

超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法优化

李文廷¹, 赵丽¹, 师真¹, 张瑞雨¹, 范忠吉³, 栾杰^{2*}

(1. 昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228; 2. 云南省疾病预防控制中心, 昆明 650022;
3. 大理大学公共卫生学院, 大理 671000)

摘要: **目的** 优化超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的分析方法。**方法** 样品经粉碎匀质后, 采用 70%乙腈-甲酸水溶液涡旋浸泡提取, 普瑞邦亲和柱净化, 以乙腈-0.05%氨水作为流动相, Waters BEH C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)进行色谱分离, 超高效液相色谱-串联质谱的多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式进行测定, 内标法定量。**结果** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇在 5.0~150.0 μg/L 范围内具有良好的线性关系($r^2=0.9995$), 添加回收率为 93.4%~101.6%, 相对标准偏差为 1.41%~3.54%, 质控样检测值在参考值允许范围内(569±60) μg/kg, 具有较好的重现性和准确度。**结论** 本研究提升了脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测能力, 该方法准确、可靠、便捷, 可满足实验要求。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 质控样; 超高效液相色谱-串联质谱法

Optimization of determination of deoxynivalenol in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Wen-Ting¹, ZHAO Li¹, SHI Zhen¹, ZHANG Rui-Yu¹, FAN Zhong-Ji³, LUAN Jie^{2*}

(1. Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China;
2. Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650022, China;
3. School of Public Health, Dali University, Dali 671000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize the method for determination of deoxynivalenol in foods by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** After crushing and homogenizing, the sample was extracted with 70% acetonitrile formic acid aqueous solution by vortex immersion and purified by PriboLab affinity column. The mobile phase was acetonitrile-0.05% ammonia. Waters BEH C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) was used for chromatography separation. Then it was determined by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with multiple reaction monitoring mode and quantitative analyzed by internal standard method. **Results** Deoxynivalenol had a good linear relationship ($r^2=0.9995$) in the concentration range of 5.0~150.0 μg/L. Addition recovery rate was 93.4%~101.6%, and relative standard deviation was 1.41%~3.54%. The control sample detection value has a good reproducibility and accuracy within the allowable range

基金项目: 昆明市卫生科技人才培养项目暨“十百千”工程培养计划(2018-sw(后备)-20)、昆明市卫生计生科研项目(2017-12-06-003)

Fund: Supported by the Kunming Health Science and Technology Talents Training Project (2018-sw(reserve)-20), and the Kunming Health, Family Planning Research Project (2017-12-06-003)

***通讯作者:** 栾杰, 技师, 主要研究方向为食品理化检验。E-mail: 250453179@qq.com

***Corresponding author:** LUAN Jie, Technician, Yunnan Center for Disease Control and Prevention, Shulin Street, Kunming 650022, China. E-mail: 250453179@qq.com

of reference values (569 ± 60) $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** This study can improve the detection ability of deoxynivalenol. This method is accurate, reliable and convenient, and can meet the requirements of experiment.

KEY WORDS: deoxynivalenol; quality control sample; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)又称呕吐毒素,主要由禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)和黄色镰刀菌(*F. culmorum*)等产生^[1,2],污染范围包含小麦、大麦、燕麦、玉米等谷物^[3]。DON是最常见的一类污染性真菌毒素,会引起食欲下降、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳和反应迟钝等急性中毒症状^[4],严重时损害造血系统造成死亡^[5],可促进免疫细胞凋亡并抑制免疫细胞增长^[6],还可导致食管癌、贫血、克山病等疾病,另外DON对免疫系统有影响,有明显胚胎毒性和一定致畸作用^[7]。DON严重威胁到了人类健康,世界各国对DON的污染制定了相应的标准限量,我国GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》^[8]规定了谷物及其制品的DON限量标准为 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

目前,DON的检测方法主要有薄层色谱测定法(thin layer chromatography, TLC)^[9]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[10]、气相色谱法(gas chromatography, GC)^[11]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[12,13]、高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)^[14,15]。食品中DON的标准检测方法为国家标准GB 5009.111-2016《食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》^[16],第1法为同位素稀释液相色谱串联质谱法,但该方法样品前处理较为复杂、灵敏度较低、方法准确性不高,因此本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法对2018~2019年国家食品安全风险监测的样品进行多毒素的检测以及实验间DON质控样的比对分析,并对DON检测中的操作事项进行总结探讨,改善DON的检测方法,优化实验条件参数,减少DON的检测误差,以期有效检测食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器

TSQ Quantum Access Max 超高效液相色谱-串联质谱(美国 Thermo Scientific 公司);XS205DU 分析天平($0.1 \text{ mg} \sim 220 \text{ g}$, 瑞士 Mettler Toledo 公司);KQ-500DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);Reax top 涡旋混匀仪(德国 HEIDOLPH 公司);PriboFast Multi-Toxin IAC 免疫亲和净化柱、PriboFast MFC226 多功能净化柱(Pribolab

中国公司);3H16RI 智能台式高速冷冻离心机(湖南赫仪器装备有限公司)。

2.2 试剂与材料

STD#3102DON 标准物质($100 \mu\text{g}/\text{mL}$)、STD#3101U¹³C₁₅-DON 同位素内标($25 \mu\text{g}/\text{mL}$, Pribolab 中国公司);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司);甲酸(分析纯,广州化学试剂厂);实验中所用水为 Arium pro D1 纯水处理终端机产生的去离子水。

国家食品安全风险监测样品:由云南省 16 州市疾病预防控制中心采样送检,包含大米、茶叶、面食制品;DON 比对质控样(A201903, B201903)(浙江省疾病预防控制中心);已知质控样(M15361D)(美国 Romer Labs 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

精确称量 1~5 g 经粉碎匀质的监测样品(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-水-甲酸($70:29:1, V:V:V$),加入 $20 \mu\text{L}$ DON 同位素内标工作液,涡旋 5 min ,超声提取 20 min ,涡旋振荡提取 30 min ,转移至高速冷冻离心机以 $10000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 15 min ,移取上清液进行以下一种操作。

(1) 普通样品:量取定量溶液,稀释样品溶液中乙腈含量为 20% , $0.22 \mu\text{m}$ 过滤备测。

(2) 基质复杂样品如玉米、小麦、婴幼儿辅食等:量取定量溶液过多功能净化柱,氮气吹干后用 20% 乙腈水溶解, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤,涡旋溶解备测;

(3) 基质复杂含有色素样品如茶叶等:量取定量溶液先氮气吹干,用水溶解后过免疫亲和净化柱,依次用 PBS 缓冲液及纯水清洗,用甲醇洗脱并收集洗脱液,再次氮气吹干,加 20% 乙腈水溶解, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤,涡旋溶解备测。

2.3.2 标准溶液的配制

将 DON 标准母液用乙腈稀释为 $2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的中间液,进一步用 20% 乙腈水稀释至 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ 标准使用液,精确量取一定体积标准使用液于 10 mL 容量瓶中,配制浓度范围 $5.0 \sim 200.0 \text{ ng}/\text{mL}$ 标准系列,用 20% 乙腈定容。将 DON 同位素内标用乙腈稀释为 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 工作液,分别避光贮存于 -20°C 条件下。

2.3.3 色谱条件

Waters BEH C₁₈ 柱($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $1.7 \mu\text{m}$),柱温 40°C ,流动相为梯度洗脱:A 相为乙腈,B 相为 0.05% 氨水溶液,流速为 $0.3 \text{ mL}/\text{min}$,样品进样体积 $15 \mu\text{L}$,检测运行时

间 12.0 min。洗脱程序为: 0~1.0 min, 98%~98%B; 1.0~1.5 min, 95%~80%B; 1.5~5.0 min, 80%~75%B; 5.0~5.5 min, 75%~0%B; 5.5~8.2 min, 0%B; 8.2~8.5 min, 0%~95%B; 8.5~12.0 min, 95%~80%B。

2.3.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 电离方式: 负离子模式; 多离子反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM), 离子源温度 500 °C, 离子喷雾电压为-2500.0 V, 屏蔽气为 40 psi。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的优化

将 DON 及同位素内标分别用乙腈稀释至质量浓度 500 µg/L, 以 10 µL/min 的流速在负离子模式进行一级质谱寻找目标化合物的母离子, 二级质谱选取强度最高的碎片离子作为定量离子, 强度次高的离子作为定性离子, 寻找过程中仪器自动优化质谱参数, 数据如表 1 所示。

表 1 DON 及同位素内标在 MRM 模式下检测的质谱参数
Table 1 DON and isotope internal standards detected in MRM mode

真菌毒素	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	保留时间 /min	锥孔电压 /V	碰撞能 /V
¹³ C-DON	310.0	279.0	3.37	17	17
		265.0*		15	15
DON	294.7	138.0	3.40	35	35

注: *为定量离子。

3.2 样品提取溶剂的选择

分别考察了有机溶剂与水不同体积混合作为提取溶剂的提取实验, 提取溶剂中都含有体积比为 1%的甲酸, 利用已知质控样进行实验分析, 实验结果如图 1 所示, 70%乙腈水的提取效率为最高达到 98%, 而纯水最低为 25%, 因此实验处理选择了 70%乙腈水作为样品的提取溶剂。

3.3 样品净化柱的选择

不同基质样品需选择不同净化柱净化, 分别考察了华安麦科、普瑞邦、Romer 亲和柱对 DON 标准物质的柱

效、不同样品加标回收及质控样的检测分析, 实验结果如表 2 所示, 样品的基质对净化柱的选择起关键作用, 3 种亲和柱并无较大差异, 普瑞邦的净化效果相对较好, 选择使用范围较广, 茶叶基质只能选择亲和柱, 因此实验中选择了普瑞邦的亲和柱及净化柱。

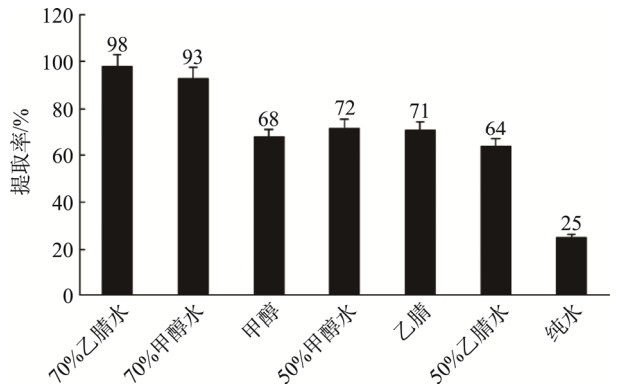


图 1 样品的提取率(*n*=4)
Fig.1 Efficiency of sample extraction (*n*=4)

3.4 备测样品乙腈含量的确定

样品经提取净化后, 备测样品溶液中乙腈含量较高导致 DON 色谱峰出现溶剂效应, 与乙腈含量成正比关系, DON 标准物质色谱峰如图 2~5 所示, 12.5%时的峰型及响应较好, 25%时色谱峰已出现前移趋势, 50%已经出现严重分裂情况, 100%时原时间位置峰已基本完全前移, 说明样品中含有较高浓度的乙腈对 DON 检测项目具有较严重的溶剂效应。

3.5 线性关系、回收率、精密度及质量控制

标准系列溶液由低到高浓度依次进样检测, 以 DON 色谱峰与对应内标色谱峰的峰面积比值为纵坐标, 质量浓度为横坐标绘制标准曲线图, 在 5.0~150.0 µg/L 范围内有较好的线性关系, 线性方程为 $Y=0.072X+0.078$, 相关系数 r^2 为 0.9995, 检出限为 5.0 µg/kg, 定量限为 15 µg/kg, 灵敏度较高。

对面条样品添加 3 种浓度水平进行加标回收实验, 每种进行 6 个水平测定, 如表 3 所示, 回收率为 93.4%~101.6%, 相对标准偏差为 1.41%~3.54%, 说明该方法具有较好回收率, 样品精密度较高, 重现性较好。

表 2 净化效果/% (*n*=3)
Table 2 Effect of purification/% (*n*=3)

样品名称	华安麦科亲和柱			普瑞邦亲和柱			普瑞邦净化柱			Romer 亲和柱		
	柱效	回收率 /RSD	质控准确率	柱效	回收率 /RSD	质控准确率	柱效	回收率 /RSD	质控准确率	柱效	回收率 /RSD	质控准确率
大米		91/1.24			94/0.98			95/1.06			93/1.15	
面条	95/0.57	92/1.15	92/1.38	97/0.34	94/1.04	94/0.96	96/0.46	95/1.12	95/1.14	95/0.48	93/1.12	93/1.47
茶叶		90/2.34			93/1.89			0/0			91/1.89	

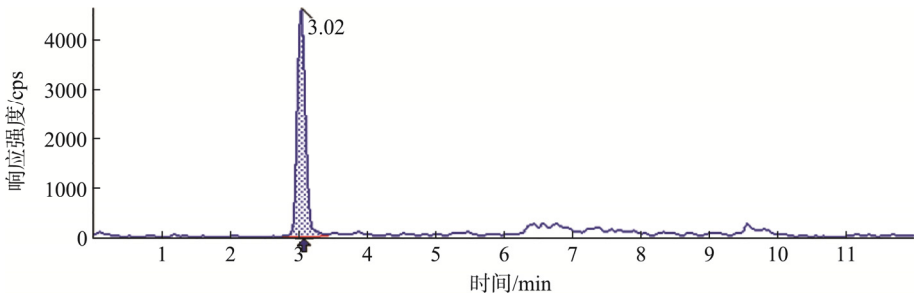


图 2 50 µg/L DON 标准含 12.5%乙腈的色谱图
Fig.2 Chromatogram of 50 µg/L DON standard containing 12.5% acetonitrile

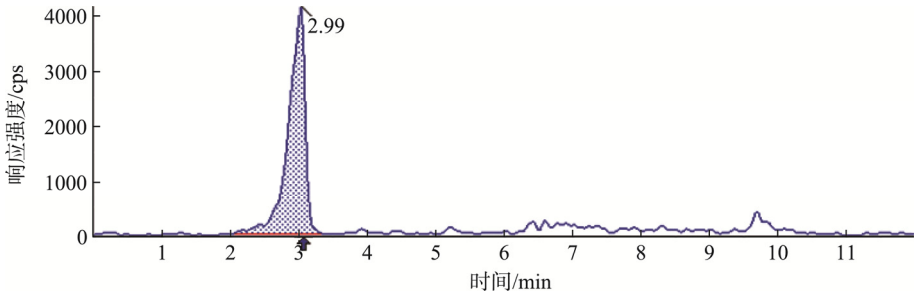


图 3 100 µg/L DON 标准含 25%乙腈的色谱图
Fig.3 Chromatogram of 100 µg/L DON standard containing 25% acetonitrile

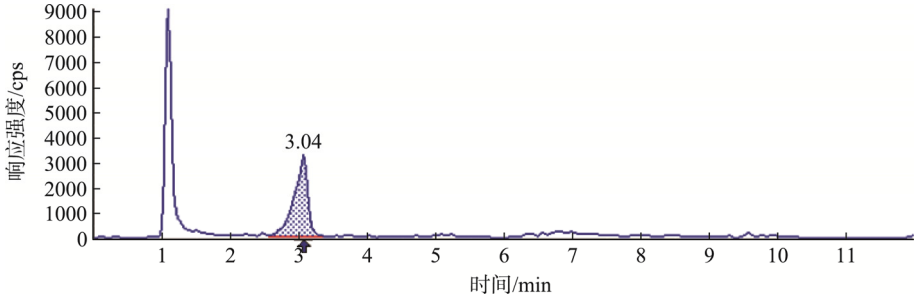


图 4 200 µg/L DON 标准含 50%乙腈的色谱图
Fig.4 Chromatogram of 200 µg/L DON standard containing 50% acetonitrile

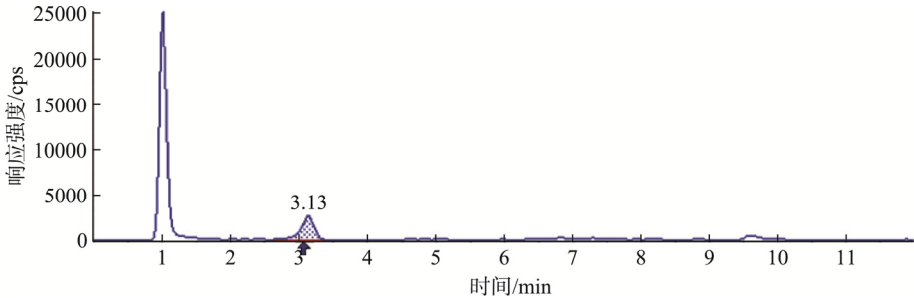


图 5 400 µg/L DON 标准含 100%乙腈的色谱图
Fig.5 Chromatogram of 400 µg/L DON standard containing 100% acetonitrile

准确称取 M15361D 质控样, 分别依据 3 种样品前处理方法处理, 如表 4 可以看出, 质控样检测值(543~586 µg/kg)均在标准证书参考值允许范围内(569±60) µg/kg, 样品处理的准确度较高。

3.6 实际样品的测定

根据上述方法对所送检的样品进行 DON 检测, 实验室间的 DON 比对检测值分别为 208 µg/kg 和 954 µg/kg。

81 件面条及面条制品有 98.8%的检出率, 含量范围为 15.2~664 $\mu\text{g/kg}$, 均未超过标准限值。36 件谷物中有 27.8%的 DON 检出率, 含量范围为 15.2~664 $\mu\text{g/kg}$, 均未超过标准限值。

表 3 DON 的加标回收率($n=6$)
Table 3 Recoveries of DON ($n=6$)

名称	添加量 /($\mu\text{g/kg}$)	实测值 /($\mu\text{g/kg}$)	回收率 /%	相对标准偏差 /%
DON	10	9.34	93.4	3.54
	20	20.32	101.6	2.39
	40	38.72	96.8	1.41

表 4 准确度数据/($\mu\text{g/kg}$) ($n=6$)
Table 4 Accuracy data/($\mu\text{g/kg}$) ($n=6$)

名称 净化方法	滤头	多功能净化柱	免疫亲和净化柱
质控样 DON 测定值	586	554	543
参考值范围	509~629		

4 结论与讨论

通过提取溶液体系及净化体系的优化, 建立了回收率好、准确度高的食品中 DON 的检测方法, 经过已知质控样、实验室间质控样比对、监控样品及样品加标回收率的测定, 样品的检测未出现偏离误差, 与国家标准方法具有一致的检测结果。此方法对于痕量及不确定度较高的样品分析具有较高的准确度, 方法便捷, 可靠, 在实际检测工作中具有指导意义, 有效提高样品的检测效率。

参考文献

[1] 张剑峰, 孙艳芳, 赵岚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法正、负离子模式测定脱氧雪腐镰刀菌烯醇的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(10): 3969–3973.
Zhang JF, Sun YF, Zhao L, *et al.* Comparative study of cation and anion ionization modes for detection of deoxynivalenol by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(10): 3969–3973.

[2] 谢瑜杰, 陈辉, 彭涛, 等. 食品与饲料基质中真菌毒素检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(6): 1234–1246.
Xie YJ, Chen H, Peng T, *et al.* Research progress on the detection techniques of mycotoxins in food and forage [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(6): 1234–1246.

[3] 高同春, 王梅, 段劲生, 等. 食品中真菌毒素的研究进展[C]. 食品安全的理论与实践-安徽食品安全博士科技论坛论文集, 2008: 735–745.
Gao TC, Wang M, Duan JS, *et al.* Research progress of mycotoxins in food [C]. Theory and practice of food safety—a collection of doctoral forum on food safety in Anhui, 2008: 735–745.

[4] 刘峰良, 赵志辉, 谢晶. 谷物中真菌毒素的研究进展[J]. 广东农业科学, 2012, (19): 115–119.
Liu FL, Zhao ZH, Xie J. Research progress of mycotoxins in cereals [J]. Guangdong Agric Sci, 2012, (19): 115–119.

[5] 何健, 冯民, 朱臻怡, 等. 国外对真菌毒素的研究进展[J]. 农产品质量与安全, 2013, 1: 72–74.
He J, Feng M, Zhu ZY, *et al.* Advances in research on mycotoxins abroad [J]. Qual Saf Agro-Prod, 2013, (1): 72–74.

[6] 税丕容. 食品中真菌毒素的污染与检测研究进展[J]. 现代食品, 2018, (13): 131–136.
Shui PR. Research progress on contamination and detection of mycotoxins in foods [J]. Mod Food, 2018, (13): 131–136.

[7] 杨世亚, 邱景富. 食品中真菌毒素的污染状况与检测方法研究进展[J]. 现代预防医学, 2012, (22): 5897–5900.
Yang SY, Qiu JF. Research progress of pollution condition and detecting methods in mycotoxins in the food [J]. Mod Prev Med, 2012, (22): 5897–5900.

[8] GB/T 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
GB/T 2761-2017 National food safety standards-Limits of mycotoxins in food [S].

[9] 谈军, 马玉侠. 检测小麦脱氧雪腐镰刀菌烯醇的注意事项[J]. 现代面粉工业, 2019, (1): 23–24.
Tan J, Ma YX. Notes on the detection of deoxynivalenol in wheat [J]. Mod Flour Milling Ind, 2019, (1): 23–24.

[10] 祭芳, 张新明, 徐学万, 等. 镰刀菌毒素限量及检测方法标准现状研究[J]. 农产品质量与安全, 2018, (4): 59–65.
Ji F, Zhang XM, Xu XW, *et al.* Status quo of *Fusarium* toxin limits and testing methods: a review [J]. Qual Saf Agro-Prod, 2018, (4): 59–65.

[11] 姜云晶, 许伟, 陈晓芳, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇提取、纯化及含量检测[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(9): 1771–1777.
Jiang YJ, Xu W, Chen XF, *et al.* Extraction, purification and concentration determination of deoxynivalenol [J]. Chin J Veter Sci, 2017, 37(9): 1771–1777.

[12] 张小永, 李永霞. 超高效液相色谱法测定小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的研究[J]. 粮食与食品工业, 2018, 25(1): 73–75.
Zhang X, Li YX. The study of deoxynivalenol determining in wheat by UPLC [J]. Cere Food Ind, 2018, 25(1): 73–75.

[13] 姚霞, 聂立, 兰瑞容, 等. 液相色谱法和液质联用法检测玉米中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇的比较[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 164–169.
Yao X, Nie L, Lan RR, *et al.* Comparison of two detection methods of HPLC and LC-MS for the deoxynivalenol in corn [J]. China Brew, 2019, 38(1): 164–169.

[14] 李文廷, 梁志坚, 张瑞雨, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定谷物及其制品中 11 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(10): 3747–3755.
Li WT, Liang ZJ, Zhang RY, *et al.* Determination of 11 kinds of mycotoxins in grains and its products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(10): 3747–3755.

- [15] 孙娟, 李为喜, 张妍, 等. 用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物中 12 种真菌毒素[J]. 作物学报, 2014, 4(4): 691-701.

Sun J, Li WX, Zhang Y, *et al.* Simultaneous determination of twelve mycotoxins in cereals by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Acta Agron Sinica, 2014, 4(4): 691-701.

- [16] GB 5009.111-2016 食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定[S].

GB 5009.111-2016 National food safety standard-Determination of Deoxynivalenol and its acetylated derivatives in foods [S].

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



李文廷, 硕士, 主管技师, 主要研究方向为食品和水质的质量与安全。

E-mail: lwt0883@qq.com



栾 杰, 硕士, 检验技师, 主要研究方向为食品理化检验

E-mail: 250453179@qq.com

“动物性食品质量与安全”专题征稿函

动物性食品是人们食品的重要组成部分, 这类食品含有丰富蛋白质、脂肪、碳水化合物、矿物质等。然而这类食品容易腐败变质, 且养殖环境的污染、饲料的污染也会对动物源食品安全造成危害, 从而影响消费者健康。

鉴于此, 本刊特别策划了“动物性食品质量与安全”专题, 由中国农业科学院饲料研究所李俊研究员担任专题主编, 主要围绕动物性食品及饲料中农兽药残留、违禁添加物、霉菌毒素、环境污染物的检测、加工贮藏与品质控制、营养成分分析等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。

鉴于您在该领域丰富的研究经历和突出的学术造诣, 学报主编吴永宁研究员和专题主编李俊研究员特邀请您为本专题撰写稿件, 综述、研究论文、研究简报均可, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。本专题计划在 **2020 年 5 月**出版, 请在 **2020 年 3 月 15 日**前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 再次感谢您的关怀与支持!

谢谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“**专题: 动物性食品质量与安全**”)

E-mail: jfoodsq@126.com

《食品安全质量检测学报》编辑部