茄、樱桃	TeA、AOH、TEN、AME	QuEChERS-UPLC-MS/MS	0.2~40.0	0.2~0.67	85.3~97.6	0.72~8.70	[17]
婴幼儿辅食果泥	TeA、AOH、TEN、AME、 ALT	QuEChERS-HPLC-MS/MS	0.1~200	0.1	73.8~118.0	2.3~8.5	[12]
番茄酱	TeA、AOH、TEN、AME、 ALT	QuEChERS-UPLC-MS/MS	0.5~200	1	78.3~104.8	1.2~7.4	[13]
橄榄油	TeA、AOH、TEN、AME	SPE-HPLC-MS/MS	0.04~50.0	0.20~2.00	92.25~124.66	3.79~10.58	[16]
谷类	TeA、AOH、TEN、AME	SPE-UPLC-MS/MS	0.20~15.0	0.4~4.0	62.50~113.40	≤7.89	[14]
菜籽油	TeA、AOH、TEN、AME	SPE-HPLC-MS/MS	0.05~50	0.1~2.0	68.8~117.3	8.6~11.4	[15]
花生	TeA、AOH、TEN、AME、 ALT、ATX I	Filterable solid phase purification column purification-- UPLC-MS/MS	0.04~50.0	0.02~0.23	87.4~117.7	0.9~3.5	—

表 6 花生样品中 6 种 ATs 的检测结果
Table 6 Detection results of 6 alternaria toxins in peanut

化合物	检出率/%	含量范围/ (μg/kg)	平均值/ (μg/kg)	中位数/ (μg/kg)
TeA	14.3	0.89~1.90	1.33	1.01
AOH	19.0	0.78~1.71	1.21	0.98
TEN	ND	ND	ND	ND
AME	ND	ND	ND	ND
ALT	100	1.05~3.84	2.17	1.87
ATX I	ND	ND	ND	ND

注:ND 表示未检出

量依次为 ALT>TeA>AOH>TEN、AME、ATX I。

经实际样品验证,本方法满足花生中 6 种链格孢毒素快速痕量分析的要求。通过比较本研究测定的花生样品与其他文献测定的样品链格孢毒素污染水平,可以发现花生的暴露风险均高于番茄和樱桃(均未检出)^[17],而低于橄榄油(ND~9.098 μg/kg)^[16]、大米(ND~12.18 μg/kg)和小麦(ND~163.32 μg/kg)^[14]。这表明在食品原料中,由于不同原料的品种、种植环境、储存时间和运输条件等因素影响,容易造成链格孢毒素的生长繁衍,造成链格孢毒素的污染程度和检出率的含量高低不同。因此持续监测花生及其相关食品中链格孢毒素的污染水平十分重要。

3 小结

本研究通过 PriboFast® MFC331 固相净化柱净化样品,对方法的质谱条件、色谱条件及前处理方式进行了优化。在优化条件下,建立了同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定花生中 6 种链格孢毒素,并对其进行了方法学验证。固相净化柱经济环保,既简化了前处理的步骤又保证了数据的准确性,适用于大批量链格孢毒素的样品处理。综上,该方法具有操作简单、灵敏度高、检出限低等优势,可满足常规实验室日常检测的需求,对更加准确地监测花生中链格孢毒素的污染水平,评估其暴

露风险具有较为重要的意义,也为食品中链格孢毒素的检验方法和限量法规的制定提供技术支持。

参考文献

[1] 程树品,李晓蒙,王小丹,等.交链孢霉毒素的危害评估[J].毒理学杂志,2020,34(3):220-227.
CHENG S P, LI X M, WANG X D, et al. Current status of hazard assessment of Alternaria toxins[J]. Journal of Toxicology, 2020, 34(3): 220-227.

[2] 齐丽娟,李国君,宁钧宇,等.食品中交链孢酚和交链孢酚单甲醚的危害评估[J].毒理学杂志,2024,38(3):173-184.
QI L J, LI G J, NING J Y, et al. Hazard assessment of alternariol and alternariol monomethyl ether in food[J]. Journal of Toxicology, 2024, 38(3): 173-184.

[3] 张晓航.浅谈粮食及其制品中真菌毒素检测技术[J].中国食品工业,2024,14(6):59-61.
ZHANG X H. A Brief discussion on mycotoxin detection techniques in grain and its products[J]. China Food Industry, 2024, 14(6): 59-61.

[4] 胡蓉,陆秀青,农子明,等.基于高分辨质谱技术测定花生中真菌毒素及代谢物的研究[J].食品安全导刊,2025,11:75-80.
HU R, LU X Q, NONG Z M, et al. A study on the determination of mycotoxins and metabolites in peanuts based on high-resolution mass spectrometry technology[J]. China Food Safety Magazine, 2025, 11: 75-80.

[5] 张峻搏,李圆圆,王建华,等.蔬菜及其制品中真菌毒素的污染与检测技术研究进展[J].上海蔬菜,2024(2):100-106.
ZHANG J B, LI Y Y, WANG J H, et al. Research progress on contamination and detection technology of mycotoxins in vegetables and their products[J]. Shanghai Vegetables, 2024(2): 100-106.

[6] 王霞,丰东升,童金蓉,等.食品中链格孢霉毒素污染现状及检测技术研究进展[J].食品与机械,2023,39(5):224-231.
WANG X, FENG D S, TONG J R, et al. Pollution status and research progress on the detection technology of Alternaria mycotoxins in foods[J]. Food & Machinery, 2023, 39(5): 224-231.

[7] FENG L, FU D J, HONG W Z, et al. Saturated brine dissolution and liquid-liquid extraction combined with UPLC-MS/MS for the

- detection of typical *Alternaria* toxins in pear paste[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2023, 103(14): 6861-6870.
- [8] ZHANG J, HUANG R, FENG Y, et al. Development and validation of stable isotope dilution LC-MS/MS method for simultaneous quantification of four *Alternaria* toxins in 15 food commodities[J]. *Food Chemistry*, 2024, 457: 140122-140122.
- [9] ÁDÁM T, ATTILA C, ANDREA S, et al. Development of a novel LC-MS/MS multi-method for the determination of regulated and emerging food contaminants including tenuazonic acid, a chromatographically challenging *alternaria* toxin[J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1468-1468.
- [10] 兰丰, 王新语, 姚杰, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定食用植物油中典型链格孢霉毒素[J]. *食品科学*, 2022, 43(16): 338-343.
- LAN F, WANG X Y, YAO J, et al. Determination of typical *alternaria* toxins in edible vegetable oil by ultra-high liquid performance chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2022, 43(16): 338-343.
- [11] 刘娜, 李澍才, 唐睿艺, 等. 市售果汁饮料及果酒中4种交链孢霉毒素的测定[J]. *食品科技*, 2023, 48(6): 316-322.
- LIN N, LI S C, TANG R Y, et al. Determination of 4 *alternaria* toxins in commercially available fruit juices and wines[J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(6): 316-322.
- [12] 邓涛, 杨华, 肖英平, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿辅食果泥中5种链格孢霉毒素[J]. *浙江农业学报*, 2022, 34(12): 2728-2739.
- DENG T, YANG H, XIAO Y P, et al. Simultaneous determination of five *Alternaria* toxins by QuEChERS-ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in fruit puree for infants[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2022, 34(12): 2728-2739.
- [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.
- WANG Y, XING L X, LI X Y, et al. Determination of five *alternaria* toxins in tomato ketchup using UPLC-MS/MS[J]. *The Food Industry*, 2021, 42(7): 323-327.
- [14] 何迎迎, 张淑琴, 姚卫蓉. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定粮食中4种交链孢霉毒素[J]. *中国粮油学报*, 2023, 38(4): 113-121.
- HE Y Y, ZHANG S Q, YAO W R. Simultaneous determination of four individual *alternaria* toxins in cereal grains by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2023, 38(4): 113-121.
- [15] 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.
- LI L, WEI L D, ZHOU Y B, et al. Determination of *alternaria* mycotoxins in rapeseed oil by solid phase extraction with ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *China Oils and Fats*, 2021, 46(8): 119-122, 139.
- [16] 蔡琛, 程先先, 吴学森. 固相萃取-同位素稀释液相色谱-串联质谱法测定橄榄油中4种交链孢霉毒素含量及其分布状况[J]. *中国食物与营养*, 2023, 29(2): 15-19.
- CAI C, CHENG X X, WU X S. Determination of Contents and Distribution of 4 Kinds of *Alternaria* Mycotoxins in Olive Oil by Solid Phase Extraction-Isotope Dilution Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. *Food and Nutrition in China*, 2023, 29(2): 15-19.
- [17] 孙灵利, 王硕, 张洪磊, 等. 番茄和樱桃中4种交链孢霉毒素的同位素稀释 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱同时测定法[J]. *中国卫生检验杂志*, 2022, 32(14): 1671-1675.
- SUN L L, WANG S, ZHANG H L, et al. Simultaneous determination of four kinds of *Alternaria* toxins in T tomatoes and cherries by isotope dilution QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2022, 32(14): 1671-1675.
- [18] 倪杨, 杨军军, 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 J J, SHI L, et al. Simultaneous determination of 20 kinds of mycotoxins in nuts by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(13): 4107-4116.