

[18] 许旭, 耿丹丹, 肖远灿, 等. 改良 QuEChERS/HPLC-光化学在线衍生荧光检测法测定猪肉中 18 种磺胺类药物残留量[J].

分析测试学报, 2015, 34(7):807-812.

实验技术与方法

QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定 粮食制品中 4 种真菌毒素

苏碧玲, 谢维平, 欧阳燕玲, 陈林刚

(泉州市疾病预防控制中心, 福建 泉州 362000)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联三重四级杆质谱(UPLC-MS/MS)测定面包、馒头和饼干等粮食制品中 4 种真菌毒素的方法。方法 样品用乙腈-水(84:16, V/V)超声提取,经 QuEChERS 方法净化,采用 BDS HYPERSIL C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.4 μm)进行分离,以甲醇-乙酸铵缓冲液为流动相梯度洗脱,流速为 300 μl/min,在电喷雾负离子化模式(ESI-)和多反应监测模式(MRM)下进行检测,采用基质外标法定量。并对方法的检出限、定量限、准确度和精密度进行评价,用建立的方法对 60 份市售粮食制品中的 4 种真菌毒素进行检测。结果 在优化条件下,4 种真菌毒素在各自的线性范围内线性关系良好,相关系数(*r*)均不低于 0.999,回收率在 81.8% ~ 98.2% 之间,相对标准偏差在 5.6% ~ 9.3% 之间。60 份市售粮食制品中均检出脱氧雪腐镰刀菌烯醇,含量为 15.2 ~ 960 μg/kg,其余 3 种真菌毒素均未检出。结论 该方法与国家标准方法和国家食品安全风险监测方法比较,具有操作简单、成本低的优点,且速度快、灵敏度高、重现性好,完善了我国食品安全风险监测的方法。

关键词:超高效液相色谱-串联质谱; QuEChERS; 真菌毒素; 粮食制品; 食品污染物; 食品安全

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2018)01-0034-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2018.01.007

Determination of four mycotoxins in grain products with QuEChERS-based approach and ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry

SU Bi-ling, XIE Wei-ping, OUYANG Yan-ling, CHEN Lin-gang

(Quanzhou Center for Disease Control and Prevention, Fujian Quanzhou 362000, China)

Abstract: Objective A high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method was developed for the determination of four mycotoxins in grain products such as bread, steamed bun and biscuit. **Methods** Samples were extracted with acetonitrile-water (84:16, V/V), then was purified by QuEChERS approach. UPLC separation was achieved by using BDS HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 2.4 μm) chromatographic column by gradient elution at a flow rate of 300 μl/min with methanol and acetate buffer as the mobile phase. The detection was carried out by negative electrospray ionization (ESI-) mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode (MRM). Matrix-matched calibration was used for the quantification. The limits of detection, quantification, accuracy and precision of the method were evaluated. The method was used for detecting four mycotoxins in 60 different grains from the market. **Results** Under optimized condition, four mycotoxins had good linear relationships in the certain correlation ranges with the correlation coefficients all above 0.999. The average recoveries of 4 mycotoxins at three spiked levels ranged from 81.8% to 98.2% with relative standard deviations of 5.6% -9.3%. Four mycotoxins were detected in the 60 market samples. Deoxynivalenol (DON) was detected in all samples with the concentrations of 15.2-960 μg/kg, the other 3 mycotoxins were not detected. **Conclusion** The method was more simple and lower cost than the national standard method and the national food safety risk monitoring method, with fast speed, high sensitivity and good reproducibility, which improve the national food safety risk monitoring method.

收稿日期:2017-11-26

基金项目:泉州市重点科技计划项目(2016Z040)

作者简介:苏碧玲 女 技师 研究方向为理化检验 E-mail:553074665@qq.com

Key words: Ultra high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry; QuEChERS; mycotoxins; grain products; food contaminants; food safety

真菌毒素是由某些真菌在适宜的环境条件下产生的次级有毒代谢产物,广泛存在于粮食、饲料和食品中^[1]。其中,对人类危害大且毒性强和污染频率高的有十几种,包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-ADON)、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-ADON)和玉米赤霉烯酮(ZON)等,这些毒素是粮食类作物霉变产生的较为常见、影响较大的真菌毒素,人或者家畜误食后,会引起呕吐、腹泻、发烧甚至死亡等急性中毒症状,还可能导致食管癌、贫血等疾病,大部分国家对粮食制品中 DON、3-ADON、15-ADON 和 ZON 不同程度地规定了限量要求,因此,有必要建立一种同时检测粮食制品中 DON、3-ADON、15-ADON 和 ZON 4 种真菌毒素残留量的方法。

目前,真菌毒素检测的方法主要有酶联免疫(ELISA)法^[2]、薄层色谱(TLC)法^[3]、气相色谱(GC)法^[4]及高效液相色谱(HPLC)法^[5]等,这些方法只能对某一种或某一类结构相似的毒素进行检测,而且,这些方法对真菌毒素缺乏确认信息,定性能力不足^[6]。然而,超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法具有更高的选择性和灵敏度,且可同时提供目标化合物的保留时间和分子结构信息,适合多组分同时分析等优点^[7],成为同时检测多种真菌毒素的主要手段^[8-9],在前期试验^[10]的基础上,本试验结合 QuEChERS 净化的前处理技术^[11],建立了面包、馒头和饼干等粮食制品中 DON、3-ADON、15-ADON 和 ZON 同时检测的 UPLC-MS/MS 法,该方法简便、快速、灵敏,为卫生监督部门提供更有效的监督手段,完善了我国食品安全风险监测的方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

按国家食品安全风险监测标准要求采集 60 份粮食制品,样品经多功能粉碎机粉碎后,密封备用。

1.1.2 主要仪器与试剂

1290 Infinity 超高效液相色谱仪(美国 Agilent)、AB Sciex 4000 + 三重四级杆质谱仪(美国 AB Sciex)、高速离心机、Milli-Q 超纯水系统、涡旋混匀器、氮吹仪。

DON (51481-10-8)、3-ADON (50722-38-8)、15-ADON (88337-96-6)、ZON (17924-92-4)均购自美国 Romer(浓度均为 100 μg/ml),甲醇(LC-MS 级),

乙腈、乙酸铵(HPLC 级),中性 Al₂O₃ 为层析用填料,伯氨仲氨(PSA)、十八烷基硅烷(C18)、石墨化炭黑(GCB)、弗罗里硅土(Florisil)、强阴离子交换剂(SAX)和无水硫酸镁。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

DON、3-ADON、ZON 用乙腈配成 1.0 μg/ml 的标准储备液,15-ADON 用乙腈配成 10.0 μg/ml 的标准储备液,置于 4 °C 冰箱中储存。

1.2.2 样品前处理

准确称取 5.00 g 样品于 50 ml 塑料离心管中,加入 10 ml 乙腈-水(84:16, V/V),在振荡器上以 240 次/min 振摇 10 min 后,置于 -10 °C 冰箱冷却 10 min,加入 3 g 无水硫酸镁及 2 g 氯化钠(产生盐析效应,降低基质中亲水性物质的溶解度和提取液中水分的含量),立即混匀,以 5 000 r/min 离心 5 min。取 1 ml 乙腈层于 QuEChERS 净化管(含有 50 mg C18 吸附剂,50 mg Florisil 吸附剂及 300 mg 无水硫酸镁),涡旋混匀 1 min,上清液经 0.22 μm 有机相滤膜过滤,取 0.6 ml 在 40 °C 下用氮气吹干,最后用 0.3 ml 20% 甲醇水溶液溶解残渣,置于有内衬管的进样瓶。

1.2.3 仪器条件

色谱:色谱柱为 BDS HYPERSIL C₁₈ (4.6 mm × 100 mm, 2.4 μm),柱温 40 °C,进样体积 10 μl,流速 300 μl/min。流动相:A 为 5 mmol/L 醋酸铵水溶液,B 为甲醇,梯度洗脱程序:0 ~ 3.0 min 30% ~ 95% B;3.0 ~ 6.0 min 95% B;6.1 min 30% B,平衡 3 min。

质谱:电喷雾离子源,多反应监测模式,离子喷射电压(IS) -4 500 V,离子源温度 550 °C,源内气体 1(Gas1)压力 4.48 × 10⁵ Pa,源内气体 2(Gas2)压力 4.48 × 10⁵ Pa,气帘气体(CUR)压力 2.76 × 10⁵ Pa,碰撞气(CAD)压力 4.14 × 10⁴ Pa,扫描方式、监测离子对和其他参数见表 1。

2 结果与分析

2.1 标准溶液色谱图

取空白样品,按照 1.2.2 方法进行前处理,得到空白基质提取液,用空白基质提取液稀释,配制混合标准序列溶液(标准序列范围: DON、3-ADON、ZON:0.50 ~ 50.0 μg/L;15-ADON:5.0 ~ 500 μg/L),标准溶液色谱图见图 1。

表1 4种真菌毒素的质谱检测参数

化合物	离子对/(<i>m/z</i>)	碰撞电压/V	碰撞能量/eV
DON	355.2/59.2*	-40	-36
	355.2/295.2	-40	-13
3-ADON	337.2/307.1*	-46	-15
	337.2/173.1	-46	-13
15-ADON	337.2/150.2*	-40	-18
	337.2/219.2	-40	-13
ZON	317.1/175.0*	-80	-34
	317.1/130.9	-80	-41

注:*表示定量离子对

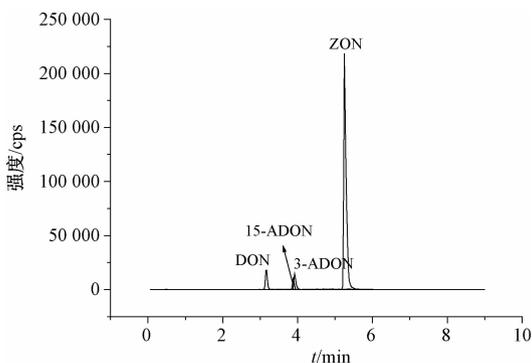


图1 混合标准溶液色谱图

Figure 1 Chromatogram of mixture standard solution

2.2 前处理方法的考察

该试验比较了甲醇、乙腈以及不同比例的甲醇-水混合溶液、乙腈-水混合溶液作为提取溶剂,结果表明使用乙腈-水作为提取溶剂时4种真菌毒素的回收率在90%~105%之间,比甲醇-水作为提取溶剂的回收率高出6%以上,所以选择乙腈-水作为提取溶剂,试验还发现当水溶液中乙腈的体积分数达到80%~85%时,提取效率最高,这和已有报道^[12]基本一致,因此,最终选择乙腈-水(84:16, V/V)作为提取溶剂。

QuEChERS净化法是近年来国际上最新发展起来的具有快速、简单、便宜、有效、可靠和安全等特点的样品前处理技术,初期主要用于农产品检测,近几年正逐渐扩大到其他领域,其中也包括真菌毒素的分析。该试验对比了混合标准溶液经过6种不同吸附剂和未使用吸附剂时各真菌毒素的回收率,结果见表2,发现C18和Florisol对4种真菌毒素的回收率均较好,在70%以上,而其他4种吸附剂净化后的真菌毒素回收率较低,因此,本试验选择C18和Florisol填料作为QuEChERS净化的吸附剂,并添加了无水硫酸镁粉末,起到除水的作用。

表2 6种吸附剂净化后和未使用吸附剂对4种真菌毒素的回收率(%)

吸附剂	DON	3-ADON	15-ADON	ZON
C18	95.6	92.4	77.5	99.8
Florisol	100.3	79.3	82.4	102.5
SAX	69.6	68.3	53.9	86.4
GCB	88.8	75.4	52.6	83.5
Al ₂ O ₃	81.7	71.3	67.5	85.8
PSA	72.5	83.2	48.9	78.4
未使用	68.5	66.8	56.2	76.9

2.3 色谱条件的优化

对流动相进行优化,比较了甲醇-醋酸铵水溶液和乙腈-醋酸铵水溶液两种体系,试验发现4种真菌毒素在甲醇-醋酸铵水溶液体系中响应较高,因此,选用甲醇和5 mmol/L醋酸铵水溶液作为流动相,同时采用梯度洗脱进行分析,不仅能缩短出峰时间,还能有效地去除色谱柱中残留的杂质。

2.4 标准曲线与检测限

配制4种真菌毒素系列混合标准溶液进行测定,以峰面积(*y*)对浓度(*x*, μg/L)进行线性回归,其线性关系良好,相关系数在0.999 4~0.999 9之间,检测限(LOD)和定量限(LOQ)分别为3倍信噪比和10倍信噪比时的最低浓度,结果见表3。

表3 4种真菌毒素的线性方程、线性范围、相关系数、检测限和定量限

分析物	线性方程	线性范围 /(μg/L)	相关系数 (<i>r</i>)	LOD /(μg/kg)	LOQ /(μg/kg)
DON	$y = 937x + 169$	1.0~50	0.999 7	0.3	1.0
3-ADON	$y = 638x + 256$	1.5~50	0.999 5	0.4	1.5
15-ADON	$y = 543x - 208$	6.0~500	0.999 4	2.0	6.0
ZON	$y = 10637x - 1024$	0.8~50	0.999 9	0.2	0.8

2.5 方法的回收率与精密度

取一份阴性样品进行添加回收率和精密度试验,样品分别添加不同浓度的4种真菌毒素混合标准溶液,摇匀,静置30 min,使标准溶液被样品充分吸收,按本方法进行前处理和测定,每个浓度测定6次,计算其平均加标回收率和相对标准偏差(RSD),结果见表4。

2.6 实际样品的检测

应用本方法对60份粮食制品进行检测,以保留时间和碎片离子定性,外标法定量。结果表明,60份样品均有检出不同浓度的DON,含量在15.2~960 μg/kg之间,均未超过国家标准规定的限量要求^[13],除此以外的3种真菌毒素均未检出。

表 4 4 种真菌毒素加标回收率与精密度 ($n = 6$)

Table 4 Recoveries of samples and relative standard deviation of four mycotoxins

分析物	加标浓度 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 /%	RSD /%
DON	0.3, 1.0, 5.0, 50.0	82.3, 83.8, 90.3, 82.7	6.2, 7.4, 8.5, 9.3
3-ADON	0.4, 2.0, 10.0, 100.0	81.8, 83.5, 94.8, 86.9	7.1, 8.5, 7.8, 8.2
15-ADON	2.0, 10.0, 25.0, 200.0	86.5, 89.5, 92.1, 85.4	7.9, 8.1, 7.0, 9.2
ZON	0.2, 1.0, 2.5, 25.0	83.2, 90.2, 98.2, 82.3	5.9, 6.3, 5.6, 7.1

3 小结

本试验针对粮食制品中 4 种真菌毒素,对样品的前处理、QuEChERS 净化条件、色谱条件等进行了详细研究,与以往报道的文献有所不同,所建立的 UPLC-MS/MS 法具有简便、快速、准确等优点,减少了有机试剂的用量,更经济、环保和实用,方法具有先进性。虽然质谱仪器昂贵,对操作人员要求高,检测成本高,但是其灵敏度和准确度高,检测速度快,为国家食品安全风险监测任务的检测要求和大批量样品检测带来了便利。

参考文献

- [1] 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.
- [2] MONACI L, PALMISANO F, MATRILLA R, et al. Determination of ochratoxin A at part-per-trillion level in Italian salami by immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Chromatogr A, 2005,1090(1/2):184-187.

- [3] MARIJANA S, BORKA S. Survey of trichothecene mycotoxins in grains and animal feed in Croatia by thin layer chromatography [J]. Food Control, 2006, 17(9):733-740.
- [4] VALLE-ALLE-ALGARRA F M, ANGEL M, GIMENO-ADELANTADO J V, et al. Comparative assessment of solid-phase extraction clean-up procedures, GC columns and perfluoroacylation reagents for determination of type B trichothecenes in wheat by GC-ECD[J]. Talanta, 2005, 66(1):194-201.
- [5] LIPPOLIS V, MICHELANGELO P, CHRIS M, et al. Improvement of detection sensitivity of T-2 and HT-2 toxins using different fluorescent labeling reagents by high-performance liquid chromatography[J]. Talanta, 2008, 74(5):1476-1483.
- [6] 张爱华,冯璐璐,马彦娜,等. 赭曲霉毒素 A 分析方法研究进展[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(7):1003-1008.
- [7] 纪律,李启,雷永良,等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定竹笋中百草枯的残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(3):312-315.
- [8] 陈慧菲,朱天仪,陈凤香,等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定谷物中的 8 种真菌毒素[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(5):67-70.
- [9] 胡文彦,许磊,杨军,等. 基于 QuEChERS 提取的快速液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷基辅助食品中的 9 种真菌毒素[J]. 色谱, 2014, 32(2):133-138.
- [10] 苏碧玲,谢维平,欧阳燕玲,等. QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷类辅助食品中 12 种真菌毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(4):467-471.
- [11] 范茂林,杨旭东,艾雨,等. 尿液中尼古丁和可替宁 QuEChERS 预处理气相色谱测定法建立[J]. 中国公共卫生, 2017, 33(2):333-337.
- [12] REN Y P, ZHANG Y, SHAO S L, et al. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1143(1/2):48-64.
- [13] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2011 [S]. 北京:中国标准出版社, 2011.

· 公告 ·

关于丙烯酸与乙二醛和丙烯酰胺的聚合物等 6 种食品相关产品新品种的公告

2017 年第 11 号

根据《食品安全法》规定,审评机构组织专家对丙烯酸与乙二醛和丙烯酰胺的聚合物等 6 种食品相关产品新品种的安全性评估材料审查并通过。

特此公告。

附件:丙烯酸与乙二醛和丙烯酰胺的聚合物等 6 种食品相关产品新品种

国家卫生计生委

二〇一七年十一月二十三日

(相关链接: <http://www.nhffc.gov.cn/sps/s7890/201711/cdf7d65e65d243b187b25a222e51c11a.shtml>)