

研究报告

面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质的研制

许娇娇¹,黄百芬¹,蔡增轩¹,赵云峰²,任一平¹

(1. 浙江省疾病预防控制中心,浙江 杭州 310051; 2. 国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

摘要:目的 目前国内尚缺乏用于质量控制的镰刀菌毒素类生物标准物质,通过研制面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇化合物的标准物质,期望填补该方面的空缺。方法 选择满足 JJG 1006—94《一级标准物质》候选物筛选原则和要求的面粉样品作为研制对象,经均质、分装、灭菌后,以同位素稀释-液相色谱-串联质谱法测定脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量,经均匀性和稳定性试验后,采用 8 家实验室联合定值的方法对面粉基质中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量进行定值及不确定度分析。结果 随机抽取 16 袋样品作均匀性检验,分析结果经 F 检验,统计量 $F < F_{(\alpha=0.05)}$ 的临界值,样品均匀性良好。在室温 25 °C 放置一年、44 °C 放置 14 天后分别进行了检测,考察其稳定性,测试结果显示特征值在考察时间范围内无明显变化。采用同位素稀释-液相色谱-串联质谱法,与国内 8 家权威机构实验室进行协同定值,研制得到脱氧雪腐镰刀菌烯醇特征值为 $(2\ 366 \pm 187) \mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 本研究提出了面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质的研制,为镰刀菌毒素类化合物检测提供质控参考和能力评价依据。

关键词:面粉; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 真菌毒素; 同位素稀释-液相色谱-串联质谱法; 标准物质; 食品安全; 食品污染物

中图分类号:R155 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2016)03-0291-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2016.03.003

Development and certification of a reference material for deoxynivalenol in wheat flour

XU Jiao-jiao, HUANG Bai-fen, CAI Zeng-xuan, ZHAO Yun-feng, REN Yi-peng

(Zhejiang Provincial Center of Disease Control and Prevention, Zhejiang Hangzhou 310051, China)

Abstract: Objective Because of lacking of domestic fusarium mycotoxins reference materials for quality control, the certified reference materials (CRM) of deoxynivalenol was prepared and certificated. **Methods** According to the requirements of JJG 1006-94, the wheat flour samples were homogenized, packed and sterilized. Homogeneity, stability studies and assignment of the certified mass fraction were based upon an in-house study using high-performance liquid chromatography isotope-dilution tandem mass spectrometry. Simultaneously, an inter-laboratory comparison study involving eight laboratories was conducted in order to support the in-house certification study. **Results** Three samples from 16 randomly selected packages were quantitatively analyzed. Shelf life at a storage temperature of 25 °C for one year (long-term stability) or 44 °C for 14 days (short-term stability) was considered. The data were evaluated by ANOVA test. There was no significance of homogeneity and stability. The certified values and the corresponding uncertainty was $(2\ 366 \pm 187) \mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** The natural reference material was produced with a certified deoxynivalenol in wheat flour showing relevant mass fractions. The intended purpose of this reference material, for deoxynivalenol, is not only attributed to laboratory internal quality control but also in facilitating the validation of new analytical methods.

Key words: Deoxynivalenol; wheat flour; high-performance liquid chromatography isotope-dilution tandem mass spectrometry; fungaltxin; certified reference materials; food safety; food contaminant

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON),又称为呕吐毒素(vomitoxin)。该类毒素是镰刀菌在适宜的环境条件

下产生的有毒代谢产物,不仅污染小麦、大麦、玉米等禾谷类作物,也危害肉、奶等畜产品^[1]。该毒素除了会引起机体胃肠道急性呕吐反应外,长期摄入还可影响动物的生长、繁殖,以及对血液系统、免疫系统均有不容忽视的影响^[2-4]。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇是目前国内外粮谷类食品中检出率最高、污染最普遍的真菌毒素,我国对脱氧雪腐镰刀菌烯醇的暴露监测及污染控制已经全面展开。液相色谱-质谱联用法,为目前国际公认

收稿日期:2015-11-25

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划课题(2011BAK10B07);浙江省公益技术应用研究(分析测试)(2015C37047)

作者简介:许娇娇 女 技师 研究方向为食品检验

E-mail:jjxucde@163.com

通信作者:任一平 男 高级工程师 研究方向为食品卫生理化检验

E-mail:renyiping@263.net

的最有效的检测目标化合物的确证方法,也是国际许多生物标准物质研制定值的方法之一。该方法可采用多种前处理方法,包括免疫亲和柱净化法、多功能柱净化法和固相萃取柱净化法等^[5-8],且适用范围较广,基本适用于食品基质的多样性与复杂性。近十年来,本课题组不断地创新和完善真菌毒素检测和筛查方法,采用同位素稀释-质谱法建立了多种真菌毒素的定性定量检测平台^[8-9],并在国际真菌毒素检测定量考核中表现很好。

食品与农产品本身固有易变化的特性,使得单纯采用传统的纯化学物质标准品检测方法已难以满足日渐增长的要求,需要同时采用纯化学物质标准品与基体标准物质对检测体系进行评价。标准物质作为具有准确量值的测量标准,既可用于量值溯源及实验室质量保证能力的评价,也能对监测体系做出客观的评价^[10]。截至目前为止,国际标准物质数据库(COMAR)可查的面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质仅有国际上的BCR-377、BCR-396和ERM-BC600 3种^[11],售价昂贵,且购买不便,远不能满足国内监测的需要。而我国尚未有自行研制的脱氧雪腐镰刀菌烯醇生物标准物质。因此,研制粮谷类食品中脱氧雪腐镰刀菌的标准物质迫在眉睫。

本文以天然食品面粉为候选物,研制了脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质,这将是我国首个真菌毒素生物标准物质,以期为我国食品中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇暴露评估与控制提供测量校准和质量控制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料样品的选择及候选物的制备

根据浙江省2012—2014年谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的风险监测结果发现,在小麦粉样品中,脱氧雪腐镰刀菌烯醇检出率高达95%以上,且含量分布较为宽泛。因此,在市场上采集的小麦粉样品可较为充分地反映样品采集的广泛性及代表性,从而可在一定程度上体现出研究结果的普遍性。根据JJG 1006—94《一级标准物质》^[12]的要求对市售面粉样品进行筛选,将同一批次不同包装的样品等分在干粉混料机内搅拌均匀12 h。混合后样品使用铝箔袋分装500袋,每包装约100 g。为了保证脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质在存放过程中的稳定性,使用Co-60 γ 射线对样品进行照射灭菌,照射剂量为5 kGy,在25℃密封箱中保存。

1.1.2 主要仪器与试剂

Xevo TQ 超高压液相色谱-质谱联用仪(美国Waters)、分析电子天平、离心机、氮吹仪、Mycosep®

226 多功能净化柱(奥地利RomerLab)。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇($C_{15}H_{20}O_6$, CAS:51481-10-8, IRMM-315, 欧盟委员会联合研究中心标准物质与测量研究院), ^{13}C -脱氧雪腐镰刀菌烯醇同位素(纯度 $\geq 99\%$, 奥地利RomeLab), 乙腈、甲醇均为色谱纯, 氨水(分析纯), 试验用水为超纯水。小麦粉标准物质[TR-D100, 标示值(0.8 ± 0.2) mg/kg, 美国Trilogy]。

1.2 方法

1.2.1 样品的提取与净化

准确称取样品2.0 g, 加入适量同位素内标溶液, 10 ml 乙腈-水(84:16, V/V) 溶液超声提取20 min。10 000 r/min 离心5 min, 取上清液按照Mycosep® 226 多功能净化柱说明书净化。取5 ml 净化液于50℃氮气下吹干, 1 ml 初始流动相复溶, 过滤进样。

1.2.2 仪器条件

色谱: Waters Acquity UPLC BEH C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 50 mm, 填料粒径1.7 μm), 流动相以0.01% 氨水为水相(A), 乙腈为有机相(B), 线性梯度洗脱: 0~0.8 min, 2% B; 3.0~4.0 min, 24% B; 6.0~6.9 min, 100% B; 6.9~7.0 min, 2% B。进样量5 μl 。

质谱: 电喷雾离子源(ESI), 负离子模式; 毛细管电压2.5 kV; 离子源温度150℃; 脱溶剂气温度500℃; 多反应监测模式: DON 离子对参数 m/z 295 > 265、295 > 138; ^{13}C -DON 同位素内标离子对参数 m/z 310 > 279、310 > 261。

1.2.3 均匀性考察

按照抽样方案^[13]规定, 从制得的500袋包装中随机抽取16袋进行均匀性检测, 随机编号1~16。每一袋样品重复测定3次, 样品检测每次最小取样量为2.0 g。

1.2.4 稳定性考察

取制备的标准物质30袋, 分为10组, 每组3袋, 分别在25℃(5组)、44℃(4组)条件下保存。测试时间分别为样品制备完成后当天, 25℃存放第0、1、3、6、12月和44℃存放第0、1、7、14天。测定时随机取样1组, 每组测定3次。

2 结果与分析

2.1 均匀性检验

均匀性检验的数据采用 F 检验进行统计分析, 此法是通过组间变动性(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误差, 如果二者的比 $F(F = S_1^2/S_2^2)$ 小于统计检验的临界值 F_{α} , 则认为样品是均匀的。从表1的检验结果数据可以

看出,该统计量 F 是自由度为 (15, 32) 的 F 分布变量。根据自由度 (15, 32) 及给定的显著性水平 α (本检验中取 $\alpha = 0.05$), 可由 F 值表查得临界值 $F_{(5, 32)} = 2.01$, 即 $F < F_{\alpha}$, 则认为组内与组间差异无统计学意义, 样品是均匀的。

2.2 稳定性检验

稳定是生物类标准物质研制中的关键环节。脱氧雪腐镰刀菌烯醇化学性质稳定, 探索保存方式时发现采用辐照杀菌方式不会引起脱氧雪腐镰刀菌烯醇浓度的变化。以每组样品的平均值为各时间点的特性值, 采用一元线性拟合方程进行稳定性检验分析。检验结果表明(表 2), 目标物浓度随时间的测定值在规定时间内均无明显的上升或下降趋势, 且变化范围均在特征值及其不确定度范围内。因此该标准物质在 44 °C 的模拟运输条件下保存 14 天或室温 (25 °C) 条件下保存一年, 均能保持稳定, 能够满足标准物质实际的运输和保存要求。

表 1 面粉中 DON 均匀性分析检测结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 1 Results of homogeneity for deoxynivalenol in wheat flour

样品号/子编号	1	2	3	均值	S_1^2	S_2^2	F
SAM C01	2 587	2 687	2 502	2 592	20 113	19 905	1.01
SAM C02	2 251	2 055	2 170	2 158			
SAM C03	2 490	2 316	2 630	2 479			
SAM C04	2 537	2 566	2 367	2 490			
SAM C05	2 089	2 246	2 346	2 227			
SAM C06	2 223	2 466	2 264	2 318			
SAM C07	2 482	2 594	2 653	2 576			
SAM C08	2 608	2 398	2 509	2 505			
SAM C09	2 605	2 570	2 854	2 676			
SAM C10	2 440	2 740	2 376	2 519			
SAM C11	2 492	2 740	2 395	2 542			
SAM C12	2 363	2 443	2 535	2 447			
SAM C13	2 356	2 457	2 810	2 541			
SAM C14	2 519	2 778	2 440	2 579			
SAM C15	2 373	2 640	2 532	2 515			
SAM C16	2 680	2 685	2 566	2 643			

表 2 面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质稳定性 (长/短期) 检验分析结果

Table 2 Results of short-term and long-term stabilities for deoxynivalenol in wheat flour

储存条件	储存时间	样品测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				标准偏差	t 值	结果判定
		1	2	3	均值			
44 °C	0 天	2 478	2 469	2 507	2 485	20	—	$t_{0.05}(4) = 2.78$
	1 天	2 359	2 705	2 245	2 436	239	0.35	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义
	7 天	2 897	2 632	2 349	2 626	274	0.89	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义
	14 天	2 280	2 563	2 532	2 459	156	0.29	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义
25 °C	1 个月	2 406	2 201	2 385	2 331	113	2.33	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义
	3 个月	2 449	2 298	2 441	2 396	85	1.76	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义
	6 个月	2 328	2 644	2 221	2 398	220	0.68	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义
	12 个月	2 439	2 288	2 399	2 375	78	2.35	$t < t_{0.05}(4)$, 差异无统计学意义

注:—为无数值

2.3 定值和质量控制

本研究邀请 8 家国内权威检测机构实验室进行定值, 各定值实验室可采用相同或相似的方法进行测定。每个定值实验室随机派发样品 2 份, 每份样品至少测定 3 次, 最后至少提交 6 个数据。分析过程中, 要求定值实验室进行严格的质量控制, 每次测定均采用市售有证标准物质进行跟踪, 溯源定值方法的可靠性与准确性。汇总分析各定值实验室质控样品检测结果(图 1), 表明各测定值均在标示范围内, 即采用的分析方法与定量检测结果可靠。对各实验室定值结果进行统计分析, 计算平均值和标准偏差, 采用狄克逊法、达戈斯提诺准则、科克伦准则等统计方法检验所得数据可否采纳保留, 并将所保留的测定结果平均值 (2 366 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 作为最终定值结果(表 3)。

一般标准物质的不确定度主要由 3 部分组成:

- ①标准品纯度不确定度;
 - ②测量值不确定度;
 - ③物质均匀性和稳定性不确定度。
- 采取多家实验室联

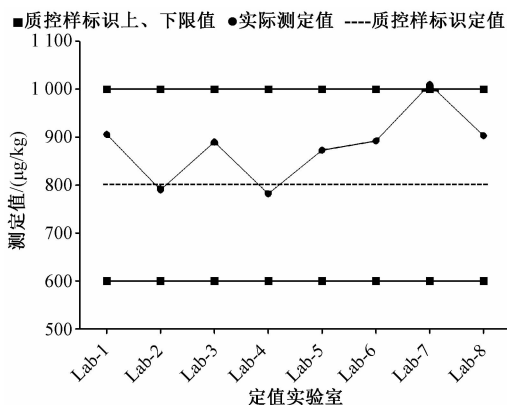


图 1 各定值实验室质控样检测结果汇总

Figure 1 Results of quality control materials analyzed by eight expert laboratories

合定值时, 测量分析过程中标准溶液配制、样品称量、仪器检测以及回收率等影响因素引起的不确定度均包括在测定值的标准偏差内, 可从定值结果中计算得到。本课题组所采用的定值标准品为有证纯溶液, 证书已标识不确定度。本课题组对其纯度

表3 经统计剔除后8家实验室定值数据汇总($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 3 Results submitted for the certification of the deoxynivalenol content

实验室	定值							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Lab-1	2 338	2 372	2 148	2 390	2 230	2 214	2 358	2 293
Lab-2	2 115	2 178	2 286	2 159	2 260	2 222	2 240	2 278
Lab-3	3 292	3 080	3 130	3 086	3 066	3 018	2 887	2 987
Lab-4	2 233	2 249	2 298	2 350	2 293	2 147	2 287	2 246
Lab-5	2 663	2 512	2 533	2 630	2 399	2 522	2 401	2 591
Lab-6	2 224	2 321	2 208	2 350	2 325	2 331	2 566	2 488
Lab-7	2 361	2 326	2 342	2 357	2 347	2 342	2 172	2 259
Lab-8	1 962	1 891	2 029	2 023	1 933	1 952	1 962	2 155

实验室	定值							
	9	10	11	12	13	14	15	16
Lab-1	2 436	2 320	2 459	2 288	—	—	—	—
Lab-2	2 269	2 276	2 134	2 140	—	—	—	—
Lab-3	2 971	2 864	2 848	2 950	—	—	—	—
Lab-4	2 392	2 192	2 193	2 162	2 389	2 341	2 222	2 227
Lab-5	2 558	2 577	2 405	2 522	—	—	—	—
Lab-6	2 373	2 134	2 300	2 386	—	—	—	—
Lab-7	2 203	2 232	2 259	2 199	—	—	—	—
Lab-8	1 923	2 099	2 076	2 050	—	—	—	—

注:Lab-4 提供 16 个数据,其他 7 家实验室均提供 12 个数据;—为无数据

进行了验证,结果符合其标示值。物质均匀性和稳定性不确定均可由均匀性和稳定性的检验统计数据得到。从表 4 可以看出研制的标准物质各不确定度分量对标准特征属性的总不确定度贡献不同,其中各实验室定值结果相对标准偏差在可接受范围内,且目标物质均匀性、稳定性良好。面粉标准物质的定值及不确定度结果为($2\ 366 \pm 187$) $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表4 面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质含量定值及不确定度

Table 4 Certified value and uncertainty of deoxynivalenol in wheat flour

化合物	相对不确定度分量/%							合成不确定度 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	标准值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	u_e	u_{char}	u_e	$u_{\text{s(1s)}}$	$u_{\text{s(5s)}}$	u	u		
DON	2.3	3.3	0.13	3.2	6.0	7.9	187	2 366	

注: u_e 标准品纯度不确定度; u_{char} 测量值不确定度; u_e 均匀性不确定度; $u_{\text{s(1s)}}$ 长期稳定性不确定度; $u_{\text{s(5s)}}$ 短期稳定性不确定度; u 合成相对不确定度

3 小结

经过样品的筛选、混合、均质、灭菌、分装等制备工序,采用同位素稀释-液相色谱-串联质谱定量法检测分析,联合 8 家权威检测机构实验室协同定值,研制了均匀性、长/短期稳定性均良好的面粉中脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准物质。本标准物质的研制开创了国内食品中真菌毒素标准物质的研制工作,是国内第一例采用天然污染的面粉样品基质,为促进国内真菌毒素监测技术的提升提供技术支

持,也为国内食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的暴露监测数据的准确性提供依据。

(志谢 感谢参与本次定值工作的国家食品安全风险评估中心、国家粮食局科学研究院、上海市食品药品检验所、北京市疾病预防控制中心、杭州市疾病预防控制中心、温州市疾病预防控制中心、福建省疾病预防控制中心、广东省疾病预防控制中心)

参考文献

- [1] Bergamini E, Catellani D, Dall A C, et al. Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal product supply chain: the deoxynivalenol (DON) case within industrial bread-making technology[J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2010, 27(5): 677-687.
- [2] Sobrova P, Adam V, Vasatkova A, et al. Deoxynivalenol and its toxicity[J]. Interdisciplinary Toxicology, 2010, 3(3): 94-99.
- [3] Pestka J J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks[J]. Animal Feed Science and Technology, 2007, 137(3/4): 283-298.
- [4] Pestka J J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance [J]. Archives of Toxicology, 2010, 84(9): 663-679.
- [5] Meneely J P, Ricci F, van Egmond H P, et al. Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food [J]. Trac Trends in Analytical Chemistry, 2011, 30(2): 192-203.
- [6] Pascale M. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products[J]. Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke, 2009, 2009(117): 15-25.
- [7] RAN R, WANG C, HAN Z, et al. Determination of deoxynivalenol (DON) and its derivatives: current status of analytical methods [J]. Food Control, 2013, 34(1): 138-148.
- [8] REN Y, ZHANG Y, SHAO S, et al. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1143(1/2): 48-64.
- [9] JIN P G, HAN Z, CAI Z X, et al. Simultaneous determination of 10 mycotoxins in grain by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using $^{13}\text{C}_{15}$ -deoxynivalenol as internal standard [J]. Food Additives & Contaminants: Part A, 2010, 27(12): 1701-1713.
- [10] Köppen R, Bremser W, Stephan I, et al. T-2 and HT-2 toxins in oat flakes: development of a certified reference material [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(11): 2997-3007.
- [11] Köppen R, Bremser W, Rasenko T, et al. Development and certification of a reference material for *Fusarium* mycotoxins in wheat flour [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013, 405(14): 4755-4763.
- [12] 国家标准物质研究中心. JJG 1006—94 一级标准物质[Z]. 1994-12-01.
- [13] ISO. Guide 35: 2006 reference materials-general and statistical principles for certification [S]. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, 2006.