

## 实验技术与方法

## 固相萃取-同位素稀释高分辨质谱法测定苹果及橙柑类水果中吗啉残留

沈施<sup>1,2</sup>, 陈达炜<sup>2</sup>, 殷轶群<sup>3</sup>, 苗虹<sup>2</sup>, 赵云峰<sup>2</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050; 2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 3. 大连市西岗区疾病预防控制中心, 辽宁 大连 116014)

**摘要:**目的 建立固相萃取结合高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱的检测方法分析苹果和橙柑类水果中吗啉的残留情况。方法 样品采用含1%甲酸的乙腈-水溶液(1:1, V/V)提取, 经MCX固相萃取柱净化, BEH HILIC色谱柱分离, 以含0.1%甲酸的乙腈、含0.1%甲酸和4 mmol/L 甲酸铵的水溶液作为流动相进行梯度洗脱分离。采用正离子采集模式对样品进行分析, tSMS采集模式定量分析, 内标法测定。结果 吗啉在1~100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内呈良好的线性关系, 回归系数 $r^2 > 0.999$ , 该方法的检出限和定量限分别为5和10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在不同加标水平下的平均回收率为81.3%~103.7%, 日内和日间精密度假别为2.7%~7.4%和1.7%~8.1%。结论 本方法灵敏、准确, 适用于苹果和橙柑类水果中吗啉残留的分析测定, 具有很好的实际应用价值。

**关键词:** 高分辨质谱; 固相萃取; 吗啉; 同位素稀释; 水果; 苹果; 橙柑; 被膜剂

中图分类号: R155; O657.63 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0127-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.007

### Determination of morpholine in apples and citrus by solid phase extraction-high resolution mass spectrometry with isotope dilution technique

SHEN Shi, CHEN Da-wei, YIN Yi-qun, MIAO Hong, ZHAO Yun-feng

(National Institute for Nutrition and Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To establish a solid phase extraction (SPE) /high-resolution benchtop Q exactive mass spectrometry (HRMS) method for the analysis of morpholine in apples and citrus. **Methods** The samples were first extracted with 1% formic acid in acetonitrile-water (1:1, V/V) and then cleaned up using SPE procedure. The chromatographic analysis was performed on a BEH HILIC column with 0.1% formic acid and 4 mmol/L ammonium formate in water/acetonitrile as the mobile phase with gradient elution. The internal standard calibration was used for quantification. **Results** The linearity was satisfying within 1-100  $\mu\text{g}/\text{L}$ , and the coefficients of determination ( $r^2$ ) were above 0.999 for morpholine. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were 5 and 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. The recoveries of the spiked apples and citrus samples at the levels of 10, 20, and 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ranged from 81.3%-103.7%, with intra-day repeatability and inter-day reproducibility precision 2.7%-7.4% and 1.7%-8.1%, respectively. **Conclusion** The method was sensitive and accurate, and was suitable for the analysis of morpholine in apples and citrus.

**Key words:** High resolution mass spectrometry; solid phase extraction; morpholine; isotope dilution; fruit; apples; citrus; coating agents

吗啉, 又名吗啡啉, 是一种无色油状具有挥发性并带有氨味的液体。吗啉主要用于橡胶硫化促进剂的生产, 还用于表面活性剂、纺织印染助剂、医

药、农药的合成。吗啉还用于顺丁二烯聚合用催化剂、腐蚀抑制剂、光学漂白剂之中。吗啉的盐类也被广泛使用, 吗啉盐酸盐等是有机合成的中间体; 吗啉脂肪酸盐可作水果或瓜果类蔬菜表皮的被膜剂, 可适当抑制呼吸作用, 防止水分的挥发及表皮的萎缩<sup>[1-3]</sup>。吗啉对皮肤、眼、消化道具有刺激性, 可通过皮肤接触和吸入导致机体中毒<sup>[4]</sup>。另外, 吗啉在一定的环境和生理条件下(如在饮食中摄入亚硝酸盐)可以发生硝基化反应生成亚硝基吗啉, 而亚硝基吗啉对人类具有潜在的致癌性<sup>[5]</sup>。加拿大

收稿日期: 2014-12-07

基金项目: 科技部国际合作项目“食品污染监测与风险评估技术合作研究”(2011DFA31770)

作者简介: 沈施 女 助理研究员 研究方向为食品卫生与营养  
E-mail: shenshiss@126.com

通讯作者: 赵云峰 男 研究员 研究方向为食品安全  
E-mail: zhaoyf703@126.com

卫生部门基于毒性研究中未观察到有害作用水平 (NOAEL) 的结果为 96 mg/kg BW, 评估吗啉的每日允许摄入量 (ADI) 为 0.48 mg/kg BW<sup>[6]</sup>。在我国, 吗啉脂肪酸盐是被批准用于新鲜水果的被膜剂, 并主要用于苹果及橙柑类水果中, 使用量按照生产需要适量使用, 而欧盟食品添加剂法规则取消吗啉作为水果表面处理剂的原料<sup>[7-8]</sup>。鉴于吗啉对人体健康潜在的危害, 我国有必要对吗啉作为水果被膜剂进行安全性评估, 然而目前我国鲜有苹果和橙柑类水果中吗啉残留方法及其相关数据的报道。因此, 建立一套灵敏、准确、可靠的苹果和橙柑类水果中吗啉残留检测方法至关重要。

吗啉的残留检测早期主要是采用气相色谱法 (GC) 和气相色谱-质谱法 (GC-MS)<sup>[9-12]</sup>。近期, Hengel 等<sup>[13]</sup>报道了苹果和橙柑类水果中吗啉残留的液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定。但该方法仅通过简单的样品提取稀释, 未经过样品的净化过程, 从而导致了 >20% 的基质离子抑制作用, 对检测仪器具有一定的污染。本研究基于吗啉的结构特点, 建立了以固相萃取柱为净化方法<sup>[14]</sup>, 采用同位素稀释高分辨质谱的检测方法。高分辨质谱的使用在很大程度上降低了假阳性结果的出现, 而同位素稀释有效地减轻了基质效应, 从而明显提高了方法的准确性和重复性。该方法灵敏、准确, 适合苹果和橙柑类水果中吗啉残留的快速检测。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

苹果和橙柑类水果购自北京各大超市。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

Q Exactive 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱系统、Dionex UltiMate 3000 快速高效液相色谱系统均购自美国 Thermo Scientific, 固相萃取装置 (美国 Supelco), MCX、HLB 和 WCX 固相萃取柱均购自美国 Waters (60 mg/3 ml), 涡旋混合器。

乙腈、甲醇均为色谱纯, 甲酸、甲酸铵均为色谱级, 吗啉标准品 (CAS: 110-91-8, 纯度 > 98%, 美国 Supelco), 吗啉-*d*<sub>8</sub> 标准品 (DLM-8254, 纯度 > 98%, 美国 Cambridge Isotope Laboratories), 实验用水为超纯水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准溶液配制

准确称取吗啉标准品 0.01 g (精确至 0.000 1 g) 于 10 ml 容量瓶中, 以乙腈定容, 配制成 1 000 mg/L 的标准储备溶液, 冷冻 (-18 ℃ 以下) 贮存。用乙腈

稀释标准储备溶液, 配制成各浓度的标准工作液, 冷藏 (约 4 ℃) 贮存。

准确称取吗啉-*d*<sub>8</sub> 内标物 0.01 g (精确至 0.000 1 g) 于 10 ml 容量瓶中, 以乙腈定容, 配制成 1 000 mg/L 的标准储备溶液, 冷冻 (-18 ℃ 以下) 贮存。再用乙腈稀释至中间液 10 mg/L 和工作液 1 mg/L, 冷藏 (约 4 ℃) 贮存。

#### 1.2.2 样品制备

参照 GB/T 8855—2008《新鲜水果和蔬菜取样方法》<sup>[15]</sup> 和 NY/T 789—2004《农药残留分析样本的采样方法》<sup>[16]</sup>, 取约 3 kg 苹果或橙柑类水果全果进行匀浆, 待用。

#### 1.2.3 样品处理

准确称取苹果或橙柑类水果匀浆样品 10 g (精确至 0.001 g) 于 50 ml 离心管中, 加入 10 mg/L 吗啉-*d*<sub>8</sub> 内标溶液 40 μl, 涡旋混匀后, 超声提取 15 min; 加入 10 ml 含 1% 甲酸的乙腈-水溶液 (1:1, V/V), 涡旋混匀 1 min, 超声提取 10 min 后, 以 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 50 ml 离心管中, 用乙腈定容至 20 ml, 待净化处理。取上述待净化液 1 ml 于 MCX 固相萃取小柱上 (小柱预先用 3 ml 甲醇和 3 ml 水淋洗), 待净化液完全通过柱床后, 分别用 2 ml 水和 2 ml 乙腈淋洗小柱。然后真空抽干, 用 2 ml 含 2% 氨水的乙腈溶液洗脱, 收集洗脱液, 待超高效液相色谱-串联质谱法 (UHPLC-MS/MS) 分析。

#### 1.2.4 仪器条件

色谱条件: Waters ACQUITY UPLC BEH HILIC 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为水 (含 0.1% 甲酸和 4 mmol/L 甲酸铵), B 为乙腈 (含 0.1% 甲酸); 梯度洗脱: 0 ~ 2 min 90% B, 2 ~ 6 min 90% ~ 40% B, 6 ~ 9 min 40% ~ 90% B; 进样量 10 μl; 流速 300 μl/min; 柱温 40 ℃。

质谱条件: 采用 HESI 离子化方式, 喷雾电压 3.5 kV, 毛细管温度 325 ℃, 加热器温度 350 ℃, 鞘气 30 arb, 辅助气 10 arb, 扫描模式 tMSMS, 正离子采集模式, 分辨率采用 70 000 FWHM; 吗啉及其内标吗啉-*d*<sub>8</sub> 分别采用其各自的二级碎片离子 *m/z* 70.065 8 和 *m/z* 78.115 9 进行定量。

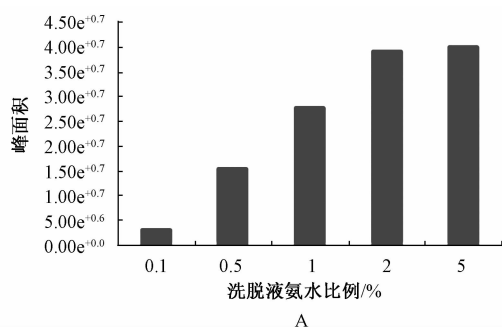
## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理的优化

提取方法的优化: 根据文献<sup>[13]</sup>, 采用含 1% 甲酸的乙腈-水溶液 (1:1, V/V) 进行提取。鉴于吗啉的低分子量、极好的水溶性以及碱性结构特点, 采用含 1% 甲酸的乙腈-水溶液 (1:1, V/V) 有助于吗啉的提取。另外, 采用 1 份吗啉残留阳性样品考察用

10 ml 1% 甲酸的乙腈-水溶液(1:1, V/V)提取1次和2次的效果,结果表明用10 ml 溶剂提取1次和2次没有明显差异,故本试验选择用10 ml 1% 甲酸的乙腈-水溶液(1:1, V/V)提取1次。

固相萃取柱的选择:本试验选择3种固相萃取柱(HLB、WCX和MCX)进行预筛选试验。以100  $\mu\text{g/L}$  的吗啡标准溶液进行考察3种色谱柱对吗啡的吸附性能,结果发现,HLB对于水溶性的吗啡保留较差,回收率低;而WCX作为一种弱阳离子交换柱,虽对吗啡的吸附能力有所提高;但相比强阳离子交换柱,MCX对于吗啡具有更优的吸附能力,回收率达到93%,见表1。由于固相萃取柱的填充剂量会影响对目标物的保留能力,本试验对于装填60和150 mg的MCX



柱进行比较,发现两种填充剂量对吗啡的保留能力无明显区别。为了进一步获得更优的MCX柱洗脱程序,分别对洗脱液的氨水比例和洗脱体积进行优化,见图1,2 ml的2%氨水-乙腈溶液能够很好的完成吗啡的洗脱,回收率达到90%以上。

表1 3种固相萃取柱的洗脱程序及对吗啡的回收率

Table 1 Recovery and comparison of three different SPE for morpholine

固相萃取柱	规格 /mg	淋洗液	洗脱液	回收率 /%
HLB	60	2 ml 水	2 ml 乙腈	9
WCX	60	2 ml 水 + 2 ml 乙腈	2 ml 2% 甲酸-乙腈	58
MCX	60	2 ml 水 + 2 ml 乙腈	2 ml 2% 氨水-乙腈	93

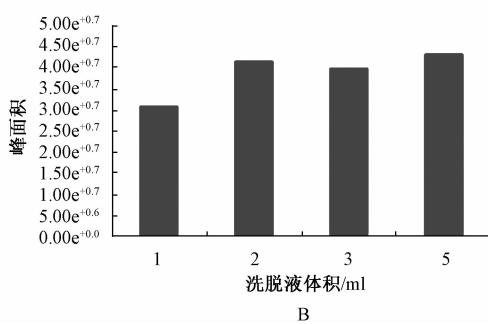


图1 洗脱液氨水比例(A)和体积(B)的优化

Figure 1 Optimization for the concentration of ammonium hydroxide (A) and volume (B)

## 2.2 液相色谱和质谱条件的优化

色谱条件的优化:本试验考察了UPLC BEH  $C_{18}$ 柱、HSS  $T_3$ 柱和BEH HILIC 3种色谱柱在各自最优的洗脱程序下对吗啡的保留行为。结果发现,由于吗啡分子量小及极性大等特点,BEH  $C_{18}$ 和HSS  $T_3$ 两种色谱柱对吗啡保留情况不佳,保留时间分别为1.22和2.13 min,而采用BEH HILIC色谱柱,能对吗啡具有较好的色谱保留(4.38 min)。另外,同一浓度水平下的吗啡标准溶液(100  $\mu\text{g/L}$ )在3种色谱柱上的离子响应不同,在HILIC色谱柱上的离子响应效果明显好于其他两种色谱柱,这可能与化合物在色谱柱上的保留行为有关。因流动相的组成会影响化合物的峰形及离子化效率,本研究比较了4 mmol/L 甲酸铵和0.1% 甲酸的水溶液作为流动相A,含0.1% 甲酸的乙腈作为流动相B的效果。结果表明,在ESI+电离模式下,0.1% 甲酸有利于目标化合物的离子化,提高离子响应值,且也有助于改善吗啡的峰形,而4 mmol/L 甲酸铵有助于维持流动相梯度洗脱中pH值的稳定。综上所述,本研究以含4 mmol/L 甲酸铵和0.1% 甲酸的水溶液作为流动相A,含0.1% 甲酸的乙腈作为流动相B。

质谱条件的优化:Q Exactive 高分辨质谱仪是四

级杆质谱与Orbitrap质谱的串联,具有高分辨率和高灵敏度的特点。根据文献[17],Q Exactive质谱主要以Full Scan、tSIM和tMSMS 3种扫描模式进行定量分析,但tMSMS扫描模式与其他两种模式相比,在更为复杂基质情况下往往具有更优的选择性,从而具有更佳的信噪比,其等同于三重四级杆质谱仪MRM的扫描模式。tMSMS模式是先通过四级杆选择指定目标化合物的母离子,而后经过高能碰撞池进行碎片裂解,以精确碎片离子进行定量。本试验进一步以100  $\mu\text{g/L}$  的吗啡和吗啡- $d_8$ 标准溶液进行tMSMS扫描模式的碰撞能量(NCE)优化,以达到最佳的分析效果,同时获取吗啡和吗啡- $d_8$ 的二级碎片质谱信息,见表2。综合上述优化分析,吗啡和吗啡- $d_8$ 的总离子流图和二级质谱图见图2。

表2 质谱条件

Table 2 Mass spectrometry conditions

目标物	保留时间 /min	母离子 /( $m/z$ )	碎片离子 /( $m/z$ )	碰撞能量 /%
吗啡	4.38	88.076 1	70.065 8	75
吗啡- $d_8$	4.40	96.126 2	78.115 9	75

## 2.3 基质效应

用含2%氨水的乙腈溶液配制浓度范围1~100  $\mu\text{g/L}$  的吗啡混合标准溶液并绘制标准曲线,同

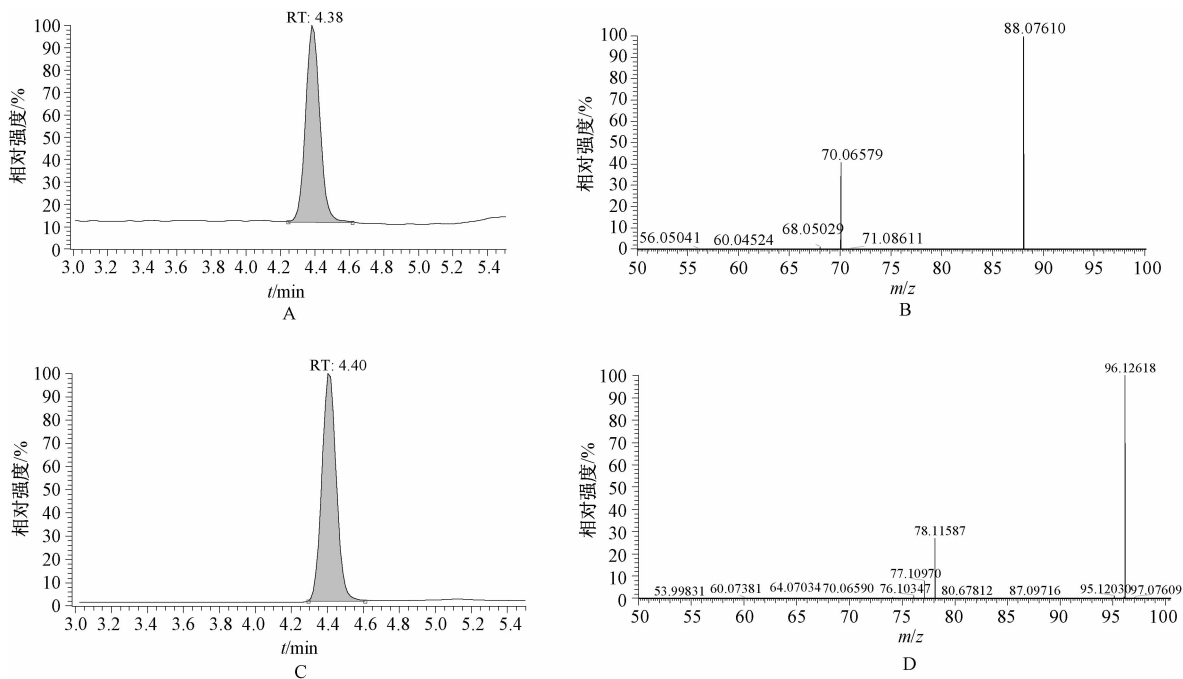


图2 吗啉和吗啉- $d_8$  标准溶液(10  $\mu\text{g/L}$ )的总离子流图(A和C)及二级碎片质谱图(B和D)

Figure 2 Ion chromatograms (A and C) and MS spectra (B and D) for morpholine and morpholine- $d_8$  at 10  $\mu\text{g/L}$

时称取空白苹果和橙柑样品,按照 1.2.3 提取净化,并对空白样品进行分析,确定其不含有痕量目标化合物后,再用空白样品液配制系列同浓度的基质混合标准溶液并绘制标准曲线。以基质标准溶液和溶剂标准溶液的标准曲线斜率比值作为评价基质效应,比值越接近 1.0 说明基质效应越弱。结果表明,吗啉在苹果和橙柑样品的曲线斜率比值分别为 0.86 和 0.84,提示吗啉在苹果和橙柑样品中存在一定的基质抑制效应。根据 Frenich 等<sup>[18]</sup>的研究结果认为基质效应在 0.8 ~ 1.2 之间为存在弱的基质效应,是可以接受的,而超出此范围之外则认为存在强的基质效应。为了准确地定量苹果和橙柑样品中的吗啉,确保定量分析结果的可靠性,本试验采用同位素内标法进行定量。

#### 2.4 线性范围、检出限及定量限

配制吗啉的系列标准溶液,浓度范围为 1 ~ 100  $\mu\text{g/L}$ ,按本试验的色谱和质谱条件进行分析,内标法定量分析,内标浓度为 10  $\mu\text{g/L}$ 。结果表明,吗啉在 1 ~ 100  $\mu\text{g/L}$  的浓度范围内均呈良好的线性关系,相关系数  $r^2 > 0.999$ 。在空白样品中分别添加 5、10、20  $\mu\text{g/kg}$  3 个水平的吗啉标准,按已建立的方法测定,以最接近 3 倍信噪比的加标水平进行计算,3 倍信噪比对应的加标水平为检出限,10 倍信噪比对应的加标水平为定量限,具体结果:线性范围为 1 ~ 100  $\mu\text{g/L}$ ,线性方程为  $y = 0.10552x + 0.022816$ ,  $r^2 = 0.9997$ ,检出限为 5  $\mu\text{g/kg}$ ,定量限为 10  $\mu\text{g/kg}$ 。

#### 2.5 准确度和精密度

分别取苹果和橙柑空白样品进行加标回收试验,添加吗啉的浓度为 10、20 和 100  $\mu\text{g/kg}$  3 个水平。按照 1.2.3 样品处理进行提取净化,用 Q Exactive 高分辨质谱测定,每个浓度水平重复 6 次,回收率及日内精密度( $RSD_i$ )和日间精密度( $RSD_R$ )结果见表 3。3 个加标水平下,吗啉在橙柑样品中的回收率在 81.3% ~ 103.7% 之间, $RSD_i$  和  $RSD_R$  分别为 3.7% ~ 7.4%、2.4% ~ 8.1%;而吗啉在苹果样品中的回收率在 84.2% ~ 98.7% 之间, $RSD_i$  和  $RSD_R$  分别为 2.7% ~ 5.1%、1.7% ~ 4.7%。结果表明本方法的准确度和精密度良好。

表3 不同添加浓度下回收率和日内、日间精密度

Table 3 Recovery and precision of different spiked levels

样品	加标水平 / $(\mu\text{g/kg})$	平均回收率 /%	$RSD_i$ /% ( $n=6$ )	$RSD_R$ /% ( $n=5$ )
橙柑	10	81.3	7.4	8.1
	20	86.7	4.3	5.6
	100	103.7	3.7	2.4
苹果	10	84.2	5.1	3.8
	20	91.6	4.6	4.7
	100	98.7	2.7	1.7

#### 2.6 实际样品测定

采用本文所建立的分析方法,对北京市市售的 10 份橙柑和 6 份苹果进行吗啉残留检测,检出 4 份橙柑样品中含有吗啉残留,含量为 34.1 ~ 526.0  $\mu\text{g/kg}$ ,2 份苹果样品中检出吗啉含量为 136.4 ~ 467.8  $\mu\text{g/kg}$ 。图 3 为实际阳性苹果和橙柑样品在分辨率为 70 000 FWHM 下的吗啉总离子色谱图以

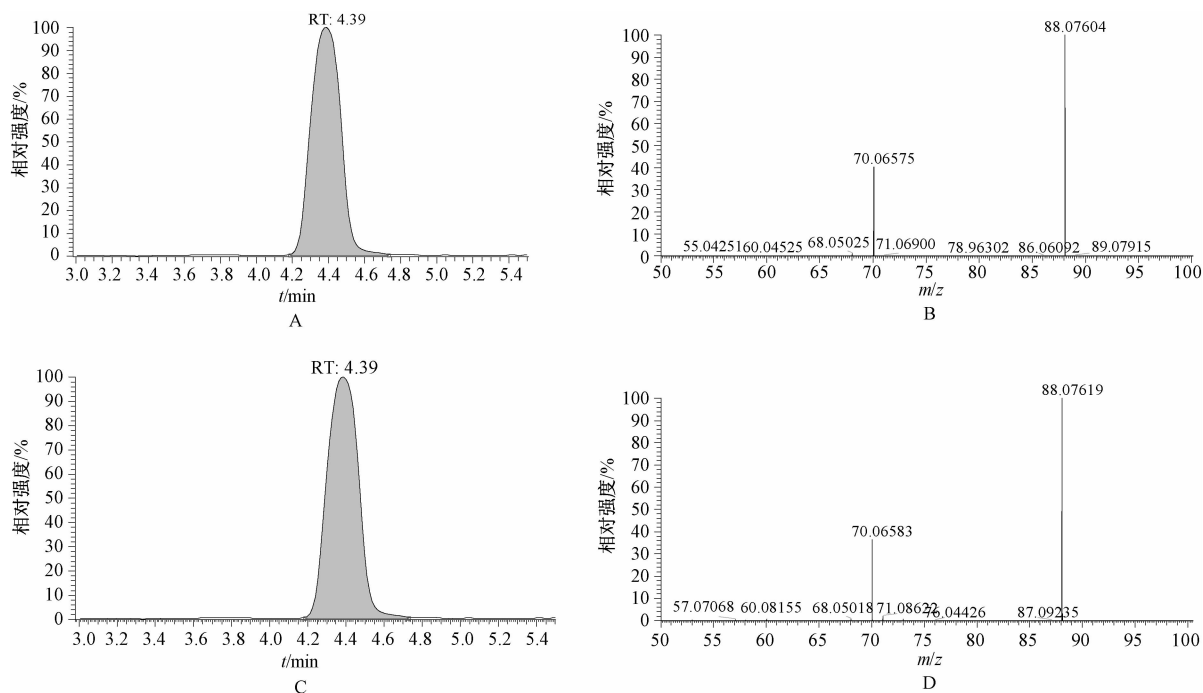


图3 苹果和橙柑阳性样品的总离子色谱图(A和C)和二级碎片质谱图(B和D)

Figure 3 Ion chromatograms (A and C) and MS spectra (B and D) for the positive apple and citrus samples

及二级碎片质谱图。

### 3 小结

本研究采用同位素稀释技术,建立了以固相萃取柱净化的超高效液相色谱-高分辨质谱检测苹果和橙柑类水果中吗啉残留的方法。结果表明,该方法采用固相萃取柱净化方法,在一定程度上降低了样品的基质效应。通过高分辨质谱的 tMSMS 扫描模式进行定性分析和定量检测,有效降低了假阳性结果出现的可能性。而选用同位素内标进行同位素稀释法测定,有效克服了样品前处理及其基质效应所带来的误差,明显提高了方法的准确性和重复性。所建立的方法灵敏度高,定量限为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,能够满足实际样品的吗啉残留分析。经实际样品的检测,该方法灵敏、准确,适合于苹果及橙柑类水果中吗啉的残留检测。

### 参考文献

- [1] Mcguire R G, Dimitroglou D A. Evaluation of shellac and sucrose ester fruit coating formulations that support biological control of post-harvest grapefruit decay[J]. *Biocontrol Sci Technol*, 1999, 9(1): 53-65.
- [2] 张晓彦,刘伟民. 国内外果蔬涂膜技术动态[J]. *食品科技*, 2000, 26(6): 2-3.
- [3] 黄金霞,王宏伟,宋长华,等. 吗啉市场与技术进展[J]. *化学工业*, 2012, 30(9): 22-25.
- [4] IARC. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 47, some organic solvents, resin monomers and

related compounds, pigments and occupational exposures in paint manufacture and painting, Lyon [M]. International Agency for Research on Cancer, 1989: 199-213.

- [5] Inui N, Nishi Y, Taketomi M, et al. Transplacental mutagenesis of products formed in the stomach of golden hamsters given sodium nitrite and morpholine[J]. *International Journal Cancer*, 1979, 24(3): 365-372.
- [6] Health Canada. Archived-A summary of health hazard assessment of morpholine in wax coatings of apples[R]. 2013.
- [7] 中华人民共和国卫生部. GB 2760—2011 食品添加剂使用标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [8] European Union. European Union food additives database [DB/OL]. [2013-9-13]. [https://webgate.ec.europa.eu/sanco\\_foods/main/index.cfm](https://webgate.ec.europa.eu/sanco_foods/main/index.cfm).
- [9] SEN N P, Baddoo P A. An investigation on the possible presence of morpholine and *N*-nitrosomorpholine in wax-coated apples[J]. *J Food Sci*, 1988, 53(1): 183-191.
- [10] Hotchkiss J H, Vechio A J. Analysis of direct contact paper and paperboard food packaging for *N*-nitrosomorpholine and morpholine[J]. *J Food Sci*, 1983, 48(1): 240-242.
- [11] SEN N P, Baddoo P A. Origin of *N*-nitrosomorpholine contamination in margarine [J]. *J Food Sci*, 1986, 51(1): 216-217.
- [12] 李晶,刘清华,于连贵,等. 气质联机测定水体中的吗啉[J]. *工业水处理*, 2009, 29(11): 61-63.
- [13] Hengel M J, Jordan R, Maguire W. Development and validation of a standardized method for the determination of morpholine residues in fruit commodities by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62(17): 3697-3701.
- [14] 张娟雯,郭春海,葛世辉,等. 固相萃取-超高效液相色谱串联质谱法同时测定豆芽中 6-苄基腺嘌呤、赤霉素和 4-氯苯氧乙酸的残留量[J]. *中国食品卫生杂志*, 2014, 26(5): 441-445.

- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 8855—2008 新鲜水果和蔬菜取样方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [16] 中华人民共和国农业部. NY/T 789—2004 农药残留分析样品的采样方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [17] Kumar P, Rubies A, Centrich F, et al. Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometry; applic 45 ation to determination of synthetic hormones in animal urine[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 780(1): 65-73.
- [18] Fernich A G, Romero-González R, Gómez-Pérez M L, 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]. *J Chromatogr A*, 2011, 1218(28): 4349-4356.

## 实验技术与方法

# 实时荧光定量 PCR 法与分离培养法检测食品从业人员沙门菌和志贺菌的比较研究

韩毅, 孙燕萍, 周虹, 毛菲菲

(无锡市疾病预防控制中心, 江苏 无锡 214023)

**摘要:**目的 比较实时荧光定量 PCR 法(RT-PCR)与分离培养法对食品从业人员肠道致病菌沙门菌和志贺菌的检测效果。方法 ①RT-PCR 法:用实时荧光定量 PCR 对体检肛拭子进行初筛;②分离培养法:按照国标方法 GB/T 4789.4—2010《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》和 GB/T 4789.5—2003《食品卫生微生物学检验 志贺氏菌检验》对所筛选出的菌株进行鉴定。结果 RT-PCR 法对食品从业人员肠道沙门菌和志贺菌的检出率明显高于分离培养法。结论 RT-PCR 法相对于分离培养法在从业人员体检沙门菌和志贺菌的检测中,无论从检出率、准确度,还是检测时效性上都有着明显的优势。因此,在从业人员体检中运用 RT-PCR 法具有很好的实际意义。

**关键词:**沙门菌;志贺菌;实时荧光定量 PCR 法;分离培养法;比较;食源性致病菌

中图分类号:R155; R378; R378.2<sup>+</sup>2 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)02-0132-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.02.008

## Comparison of RT-PCR method and culture method for the detection *Salmonella* and *Shigella* from food practitioners

HAN Yi, SUN Yan-ping, ZHOU Hong, MAO Fei-fei

(Wuxi Center for Disease Control and Prevention, Jiangsu Wuxi 214023, China)

**Abstract: Objective** To compare the effect of RT-PCR and isolated culture for the detection of food practitioners of *Salmonella* and *Shigella*. **Methods** ① RT-PCR, ② isolated culture. **Results** The detection rate of RT-PCR was significantly higher than that in isolated culture for food practitioners intestinal *Salmonella* and *Shigella*. **Conclusion** RT-PCR method was superior to the isolation and culture method in the detection of practitioners physical examination of *Salmonella* and *Shigella* in terms of detection rate, accuracy and timeliness. Therefore, the use of RT-PCR in the physical examination of employees has very important practical application value.

**Key words:** *Salmonella*; *Shigella*; real-time PCR; isolated culture; compare; foodborne pathogens

根据我国相关法律法规的要求,食品从业人员不能携带有伤寒、副伤寒和痢疾病原菌,否则将不能取得健康证和在该领域从业。但是引起人群感染和腹泻的往往是其他血清型的沙门菌和志贺菌。

因此对从业人员体检中的沙门菌和志贺菌加强监测和管理很有必要。

目前,在我国绝大多数地区,传统的分离培养方法仍是检测沙门菌和志贺菌的主要方法,此方法检测时限长、工作量大、灵敏度低,远不能满足大批量食品从业人员体检的要求。

利用实时荧光定量 PCR (real-time PCR, RT-