

倪杨, 杨军军, 石磊, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 9 种真菌毒素 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(21): 302–309.  
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010031

NI Yang, YANG Junjun, SHI Lei, et al. Simultaneous Determination of 9 Mycotoxins in Fruits by Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(21): 302–309. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010031

· 分析检测 ·

# 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定水果中 9 种真菌毒素

倪 杨<sup>1,2,3</sup>, 杨军军<sup>1,2,3</sup>, 石 磊<sup>1,2,3</sup>, 张莹莹<sup>1,2,3</sup>, 熊 融<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093;

2. 北京市落叶果树工程技术研究中心, 北京 100093;

3. 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:** 利用超高效液相色谱-串联质谱法建立水果中 9 种真菌毒素同时检测的方法。实验对提取溶剂、净化方式及色谱质谱条件进行优化。样品经 10 mmol/L 柠檬酸-乙腈溶液提取, 再加入氯化钠盐析, 离心后上清液采用 C<sub>18</sub> 吸附剂进行净化处理, 以 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱分离, 采用电喷雾正离子电离, 多反应监测模式测定, 以空白基质匹配标准溶液外标法定量。结果表明, 9 种真菌毒素在 5 min 内完成色谱分离分析, 在各自浓度范围内呈良好线性关系 ( $R^2 > 0.999$ ), 方法的检出限 (S/N=3) 为 0.004~1.676 μg/kg, 定量限 (S/N=10) 为 0.014~5.587 μg/kg。以桃、樱桃为基质, 在低、中、高 3 个添加浓度水平下, 9 种真菌毒素的加标回收率在 84.5%~113.2% 之间, 相对标准偏差为 0.7%~4.0% (n=6)。将该方法用于分析实际水果样品(草莓、樱桃、葡萄、苹果、梨)中 9 种真菌毒素的污染状况, 结果发现小粒、易腐的樱桃和葡萄中共检出自僵菌素、展青霉素、链格孢菌毒素共计 7 种毒素, 含量在 ND(未检出)~12.47 μg/kg 之间。所建方法稳定、准确、灵敏、快速, 能够满足水果样品中多组分真菌毒素残留分析的需求。

关键词: QuEChERS, 超高效液相色谱-串联质谱, 水果, 真菌毒素

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)21-0302-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010031

本文网刊:



## Simultaneous Determination of 9 Mycotoxins in Fruits by Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

NI Yang<sup>1,2,3</sup>, YANG Junjun<sup>1,2,3</sup>, SHI Lei<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yingying<sup>1,2,3</sup>, XIONG Rong<sup>1,2,3,\*</sup>

(1. Institute of Forestry and Pomology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100093, China;

2. Beijing Engineering Research Center for Deciduous Fruit Trees, Beijing 100093, China;

3. Inspection and Testing Laboratory of Fruits and Nursery Stocks (Beijing) Ministry of Agriculture  
and Rural Affairs, Beijing 100093, China)

**Abstract:** An ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed for the simultaneous determination of 9 mycotoxins in fruit. Sample extraction, purification conditions and instrument conditions were optimized. The samples were ultrasonic extracted with 10 mmol/L citric acid acetonitrile solution and salted out by adding NaCl. After centrifugation, the supernatant was cleaned up by C<sub>18</sub> sorbent and separated on an ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column. The analytes were detected in the multiple reaction monitoring mode after being ionized by an electrospray positive ion. Quantitative analysis was performed by the external standard method using matrix-matched calibration curves. The results showed that all the 9 mycotoxins were well separated in 5 min. The coefficients of

收稿日期: 2022-01-07

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)。

作者简介: 倪杨 (1985-), 女, 博士, 高级农艺师, 研究方向: 农产品质量与安全, E-mail: niyang6@163.com。

\* 通信作者: 熊融 (1977-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 植物资源利用与评价, E-mail: rong\_xiong@hotmail.com。

determination ( $R^2$ ) were greater than 0.999, suggesting good linearity of the method in the mass concentration range. The method limits of detection (3S/N) and limits of quantification (10S/N) were 0.004~1.676  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 0.014~5.587  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The recovery experiments were performed with peach and cherry samples at three spiked levels (low, medium and high) were 84.5%~113.2% with the relative standard deviations were 0.7%~4.0% (n=6). This method was used to analyze the contamination status of 9 mycotoxins in fruit samples (strawberry, cherry, grape, apple and pear). The results showed that beauvericin, patulin and *Altenuene* toxins were found in cherry and grape samples, and their contents were ranged from ND (not detected) ~12.47  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The method is proved to be stable, accurate, sensitive and rapid, and can meet the requirements for the analysis of 9 mycotoxins residues in a variety of fruit samples.

**Key words:** QuEChERS; ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; fruit; mycotoxins

水果是我国居民餐桌上的重要组成部分, 其在整个生长周期以及采后加工、贮运销售过程中, 尤其在反季节销售模式下的贮藏期间, 易受真菌侵染而产生并积累具有毒性的次级代谢产物<sup>[1]</sup>。目前, 主要污染水果的真菌毒素有链格孢菌毒素(*Alternaria* toxins, ATs)、展青霉素(Patuline, PAT)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxine A, OTA)、橘青霉素(Citrinine, CIT)等<sup>[2-8]</sup>, 大多具有细胞毒性、胚胎毒性、致畸性、致癌性等多种毒性, 可在人体内富集, 给人类健康造成极大危害。此外, 一直以来, 人们在鲜食果品中存在一定的误区, 认为去除水果腐烂变质部位即可保证食用的安全性, 但研究证明, 周围看似健康的部位同样会受真菌侵染并产生毒素<sup>[9]</sup>, 如链格孢菌可使水果内部变质而外观无明显变化, 且不能通过冲洗等方式去除毒素<sup>[3]</sup>; OTA 化学结构稳定, 即使在高温高压条件下也难以完全分解<sup>[10]</sup>; PAT 是青霉属、曲霉属等 60 余种真菌的次级代谢产物, 这些真菌广泛污染果蔬、粮油及发酵食品, 且在冷藏条件下、加工过程中稳定存在<sup>[11-12]</sup>, 致使毒素污染的范围难以控制, 危害难以防控。

鉴于真菌毒素的危害, 很多国家和机构都制定了相应的限量标准和分析检测方法, 我国在 GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中明确规定, PAT 在以苹果、山楂为原料的制品和饮料类食品中限量值为 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>。GB 5009.185-2016《食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定》分别以液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)检测苹果、山楂及其制品中的 PAT 含量, 使用 LC-MS/MS 法, 不同试样采用不同前处理方法的检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantification, LOQ)分别为 1.5~6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5~20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 使用 HPLC 法液体试样的 LOD 为 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、LOQ 为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 固体、半流体试样的 LOD 为 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、LOQ 为 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[14]</sup>。此外, SN/T 4259-2015《出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的测定》使用 LC-MS/MS 同时检测 4 种 ATs, 适用于苹果、梨、葡萄、猕猴桃、柑桔等样品, 方法的测定低限均为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[15]</sup>。

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<sup>[16-19]</sup>。而在精准定量检测方面, 超高效液相色谱法(ultra-performance liquid chromatography, UPLC)、HPLC 等作为主流色谱技术的代表, 尤其与质谱联用, 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。然而, 上述方法前处理操作繁琐, 难以满足大批量样品的快速检测, QuEChERS 作为一项新兴的高效提取净化方法, 因其操作简单、适用性广、提取净化效率高等优点, 近年来也应用于水果中真菌毒素的检测。曾有研究使用 QuEChERS 方法结合 UPLC-MS/MS 或 HPLC-MS/MS 分别对红枣<sup>[5]</sup>、苹果<sup>[20]</sup>、葡萄<sup>[21]</sup>、柑橘<sup>[22]</sup>、芒果<sup>[23]</sup>中的 ATs 进行检测, 其中, 苹果中 5 种 ATs 的 LOQs 为 0.02~1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 其余水果中多种 ATs 的 LODs 为 0.11~12.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。张晓男等<sup>[4]</sup>对 QuEChERS 进行改进, 采用新型除水剂 4A 型分子筛, 建立了 UPLC-MS/MS 同时检测苹果及其制品中 ATs、PAT、OTA 共 7 种毒素的定量分析方法, 各毒素 LODs 和 LOQs 分别为 0.02~1.80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1~5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

前期主要针对单一水果中多种 ATs 开展检测方法的研究, 由于水果在生长发育、采收加工、贮运销售过程中, 受多种毒素复合污染的潜在风险较大。因此, 本研究综合利用 QuEChERS 方法和 UPLC-MS/MS 技术的优势, 对提取溶剂、净化方式及色谱质谱条件进行优化, 建立适用于多种水果中多种真菌毒素的检测分析方法, 快速富集和净化水果中 9 种真菌毒素, 在保证较高回收率的情况下, 简化前处理步骤, 相比已有方法具有检出限低、分析时间短、适用范围广等优势, 实现水果中多种真菌毒素的快速定性定量检测, 以期为监测、评估水果中多组分真菌毒素的污染风险和确证检测提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

9 种真菌毒素标准溶液及其浓度见表 1 北京曼哈格生物科技有限公司; 甲酸、乙腈 色谱纯, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 乙酸、柠檬酸、乙酸铵 分析纯, 上海麦克林生化科技有限公司; 无水硫酸镁、氯化钠 分析纯, 现代东方(北京)科技发展有限公司; 超纯水 电阻率大于 18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ , Milli-Q 超纯水机制备; 微孔过滤膜 尼龙 13 mm×0.22  $\mu\text{m}$ ,

迪马科技有限公司; ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)、ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)

美国 Waters 公司; 十八烷基硅烷键合硅胶(C<sub>18</sub>, 60 μm)、乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶(primary secondary amine, PSA, 60 μm) 日本岛津公司; 桃、樱桃、苹果、梨、草莓、葡萄等样品 北京市各大超市。

ACQUITY UPLC I-Class 液相色谱仪、Xevo TQ-S 质谱仪(配有电喷雾离子(electrospray ionization, ESI)源及 Masslynx4.1 数据处理系统) 美国 Waters 公司; GL-20G-II 型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; FE20 型实验室 pH 计 瑞士 Mettler Toledo 公司; 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, 瑞士 Mettler Toledo 公司; Milli-Q 超纯水仪 美国 Millipore 公司; ZD-85 型气浴恒温振荡器 常州国华电器有限公司; QL-8BB 型旋涡混合器 海门市其林贝尔仪器制造有限公司; L18-Y915S 型食品粉碎机 九阳股份有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制 混合标准溶液: 分别移取一定体积的 9 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, 得到混合标准工作溶液, 其中 PAT 质量浓度为 500 μg/L, 其余 8 种真菌毒素质量浓度均为 100 μg/L。

空白基质溶液: 另取经检测不含 9 种真菌毒素的样品, 按照 1.2.2 节进行样品前处理, 制备空白基质溶液待用。

基质混合标准溶液: 分别移取一定体积的 9 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溶液。其中, PAT 的标准工作曲线浓度为 5、10、50、100、250、500 μg/L, 其余 8 种真菌毒素的标准工作曲线浓度均为 1、5、10、20、50、100 μg/L。

10 mmol/L 柠檬酸-乙腈溶液: 称取 1.92 g(精确到 0.1 mg)柠檬酸于 1 L 容量瓶, 加入乙腈溶解并定容。

1.2.2 样品前处理 参考文献 [4, 24] 中的前处理条件进行优化, 具体如下: 称取 10 g(精确到 0.01 g)匀浆试样置于 50 mL 离心管中, 加入 15 mL 10 mmol/L 柠檬酸-乙腈溶液置于气浴恒温振荡器中振荡 10 min, 再加入烘干后的 3.0 g 氯化钠, 涡旋振荡 1 min, 5000 r/min 离心 5 min。吸取 6 mL 有机相置于内含 300 mg 无水硫酸镁、200 mg C<sub>18</sub> 的 10 mL 离心管中, 涡旋振荡 0.5 min, 常温静置 5 min 后, 过 0.22 μm 有机滤膜于样品瓶中, 待测分析。

加标阴性样品前处理: 选取经检测不含 9 种真菌毒素的样品, 在 50 mL 离心管中称取 10 g(精确到 0.01 g)匀浆试样, 分别加入低、中、高 3 个浓度水

平的混合标准溶液(具体添加量详见表 4), 按照上述方法进行样品前处理。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(2.1×100 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-水溶液; 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。

1.2.4 质谱条件 离子源: ESI; 扫描方式: 正、负离子同时扫描; 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: 高纯氩气; 检测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。

1.2.5 定性定量方法 结合质谱扫描所得质量数, 采用两个碎片子离子进行定性和定量, 以响应较强、稳定较好的子离子的质荷比(m/z)作为定量离子, 响应次强、干扰少的子离子作为定性离子。

## 1.3 数据处理

通过 Waters Masslynx 仪器配置工作站系统进行数据采集及定性、定量分析, 利用 Excel 软件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

混合标准溶液直接进样, 根据化合物的性质, 先对 9 种目标物进行 Q1 MS Scan 母离子全扫, 确定一级质谱碎片离子母离子质荷比(m/z)并优化锥孔电压, 得到目标物的母离子和质谱参数。发现 PAT 在负离子模式下响应值高, 分子离子峰为 [M-H]<sup>-</sup>; 而其它 8 种化合物在正离子模式下响应值高, 其中 BEA 分子离子峰为 [M+NH<sub>3</sub>]<sup>+</sup>, ALT、TeA、AOH、AME、TEN、OTA 和 CIT 均为 [M+H]<sup>+</sup>。其次在 Q2 MS/MS daughter Scan 子离子扫描模式下进行二级质谱扫描, 每个化合物选择两对特征离子对, 以响应较强、稳定较好的碎片离子的质荷比作为定量离子, 响应次强、干扰少的子离子作为定性离子, 优化碰撞能量, 确定质谱参数, 9 种真菌毒素 MRM 质谱参数见表 1。

### 2.2 色谱条件的优化

本研究比较了 CQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱、ACQUITY UPLC HSS T3 柱和 ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱对目标物的分离效果。结果发现, 使用 HSS T3 柱时, ALT 和 TeA 峰形较差, 响应值较低; 使用 BEH HILIC 柱时, ALT、PAT、TeA 三种化合物均不出峰; 而 BEH C<sub>18</sub> 柱能够在 5 min 内较好地分离 9 种化合物, 且峰型更加对称, 故选定 BEH C<sub>18</sub> 柱作为分析色谱柱。

以纯水、甲酸、乙酸铵 3 种水相和甲醇、乙腈两种有机相的 6 组配比作为流动相, 分别测定 9 种真菌毒素的色谱峰分离及峰形情况, 比较不同流动相体系对真菌毒素的分离效果。实验结果表明, 以纯水、

表 1 9 种真菌毒素检测质谱参数  
Table 1 Mass spectrometric parameters for 9 mycotoxins

真菌毒素	缩写	标液浓度(μg/mL)	保留时间(min)	m/z		锥孔电压(V)	碰撞能量(eV)
				母离子	子离子		
展青霉素(Patuline)	PAT	100	2.30	153.0	81.0 <sup>*</sup> /108.9	-15	-11;-7
白僵菌素(Beauvericin)	BEA	100	4.89	801.4	244.2 <sup>*</sup> /262.2	30	35;20
交链孢烯(Altenuene)	ALT	10	3.09	293.1	239.1 <sup>*</sup> /257.0	30	20;15
细交链孢菌酮酸(Tenuazonic Acid)	TeA	100	3.46	198.2	125.0 <sup>*</sup> /139.0	30	18;20
交链孢酚(Alternariol)	AOH	99.9	2.89	259.0	185.0 <sup>*</sup> /213.0	30	28;25
交链孢酚单甲醚(Alternariol Monomethyl Ether)	AME	100	3.50	273.1	128.0/258.0 <sup>*</sup>	30	35;35
腾毒素(Tentoxin)	TEN	100	3.04	415.1	256.0/312.1 <sup>*</sup>	30	20;20
赭曲霉毒素 A(Ochratoxine A)	OTA	10	3.52	404.1	239.1 <sup>*</sup> /358.1	30	25;20
橘青霉素(Citrinine)	CIT	100	3.14	251.2	191.1 <sup>*</sup> /205.2	30	25;20

注: \*为定量离子。

乙酸铵 2 种水相分别和甲醇、乙腈 2 种有机相组合时, OTA、ALT、CIT 和 TeA 峰形较差, 且丰度和灵敏度较低。为提高各化合物响应强度, 在水相中加入低浓度甲酸后, 发现 9 种真菌毒素峰形对称性得到明显改善, 并且响应值增强。甲醇-甲酸水作为流动相时, TeA 和 ALT 峰形严重拖尾, 而乙腈-甲酸水作为流动相时则无此现象, 因此, 最终以乙腈-甲酸水作为流动相体系。进一步优化甲酸浓度(0.01%、0.05%、0.1%), 当流动相为乙腈-0.05% 甲酸水时, 9 种真菌毒素的色谱峰形和响应强度最好, 保留时间稳定, 色谱条件优化后的 MRM 色谱图见图 1。

### 2.3 提取剂的选择

大多数真菌毒素易溶于有机溶剂, 乙腈和甲醇是目前最常用的两种提取溶剂<sup>[25]</sup>, 甲醇比乙腈具有更好的溶解性, 易将样品中的酸、酚、脂肪、色素等物质提取出来, 致使提取液中杂质较多, 不利于后续的盐析和净化<sup>[26]</sup>。由于降低提取溶剂 pH 能提高部分毒素的稳定性和回收率<sup>[4, 26-27]</sup>, 因此本实验比较了乙腈、10 mmol/L 柠檬酸-乙腈<sup>[4]</sup>、10% 甲酸-乙腈<sup>[26]</sup> 和 0.1% 乙酸-乙腈<sup>[27]</sup>4 种提取溶剂对 9 种真菌毒素提取效果的影响。

结果如图 2 所示, 采用纯乙腈提取时, BEA 回收率为 136.7%, TeA 回收率为 76.4%, 其余 7 种真菌毒素回收率为 81.6%~104.1%。对乙腈进行 3 种不同程度的酸化后, BEA 回收率分别降低为 90.6%、85.8%、86.8%, TeA 回收率分别提高为 90.7%、78.7%、86.5%。以 10% 甲酸-乙腈为提取溶剂时, PAT 回收率最低, 为 74.2%。采用 10 mmol/L 柠檬酸-乙腈、0.1% 乙酸-乙腈提取时, 9 种真菌毒素的回收率分别为 86.0%~97.9%、81.5%~92.5%, 考虑到柠檬酸更为经济环保, 因此选用 10 mmol/L 柠檬酸-乙腈溶液作为提取溶剂。

### 2.4 净化剂的选择

在毒素提取的过程中, 水果样品中的色素、有机酸、糖类物质、酚类物质等组分也被部分提取, 这不仅会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<sup>[25]</sup>。参考 QuEChERS 技术中的净化方法, 选择常用的 PSA 和 C<sub>18</sub> 吸附剂, C<sub>18</sub> 作为非极性吸附剂能够吸附基质中的非极性物质, 有效去除样品中的脂质、糖类等有机化合物; PSA 是一种碱性吸附剂, 在结构上有两个氨基, 可以通过氢键结合去除基质中的碳水化合物、有机酸、色素等。本研究比较了不同用量的 PSA 和 C<sub>18</sub> 净化对毒素回收率的影响。

结果如图 3 所示, 在 100~400 mg 用量下的 PSA 对 AOH、TeA、OTA 和 CIT 均有不同程度的吸附, 其回收率为 22.8%~68.4%; 而 C<sub>18</sub> 的净化效果较好, 当用量为 200 mg 时, 9 种真菌毒素的回收率最佳, 为 88.5%~108.9%。张晓男等<sup>[4]</sup>、王玉娇等<sup>[28]</sup> 在研究干/鲜果品中多种真菌毒素的提取方法时, 也发现经 C<sub>18</sub> 吸附剂净化后, 多种真菌毒素的回收率分别在 75.6%~111.8% 和 77.5%~103.7% 之间, 结果较为满意。因此, 本实验选用 200 mg C<sub>18</sub> 进行净化处理。

### 2.5 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 9 种目标毒素在 5 种水果中的信号增强/抑制程度(signal suppression/enhancement, SSE), SSE 值大于 1.2 表示存在基质增强效应, 小于 0.8 表示存在基质抑制效应, 在 0.8~1.2 之间则视为基质效应影响不大<sup>[26]</sup>。测定结果如表 2 所示, 在 5 种水果样品中, PAT、ALT、AME 和 AOH 基质抑制效应明显(<0.8), TEN、TeA 基质增强效应明显(>1.2); CIT 仅在樱桃样品中基质抑制效应明显; 而 BEA 和 OTA, 在 5 种水果样品中的基质效应尚在可接受范围内(0.8~1.2)。因此本实验采用空白基质外标曲线法进行定量, 以补偿基质效应。

### 2.6 方法学验证

2.6.1 方法的线性关系、LODs 和 LOQs 取空白桃样品, 按照 1.2.2 进行样品前处理, 配制一系列浓度的基质混合标准工作液, 上机测定后, 分别以 9 种真菌毒素的色谱峰面积为纵坐标(Y), 对应的质量浓度为横坐标(X), 进行线性回归分析, 计算回归方程和

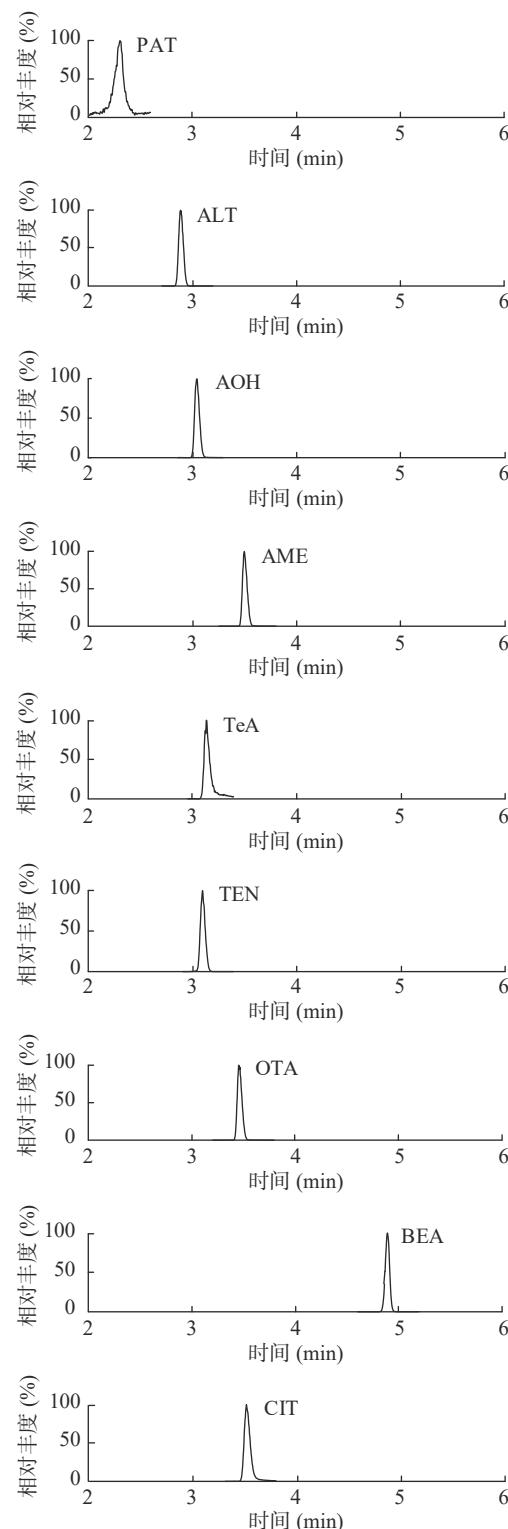


图1 9种真菌毒素的MRM色谱图

Fig.1 The MRM chromatograms of 9 mycotoxins

相关系数,并根据信噪比(S/N)确定LOD(S/N=3)和LOQ(S/N=10),结果见表3。PAT的曲线浓度范围与其它毒素不同,主要考虑了PAT的限量水平、仪器响应值等因素。各目标物在各自质量浓度范围内,峰面积与质量浓度呈现良好的线性关系,  $R^2$ 在0.9991~0.9999之间。PAT的LOD和LOQ分别为1.676、5.587  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,满足GB 2761-2017<sup>[13]</sup>和GB 5009.185-2016<sup>[14]</sup>规定的测定要求。其它8种真菌毒素的LODs

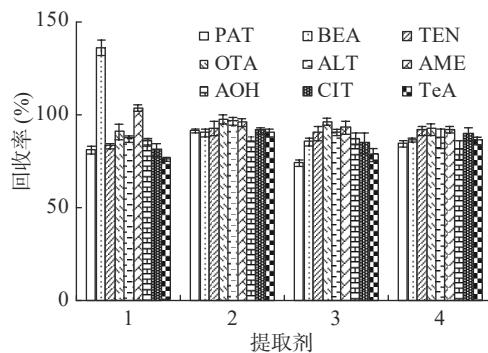


图2 不同提取剂对9种真菌毒素回收率的影响

Fig.2 Effects of different extractants on the recovery of 9 mycotoxins

注:1.乙腈;2.10 mmol/L柠檬酸-乙腈;3.10%甲酸-乙腈;4.0.1%乙酸-乙腈。

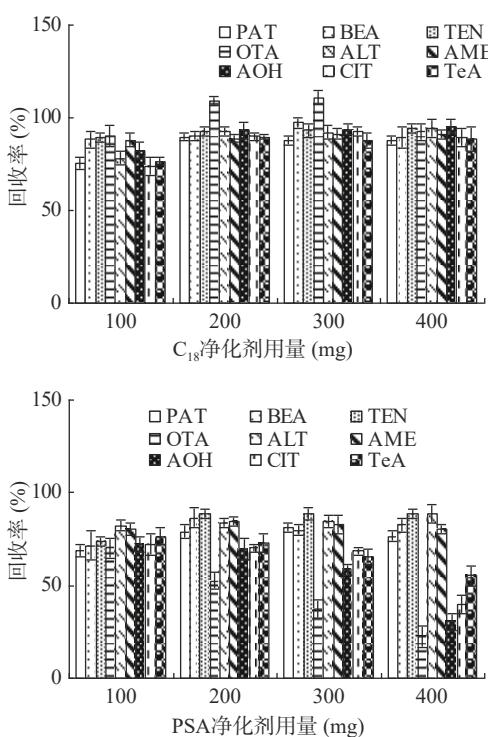


图3 净化剂对9种真菌毒素回收率的影响

Fig.3 Effects of different purification reagents on the recovery for 9 mycotoxins

表2 9种真菌毒素的基质效应

Table 2 Matrix effects of 9 mycotoxins

样品	SSE值								
	PAT	BEA	TEN	OTA	ALT	AME	AOH	CIT	TeA
桃	0.70	0.96	1.39	1.09	0.75	0.76	0.72	0.83	1.46
樱桃	0.65	0.91	1.32	1.00	0.68	0.70	0.65	0.77	1.36
葡萄	0.68	0.93	1.27	0.93	0.73	0.65	0.76	0.87	1.28
苹果	0.73	0.87	1.21	0.92	0.66	0.68	0.72	0.82	1.29
柑橘	0.59	0.85	1.36	1.13	0.71	0.63	0.69	0.81	1.31

为0.004~0.122  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,LOQs为0.014~0.406  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,相关毒素均低于SN/T 4259-2015<sup>[15]</sup>中制定的LODs,表明本方法具有较好的灵敏度和良好的定性定量分析能力。

表 3 9 种真菌毒素的线性范围、LODs 和 LOQs(n=6)  
Table 3 Linear range, LODs and LOQs of 9 mycotoxins (n=6)

真菌毒素	线性范围(μg/L)	线性方程	R <sup>2</sup>	LOD(μg/kg)	LOQ(μg/kg)
PAT	5~500	y=1.567x+9.088	0.9996	1.676	5.587
BEA	1~100	y=51525x+145557	0.9991	0.011	0.036
TEN	1~100	y=28502.2x-9701.1	0.9998	0.021	0.071
OTA	1~100	y=58099.6x-80489.7	0.9999	0.004	0.014
ALT	1~100	y=3042.5x+8282.8	0.9999	0.008	0.026
AME	1~100	y=5133.1x-1272.5	0.9999	0.016	0.054
AOH	1~100	y=7200.3x-13125	0.9997	0.033	0.110
CIT	1~100	y=15756.1x+21228.4	0.9992	0.026	0.087
TeA	1~100	y=7062.3x+6883.9	0.9999	0.122	0.406

2.6.2 回收率与精密度 选取空白桃和樱桃样品为本底, 对 9 种真菌毒素进行低、中、高 3 个浓度水平的加标回收实验, 在优化的实验条件下, 每个加标水平重复测定 6 次, 分别计算加标回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD), 结果见表 4。在 2 种水果基质中, 各毒素在低水平添加量下的平均回收率为 84.5%~106.5%, RSDs 为 0.8%~4.0%; 在中水平添加量下的平均回收率为 85.9%~113.2%, RSDs 为 1.1%~2.9%; 在高水平添加量下的平均回收

表 4 9 种真菌毒素的加标回收率和 RSDs (n=6)

Table 4 Recoveries and RSDs of 9 mycotoxins (n=6)

序号	真菌毒素	桃			樱桃		
		添加量 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)	添加量 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
1	PAT	5.0	87.3	3.9	5.0	84.5	3.9
		10.0	86.6	2.7	10.0	85.9	2.7
		20.0	93.2	2.0	20.0	89.3	2.0
2	BEA	0.5	92.3	0.8	0.5	90.6	0.8
		2.0	94.8	1.8	2.0	91.3	1.8
		5.0	91.2	1.3	5.0	92.5	1.3
3	TEN	0.5	91.6	2.9	0.5	89.5	2.9
		2.0	89.8	1.5	2.0	89.1	1.5
		5.0	93.7	0.7	5.0	94.3	0.7
4	OTA	0.5	92.7	2.5	0.5	88.3	2.5
		2.0	91.3	1.2	2.0	93.1	1.2
		5.0	94.3	2.0	5.0	96.1	2.0
5	ALT	0.5	90.5	4.0	0.5	106.5	4.0
		2.0	90.9	2.4	2.0	113.2	2.4
		5.0	91.8	3.3	5.0	111.3	3.3
6	AME	0.5	96.8	1.4	0.5	90.1	1.4
		2.0	93.2	1.7	2.0	89.8	1.7
		5.0	93.7	1.4	5.0	91.8	1.4
7	AOH	0.5	98.2	1.8	0.5	91.6	1.8
		2.0	88.2	1.6	2.0	93.3	1.6
		5.0	94.1	1.2	5.0	87.9	1.2
8	CIT	0.5	91.8	3.5	0.5	88.7	3.5
		2.0	86.1	1.1	2.0	90.0	1.1
		5.0	93.9	1.0	5.0	86.1	1.0
9	TeA	0.5	93.5	1.8	0.5	86.9	1.8
		2.0	91.9	2.9	2.0	93.6	2.9
		5.0	94.1	2.8	5.0	91.6	2.8

率为 86.1%~111.3%, RSDs 为 0.7%~3.3%, 符合 GB/T 27404-2008<sup>[29]</sup>《实验室质量控制规范 食品理化检测》的技术要求, 表明本方法具有良好的准确度和精密度。

## 2.7 实际样品测定

采用本研究建立的方法对从超市购买的草莓(10 份)、樱桃(5 份)、葡萄(10 份)、苹果(10 份)、梨(10 份)共计 45 份样品进行检测, 结果发现 3 份样品中检出真菌毒素, 分别为樱桃样品 2 份、葡萄样品 1 份, 阳性率为 6.67%, 所检测到的真菌毒素有 PAT(检出率 6.67%)、ALT(检出率 6.67%)、TeA(检出率 4.44%)、AOH(检出率 2.22%)、AME(检出率 2.22%)、TEN(检出率 2.22%) 和 BEA(检出率 2.22%)。如表 5 所示, 有 2 份樱桃样品共检出 PAT、ALT、TeA 和 BEA 4 种真菌毒素, 1 份葡萄样品中检出 PAT、ALT、TeA、AOH、AME 和 TEN 6 种真菌毒素。

表 5 市售水果中真菌毒素的检测结果

Table 5 Detection results of mycotoxins in commercial fruits

样品	PAT (μg/kg)	ALT (μg/kg)	TeA (μg/kg)	AOH (μg/kg)	AME (μg/kg)	TEN (μg/kg)	BEA (μg/kg)
樱桃1	7.33	0.28	ND	ND	ND	ND	ND
樱桃2	11.35	12.47	1.53	ND	ND	ND	1.83
葡萄1	6.18	1.78	9.05	2.31	0.46	1.17	ND

注: ND 为未检出。

PAT 和 ALT 是水果中污染最为广泛、危害最大的重点毒素, 其产毒真菌是樱桃和葡萄采后贮藏过程中的主要病原菌<sup>[30~31]</sup>, 同样广泛污染蔬菜、粮食、油料等作物, 在草莓、樱桃、葡萄、苹果、梨、桃等果品中均有检出<sup>[2~5, 32]</sup>。据报道, 新鲜水果中很少有 PAT 产生, 由青霉、曲霉等引起的腐烂水果样品中, PAT 阳性率和检出浓度较高<sup>[33~34]</sup>。链格孢菌可在水果贮运过程中的低温潮湿环境下生长, 易于含水量和水分活度高的水果中增殖, 浆果类水果的毒素检出率较高<sup>[12, 32]</sup>。本次超市抽检的小粒、易腐的樱桃和葡萄中, 部分样品均含有 PAT 和 ALT, 而 9 种真菌毒素在草莓、苹果、梨样品中均未检出, 可能与水果的新鲜程度、包装形式及贮藏条件等因素有关。

## 3 结论

本研究建立了 QuEChERS 前处理方法结合 UPLC-MS/MS 技术同时测定水果中 9 种真菌毒素的分析方法。实验优化了色谱质谱条件, 使 9 种毒素拥有较合适的出峰时间、较好的峰形和较高的响

应值,并通过优化提取溶剂、净化方法等前处理条件有效减少样品的基质干扰。建立的检测方法中,9种真菌毒素在5 min内完成色谱分离分析,在各自质量浓度范围内线性关系良好( $R^2>0.999$ ),检出限低,灵敏度高。桃和樱桃样品中低、中、高3个添加浓度水平的加标回收率在84.5%~113.2%之间,RSDs为0.7%~4.0%(n=6),结果较为满意。与以往单一水果种类中以ATs为主的检测方法相比,本方法操作简单、快速、毒素种类多、适用范围广,方法学验证及实际样品检测结果表明其灵敏度高、精密度好、实用性强,可以实现9种真菌毒素的有效分离和准确定量测定,满足水果中痕量毒素定量分析的要求,对监测、评估水果中多组分真菌毒素的污染风险评估和确证检测具有参考意义。

实际样品测定结果显示,有2份樱桃样品共检出PAT、ALT、TeA和BEA 4种毒素,1份葡萄样品检出PAT、ALT、TeA、AOH、AME和TEN 6种毒素,其余样品中均无毒素检出。实验结果表明售价较高、货架期较短的小粒、易腐类水果,在贮藏、销售过程中,存在真菌毒素混合污染的安全隐患,应给予持续关注。目前针对水果中的真菌毒素限值标准相关甚少,我国仅对苹果、山楂及其制品中的PAT规定了限值和测定方法,有必要健全水果中的真菌毒素限量标准及检测标准。

## 参考文献

- [1] TURNER N W, SUBRAHMANYAM S, PILETSKY S A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review[J]. *Analystica Chimica Acta*, 2009, 632(2): 168~180.
- [2] 史文景,赵其阳,焦必宁. UPLC-ESI-MS-MS结合QuEChERS同时测定柑橘中的4种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2014, 35(20): 170~174. [SHI W J, ZHAO Q Y, JIAO B N. Simultaneous determination of four mycotoxins in citrus fruits by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry combined with modified QuEChERS[J]. *Food Science*, 2014, 35(20): 170~174.]
- [3] 王蒙,姜楠,韦迪哲,等.自制固相萃取柱-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定果蔬中的8种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2016, 37(10): 213~218. [WANG M, JIANG N, WEI D Z, et al. A solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of 8 mycotoxins in fruits and vegetables[J]. *Food Science*, 2016, 37(10): 213~218.]
- [4] 张晓男,聂继云,闫震,等. UPLC-MS/MS同时检测苹果及其制品中的7种真菌毒素[J]. *分析测试学报*, 2017, 36(5): 588~594. [ZHANG X N, NIE J Y, YAN Z, et al. Simultaneous detection of 7 kinds of mycotoxins in apple and its products by UPLC-MS/MS[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2017, 36(5): 588~594.]
- [5] 程家兴,黎明阳,杨雨希,等. 红枣中4种链格孢菌毒素的检测及风险评估[J]. *分析测试学报*, 2018, 37(11): 1334~1338. [CHENG J X, LI M Y, YANG Y X, et al. Determination and risk assessment of four alternaria mycotoxins in jujube[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2018, 37(11): 1334~1338.]
- [6] 韩艺烨,邓年,谢建军,等. 酸辅助分散液液微萃取-高效液相色谱-串联质谱法测定果汁中多种真菌毒素[J]. *分析化学*, 2019, 47(3): 455~462. [HAN Y Y, DENG N, XIE J J, et al. Acid-assisted dispersive liquid-liquid microextraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of mycotoxins in fruit juice[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2019, 47(3): 455~462.]
- [7] 张嘉坤,张少军,钱训,等. 梨果实及其制品中真菌毒素的污染、检测及控制方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(22): 5816~5822. [ZHANG J K, ZHANG S J, QIAN X, et al. Research progress of contamination, detection and control of mycotoxins in pears and their products[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2018, 9(22): 5816~5822.]
- [8] 谢汉忠,黄玉南,李君,等. 葡萄及其制品中真菌毒素研究进展[J]. *农学学报*, 2017, 7(12): 70~75. [XIE H Z, HUANG Y N, LI J, et al. Research progress of mycotoxins in grapes and its products[J]. *Journal of Agriculture*, 2017, 7(12): 70~75.]
- [9] ROBIGLIO A L, LOPEZ S E. Mycotoxin production by *Alternaria alternata* strains isolated from red delicious apples in Argentina[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 1995, 24(3): 413~417.
- [10] BOUDRA H, BARS P L, BARS J L. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1156~1158.
- [11] 唐晓倩. 农产品典型真菌毒素生物识别材料与快速检测方法研究[D]. 武汉: 中国农业科学院, 2020. [TANG X Q. Development of bio-receptors and rapid detection methods for typical mycotoxins in agricultural products[D]. Wuhan: Chinese Academy of Agricultural, 2020.]
- [12] 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 Z X, NIE J Y, YAN Z, et al. Progress in research of detection, risk assessment and control of the mycotoxins in fruits and fruit products[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(2): 332~347.]
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761-2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [National Health and Family Planning Commission of China, China Food and Drug Administration. National food safety standard: Limits of mycotoxins in foods: GB 2761-2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
- [14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定: GB 5009.185-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [National Health and Family Planning Commission of China, China Food and Drug Administration. National food safety standard: Determination of patulin in foods: GB 5009.185-2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017.]
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口水果蔬菜中链格孢菌毒素的测定 液相色谱-质谱/质谱法: SN/T 4259-2015[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China. Determination of alternaria toxins residues in fruit and vegetables for export-LC-MS/MS method: SN/T 4259-2015[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.]

[16] DUAN Z H, LIN Z S, YAO H R, et al. Preparation of artificial antigen and egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) of citrinin for enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2009, 22(3): 237–243.

[17] ACKERMANN Y, CURTUI V, DIETRICH R, et al. Widespread occurrence of low levels of alternariol in apple and tomato products, as determined by comparative immunochemical assessment using monoclonal and polyclonal antibodies[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(12): 6360–6368.

[18] 曹德康, 苏建忠, 张瑛, 等. 胶体金免疫层析技术快速检测谷物中 3 种真菌毒素的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(3): 306–312. [CAO D K, SU J Z, ZHANG Y, et al. Research on the rapid detection of three kinds of mycotoxin in grains by colloidal gold immunochromatographic method[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2017, 29(3): 306–312.]

[19] 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]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2018, 410(12): 3017–3023.

[20] 陈跃, 张悦丽, 王超, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定水果中 5 种链格孢霉毒素[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(11): 1312–1317. [CHEN Y, ZHANG Y L, WANG C, et al. HPLC-MS/MS determination of 5 Alternaria toxins in fruits with QuEChERS[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2019, 55(11): 1312–1317.]

[21] 林玲, 刘元靖, 查玉兵, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄中桔青霉素、链格孢酚和链格孢酚甲基乙醚的残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2018, 54(2): 172–176. [LIN L, LIU Y J, CHA Y B, et al. UHPLC-MS/MS determination of residual amounts of citrinin, alternariol and alternariolmethyleneether in grapes[J]. *Physical Testing and Chemical Analysis (Part B: Chemical Analysis)*, 2018, 54(2): 172–176.]

[22] 蒋黎艳, 赵其阳, 龚蕾, 等. 超高效液相色谱串联质谱法快速检测柑橘中的 5 种链格孢霉毒素[J]. *分析化学*, 2015, 43(12): 1851–1858. [JIANG L Y, ZHAO Q Y, GONG L, et al. Rapid determination of five alternaria mycotoxins in citrus by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2015, 43(12): 1851–1858.]

[23] 张子庚, 张爱芝, 邢家溧, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定芒果中六种链格孢霉毒素残留[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(20): 199–205, 211. [ZHANG Z G, ZHANG A Z, XING J L, et al. Determination residues of six alternaria toxins in mango by HPLC-MS[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2020, 41(20): 199–205, 211.]

[24] 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 Z M, NIE D X, et al. Simultaneous determination of 40 mycotoxins in common agricultural products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2020, 11(19): 7019–7029.]

[25] 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 X N, MA L Y, PAN S C, et al. Simultaneous determination of 11 mycotoxins in minor food legumes by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)[J]. *Food Science*, 2019, 40(8): 306–310.]

[26] 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 W J, HUANG B, FU J W, et al. Simultaneous determination of 16 mycotoxin residues in aged tea by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2021, 42(2): 299–305.]

[27] 孙晓冬, 郝杰, 毛婷, 等. 固相萃取柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定液态乳中 14 种真菌毒素[J]. *食品科学*, 2018, 39(18): 292–301. [SUN X D, HAO J, MAO T, et al. Determination of 14 mycotoxins in liquid milk by solid-phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Science*, 2018, 39(18): 292–301.]

[28] 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 Y J, NIE J Y, YAN Z, et al. Simultaneous determination of 16 kinds of mycotoxins in common dried fruits by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2017, 45(10): 1556–1563.]

[29] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验室质量控制规范 食品理化检测: GB/T 27404-2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of China, Standardization Administration of China. Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food: GB/T 27404-2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.]

[30] 王小佳, 于有伟, 张少颖.  $\epsilon$ -聚赖氨酸对樱桃采后病原菌橘青霉和链格孢菌的抑菌作用研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(4): 1301–1309. [WANG X J, YU Y W, ZHANG S Y. Inhibitory effects of  $\epsilon$ -polylysine on *Penicillium citrinum* and *Alternaria alternata* inoculated on fresh cherry[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2022, 13(4): 1301–1309.]

[31] 朱志强, 集贤, 兰青阔, 等. 鲜食葡萄贮运期黑斑病害致病病原菌分离鉴定[J]. *包装工程*, 2020, 41(21): 31–37. [ZHU Z Q, JI X, LAN Q K, et al. Isolation and identification of pathogens causing grape blackspot during storage and transportation[J]. *Packaging Engineering*, 2020, 41(21): 31–37.]

[32] 沈友明, 聂继云, 李志霞, 等. 果品中真菌毒素的污染、毒性、生物合成及影响因素研究进展[J]. *食品科学*, 2018, 39(9): 294–304. [SHEN Y M, NIE J Y, LI Z X, et al. Progress in research on mycotoxins contamination, toxicity, biosynthesis and regulatory factors of mycotoxins in fruits[J]. *Food Science*, 2018, 39(9): 294–304.]

[33] MOAKE M M, PADILLA-ZAKOUR O I, WOROBO R W. Comprehensive review of patulin control methods in foods[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2005, 4(1): 8–21.

[34] BONERBA E, CECI E, CONTE R, et al. Survey of the presence of patulin in fruit juices[J]. *Food Additives and Contaminants*: