

食品安全

真菌毒素—食品安全应用文集



目录

QuEChERS 样品前处理结合 LC-MS/MS 测定粮谷中的 12 种真菌毒素	03
利用高分辨质谱 Q Exactive Focus 定量分析小麦和饲料中的真菌毒素.....	07
QuEChERS 样品前处理结合 LC-MS/MS 测定粮谷中的 16 种真菌毒素	09
奶粉中黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2, M1 的分析	11
花生酱中黄曲霉毒素 B1,G1,B2,G2 的测定	12
食品中赭曲霉毒素 A 的测定.....	13
榨果汁中展青霉素的检测.....	15
饲料中黄曲霉毒素的测定	16
饲料中赭曲霉毒素 A 的测定.....	19
饲料中玉米赤霉烯酮的测定	22
饲料中的伏马毒素 B1 和 B2 的测定.....	25
饲料中呕吐毒素 (DON), 3-DON, 15-DON 的测定.....	28

QuEChERS 样品前处理结合 LC-MS/MS 测定粮谷中的 12 种真菌毒素

关键词

真菌毒素, 食品, HyperSep, QuEChERS, Accucore aQ

摘要

本文采用QuEChERS样品前处理, 结合液相色谱串联三重四极杆质谱平台建立了粮谷中12种真菌毒素的快速检测方法。前处理净化方法, 操作简单, 重复性好, 回收率高。使用Accucore aQ表面多孔增强核色谱柱, 增强了对极性化合物的保留及选择性, 峰形良好。采用LC-MS/MS方法, 15min内快速完成低浓度真菌毒素的分析, 并获得较好的回收率, 回收率范围60-110%, LOD为 0.1-2 ug/kg, 该方法完美适合于粮谷中多种真菌毒素的分析。

1. 引言

真菌毒素是真菌在适宜条件下产生的有毒次级代谢产物, 能够引发人类、动物各种急、慢性疾病。我国高度重视真菌毒素污染问题, GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量 规定了食品中黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、展青霉素、赭曲霉毒素A及玉米赤霉烯酮的限量指标。据报道我国每年有3100万吨粮食在生产、储存、运输过程中被真菌污染, 约占粮食年总产量的6.2%。为了保证我国粮食质量安全, 避免不必要的经济损失, 及时快速监测调查真菌毒素污染种类、水平及其风险尤为重要。

由于真菌毒素种类多样, 且存在协同污染, 为确保全面、快速的了解粮食中真菌毒素的污染情况, 迫切需要一种简单、快速、灵敏、同时准确测定粮食中多种真菌毒素的方法。目前真菌毒素的前处理检测方法主要有酶联免疫吸附法、免疫亲和柱

方法等。基于抗原抗体相互作用的酶联免疫吸附法虽有较高的选择性, 但无法准确定量, 同时由于前处理简单, 没有有效的净化, 易受基质干扰, 产生假阳性。免疫亲和柱前处理净化方法由于其特异性吸附, 净化效果好, 但是一方面操作复杂, 另外一方面成本较高, 不适合大规模检测。

本文使用QuEChERS作为前处理净化方法, 操作简单, 重复性好, 回收率高。采用Accucore AQ HPLC 色谱柱分离, 表面多孔增强核技术的运用, 兼容100%水相, 同时增强了对极性化合物的保留及选择性。采用LC-MS/MS方法, 15min内快速完成低浓度真菌毒素的分析, 该方法完美适合于粮谷中多种真菌毒素的分析检测。

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 Thermo Scientific™ Dionex™ UltiMate™ 3000

2.1.2 三重四极杆质谱仪

2.1.3 乙腈 (色谱纯, 美国Thermo Fisher公司); 实验用水为超纯水 (18.2 mΩ); 甲酸 (LCMS纯, 美国Thermo Fisher公司)

2.1.4 12种真菌毒素标准品均购自有信誉的标准品公司

2.2 化合物信息及溶液配制

2.2.1 储备液: 分别精确所有标准品适量, 甲醇溶解, 配制储备液 100 µg/mL。

2.2.2 工作液: 以2% 甲酸乙腈为溶剂, 配制成一定浓度标准溶

液 (0.25 ng/mL – 100 ng/mL)

2.3 色谱条件

色谱柱: Accucore aQ, 100 × 2.1 mm, 2.6 μm

(P/N 17326-102130)

柱温: 35 °C;

进样量: 10 μL;

流动相: A:0.1% 甲酸水 B:0.1% 甲酸乙腈

梯度洗脱程序 (表1)

表1. 梯度洗脱程序

时间min	A %	B %	流速 mL/min
Initial	95	5	0.3
0.8	95	5	0.3
10	50	50	0.3
10.2	5	95	0.3
12.2	5	95	0.3
12.5	95	5	0.3
15	95	5	0.3

2.4 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源。

质谱扫描方式: 多重反应监测模式 (MRM)。

锥孔电压: 3.0 kV。

加热气温度: 500°C。

离子源温度: 150°C。

脱溶剂气: 800 L/H

选择反应监测离子对信息见表2。

表2. 化合物及质谱采集参数

化合物名称	英文名称	缩写	母离子	锥孔电压	子离子	碰撞能量	离子化模式
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	DON	297.15*	20	297.15	16	ESI+
			297.15	20	203.15	10	
15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxynivalenol-D3	15-AcDON	339.19*	18	137.07	9	ESI+
			339.19	18	321.14	7	
3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyldeoxynivalenol	3-AcDON	339.12*	17	203.1	13	ESI+
			339.12	17	231.1	13	
黄曲霉毒素G2	Aflatoxin G2	AFG2	330.93*	36	244.9	25	ESI+
			330.93	36	313	25	
HT-2毒素	HT-2	HT-2	425.2*	45	245.1	12	ESI+
			425.2	45	263.1	12	
黄曲霉毒素B2	Aflatoxin B2	AFB2	315.09*	42	259.06	30	ESI+
			315.09	42	287.09	24	
黄曲霉毒素G1	Aflatoxin G1	AFG1	329.06*	36	243.1	28	ESI+
			329.06	36	311.1	20	
黄曲霉毒素B1	Aflatoxin B1	AFB1	313.07*	37	241.1	35	ESI+
			313.07	37	285	20	
T2-毒素	T2	T2	484.26*	15	185.12	17	ESI+
			484.26	15	305.17	15	
玉米赤霉烯酮	Zearalenone	ZEN	319.15*	17	187.06	19	ESI+
			319.15	17	283.13	11	
杂色曲霉毒素	sterigmatocystin	ST	325.09*	33	281.08	31	ESI+
			325.09	33	310.06	25	
赭曲霉毒素A	Ochratoxin A	OTA	404.12*	21	239.04	27	ESI+
			404.12	21	358.12	13	

注: *表示定量离子

2.5 样品前处理

2.5.1 样品提取:

- 1) . 称取5g均质后的样品放入50mL离心管中, 加入10 mL 水, 震荡15 min
- 2) . 再加入 10 mL 2%甲酸乙腈, 旋涡混合1min
- 3) . 加入 HyperSep 萃取盐包 (P/N 60105-332-B: 4g MgSO₄, 1g NaCl), 快速震荡1 min.
- 4) . ≥ 3000 g 离心5 min

2.5.2 样品净化:

- 1) . 移取 1 mL 上清液到HyperSep 净化管中 (P/N: 60105-204-B: QUECHERS 2mL 离心管 带150mg MgSO₄, 50mg PSA 50mg C18), 震荡30 s, ≥ 3000 g 离心5 min
- 2) . 移取 500 μL 净化液, 使用纯水稀释4倍, 过0.2 μm 滤膜后上机检测。



3. 实验结果与讨论

3.1. 样品谱图

3.1.1 纯标准品色谱图 (见图1) :

3.1.2 玉米加标色谱图 (见图2) :

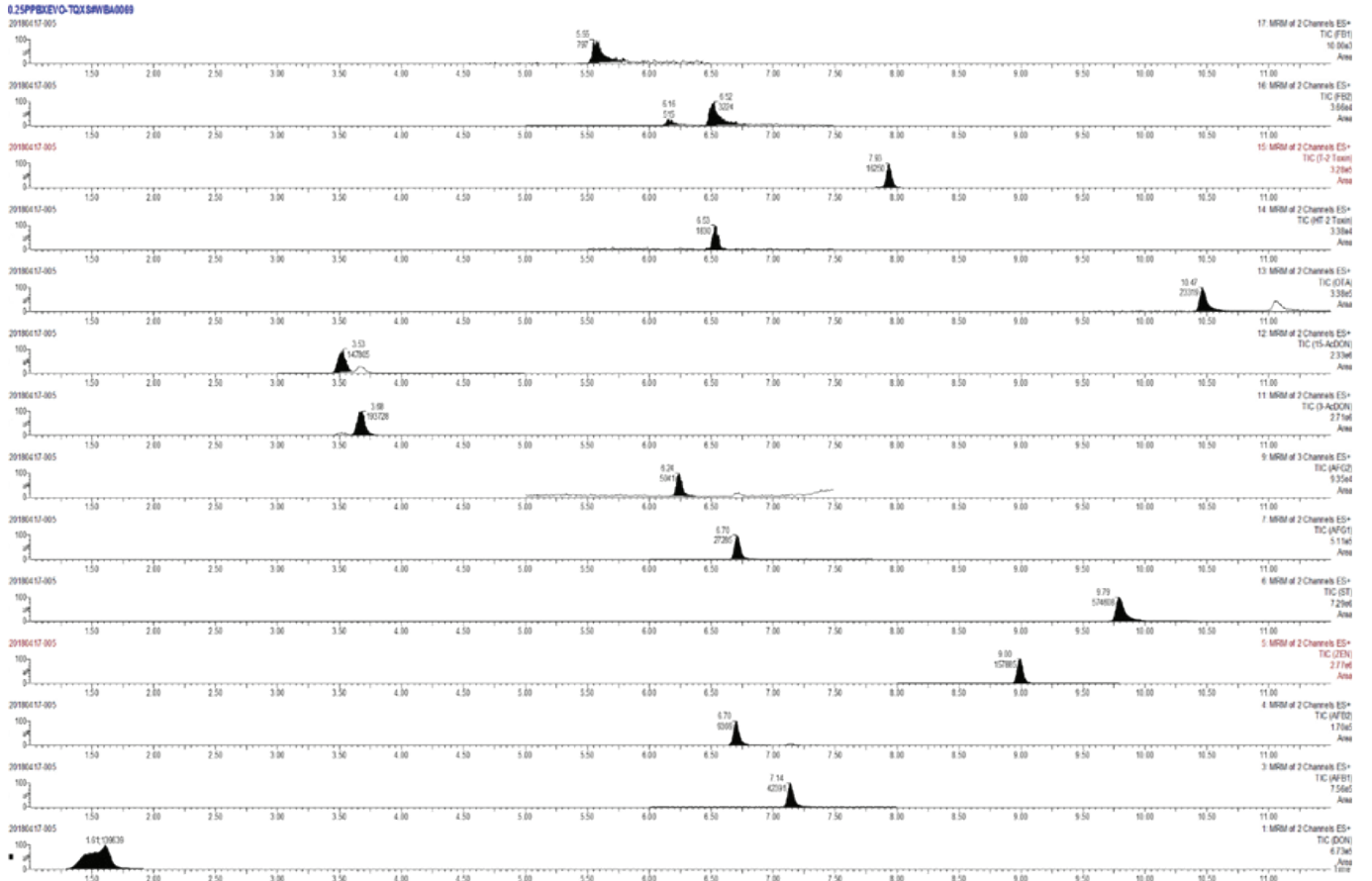


图1. 12种真菌毒素标准溶液图谱 (浓度见表3)

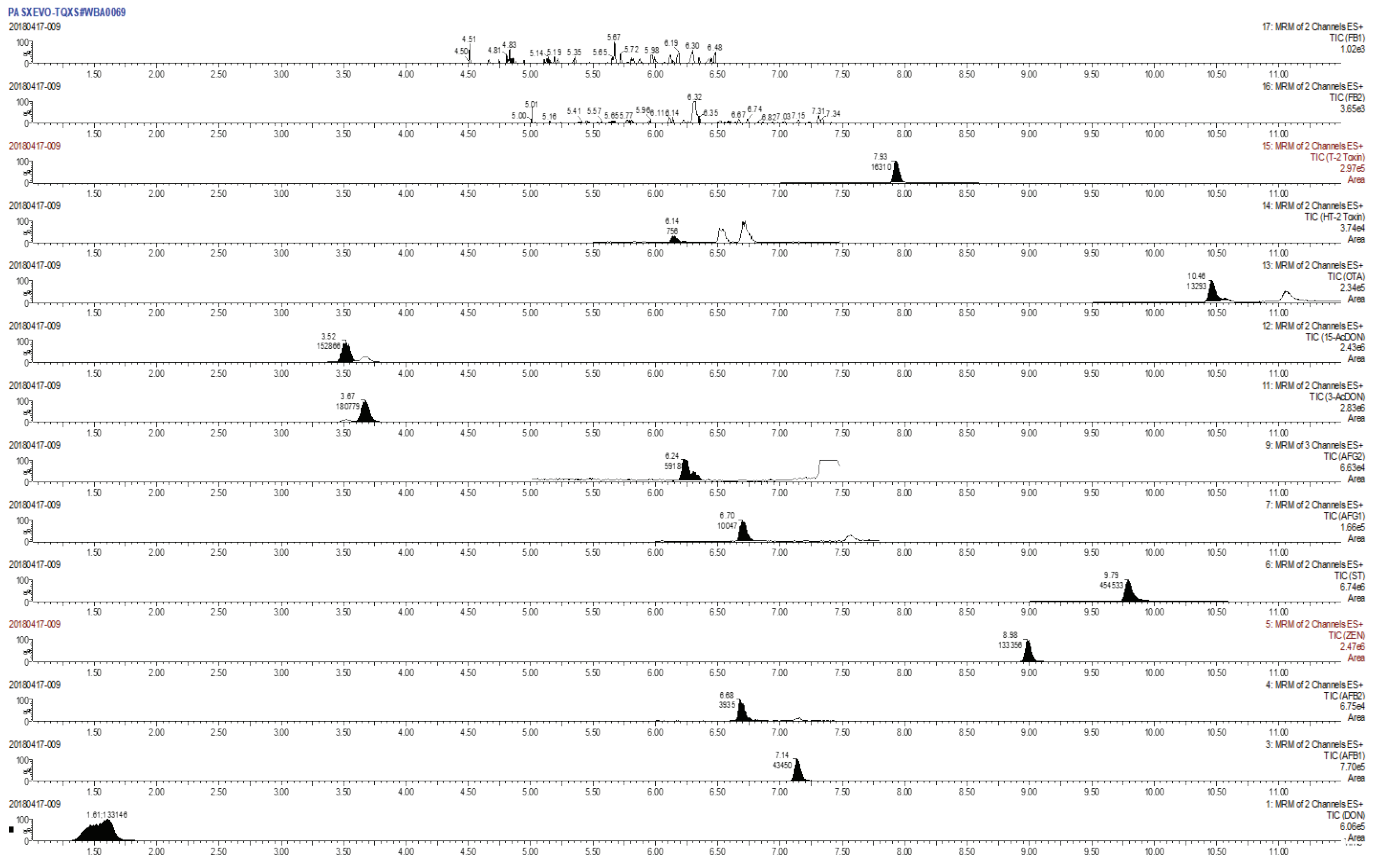


图2. 玉米中12种真菌毒素加标图谱 (加标浓度见表3)

3.2. 结果与讨论

3.2.1 玉米中12种真菌毒素回收率数据及LOD详见表3

表3. 12种真菌毒素回收率数据及LOD

序号	化合物名称	英文名称	缩写	浓度 (ng/ml)	回收率 %	RSD (n=6)	LOD (ug/kg)
1	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	DON	100	94	10	1
2	15-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxynivalenol	15-AcDON	100	102	8	2
3	3-乙酰化脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyldeoxynivalenol	3-AcDON	100	100	9	2
4	黄曲霉毒素G2	Aflatoxin G2	AFG2	0.25	88	11	0.1
5	HT-2毒素	HT-2	HT-2	100	91	10	2
6	黄曲霉毒素B2	Aflatoxin B2	AFB2	0.25	64	15	0.1
7	黄曲霉毒素G1	Aflatoxin G1	AFG1	1	61	14	0.1
8	黄曲霉毒素B1	Aflatoxin B1	AFB1	1	97	7	0.1
9	T2-毒素	T2	T2	25	102	10	1
10	玉米赤霉烯酮	Zearalenone	ZEN	25	87	12	2
11	杂色曲霉毒素	sterigmatocystin	ST	10	84	13	2
12	赭曲霉毒素A	Ochratoxin A	OTA	1	68	15	0.5

3.2.2 试样溶液的测定

取2.5.2处理得到的待测溶液进样，外标法计算待测液中目标物质的质量浓度，然后计算样品中待测物的含量。

【注】试样中毒素含量超过GB 2761限量值时，需采用相应的单一毒素检测的标准方法进行确证。

3.2.3 定量方法选择

本文选择外标法定量，使用正离子模式监测；可以选择同位素内标进行定量，如果对化合物有干扰，可以选择负离子模式检测。

3.2.4 QuEChERS前处理优化

1) 样品前处理考虑了两种净化方式（包含GCB填料和不包含GCB填料），分别对纯标液进行处理，两种净化方式对DON、3-AcDON、15-AcDON、T-2、HT-2 均无吸附作用，可进行进一步样品净化实验。

2) 含GCB净化方式对AFB1、AFG2、ST、ZEN、AFG1、AFB2、OTA、ZEN、AFG1、AFB2、OTA、FB3、FB1、FB2 有很强的吸附性，不适合做多组分净化。

3) 最终选用不含GCB的净化方式，对DON、3-AcDON、15-AcDON、T-2、HT-2、AFB1、AFG2、ST、ZEN检测净化效果和回收率较好，适合多组分净化。

3.2.5 灵敏度测试

采用上述分析方法，12种真菌毒素在15 min内均可获得良好的

色谱峰，图1为12种真菌毒素标准溶液图谱（浓度见表3），各化合物灵敏度测试结果见表3，LOD在0.1-2ug/kg之间。

3.2.6 相对标准偏差RSD 测试

采用上述分析方法，对12种真菌毒素进行相对标准偏差测试（浓度见表3，n=6），实验结果证明，12种真菌毒素相对标准偏差RSD%均小于15%（见表3）

4. 总结

开发了一种快速简单的QuEChERS前处理方法用于粮谷中16种典型真菌毒素的分析，使用AccuCore aQ表面多孔增强核色谱柱，增强了对极性化合物的保留及选择性，峰形良好。采用LC-MS/MS方法，15min内快速完成低浓度真菌毒素的分析，并获得较好的回收率，回收率范围60-110%，LOD为0.1-2 ug/kg，该方法完美适用于粮谷中多种真菌毒素的分析。

5. 参考文献

- 1 Determination of Multiple Mycotoxins in Grain Using a QuEChERS Sample Preparation Approach and LC-MS/MS Detection
2. GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量

利用高分辨质谱 Q Exactive Focus 定量分析 小麦和饲料中的真菌毒素

引言

真菌毒素是真菌在食品或饲料里生长所产生的代谢产物，对人和动物都具有极大的健康隐患。据联合国粮农组织（FAO）统计，全球每年约有 25% 的农产品受到真菌毒素污染。为了保证食品和饲料的安全，全世界多个国家通过法规或标准严格规定粮食中主要真菌毒素的限量。但传统的检测方法存在耗时长，通量低，定性能力差等问题。本文采用高分辨台式质谱仪 Q Exactive Focus 建立了粮食提取物中多种真菌毒素的检测方法。方法具有媲美高端三重四极杆的灵敏度，同时可以对复杂基质中的痕量物质准确地定性分析，充分保障结果的准确性。

实验方法

液相色谱方法

UHPLC: Thermo Scientific Ultimate 3000 RSLC

色谱柱: Thermo Scientific Hypersil Gold (50*2.1mm, 1.9 μm)

流速: 0.3 mL/min, 进样体积: 5 μL

流动相: A 相: 2mM 的甲酸铵和 20 μL/L 的甲酸水溶液

B 相: 2mM 的甲酸铵和 20 μL/L 的甲酸甲醇溶液

梯度洗脱:

Time (min)	%A	%B
0	98	2
2	55	45
6	2	98
11	2	98
11.5	98	2
14	98	2

质谱方法

质谱仪: Thermo Scientific Q Exactive Focus 台式高分辨质谱仪。

实验采用正负切换 Full MS-ddMS² 扫描方式进行筛查分析，采用正离子或负离子模式的 Full MS-ddMS² 和 t-SIM-ddMS² 进行

定量分析，如图 1 所示。利用数据依赖扫描获得的二级子离子碎片离子信息进行确证。

Full MS: 分辨率为 60,000 (FMHW@m/z 200)。

t-SIM: 分辨率为 60,000 (FMHW@m/z 200)，isolation width 为 4 m/z

MS/MS采集: 15,000 (FMHW@m/z 200) 分辨率下数据依赖采集; HCD NCE 为 45%，isolation width 为 4m/z

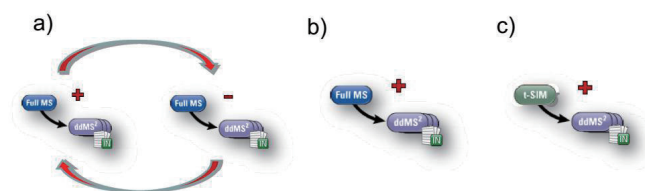


图 1. 扫描方法设置, a) 快速正负切换的筛查方法; b) Full MS 定量方法; c) t-SIM 定量方法

样品前处理方法

样品前处理方法

参考文献 [1], 样品经 1% 的甲酸乙腈 / 水溶液浸提 15min 后, 再震荡 1h 后, 离心, 过滤, 供测定分析。

实验与讨论

筛查结果分析

在一定的 Mass tolerance 下, 采用化合物加合离子峰的精确质量数从 Fullscan 的数据中提取, 得到 XIC 图谱。Q Exactive Focus 具有良好的质量精度, 因此可以将提取窗口缩小至 5ppm, 甚至更低, 充分保证了方法极高的选择性。同时, Q Exactive Focus 可以实现快速的正负离子切换扫描, 并在正负切换的模式下保证高质量精度, 在提高筛查实验通量同时, 也保证结果的准确 (图 3)。

Compound Name	Elemental Composition	Polarity	Exact Mass [M+H] ⁺ / [M-H] ⁻
Alternariol	C14H10O5	-	257.046
Alternariol 1-methylether	C15H12O5	-	271.061
Zearalenol alpha-	C18H24O5	-	319.155
Zearalenol beta-	C18H24O5	-	319.155
Sterigmatocystine	C18H12O6	+	325.071
Ochratoxin A	C20H18ClNO6	+	404.09
Citreoviridin	C23H30O6	+	403.212

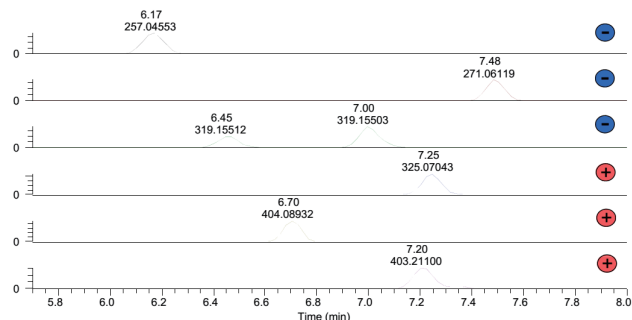


图 2. 正负切换扫描模式下的筛查分析结果

定量结果分析:

本文分别采用了 Full MS-ddMS² 和 t-SIM- ddMS² 两种方式进行定量分析。结果表明 (见表 1), t-SIM 由于发挥了四极杆的离子筛选作用, 可以获得更好的动态范围和灵敏度, 在小麦提取物基质中的 LOD 较 Full MS 有 2-20 倍的提升。

Compound Name	Elemental Composition	Polarity	Exact Mass [M+H] ⁺	LOD Full MS [ppb]	LOD SIM [ppb]	Factor
Aflatoxin B1	C17H12O6	+	313.0707	0.13	0.07	2
Aflatoxin G1	C17H12O7	+	329.0656	0.07	0.016	4
Citreoviridin	C23H30O6	+	403.2115	5.33	2.67	2
Citrinin	C13H14O5	+	251.0914	8	0.4	20
Deoxynivalenol (DON)	C15H20O6	+	297.1333	26.7	1.33	20
DON-15-acetyl	C17H22O7	+	425.217	53.33	10.67	5
HT-2 Toxin	C22H32O8	+	325.0707	2.67	0.27	10
Sterigmatocystine	C18H12O6	+	467.2276	0.53	0.05	10
T2 Toxin	C24H34O9	+	403.212	1.33	0.27	5

表 1. 小麦提取物中真菌毒素的定量结果比较

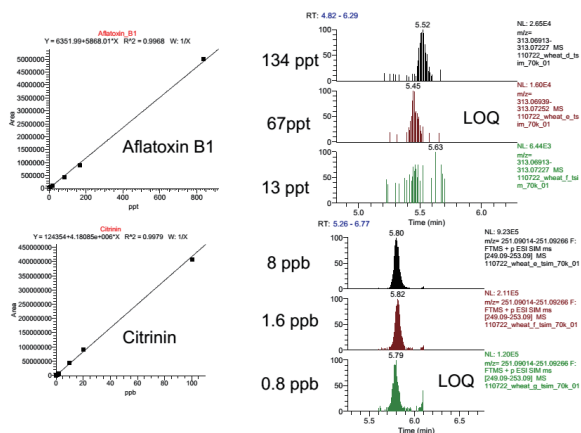


图 3. Aflatoxin B1 (黄曲霉毒素 B1) 和 Citrinin (橘霉素) 小麦提取物基质加标的标准曲线和不同浓度水平的 SIM 扫描色谱图

实验在采集一级扫描数据的同时, 也可由方法设置中的 inclusion list 来触发数据依赖扫描, 获得二级子离子的全扫描图谱, 并以此对结果进行确证分析。方法还可通过 top N 和动态排除, 来保证低含量组分的检测和定量分析足够扫描点数的采集。图 4 为二级数据的确证结果。

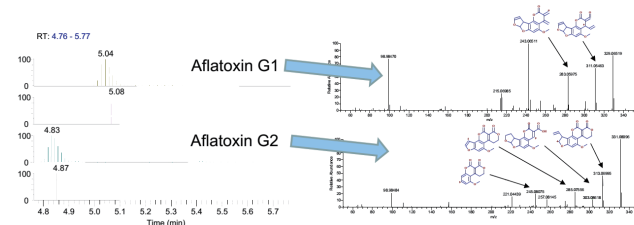


图 4. HRAM ddMS² 扫描确证小麦提取物中不同类型的黄曲霉毒素

结论

本文建立了运用高分辨质谱对粮食中真菌毒素的筛查和定量方法。Q Exactive Focus 凭借其高达 60,000 (FMHW@m/z 200) 的分辨率和良好的质量精度可以很好的排除复杂基质中的干扰, 实现方法的高特异性; 凭借其快速的正负极性切换能力, 可在一针分析内同时完成对正负离子的检测, 实现方法的高通量, 在

实现高灵敏度的同时, 还能通过数据依赖的二级全扫描对结果进行确证, 可以很好满足食品安全的定量分析需求。

参考文献

[1] KELLMANN ET AL "Full Scan MS in Comprehensive Quantitative and Quantitative Residue Analysis in Food and Feed Matrices: How Much Resolving Power is required?" J Am Soc Mass Spectrom 2009,20,1464-1476

QuEChERS 样品前处理结合 LC-MS/MS 测定粮谷中的 16 种真菌毒素

1. 实验背景

真菌毒素是真菌在适宜条件下产生的有毒次级代谢产物，能够引发人类、动物各种急、慢性疾病主要威胁人类健康的真菌毒素种类有单端孢霉烯族类毒素、伏马类毒素、赭曲霉类毒素、黄曲霉类毒素等。目前，大部分的国家和地区都制定了粮食中真菌毒素限量标准，我国也高度重视真菌毒素污染问题，在 2015 年新修订的《食品安全法》中，首次将生物毒素明确列入重点关注的污染物质中。GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量 也规定了食品中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 M1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、展青霉素、赭曲霉毒素 A 及玉米赤霉烯酮的限量指标。据报道我国每年有 3100 万吨粮食在生产、储存、运输过程中被真菌污染，约占粮食年总产量的 6.2%。为了保证我国粮食质量安全，避免不必要的经济损失，及时快速监测调查真菌毒素污染种类、水平及其风险尤为重要。

由于真菌毒素种类多样，且存在协同污染，为确保全面、快速的了解粮食中真菌毒素的污染情况，迫切需要一种简单、快速、灵敏、同时准确测定粮食中多种真菌毒素的方法。目前真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法、酶联免疫吸附法、高效液相色谱法、液相色谱串联质谱法。薄层色谱法程序复杂、可重复性和再现性差，基于抗原抗体相互作用的酶联免疫吸附法虽有较高的选择性，但无法准确定量，同时由于前处理简单，没有有效的净化，易受基质干扰，产生假阳性。免疫亲和柱前处理净化方法由于其特异性吸附，净化效果好，但是一方面操作复杂，另外一方面成本较高，不适合大规模检测。LC-MS/MS 法已成为真菌毒素检测最广泛的检测方法，能够覆盖广泛的化合物，同时具备良好的选择性和灵敏度。

本文使用 QuEChERS 作为前处理净化方法，操作简单，重复性好，回收率高。采用 Accucore AQ HPLC 色谱柱分离，表面多孔增强核技术的运用，兼容 100% 水相，同时增强了对极性化合物的保留及选择性。赛默飞高效液相色谱仪 Dionex Ultimate 3000 和三重四极杆质谱仪 TSQ Vantage MS/MS 联用用于 16 种真菌毒素及 3 种内标物的快速有效地分析。

2. 样品前处理:

样品提取:

1. 称取 5g 均质后的样品放入 50mL 离心管中
2. 加入 10 mL 水
3. 震荡 15 min
4. 加入 250 μ L of 1 μ g/mL 内标物，再加入 10 mL 2% 甲酸乙腈
5. 震荡 15 min
6. 加入 HyperSep Dispersive SPE 萃取包 (P/N 60105-332-B: 4g MgSO₄, 1g NaCl)
7. 快速震荡 1 min.
8. \geq 3000 g 离心 5 min

样品净化:

1. 移取 1 mL 上清液到 HyperSep Dispersive SPE 净化管中 (P/N 60105-204: QuEChERS 2mL 离心管 带 150mg MgSO₄, 50mg PSA 50mg C18)
2. 震荡 30 s
3. \geq 3000 g 离心 5 min
4. 移取 500 μ L 净化液 到 5 mL 试管中，氮吹干，用 500 μ L 甲醇 / 水 (50:50, v/v) 复溶
5. 用 0.2 μ m 滤头 (亲水 PTFE, 货号: 42213-NPL) 过滤后上机检测

3. 仪器条件

液相条件:

色谱柱:	Accucore aQ, 100 \times 2.1 mm, 2.6 μ m (货号: 17326-102130)
保护柱:	Accucore aQ, 10 \times 2.1 mm, 2.6 μ m (货号: 17326-012105)
柱温:	45 $^{\circ}$ C
进样体积:	5 μ L
自动进样器温度:	10 $^{\circ}$ C
流速:	400 μ L/min
流动相	A: 10 mM 甲酸铵水溶液
流动相	B: 甲醇

表 1. LC 梯度

Time(min)	A(%)	B(%)
0	100	0
1	75	25
4	75	25
5	60	40
8	60	40
8.5	40	60
9.5	40	60
10	0	100
13	0	100
13.2	100	0
17	100	0

质谱条件:

电离方式:	APCI+ & APCI- , 快速极性转换
喷雾电压:	5 μ A (APCI+), 20 μ A (APCI-)
雾化温度:	250 $^{\circ}$ C
离子传输管温度:	250 $^{\circ}$ C
鞘气压力:	50 arbitrary units
辅助气压力:	15 arbitrary units
反吹气:	0 arbitrary units
扫描方式:	EZ method (SRM)

表 2 SRM 真菌毒素类化合物的保留时间及离子信息

Analyte	分析物	tR(min)	母离子	子离子 2	CE 1	子离子 2	CE 2	S-lens(V)
Nivalenol	雪腐镰刀菌烯醇	2.47	357.34 [M+HCOO]-	281.91	16	311.79	15	65
Deoxynivalenol	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	2.93	341.42 [M+HCOO]-	265.87	13	295.96	16	63
Fusarenon X	镰刀菌酮	3.56	354.9 [M+H]+	136.97	31	174.96	19	76
Neosolaniol	新茄镰孢菌醇	3.96	399.91 [M+NH4]+	184.99	20	215.03	16	81
3-Acetyldeoxynivalenol	乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	4.68	338.89 [M+H]+	231.1	13	90.98	48	74
3-Acetyldeoxynivalenol-D3	乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇-D3	4.64	341.92 [M+H]+	230.99	14	213.04	15	80
Aflatoxin G2	黄曲霉毒素 G2	6.62	330.83 [M+H]+	189.02	36	245.05	27	137
Aflatoxin G1	黄曲霉毒素 G1	7.03	328.83 [M+H]+	199.02	41	200.03	36	143
Thiabendazole-13C6	噻苯咪唑-13C6	7.01	207.91 [M+H]+	181.02	25	137.04	32	123
Aflatoxin B2	黄曲霉毒素 B2	7.47	314.85 [M+H]+	287.06	23	259.01	27	129
Aflatoxin B1	黄曲霉毒素 B1	7.93	312.84 [M+H]+	241.02	36	285.05	22	121
Diacetoxyscirpenol	双乙酰基草镰刀菌醇	8.1	383.93 [M+NH4]+	247.06	13	229.08	16	82
Ochratoxin A	赭曲霉毒素 A	9.18	403.8 [M+H]+	238.93	23	220.9	36	101
Alternariol	交链孢酚	10.08	257.65 [M-H]-	214.03	23	216.01	26	113
β -zearalanol	β -玉米赤霉醇	10.48	321.51 [M-H]-	277.94	24	303.86	24	125
α -zearalanol	α -玉米赤霉醇	11.11	321.51 [M-H]-	277.94	24	303.86	24	125
T-2 toxin	T-2 毒素	11.09	483.91 [M+NH4]+	185.02	21	214.99	17	84
Zearalenone	玉米赤霉烯酮	11.3	317.5 [M-H]-	176.13	27	273.95	22	110
Gemfibrozil-D6	二甲苯氧庚酸-D6	11.66	255.79 [M-H]-	122.41	21	-	-	60

4. 实验谱图

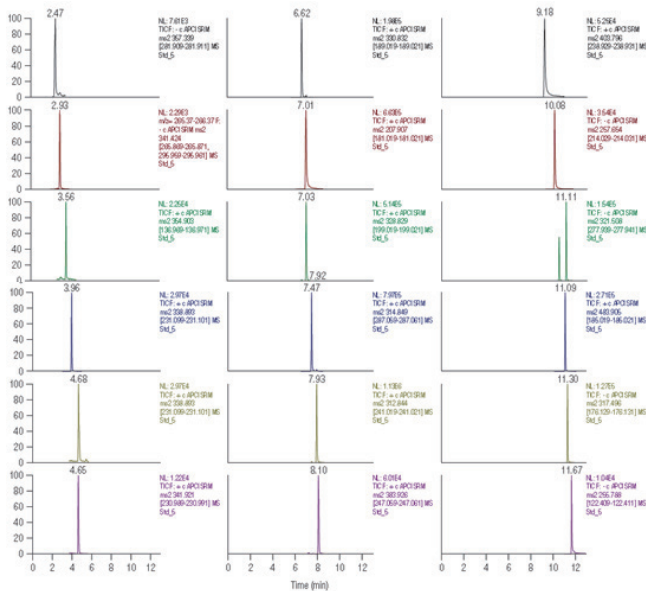


图 1 16 种真菌毒素及 3 种内标 100 µg/kg 色谱图

5. 实验数据

表 3 不同添加浓度下的 16 种真菌毒素回收率及 RSD 值

Analyte	分析物	20 µg/kg		100 µg/kg	
		回收率 %	RSD %	回收率 %	RSD %
Nivalenol	雪腐镰刀菌烯醇	71.4	11.2	67.2	6.5
Deoxynivalenol	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	106.7	4.1	97	2.8
3-Acetyldeoxynivalenol	乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	100.4	3.9	97.2	1.9
Fusarenon X	镰刀菌酮	96.3	3.9	96.2	3.8
Neosolaniol	新茄镰孢菌醇	100.5	3.3	99.4	2
Diacetoxyscirpenol	双乙酰基草镰刀菌醇	102.6	2.8	99	2.3
Alternariol	交链孢酚	94.8	4.9	85.9	5.4
β -zearalanol	β -玉米赤霉醇	94.5	9.2	92.7	4.6
α -zearalanol	α -玉米赤霉醇	93.9	10.5	89	3.5
Zearalenone	玉米赤霉烯酮	92.4	9.4	87.6	4.5
Ochratoxin A	赭曲霉毒素 A	93.8	3	94.7	3.8
T-2 toxin	T-2 毒素	96.2	4.5	94.2	2.8
Aflatoxin B1	黄曲霉毒素 B1	97	2.7	91.7	5.4
Aflatoxin B2	黄曲霉毒素 B2	97.4	2.9	91.4	4.8
Aflatoxin G1	黄曲霉毒素 G1	95	3.3	92	4.1
Aflatoxin G2	黄曲霉毒素 G2	95.5	3.1	93.9	2.7

LOQ: ≤ 10 ng/g

6. 结论

开发了一种快速和简单的 QuEChERS 前处理方法用于粮谷中 16 种典型真菌毒素的分析, 使用 Accucure aQ 表面多孔增强核色谱柱, 能够达到 α - 和 β - 玉米赤霉醇的基线分离, 采用 LC-MS/MS 方法, 17min 内快速完成低浓度真菌毒素的分析, 并获得较好的线性、精确度, 回收率数据及可接受的 LOQ, 该方法完美适合于粮谷中多种真菌毒素的分析。

奶粉中黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2, M1 的分析

——参考标准: GB 5009.22-2016 食品中黄曲霉毒素 B1, B2、G1, G2 的测定

1. 实验背景

黄曲霉毒素作为一种霉菌毒素,是粮食在未能及时晒干及储藏不当时产生霉菌的代谢产物,广泛存在。因其具有很强的毒性和致癌性,在国家食品标准、饲料标准中都对此设置了严格的规定。黄曲霉毒素 M1 属于真菌毒素,是黄曲霉毒素 B1 在动物体内羟基化代谢产物,具有剧毒性和强致癌性,由于其可能诱发肝癌,早在 1993 年就被世界卫生组织癌症研究机构列为一类致癌物。由于黄曲霉毒素具有含量低、结构相似的特点,这就要求检测方法灵敏度高,特异性强,集分离与检测为一体,方可达到这样的要求。本文采用高效液相色谱法对黄曲霉毒素进行分析,克服了黄曲霉毒素含量低的问题,得到了高灵敏度的结果。

2. 样品前处理

称取奶粉 5 g,置 100 mL 量瓶中,加 50℃温水 20 mL 使溶解,振荡 30 S;加入氯化钠 2 g,振荡使溶解;继续加入 50 mL 乙腈,振荡 30 S,混匀后加乙腈至刻度,涡旋振荡使混匀。过滤,取滤液 40 mL,40℃氮气流下挥至近干。残留物加入 20 mL 10% 乙腈使溶解,过免疫亲和柱,待样品完全通过免疫亲和柱之后,加 10 mL 水清洗亲和柱。最后用乙腈 2 mL 洗脱,收集洗脱液 1.5 mL,氮气吹干。加入 200 μL 正己烷和 200 μL 三氟乙酸,振荡混匀,在 40℃下反应 10 min,取出,氮气流下挥干,加 10% 乙腈 0.5 mL,振荡 10 s。

3. 实验条件

仪器型号:

Dionex Ultimate 3000 系列:

泵: LPG-3400SD

自动进样器: WPS-3000SL

柱温箱: TCC-3000RS

检测器: FLD

色谱软件: Chromeleon Chromatography Data System

检测器类型、工作参数及 S/N 号:

荧光检测器, FLD-3400

ResponseTime = 1

FLD_FlowCell.Temperature.Nominal = 35.00 [°C]

FLD_FlowCell.ReadyTempDelta = 1.00 [°C]

BaselineBehavior = Append

Data_Collection_Rate.Nominal = 10.00 [Hz]

Emission_1.ExWavelength = 365.0 [nm]

Emission_1.EmWavelength = 435.0 [nm]

Emission_1.Sensitivity = 6

Emission_1.PMT = Auto

Emission_1.FilterWheel = Auto

色谱条件:

色谱柱: Thermo Scientific™ Hypersil GOLD C18, 5 μm, 100×2.1mm 货号 25005-102130

流动相: Time (min) CH₃CN (%) Methanol (%) Water (%)

0	16.5	16.5	67
---	------	------	----

25	16.5	16.5	67
----	------	------	----

进样量: 20 μL

流速: 800 μL/min

柱温: 25℃

4. 实验谱图

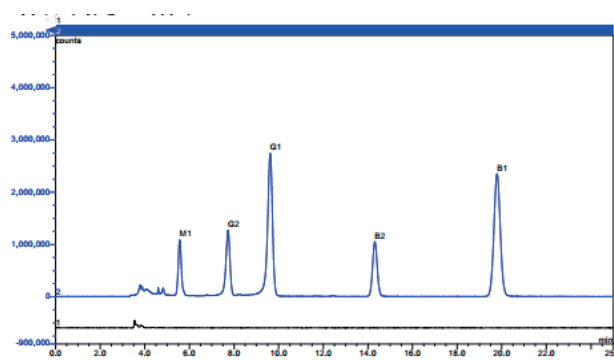


图 1 样品测定色谱图 (上: 1ppb 加标色谱图; 下: 空白样品色谱图)

5. 结论

本文使用 Thermo Scientific™ Hypersil GOLD C18, 5 μm, 100×2.1mm 色谱柱, 采取柱前衍生法与荧光检测器结合, 对芝麻中黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2, M1 进行分析, 得到了良好的峰型和分离, 以及高灵敏度的检测结果。

花生酱中黄曲霉毒素 B1,G1,B2,G2 的测定

——参考标准 GB 5009.22-2016 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定

1. 实验背景

黄曲霉毒素 (AFT) 是黄曲霉和寄生曲霉等某些菌株产生的双呋喃环类毒素。其衍生物有约 20 种, 分别命名为 B1、B2、G1、G2、M1 等。其中以 B1 的毒性最大, 致癌性最强, 被列为一级致癌物。黄曲霉毒素主要污染粮油及其制品, 各种植物性与动物性食品也能被污染。而花生酱是先将花生去壳, 再经过烘焙、去红衣、碾磨等工序加工制得的, 因此, 花生酱也会有被黄曲霉毒素污染的风险。目前, 我国已经制定一系列相关标准适用于食品中黄曲霉毒素的检测, 黄曲霉毒素测定的样品前处理方法一般采用净化柱或免疫亲和柱净化, 仪器检测方法主要有液相色谱串联质谱法、高效液相色谱法等。

本文参考食品安全国家标准《GB 5009.22-2016 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》第三法, 前处理使用赛默飞黄曲霉毒素总量免疫亲和柱, 完全按照国标方法处理, 结合高效液相色谱光化学柱后衍生法对黄曲霉毒素进行分析, B 族和 G 族 4 种黄曲霉毒素回收率好, 灵敏度高, 完全满足国标的要求。

2. 样品前处理

称取 5.0 g (精确到 0.01 g) 花生酱到 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈: 水 (84:16), 涡旋混匀 20 min, 4000 r/min 下离心 8 min, 取上清液 1 mL 于 15 mL 离心管中, 加入 9 mL 水, 混匀待净化。将黄曲霉毒素总量免疫亲和柱 (P/N: 60105-103-B) 恢复到室温, 去掉两端堵头, 将待净化样品液以 1-2 滴 / 秒的速度通过免疫亲和柱, 弃掉流出的液体, 加 10 mL 水淋洗柱子, 弃掉流出的液体, 用真空泵抽干柱子中的水, 加入 2*1 mL 甲醇缓慢洗脱, 流速约为 2-3 秒 / 滴, 最后在 50°C 下氮吹至近干, 用流动相定容至 1 mL, 过 0.22 μm 滤膜待测。

3. 仪器条件

色谱条件:

色谱柱: Acclaim C18 色谱柱, 4.6 × 150 mm, 5 μm (P/N: 059148)

流动相: 甲醇: 水 = 45:55

流速: 1 mL/min

检测器: 荧光检测器

激发波长: 360 nm

发射波长: 440 nm

进样量: 10 μL

柱温: 40°C

仪器: Ultimate 3000 HPLC 系统 + 光化学柱后衍生器

4. 实验谱图

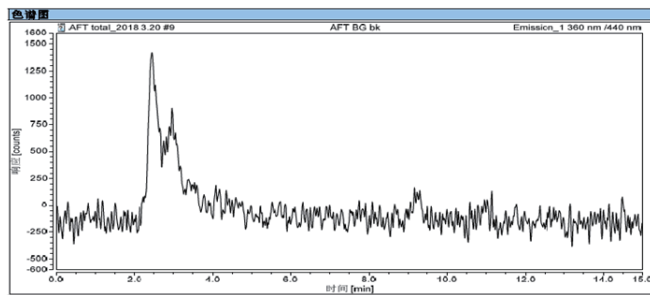


图 1. 花生酱空白基质谱图

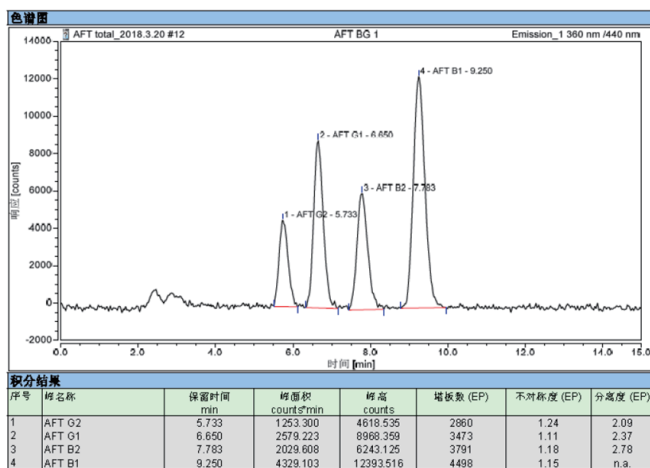


图 2. 花生酱基质加标 20 ng/mL (上机浓度 5 ng/mL) 色谱图
出峰顺序: 1. G2 2. G1 3. B2 4. B1

5. 实验数据

化合物	保留时间 (min)	回收率 1(%)	回收率 2(%)
AFT G2	5.7	104.75	101.40
AFT G1	6.6	101.78	99.34
AFT B2	7.7	106.69	101.51
AFT B1	9.2	105.50	104.60

表 1. 花生酱基质加标 20 ng/mL 回收率结果

6. 结论

本文采用赛默飞黄曲霉毒素总量免疫亲和柱, 按照国标方法进行样品前处理, 加标 20 ng/mL, 使用 Acclaim C18 色谱柱, 结合 Ultimate 3000 高效液相色谱仪, 黄曲霉毒素 B 族和 G 族四个化合物分离度良好, 空白样品加标回收率在 99.34%~106.69% 之间, 完全满足 GB 5009.22-2016 第三法实验分析要求。

食品中赭曲霉毒素 A 的测定

——参考标准：GB 5009.96-2016 食品中赭曲霉毒素 A 的测定

1. 实验背景

由赭曲霉 (*Aspergillus Ochratoxin*) 和硫色曲霉 (*A. sulphureus*) 等产生的赭曲霉毒素 (Ochratoxin) 有 A、B、C、D 四种化合物。其中，赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 是最重具卫生学意义的霉菌代谢产物。赭曲霉毒素 A 是一种强致死性化合物，它会导致肝、肾坏死性病变。对雏鸭经口测试，LD50 仅为 0.5 mg/kg 体重，其毒性与黄曲霉素相当。在肝癌高发区的谷物中可分离出赭曲霉毒素。赭曲霉毒素 A 的污染范围较广，几乎可污染玉米，小麦等所有的谷物和中药材。

目前已有粮食和食品中赭曲霉毒素 A 的检验标准。本文以薏苡仁、淡豆豉和白扁豆为基质，发展赭曲霉毒素 A 的前处理和分离检测方法，以期对同类型的检测提供参考。

2. 样品前处理

提取液：甲醇：水 (8:2, v:v)。

PBS 溶液：称取 8 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，溶解于 990 mL 水中，用浓盐酸调节 pH 7，用水稀释至 1 L。

清洗液缓冲：称取 25 g 氯化钠、5 g 碳酸氢钠溶于水中，加入 0.1 mL 吐温 -20，用水稀释至 1 L。

称取 15 g 样品加入到 50 mL 离心管中，加入 30 mL 提取液，加入 0.75 g 氯化钠，振摇后涡旋 3 min，超声 20 min，中间振摇 3 次，11000 r/min 离心 15 min 后取上清液。取 2 mL 上清液，吹除去大部分的甲醇后，用 PBS 溶液定容到 10 mL，过 0.22 μm 滤膜。取过滤后的提取液 5 mL，以 1 滴每 3 秒流速流过免疫亲和柱 (货号：60105-105-B)，然后 2~4 mL 空气排空，10 mL 清洗缓冲液、10 mL 水依次淋洗免疫亲和柱，弃去淋洗液，抽干小柱。1.5 mL 甲醇洗脱，40 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹干，用流动相定容至 1 mL，供检测。

测试用对照品的配制：使用流动相将 10 mg/L 的赭曲霉毒素 A 标准溶液依次稀释成 3.13 $\mu\text{g/L}$ 、6.25 $\mu\text{g/L}$ 、12.50 $\mu\text{g/L}$ 、25.00 $\mu\text{g/L}$ 、50.00 $\mu\text{g/L}$ 、100.00 $\mu\text{g/L}$ 和 200.00 $\mu\text{g/L}$ 的线性标准溶液。

3. 仪器条件

色谱条件：

色谱柱：Acclaim C18 4.6 \times 150 mm, 5 μm
(货号：059148)

流动相：乙腈：水：冰醋酸 (48:51:1, v:v:v)
流速：1 mL/min
检测器：荧光, Ex: 333 nm; Em: 460 nm
柱温：30 $^{\circ}\text{C}$
进样量：20 μL
仪器：Ultimate 3000

4. 实验谱图

1. 线性

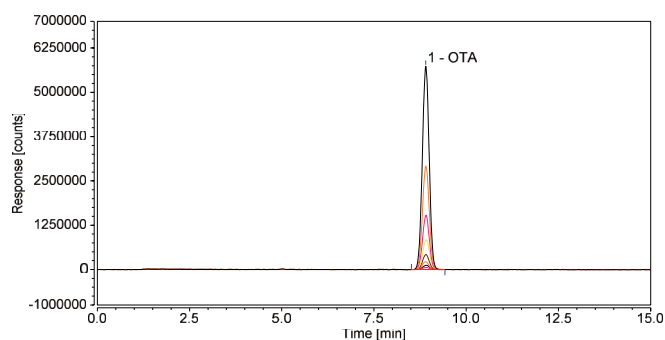


图 1 线性叠加谱图 (从低到高依次代表浓度为 3.13 $\mu\text{g/L}$ 、6.25 $\mu\text{g/L}$ 、12.50 $\mu\text{g/L}$ 、25.00 $\mu\text{g/L}$ 、50.00 $\mu\text{g/L}$ 、100.00 $\mu\text{g/L}$ 和 200.00 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准溶液)

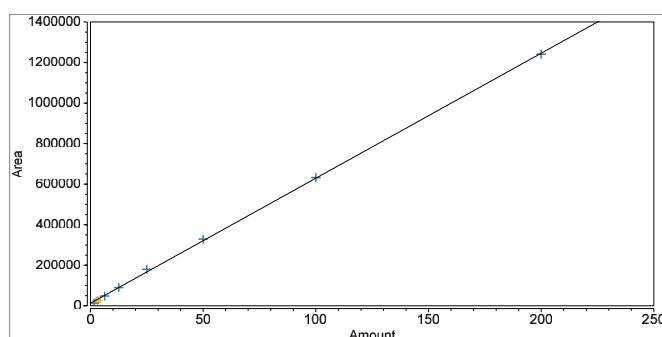


图 2 OTA 标准曲线图

表 1 赭曲霉毒素 A 线性曲线

名称	线性曲线
OTA	$A = 6166C + 12898$, $R^2 = 1.000$

2. 重复性

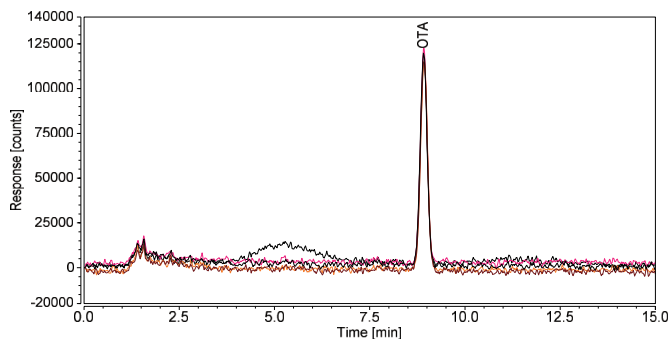


图 3 低浓度样品 (3.13 µg/L OTA) 重复性

表 2 低浓度样品进样重复性

名称	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	样品浓度 (µg/L)
OTA	0.09%	0.67%	3.13

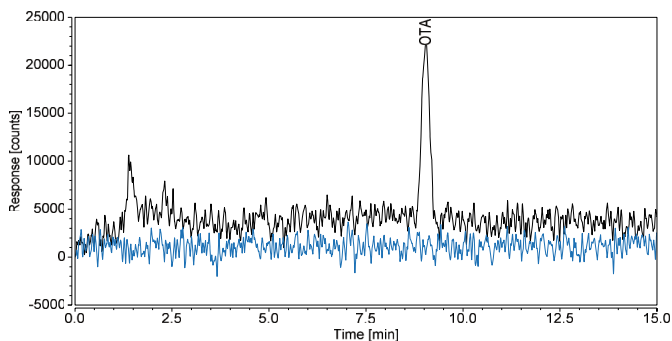


图 6 定量限 (0.55 µg/L OTA) 谱图与空白叠加谱图

表 4 赭曲霉毒素 A 的 LOD 和 LOQ

名称	保留时间 (min)	LOD (S/N=3) (µg/L)	LOQ (S/N=10) (µg/L)
OTA	9.05	0.15	0.55

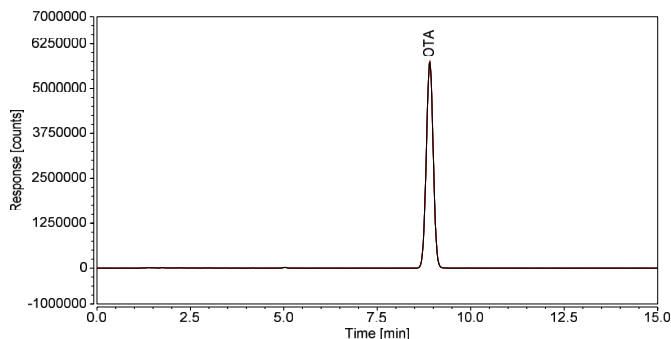


图 4 高浓度样品 (200 µg/L OTA) 重复性

表 3 高浓度样品进样重复性

名称	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	样品浓度 (µg/L)
OTA	0.01%	0.11%	200

回收率

表 5 回收率数据

名称	加标量 (µg/L)	加标回收率 (%)
薏苡米	2.5	99.8
淡豆豉	2.5	100.2
白扁豆	2.5	97.4

6. 结论

本文开发了赭曲霉毒素 A 测定的方法。以赭曲霉毒素 A 对照品为样品, 考察了液相方法的检测限、检出限和线性范围。以薏苡仁、白扁豆和淡豆豉为基质, 考察了前处理方法的净化能力和基质干扰情况。结果表明, 该前处理方法回收率高、具有较好的净化能力, 赭曲霉毒素 A 出峰位置附近无干扰峰, 可用于薏苡仁、白扁豆和淡豆豉赭曲霉毒素 A 的检测。液相方法重复性好、具有较宽的线性范围、较低的检测限和检出限。

5. 实验数据

检出限和定量限

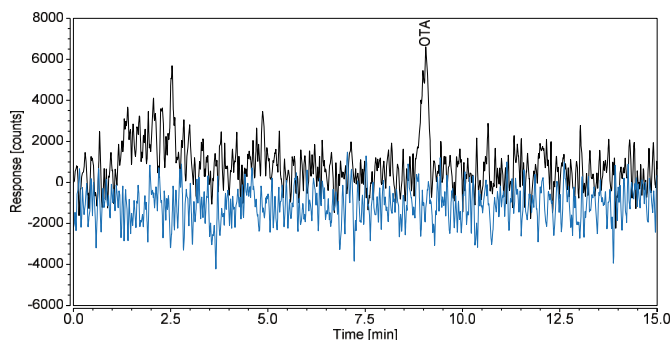


图 5 检出限 (0.15 µg/L OTA) 谱图与空白叠加谱图

鲜榨果汁中展青霉素的检测

——参考标准：GB 5009.185-2016 食品安全国家标准 食品中展青霉素的测定

1. 实验背景

近年来，真菌毒素在食品中造成的污染事件频频爆发，引发了公众的极大关注。展青霉素（Patulin, PAT）又称棒曲霉素，作为一种广泛存在的真菌毒素，是由曲霉属和青霉等真菌产生的对人和动物健康有害的次级代谢产物。

展青霉素被国际癌症研究机构（IARC）归为第三类可疑致癌物质。世界卫生组织（WHO）和欧盟规定展青霉素在食品中的安全限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国 GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量，规定果蔬汁类及其饮料中展青霉素的限量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。16 年的食品国家标准出台了 GB 5009.185-2016 食品中展青霉素的测定。

本文采用 HyperSep C18 固相萃取小柱进行样品前处理，操作简单、省时、省力，能够得到较高和稳定的回收率，回收率在 94-101% 之间。使用 Hypersil GOLD C18 色谱柱，在 LC-MS 上具有出色的峰形和分辨率。完全满足 GB 5009.185-2016 第二法高效液相色谱法的要求。

2. 样品前处理

样品提取

取 1g 均质离心后的样品，加入 0.5mL 醋酸缓冲液（pH4）。

SPE 操作步骤

500mg 3mL HyperSep C18 固相萃取柱（货号：60108-304）

活化

10 mL 甲醇，3 mL 10% 甲醇，10 mL 水

上样

上样，2-3 mL/min

清洗

5 mL 正己烷，柱子抽干，通气 15 min

洗脱

正己烷：乙酸乙酯：丙酮 = 1:5:4，1:4:5，1:3:6 每个梯度洗脱体积为 5 mL；洗脱液加入 1 滴冰醋酸，40℃ 氮气吹干，立即用 1 mL 醋酸缓冲液溶解

3. 色谱条件

色谱柱：Hypersil Gold C18, 5 μm , 4.6 \times 250mm
（货号：25005-254630）

流动相：乙腈（A）：水（B）= 1:10（v/v）

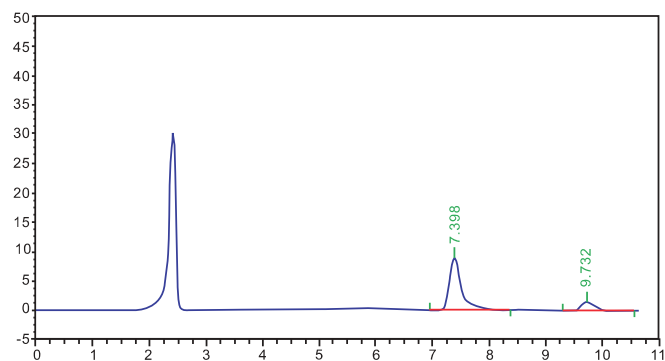
流速：1 mL/min

检测波长：UV 276 nm

柱温：40℃

进样量：5 μL

4. 实验谱图



展青霉素（Rt=7.4min）HPLC 色谱图

5. 实验数据

回收率在 94-101% 之间。

6. 结论

本文采用 HyperSep C18 固相萃取小柱进行样品前处理，操作简单、省时、省力，能够得到较高和稳定的回收率，回收率在 94-101% 之间。使用 Hypersil GOLD C18 色谱柱，在 LC-MS 上具有出色的峰形和分辨率。完全满足 GB 5009.185-2016 第二法 高效液相色谱法的要求。

饲料中黄曲霉毒素的测定

1. 引言

黄曲霉毒素 (AFT) 是一类化学结构类似的化合物, 均为二氢呋喃香豆素的衍生物。黄曲霉毒素是主要由黄曲霉 (aspergillus flavus) 寄生曲霉 (a.parasiticus) 产生的次生代谢产物, 是目前饲料中毒性最大、波及面最广的真菌毒素之一。B1 是二氢呋喃氧杂萜邻酮的衍生物, 即含有一个双呋喃环和一个氧杂萜邻酮 (香豆素), 前者为基本毒性结构, 后者与致癌有关。M1 是黄曲霉毒素 B1 在体内经过羟化而衍生成的代谢产物, 与致癌性有关。黄曲霉毒素的主要分子型式含 B1、B2、G1、G2、M1 等。

GB13078-2001 饲料卫生标准中规定我国仔猪配合饲料及浓缩饲料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 10 µg/kg、肉用仔鸡前期、雏鸡配合饲料及浓缩饲料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 20 µg/kg、肉用仔鸡后期、成长鸡、产蛋鸡配合饲料及浓缩饲料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 20 µg/kg、肉用仔鸭前期、雏鸭配合饲料及浓缩饲料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 10 µg/kg、肉用仔鸭后期、生长鸭、产蛋鸭配合饲料及浓缩饲料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 15 µg/kg、鹌鹑配合饲料及浓缩饲料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 20 µg/kg、奶牛精料补充料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 10 µg/kg、肉牛精料补充料黄曲霉毒素 B1 最高残留量值不得高于 50 µg/kg。

2. 测试用对照品

使用流动相将黄曲霉毒素 B1 150 µg/L、B2 150 µg/L、G1 150 µg/L、G2 150 µg/L、M1 500 µg/L 混合标准溶液依次稀释成 (0.15 µg/L、0.15 µg/L、0.15 µg/L、0.15 µg/L、0.5 µg/L)、(0.3 µg/L、0.3 µg/L、0.3 µg/L、0.3 µg/L、1.0 µg/L)、(1.2 µg/L、1.2 µg/L、1.2 µg/L、1.2 µg/L、4 µg/L)、(3 µg/L、3 µg/L、3 µg/L、10 µg/L) 和 (4.5 µg/L、4.5 µg/L、4.5 µg/L、15 µg/L) 的线性混合标准溶液。

3. 样品前处理

提取液: 甲醇: 水 = 7: 3

精确称取 5 g 饲料样品加入到 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 提取液, 加入 1 g 氯化钠, 振摇后涡旋 2 min, 超声 20 min, 中间振摇 3 次, 滤纸过滤。精确量取 10 mL 提取液, 加入 6 mL 正己烷, 充分振摇后, 待分层, 精确量取下层液体 8 mL, 加

入 112 mL 超纯水, 混匀, 使用玻璃滤纸过滤至澄清。取该滤液 75 mL, 以 1 滴/s 的速度过免疫亲和柱 (AFT 免疫亲和柱, 美国 VICAM), 使用 20 mL 超纯水以 1 滴/s 的速度清洗免疫亲和柱, 2 mL 空气排空后, 使用 4 mL 甲醇洗脱并空气排空, 收集洗脱液, 60 °C 下氮吹至小于 0.2 mL, 使用流动相充分溶解样品并定容至 1 mL, 制成样品溶液。

4. 色谱条件

色谱柱	ThermoFisher Synchronis C18, 5 µm 4.6 × 150 mm, P/N: 97105-154630
柱温	室温
流动相	乙腈: 甲醇: 水 = 22: 22: 56
流速	0.8 mL/min
衍生条件	衍生泵: 0.05% 碘溶液 (0.1g 碘溶解于 20mL 甲醇中, 用水定量至 200mL) 衍生泵流速: 0.2mL/min 衍生化温度: 70°C 衍生反应管: Reaction Coil 750µL+ Reaction Coil 375µL
进样量	100 µL
检测器条件	FLD, Ex: 365nm; Em: 435nm

5. 结果与讨论

5.1 方法线性

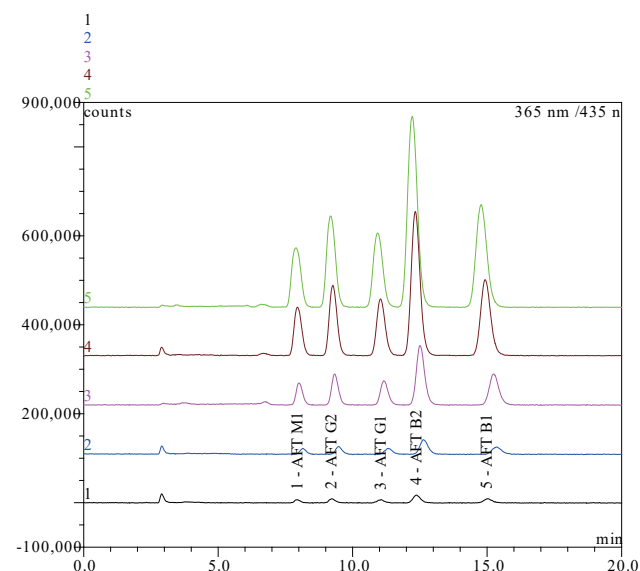


图 1. 线性叠加谱图

(其中 1、2、3、4、5 分别代表从低到高的线性浓度)

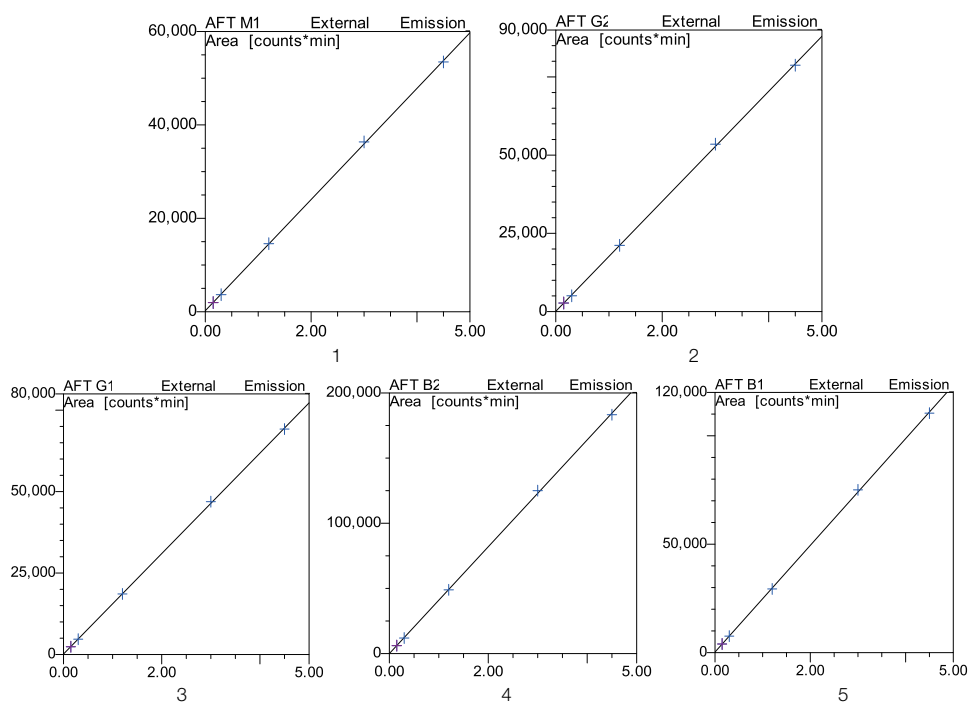


图 2 . 标准曲线图
(其中 1、2、3、4、5 分别代表黄曲霉毒素 M1、G2、G1、B2、B1)

表 1. 线性数据

Peak Name	Cal.Type	Points	Offset (C0)	Slope (C1)	Curve (C2)	Corr.Coeff. %
AFT M1	LOff	5	221.737	11900.772	0.000	99.993
AFT G2	LOff	5	58.532	17583.034	0.000	99.991
AFT G1	LOff	5	136.139	15419.663	0.000	99.994
AFT B2	LOff	5	-4.329	41002.287	0.000	99.988
AFT B1	LOff	5	268.323	24601.217	0.000	99.991

5.2 方法检出限、定量限

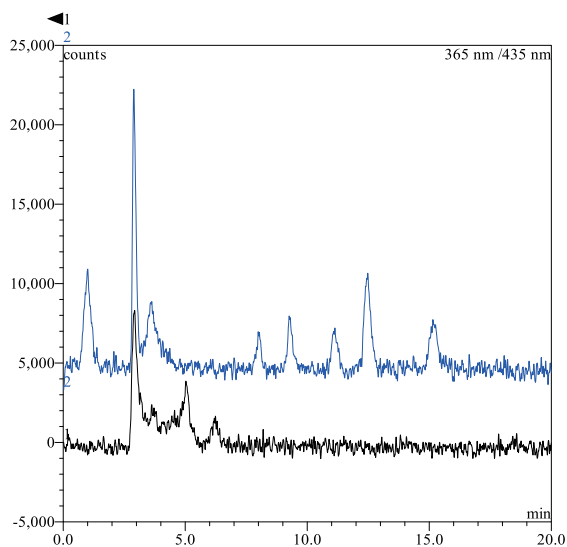


图 3. 检出限附近谱图与空白叠加谱图
(其中 1、2 分别代表空白、检出限附近谱图)

表 2. 图 3 对应数据

No.	Peakname	Ret.Time (min)	Area (counts*min)	amount ($\mu\text{g/L}$)	Resolution	S/N
1	AFT M1	7.990	680.7633	0.17	3.52	4.4
2	AFT G2	9.260	953.2900	0.05	4.47	5.9
3	AFT G1	11.133	869.2133	0.05	2.71	4.8
4	AFT B2	12.480	2009.6383	0.05	4.70	10.3
5	AFT B1	15.150	1110.5100	0.05	n.a.	5.2

表 3. 检出限、定量限数据

	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
AFT M1	0.116	0.386
AFT G2	0.025	0.085
AFT G1	0.031	0.104
AFT B2	0.015	0.049
AFT B1	0.029	0.096

5.3 方法精密度

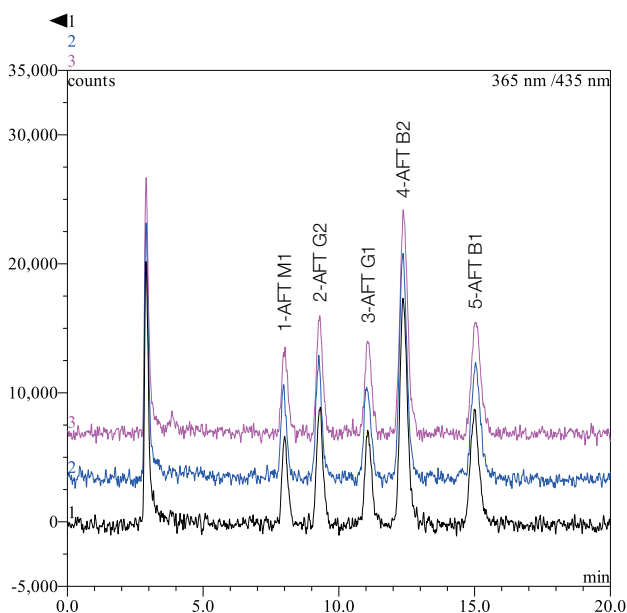


图 4. 定量限附近三针标准品叠加谱图

表 4. 精密度考察结果 (图 4 数据)

No.	待测物	Ret.Time RSD (% n=3)	Area RSD (% n=3)	amount (µg/L)
1	AFT M1	0.296 %	2.156 %	0.5
2	AFT G2	0.309 %	2.137 %	0.15
3	AFT G1	0.177 %	0.698 %	0.15
4	AFT B2	0.041 %	2.042 %	0.15
5	AFT B1	0.206 %	2.651 %	0.15

5.4 方法回收率

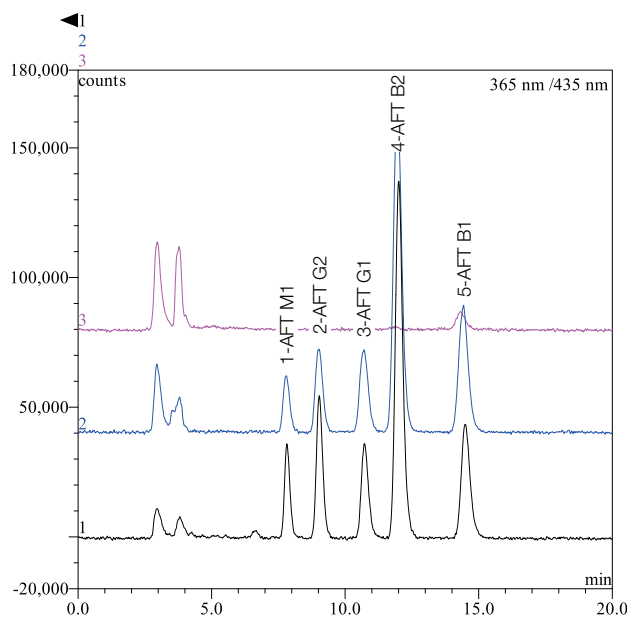


图 5. 回收率谱图

(其中 1、2、3 分别代表标准品、加标样品、样品)

表 5. 回收率考察结果 (图 5 数据)

	加标量 (µg/L)	加标回收率 (%)
AFT M1	5.0	82.20
AFT G2	1.5	80.94
AFT G1	1.5	99.22
AFT B2	1.5	99.50
AFT B1	1.5	98.56

6. 前处理方法摸索过程

根据《NYT 2071-2011 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定液相色谱-串联质谱法》最初选择乙腈:水=84:16 作为黄曲霉毒素的提取液,发现 AFT M1、AFT G2 的回收率很差,都在 20% 左右 (AFT G1、AFT B2、AFT B1 回收率比较好,接近 100%),怀疑是免疫亲和柱上样之前的有机相含量过高原因引起的 (水稀释 5 倍),之后连续使用水稀释 10 倍、15 倍、25 倍,AFT M1、AFT G2 的回收率依然没有改进。而且在过玻璃纤维滤纸的过程中,连续过了 4 遍玻璃纤维滤纸,液体依然没有彻底澄清。

根据《GBT 食品中黄曲霉毒素的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法》使用甲醇:水=7:3 作为黄曲霉毒素的提取液,水稀释提取液 10 倍后进免疫亲和柱,AFT M1、AFT G2 的回收率有所提高 (70~80%),之后将稀释倍数变成 15 倍后,回收率升高到 80% 以上。

相比《AN_C_LC-21 双三元柱后碘衍生测定芝麻中的 5 种黄曲霉毒素》中 AFT M1、AFT G2 的回收率接近 100%,初步认为是饲料中基质干扰的问题,导致免疫亲和柱回收率降低。在实验过程中还发现,在最终的浓缩过程中,如果浓缩体积大于 0.2 mL,使用流动相定容至 1 mL 时,会出现强烈的溶剂效应,如图 6 所示,当浓缩体积小于 0.2 mL 时,使用流动相定容至 1 mL 时干扰消除。

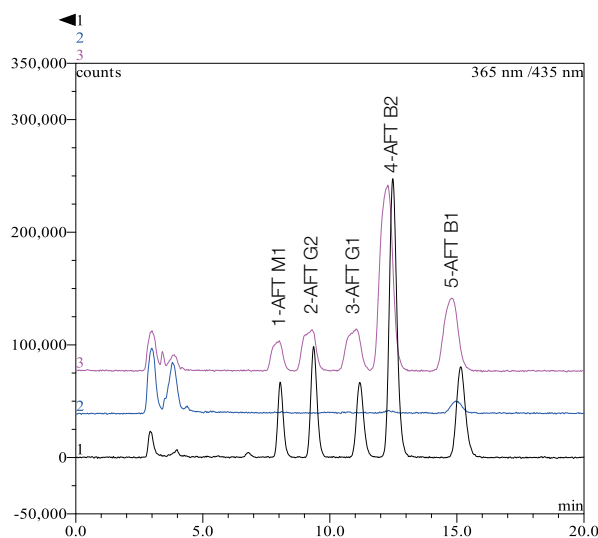


图 6. 溶剂效应谱图

(其中 1、2、3 分别代表标准品、样品、样品加标)

饲料中赭曲霉毒素 A 的测定

1. 引言

赭曲霉毒素是由真菌产生的一组结构类似的有毒的次级代谢产物，主要危害人和动物的肾脏，有 A、B、C、D 四种化合物，其中毒性最大、分布最广、对农作物的污染最严重、与人类健康关系最密切的是赭曲霉毒素 A。我国饲料中常见的检测浓度和 GB 13078-2006《饲料卫生标准 赭曲霉毒素 A 的允许量》中规定了配合饲料、玉米中赭曲霉毒素 A 允许量不能大于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2. 测试用对照品

使用流动相将 1 mg/L 的赭曲霉毒素 A 标准溶液依次稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的线性标准溶液。

3. 样品前处理

提取液：甲醇：水 =8: 2。

PBS 溶液：精确称取 8 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，溶解于 990 mL 水中，用浓盐酸调节 PH=7，用水稀释至 1L。

清洗液缓冲：精确称取 25 g 氯化钠、5 g 碳酸氢钠溶于水，加入 0.1 mL 吐温 -20，用水稀释至 1 L。

精确称取 10 g 饲料样品加入到 50 mL 离心管中，加入 20 mL 提取液，加入 0.5 g 氯化钠，振摇后涡旋 3 min，超声 20 min，中间振摇 3 次，10000 r/min 离心 5min 后取上清液。精确量取 2 mL 上清液于 10 mL 容量瓶中，加入 PBS 溶液至刻度，摇匀，玻璃滤纸过滤（如果不澄清可过滤两次）。精确量取过滤后的提取液 5 mL，以 1 滴每秒流速流过免疫亲和柱（PriboFast® 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱），然后 2~4 mL 空气排空，10 mL 清洗缓冲液、10 mL 水依次淋洗免疫亲和柱，弃去淋洗液，抽干小柱。1.5 mL 甲醇洗脱，45℃ 下氮吹 <0.2 mL 后，用流动相定容至 0.5 mL，供检测。

4. 色谱条件

色谱柱	Synchronis C18, 5 μm 4.6 \times 150 mm, P/N: 97105-154630
柱温	30℃
流动相	乙腈：水：冰醋酸 =48: 51: 1
流速	1.0 mL/min
进样量	20 μL
检测器	FLD, Ex: 333nm; Em: 460nm

5. 结果与讨论

5.1 线性

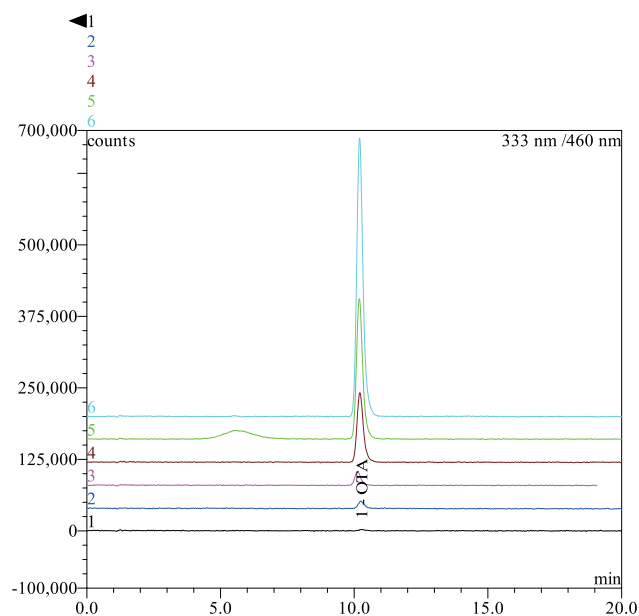


图 1. 线性叠加谱图

（其中 1、2、3、4、5 分别代表 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 OTA 标准溶液）

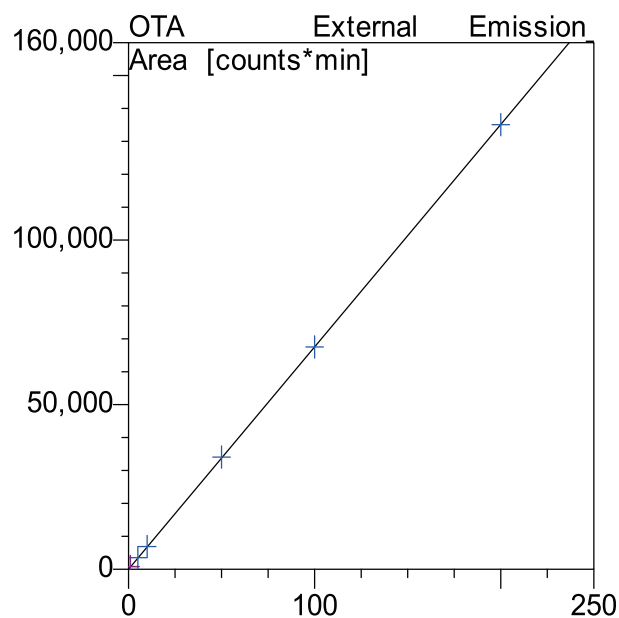


图 2. OTA 标准曲线图

表 1. 线性数据

Peak Name	Retention Time (min)	Cal.Type	Points	Offset (C0)	Slope (C1)	Curve (C2)	Corr.Coeff. %
OTA	10.31	Lin	6	0.000	675.679	0.000	100.000

5.2 检出限、定量限

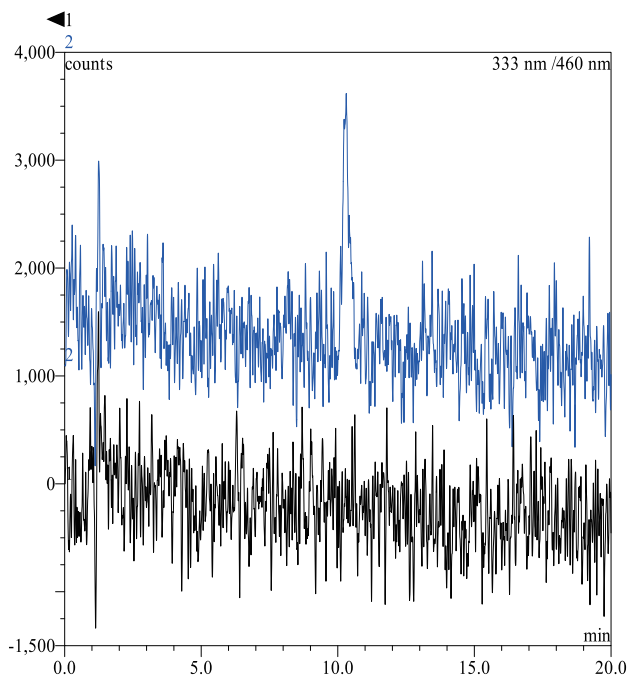


图 3. 检出限附近 (1 µg/L OTA) 谱图与空白叠加谱图 (其中 1、2 分别代表空白、检出限附近 (1 µg/L OTA) 谱图)

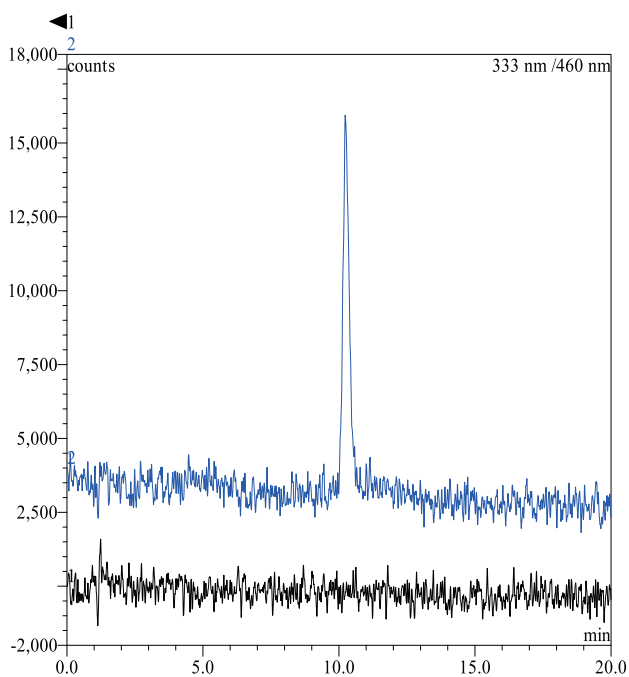


图 4. 定量限附近 (5 µg/L OTA) 谱图与空白叠加谱图 (其中 1、2 分别代表空白、定量限附近 (5 µg/L OTA) 谱图)

表 2. 检测限和定量限数据

Peak Name	Ret.Time (min)	LOD (S/N=3) (µg/kg)	LOQ (S/N=10) (µg/kg)
OTA	10.31	0.81	2.7

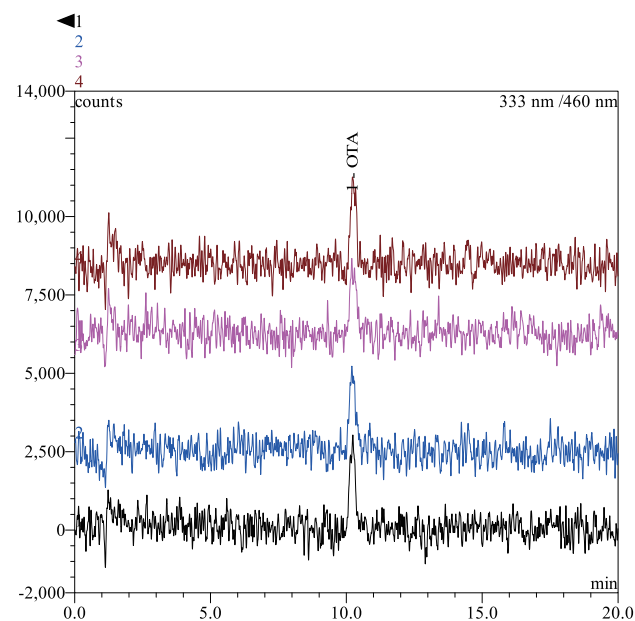


图 5. 检测限附近 (1 µg/L OTA) 重复性叠加谱图

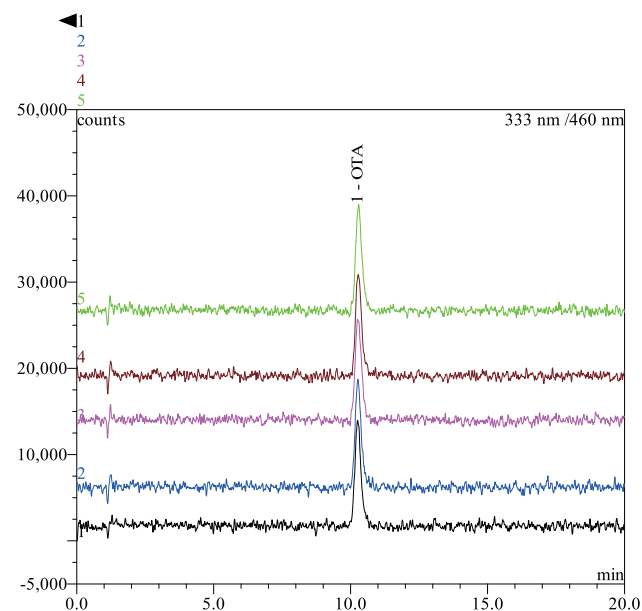


图 6. 定量限附近 (5 µg/L OTA) 重复性叠加谱图

表 3. 检出限、定量限重复性数据

Peak Name	1 µg/L OTA RSD (%)	5 µg/L OTA RSD (%)
OTA	1.986	1.871

5.3 各种饲料回收率

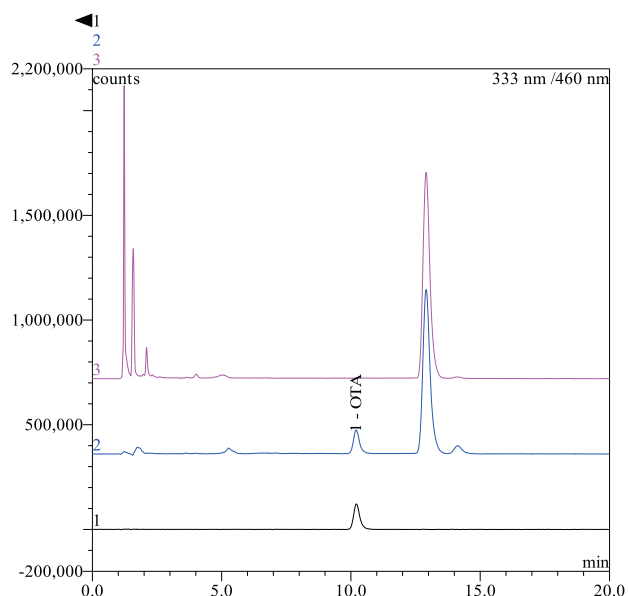


图 7. 鸡肉预混合饲料加标结果

(其中 1、2、3 分别为 50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准品、鸡肉预混合饲料样品加标 50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA、鸡肉预混合饲料样品)

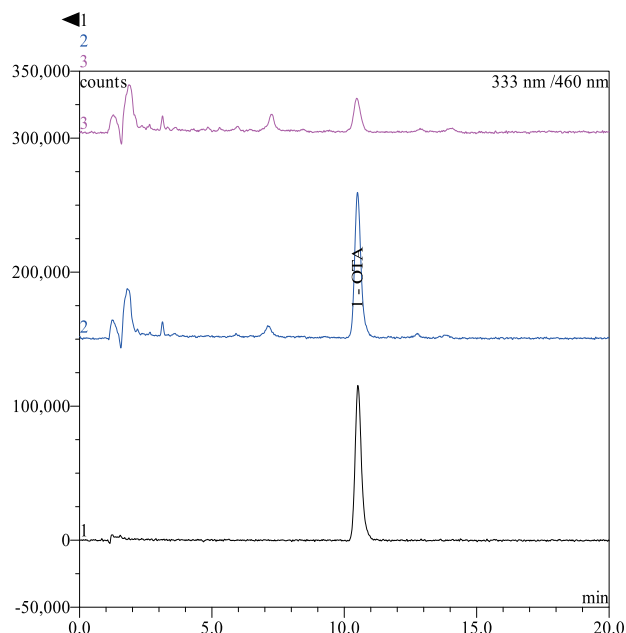


图 9. 浓缩饲料加标结果

(其中 1、2、3 分别为 50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准品、浓缩饲料样品加标 50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA、浓缩饲料样品)

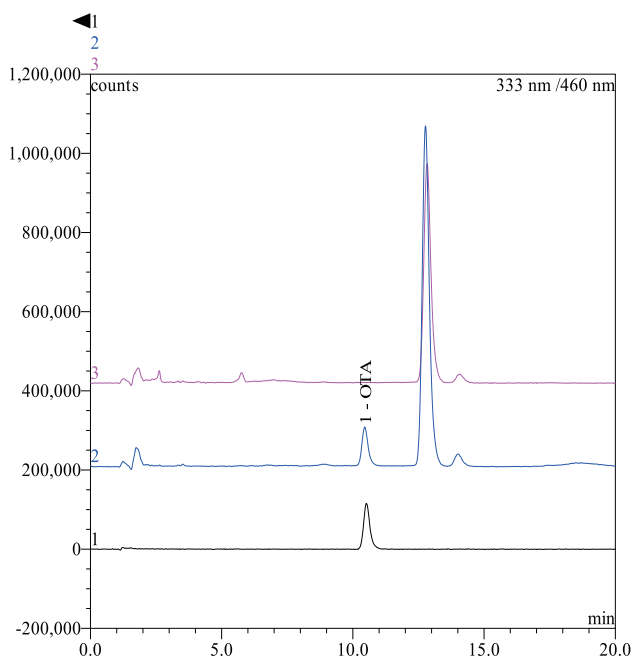


图 8. 猪前期饲料加标结果

(其中 1、2、3 分别为 50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA 标准品、猪前期饲料样品加标 50 $\mu\text{g/L}$ 的 OTA、猪前期饲料样品)

表 4. 回收率数据

名称	实际样品中 OTA 含量 ($\mu\text{g/L}$)	加标量 ($\mu\text{g/L}$)	加标后得到的 OTA 含量 ($\mu\text{g/L}$)	加标回收率 (%)
鸡预混合饲料	0	50	46.71	93.42
猪前期饲料	0	50	40.70	81.4
浓缩饲料	9.46	50	46.01	73.10

6. 前处理方法摸索过程

参考《GB 13078.2-2006 饲料卫生标准 饲料中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的允许量》、《GBT 23502-2009 食品中赭曲霉毒素 A 的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法》及《GBT 25220-2010 粮油检验 粮食中赭曲霉毒素 A 的测定 高效液相色谱法和荧光光度法》选择甲醇：水 =8: 2 作为提取液，北京泰乐琪的 PriboFast® 赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱作为前处理柱进行液相荧光检测饲料中的赭曲霉毒素 A 含量，方法结果显示检测限达到 0.81 $\mu\text{g/kg}$ ，小于 GBT 25220-2010 规定的 1 $\mu\text{g/kg}$ ，回收率也在 GBT 25220-2010 规定的 70~100 % 之内。本方法适合鸡用预混合饲料、猪前期饲料及浓缩饲料。

经过多次实验发现，对于猪预混合饲料，回收率只能达到 52 % 左右，所以本方法不适用猪预混合饲料。

饲料中玉米赤霉烯酮的测定

1. 引言

玉米赤霉烯酮是一种具有强烈致畸作用的生殖系统毒素，会导致家畜生长速度下降、免疫抑制、繁殖障碍等后果，从而给畜牧业带来严重威胁。由于玉米赤霉烯酮的危害性和污染普遍性，GB 13078.2-2006《饲料卫生标准 饲料中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮》中已经规定了饲料中玉米赤霉烯酮的最高限量不得超过 0.5 mg/kg，因此对玉米赤霉烯酮进行监测，对于畜牧业的健康发展具有非常重要的意义。

2. 测试用对照品

液相 - 荧光方法：使用流动相将 100.4 µg/mL 的玉米赤霉烯酮（ZEN）标准溶液依次稀释成 100 µg/L、250 µg/L、500 µg/L、1250 µg/L、5000 µg/L 的 ZEN 线性标准溶液。

3. 样品前处理

提取液：乙腈：水 =80: 20。

PBS 浓缩液：精确称取 12 g 氯化钠，4.53 g 十二水合磷酸氢二钠，0.3 g 磷酸二氢钾及 0.3 g 氯化钾，放置于 200 mL 的烧杯内，加入 140 mL 去离子水溶解，用氢氧化钠溶液或者盐酸溶液调节 PH 值至 7.0，用去离子水定容至 150mL。

PBS 溶液：用去离子水将 PBS 浓缩液按 1:9 体积进行稀释。

提取：精确称取 40 g 样品，加入 10 g 氯化钠及 250 mL 提取液中，涡旋 2 min 后高速匀质 2 min，离心取上清液 10 mL，加入 40 mL PBS 溶液稀释，用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清，备用。

净化：精确移取 18.75 mL 上述提取液置于玉米赤霉烯酮免疫亲和柱上，重力过柱，然后使用 10 mL PBS 溶液快速冲洗免疫亲和柱并抽干。使用 0.5 mL 甲醇浸泡免疫亲和柱 5 min 后，重力流出洗脱液，然后使用 1 mL 甲醇浸泡免疫亲和柱 5 min 后，重力流出洗脱液，合并两次洗脱液，0.22 µm 滤膜过滤后进样。

4. 色谱条件

色谱柱	Acclaim PALL, 3 µm 3.0 × 150mm, P/N: 063705												
柱温	35°C												
净化柱	PriboFast® 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱												
流动相	<table border="1"><thead><tr><th>Time (min)</th><th>乙腈 (%)</th><th>甲醇 (%)</th><th>水 (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>37.5</td><td>6.5</td><td>56</td></tr><tr><td>30</td><td>37.5</td><td>6.5</td><td>56</td></tr></tbody></table>	Time (min)	乙腈 (%)	甲醇 (%)	水 (%)	0	37.5	6.5	56	30	37.5	6.5	56
Time (min)	乙腈 (%)	甲醇 (%)	水 (%)										
0	37.5	6.5	56										
30	37.5	6.5	56										
流速	0.6 mL/min												
进样量	10 µL												
检测器	FLD, Ex: 274nm; Em: 440nm												

5. 结果与讨论

5.1 方法线性

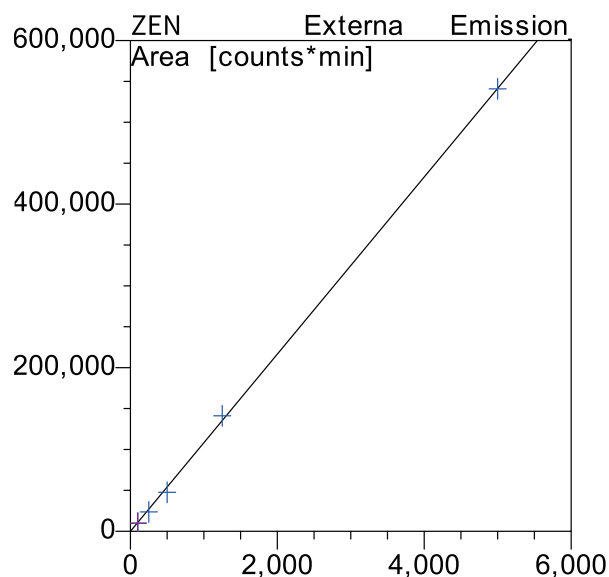


图 1. 液相色谱标准曲线图

表 1. 液相色谱线性

Retention time (min)	Cal. Range (µg/L)	Points	Cal.	Corr.Coeff. %
17.71	100~5000	5	Y=108.3x	99.98

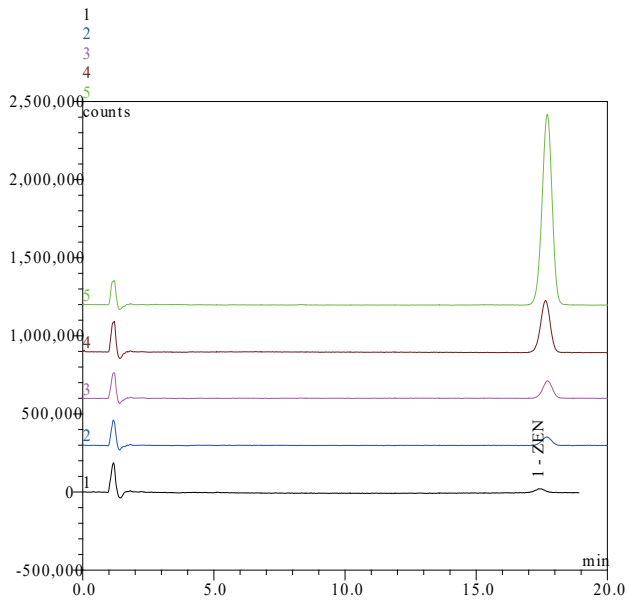


图 2. 液相色谱线性叠加谱图

(其中 1、2、3、4、5 分别代表 100 µg/L、250 µg/L、500 µg/L、1250 µg/L、5000 µg/L 的线性浓度)

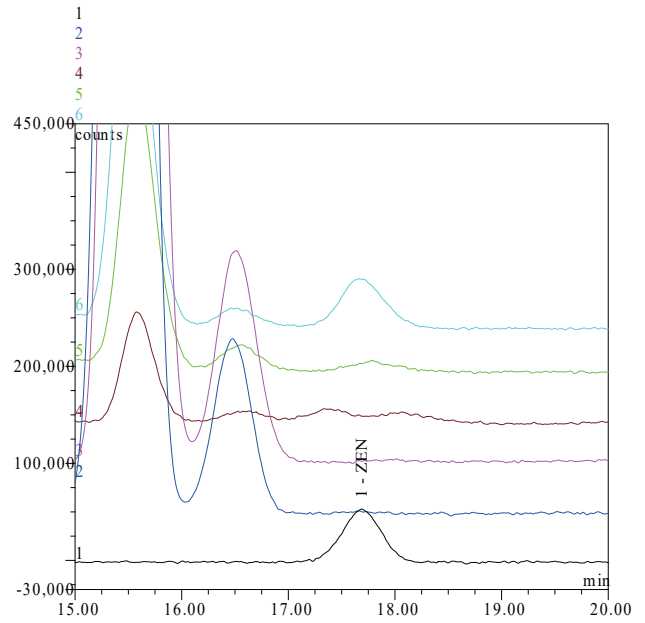


图 4. 回收率放大谱图

(其中 1-6 分别为 250ppb 的 ZEN 标准品、鸡用预混合饲料、猪前期饲料、猪用预混合饲料、猪浓缩饲料、加标 250ppb ZEN 的猪浓缩饲料)

5.2 方法回收率、定量限、检测限

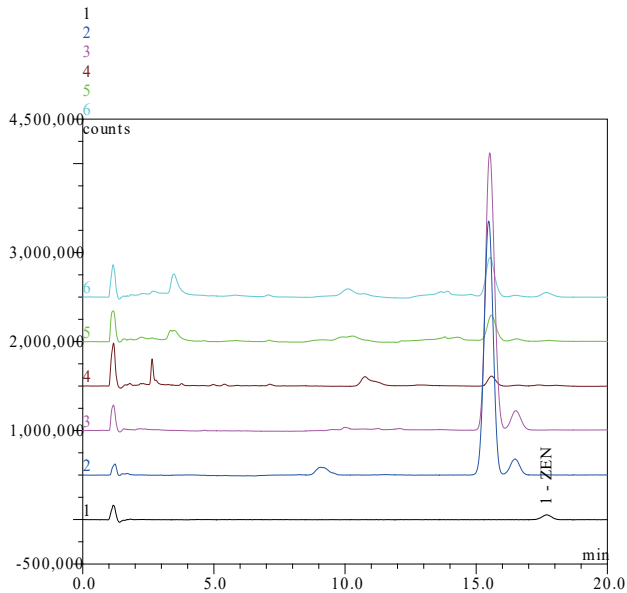


图 3. 回收率谱图

(其中 1-6 分别为 250ppb 的 ZEN 标准品、鸡用预混合饲料、猪前期饲料、猪用预混合饲料、猪浓缩饲料、加标 250ppb ZEN 的猪浓缩饲料)

5.3 方法精密度

Peak Name	浓度 (µg/L)	S/N	重复性 (%)
ZEN	25	6	3.31

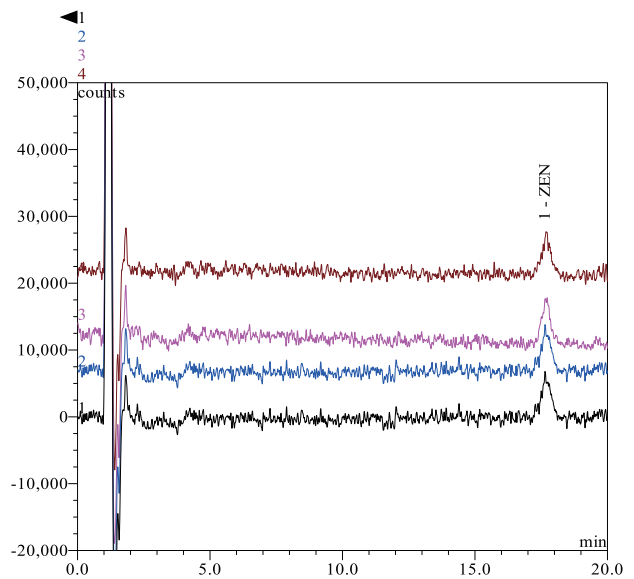


图 5. 检测限附近标准品 (25 µg/L) 重复性叠加谱图

表 2. 回收率数据

Peak Name	加标量 (µg/L)	饲料中检测量 (µg/L)	加标后饲料样品中检测量 (µg/L)	回收率 (%)	检测限 S/N=3 (µg/kg)	定量限 S/N=10 (µg/kg)
ZEN	207.6	37.3	223.5	89.69	12.5	41.7

6. 建议

本方法最初根据大量文献希望通过 M160 净化柱前处理后使用液相 - 荧光检测饲料中的玉米赤霉烯酮，通过实验发现，M160 对于饲料的前处理不是很理想，玉米赤霉烯酮附近有很多干扰峰，如图 6 所示，对液相色谱条件进行进一步的优化后，依然没有达到理想的分离结果。

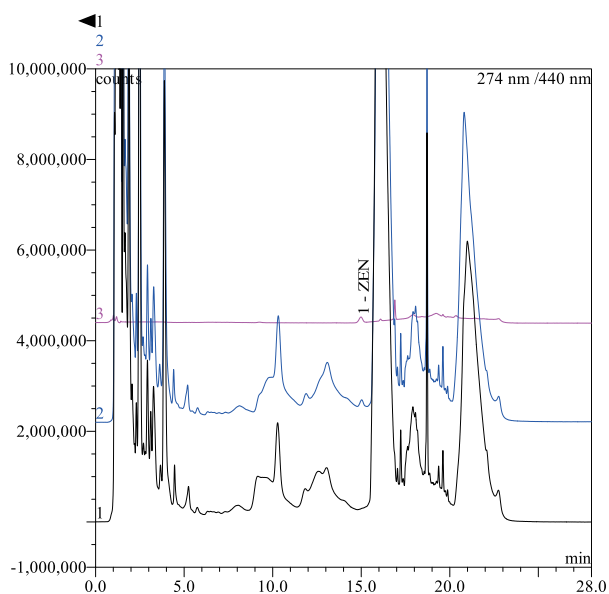


图 6. M160 净化柱后液相色谱叠加谱图
(其中 1-3 分别代表样品、加标 200 $\mu\text{g/L}$ ZEN 的样品、200 $\mu\text{g/L}$ ZEN 标准品)

参考《NYT 2071-2011 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素的测定液相色谱 - 串联质谱法》中使用质谱作为检测手段 (SRM)，能够得到很好的干扰排除，如图 7、8、9，但是如果按照该标准线性点溶在甲醇中做标准曲线去测定试剂浓缩饲料样品的时候，发现回收率只有不到 50%。之后通过 200 $\mu\text{g/L}$ 的标准品过 M160 柱前后得到的玉米赤霉烯酮峰面积做对比，发现 M160 的柱回收率有 86.27 %；通过将实际样品加标 200 $\mu\text{g/L}$ 得到的玉米赤霉烯酮峰面积与 200 $\mu\text{g/L}$ 的玉米赤霉烯酮标准品及不加标的实际样品进行对比，发现回收率只有 34.55 %。所以推断出加标回收率不到 50 % 是因为饲料基质对质谱检测的干扰形成的，所以通过在浓缩饲料的净化后浓缩液里加标来检测标准曲线来测定实际样品中玉米赤霉烯酮的含量，测得浓缩饲料中含有玉米赤霉烯酮 207.63 $\mu\text{g/kg}$ ，与液相方法中检测到的 2.34 $\mu\text{g/kg}$ 相差很大，认为是液相方法中基质干扰导致基线抬高，大量的玉米赤霉烯酮没有检测到引起的。

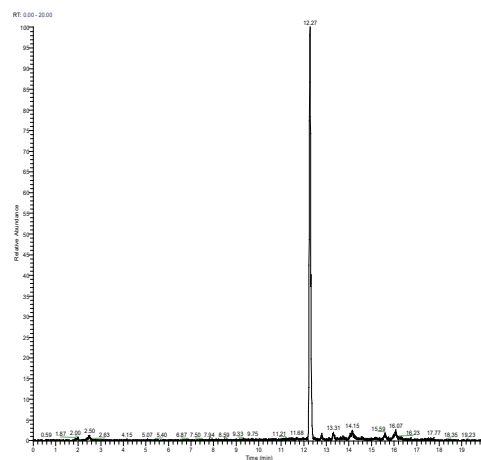


图 7. 质谱 - ZEN200 $\mu\text{g/L}$ 谱图

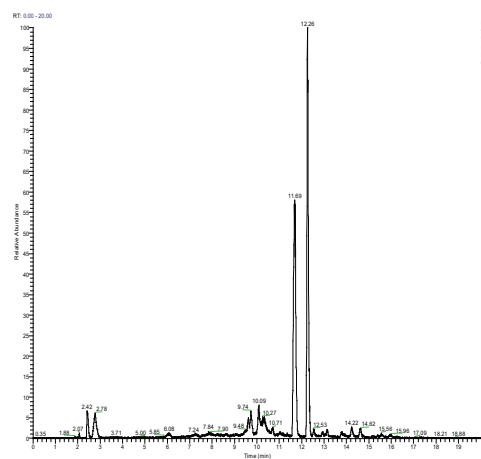


图 8. 质谱 - 浓缩饲料加标 ZEN200 $\mu\text{g/L}$ 谱图

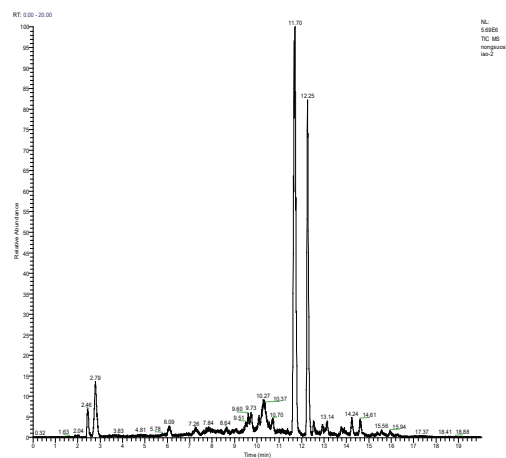


图 9. 质谱 - 浓缩饲料未加标谱图

最后根据《GBT 28716-2012 饲料中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和柱净化 - 高效液相色谱法》使用免疫亲和柱对饲料中的玉米赤霉烯酮进行检测。

所以建议，如果希望使用液相 - 荧光作为检测手段的时候，前处理方法选择选择性比较高的免疫亲和柱方法，如果选择 M160 净化柱作为前处理手段的时候，选择液质联用进行检测。

饲料中的伏马毒素 B1 和 B2 的测定

1. 引言

伏马毒素 (Fumonisin FB) 是一类真菌毒素, 是由串珠镰孢、轮状镰孢、多育镰孢和其他一些镰孢菌种产生的次生代谢产物^[1], 是一类由不同的多氢醇和丙三羧酸组成的结构类似的双酯化合物, 包括一个由 20 个碳组成的脂肪链及通过二个酯键连接的亲水性侧链。自 1988 年南非与美国的研究人员首次从霉变的玉米中分离出伏马毒素 B1 (FB1) 以来, 到目前为止, 已经鉴定到的伏马毒素类似物有 28 种, 其中以 FB1 为主。

伏马毒素普遍存在于玉米、小麦、大米等粮食作物中, 对动物和人的健康有很大的潜在危害, 已被世界卫生组织列为 2B 类致癌物。伏马毒素主要损害动物的肝功能, 引起马脑白质软化症和猪肺水肿; 对人体健康也构成潜在威胁, 可能诱发食管癌、肝癌、胃癌等。

伏马毒素尤其是 FB1 对饲料污染的情况在世界范围内普遍存在, 其污染的饲料主要为以玉米为原料的饲料。目前, 饲料中伏马毒素的检测主要有酶联免疫法 (elisa)、高效液相色谱法, 液相色谱联用质谱法等。

本文参考我国农业部标准 NY/T 1970-2010, 采用超声提取, 强阴离子交换柱净化, 柱前 OPA 衍生, 高效液相色谱法联用荧光检测器分析饲料中的 FB1 和 FB2 两种伏马毒素, 取得良好的实验结果, 具有一定的参考意义。

2. 测试用对照品

使用 75% 甲醇溶液将 50 mg/L 的伏马毒素 B1 和 B2 的标准溶液依次稀释成 10 µg/L、20 µg/L、50 µg/L、100 µg/L、200 µg/L、500 µg/L、1000 µg/L 的线性标准溶液。

3 样品前处理

提取液: 甲醇: 水 =75:25。

OPA 衍生剂: 称取邻苯二甲醛 40 mg, 溶于 1 mL 甲醇, 加入 5 mL 50 mM 四硼酸钠溶液 (pH=9.5) 稀释, 再加入 50 µL 巯基乙酸, 混匀后备用, 避光 4℃ 保存一周。

提取: 精确称取 2 g 饲料样品加入到 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 提取液, 振荡后涡旋 3 min, 超声提取 5 min, 以 10000 r/min 离心 5 min, 移取上清液后同样步骤提取一次, 合并上清液, 调节 pH 至 6 ~ 7。

净化: 精确量取 2 mL 上清液至已活化的固相萃取小柱中 (Thermo Scientific HyperSep SAX, 货号: 60108-521,

500 mg/3 mL, 依次用甲醇 3 mL 和 75 % 甲醇 3 mL 淋洗活化), 依次用 3 mL 75% 甲醇溶液、3 mL 甲醇淋洗小柱, 抽至近干后用 10 mL 1% 乙酸甲醇洗脱, 收集洗脱液于 45℃ 下氮吹干, 残留物用 1 mL 50 % 乙腈溶液溶解, 待衍生检测。

OPA 衍生: 准确量取等体积的 OPA 衍生剂和样品溶液, 混匀, 涡旋震荡 30 s, 于 2 min 内进液相色谱分析。

4. 色谱条件

色谱柱	ThermoFisher Synchronis C18, 2.1*100mm, 1.7µm, S/N: 0116014X6, P/N:97102-102130																		
柱温	35℃																		
流动相	A: 甲醇; B: 0.1M 甲酸铵																		
	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>A (%)</th><th>B (%)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>4.5</td><td>85</td><td>15</td></tr><tr><td>9.0</td><td>85</td><td>15</td></tr><tr><td>9.5</td><td>70</td><td>30</td></tr><tr><td>13.5</td><td>70</td><td>30</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	A (%)	B (%)	0	70	30	4.5	85	15	9.0	85	15	9.5	70	30	13.5	70	30
时间 (min)	A (%)	B (%)																	
0	70	30																	
4.5	85	15																	
9.0	85	15																	
9.5	70	30																	
13.5	70	30																	
流速	0.25 mL/min																		
进样量	10 µL																		
固相萃取小柱	HyperSep SAX (500mg/3mL, P/N 60108-521)																		
检测器	FLD, Ex: 335nm; Em: 440nm																		

5 结果与讨论

5.1 标准品测试图谱

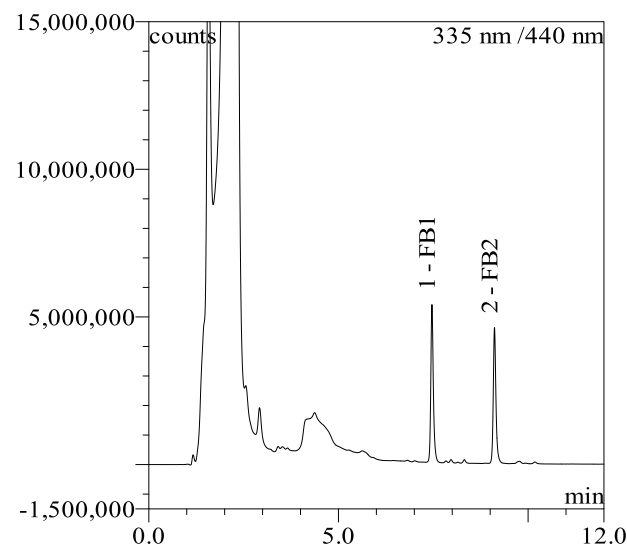


图 1. 标准品分析谱图 (20 µg/L)

5.2 方法精密度

取混合标准品溶液，衍生后 3 min 内进样分析，重复 5 次，计算峰积的 RSD，结果 FB1 和 FB2 的 RSD 分别为 1.793、2.470。

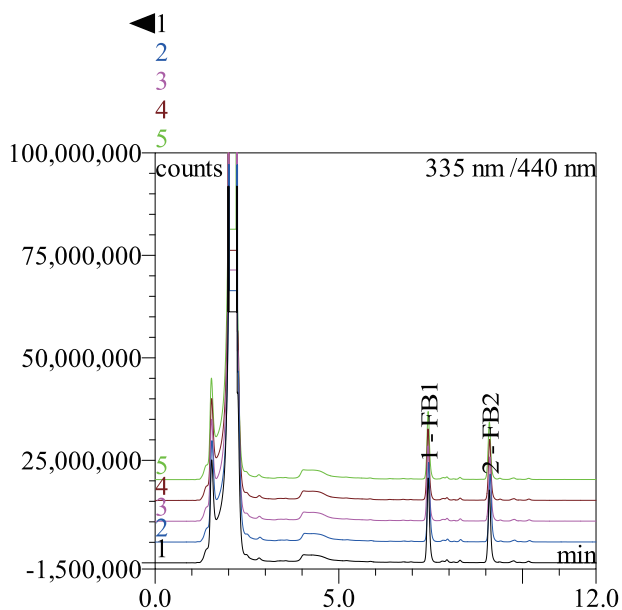


图 2. 重复性谱图 (n=5)

5.3 方法线性

取系列浓度标准品溶液，进样 10 μL 。以峰面积为纵坐标，浓度为横坐标，绘制标准曲线，考察相关系数。结果见表 1 和图 3、图 4。

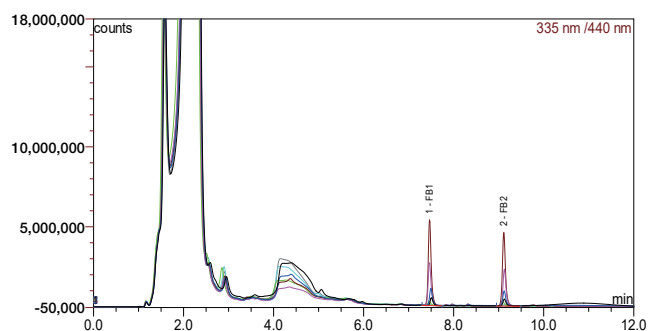


图 3. 各浓度标准品叠加谱图

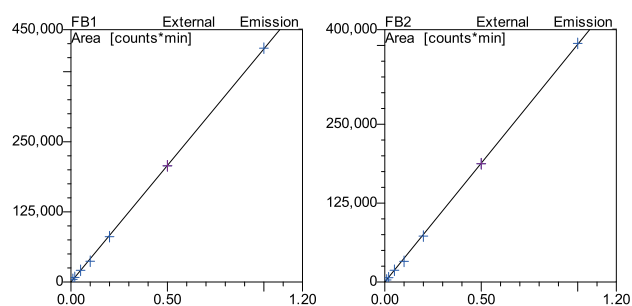


图 4. 标准曲线

表 1. 线性数据

No.	Ret.Time (min)	Peak Name	Cal.Type	Point	Offset (C0)	Slope (C1)	Range ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Corr.Coeff %
1	7.4	FB1	LOff	7	-1439	417811	(0.01~1)	99.98
2	9.1	FB2	LOff	7	-2017	379636	(0.01~1)	99.98

5.4 方法检出限、定量限

以信噪比为 10:1，测得 FB1 和 FB2 的最低定量限检测浓度约为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、以信噪比为 3:1，测得 FB1 和 FB2 的最低检测限浓度约为 0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

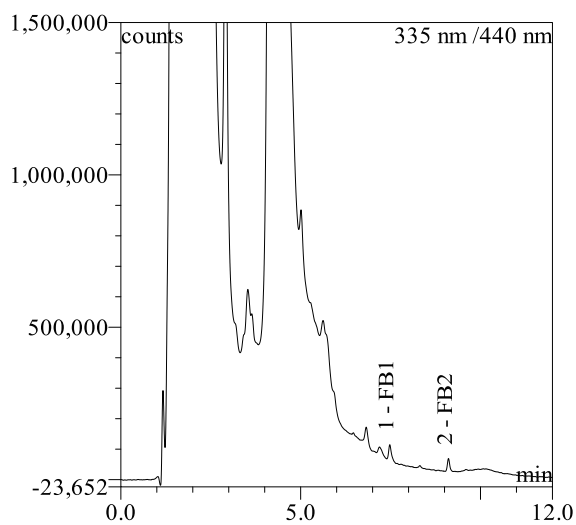


图 5. 定量限附近 (0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 谱图

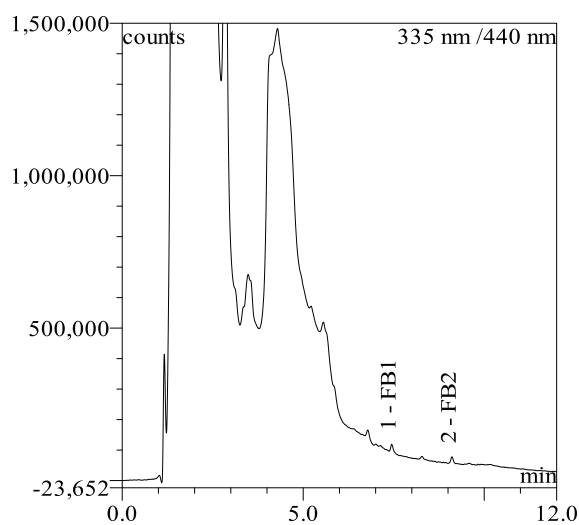


图 6. 检出限附近 (0.005 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 谱图

5.5 方法回收率及实际样品测定结果

取饲料样品,加入一定量的伏马毒素标准品,按照样品前处理方法制备成供试品溶液,测定图谱见图7,测定结果见表2。

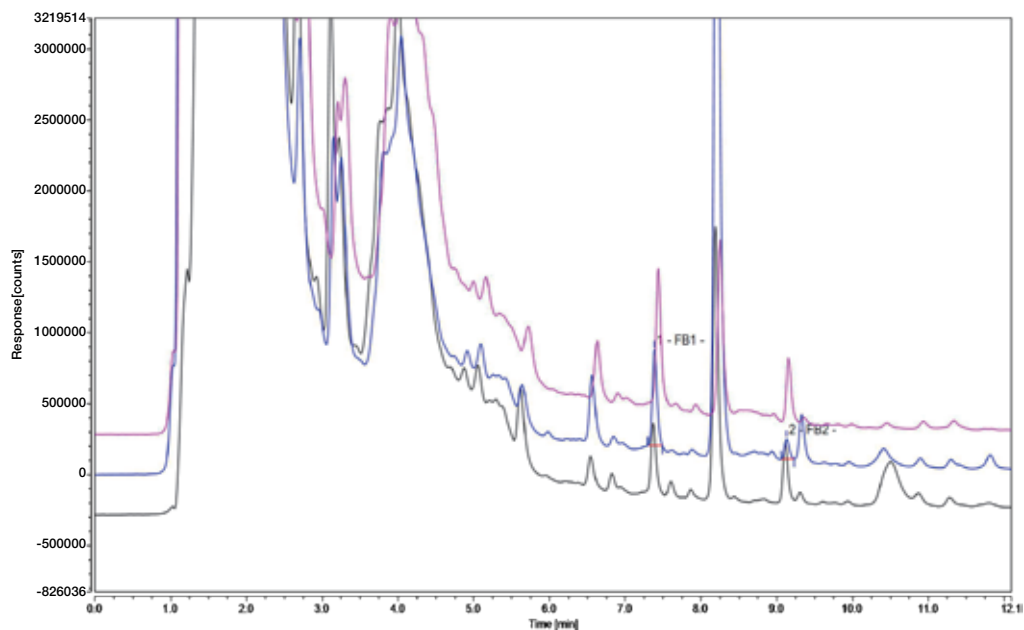


图 7. 空白加标、样品、样品加标图谱

表 2. 回收率数据

名称	实际样品含量 (μg/g)	加标量 (μg/g)	测得量 (μg/g)	加标回收率 (%)
空白 1	0	1	0.93	93.3
浓缩饲料 1	1.23	1	1.83	82.1
空白 2	0	1	0.84	84.0
浓缩饲料 2	0.32	1	0.94	71.2

6. 建议

参考《NYT 1970-2010 饲料中伏马毒素的测定》、《GBT 25228-2010 粮油检验 玉米及其制品中伏马毒素含量测定 免疫亲和柱净化高效液相色谱法和荧光光度法》，选择了 NYT 1970-2010 的提取条件，即以甲醇:水=75:25 作为提取液；另外，考虑到免疫亲和柱价格较贵，最终选取以强阴离子交换固相萃取柱净化。结果显示：方法最低检测限为 0.025 mg/kg，最低定量限为 0.05 mg/kg，与标准相符。回收率在 70~100 % 之间，符合标准的规定。

NYT 1970-2010 标准采用甲醇:0.1 mol/L 磷酸二氢钠 (pH=3.3) = 77:23 作为流动相，在实际实验中如下问题：1，FB1 的出峰时间较早，而 OPA 的衍生试剂的峰很大很宽，因此 FB1 的峰会衍生试剂的峰干扰；2，某些饲料的基质比较复杂，等度洗脱无法将所以杂质一次性洗脱出来，未洗脱的杂质可能会对下一次进样产生干扰。综合考虑，参考文献方法^[1]，最终确定了以甲醇-0.1 mol/L 的甲酸铵 (pH=3.3) 作为流动相，梯度洗脱。解决了如上所述的干扰峰问题。

采用 OPA 试剂衍生测定伏马毒素的含量，OPA 试剂与伏马毒素生成的衍生产物不稳定，需要衍生后 2 min 之内立即进样分析，以确保结果的重现性。

7. 参考文献

[1] 王军淋, 胡玲玲, 蔡增轩, 任一平, 超高压液相色谱法同时检测玉米中的伏马毒素 B1、B2、B3. 食品安全质量检测学报, 2013, 4 (10) 215-23.

饲料中呕吐毒素 (DON), 3-DON, 15-DON 的测定

1. 引言

呕吐毒素 (vomitoxin), 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON), 化学名为 3 α , 7 α , 15-三羟基草镰孢菌-9-烯-8-酮, 属单端孢霉烯族化合物。由于它可以引起猪的呕吐而得名^[1,2]。对人体有一定危害作用, 欧盟分类标准为三级致癌物。欧盟要求呕吐毒素要小于 1.0 mg/kg; 中国饲料要求低于 1 mg/kg^[3-5]。DON 的污染常出现于小麦、大麦、玉米和饲料中, 因此绝大部分 DON 检测方法是针对这些物质, 而分析谷物及饲料中的 DON 并非易事, 许多因素必须给以良好控制。日常检测的 3 种毒素是脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-DON) 和 15-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-DON)。例如要从大量的原始材料中抽取适当的样品, 适当的储备、处理以及恰当地从样品中抽小样。原始材料可能存在的不均一性和在储备、分装过程中可能出现的污染物使分析进一步复杂化; 另一方面, 分析过程中需要估计精确度、精密性、最低检出限以确保检测得出的数据能具有代表性, 尽可能把分析错误减到最小。目前呕吐毒素的分析测定一般采用薄层色谱法 (TLC)、酶联吸附免疫法 (ELISA) 和高效液相色谱法 (HPLC)。其中 TLC 法繁琐费时, 且灵敏度、特异性较差, 提取过程中所需有机溶剂品种多且量大, 易污染环境, 对人体有较大危害。而 ELISA 法测定结果受试剂盒差异、实验温度、仪器灵敏度等条件影响较大, 重复性差, 假阳性率高, 难以达到相关技术要求。HPLC 法检测灵敏度高、重复性好、操作简便、快速灵敏, 目前已作为粮谷中呕吐毒素的最常用测定方法。

2. 测试用对照品

DON, 3-DON, 15-DON 标准曲线: 移取 DON, 3-DON, 15-DON 标准溶液, 用去离子水逐级稀释, 0.05、0.25、0.5、1、2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3-DON&15-DON), 0.01、0.05、0.1、0.2、0.5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (DON) 的系列混合标准溶液。

3. 样品前处理

选取市售的 3 种饲料做为样品, 参考称取样品 1 g, 于 10 mL 离心管中, 加水 5 mL 振荡 10 min, 超声提取 20 min, 以 12 000 r/min 离心 15min, 取上清液过 0.45 μm 滤膜过滤, 取 0.5 mL 与 0.5 mL 乙醇混合, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱 30 min, 氮气吹干, 2 mL 水复溶。1 mL 甲醇活化 SPE 柱, 上样 2 mL, 1 mL 水洗脱, 空气流干 10 min, 1 mL 乙酸乙酯洗脱, 氮气吹干, 1 mL 水复溶, 过 0.45 μm 滤膜过滤供测定。

4. 色谱条件

分析柱	Synchronis 250 \times 4.6 mm, 5 μm , PN 97105-254630
流动相	1 mM 磷酸水 : 乙腈 (90:10)
流速	1.0 mL/min
柱温	30 $^{\circ}\text{C}$
检测器	UV: 224 nm
进样量	20 μL

5. 样品分析图谱

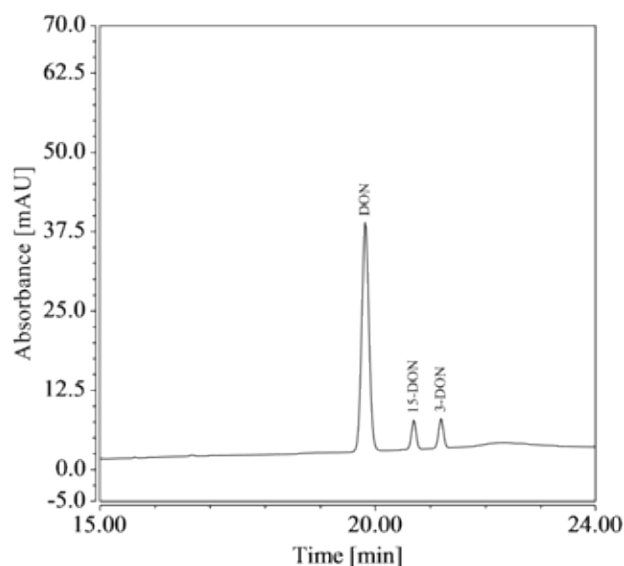


图 1. DON, 3-DON, 15-DON 标准溶液 UV 色谱图

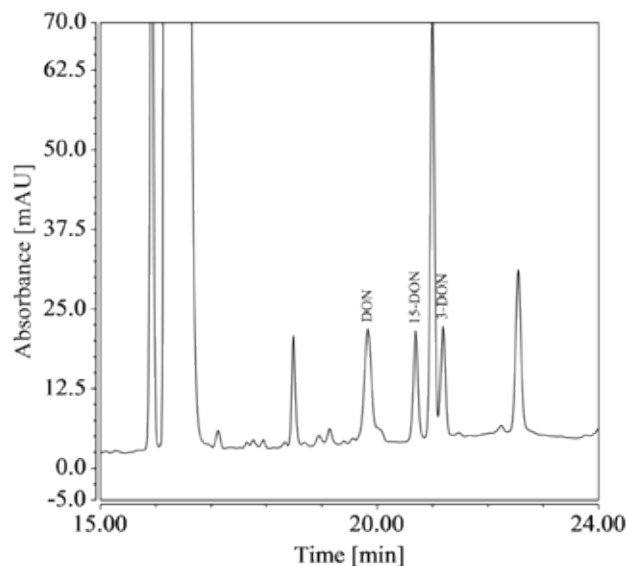


图 2. 样品加标色谱图

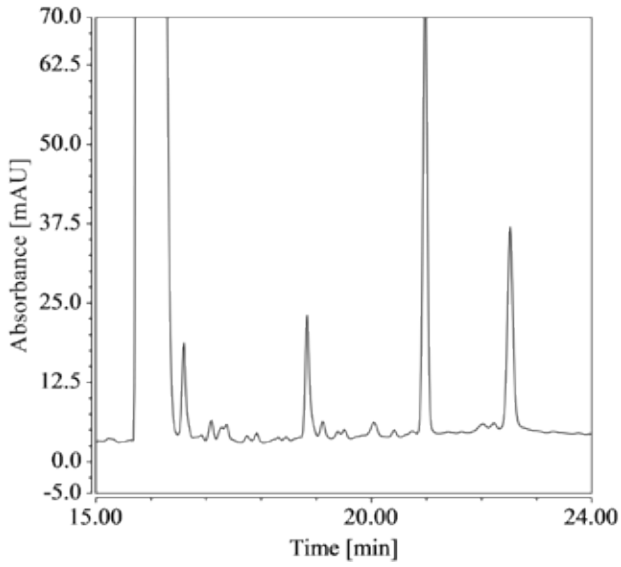


图 3. 样品色谱图

6. 结果与讨论

6.1 方法线性、检出限

由低浓度至高浓度依次进样检测，以质量浓度与峰面积作标准曲线线性回归。结果表明，DON 在 0.01-1 $\mu\text{g/mL}$ ，3-DON&15-DON 在 0.05-5 $\mu\text{g/mL}$ 范围内显良好线性关系 ($r^2 > 0.999$)。通过溶液逐步稀释法，测得最低定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ，检出限为 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 。外标法定量。标准曲线如下：

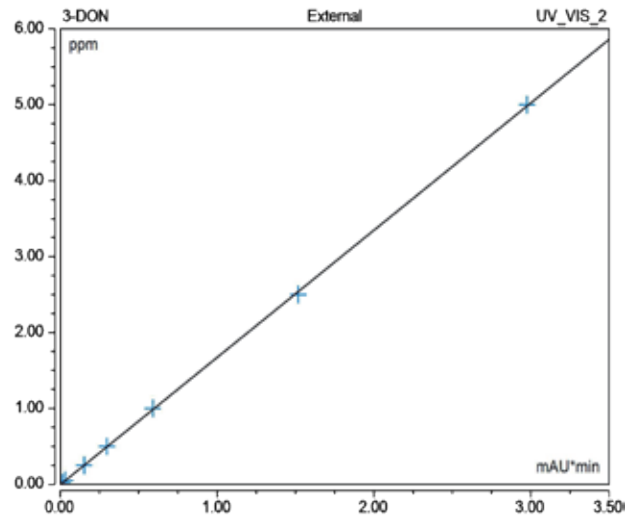
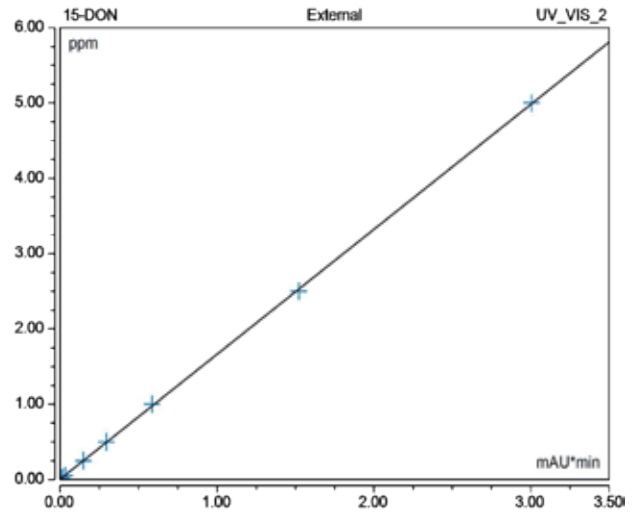


图 4. DON, 3-DON, 15-DON 标准曲线

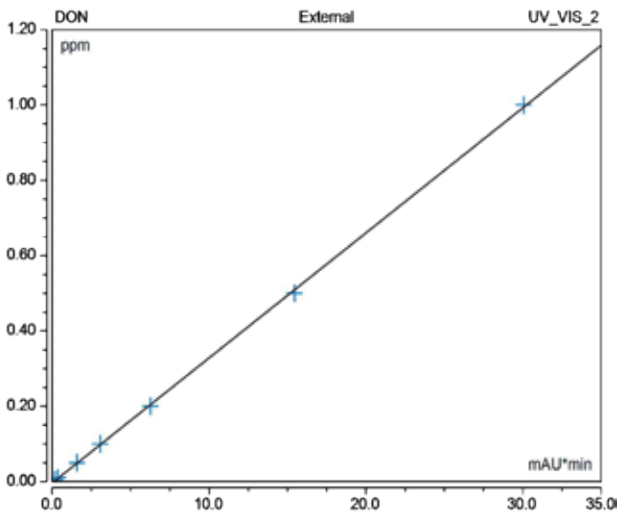


表 2. DON, 3-DON, 15-DON 标准曲线方程

Ret.Time (min)	Peak Name	Cal.Type	Coeff.of Determination	C0 (Offset)	C1 (Slope)
19.813	DON	Lin, WithOffset	0.99981	-0.0036	0.0332
20.700	15-DON	Lin, WithOffset	0.99992	0.0066	1.6584
21.193	3-DON	Lin, WithOffset	0.99990	-0.0041	1.6761

6.2 方法回收率和精密度

分别配置低浓度 (DON 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 3-DON&15-DON 0.16 $\mu\text{g/mL}$), 中浓度 (DON 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 3-DON&15-DON 0.8 $\mu\text{g/mL}$), 高浓度 (DON 0.8 $\mu\text{g/mL}$, 3-DON&15-DON 4.0 $\mu\text{g/mL}$) 的标准品溶液, 连续 7 针进样。添加一定浓度的标准品, 精密度数据结果见表 3。在样品中加入 (DON 0.6 μg , 3-DON&15-DON 3 μg), 处理后经测量得 DON, 3-DON, 15-DON 的回收率分别为 80.04%, 86.72%, 90.19%。

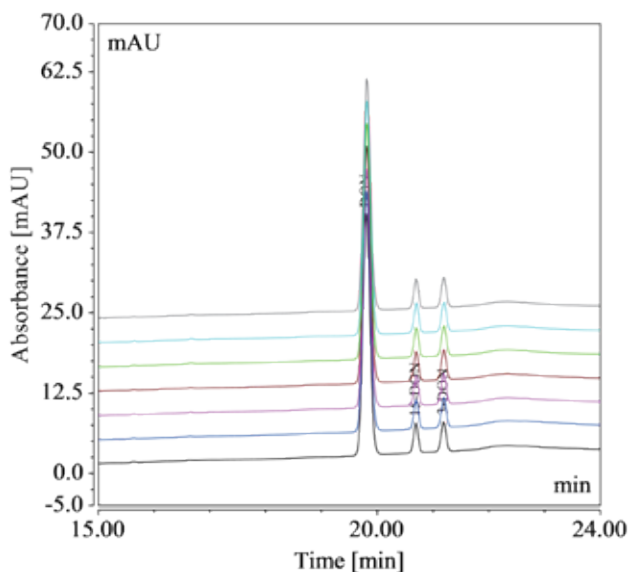


图 4. 连续 7 针精密度

表 3. DON, 3-DON, 15-DON 精密度的结果

浓度范围	RSD (%)		
	高浓度	中浓度	低浓度
DON	1.85	1.44	1.26
3-DON	0.67	0.28	1.87
15-DON	0.30	0.15	1.15

6.3 实际样品测定

按上述方法测定了 3 种饲料样品中 DON, 3-DON, 15-DON 的残留量, 结果样品均未检出 DON, 3-DON, 15-DON。

6.4 讨论

本实验采用国家标准测定饲料中 DON, 3-DON, 15-DON, 各项方法学数据均满足测定要求, 是饲料中 DON, 3-DON, 15-DON 测定的快捷有效方法。

7. 参考文献

- [1] 孟昭赫. 酵米面, 银耳等食品中椰酵假单菌及其毒素的污染调查 [J]. 卫生研究, 1993, 22 (2) :99-101.
- [2] Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The State-of-the art in the analysis of type-A and-B trichothecene mycotoxins in cereals. *Fresenius J Anal Chem.* 2001, 371:285-299.
- [3] ENGELHARDT G. Production of mycotoxins by *Fusarium* species isolated in Germany 1. Time course of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol, and zearalenone formation on solid substrates [J]. *Z Lebensm Unters Forsch*, 198 (6 182) : 123- 126.
- [4] 张鹏. 出入境粮谷中呕吐毒素检测方法的研究 [J]. *检验检疫科学*, 2003, 1 (32) : 8- 10.
- [5] Yang, D, Geng, Z.M., Yao, J.B., Zhang, X., Zhang, P.P., Ma, H.X., [J] Simultaneous determination of deoxynivalenol, and 15- and 3-acetyldeoxynivalenol in cereals by HPLC-UV detection. *World Mycotoxin Journal*, May 2013; 6 (2): 117-125.

赛默飞世尔科技

上海

上海市浦东新区新金桥路27号3,6,7号楼
邮编 201206
电话 021-68654588

成都

成都市临江西路1号川投大厦1406室
邮编 610041
电话 028-65545388*5300

南京

南京市中央路201号金茂广场南楼1103室
邮编 210000
电话 021-68654588*2901

北京

北京市东城区北三环东路36号环球贸易
中心C座7层/8层
邮编 100013
电话 010-87946888

沈阳

沈阳市沈河区惠工街10号卓越大厦3109室
邮编 110013
电话 024-31096388*3901

西安

西安市高新区科技路38号林凯国际大厦
1006-08单元
邮编 710075
电话 029-84500588*3801

广州

广州国际生物岛寰宇三路36、38号合景
星辉广场北塔204-206单元
邮编 510000
电话 020-82401600

武汉

武汉市高新四路22号58众创光谷产业园A座1楼2-5楼
邮编 430075
电话 027-59744988*5401

欲了解更多信息，请扫描二维码关注我们的微信公众账号与官方网站。

赛默飞世尔科技在全国有共14个商业办公室。本资料中的信息，说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。



赛默飞
官方微信



赛默飞
官方网站

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC