

- [13] 郭昕. 奶牛乳房炎的发病规律及危害与预防措施[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008, 12:52-53.
- [14] 甘辛, 许学斌, 王伟, 等. 临床病例痰液和腹泻病例粪便标本来源的肺炎克雷伯菌分离株的耐药特征分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(12): 4889-4894.
- [15] BEZANSON G S, MACINNIS R, POTTER G, et al. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology, 2008, 127 (1-2): 37-42.
- [16] CARMINATI D, BONVINI B, ROSSETTI L, et al. Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese [J]. Food Control, 2019, 100:321-328.
- [17] CHINGWARU W, MPUCHANE S F, GASHE B A. *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from milk, beef, and chicken and their antibiotic resistance [J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(6):931-936.

研究报告

小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质的研制

谢继安¹, 刘柏林¹, 赵紫微¹, 杨欣², 张磊², 杨大进², 赵云峰²

(1. 安徽省疾病预防控制中心, 安徽 合肥 230601; 2. 国家食品安全风险评估中心, 北京 100050)

摘要:目的 研制小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质。方法 利用天然污染交链孢霉毒素的小麦样籽粒制备, 按照规定的定值程序, 形成符合国家相关要求的小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质。结果 研制成功2个不同浓度水平的小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质, 并获批国家二级标准物质[标准号: GBW(E) 100547 和 GBW(E) 100548]。结论 该标准物质是目前国际上唯一的天然污染细交链孢菌酮酸和腾毒素的小麦粉标准物质, 研制过程为我国开展粮食中新型真菌毒素基体标准物质的研制提供重要方法学借鉴。

关键词:小麦粉; 细交链孢菌酮酸; 腾毒素; 交链孢霉毒素; 标准物质

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2021)06-0716-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2021.06.013

Preparation and certification of wheat flour reference material for tenuazonic acid and tentoxin using isotope dilution- liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XIE Ji'an¹, LIU Bolin¹, ZHAO Ziwei¹, YANG Xin², ZHANG Lei²,
YANG Dajin², ZHAO Yunfeng²

(1. Anhui Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hefei 230601, China;
2. China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective A method for the preparation and certification of the reference material of tenuazonic acid (TeA) and tentoxin (TEN) in wheat flour was developed. **Methods** The reference material of TeA and TEN in wheat flour was prepared from grain which naturally contaminated alternaria toxins, characterized with national standard regulation. **Results** The reference materials of TeA and TEN in wheat flour which contains two values were developed. The reference materials were approved the second class of National Certified Reference Materials [GBW (E) 100547 and GBW (E) 100548]. **Conclusion** The reference materials are currently the only National Certified Reference Materials of wheat flour that naturally contaminate TeA and TEN. The reference materials provides important method ological reference for the development of matrix reference materials with new mycotoxins in grain in China.

Key words: Wheat flour; tenuazonic acid; tentoxin; alternaria toxins; reference material

收稿日期: 2021-10-21

基金项目: 科技部国家重点研发计划 (2017YFC1601302); 安徽省卫生计生委公共卫生与预防医学科研课题 (2017jk009)

作者简介: 谢继安 男 副主任技师 研究方向为食品理化检验和研究工作 E-mail: 16615925@qq.com

通信作者: 杨大进 男 研究员 研究方向为食品安全风险监测 E-mail: yangdajin@cfsa.net.cn

赵云峰 男 研究员 研究方向为食品理化检验技术研究 E-mail: zhaoyf@cfsa.net.cn

标准物质主要用于实验室检测量值溯源和质量控制,在实验室检测活动中发挥极为重要作用,其中基体标准物质广泛应用于实验室内外质量控制领域,为保证实验室检测数据准确性发挥着重要作用^[1-2]。目前,欧美发达国家在基体标准物质的研制和使用上积累了丰富的经验,而我国在这一领域上有待完善,尤其是生物毒素基体标准物质,几乎完全依赖进口。因此有必要研制食品相关的基体标准物质,以更好地开展我国的食品安全工作^[3-4]。

交链孢霉属(*Alternaria*)是一类广泛分布于各种农作物和泥土里的真菌,能引起水果、蔬菜和粮食的腐败,交链孢霉代谢产生的毒素统称为交链孢霉毒素(*Alternaria toxins*)^[5]。其中细交链孢菌酮酸(*Tenuazonic acid*, TeA)和腾毒素(*Tentoxin*, TEN)污染最为普遍。TeA和TEN主要存在于谷物、番茄、柑橘、樱桃等农作物和水果中,尤其是小麦中的污染情况非常普遍,检出率和检出量高,世界各地均有报道^[6-7]。2016年EFSA开展了欧洲人群的交链孢霉毒素膳食暴露研究,研究显示^[7],膳食暴露TeA和TEN的高风险人群是1岁左右的幼儿,TeA每日平均暴露量为100~1 614 ng/kg·BW, TEN每日平均暴露量为1.6~33.4 ng/kg·BW。TeA膳食暴露主要来源为谷基婴幼儿食品和番茄及其制品, TEN膳食暴露主要来源为果实蔬菜类,如番茄。我国污染TEN和TeA主要食品是小麦及其制品,2016—2018年国家食品污染物监测对各类食品中的交链孢霉毒素进行监测,结果显示小麦及其制品中TeA和TEN的污染最为严重,检出率超过90%,TeA最大检出值超过2 000 μg/kg, TEN最大检出值超过200 μg/kg。

目前,GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》未对食品中交链孢霉毒素有规定^[8],我国已在全国范围内逐步开展食品中交链孢霉毒素污染水平的调查工作,由于食品中真毒毒素污染物检测复杂,单独采用化学纯度标准物质难以保证检测结果准确性,如使用基体标准物质既可用于实验室检测的量值保证,也可以对监测体系做出客观的评价^[9]。目前尚未查到国内外食品中交链孢霉毒素有证标准物质信息。因此,有必要研制一种食品中多种交链孢霉毒素标准物质,以满足食品中交链孢霉毒素监测的需要。

本研究以天然污染的小麦籽粒为原料,制备的小麦粉符合小麦粉(GB 1355—86)国家标准中普通粉的要求^[10],以该小麦粉为基体载体,TeA和TEN为目标物的标准物质,以期为食品中交链孢霉毒素分析测试提供测量标准、分析方法的校准和质量控制。

1 标准物质候选物制备、检验和定值

1.1 标准物质候选物制备

本研究采用天然污染交链孢霉毒素的小麦籽粒为基质,按程序制成两个浓度水平的小麦粉标准物质候选物。为满足目标物的长期稳定和便于长期保存,采用了一定强度的射线进行辐照灭菌,装袋后置于室温(25℃)条件下避光保存。

1.2 标准物质定值方法

1.2.1 主要仪器和试剂

超高效液相色谱质谱仪(UPLC-Xevo TQ MS),色谱柱(UPLC HSS T3, 2.1×100 mm, 1.8 μm),高速旋涡混匀器(VORTEX Multi Reax),电子天平(XS204),固相萃取仪(GX-271),高速冷冻离心机(Legend Mach 1.6R),HLB固相萃取柱(200 mg/6 mL)。细交链孢菌酮酸(TeA, C₁₀H₁₅NO₃, CAS: 610-88-8,英国LGC),腾毒素(TEN, C₂₂H₃₀N₄O₄, CAS: 28540-82-1,英国LGC),细交链孢菌酮酸同位素内标(¹³C₂-TeA, ¹³C₂C₈H₁₅NO₃, 54.3 μg/mL,德国Sigma_Aldrich公司),腾毒素同位素内标(D₃-TEN, C₂₂H₂₇D₃N₄O₄, 99.7%,加拿大Toronto Research Chemicals公司),乙腈(色谱纯),甲醇(色谱纯),碳酸氢铵(色谱纯),超净水系统(Milli-Q)。

1.2.2 样品提取与净化

称取5.0 g样品,加入适量混合同位素内标溶液,加25 mL提取溶液[乙腈:甲醇:0.05 mol/L磷酸二氢钠溶液(pH 3.0)=45:10:45, V/V/V],高速旋涡混匀提取20 min, 10 000 r/min离心10 min,准确移取5.0 mL样品提取液,加入15 mL磷酸二氢钠溶液(0.05 mol/L, pH 3.0)稀释后全部通过HLB固相萃取柱净化,用5 mL 20%甲醇溶液淋洗,再依次用5 mL甲醇和5 mL乙腈洗脱,合并洗脱液于45℃水浴氮气吹至近干,用2.0 mL 10%甲醇溶液复溶, 12 000 r/min离心10 min,上清液供LC-MS/MS分析。

1.2.3 样品测定

1.2.3.1 色谱条件

色谱柱为HSS T3(2.1×100 mm, 1.8 μm),流动相以1.0 mmol/L碳酸氢铵溶液为水相(A),甲醇为有机相(B),流速为0.2 mL/min。线性梯度洗脱:0~2.0 min, B:5%;3.0 min, B:75%;4.0~6.0 min, B:90%;7.0~9.0 min, 5%。

1.2.3.2 质谱条件

电喷雾离子源(ESI),负离子模式,毛细管电压为-2.4 kV,离子源温度:150℃,脱溶剂温度:500℃,脱溶剂气流量:800 L/h,碰撞气流量:0.15 mL/min,多反应检测模式(MRM)定量检测。TeA离子对参

数: m/z 196>139(定量)、196>112, $^{13}\text{C}_2$ -TeA 离子对参数: m/z 198>141; TEN 离子对参数: m/z 413>141(定量)、413>271, D_3 -TEN 离子对参数: m/z 416>141。

1.2.4 质量控制

以空白试验考察系统分析背景,确保不存在本底干扰。因无相关基体标准物质作为参考,故采用空白小麦粉样品加标回收试验进行质量控制,2个浓度水平(添加量为 TeA:100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TEN:20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 TeA:200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、TEN:40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的加标回收率控制在 $100\% \pm 5\%$ 以内,精密密度控制在 5% 以内。

1.3 标准物质的均匀性和稳定性实验

根据 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》规定,必须进行均匀性测试,以证明一批分包装(单元)是足够均匀的。本次研究的标准物质共 2 个浓度水平,每个浓度水平分装约 1 000 袋,每袋约 50 g,选择随机抽样方法,将所有包装袋样品按照 001、002、003、...1 000 编号,按照随机数原理,抽取(编号从小到大排列)的 17 个样品进行袋间均匀性研究,每袋样品再抽取 6 个平行样,进行袋内均匀性研究。

本研究短期稳定性考察了所研标准物质在 60 $^{\circ}\text{C}$ 的运输条件下的稳定性情况,随机抽取 2 个浓度水平样品各 3 份(共 30 份),并将其全部置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱内,分别在第 0、1、3、5、7 d 取样检测,用于评价所研制标准物质在模拟运输条件下的短期稳定性。长期稳定性考察了所研标准物质在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)避光保存条件下,保存 0、1、3、6 和 12 个月,每次随机抽取 2 个浓度水平样品各 3 份检测,用于评价所研制标准物质在室温储存条件下的长期稳定性。

1.4 标准物质的联合定值

本研究采用多家实验室联合定值法来确定所研标准物质的指定值,共邀请国内 10 家高水平实验室参与联合定值。联合定值方法采用统一的分析方法,向每家定值单位发放 4 个包装(每个浓度水平各 2 袋)的小麦粉标准物质样品,每个包装至少取样 6 次,提供 6 个测定结果,4 个包装至少提供 24 个测定数据。为确保定值过程中的可溯源性与质量控制,同时向各定值单位发放 TeA 和 TEN 标准物质、同位素内标溶液和固相萃取柱等关键耗材。

2 结果与分析

2.1 标准物质候选物制备方法与工艺

标准物质的生产制备工艺流程图如图 1 所示。根据 JJF 1006-1994《一级标准物质技术规范》和 ISO

Guide 35-Certification of reference materials-General and statistical principles^[11-12] 对全国各小麦主产区代表性样品的筛查,选取山西省某县的天然污染高浓度 TeA 和 TEN 小麦籽粒样品和安徽省某县天然污染低浓度 TeA 和 TEN 小麦籽粒样品作为候选物,满足了本研究所采集的小麦籽粒样品是在不同气候条件下 TeA 和 TEN 污染的典型谷物样品。

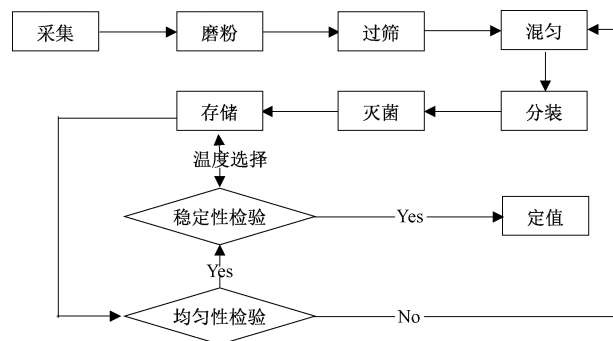


图 1 小麦粉中 TeA 和 TEN 标准物质的生产制备工艺流程图

Figure 1 Flow chart for preparation and certification of TeA and TEN in wheat flour

将 2 种小麦籽粒候选物经一定比例混合后按小麦粉(GB 1355—86)国家标准中普通粉(粗细度:全部通过 CQ 20 号筛,水分 $\leq 13.5\%$)的要求进行磨粉和过筛加工,再在干粉混料机中混匀 6 h 制备成编号 A 和 B 的 2 个浓度水平的小麦粉标准物质候选物。混匀后的样品用铝箔袋分装各 1 000 袋,抽真空热封的方法封袋,每包装袋约 50 g。为保证小麦粉中 TeA 和 TEN 标准物质在存放过程中的稳定性,使用电子加速器辐照法对装袋样品进行辐照灭菌,辐照剂量为 10 KGy,灭菌后的样品做霉菌培养实验,证实无活菌存在。所有装袋样品在室温(25 $^{\circ}\text{C}$)条件下避光保存于密封桶中,确保其稳定性。

2.2 标准物质定值方法优化^[13]

为确保研制标准物质质量值的准确性,首先在完整的方法学验证工作的基础上编写了小麦粉(面粉)中细交链孢菌酮酸和腾毒素测定标准操作程序。

2.2.1 提取溶剂和提取时间

由于 TeA 和 TEN 的 Log P (octanol-water) 分别为 0.65 和 1.46,经过反复试验,选用酸性缓冲盐和有机溶剂条件下的混合提取液[乙腈:甲醇:0.05 mol/L 磷酸二氢钠溶液(pH 3.0)=45:10:45, V/V/V],以实现同时提取。为保证提取效率,使用高含量样品进行提取时间筛选实验,结果显示当提取时间达到 60 min 及更长时间时,样品的检测值达到最大并相对稳定,因此选用振荡提取 60 min。

2.2.2 固相萃取柱净化

本研究利用 HLB 填料中亲水性的 N-乙炔吡咯烷酮保留 TeA,亲水性的 N-乙炔吡咯烷酮和亲脂性的二乙炔基苯聚合物共同保留 TEN,能达到完全保留 TeA 和 TEN 的效果。实验结果显示,当 HLB 填料 ≥ 200 mg 时,空白样品加标回收率达到最大并趋于稳定。

2.2.3 液相色谱及质谱条件优化

由于采用负离子模式分析 TeA 和 TEN,当流动相使用纯水和乙腈时灵敏度较差,峰型偏宽。当水相改为碳酸氢铵溶液 (1.0 mmol/L) 时, pH 约为 8.0,并且有机相是改为甲醇,TeA 和 TEN 可获得更好的灵敏度和分离度。

2.2.4 同位素内标干扰实验

由于同位素内标 $^{13}\text{C}_2$ -TeA 和 D_3 -TEN 的同位素标记含量不是 100%,需要通过配制同位素内标溶液进行质谱分析,以确认是否干扰测定。在分析 TeA 和 TEN 相同的仪器条件下,实验结果显示, $^{13}\text{C}_2$ -TeA 和 D_3 -TEN 同位素内标在 TeA 和 TEN 的 MRM 通道无明显色谱峰,确认了同位素内标不干扰 TeA 和 TEN 的测定。

2.2.5 样品溶液的基质效应评估

为评估检验方法的样品基质效应,本研究空白小麦粉基质标准和溶剂标准的基质效应,采用 HLB 柱净化后,能去除小麦粉样品中大部分的基质干扰物,同浓度 TeA 和 TEN 的空白小麦粉基质标准质谱响应和溶剂标准的质谱响应差别不大。为完全消除小麦粉样品基质效应的影响,使用 TeA 和 TEN 的同位素内标 $^{13}\text{C}_2$ -TeA 和 D_3 -TEN 来抵消样品基质效应,在小麦粉样品提取阶段即加入混合同位素内标溶液,使得同位素内标参与小麦粉样品前处理的全部过程,从而达到完全消除样品基质效应影响。

2.2.6 检测方法线性范围、定量限和加标回收率

根据质谱响应情况,本研究制备了一系列不同浓度的标准溶液,连续 3 d 重复实验。结果显示, TeA 和 TEN 标准曲线相关系数均大于 0.999,线性范围:TeA:5.0~400 $\mu\text{g}/\text{kg}$; TEN:1.0~80 $\mu\text{g}/\text{kg}$,满足高、低含量水平的 TeA 和 TEN 的定量分析要求。为满足低含量样品检测要求,选取阴性基质加标 (TeA: 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, TEN: 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 平行实验 20 次,所测得的样品回收率为 82.6%~118.3%,相对标准偏差均小于 10%,均在容许范围内。方法的定量限小于 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TeA) 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (TEN)。选用不含 TeA 和 TEN 的小麦粉为基质进行加标回收率的测定。在小麦粉样品中加入低 (TeA:

10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, TEN: 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、中 (TeA: 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, TEN: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、高 (TeA: 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, TEN: 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 三个浓度水平,每个加标样品取 6 个平行样,结果表明,TeA 的三个浓度水平的加标回收率为 98.9%~104.6%, RSD% 为 1.5%~3.8%; TEN 的三个浓度水平的加标回收率为 99.6%~103.7%,精密度的相对标准偏差 (RSD%) 为 1.4%~3.1%。实验结果显示本方法准确度和精密度的良好。

2.3 标准物质均匀性检验

根据 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》规定^[14],采用“均匀性好的样品总体单元数 (N) > 500,抽取单元数 ≥ 15 ”的抽样方案,从分装成最小包装单位的编号 A 和 B 的 2 个浓度水平各 1 000 袋标准物质候选物中,按随机数字表抽取样品各 17 袋,每袋样品抽取 3 份样品,每份 5.0 g,考察特性值在袋间的均匀度。从某一袋中抽取的 6 份样品进行实验,每份 5.0 g,每份样品平行测定 3 次,考察特性值在袋内的均匀度。袋间和袋内均匀性检验数据均采用 F 检验进行统计分析,按照组间变动性 (S_1^2) 和组内变动性 (S_2^2) 的比较来判断各组测量值之间有无系统性误差,如果比值 F ($F = S_1^2/S_2^2$) 小于统计分析检验的临界值 F_α ,则认为候选物是均匀的。以编号 A 浓度水平 TeA 为例,袋间和袋内均匀性数据见表 1 和表 2 所示,查 F 检验值表,组间检验临界值 $F_{0.05}(16, 34) = 1.95$,组内检验临界值 $F_{0.05}(5, 12) = 4.68$,统计分析得到的编号 A 浓度水平 TeA 的组间 $F_{(\text{含量A-TeA-组间})} = 1.88$ 和组内 $F_{(\text{含量A-TeA-组内})} = 3.96$,均小于相应的组间和组内检验临界值,证明袋间和袋内特性值无显著性差别,样品是均匀的。同时分析的其他浓度水平的 TeA 和 TEN 的均匀性检验结果均小于相应的组间和组内检验临界值,证明制备的编号 A 和 B 的 2 个浓度水平的标准物质候选物是均匀的。

2.4 标准物质稳定性检验

根据 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》规定^[14],本研究进行了高温短期稳定性检验 (60 $^\circ\text{C}$, 0、1、3、5、7 d) 和室温长期稳定性 (25 $^\circ\text{C}$, 0、1、3、6、12 个月), 检验结果见表 3。采用每组标准物质候选物的平均值为各时间点的特征值,采用一元线性拟合方程进行短期和长期稳定性检验分析。以 x 代表时间点,以 y 代表各时间点标准物质的特性值 (TeA 或 TEN 的含量), 拟合成一条直线,则有斜率 β_1 , 则

$$\beta_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

表 1 小麦粉中 TeA(编号 A 浓度水平)袋间均匀性分析结果(μg/kg)

Table 1 Results of between-bottle homogeneity for TeA (A concentration level) in wheat flour (μg/kg)

样品号/子编号	1	2	3	均值	S_1^2	S_2^2	F
SAM A01	103.5	92.1	96.3	97.3			
SAM A02	98.4	111.7	106.8	105.6			
SAM A03	99.1	104.2	92.3	98.5			
SAM A04	93.8	105.1	98.2	99.0			
SAM A05	107.5	98.1	94.9	100.2			
SAM A06	93.6	98.5	95.1	95.7			
SAM A07	97.5	98.1	106.2	100.6			
SAM A08	87.6	91.8	93.5	91.0			
SAM A09	98.8	93.9	97.1	96.6	51.907	27.584	1.88
SAM A10	92.7	105.1	99.2	99.0			
SAM A11	99.5	92.5	86.3	92.8			
SAM A12	102.7	90.9	95.8	96.5			
SAM A13	99.2	93.4	90.7	94.4			
SAM A14	97.9	98.5	93.5	96.6			
SAM A15	97.7	102.2	91.6	97.2			
SAM A16	103.5	101.2	96.2	100.3			
SAM A17	101.5	115.3	106.9	107.9			
总均值				98.2			

表 2 小麦粉中 TeA(编号 A 浓度水平)袋内均匀性分析结果(μg/kg)

Table 2 Results of within-bottle homogeneity for TeA (A concentration level) in wheat flour (μg/kg)

样品号/子编号	1	2	3	均值	S_1^2	S_2^2	F
SAM _A-1	101.2	100.8	99.7	100.6			
SAM _A-2	99.8	98.3	99.4	99.2			
SAM _A-3	97.5	98.1	98.9	98.2			
SAM _A-4	98.2	99.0	97.6	98.6	2.201	0.556	3.96
SAM _A-5	99.2	100.2	99.7	99.7			
SAM _A-6	100.5	99.6	98.8	99.6			
总均值				99.3			

根据公式直线截距 $\beta_0 = \bar{y} - \beta_1 \bar{x}$ 、直线的标准偏

差 $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \beta_0 - \beta_1 x_i)^2}{n - 2}$ 、斜率不确定度 $s(\beta_1)$

$= \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}$ 计算各含量水平的截距 β_0 、标

准偏差 s^2 、斜率不确定度 $s(\beta_1)$ 以及 \bar{y} 、 \bar{x} 值。以含量 B 浓度水平 TEN 为例,查 t 检验分布表得自由度为 $n-2$ ($n=15$) 和 $P=0.95$ (95% 置信区间) 的 t

因子等于 2.16,由于 $|\beta_1| < T_{0.95, n-2} \times s(\beta_1)$, 故斜率是不显著的,因而未观测到短期和长期不稳定。检验结果表明含量 B 浓度水平 TEN 含量在规定时间内无明显变化趋势,同时分析的其他浓度水平的 TeA 和 TEN 的含量在规定时间内均无明显变化趋势,因此该标准物质候选物在 60 °C 模拟运输条件下保存 7 d 和室温 (25 °C) 避光条件下保存 12 个月均能保存稳定,满足标准物质实际运输和保存要求。

表 3 小麦粉中 TEN(编号 B 浓度水平)稳定性(短期/长期)检验分析结果

Table 2 Results of short-term and long-term stabilities for TEN (B concentration level) in wheat flour

储存条件	\bar{x}	\bar{y}	β_1	β_0	s^2	s	$s(\beta_1)$	$T_{0.95, n-2} \times s(\beta_1)$	结果判定
60 °C 短期	3.2	39.9	-0.058	40.063	0.098 5	0.314	0.032	0.069 1	无显著差异
25 °C 长期	4.4	39.6	-0.025	39.681	0.177 0	0.421	0.025	0.054 0	无显著差异

2.5 标准物质特性量值测量方法、质量控制和溯源性

同位素稀释质谱法采用稳定性同位素标记的目标物为内标,该标记物与目标物具有相同分子结构,理化性质与目标物基本一致,可以抵消检测过程中各种基质效应和系统误差,是公认的一种测量微量污染物的基准方法^[15]。基于上述要求,本研究

建立了测定小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素的同位素稀释-液相色谱质谱法,并通过对提取溶剂、提取时间、固相萃取柱、液相色谱条件和质谱条件、基质效应、定量线性范围、检出限和定量限、加标回收等多方面进行了方法学优化和确认^[16-17]。

用于定值测量的 TeA 和 TEN 标准物质均购于英国政府化学家实验室 (LGC), ¹³C₂-TeA 购于德国

Sigma_Aldrich 公司, D₃-TEN 购于加拿大 Toronto Research Chemicals 公司,特性量值可以溯源至国际单位制,具有良好的溯源性。由于无法获得 TeA 和 TEN 的基体标准物质,本研究建立的定值检验方法的有效性是通过权威实验室方法学验证形式实现的,国家粮食和物资储备局科学研究所和上海市疾病预防控制中心等 4 家国家级检测技术机构对本研究建立的定值检验方法进行了方法学验证,验证结果满意。定值过程中还通过对目标物保留时间确认、定量定性离子丰度比确认、标准溶液响应因子确认、定量限的控制、全程空白和回收率控制等质量控制措施来保证可靠性和准确性。

2.6 标准物质联合定值和不确定度评定

依据 JJF 1006-1994《一级标准物质技术规范》和 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》对标准物质的定值要求,需采用多个实验室协作定值的方法进行。参与本次定值的实验室如国家粮食和物资储备局科学研究所等均是在国内各领域具有先进水平的实验室。在定值过程中,每个定值实验室随机发放编号 A 和 B 浓度水平各 2 个样品,每个浓度水平每份样品至少测量 3 次,每个

浓度水平至少提供 6 个定值数据,每家实验室均按定值作业指导书进行严格的质量控制,确保了每一个定值数据的可靠性和准确性。对各实验室的定值数据进行统计分析,依次采用格拉布斯(Grubbs)法和狄克逊(Dixon)法来判别和剔除组内定值数据的可疑值,科克伦(Cochran)法检查各组数据之间是否等精度,狄克逊(Dixon)法来判别和剔除各组定值数据平均值的可疑值,最后采用达戈斯提诺(D'Agostino)法检验数据的正态性。经统计分析后保留的定值数据的总平均值为标准值。以编号 B 浓度水平 TEN 为例,定值数据汇总表见表 4。其组内 Grubbs 检验结果为各组数据中最大值和最小值的 $|v_i|$ 均小于相应的 $\lambda(\alpha, n) \times s$ 无可疑值需要剔除;组内 Dixon 检验检验结果为各组数据的 r_1 和 r_n 的值都小于 $f_{(0.05, 12)} = 0.583$, 无可疑值需要剔除;Cochran 等精度检验结果为 $C = 0.2416 < C_{(0.01, 10, 12)} = 0.2704$, 数据等精度;组间 Dixon 检验结果为 $r_1 = 0.000$ 和 $r_n = 0.087$, 均小于 $f_{(0.05, 10)} = 0.530$, 无可疑值需要剔除;正态检验结果为 $Y = 0.468$, 落在 $-3.41 \sim 1.75$ ($n \leq 150, b-b(P = 0.99)$ 临界区间)内,可接受所有数据为正态分布。

表 4 小麦粉中 TEN(编号 B 浓度水平)10 家实验室定值数据汇总 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 4 Results submitted for the certification of the TEN (B concentration level) in wheat flour ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

实验室	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
1	39.3	37.3	40.6	41.1	38.4	40.8	37.6	38.6	41.0	39.2
2	38.8	39.6	39.5	39.8	39.3	39.3	37.0	38.4	39.5	40.3
3	39.5	38.9	37.9	39.1	39.2	39.2	38.4	39.2	39.2	38.9
4	39.4	38.2	38.0	39.3	39.8	40.0	39.1	37.3	40.4	41.2
5	39.7	40.4	39.0	41.1	39.9	41.2	38.0	38.4	39.8	40.5
6	39.3	40.5	41.6	41.4	39.9	41.5	39.1	37.5	39.1	39.4
7	39.0	39.8	38.5	38.6	40.1	41.7	38.7	39.0	39.5	40.6
8	40.0	41.0	39.6	38.0	39.6	40.9	38.5	38.5	42.5	39.5
9	38.8	41.7	39.5	40.1	39.7	40.9	37.3	37.5	41.7	41.5
10	39.7	41.2	37.0	38.5	40.7	39.5	38.6	38.6	38.9	40.2
11	38.6	39.9	36.6	37.5	40.0	40.5	37.7	37.0	39.8	39.9
12	40.1	41.5	36.5	38.4	39.3	40.9	37.8	37.9	42.4	40.4
平均值	39.4	40.0	38.7	39.4	39.7	40.5	38.2	38.2	40.3	40.1
SD	0.48	1.35	1.58	1.30	0.57	0.85	0.69	0.70	1.28	0.79
RSD/%	1.22	3.37	4.09	3.30	1.44	2.09	1.80	1.84	3.18	1.97
总均值(\bar{X})	39									
总标准偏差(SD)	1.3									
有效数据组数(p)	10									
总相对标准偏差(RSD/%)	3.2									

依据 JJF 1006-1994《一级标准物质技术规范》和 JJF 1343-2012《标准物质定值的通用原则及统计学原理》的要求,标准物质总不确定度一般由三部分组成:(1)通过定值数据的标准偏差、测量次数和确定的置信水平按统计方法得出;(2)对定值方法影响因素的分析,分项计算得出;(3)标准物质均匀性和有效期内的变化所引起的误差。对应本研究

可按以下 4 个部分:(1)均匀性引入的不确定度(u_{hb}),此项可分为袋间均匀性引入的不确定度和袋内均匀性引入的不确定度;(2)稳定性引入的不确定度(u_s),此项可分为短期稳定性引入的不确定度和长期稳定性引入的不确定度;(3)多个实验室定值过程中引入的不确定度(u_{char}),此项可分为所有定值数据的不确定度和定值过程中的各种 B 类不

确定度;(4)标准曲线求得的分析结果的不确定度(u_{cal})。小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质含量定值及不确定见表 5。可以得出所研制的标

准物质各不确定度分量对标准物质总不确定度贡献不同,各实验室定值数据的相对标准偏差在可接受范围内,说明均匀性和稳定性良好。

表 5 小麦粉中 TeA 和 TEN 标准物质含量定值及不确定
Table 5 Certified value and uncertainty of TeA and TEN in wheat flour

含量水平	化合物	相对不确定度/%					扩展不确定度 /($k=2, \mu\text{g}/\text{kg}$)	标准值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
		u_{hb}	u_s	u_{char}	u_{cal}	u		
A	TeA	3.26	1.14	2.00	1.59	4.30	9	98
	TEN	2.73	1.03	2.21	0.79	3.75	2	19
B	TeA	3.40	1.14	1.90	0.78	4.13	17	198
	TEN	2.30	0.58	2.09	0.40	3.20	3	39

3 小结

本标准物质是国内外首次开展,所研制的小麦粉中细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质具有目标物浓度为自然条件下天然含量水平,均匀度好,不确定度小等特点。该标准物质已于 2019 年 7 月通过了国家标准物质的评审并获得国家二级标准物质证书[标准号:GBW(E) 100547 和 GBW(E) 100548]。本标准物质的成功研制,为促进国内交链孢霉毒素检测技术的提升和保证检测数据的准确性提供了技术支持。

参考文献

[1] 荆新艳,李萍,杨学林,等. 国内标准物质概况及重点领域发展现状[J]. 化学分析计量, 2017, 26(6):120-124.
 [2] 胡晓燕. 我国标准物质/标准样品发展综述[J]. 山东冶金, 2006, 28(4):1-4.
 [3] 程涛,田玉平. 食品类标准物质的发展[J]. 中国计量, 2012(8):80-81.
 [4] 赵艳,李娜,谢艳艳,等. 标准物质及其在分析测试中的重要作用[J]. 中国标准化, 2019(19):185-190.
 [5] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of Alternaria toxins in feed and food[J]. EFSA Journal, 2011, 9(10):2407.
 [6] TIEMANN U, TOMEK W, SCHNEIDER F, et al. The mycotoxins alternariol and alternariol methyl ether negatively affect progesterone synthesis in porcine granulosa cells in vitro

[J]. Toxicology Letter, 2009, 186(2):139-145.
 [7] ARCELLA D, ESKOLA M, RUIZ J A G. Dietary exposure assessment to Alternaria toxins in the European population[J]. EFSA Journal, 2016, 14(12):4654.
 [8] 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.
 [9] 卢宪波,陈吉平,王淑秋,等. 贻贝中有机氯农药和多氯联苯标准物质的研制及同位素稀释高分辨质谱法定值[J]. 色谱, 2012, 30(9):915-921.
 [10] 国家标准局. 国家标准 小麦粉:GB/T 1355—1986[S]. 北京:中国标准出版社, 1986.
 [11] 国家技术监督局. 国家计量技术规范 一级标准物质技术规范:JJF 1006-1994[S]. 北京:中国计量出版社, 1994.
 [12] British Standards Institution(BSI). Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability, International Organisation for Standardisation: BS PD ISO GUIDE 35-2017[S]. 2017.
 [13] 谢继安,刘柏林,赵紫薇,等. 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法在小麦粉细交链孢菌酮酸和腾毒素标准物质制备和定值中的应用[J]. 色谱, 2020, 38(7):833-840.
 [14] 国家质量监督检验检疫总局. 国家计量技术规范 标准物质定值的通用原则及统计学原理:JJF 1343-2012[S]. 北京:中国质检出版社, 2012.
 [15] 徐锐锋,方向,徐蓓,等. 同位素稀释质谱法在痕量有机物测量国际比对中的应用[J]. 质谱学报, 2000, 21(4):167.
 [16] 许娇娇,黄百芬,蔡增轩,等. 面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(3):291-294.
 [17] 王向勇,张磊,李敬光,等. 牛乳中二噁英类化合物标准物质的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3):205-209.