

论著

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

韩小敏,徐文静,赵熙,张宏元,张靖,李凤琴

(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)

摘要:目的 建立了玉米及其制品和小麦及其制品中白僵菌素 (beauvericin, BEA)、恩镰孢菌素 A (enniatin A, ENA)、恩镰孢菌素 A₁ (enniatin A₁, ENA₁)、恩镰孢菌素 B (enniatin B, ENB) 和恩镰孢菌素 B₁ (enniatin B₁, ENB₁) 的高效液相色谱-串联质谱检测方法。方法 样品经乙腈-水 (85:15, V/V) 提取、室温静置、固相萃取柱净化后,以 2 mmol/L 乙酸铵水-乙腈作为流动相,采用电喷雾电离正离子多反应监测模式进行检测。结果 该方法对玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 4 种恩镰孢菌素 (ENNs) 的检出限范围分别为 0.01 ~ 0.12 和 0.02 ~ 0.21 μg/kg, 定量限范围分别为 0.02 ~ 0.44 和 0.05 ~ 0.68 μg/kg, 平均加标回收率范围分别为 91.6% ~ 149.7% 和 100.5% ~ 128.2%, 基质抑制或增强效应分别为 88.0% ~ 101.5% 和 55.8% ~ 106.5%, 且 BEA 和 4 种 ENNs 在所测基质中线性关系和精密度良好, 相关系数均 > 0.99, 相对标准偏差均 < 15%。结论 所建立的方法操作简便、灵敏度高、准确性好, 可用于玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs 的测定。

关键词:玉米及其制品; 小麦及其制品; 高效液相色谱-串联质谱; 白僵菌素; 恩镰孢菌素; 真菌毒素; 食品污染物

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)06-0633-08

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.06.001

Development of high performance liquid chromatography tandem-mass spectrometry method for determination of beauvericin and enniatins in corn and wheat and their products

HAN Xiao-min, XU Wen-jing, ZHAO Xi, ZHANG Hong-yuan, ZHANG Jing,
LI Feng-qin(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center
for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) for determination of beauvericin (BEA), enniatin A (ENA), enniatin A₁ (ENA₁), enniatin B (ENB) and enniatin B₁ (ENB₁) in corn, wheat and their products was developed. **Methods** Samples were extracted with acetonitrile-water (85:15, V/V), cleaned up with solid phase extraction column followed by HPLC-MS/MS determination with electrospray positive ionization (ESI+) under multiple reaction monitoring (MRM) mode, and with 2 mmol/L ammonium acetate water-acetonitrile as the mobile phase. **Results** The limits of detection for BEA and 4 kinds of enniatins (ENNs) ranged from 0.01 to 0.12 μg/kg for corn and corn products and 0.02 to 0.21 μg/kg for wheat and wheat products, and the limits of quantification ranged from 0.02 to 0.44 μg/kg and 0.05 to 0.68 μg/kg for both cereals. The mean recoveries ranged from 91.6% to 149.7% for corn and corn products and 100.5% to 128.2% for wheat and wheat products, respectively. The matrix induced suppression or enhancement effect ranged from 88.0% to 101.5% and 55.8% to 106.5% for both cereals, respectively. The method for BEA and ENNs determination showed good linearity and precision in all matrixes with correlation coefficient above 0.99, and the relative standard deviations were less than 15%. **Conclusion** The method developed was of simple operation, high sensitivity and good accuracy, which could be used for BEA and 4 kinds of ENNs determination in corn and wheat and their products.

Key words: Corn and their products; wheat and their products; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; beauvericin; enniatins; mycotoxin; food contamination

收稿日期: 2017-11-24

基金项目: 科技基础工作专项 (2013FY113400); 北京市自然科学基金 (7163235)

作者简介: 韩小敏 女 副研究员 研究方向为食品卫生 E-mail: hanxiaomin@cfsa.net.cn

通信作者: 李凤琴 女 研究员 研究方向为食品卫生 E-mail: lifengqin@cfsa.net.cn

白僵菌素 (beauvericin, BEA) 和恩镰孢菌素 (enniatins, ENNs) 主要是由镰刀菌属的燕麦镰刀菌 (*F. avenaceum*) 和木贼镰刀菌 (*F. equiseti*) 等的某些菌种侵染小麦、大麦、黑麦和燕麦等谷物后, 在潮湿和低温条件下产生的真菌毒素^[1-2]。到目前为止, 已经发现了 29 种 ENNs, 但食品中最常见的 ENNs 主要有 4 种即恩镰孢菌素 A (enniatin A, ENA)、恩镰孢菌素 A₁ (enniatin A₁, ENA₁)、恩镰孢菌素 B (enniatin B, ENB) 和恩镰孢菌素 B₁ (enniatin B₁, ENB₁)^[3-4]。据报道^[5-7], BEA 和 ENNs 具有基因毒性和细胞毒性, 可诱导染色体畸变、姊妹染色单体交换和微核形成等。目前, 已在西班牙、突尼斯、意大利、日本、伊朗、巴西、摩洛哥、挪威和丹麦等国家的谷物及其制品中检测到这两类毒素^[8-14]。UHLIG 等^[13]对 2000—2002 年挪威产 73 份燕麦、75 份大麦和 80 份小麦共计 228 份样品中 BEA 和 4 种 ENNs (ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁) 的污染调查发现, 228 份样品中 5 种毒素均有检出。SØRENSEN 等^[14]对丹麦 2005—2006 年收获的 80 份玉米和玉米青贮饲料中 BEA 和 4 种 ENNs (ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁) 的污染调查表明, 两类样品中 4 种 ENNs 的检出率由高到低依次为 ENB > ENB₁ > ENA₁ > ENA。考虑到 BEA 和 ENNs 污染的严重性和普遍性, 近年来人们对其关注也越来越多。

基于液液萃取或固相萃取的高效液相色谱 (HPLC) 配合光电二极管阵列检测器 (DAD) 的 HPLC-DAD 法是检测食品中 BEA 和 ENNs 常用方法^[15]。但由于单纯的色谱分析方法存在特异性不强、灵敏度不高等特点, 其应用越来越受到限制。近年来, 基于 HPLC 与质谱联用技术开发的高效液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 因结合了色谱优越的分离能力与质谱优越的定性能力, 明显地提高了检测的灵敏度和特异性, 具有检出限低、能获得待测化合物的分子结构信息、对前处理要求不高等特点, 成为目前分析食品中 BEA 和 ENNs 的最佳手段^[16-19]。但我国目前尚未建立食品中两类毒素的检测方法, 本课题组前期在对目前国际上食品中 BEA 和 ENNs 的污染与分析方法的最新研究进行概述的基础上^[19], 提出了采用 HPLC-MS/MS 同时测定谷物及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs (ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁) 的方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

玉米及其制品包括玉米粒、玉米渣和玉米面,

小麦及其制品包括小麦粉和挂面, 均购自部分省 (市) 超市及农贸市场。

1.1.2 主要仪器与试剂

QTRAP™ 5500 HPLC-MS/MS (配备有 ExionLC 系统和 QTRAP™ 5500 质谱仪, 美国 AB Sciex)、Sep-Pak Vac C₁₈ 固相萃取柱 (SPE, 200 mg, 3 ml, 美国 Waters)、涡旋混合器、圆周式振荡器、低温离心机。

BEA (BIA-B1238)、ENA (BIA-E1165)、ENA₁ (BIA-E1166)、ENB (BIA-E1167) 和 ENB₁ (BIA-E1168) 均为固体粉末标准品 (纯度均 ≥ 97%), 均购自澳大利亚 Bioaustralis; 甲醇、乙腈、醋酸、乙酸铵均为质谱纯, 超纯水由本实验室的超纯水仪制备。

1.2 方法

1.2.1 BEA 和 ENNs 标准溶液的配制

标准储备液: 分别称取一定量的 BEA、ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁ 固体粉末标准品, 用乙腈溶解并定容后混匀, 得到 ENA 标准储备液 (5 μg/ml)、ENA₁ 标准储备液 (40 μg/ml)、ENB 标准储备液 (40 μg/ml)、ENB₁ 标准储备液 (100 μg/ml) 和 BEA 标准储备液 (100 μg/ml), -20 °C 下避光保存, 备用。

混合标准储备液: 从 ENA、ENA₁、ENB、ENB₁ 和 BEA 标准储备液中分别移取 300、100、100、100 和 100 μl 至 10 ml 容量瓶, 乙腈定容至刻度, 混匀。制备成 ENA 为 150 μg/L、ENA₁ 和 ENB 均为 400 μg/L、ENB₁ 和 BEA 均为 1 000 μg/L 的混合标准储备液, 4 °C 下避光保存。

混合标准工作液: 从 ENA、ENA₁、ENB、ENB₁ 和 BEA 标准储备液中分别移取 30、10、10、10 和 10 μl 至 10 ml 容量瓶, 乙腈定容至刻度, 混匀, 制备成 ENA 为 15 μg/L、ENA₁ 和 ENB 均为 40 μg/L、ENB₁ 和 BEA 均为 100 μg/L 的混合标准工作液。4 °C 下避光保存, 用于标准系列工作溶液的配制。

标准系列工作溶液: 移取一定量混合标准工作液用乙腈按比例稀释, 配制成一系列标准工作液, 其中 ENA 浓度为 0.005、0.015、0.05、0.15、0.5、1.5、5、15 μg/L; ENA₁ 和 ENB 浓度均为 0.013、0.04、0.13、0.4、1.33、4.0、13.33 和 40 μg/L; ENB₁ 和 BEA 的浓度均为 0.033、0.1、0.33、1.0、3.33、10.0、33.33 和 100 μg/L。若配制基质匹配标准工作溶液, 则将稀释溶剂由乙腈更换为空白基质提取液, 各毒素浓度保持不变。

1.2.2 样品前处理

样品粉碎: (1) 散装样品: 将玉米及其制品和小麦及其制品用四分法缩分至 500 g, 如有必要则先用高速粉碎机粉碎, -20 °C 下避光保存备用。 (2) 定

型包装样品:独立包装 ≤ 500 g的样品,如有必要粉碎则直接用高速粉碎机粉碎后作为样品,备用;若单个样品的独立包装 > 500 g,则先用四分法缩分至 500 g,如有必要粉碎则再用高速粉碎机粉碎后作为样品,备用, -20 °C下避光保存。

提取:称取 5.0 g样品(精确至 0.01 g)于 50 ml刻度离心管中,加入 40 ml样品提取液(乙腈:水 = $85:15$, V/V),加盖密封后涡旋混匀 $30 \sim 60$ s, 180 r/min振荡提取 30 min后,室温静置 $15 \sim 20$ min;准确移取 10 ml上清液于另一 50 ml刻度离心管,加入 20 ml水进行稀释,加盖密封并涡旋混匀 $30 \sim 60$ s,室温静置 $15 \sim 20$ min备用。

净化:取 4 ml最终稀释后的样品提取液全部通过事先依次用 3 ml甲醇和 3 ml水预先活化的SPE柱,依次用 3 ml 10%乙腈水溶液、 3 ml 50%乙腈水溶液淋洗并抽干SPE柱。最后用 2 ml 90%乙腈水

溶液洗脱毒素,抽干SPE柱并收集洗脱液,涡旋混匀后备用。

1.2.3 仪器条件

质谱:选择电喷雾正离子扫描(ESI⁺)、多反应监测(MRM)模式,驻留时间为 200 ms,离子源参数见表1,BEA和4种ENNs的保留时间及MRM参数见表2。

表1 BEA和ENNs测定的离子源参数

参数	正离子模式
气帘气/kPa	206
碰撞气/kPa	中速
离子化电压/V	5 500
去溶剂温度/°C	550
雾化气/kPa	552
辅助加热气/kPa	552

注:气帘气、雾化气、辅助加热气分别为 30 、 80 、 80 psi

表2 HPLC-MS/MS测定BEA和ENNs的保留时间和MRM参数

Table 2 Retention time and MRM parameters for BEA and ENNs determination by HPLC-MS/MS

真菌毒素	保留时间/min	母离子/(m/z)	子离子/(m/z)	DP/V	CE/V	CXP/V	EP/V
BEA	14.40	801.4	244.1 [*] /262.1	100	40/40	12/12	7/7
ENA	17.55	699.5	210.1 [*] /228.2	100	40/40	10/12	7/7
ENA ₁	14.95	685.5	210.2 [*] /228.2	84	38/38	7/7	7/7
ENB	10.77	657.5	196.2 [*] /214.1	90	38/38	9/10	7/7
ENB ₁	12.68	671.5	196.1 [*] /210.2	88	40/40	8/8	7/7

注: * 为定量离子;DP为去簇电压;CE为碰撞能量;CXP为碰撞室射出电压;EP为射入电压

色谱:色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈柱(2.1 mm \times 50 mm, 1.7 μ m),柱温 35 °C,样品室温度 15 °C,进样体积 5 μ l,流速 0.2 ml/min。流动相A为含 2 mmol/L乙酸铵的水溶液,流动相B为乙腈。梯度洗脱程序: $0 \sim 2$ min 100% A, $2 \sim 3$ min 100% A \sim 40% A, $3 \sim 19$ min 40% A \sim 30% A, $19 \sim 21$ min 30% A \sim 100% A, $20 \sim 20.1$ min 100% A。

ESI⁺条件下,分别考察甲醇-水-醋酸($10:89:1$, V/V)、 2 mmol/L乙酸铵水溶液作为流动相A和甲醇-水-醋酸($97:2:1$, V/V)、乙腈作为流动相B对BEA和4种ENNs保留时间和质谱信号响应值的影响。

1.3 数据处理

采用MultiQuant™ 3.0.2软件对每份样品中各毒素色谱峰的峰面积、线性关系、校正曲线、信噪比(S/N)、检出限(LOD)和定量限(LOQ)等进行计算。后续的数据处理包括平均加标回收率、基质抑制或增强效应(基质效应,SSE)、精密度等采用Microsoft Excel 2007进行计算。不同基质中每种毒素的平均加标回收率(R_A)和基质效应分别按照公式(1)和(2)进行计算,LOD和LOQ分别按3倍S/N和10

倍S/N进行计算。

平均加标回收率(%) =

$$\frac{\text{平均峰面积(加标样品)}}{\text{平均峰面积(基质匹配标准品)}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{基质效应(}\%) = \frac{\text{平均峰面积(加标样品)}}{\text{平均峰面积(纯溶剂标准品)}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与分析

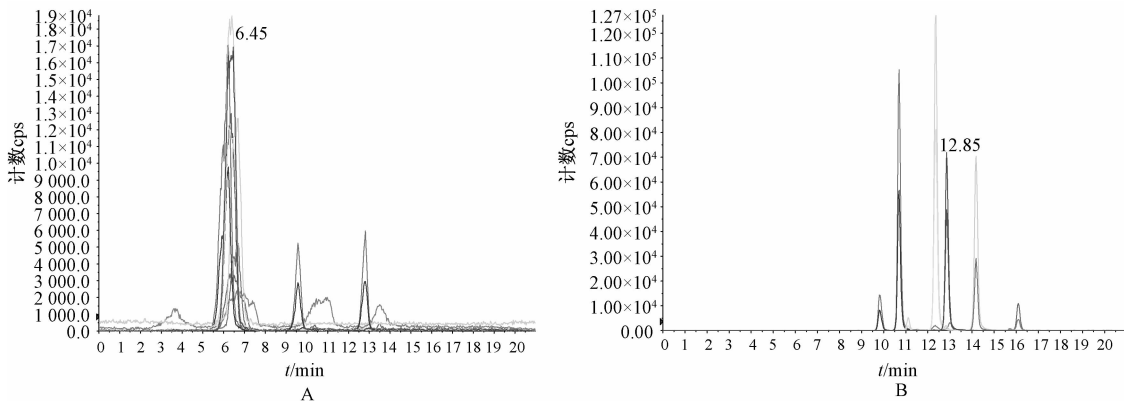
2.1 质谱条件的优化

BEA和4种ENNs均为环脂肽类真菌毒素,本试验分别考察了ESI⁺和ESI⁻条件下BEA和4种ENNs的[M+H]⁺、[M+Na]⁺和[M+NH₄]⁺母离子峰的信号响应值强弱,根据欧盟2002/657/EC指令^[20]对于低分辨率质谱联用检测的规定每种毒素选择两个适宜的子离子,后以三通连接方式将标准品与流动相同时进样,优化离子源参数。经过优化发现,5种毒素在ESI⁺条件下母离子峰的信号响应值均高于在ESI⁻条件下母离子峰的信号响应值,ESI⁺条件下5种毒素均以[M+NH₄]⁺峰的信号响应值最优,优化后的BEA、ENA、ENA₁、ENB和ENB₁的母离子峰分别为 801.4 、 699.5 、 685.5 、 657.5 、 671.5 ,其他参数具体见表1和2。

2.2 色谱条件的优化

液相色谱流动相的组成不仅影响 BEA 和 4 种 ENNs 的色谱行为,还会影响 BEA 和 4 种 ENNs 的离子化效率。根据 2.1 质谱条件优化的结果,ESI+ 条件下分别考察了甲醇-水-醋酸(10:89:1, V/V)和甲醇-水-醋酸(97:2:1, V/V)作为流动相与 2 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈作为流动相对 5 种真菌毒素质谱信号响应值的影响。因 5 种毒素 $[M + NH_4]^+$ 峰的信号响应值明显高于 $[M + H]^+$ 和 $[M + Na]^+$ 峰的信号响应值,所以 2 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙

腈作为流动相时 5 种毒素的信号相应值明显高于甲醇-水-醋酸(10:89:1, V/V)和甲醇-水-醋酸(97:2:1, V/V)作为流动相时的信号相应值,且 2 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈作为流动相时各毒素色谱峰的峰形更对称,基线信号强度更低(见图 1)。因乙酸铵浓度过高会影响色谱柱寿命,所以后续试验中选择 2 mmol/L 乙酸铵水溶液作为流动相 A、乙腈作为流动相 B 进行洗脱。综合考虑各毒素的分离度、保留时间等方面的影响,确定本试验流动相的流速和梯度洗脱程序。



注:A 表示流动相为甲醇-水-醋酸(10:89:1, V/V)和甲醇-水-醋酸(97:2:1, V/V);B 表示流动相为 2 mmol/L 乙酸铵水溶液和乙腈

图 1 ESI+ 条件下 BEA 和 ENNs 在不同流动相中的总离子流图

Figure 1 TIC of BEA and ENNs obtained by different mobile phases under ESI+

2.3 样品前处理条件的优化

本试验在 SPE 柱常规操作步骤和已有文献^[9]报道的基础上,重点考察了玉米粒和挂面中两类毒素的提取效率。采用两种方法(1)提取后静置 15~20 min 和(2)1 400 × g 低温离心 10 min 对平均加标回收率的影响。结果发现,振荡提取 30 min 后温室静置 15~20 min 与 1 400 × g 低温离心 10 min 对玉

米粒和挂面样品中毒素的平均加标回收率均差异无统计学意义($P > 0.05$),具体结果见表 3。考虑到大量样品中 BEA 和 4 种 ENNs 的提取时,低温离心会明显延长操作时间并增加操作步骤的复杂性,因此后续试验中选择振荡提取 30 min 后温室静置 15~20 min 的方式进行 BEA 和 4 种 ENNs 的提取。

表 3 BEA 和 ENNs 在不同前处理方式中的平均加标回收率($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of different sample preparation on recoveries of BEA and ENNs

真菌毒素	加标浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	室温静置		低温离心	
		玉米粒/%	挂面/%	玉米粒/%	挂面/%
BEA	50	129.0 ± 2.9	128.2 ± 7.7	118.7 ± 6.1	123.5 ± 3.7
	150	91.6 ± 5.2	124.3 ± 6.6	105.4 ± 1.7	132.1 ± 4.2
	250	102.3 ± 3.1	121.7 ± 3.2	108.8 ± 7.5	134.4 ± 1.6
ENA	7.5	140.5 ± 2.1	125.4 ± 11.6	115.8 ± 5.6	117.2 ± 4.0
	22.5	95.8 ± 4.4	122.6 ± 13.3	103.9 ± 1.5	120.1 ± 3.2
	37.5	107.0 ± 0.4	119.0 ± 8.5	114.3 ± 5.5	121.4 ± 1.2
ENA ₁	20	139.3 ± 1.9	125.3 ± 6.9	121.2 ± 5.8	119.0 ± 5.9
	60	97.1 ± 3.3	120.6 ± 3.5	111.8 ± 2.9	125.1 ± 2.3
	100	110.3 ± 1.4	118.2 ± 6.9	123.4 ± 6.0	119.8 ± 1.0
ENB	20	149.7 ± 13.8	123.0 ± 2.9	134.8 ± 6.2	124.3 ± 4.8
	60	106.5 ± 4.7	119.1 ± 1.7	100.8 ± 1.7	120.1 ± 7.4
	100	117.4 ± 3.8	116.2 ± 2.9	117.5 ± 7.3	128.2 ± 2.2
ENB ₁	50	142.2 ± 5.6	125.0 ± 4.8	126.1 ± 6.9	122.7 ± 2.9
	150	102.7 ± 3.7	122.4 ± 1.2	107.2 ± 1.6	133.6 ± 4.2
	250	111.9 ± 5.0	122.3 ± 2.1	112.6 ± 5.5	121.4 ± 2.5

2.4 基质效应

基质效应是目前采用电喷雾电离分析毒素面临的一个巨大挑战。减少进入质谱系统基质组分的含量和用合适的方法比如基质匹配标准曲线、标准品添加和同位素内标法对测定结果进行校正是目前常用的校正基质效应的方法。前者因在减少进入质谱系统基质组分含量的同时也降低了目标分析物的含量,且明显提高了目标化合物的 LOD 和 LOQ 等越来越不被人们采用。基质匹配标准曲线校正法是目前常用的测定食品中毒素含量时校正基质效应的方法。本试验采用 HPLC-MS/MS 对玉米及其制品包括玉米粒、玉米渣、玉米面和小麦及其制品包括小麦粉和挂面中 BEA 和 4 种 ENNs 的含量测定时发现,玉米及其制品的基质效应为 88.0% ~ 101.5%,小麦及其制品的基质效应为 55.8% ~ 61.5%,其中小麦粉的基质抑制效应最明显,为 55.8% ~ 61.5%,见表 4。

2.5 方法验证

2.5.1 方法的线性范围、LOD 和 LOQ

根据欧盟 SANCO 方法学验证标准^[21]对所建立的方法进行验证,具体见表 5 和 6。可以看出,玉米粒和玉米面的 BEA、ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁ 的线

表 4 BEA 和 ENNs 在玉米及其制品和小麦及其制品中的基质效应

Table 4 Matrix effect on detection of BEA and ENNs in corn and wheat and their products

真菌毒素	玉米及其制品			小麦及其制品	
	玉米粒/%	玉米渣/%	玉米面/%	小麦粉/%	挂面/%
BEA	90.8	88.5	89.2	55.8	100.4
ENA	101.5	90.9	99.5	61.5	105.2
ENA ₁	98.0	91.1	98.7	58.9	105.2
ENB	92.6	88.0	88.1	59.9	103.5
ENB ₁	95.1	89.4	95.4	60.3	106.5

性范围分别为 0.03 ~ 1 200、0.01 ~ 180、0.09 ~ 480、0.01 ~ 480 和 0.08 ~ 1 200 μg/kg,玉米渣中 BEA、ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁ 的线性范围分别为 0.03 ~ 400、0.02 ~ 60、0.09 ~ 160、0.01 ~ 160 和 0.07 ~ 400 μg/kg。小麦及其制品中 BEA、ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁ 的线性范围分别为 0.02 ~ 1 200、0.03 ~ 180、0.10 ~ 480、0.02 ~ 480 和 0.10 ~ 1 200 μg/kg,玉米及其制品和小麦及其制品中 5 种真菌毒素的 LOD 范围分别为 0.01 ~ 0.12 和 0.02 ~ 0.21 μg/kg,LOQ 范围分别为 0.02 ~ 0.44 和 0.05 ~ 0.68 μg/kg,且 BEA 和 4 种 ENNs 在不同基质中的线性关系良好,线性相关系数均 > 0.99,可满足玉米及其制品和小麦及其制品中 5 种真菌毒素定量检测的要求。

表 5 玉米及其制品中 BEA 和 ENNs 的相关技术指标

Table 5 Related technical index of method for detection of BEA and ENNs in corn and corn products

真菌毒素	玉米粒				
	线性方程	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)	相关系数	线性范围/(μg/kg)
BEA	$y = 346036x - 210992$	0.04	0.12	0.999 1	0.04 ~ 1 200
ENA	$y = 664608x - 71722$	0.02	0.07	0.998 8	0.02 ~ 180
ENA ₁	$y = 478313x - 107105$	0.09	0.42	0.999 2	0.09 ~ 480
ENB	$y = 580940x - 131367$	0.01	0.03	0.999 2	0.01 ~ 480
ENB ₁	$y = 346036x - 210992$	0.10	0.33	0.999 4	0.10 ~ 1 200
真菌毒素	玉米面				
	线性方程	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)	相关系数	线性范围/(μg/kg)
BEA	$y = 333689x - 26777$	0.03	0.09	0.998 5	0.03 ~ 1 200
ENA	$y = 627320x - 60105$	0.01	0.02	0.998 4	0.01 ~ 180
ENA ₁	$y = 460163x - 120840$	0.12	0.44	0.998 3	0.12 ~ 480
ENB	$y = 531906x - 121352$	0.02	0.06	0.998 7	0.12 ~ 480
ENB ₁	$y = 288125x - 156172$	0.08	0.28	0.999 1	0.08 ~ 1 200
真菌毒素	玉米渣				
	线性方程	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)	相关系数	线性范围/(μg/kg)
BEA	$y = 329627x + 19079$	0.03	0.11	0.999 6	0.03 ~ 400
ENA	$y = 599455x + 3099$	0.02	0.05	0.999 7	0.02 ~ 60
ENA ₁	$y = 456392x - 1592$	0.09	0.30	0.999 9	0.09 ~ 160
ENB	$y = 561221x + 14551$	0.01	0.03	0.999 7	0.01 ~ 160
ENB ₁	$y = 292532x + 9494$	0.07	0.25	0.999 8	0.07 ~ 400

2.5.2 方法的加标回收率

取不含 BEA 和 ENNs 的玉米及其制品和小麦及其制品,分别添加低、中、高 3 个浓度的 BEA 和 ENNs 混合标准溶液,每个加标水平进行 3 次重复试验,按 1.2.2 进行样品前处理,加标回收率结果见表 7。可以看出,玉米及其制品和小麦及其制品中 5 种真菌毒素的平均加标回收率范围分别为 91.6% ~

149.7% 和 100.5% ~ 128.2%,相对标准偏差 (RSD) 范围分别为 0.3% ~ 13.8% 和 1.2% ~ 13.3%,符合欧盟对食品中真菌毒素定量测定时对回收率及 RSD 的要求^[22]。

2.5.3 方法的精密度

本试验采用添加低、中和高 3 个浓度 BEA 和 ENNs 样品,按照 1.2.2 对加标样品中的 BEA 和

表6 小麦及其制品中 BEA 和 ENNs 的相关技术指标

Table 6 Related technical index of method for detection of BEA and ENNs in wheat and wheat products

真菌毒素	小麦粉				
	线性方程	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
BEA	$y = 216\ 234x + 57\ 123$	0.08	0.26	0.999 3	0.08 ~ 1 200
ENA	$y = 391\ 948x + 12\ 745$	0.06	0.21	0.999 3	0.06 ~ 180
ENA ₁	$y = 28\ 7217x + 19\ 653$	0.21	0.68	0.998 5	0.21 ~ 480
ENB	$y = 360\ 748x + 48\ 897$	0.02	0.05	0.999 2	0.02 ~ 480
ENB ₁	$y = 188\ 108x + 74\ 018$	0.14	0.48	0.998 9	0.14 ~ 1 200
真菌毒素	挂面				
	线性方程	LOD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相关系数	线性范围/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
BEA	$y = 324\ 985x - 153\ 545$	0.02	0.08	0.999 3	0.02 ~ 1 200
ENA	$y = 574\ 115x - 48\ 761$	0.03	0.10	0.999 3	0.03 ~ 180
ENA ₁	$y = 424\ 538x - 86\ 670$	0.10	0.33	0.999 2	0.10 ~ 480
ENB	$y = 555\ 015x - 99\ 765$	0.02	0.07	0.999 4	0.02 ~ 480
ENB ₁	$y = 26\ 7521x - 88\ 247.3$	0.10	0.32	0.999 4	0.10 ~ 1 200

表7 玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 ENNs 的加标回收率和 RSD ($n = 3$)

Table 7 Recoveries and relative standard deviation of method for detection of BEA and ENNs in corn and wheat and their products

真菌毒素	加标浓度 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	玉米粒		玉米渣		玉米面		小麦粉		挂面	
		加标回收 率/%	RSD /%	加标回收 率/%	RSD /%	加标回收 率/%	RSD /%	加标回收 率/%	RSD /%	加标回收 率/%	RSD /%
BEA	50	129.0	2.9	110.2	1.3	105.3	1.5	126.0	6.9	128.2	7.7
	150	91.6	5.2	107.9	0.3	102.7	3.8	118.4	8.1	124.3	6.6
	250	102.3	3.1	109.2	2.3	101.4	7.1	100.5	5.4	121.7	3.2
ENA	7.5	140.5	2.1	112.9	1.1	117.9	12.9	115.5	12.9	125.4	11.6
	22.5	95.8	4.4	111.4	4.3	109.0	10.1	124.3	7.6	122.6	13.3
	37.5	107.0	0.4	113.5	2.6	108.1	0.6	121.3	3.8	119.0	8.5
ENA ₁	20	139.3	1.9	102.6	3.8	114.5	5.7	127.2	4.4	125.3	6.9
	60	97.1	3.3	103.3	0.9	110.7	2.1	118.4	3.8	120.6	3.5
	100	110.3	1.4	104.7	8.1	108.7	8.8	117.5	4.3	118.2	6.9
ENB	20	149.7	13.8	105.3	0.3	124.7	9.2	123.1	9.2	123.0	2.9
	60	106.5	4.7	106.6	2.1	117.7	7.7	117.6	6.8	119.1	1.7
	100	117.4	3.8	108.4	4.8	116.5	5.9	114.6	3.6	116.2	2.9
ENB ₁	50	142.2	5.6	119.4	4.9	120.2	6.4	119.8	4.0	125.0	4.8
	150	102.7	3.7	118.5	1.3	115.5	4.7	125.1	2.2	122.4	1.2
	250	111.9	5.0	120.5	1.6	114.6	12.6	118.3	5.1	122.3	2.1

4种ENNs进行提取和净化,同一天不同时间点连续进样5次,同时对这些样品连续测定5d,分别计算各毒素色谱峰的峰面积的RSD,进行日间和日内精

密度的考察,结果见表8。可以看出,玉米及其制品的日内和日间RSD分别为0.2%~6.9%和1.9%~13.5%,小麦及其制品的日内和日间RSD分别

表8 玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 ENNs 的日内和日间精密度

Table 8 Intra-and inter-day precision of method for detection of BEA and ENNs in corn and wheat and their products

真菌毒素	加标浓度 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	玉米粒		玉米渣		玉米面		小麦粉		挂面	
		日内 RSD/%	日间 RSD/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%	日内 RSD/%	日间 RSD/%
BEA	50	0.4	1.9	1.3	4.2	0.3	2.8	0.9	6.2	1.2	9.3
	150	1.9	2.4	2.0	2.9	2.5	2.3	1.1	4.4	3.8	9.9
	250	1.6	2.7	0.8	2.9	0.8	2.8	0.6	7.6	2.5	9.4
ENA	7.5	4.7	4.6	0.2	5.5	2.9	3.7	0.9	8.1	2.9	7.3
	22.5	3.3	4.7	0.6	5.1	4.3	3.4	0.7	3.9	5.3	9.0
	37.5	1.4	5.7	1.6	5.1	5.4	4.0	1.1	8.4	4.4	8.6
ENA ₁	20	0.6	3.8	2.2	5.5	1.3	3.0	0.4	13.3	2.1	7.8
	60	2.1	3.9	1.7	5.2	2.6	3.8	2.0	7.9	3.3	7.9
	100	5.6	4.7	2.9	5.8	2.1	3.7	1.3	12.5	4.7	7.6
ENB	20	2.2	13.1	3.1	7.4	1.1	4.6	0.1	12.6	4.4	6.8
	60	6.9	12.5	5.4	7.2	3.7	5.8	0.5	11.6	6.8	6.3
	100	1.6	13.5	2.2	6.9	2.5	5.7	0.6	8.9	2.4	5.8
ENB ₁	50	3.5	3.8	3.5	8.2	0.4	5.0	4.0	10.0	3.6	7.7
	150	3.3	5.6	0.3	7.2	1.1	5.6	4.5	8.4	2.4	7.9
	250	0.4	5.0	2.1	7.1	2.2	5.8	3.8	8.8	4.1	9.2

为 0.1% ~ 6.8% 和 3.9% ~ 13.3%, 表明所建方法具有良好的精密度。

2.6 玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 ENNs 污染水平的测定

从北京、安徽、宁夏等省(市/自治区)采集市售玉米及其制品 19 份、小麦及其制品 17 份对所建立的方法进行验证,结果见表 9。可以看出,所测的玉米及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs 的污染水平均低于小麦及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs 的污染水平。19 份玉米及其制品中均检出 BEA、ENA、ENA₁ 和 ENB₁, 平均含量和中位数分别为 0.97 和 0.18、0.06 和 0.04、0.21 和 0.20、0.09 和 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 仅 1 份玉米样品中检出 ENB, 检出率为 5.3%、含量为 0.09 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。17 份小麦及其制品中均检出 BEA 和 4 种 ENNs, BEA、ENA、ENA₁、ENB 和 ENB₁ 的平均含量和中位数分别为 3.57 和 3.38、1.16 和 0.71、3.64 和 0.89、14.13 和 3.68、15.10 和 5.56 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 值得注意的是一份来自宁夏的小麦粉样品中 ENB 和 ENB₁ 的含量高达 111.95 和 71.66 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 但仍低于 SØRENSEN 等^[14]报道的丹麦 2005—2006 年产玉米和玉米青贮饲料中 ENB 和 ENB₁ 的最大污染水平,同时本次测定样品中玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs 的污染水平也均低于 UHLIG 等^[13]报道的 2000—2002 年挪威产燕麦、大麦和小麦中 BEA 和 4 种 ENNs 的污染水平。

表 9 玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 ENNs 的污染状况

Table 9 Natural occurrence of BEA and ENNs in corn and wheat samples

真菌毒素	玉米及其制品 ($n=19$)				
	检出率 /%	平均含量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最小值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	中位数 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
BEA	100.0(19/19)	0.97	6.22	0.01	0.18
ENA	100.0(19/19)	0.06	0.16	0.04	0.04
ENA ₁	100.0(19/19)	0.21	0.28	0.19	0.20
ENB	5.3(1/19)	0.09	0.09	0.09	0.09
ENB ₁	100.0(19/19)	0.09	0.18	0.08	0.08
真菌毒素	小麦及其制品 ($n=17$)				
	检出率 /%	平均含量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最大值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	最小值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	中位数 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
BEA	100.0(17/17)	3.57	4.91	3.31	3.38
ENA	100.0(17/17)	1.16	4.61	0.64	0.71
ENA ₁	100.0(17/17)	3.64	20.11	0.58	0.89
ENB	100.0(17/17)	14.13	111.95	1.25	3.68
ENB ₁	100.0(17/17)	15.10	71.66	4.54	5.56

3 小结

本试验在优化液相色谱条件、质谱条件和样品前处理方法的基础上,对方法的准确性及精密度进行了验证,同时对实际样品中 BEA 和 4 种 ENNs 的

含量进行测定,建立了玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs 含量测定的 HPLC-MS/MS 检测方法。与现有文献报道的谷物及其制品经乙腈-水-乙酸(79:20:1, V/V) 一步法提取后直接经 HPLC-MS/MS 或 HPLC 检测 BEA 和 4 种 ENNs 的方法比较^[10-11],该方法具有操作简便、灵敏度高、稳定性好、基质效应弱等特点,适于批量样品中 BEA 和 4 种 ENNs 的定性确证与定量检测,能够满足我国污染物监测中玉米及其制品和小麦及其制品中 BEA 和 4 种 ENNs 含量测定的要求。

参考文献

- [1] LOGRIECO A, RIZZO A, FERRACANE R, et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat affected by *Fusarium avenaceum* head blight [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1):82-85.
- [2] JESTOI M. Emerging mycotoxins fusaproliferin, beauvericin, enniatins and moniliformin—a review [J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2008, 48(1):21-49.
- [3] HERRMANN M, ZOCHER R, HAESE A A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(62):393-398.
- [4] MALACHOVA A, DZUMAN Z, VEPRIKOVA Z, et al. Deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside and enniatins: the major mycotoxins found in cereal-based products on the Czech market [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(24):12990-12997.
- [5] CELIK M, AKSOY H, YILMAZ S. Evaluation of beauvericin genotoxicity with the chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges and micronucleus assays [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(7):1553-1557.
- [6] TAN D C, FLEMATTI G R, GHISALBERTI E L, et al. Toxicogenicity of enniatins from western Australian *Fusarium* species to brine shrimp (*artemia franciscana*) [J]. Toxicon, 2011, 57(5):817-825.
- [7] HAMILL R L, HIGGINS C E, BOAZ H E, et al. The structure of beauvericin, a new desipeptide antibiotic toxic to *artemia salina* [J]. Tetrahedron Letters, 1969, 10(49):4255-4258.
- [8] SERRANO A B, FONT G, RUIZ M J, et al. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area [J]. Food Chemistry, 2012, 135(2):423-429.
- [9] YOSHINARI T, SUZUKI Y, SUGITAKONISHI Y, et al. Occurrence of beauvericin and enniatins in wheat flour and corn grits on the Japanese market and their co-contamination with type B trichothecene mycotoxins [J]. Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment, 2016, 33(10):620-626.
- [10] NAZARI F, SULYOK M, KOBARFARD F, et al. Evaluation of emerging *Fusarium* mycotoxins beauvericin, enniatins, fusaproliferin and moniliformin in domestic rice in Iran [J]. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 2015, 14(2):505-512.
- [11] SOUZA M D L M D, SULYOK M, FREITASILVA O, et al.

- Cooccurrence of mycotoxins in maize and poultry feeds from Brazil by liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Scientific World Journal, 2013, 2013(1):77-87.
- [12] BLESÁ J, MOLTÓ J C, AKHDARI S E, et al. Simultaneous determination of *Fusarium* mycotoxins in wheat grain from Morocco by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry[J]. Food Control, 2014, 46(4):1-5.
- [13] UHLIG S, TORP M, HEIER B T. Beauvericin and enniatins A₁, B and B₁ in Norwegian grain: a survey[J]. Food Chemistry, 2006, 94(2):193-201.
- [14] SØRENSEN J L, NIELSEN K F, RASMUSSEN P H, et al. Development of a LC-MS/MS method for the analysis of enniatins and beauvericin in whole fresh and ensiled maize[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(21):10439-10443.
- [15] HERRMANN M, ZOCHER R, HAESE A A. Enniatin production by *Fusarium* strains and its effect on potato tuber tissue[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(62):393-398.
- [16] HÄBLER K, RYCHLIK M. Multi-mycotoxin stable isotope dilution LC-MS/MS method for *Fusarium* toxins in cereals[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016, 218(1):447-454.
- [17] HU L, RYCHLIK M. Biosynthesis of ¹⁵N₃-labeled enniatins and beauvericin and their application to stable isotope dilution assays [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(29):7129-7136.
- [18] HU L, RYCHLIK M. Occurrence of enniatins and beauvericin in 60 Chinese medicinal herbs [J]. Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment, 2014, 31(7):1240-1245.
- [19] 韩小敏, 李凤琴, 徐文静. 食品中白僵菌素和恩镰孢菌素污染与分析方法研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(4):508-513.
- [20] European Commission. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002[J]. Off J Eur Communities L, 2002, 221:8-36.
- [21] PIHLSTRÖM T. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed. Document No. SANCO/12495/2011 [A]. 2011.
- [22] Commission Regulation (EC) No 401/2006. Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs [S]. Official Journal of the European Union, 2006, L70:31-33.

· 公告 ·

关于爱德万甜等6种食品添加剂新品种、食品添加剂环己基氨基磺酸钠(又名甜蜜素)等6种食品添加剂扩大用量和使用范围的公告

2017年第8号

根据《食品安全法》规定,审评机构组织专家对爱德万甜等6种食品添加剂新品种、环己基氨基磺酸钠(又名甜蜜素)等6种食品添加剂扩大用量和使用范围的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

附件:1. 食品添加剂新品种爱德万甜(*N*-[*N*-[3-(3-羟基-4-甲氧基苯基)丙基]-*L*-α-天冬氨酸]-*L*-苯丙氨酸-1-甲酯)

2. 2-丙酰吡咯等2种食品用香料新品种

3. 食品工业用酶制剂新品种β-葡聚糖酶

4. (6S)-5-甲基四氢叶酸,氨基葡萄糖盐等2种食品营养强化剂新品种

5. 环己基氨基磺酸钠(又名甜蜜素)等6种扩大用量和使用范围的食品添加剂

国家卫生计生委
二〇一七年十月二十日

(相关链接: <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7890/201710/c4cc46c01005445f88ad169c8e820aee.shtml>)