DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251027006
引用格式: 王权帅, 闫乐, 孙卫明, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定板栗中白僵菌素和恩镰孢菌素[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(6): 320–326.
WANG QS, YAN L, SUN WM, *et al*. Determination of beauvericin and enniatins in *Castanea mollissima* Blume by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(6): 320–326. (in Chinese with English abstract).

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定板栗中白僵菌素和恩镰孢菌素

王权帅, 闫　乐, 孙卫明*, 贾建伟, 刘　伟, 袁舜麟, 杜志刚, 陈玲霞
(北京市怀柔区疾病预防控制中心, 北京　101400)

摘　要: 目的　建立 QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定板栗中白僵菌素(beauvericin, BEA)、恩镰孢菌素 A (enniatin A, ENN A)、恩镰孢菌素 A_1 (enniatin A_1, ENN A_1)、恩镰孢菌素 B (enniatin B, ENN B)和恩镰孢菌素 B_1 (enniatin B_1, ENN B_1)含量的方法。**方法**　对 5 种新兴真菌毒素的质谱条件进行优化。根据色谱峰的分离度和峰形选择最佳的色谱柱和流动相条件。通过回收率指标确定最优的提取试剂和 QuEChERS 净化柱。分析板栗样本对 5 种新兴真菌毒素的基质效应。最后对建立的方法进行方法学实验。**结果**　该方法最终使用乙腈-水(80:20, *V*:*V*)对试样进行提取, 使用 QuEChERS 净化柱(乙二胺-N-丙基 50 mg, $MgSO_4$ 150 mg)进行净化处理。采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 为分析色谱柱, 流动相为乙腈-2 mmoL/L 乙酸铵水溶液, 梯度洗脱进行分析。方法的基质效应不能忽略, 应采用同位素内标法进行定量分析。BEA、ENN A、ENN A_1、ENN B 和 ENN B_1 的检出限为 0.03 μg/kg, 定量限为 0.1 μg/kg, 回收率为 89.5%~125.0%之间, 相对标准偏差为 1.6%~8.4%, 相关系数均大于等于 0.9990。**结论**　本方法操作简便快捷, 准确度和灵敏度高, 适用于板栗中 BEA、ENN A、ENN A_1、ENN B 和 ENN B_1 的同时测定。

关键词: 白僵菌素; 恩镰孢菌素; 超高效液相色谱-串联质谱法; 板栗

Determination of beauvericin and enniatins in *Castanea mollissima* Blume by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

WANG Quan-Shuai, YAN Le, SUN Wei-Ming*, JIA Jian-Wei, LIU Wei,
YUAN Shun-Lin, DU Zhi-Gang, CHEN Ling-Xia
(*Beijing Huairou District Center for Diseases Control and Prevention*, *Beijing* 101400, *China*)

ABSTRACT: Objective　To establish a method for simultaneous determination of the content of beauvericin

收稿日期: 2025-10-27
基金项目: 北京市怀柔区科技计划项目(SHFZ 2020-1)
第一作者: 王权帅(1985—), 男, 硕士, 主管检验师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: wqslunwen@126.com
***通信作者:** 孙卫明(1971—), 男, 主任技师, 主要研究方向为食品检验。E-mail: swm0883@126.com

(BEA), enniatin A (ENN A), enniatin A_1 (ENN A_1), enniatin B (ENN B) and enniatin B_1 (ENN B_1) in *Castanea mollissima* Blume by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The mass spectrometry conditions for 5 kinds of emerging mycotoxins were optimized. The optimal chromatographic column and mobile phase conditions based on the separation degree and peak shape of the chromatographic peaks were selected. The best extraction reagent and QuEChERS purification column through recovery rate indicators were determined. The matrix effects of *Castanea mollissima* Blume samples on 5 kinds of emerging mycotoxins were analyzed. Finally, a methodological experiment was conducted on the established method. **Results** The method ultimately used acetonitrile-water (80:20, *V*:*V*) as the extraction reagent, selected QuEChERS column (primary secondary amine 50 mg, $MgSO_4$ 150 mg) for cleaning Treatment. The ACQUITY UPLC BEH C_{18} column was used as the chromatographic column and acetonitrile-2 mmoL/L ammonium acetate was used as the mobile phase, the elution mode was gradient elution. Matrix effects of the method could not be ignored, the isotope internal standard method should be used for quantitative analysis. The limits of detection of BEA, ENN A, ENN A_1, ENN B and ENN B_1 were 0.03 μg/kg and the limits of quantatition were 0.1 μg/kg, the recovery rates were between 89.5% and 125.0%, the relative standard deviations were 1.6% to 8.4%, the correlation coefficients were all than or equal to 0.9990. **Conclusion** This method is simple, rapid, with the high accurates and ensitivity, which can be used for simultaneous determination of the content of BEA, ENN A, ENN A_1, ENN B and ENN B_1 in *Castanea mollissima* Blume.

KEY WORDS: beauvericin; enniatin; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Castanea mollissima* Blume

0　引　言

随着检测技术的发展, 一些之前未被发现的真菌毒素逐渐被检出和确认, 这些真菌毒素目前既未被常规检测, 也未受监管, 但检出率迅速增加, 这类毒素被称为新兴真菌毒素[1]。白僵菌素(beauvericin, BEA)和恩镰孢菌素(enniatins, ENNs)就是属于新兴的真菌毒素, 它们是由镰刀菌属的部分菌种产生的镰刀菌毒素[2]。BEA 和 ENNs 是六酯肽类化合物, 它们的主体结构相同, 区别在于 3 个自由基的组成不同。BEA 是 3 个苯甲基基团, ENNs 目前最常见的类型是恩镰孢菌素 A (enniatin A, ENN A)、恩镰孢菌素 A_1 (enniatin A_1, ENN A_1)、恩镰孢菌素 B (enniatin B, ENN B)和恩镰孢菌素 B_1 (enniatin B_1, ENN B_1), ENN A 有 3 个异亮氨酸基团, ENN B 有 3 个缬氨酸基团, 而 ENN A_1 有一个缬氨酸和两个异亮氨酸自由基, ENN B_1 是两个缬氨酸基团和一个异亮氨酸基团[3–4]。

据报道 BEA 和 ENNs 对人体和动物都具有细胞毒性, 会损害细胞活力, 阻断细胞周期, 诱导细胞凋亡[1,5–6]。BEA 和 ENN 对动物的生殖系统也具有一定的毒性, BEA 和 ENN B_1 会损害胚胎发育。BEA 和 ENN B 还会抑制睾酮、雌二醇和孕酮的合成[7–10]。

板栗营养价值高又美味价廉, 深受消费者的喜爱。北京市怀柔区地理位置和气候适宜板栗的种植, 因此怀柔板栗被授予了“中国板栗之乡”的称号[11–12]。板栗在贮藏、加工等过程中极易污染真并产生多种真菌毒素, 影响板栗品质[13–15]。目前多项研究报道了板栗中 BEA 和 ENNs 5 种真菌毒素的污染状况, WANG 等[16]对 33 件板栗样本进行了检测, 检出了 ENN B_1 和 BEA。ZHOU 等[17]在干板栗和板栗粉中检出了 BEA、ENN A、ENN A_1、ENN B 和 ENN B_1, 其检出率分别为 87%、52%、65%、72%、65%。

BEA 和 ENNs 的检测主要采用高效液相色谱法[18]和液相色谱-质谱法[19–20]进行分析测定。采用二极管阵列检测器-液相色谱法分析时方法的灵敏度不高, KRSKA 等[21]用液相色谱法单独检测 BEA 时能达到 μg/kg 级, 但 OUESLATI 等[22]对 BEA 和 ENNs 5 种真菌毒素进行同时分析时只能检出 mg/kg 级别的含量。因此现在对该 5 种新兴真菌毒素的检测主要使用液相色谱-质谱法, 该方法灵敏度高, 特异性强, 是分析的最佳方法。离子源目前应用最为普遍的是电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI), 有部分文献采用大气压化学离子源(atmospheric pressure chemical ionization, APCI), 但应用并不广泛[23]。前处理方法主要有固相萃取法[24]和 QuEChERS 法[25]。固相萃取法需要专用的固相萃取装置, 且净化后还需要氮吹进行浓缩, 当检测样品量大时操作步骤烦琐, 影响实验效率。而 QuEChERS 法, 前处理步骤简单, 净化效果也能满足实验要求, 是真菌毒素检测的理想前处理方法。

BEA 和 ENNs 均属于新兴真菌毒素, 目前国内外关于 BEA 和 ENNs 同时测定的国际标准和国家标准还鲜有发

布。尽管近些年关于 BEA 和 ENNs 检测方法的研究报道越来越多，但主要以玉米、小麦、燕麦等谷物及其制品为主，关于板栗中两类毒素检测方法的研究还鲜有报道。因此，本研究采用 QuEChERS 法对板栗样本进行前处理，利用超高效液相色谱-串联质谱法同时测定板栗中 BEA、ENN A、ENN A_1、ENN B 和 ENN B_1 等 5 种真菌毒素，可用于板栗中该 5 种真菌毒素含量的同时测定，对板栗中 BEA 和 ENNs 含量监测、风险评估和相关标准制定等都具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

材料：本研究所用板栗样本来源于北京市怀柔区渤海镇。

标准品: BEA (CAS 号: 26048-05-5, 质量浓度 100.0 μg/mL, 北京誉晶生物科技有限公司); ENN A (CAS 号: 2503-13-1, 质量浓度 10.05 μg/mL)、ENN A_1 (CAS 号: 4530-21-6, 质量浓度 10.01 μg/mL)、ENN B (CAS 号: 917-13-5, 质量浓度 10.11 μg/mL)、ENN B_1 (CAS 号: 19914-20-6, 质量浓度 10.08 μg/mL); $^{13}C_{45}$-BEA (CAS 号: 26048-05-5, 质量浓度 25.05 μg/mL); $^{13}C_{36}$-ENN A (CAS 号: 2503-13-1, 质量浓度 2.03 μg/mL)、$^{13}C_{35}$-ENN A_1 (CAS 号: 4530-21-6, 质量浓度 2.00 μg/mL)、$^{13}C_{33}$-ENN B (CAS 号: 917-13-5, 质量浓度 2.05 μg/mL)、$^{13}C_{34}$-ENN B_1 (CAS 号: 19914-20-6, 质量浓度 2.04 μg/mL)(中国 Pribolab 公司); 乙腈(色谱纯)、提取盐包($MgSO_4$ 6 g, CH_3COONa 1.5 g)、QuEChERS 净化管[乙二胺-N-丙基 primary secondary amine PSA, 50 mg, $MgSO_4$ 150 mg, 2 mL](北京纳鸥科技有限公司); 乙酸铵(色谱纯，上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.2 仪器与设备

LCMS-8050 超高效液相色谱-三重四级杆串联质谱仪(日本岛津公司); BSA623S-CW 电子天平(精度 0.001 g, 德国 Sartorius 公司); VORTEX-5 调速振荡器(海门其林贝尔仪器制造有限公司); Centrifuge 5810R 高速低温离心机(德国 Sigma 公司); ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS PFP (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)(美国 Waters 公司)。

1.3 方 法

1.3.1 标准溶液的配制

混合标准使用液(1000 μg/L): 分别准确吸取一定量的标准溶液，用乙腈定容至 10 mL，涡旋混匀。–20 ℃保存。

混合同位素内标使用液(100 μg/L): 分别准确吸取一定量的标准溶液，用乙腈定容至 10 mL，涡旋混匀。–20 ℃保存。

标准系列工作液：分别移取混合标准使用液适量于不同的 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，涡旋混匀，浓度分别为 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10.0 μg/L，分别准确吸取 500 μL 标准曲线浓度点于液相进样瓶内，加入 40 μL 内标使用液，涡旋混匀，配成标准曲线系列溶液。以目标物与对应内标的浓度比为横坐标，以目标物峰面积与对应内标峰面积的比为纵坐标，绘制标准曲线。

1.3.2 样品制备

板栗样品先用去皮机脱掉外壳，然后用高速粉碎机将其粉碎，混合均匀，储存于样品袋中，密封保存。

1.3.3 提取及净化

称取 5 g(精确到 0.001 g)试样，置于 50 mL 离心管中，先加入 5 mL 水涡旋混匀，再加入 20 mL 乙腈，涡旋混匀后，置于振荡器上振荡提取 20 min，提取结束后加入提取盐包，充分混匀，4 ℃冷冻离心机 10000 r/min 离心 5 min。吸取 2.0 mL 上清液于 QuEChERS 净化管中，涡旋混匀 1 min，4 ℃冷冻离心机 5000 r/min 离心 5 min，吸取上清液过 0.22 μm 微孔滤膜。吸取 500 μL 处理好的试样于液相进样瓶内，加入 40 μL 内标使用液，涡旋混匀，上机测定。

1.3.4 仪器条件

(1)液相色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C_{18} (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相: A: 乙腈; B: 2 mmoL/L 乙酸铵水溶液; 流速: 0.4 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 ℃; 梯度洗脱程序: 0.0~1.0 min, 45% B; 1.0~8.0 min, 20% B; 8.0~8.5 min, 20% B; 8.5~9.5 min, 45% B; 9.5~18.0 min, 45% B。

(2)质谱条件

离子化模式：电喷雾离子源正离子模式(positive electrosprayionization, ESI^+); 质谱扫描方式：多反应监测; 接口温度: 300 ℃; 脱溶剂管温度: 200 ℃; 加热模块温度: 500 ℃; 干燥气流速: 10.00 L/min; 加热气流速: 10.00 L/min; 雾化气流速: 3.00 L/min。5 种目标真菌毒素的前体离子、产物离子、Q1 电压、Q3 电压和碰撞电压等质谱仪器条件，具体见表 1。

1.4 数据处理

采用 LabSolution 5.75 软件和 WPS Office 2010 软件进行数据处理。基质效应的计算按照 FRENICH 等[26]的方法计算，在±20%之间为可接受范围。取样量按 5 g 计算检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)，以 3 倍信噪比(*S*/*N*)下的浓度为 LOD，10 倍信噪比(*S*/*N*)下的浓度为 LOQ。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择

本研究对 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 和 ACQUITY UPLC HSS PFP 色谱柱进行比较。2 种色谱柱均为通用型色谱柱，但键合和性能均不相同。通过实验分析，ACQUITY

UPLC HSS PFP 色谱柱对 BEA 和 ENN A_1 的分离不够理想(图 1), 而 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱经过对色谱条件优化后对 BEA、ENN A、ENN A_1、ENN B 和 ENN B_1 等 5 种真菌毒素均能达到基线分离(图 2), 故本方法采用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱对目标物进行分析。

2.2　流动相的优化

分别采用 95%、80%和 45%的 2 mmol/L 乙酸铵水溶液浓度为起始浓度进行分析, 当采用 95%和 80% 2 mmol/L 乙酸铵水溶液浓度为起始浓度时, 出峰时间非常集中, 无法达到基线分离, 且色谱峰尾部均有拖尾(图 2)。当采用 45%的起始浓度时, 经过梯度优化, 5 种目标真菌毒素均能达到基线分离, 因此选择 45%的 2 mmol/L 乙酸铵溶液浓度作为色谱分析的起始浓度。液相分析到 9.5 min 时, 梯度会恢复到起始浓度, 当设定平衡时间到 12 min 时, 通过未检出的样品色谱图发现, 色谱柱还未达到完全平衡, 因此本研究平衡时间延长至 18 min(谱图见图 2, 保留时间见表 1)。

表 1　BEA 和 ENNs 质谱仪器条件及保留时间

Table 1　Parameters of mass spectrometers and retention time of BEA and ENNs

毒素名称	保留时间/min	前体离子(*m*/*z*)	产物离子(*m*/*z*)	Q1 电压/V	碰撞电压/eV	Q3 电压/V
BEA	7.850	801.30	784.40	–24.0	–19.0	–38.0
		801.30	244.20	–22.0	–34.0	–25.0
ENN A	8.924	699.30	682.40	–26.0	–19.0	–32.0
		699.30	210.20	–20.0	–34.0	–21.0
ENN A_1	8.205	685.30	668.40	–20.0	–19.0	–32.0
		685.30	210.20	–26.0	–33.0	–22.0
ENN B	6.664	657.30	640.40	–26.0	–18.0	–30.0
		657.30	196.20	–24.0	–32.0	–20.0
ENN B_1	7.452	671.30	654.40	–20.0	–20.0	–32.0
		671.30	196.20	–26.0	–32.0	–20.0
^{13}C-BEA	7.850	846.40	829.50	–20.0	–19.0	–30.0
^{13}C-ENN A	8.924	735.50	718.50	–28.0	–19.0	–34.0
^{13}C-ENN A_1	8.205	720.40	703.50	–20.0	–19.0	–34.0
^{13}C-ENN B	6.664	690.40	673.50	–20.0	–20.0	–32.0
^{13}C-ENN B_1	7.452	705.40	688.50	–20.0	–19.0	–32.0

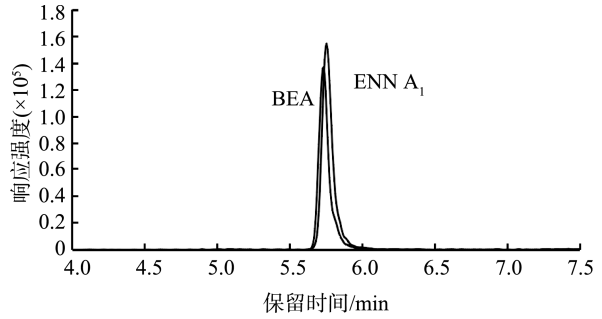


图 1　ACQUITY UPLC HSS PFP 色谱柱分析 BEA 和 ENNs 的色谱图

Fig.1　Chromatograms of BEA and ENNs analyzed by ACQUITY UPLC HSS PFP chromatographic column

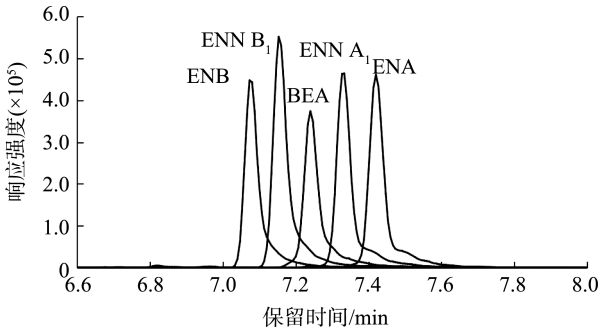


图 2　95%乙酸铵水溶液起始浓度分析 BEA 和 ENNs 色谱图

Fig.2　Chromatogram of BEA and ENNs analyzed by 95% ammonium acetate aqueous solution at the initial concentration

2.3　质谱条件优化

目标物的前体离子在 ESI$^+$模式下, 主要以$[M+H]^+$、$[M+Na]^+$、$[M+K]^+$和$[M+NH_4]^+$形态出现, 以乙酸铵为流动相时, $[M+Na]^+$、$[M+K]^+$未产生响应, 除 BEA 的$[M+H]^+$和$[M+NH_4]^+$峰的响应强度均很强以外, 4 种 ENNs 的$[M+H]^+$峰响应强度均严重低于$[M+NH_4]^+$峰的强度, TOLOSA 等[27]选择了$[M+H]^+$离子进行分析, 但研究仅对$[M+H]^+$、$[M+Na]^+$和$[M+K]^+$进行了比较, 并未考察$[M+NH_4]^+$。通过本研究结果表明, $[M+NH_4]^+$响应强度整体要好于$[M+H]^+$, 所以采用$[M+NH_4]^+$作为 5 种目标物的前体离子则更为理想。5 种目标物的产物离子均主要有 3 个。通过研究发现, 较低碰撞电压下产生的 1 个产物离子的响应强度要高于在较高碰撞电压下产生的 2 个产物离子的响应强度, 因此本研究分别在较低和较高的碰撞电压下各选择一个产物离子, 并采用较低电压下产生的离子为定量离子, 这与邓涛等[28]的研究结果一致。最终的 BEA 和 ENNs 色谱图如图 3。

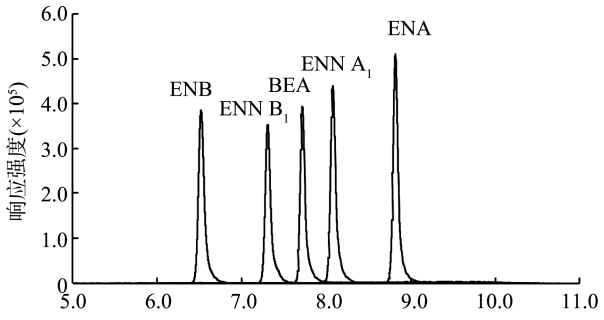


图 3 BEA 和 ENNs 色谱图

Fig.3 Chromatogram of BEA and ENNs

2.4 提取试剂的选择

由于 5 种目标毒素均为中性化合物, 因此本试验在提取试剂中未添加甲酸, 主要采用乙腈和水。本研究对乙腈、乙腈-水(80:20, *V*:*V*)和乙腈-水(50:50, *V*:*V*) 3 各不同的提取试剂进行比较分析, 结果表明, 当使用乙腈进行提取时, 板栗样品没有完全分散, 有一定的凝集, 影响了提取效率。当使用乙腈-水(50:50, *V*:*V*)提取, 5 种目标毒素的回收率在 110.0%~119.6%之间, 整体回收率偏大。因此本研究采用乙腈-水(80:20, *V*:*V*)作为提取试剂。

2.5 QuEChERS 净化管的选择

板栗中含有一定量的脂肪, C_{18} 和无机硅锆 HMR 均能对脂肪有很好的净化作用, 因此本研究对净化管 1 (PSA 50 mg, $MgSO_4$ 150 mg)、净化管 2 (PSA 50 mg, $MgSO_4$ 150 mg, C_{18} 50 mg)、净化管 3 (HMR 50 mg)和净化管 4 (PSA 50 mg, HMR 50 mg) 4 种不同的 QuEChERS 净化管用回收率进行表征进行了净化能力的分析, 具体见图 4。通过实验发现使用净化管 1 进行净化处理, 5 种目标毒素的回收率能达到 89.5%~101.4%, 而其他 3 种净化管不论是添加了 HMR 还是 C_{18}, 尽管回收率均能达到 80%以上, 但回收率均出现不同程度的下降。C_{18} 填料对回收率的负面影响与 AZAIEZ 等[25]的研究结果一致。HMR 和 C_{18} 可能均对目标化合物有一定的吸附, 从而影响回收率, 因此本研究采用含有 PSA 50 mg 和 $MgSO_4$ 150 mg 的净化管进行净化操作。

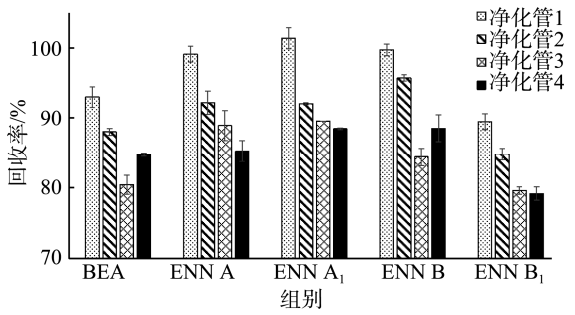


图 4 QuEChERS 净化管净化效果

Fig.4 Purification efficiency of QuEChERS tube

2.6 基质效应分析

板栗样本品种众多, 基质复杂, 可能产生基质效应, 从而影响结果定量。本研究使用燕山早丰和怀九 2 个品种板栗对 BEA 和 ENNs 的基质效应进行分析(图 5)。怀九板栗的基质效应在–0.1%~2.8%之间, 基质效应对分析几乎没有影响。燕山早丰品种板栗的基质效应研究发现, BEA、ENN A 和 ENN B 均产生基质抑制效应, 抑制效应分别为–25.6%、–30.6%和–20.5%, 均大于 20%, 基质抑制效应不可以忽略。ENN A_1 产生的基质抑制效应为–9.2%, ENN B_1 基质效应为–0.8%, ENN A_1 和 ENN B_1 的基质抑制效应可以忽略, 但 5 种毒素同时进行分析, 因此无法采用外标法进行定量。另外板栗产品并未按照品种进行收购、售卖和加工, 因此无法使用空白基质配制的工作曲线进行定量。综上所述, 本研究必须采用同位素内标法进行定量分析。

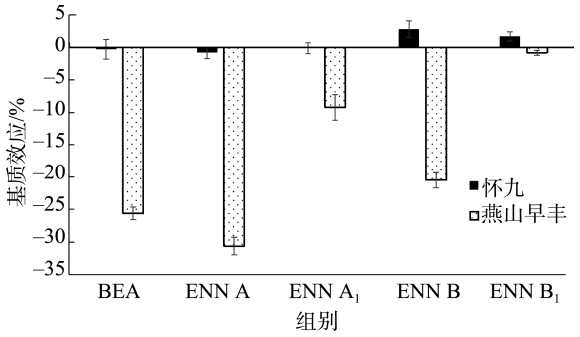


图 5 板栗对 BEA 和 ENNs 的基质效应

Fig.5 Matrix effects of *Castanea mollissima* Blume on BEA and ENNs

2.7 方法线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限

方法的线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限如表 2 所示。5 种目标菌素在 0.1~10.0 μg/L 线性范围内相关系数大于等于 0.997, 检出限为 0.03 μg/kg, 定量限为 0.10 μg/kg。本研究的检出限、定量限与王玉娇等[29]结果比较, 除 ENN B 略低以外, 其余 4 种的检出限、定量限更低。与邢杨等[19]的研究结果基本一致。因此本研究方法的线性关系、检出限与定量限均满足分析检测的要求。

2.8 方法的回收率与精密度

以板栗为基质, 分别测定加标量为低、中、高 3 个浓度(加标浓度为 0.1、1.0、8.0 μg/kg,)的加标回收率。方法的回收率和精密度如表 3 所示, 本研究的平均回收率为 89.5%~125.0%之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.6%~8.4%。方法的精密度和回收率满足 GB/T 27404—2008《实验室质量控制规范 食品理化检验》的规定和欧盟对食品中真菌毒素定量测定的要求。

表 2　方法的线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限(*n*=6)

Table 2　Linear equation, correlation coefficient, linear range, limit of detection and limit of quantitation of this method (*n*=6)

毒素名称	线性方程	相关系数(*r*)	线性范围/(μg/L)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
BEA	*Y*=0.156482*X*–0.001311	0.9999	0.1~10.0	0.03	0.10
ENN A	*Y*=0.192454*X*+0.001051	0.9998	0.1~10.0	0.03	0.10
ENN A_1	*Y*=0.202606*X*–0.004474	0.9997	0.1~10.0	0.03	0.10
ENN B	*Y*=0.189729*X*–0.000806	0.9999	0.1~10.0	0.03	0.10
ENN B_1	*Y*=0.200617*X*–0.003116	0.9999	0.1~10.0	0.03	0.10

表 3　BEA 和 ENNs 的回收率及精密度(*n*=6)

Table 3　Recoveries and precision of BEA and ENNs (*n*=6)

毒素名称	加标量/(μg/kg)	回收率范围/%	平均回收率/%	RSDs/%
BEA	0.1	96.0~119.0	108.2	8.4
	1.0	94.4~109.0	100.8	5.4
	8.0	91.5~104.4	98.0	5.0
ENN A	0.1	85.0~98.0	89.5	6.2
	1.0	91.0~101.9	98.0	4.2
	8.0	95.9~100.8	98.9	1.7
ENN A_1	0.1	113.0~123.0	117.7	3.4
	1.0	94.7~105.8	100.1	4.2
	8.0	93.3~101.4	97.8	3.8
ENN B	0.1	98.0~117.0	107.2	7.0
	1.0	89.7~106.1	97.7	5.7
	8.0	100.9~105.2	103.6	1.6
ENN B_1	0.1	107.0~125.0	117.0	6.1
	1.0	92.3~106.2	100.6	5.4
	8.0	96.5~102.1	99.1	2.0

2.9　样品检测

本研究从怀柔区板栗主产区采集 20 件样品进行检测, 均未检出。9—10 月份为板栗采收的季节, 可能由于刚采摘的原因, 真菌毒素还没有进行产出和积累, 这与之前研究对板栗其他 21 种真菌毒素的检出情况类似[30], 对于 BEA 和 ENNs 在板栗贮藏和加工过程中含量的变化有待于进一步的研究。

3　结　论

本研究加入乙腈-水(80:20, *V*:*V*)对试样进行提取, 使用 QuEChERS 净化柱(PSA 50 mg, $MgSO_4$ 150 mg)进行净化处理, 采用超高效液相色谱-串联质谱法对板栗中 BEA、ENN A、ENN A_1、ENN B 和 ENN B_1 同时进行检测, 同位素内标法定量。本方法操作简便、快速准确, 精密度和回收率等也满足方法学要求, 可用于对板栗中白僵菌素和 4 种恩镰孢菌素的同时检测, 为政府监管、污染状况研究和风险评估等提供技术支持。

参考文献

[1] HASUDA AL, BRACARENSE APFRL. Toxicity of the emerging mycotoxins beauvericin and enniatins: A mini-review [J]. Toxicon, 2024, 239: 107534.

[2] VACLAVIKOVA M, MALACHOVA A, VEPRIKOVA Z, *et al*. 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making [J]. Food Chemistry, 2013, 136(2): 750–757.

[3] FRAEYMAN S, CROUBELS S, DEVREESE M, *et al*. Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: Occurrence, toxicity and toxicokinetics [J]. Toxins, 2017, 9(7): 228.

[4] JESTOI M. Emerging *fusarium*-mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins, and moniliformin: A review [J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2008, 48(1): 21–49.

[5] PROSPERINI A, JUAN-GARCÍA A, FONT G, *et al*. Beauvericin-induced cytotoxicity via ROS production and mitochondrial damage in Caco-2 cells [J]. Toxicology Letters, 2013, 222(2): 204–211.

[6] PROSPERINI A, JUAN-GARCÍA A, FONT G, *et al*. Reactive oxygen species involvement in apoptosis and mitochondrial damage in Caco-2 cells induced by enniatins A, A_1, B and B_1 [J]. Toxicology Letters, 2013, 222(1): 36–44.

[7] SCHOEVERS EJ, SANTOS RR, FINK-GREMMEL SJ, *et al*. Toxicity of beauvericin on porcine oocyte maturation and preimplantation embryo development [J]. Reproductive Toxicology, 2016, 65: 159–169.

[8] HUANG CH, WANG FT, CHAN WH. Enniatin B_1 exerts embryotoxic effects on mouse blastocysts and induces oxidative stress and immunotoxicity during embryo development [J]. Environmental Toxicology, 2019, 34(1/2): 48–59.

[9] ALBONICO M, SCHUTZ LF, CALONI F, *et al*. *In vitro* effects of the *Fusarium* mycotoxins fumonisin B_1 and beauvericin on bovine granulosa cell proliferation and steroid production [J]. Toxicon, 2017, 128: 38–45.

[10] KALAYOU S, NDOSSI D, FRIZZELL C, *et al*. An investigation of the endocrine disrupting potential of enniatin B using *in vitro* bioassays [J]. Toxicology Letters, 2015, 233(2): 84–94.

[11] 乔艳杰, 刘巍, 吴瑞刚, 等. 北京市板栗产业发展问题及对策研究[J]. 中国果树, 2024(6): 125–129.
QIAO YJ, LIU W, WU RG, *et al*. Research on the development issues and countermeasures of chestnut industry in Beijing [J]. China Fruits, 2024(6): 125–129.

[12] 溢彩. 板栗之冠——怀柔板栗[J]. 中国果菜, 2016, 35(1): 29.
YI C. The crown of chestnuts-Huairou chestnuts [J]. China Fruit & Vegetable, 2016, 35(1): 29.

[13] OVERY DP, SEIFERT KA, SAVARD ME, *et al*. Spoilage fungi and their mycotoxins in commercially marketed chestnuts [J]. International Journal

of Food Microbiology, 2003, 88(1): 69–77.

[14] 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 Microbiology, 2018, 76: 396–404.

[15] BERTUZZI T, RASTELLI S, PIETRI A. *Aspergillus* and *Penicillium* toxins in chestnuts and derived products produced in Italy [J]. Food Control, 2015, 50: 876–880.

[16] WANG YJ, NIE JY, ZHEN Y, *et al*. Occurrence and co-occurrence of mycotoxins in nuts and dried fruits from China [J]. Food Control, 2018(88): 181–189.

[17] ZHOU J, ZHANG DD, CHEN XH, *et al*. Investigation on the occurrence and contamination of multi- mycotoxin in chestnut and jujube (red date) [J]. Journal of Chromatography A, 2021(165): 462486.

[18] MONTI SM, FOGLIANO V, LOGRIECO A, *et al*. Simultaneous determination of beauvericin, enniatins, and fusaproliferin by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3317–3320.

[19] 邢杨, 牛宇敏, 靳玉慎, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定燕麦粉和小米粉中白僵菌素和恩镰孢菌素[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(4): 234–241.
XING Y, NIU YM, JIN YS, *et al*. Determination of beauvericin and enniatins in oat flours and millet flours by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(4): 234–241.

[20] 赵迪, 尹丹阳, 胡佳薇, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定大米粉和小麦粉中白僵菌素和恩镰孢菌素[J]. 卫生研究, 2023, 52(5): 756–761.
ZHAO D, YIN DY, HU JW, *et al*. Determination of beauvercin and enniatins in rice flour and wheat flour by solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Hygiene Research, 2023, 52(5): 756–761.

[21] KRSKA R, SCHUHMACHER R, GRASSERBAUER M, *et al*. Determination of the *Fusarium* mycotoxin beauvericin at μg/kg levels in corn by high-performance liquid chromatography with diode-array detection [J]. Journal of Chromatography A, 1996, 746(2): 233.

[22] OUESLATI S, MECA G, MLIKI A, *et al*. Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia [J]. Food Control, 2011, 22(8): 1373–1377.

[23] UHLIG S, IVANOVA L. Determination of beauvericin and four other enniatins in grain by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1050(2): 173–178.

[24] 韩小敏, 徐文静, 赵熙, 等. 玉米及其制品和小麦及其制品中白僵菌素和恩镰孢菌素的高效液相色谱-串联质谱检测方法的建立[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(6): 633–640.
HAN XM, XU WJ, ZHAO X, *et al*. Development of high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry method for determination of beauvericin and enniatins in corn and wheat and their products [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2017, 29(6): 633–640.

[25] AZAIEZ I, GIUSTI F, SAGRATINI G, *et al*. Multi-mycotoxins analysis in dried fruit by LC/MS/MS and a modified QuEChERS procedure [J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(4): 935–945.

[26] FRENICH AG, GONZÁLEZ RR, GÓMEZ-PÉREZ ML, *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]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(28): 4349–4356.

[27] TOLOSA J, FONT G, MANES J, *et al*. Nuts and dried fruits: Natural occurrence of emerging *Fusarium* mycotoxins [J]. Food Control, 2013, 33(1): 215–220.

[28] 邓涛, 吉小凤, 肖英平, 等. 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[J]. 宁波大学学报(理工版), 2023, 36(6): 50–56.
DENG T, JI XF, XIAO YP, *et al*. Determination of enniatins and beauvericin in fruit juice by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Ningbo University (NSEE), 2023, 36(6): 50–56.

[29] 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 Chinese [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2017, 45(10): 1556–1563.

[30] 王权帅, 孙卫明. 北京市怀柔区板栗冷库贮藏过程中真菌毒素污染状况研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 35–43.
WANG QS, SUN WM. Study on the contamination of mycotoxins during cold storage of *Castanea mollissima* in Beijing Huairou District [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 35–43.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)