

实验技术与方法

间氨基苯硼酸修饰磁性碳纳米管-超高效液相色谱-串联质谱法
测定太湖水产品中9种微囊藻毒素残留

邵国健,姚建花,余娟

(浙江省湖州市疾病预防控制中心,浙江湖州 313000)

摘要:目的 建立基于间氨基苯硼酸修饰磁性多壁碳纳米管复合纳米粒子前处理技术的磁性固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定水产品中9种微囊藻毒素。方法 通过水热合成方法制备磁性多壁碳纳米管($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNTs}$)复合纳米粒子,利用化学氧化法将间氨基苯硼酸修饰在磁性碳纳米管表面形成功能化纳米材料($\text{APBA}@ \text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNTs}$)。应用透射电子显微镜及红外光谱对材料进行表征。通过对萃取效率的影响因素进行优化,建立了乙酸-PBS缓冲溶液-甲醇(2:49:49, V/V)溶液作为提取溶液,使用50 mg的磁性纳米材料萃取15 min,采用5%氯化甲醇作为洗脱溶剂,洗脱时间为10 min的前处理方法。结果 9种微囊藻毒素在5~200 ng/mL范围内,线性关系良好,相关系数(r)均>0.998,检出限(LOD)为0.15~8.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。3个加标水平的平均回收率为91.8%~103.2%,相对标准偏差(RSD)为3.1%~9.5%。结论 该方法可同时测定水产品中9种微囊藻毒素,前处理简单、灵敏度高、相对回收率高,优于国标方法,为水产品中微囊藻毒素的监测提供有力的技术保障。

关键词:水产品;微囊藻毒素;多壁碳纳米管;超高效液相色谱-串联质谱

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)04-0391-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.008

Simultaneous determination of 9 kinds of microcystins in Taihu aquatic products based on APBA@ $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNTs}$ magnetic nanoparticles coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

SHAO Guojian, YAO Jianhua, YU Juan

(Huzhou Center for Disease Control and Prevention, Zhejiang Huzhou 313000, China)

Abstract: Objective To develop a multiwalled carbon nanotube (MSPE) method coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) by preparing a magnetic multiwall carbon nanotube composite nanoparticles modified with 3-aminobenzenboronic acid for simultaneous determination of 9 kinds of microcystins in aquatic products. **Methods** Magnetic multiwall carbon nanotubes ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{MWCNTs}$) composite nanoparticles were prepared by hydrothermal synthesis. Then, the 3-aminobenzenboronic acid was modified on the prepared magnetic carbon nanotubes through the chemical oxidation method. The nanoparticles have been characterized by transmission electron microscopy and infrared spectroscopy. The main factors influencing the extraction efficiency were optimized. And then a preprocessing method with acetic acid-PBS buffer solution-methanol (2:49:49, V/V) was selected as the extraction solution, and 50 mg magnetic nanomaterials were used for extraction for 15 min, 5% ammoniated methanol was used as the eluting solvent within 10 min. **Results** The calibration curves of microcystins showed a good linearity in the range of 5-200 ng/mL with correlation coefficients above 0.998. The detection limits (LOD) of the method were in the range of 0.15-8.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The average relative recoveries of three spiked levels ranged from 91.8% to 103.2% with the relative standard deviations of 3.1%-9.5%. **Conclusion** The method has the characteristics of simple pretreatment, high sensitivity and high recoveries, superior to national standard method. It could simultaneously determine 9 kinds of microcystins in aquatic products and provides a powerful technical guarantee for the monitoring of microcystins in aquatic products.

Key words: Aquatic products; microcystins; multi-walled carbon nanotube; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

随着工业、航运、围网养殖等行业的发展,水资源污染情况日益严重^[1]。2007年后,太湖蓝藻水华暴发的频率及强度逐年增加,成为当地严重的环境安全问题^[2]。微囊藻毒素(microcystins, MCs)是目前在蓝藻水华污染中出现频率最高、产生量最大、

收稿日期:2020-05-29

基金项目:浙江省公益技术应用研究计划项目(2016C37022, 2016C33218)

作者简介:邵国健 男 副主任技师 研究方向为食品理化检验

E-mail:sgj1019@126.com

造成危害最严重的藻毒素。MCs 对人体和水生生物具有急性肝毒性和强促癌活性^[3-4]。研究^[5-9]表明, MCs 可导致氧化应激态、DNA 损伤、细胞骨架崩解乃至诱导凋亡而产生毒作用,其可通过影响两种蛋白磷酸酶(PP1 和 PP2A)活性和功能导致细胞内磷酸化和去磷酸化水平的失衡进而产生毒性效应,破坏细胞内稳态,中毒时可导致肝肿大,严重可发生出血和死亡,但由于缺少 MCs 的检测技术,导致成为污染防治的瓶颈。

目前,对于 MCs 的检测方法主要有免疫检测法^[10]、液相色谱法^[11]、气相色谱-质谱法^[12]和液相色谱-串联质谱法^[13-14]等,其中,灵敏度较高、选择性较好的为液相色谱-串联质谱法,目前国标检测水产品中 MCs 主要是液相色谱-串联质谱法^[15],前处理一般采用固相萃取技术,通常采用的是 HLB 柱或 C₁₈ 柱^[11-12],存在回收率低、共存干扰物质多的问题。磁性固相萃取(MSPE)是一种新技术,相对于传统固相萃取有不需要离心过滤、悬浊液直接萃取和相分离方便等优点。碳纳米管是 MSPE 应用较为广泛的纳米材料,由二维石墨烯片层卷曲而成无缝中空的圆柱管体,其侧面管壁通常由六边形的碳环构成,碳原子以 sp² 杂化方式结合,每个碳原子剩余的 p 轨道相互平行,形成大 π 键,对有机物有较好的吸附性能^[16]。针对水产品中 MCs 的检测存在样品前处理复杂、基质干扰多和回收率低等问题,本试验建立了 MSPE 前处理、超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)检测技术以提高方法的灵敏度和净化富集效果,通过水热合成法将 Fe₃O₄ 纳米磁球结合到多壁碳纳米管(MWCNTs)表面^[17-18],并通过化学氧化法进行 MWCNTs 表面间氨基苯硼酸修饰,合成了复合磁性纳米粒子 APBA@Fe₃O₄/MWCNTs,建立水产品中 9 种 MCs 间氨基苯硼酸修饰磁性碳纳米管-UPLC-MS/MS 法的检测技术,与国标方法比较,本法具有样品前处理简单、检测毒素种类多、相对回收率高等优点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2016—2018 年采集太湖主要捕捞淡水水产品,包括白虾(8 份)、河虾(8 份)、螺蛳(6 份)、螃蟹(8 份)、白鲢(9 份)、白鱼(6 份)、鲢鱼(5 份)、鲫鱼(12 份)、银鱼(8 份)和鳊鱼(8 份),共计 10 类 78 份样品。

1.1.2 主要仪器与试剂

Q-TRAP 5500 质谱仪(美国 AB SCIEX)、LC-30A

超高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU)、Milli-Q 超纯水仪(美国 MILLIPORE)、多管涡旋振荡器、数控加热超声波清洗器、ASPE899 自动固相萃取仪(日本岛津 GL)、N-EVAP112 氮气浓缩仪。

微囊藻毒素-RR(L30195, MC-RR)、微囊藻毒素-YR(L30240, MC-YR)、微囊藻毒素-HtYR(L25556, MC-HtYR)、微囊藻毒素-LR(L29541, MC-LR)、微囊藻毒素-WR(L30247, MC-WR)、微囊藻毒素-LA(L30201, MC-LA)、微囊藻毒素-LY(L30199, MC-LY)、微囊藻毒素-LW(L30186, MC-LW)、微囊藻毒素-LF(L30188, MC-LF)浓度均 $\geq 95.0\%$,均购自美国 ENZO life sciences。

甲醇、乙腈均为色谱纯,甲酸($\geq 98.0\%$)、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、乙酸、氯化高铁、乙二醇、一缩二乙二醇、柠檬酸均为分析纯,间氨基苯硼酸一水合物(分析纯,德国 Sigma),聚乙二醇(PEG)10000(化学纯),10~30 μm 羧基化多壁碳纳米管(北京德科岛金公司),0.2 μm 一次性微孔滤膜(上海安谱)。

1.2 方法

1.2.1 磁性碳纳米管(Fe₃O₄/MWCNTs)的制备

称取 2 g 表面活性剂 PEG10000 于 40 mL 乙二醇-二乙二醇(1:1, V/V)溶液中,加热溶解,加入 5.4 g 三氯化铁水合物、7.2 g 静电稳定剂无水醋酸钠、0.6 g 羧基化碳纳米管,超声搅拌 30 min,水热釜中 195 $^{\circ}\text{C}$ 反应 15 h,冷却至室温。收集产物,用乙醇和水清洗产物数次,在干燥箱中 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥过夜备用。

1.2.2 间氨基苯硼酸修饰磁性纳米材料(APBA@Fe₃O₄/MWCNTs)的制备

称取 0.5 g 磁性碳纳米管、1.1 g 柠檬酸及 9.1 g FeCl₃·6H₂O 于 250 mL 三颈烧瓶中,加入 150 mL 超纯水,室温下搅拌 3 h,Fe³⁺将在同离子效应作用下吸附包裹在磁性碳纳米管表面。迅速加入 30 mL 的间氨基苯硼酸溶液(0.18 mol/L),混合物在机械搅拌下反应 12 h。收集产物,用甲醇和水反复清洗,在干燥箱中 60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥过夜备用^[19]。

1.2.3 标准溶液配制

9 种 MCs 标准品及内标节球藻毒素用甲醇配制成 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的单标储备液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。临用前用甲醇-0.04%甲酸水溶液(1:1, V/V)将混合标准中间液稀释,配制成 5~200 ng/mL 的混合标准工作液,内标浓度均为 20 ng/mL。

1.2.4 样品前处理

将鱼虾等水产品去鳞、去皮、取可食部分,用匀浆机制成匀浆样品。称取已均质样品 2 g(精确到 0.01 g),置于 50 mL 离心管中,加入 40 ng 内标节球

藻毒素溶液及 30 mL 乙酸-磷酸缓冲盐溶液(PBS 缓冲溶液)-甲醇(2:49:49, V/V)溶液,涡旋提取 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min(离心半径为 10 cm),用快速滤纸过滤,待净化。量取上清液 15 mL 于离心管中,用 PBS 缓冲溶液(2% 乙酸)稀释至 50 mL,加入 50 mg 磁性纳米材料,振荡吸附 15 min,磁性分离,弃去水相。加入 2 mL 5% 氯化甲醇洗脱液振荡解吸 10 min,磁性分离,收集上清液,洗脱溶剂在 40 °C 使用氮吹进行吹干,准确加入 1 mL 50% 水(0.04% 甲酸)-甲醇(1:1, V/V)溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜后,待 UPLC-MS/MS 分析。

1.2.5 仪器条件

色谱:色谱柱 ACQUITY UPLC BEH C₁₈(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相:A 为 0.04% 甲酸水溶液,B 为甲醇。流速:0.20 mL/min;柱温:40 °C;进样量:10 μL。梯度洗脱程序条件见表 1。

质谱:电喷雾离子源(ESI⁺),多反应监测(MRM)。气帘气(CUR):35 psi(241 kPa);雾化气(GS1):50 psi(345 kPa);辅助气(GS2):50 psi

表 1 UPLC 梯度洗脱程序

Table 1 UPLC gradient elution condition

时间/min	流速/(mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.20	90.0	10.0
1.00	0.20	90.0	10.0
6.00	0.20	65.0	35.0
11.00	0.20	65.0	35.0
17.00	0.20	20.0	80.0
18.00	0.20	20.0	80.0
19.00	0.20	90.0	10.0
20.00	0.20	90.0	10.0

(345 kPa);电喷雾电压(IS):5 500 V;碰撞气(CAD):medium;离子源温度(TEM):550.0 °C。特征离子见表 2。一级质谱分析(Q1 扫描)显示,9 种 MCs 的母离子均不相同,母离子的 H⁺转移至甲氧基上,形成氧正离子,然后发生 α 断裂,C-C 键断开,形成 m/z 为 135.0 的子离子。此离子可能发生分子内的氢转移重排,形成更稳定的共轭正离子,不同的 MCs 母离子和 m/z 为 135.0 的子离子形成不同的定量通道,用于结果的确证分析。

表 2 9 种 MCs 及内标节球藻毒素质谱分析条件

Table 2 9 kinds of microcystins algae toxin quality spectrum analysis conditions

序号	化合物	保留时间 /min	母离子 / (m/z)	子离子 / (m/z)	去簇电压 /V	碰撞电压 /V
1	MC-RR	8.00	520.0	135.0 [*] , 213.1	145, 145	34, 41
2	MC-YR	9.75	530.3	135.0 [*] , 213.1	70, 70	16, 40
3	MC-HtYR	10.01	523.6	135.0 [*] , 213.1	70, 70	16, 40
4	nodularin	10.45	825.5	135.0 [*] , 70.0	100, 100	60, 97
5	MC-LR	10.45	498.6	135.0 [*] , 213.1	70, 70	16, 37
6	MC-WR	11.93	535.1	135.0 [*] , 213.1	80, 80	31, 42
7	MC-LA	13.04	456.0	135.0 [*] , 213.1	80, 80	20, 30
8	MC-LY	13.12	502.3	135.0 [*] , 213.1	70, 70	32, 40
9	MC-LW	13.61	513.6	135.0 [*] , 213.1	80, 80	33, 40
10	MC-LF	13.82	494.1	135.0 [*] , 213.1	80, 80	30, 30

注: * 为定量离子;节球藻毒素(nodularin)为内标

2 结果与分析

2.1 APBA@Fe₃O₄/MWCNTs 的表征与性能评价

合成的磁性纳米材料为黑色粉末蓬松状固体,在水相中经轻微振摇即可均匀分散,并且具有良好的磁性,能全部被磁铁吸引进行分离收集。从透射电镜图可以看到,合成的纳米材料中 Fe₃O₄ 磁性颗粒为规则球形,MWCNTs 结合在磁球表面,粒径基本在 200 nm 左右,见图 1。红外谱图结果显示,MWCNTs 具有 C=O 的 1 718 cm⁻¹ 和-OH 的 2 920 cm⁻¹ 伸缩振动峰,其表面修饰了-COOH 基团,见图 2。合成的 Fe₃O₄/MWCNTs 纳米颗粒在 575 cm⁻¹ 处有 Fe₃O₄ 的 Fe-O-Fe 键的特征伸缩振动峰。APBA@Fe₃O₄/MWCNTs 分别在苯环的 858 cm⁻¹ 和肽键 1 537 cm⁻¹ 特征吸收峰,而-COOH 基团的特征

峰峰值明显下降,表明间氨基苯硼酸成功接枝在磁性碳纳米颗粒的表面。

2.2 MSPE 条件优化

将 9 种 MCs 及其内标节球藻毒素的混合标准溶液添加于空白水产品基质中,每种 MCs 添加水平为 20 μg/kg,用于试验条件的优化。

2.2.1 提取条件优化

目前甲醇、乙腈、PBS 缓冲溶液和乙二胺四乙酸-McIlvaine 广泛用于食品样品中污染物的提取,本试验将其运用到水产品中 MCs 的提取。PBS 缓冲溶液对出峰靠前的毒素有较好的提取效果,见图 3。而甲醇对出峰靠后的毒素提取效果好,二者混合后提取效果更优,且随着混合溶液中甲醇浓度的提升,毒素的回收率也逐渐增大,当二者比例为 1:1 (V/V)时效果最佳,见图 4。

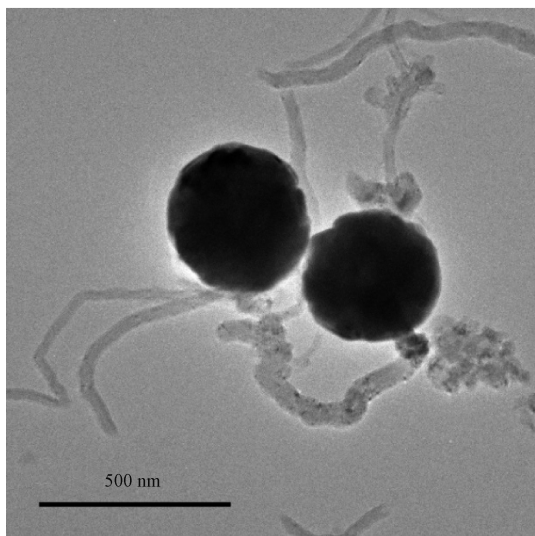


图1 APBA@Fe₃O₄/MWCNTs透射电镜图

Figure 1 TEM image of the magnetic APBA@Fe₃O₄/MWCNTs

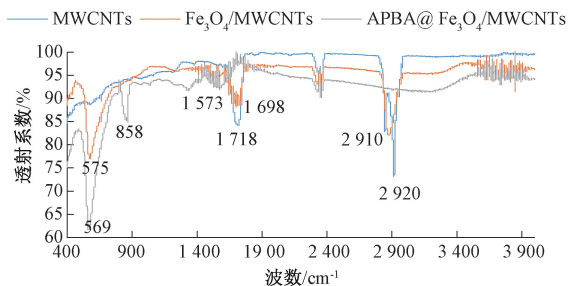
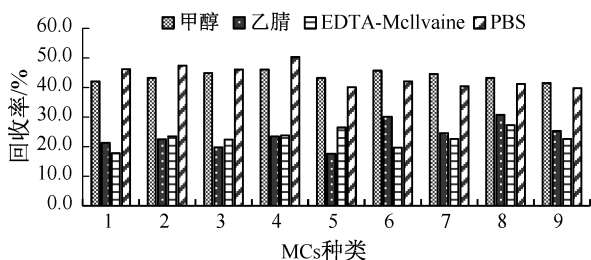


图2 纳米颗粒修饰前后的红外光谱谱图

Figure 2 FTIR spectra of MWCNTs, Fe₃O₄/MWCNTs and APBA@Fe₃O₄/MWCNTs



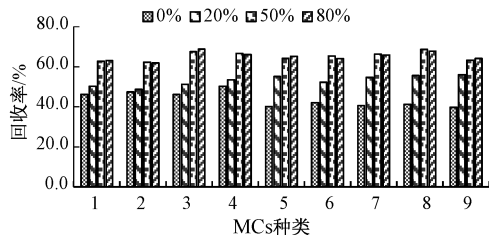
注:1为MC-RR;2为MC-YR;3为MC-HtYR;4为MC-LR;

5为MC-WR;6为MC-LA;7为MC-LY;8为MC-LW;9为MC-LF

图3 提取液类型对萃取效果的影响

Figure 3 Effect of the extraction solvent type on extraction efficiency

由于MCs分子结构含有羧基、氨基和酰氨基,所以在不同pH值下,MCs有不同的离子化倾向。GB/T 5750.8—2006《生活饮用水标准检验方法 有机物指标》^[20]中使用5%乙酸水溶液进行提取。在混合溶液加入不同浓度的乙酸进行提取效果比较,当含有2%的乙酸时,提取效果最优,9种毒素的回收率在67.1%~71.5%之间,见图5。最终选择乙酸-PBS缓冲溶液-甲醇(2:49:49,V/V)溶液作为提



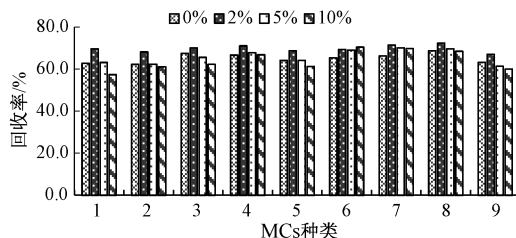
注:1为MC-RR;2为MC-YR;3为MC-HtYR;4为MC-LR;

5为MC-WR;6为MC-LA;7为MC-LY;8为MC-LW;9为MC-LF

图4 甲醇比例对萃取效果的影响

Figure 4 Effect of the ratio of methanol on extraction efficiency

取溶液。萃取时间优化结果显示见图6,当吸附时间由5 min逐渐增大到20 min时,MCs的回收率逐渐增大,15 min时基本达到萃取平衡。

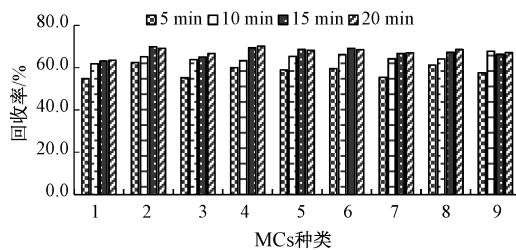


注:1为MC-RR;2为MC-YR;3为MC-HtYR;4为MC-LR;

5为MC-WR;6为MC-LA;7为MC-LY;8为MC-LW;9为MC-LF

图5 乙酸含量对萃取效果的影响

Figure 5 Effect of the ratio of acetic acid on extraction efficiency



注:1为MC-RR;2为MC-YR;3为MC-HtYR;4为MC-LR;

5为MC-WR;6为MC-LA;7为MC-LY;8为MC-LW;9为MC-LF

图6 萃取时间对萃取效果的影响

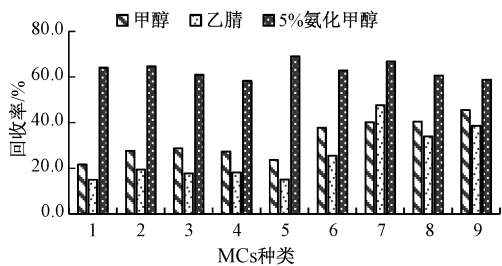
Figure 6 Effect of extraction time on extraction efficiency

2.2.2 解吸条件的优化

选取甲醇、乙腈和5%氯化甲醇作为洗脱溶剂进行试验,结果显示5%氯化甲醇效果明显优于其他三种纯溶剂,解吸10 min可达到完全洗脱,见图7和8。

2.2.3 吸附容量

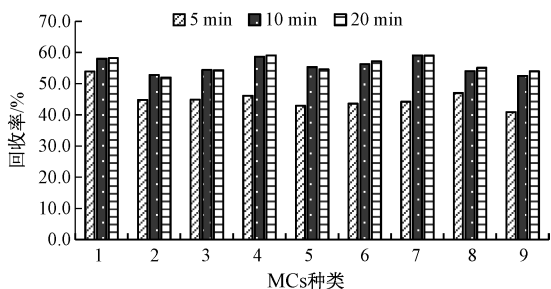
本试验以MC-LR为例,考察磁性纳米材料对MCs的吸附容量,在空白水产品基质中添加不同浓度的MC-LR,在上述优化的条件下使用50 mg磁性纳米材料进行萃取。结果发现,当水产品中MC-LR达到260 mg/kg时,材料的吸附容量达到最高,进一步增大水产品中MC-LR的浓度,吸附容量几乎保持恒定,在吸附容量最高时,平均绝对回



注:1为MC-RR;2为MC-YR;3为MC-HtYR;4为MC-LR;
5为MC-WR;6为MC-LA;7为MC-LY;8为MC-LW;9为MC-LF

图7 解吸液类型对解吸效果的影响

Figure 7 Effect of the desorption solvent type on extraction efficiency



注:1为MC-RR;2为MC-YR;3为MC-HtYR;4为MC-LR;
5为MC-WR;6为MC-LA;7为MC-LY;8为MC-LW;9为MC-LF

图8 解吸时间对解吸效果的影响

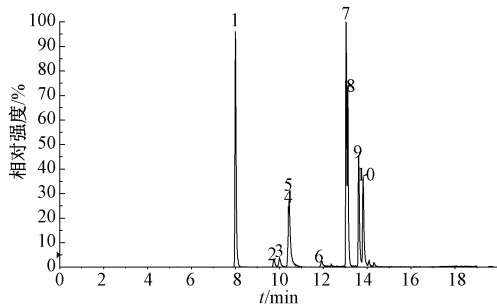
Figure 8 Effect of the elution time on extraction efficiency

收率为65.7%,计算得出制备的磁性纳米材料对MC-LR的吸附容量为3.42 mg/g。在碳纳米管的其他应用上,陈冰等^[21]合成的磁性纳米材料对食用油中的苯并[a]芘的吸附容量为0.95 mg/g;付善良等^[22]合成的磁性纳米材料对水样中的13种邻苯二甲酸酯类的吸附容量为3.6 mg/g;胡争艳等^[23]合成的磁性纳米材料针对婴幼儿配方奶粉中14种性激素残留的吸附容量为5.41 mg/g;本试验

合成的功能化纳米材料对MCs的吸附性能与上述文献中得出的吸附性能相当。结果表明磁性纳米材料极易吸附MCs,能满足本方法对分析的需要。本方法开展磁性MWCNTs用量分别为10、30、50、100 mg时的回收率试验,当材料用量为50 mg,萃取时间为15 min时,MCs的回收率达到理想效果。

2.3 线性范围、检出限及方法的准确度和精密度

本试验选用节球藻毒素为内标,以目标组分峰面积与相应内标峰面积的比值 y 为纵坐标,以标准工作液的浓度 x (ng/mL)为横坐标,进行线性回归,绘制标准曲线,得到线性回归方程。MCs及其内标总离子流图见图9。9种MCs在1~200 ng/mL时,具有良好的线性关系,相关系数(r)均>0.998。9种MCs的方法检出限(LOD)为0.15~8.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。选取空白水产品样品分别进行20、50和100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 开展3个加标水平进行回收率试验,每个添加水平分别测定6次,平均回收率及相对标准偏差(RSD)见表3,9种MCs的相对回收率为91.8%~103.2%,RSD为3.1%~9.5%,说明本方法具有较高的准确度和精密度。



注:1~10化合物同表2

图9 9种MCs总离子流图

Figure 9 HPLC-MS/MS chromatogram of a mix solution of 9 MCs

表3 9种MCs的线性关系、检出限及样品加标回收率与精密度($n=6$)

Table 3 Linear relationships, LOD, recoveries and precision of 9 MCs

化合物	线性范围 /(ng/mL)	线性方程	相关系数 r	LOD /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%			RSD/%		
					20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	20 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	100 $\mu\text{g}/\text{kg}$
MC-RR	1~50	$y=0.4691x-0.3194$	0.999 7	0.15	94.9	95.1	101.1	5.2	4.1	7.9
MC-YR	1~50	$y=0.1667x-0.0801$	0.999 9	0.47	100.9	98.9	101.1	5.3	8.9	6.4
MC-HtYR	1~50	$y=0.1856x-0.0409$	0.999 9	0.82	101.2	101.8	102.4	5.9	4.1	6.9
MC-LR	1~50	$y=0.1715x-0.1937$	0.998 4	0.21	91.8	102.3	95.4	6.9	7.9	7.7
MC-WR	5~50	$y=0.0399x-0.0139$	0.999 9	6.72	97.2	100.2	101.1	6.8	3.2	7.4
MC-LA	10~200	$y=0.0067x+0.0019$	0.999 9	8.56	101.2	93.9	100.3	3.1	7.9	9.5
MC-LY	10~200	$y=0.0038x+0.0017$	0.999 0	8.71	94.9	101.5	95.6	5.7	8.4	9.2
MC-LW	10~200	$y=0.0172x+0.0337$	0.999 9	4.28	102.9	96.8	103.2	5.1	4.8	5.3
MC-LF	10~200	$y=0.0062x+0.0392$	0.998 0	6.32	96.1	97.2	98.0	5.7	6.9	7.7

2.4 检测方法比对

为了进一步验证检测方法,将检测方法与GB 5009.273—2016《食品安全国家标准 水产品中微囊藻毒素的测定》^[15]方法进行比对。由于阳性样品往

往仅能检出几种MCs,为验证所有MCs的检测效果,采用空白螺蛳样品加入混合标准溶液,制备成目标浓度为20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样品,分别采用本检测方法和国标方法测定,结果见表4,其中国标方法

只检测 3 种 MCs,为了方法比对的可比性,因此使用国标方法检测了 9 种 MCs。相对国标方法,本方法样品处理方法更简便,MCs 的检测种类达到 9 种,且采用了内标法,可以校正回收效果,相对国标方法

的外标法有更好的相对回收率。国标方法使用基质匹配工作曲线检测样品,不同种类的水产品或水产品的不同部位有不同的基质效应,会影响定量准确性。

表 4 不同检测方法结果比对 ($n=6$)

Table 4 Results of method comparison

化合物	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)		回收率/%		RSD/%	
		本方法	国标法	本方法	国标法	本方法	国标法
MC-RR	20.0	18.98	14.84	94.9	74.2	5.2	7.5
MC-YR	20.0	20.18	15.24	100.9	76.2	5.3	5.7
MC-HiYR	20.0	20.24	15.70	101.2	78.5	5.9	4.9
MC-LR	20.0	18.36	16.08	91.8	80.4	6.9	8.7
MC-WR	20.0	19.44	15.30	97.2	76.5	6.8	6.7
MC-LA	20.0	20.24	15.12	101.2	75.6	3.1	7.7
MC-LY	20.0	18.98	14.48	94.9	72.4	5.7	7.2
MC-LW	20.0	20.58	15.08	102.9	75.4	5.1	5.6
MC-LF	40.0	38.44	30.08	96.1	75.2	5.7	7.4

2.5 实际样品测定

按上述方法测定了共 10 类 78 份太湖捕捞水产品,其中甲壳类河虾、太湖蟹中 9 种 MCs 均未检出,对太湖蟹进行肌肉、蟹膏、蟹黄分别检测时亦未发现 MCs 污染;8 份白虾中有 3 份检出,检出物为 MC-RR 和 MC-LR,MCs 总量在 0.28~2.19 $\mu\text{g}/\text{kg}$;6 份螺蛳中有 2 份检出,1 份仅检出 MC-RR,含量为 0.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$,另 1 份检出 MC-RR、MC-YR 和 MC-LR,总量达到 117 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对淡水鱼检测时发现,所有鱼的肌肉组织中 9 种 MCs 均未检出,其结果与 MCs 的生化代谢过程原理相符合,即与两种蛋白磷酸酶 (PP1 和 PP2A) 结合,而在鱼类肝脏样品中检出 MCs,9 份白鲢肝脏样品中有 1 份检出 MC-RR、MC-YR 和 MC-LR,总量达到 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$,6 份白鱼肝脏样品中有 2 份检出 MC-RR 和 MC-LR,总量在 3.28~4.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$,5 份鲢鱼肝脏样品中有 4 份检出 MC-RR 和 MC-LR,总量在 0.25~1.84 $\mu\text{g}/\text{kg}$,12 份鲫鱼肝脏样品中均有 MCs 检出,总量在 0.28~22.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本次检测的 10 类 78 份样品的结果较好地反映了南太湖流域主要捕捞淡水产品中 MCs 污染状况,为合理指导该区域水产品的消费提供帮助,为水产品质量安全提供技术保障。

3 小结

本试验建立了水产品中 9 种 MCs 残留同时检测的间氨基苯硼酸修饰磁性碳纳米管-UPLC-MS/MS 测定方法,该方法使用节球藻毒素作为内标,补偿了分析物在样品前处理时的损失以及基体的干扰,具有操作简单、快速、环境友好、结果准确可靠的特点,适用于水产品中 MCs 快速定量检测。

参考文献

- [1] 李冬华,苗通,周晟葆.基于可持续理论的太湖流域污染与治理研究[J].江苏科技信息,2016(29):78-80.
- [2] 秦伯强,杨桂军,马健荣,等.太湖蓝藻水华“暴发”的动态特征及其机制[J].科学通报,2016,61(7):759-770.
- [3] 黄艺,张郅灏.微囊藻毒素的致毒机理和人体健康风险评估研究进展[J].生态环境学报,2013,22(2):357-364.
- [4] 汪洋,李榭,冯悦,等.蓝藻毒素的类型及其产毒基因[J].生态学杂志,2017,36(2):517-523.
- [5] 王小宁.微囊藻毒素及其衍生物抑制蛋白磷酸酶 PP1 生物活性差异机制研究[D].济南:山东师范大学,2017.
- [6] FAN H H, CAI Y, XIE P, et al. Microcystin-LR stabilizes c-myc protein by inhibiting protein phosphatase 2A in HEK293 cells[J]. Toxicology, 2014, 319(2): 69-74.
- [7] GU Y L, GAO X F, JIANG Y G, et al. Molecular characterization and toxin quantification of *Microcystis panniformis*: a microcystin producer in Lake Taihu, China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2019,76(2):359-367.
- [8] 钟晴.微囊藻毒素-RR 对小鼠水代谢和神经行为的影响及机制研究[D].武汉:华中科技大学,2017.
- [9] 国晓春,卢少勇,谢平,等.微囊藻毒素的环境暴露、毒性和毒性作用机制研究进展[J].生态毒理学报,2016,11(3):61-71.
- [10] 李秀娟.水产品中微囊藻毒素 ELISA 和 LC/MS/MS 检测[J].福建分析测试,2020,29(1):40-45.
- [11] SPOOF L, NEFFLING M R, MERILUOTO J. Fast separation of microcystins and nodularins on narrow-bore reversed-phase columns coupled to a conventional HPLC system[J]. Toxicon, 2010,55(5):954-964.
- [12] XIE L Q, PARK H D. Determination of microcystins in fish tissues using HPLC with a rapid and efficient solid phase extraction[J]. Aquaculture,2007,271(1/4):530-536.
- [13] 陈丽惠,贾玉珠,张斌,等.分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定淡水鱼中柱孢藻毒素、节球藻毒素和微囊藻毒素[J].色谱,2019,37(7):723-728.
- [14] MANUBOLU M, LEE J Y, RIEDL K M, et al. Optimization of

- extraction methods for quantification of microcystin-LR and microcystin-RR in fish, vegetable, and soil matrices using UPLC-MS/MS[J]. *Harmful Algae*, 2018, 76(4): 47-57.
- [15] 中华人民共和国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 水产品中微囊藻毒素的测定:GB 5009.273—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [16] GREER B, MCNAMEE S E, BOOTS B, et al. A validated UPLC-MS/MS method for the surveillance of ten aquatic biotoxins in European brackish and freshwater systems [J]. *Harmful Algae*, 2016, 55(1): 31-40.
- [17] 刘腾飞,杨代凤,毛健,等.碳纳米管材料在食品安全分析中的应用[J].*化工进展*,2018,37(10):3699-3725.
- [18] 赵伟高.磁性多壁碳纳米管的制备及其吸附性能研究[D].天津:天津大学,2016.
- [19] 殷敏.磁性多壁碳纳米管的功能化修饰及在磁共振成像中的应用[D].上海:上海师范大学,2010.
- [20] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会.生活饮用水标准检验方法 有机物指标:GB/T 5750.8—2006[S].北京:中国标准出版社,2006.
- [21] 陈冰,肖维毅,尧珍玉,等.磁性多壁碳纳米管固相萃取-气相色谱质谱联用快速测定食用油中的苯并[a]芘[J].*中国测试*,2015,41(11):44-49.
- [22] 付善良,丁利,朱绍华,等.磁性多壁碳纳米管固相萃取-气相色谱-质谱法检测水样中的 13 种邻苯二甲酸酯类化合物[J].*色谱*,2011,29(8):737-742.
- [23] 胡争艳,王天娇,王立媛,等.磁性多壁碳纳米管分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法同时检测婴幼儿配方奶粉中 14 种性激素残留[J].*中国卫生检验杂志*,2018,28(6):641-649.

实验技术与方法

快速霉菌酵母测试片法与 GB 4789.15—2016 在 3 种类型食品中霉菌计数比较

赵红阳¹,王鸣雨¹,宋娇娇¹,高思琪²,杨含草²,关远航²,孟云³,卢行安¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100176; 2. 大连医科大学,辽宁大连 116044; 3. 3M 中国有限公司,北京 100176)

摘要:目的 比较快速霉菌酵母测试片(RYM)法和 GB 4789.15—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数》方法(以下简称国标法)测定 3 种类型食品样品中霉菌计数的一致性。方法 选取 90 份糕点、面包、饼干样品,30 份含乳饮料、植物蛋白饮料、固体饮料样品,30 份保健食品样品并对 3 种类型食品样品进行人工污染得到的人工污染样品,利用 RYM 法和国标法进行霉菌计数的测定,检测结果通过配对资料 *t* 检验以及对数值差值绝对值(|dlog|)汇总分析进行统计。结果 两种方法对 3 种类型食品样品以及人工污染样品检测结果在统计学意义上无显著性差异($P>0.05$);|dlog|≤0.50 占比均为 100.0%,表明两种方法的检测结果一致性较好。结论 RYM 法和国标法对 3 种类型的食品样品及其人工污染样品中霉菌计数的检测结果一致性较好。

关键词:快速霉菌酵母测试片;GB 4789.15—2016;霉菌计数;一致性

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2020)04-0397-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.04.009

Comparison of the rapid yeast and mold count plate method with GB 4789.15-2016 method for enumeration of molds in three types of food

ZHAO Hongyang¹, WANG Mingyu¹, SONG Jiaojiao¹, GAO Siqi²,
YANG Hanco², GUAN Yuanhang², MENG Yun³, LU Xing'an¹

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 3. 3M China Limited, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective The rapid yeast and mold count plate (RYM) method and the national standard (GB 4789.15-

收稿日期:2020-03-17

基金项目:科技部“食品安全关键技术研发”重点专项(2017YFC1601400)

作者简介:赵红阳 女 中级工程师 研究方向为微生物检测及溯源方法 E-mail: zhy8707@163.com

通信作者:卢行安 男 研究员 研究方向为微生物检测质量控制和溯源方法 E-mail: luxa@sina.com