

董 飞,王淑芳,张 笑,等. 粒径及取样量对小麦中主要镰刀菌毒素定量检测的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(19):206-209.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.19.044

粒径及取样量对小麦中主要镰刀菌毒素定量检测的影响

董 飞,王淑芳,张 笑,徐剑宏,史建荣

[江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所/农业农村部农产品质量安全风险评估实验室(南京)/
农业农村部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室/省部共建国家重点实验室培育基地 -
江苏省食品质量安全重点实验室/江苏省现代粮食流通与安全协同创新中心,江苏南京 210014]

摘要:为进一步优化和完善小麦中主要镰刀菌毒素的固相萃取-高效液相色谱串联质谱检测法,探索了粒径和取样量对脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮检测的影响。结果表明,当粉碎粒径为 20 目时,脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量为 $1\,868 \pm 115 \mu\text{g/kg}$,除 10 目外,显著高于其他粒径和未粉碎样品;3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量分别为 $9 \pm 2 \mu\text{g/kg}$ 和 $13 \pm 2 \mu\text{g/kg}$,除 40 目外,显著高于其他粒径和未粉碎样品;玉米赤霉烯酮含量为 $590 \pm 15 \mu\text{g/kg}$,显著高于其他粒径和未粉碎样品。在样品充分混匀条件下,取样量对检测结果没有显著影响,但随着取样量的增加,精密度的提高。因此,采用本研究检测方法检测小麦中主要镰刀菌毒素时,样品应完全粉碎过 20 目筛;同时,可适当增加取样量,以提高检测结果的精密度。

关键词:小麦;固相萃取;高效液相色谱串联质谱;粒径;取样量;镰刀菌毒素;检测

中图分类号:S435.121.4⁺5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)19-0206-04

小麦赤霉病是由禾谷镰刀菌复合群引起的一种世界性真菌病害,不仅影响小麦产量,还会导致小麦中镰刀菌毒素严重污染,对人畜健康造成危害^[1-2]。脱氧雪腐镰刀菌烯(DON)及其乙酰化衍生物[3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3ADON),15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15ADON)]和玉米赤霉烯酮(ZEN)是我国小麦中最为常见的镰刀菌毒素^[1,3-5]。

目前,国内外报道最多的检测真菌毒素的前处理方法主要有免疫亲和柱法^[6-8]、多功能净化柱法^[3,9]和固相萃取法^[10-12],其中前两者价格昂贵,相比较而言,固相萃取法是一种可同时检测小麦中多种镰刀菌毒素的廉价高效的前处理方法。但长期以来,在采用该方法作为前处理方法时,国内外

研究学者比较重视样品的提取净化和仪器分析工作,而对样品制备的研究严重缺乏。研究表明,样品制备过程尤其是样品的粉碎粒径对检测结果的准确性有直接影响^[13-14]。此外,样品粉碎后,分析样品的取样量对分析误差也会产生影响^[13]。本研究在前人的检测方法的基础上,进一步明确粒径和取样量对定量检测结果的影响,对优化和完善小麦中主要镰刀菌毒素的固相萃取-高效液相色谱串联质谱检测方法具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

主要仪器有:高效液相色谱仪 20ADXR,日本岛津公司;质谱仪 AB6500,美国 AB 公司;旋风粉碎磨,杭州钱江仪器设备有限公司;固相萃取仪 Visiprep 24TM DL,美国 Supelco 公司;离心机 5810R,德国 Eppendorf 公司;氮吹仪 N-WVAPTM 112,美国 Organomation 公司;电子天平 YP3002,上海佑科仪器仪表有限公司;电子天平 BT125D,德国 Satorius 公司;氨基固相萃取柱,500 mg,6 mL,上海安谱科学仪器有限公司;0.22 μm 有机滤膜,天津市津腾实验设备有限公司。

收稿日期:2019-12-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31772118,31701748);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(17)1003]。

作者简介:董 飞(1985—),男,江苏南京人,硕士,助理研究员,主要从事农产品质量安全研究。Tel:(025)84392003;E-mail:feidong1985@126.com。

通信作者:史建荣,博士,研究员,主要从事农产品质量安全研究。Tel:(025)84392001;E-mail:jianrong63@126.com。

主要试剂有: DON、3ADON、15ADON、ZEN 标准品, 纯度 $\geq 99\%$, Romer 国际贸易(北京)有限公司; 乙腈和甲醇, 分析纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 甲醇, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 乙酸铵, 色谱纯, 美国 Tedia 公司; 试验用水为 Milli-Q 超纯水, 美国 Millipore 公司。

1.2 液相色谱条件

色谱柱为 Waters Atlantis® T-3 色谱柱 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m)。流动相: A 为水(含 5 mmol/L 乙酸铵), B 为甲醇。采用线性梯度洗脱, 0~2 min, 流动相中水相(A)比例由 75% 下降到 30%; 2~4 min, 流动相水相(A)比例由 30% 下降到

10%; 4~6 min, 保持流动相中水相(A)比例为 10%; 6~9 min, 流动相中水相(A)比例由 10% 上升至 75%; 10~15 min, 保持流动相中水相(A)比例为 75%。流速为 0.7 mL/min, 单次运行时间总共为 15 min。

1.3 质谱条件

离子化模式为电喷雾电离正离子模式(ESI^+), 检测方式为多反应监测(MRM), 离子源温度为 500 $^{\circ}C$, 驻留时间 100 ms, 雾化气压 34.5 kPa, 辅助气压 34.5 kPa, 喷雾电压 5 500 V, 碰撞室射出电压 6 V。4 种镰刀菌毒素的质谱参数见表 1。

表 1 4 种镰刀菌毒素的质谱条件参数

镰刀菌毒素	保留时间 (min)	母离子质荷比 m/z	特征离子质荷比 m/z	碰撞能量 (eV)
DON	4.49	297.2	203.1 [*] , 249.1	21, 16
3ADON	5.25	339.1	231.1 [*] , 203.2	17, 21
15ADON	5.25	339.1	321.1 [*] , 137.1	12, 23
ZEN	7.16	319.2	283.3 [*] , 187.1	17, 29

注: * 表示定量离子。

1.4 样品提取净化

样品的提取净化采用优化 Njumbé 的方法^[10], 将小麦粉碎至完全通过 20 目筛, 准确称取均质样品 5.0 g, 加入 4 倍样品质量体积(20 mL)的乙腈-水($V:V, 80:20$), 在 180 r/min 摇床上振荡 30 min, 3 200 r/min 离心 15 min 后取上清, 转移到新的容器中, 待净化。将氨基固相萃取柱连接在固相萃取仪上, 分别用 5 mL 甲醇和甲醇-水($V:V, 80:20$)活化。准确移取 5 mL 待净化的上清液加入固相萃取柱中, 以约 1 s/滴的流速通过固相萃取柱, 收集过柱液, 向固相萃取柱中加入 10 mL 甲醇-水($V:V, 80:20$)洗脱, 收集全部洗脱液, 合并过柱液和洗脱液于干净的玻璃试管中, 用氮气吹干, 向残留物中加入 1 mL 流动相溶液, 于涡旋混合器上振荡 1 min, 过 0.22 μ m 有机滤膜, 供高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)检测。

1.5 基质标准曲线的建立

按照 SN/T 3136—2012 和 GB 5009.111—2016 中的方法^[15-16]对从市场购买的小麦样品进行检测, 取未检出 DON、3ADON、15ADON、ZEN 的空白小麦样品, 粉碎至完全通过 20 目筛。准确称取 5.0 g 空白样品, 加入 50 mL 具塞三角瓶中, 采用“1.4”节的

方法提取净化, 将 DON、3ADON、15ADON、ZEN 标准品用上述空白基质稀释成混合标准溶液。

1.6 本研究方法的回收率测定

采用本研究建立的方法对添加 4 种镰刀菌毒素的小麦样品进行检测, 并测定回收率。分别在空白小麦样品中添加 4 种镰刀菌毒素, 使 DON 浓度分别为 10、20、100 μ g/kg; 3ADON 和 15ADON 浓度分别为 5、10、50 μ g/kg; ZEN 浓度分别为 3、6、30 μ g/kg。试验设 3 次重复。

1.7 数据分析

用 Microsoft Excel 16.0 软件处理数据, 用 SPSS (IBM) 19.0 软件进行数据统计分析。计算回收试验中 4 种镰刀菌毒素的回收率平均值和相对标准偏差(RSD); 计算不同粉碎粒径和取样量条件下 4 种镰刀菌毒素含量的平均值、RSD 及差异显著性等。

2 结果与分析

2.1 试验方法的线性范围与灵敏度

取空白小麦样品进行提取净化, 将 DON、3ADON、15ADON、ZEN 标准品用空白基质稀释成混合标准溶液, 其中, DON 系列标准工作液浓度为 10、30、120、600、1 200 μ g/kg; 3ADON 和 15ADON 系列

标准工作液浓度为 5、10、50、100、200 μg/kg;ZEN 系列标准工作液浓度为 3、6、12、30、60、120 μg/kg。以浓度为横坐标(*X*),峰面积为纵坐标(*Y*)作线性回归方程,根据 3 倍信噪比的峰响应值得到本研究方法的检出限,根据 10 倍信噪比的峰响应值得到线性范围的下限。结果显示,DON、3ADON、15ADON、ZEN 线性范围分别为 10~1200、5~200、5~200、3~120 μg/kg;基质标准曲线相关系数(*r*)分别为 0.999 9、0.999 7、0.999 8、0.999 9;检出限(LOD)分别为 5、2、2、1 μg/kg;定量限(LOQ)分别为 10、5、5、3 μg/kg。

2.2 试验方法的回收率

采用本研究方法对添加 4 种镰刀菌毒素的小麦样品进行检测,结果(表 2)表明,DON 的加标回收率为 87.5%~94.2%,*RSD* 为 5.4%~7.2%;3ADON 的加标回收率为 86.9%~93.2%,*RSD* 为 5.3%~6.8%;15ADON 的加标回收率为 88.4%~95.2%,*RSD* 为 4.8%~7.5%;ZEN 的加标回收率为 88.5%~96.6%,*RSD* 为 4.5%~5.8%。

表 2 4 种镰刀菌毒素不同添加水平的添加回收率			
镰刀菌毒素	添加量 (μg/kg)	回收率 (%)	<i>RSD</i> (%)
DON	10	94.2	7.2
	20	90.3	5.4
	100	87.5	6.1
3ADON	5	93.2	6.8
	10	89.2	5.9
	50	86.9	5.3
15ADON	5	95.2	7.5
	10	91.3	4.8
	50	88.4	5.2
ZEN	3	96.6	5.3
	6	92.3	5.8
	30	88.5	4.5

2.3 粒径对镰刀菌毒素检测结果的影响

按照 SN/T 3136—2012 和 GB 5009.111—2016 中的方法^[15-16]对 2016 年江苏省新收获小麦进行检测,筛选得到 DON、3ADON、15ADON、ZEN 含量分别为 1 950、12、14、610 μg/kg 的小麦样品。将筛选得到的小麦样品充分混匀,采用四分法混合缩分,分别粉碎至完全通过 10、20、40、60 目筛后待用,以未粉碎的小麦样品为对照,待检测小麦样品于 4℃保存。

采用“1.4”节中的方法对不同粒径和未粉碎小麦样品进行提取净化及 HPLC-MS/MS 检测,试验设 5 次重复,检测结果如表 3 所示。当粉碎粒径为 20 目时,DON 含量为 1 868±115 μg/kg,除与 10 目没有显著差异外,显著高于其他粒径和未粉碎样品;3ADON、15ADON 含量分别为(9±2)、(13±2) μg/kg,除与 40 目没有显著差异外,显著高于其他粒径和未粉碎样品;ZEN 含量为(590±15) μg/kg,显著高于其他粒径和未粉碎样品。总体而言,在检测小麦中 DON、3ADON、15ADON、ZEN 的含量时,应将小麦粉碎至完全通过 20 目筛。

表 3 不同粒径对 4 种镰刀菌毒素检测结果的影响				
粉碎粒径	含量(μg/kg)			
	DON	3ADON	15ADON	ZEN
未粉碎	321±89a	0a	0a	76±15a
10 目	1 758±79c	5±3b	7±2b	480±19b
20 目	1 868±115c	9±2c	13±2c	590±15d
40 目	1 620±76b	11±2c	10±2bc	490±14b
60 目	1 591±93b	6±2b	8±2b	520±13c

注:同一列中不同字母表示数据间有显著差异(*P*<0.05)。下同。

2.4 取样量对镰刀菌毒素检测结果的影响

取“2.3”节中完全粉碎通过 20 目筛的小麦样品,充分混合均匀,采用“1.4”节中的方法对不同取样量小麦样品进行提取净化及 HPLC-MS/MS 检测,试验设 5 次重复,比较取样量大小对 4 种镰刀菌毒素检测结果的影响,结果如表 4 所示。DON、3ADON、15ADON、ZEN 含量在不同取样量间没有显著差异;但是随着取样量的增加,样品重复之间的 *RSD* 呈下降趋势,精密度会得到提高,这一结果与前人研究结果^[13]相一致。因此,在样品充分混匀的情况下,可适当增加样品的取样量。

表 4 不同取样量大小对镰刀菌毒素检测结果的影响				
取样量 (g)	含量(μg/kg)			
	DON	3ADON	15ADON	ZEN
2	1 875±160a	9±3a	10±2a	598±71a
5	1 918±105a	11±2a	12±3a	601±61a
10	1 890±98a	10±2a	10±2a	586±77a
15	1 899±55a	10±2a	12±2a	594±48a
20	1 910±48a	9±2a	11±3a	583±34a
25	1 902±24a	9±3a	10±2a	574±25a
30	1 883±38a	11±2a	12±2a	593±24a
40	1 877±27a	10±2a	10±3a	595±25a

3 讨论

研究发现,采用固相萃取-高效液相色谱串联质谱法检测小麦中 DON、3ADON、15ADON、ZEN 含量时,样品粉碎粒径对 4 种镰刀菌毒素的定量检测有显著影响,应将小麦粉碎至完全通过 20 目筛。取样量对 4 种镰刀菌毒素的检测结果没有显著影响,但是对精密度会有影响;在条件允许的情况下,可适当提高取样量。目前,国际上对真菌毒素分析过程中的样品制备高度重视^[17],并呼吁制定统一的样品制备标准程序。但国内长期以来比较重视样品提取净化和仪器分析工作,对样品制备的研究比较缺乏,部分检测方法标准对样品粉碎粒径或取样量规定不够明确^[15-16,18]。因此,在制订检测方法标准时,应明确样品制备要求,引入具备一定功能的样品粉碎设备,进而逐步提高我国主粮产品中真菌毒素检测能力。

参考文献:

- [1] 史建荣,仇剑波,董飞,等. 小麦镰刀菌毒素及其发生风险研究进展[J]. 麦类作物学报,2016,36(2):129-135.
- [2] 史建荣,刘馨,仇剑波,等. 小麦中镰刀菌毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇污染现状与防控研究进展[J]. 中国农业科学,2014,47(18):3641-3654.
- [3] Dong F, Qiu J B, Xu J H, et al. Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu Province, China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 230: 58-63.
- [4] Ji F, Xu J H, Liu X, et al. Natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in wheat from Jiangsu Province, China[J]. Food Chemistry, 2014, 157: 393-397.
- [5] 马跃亭,吴琴燕,杨红福,等. 小麦籽粒脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)含量影响因素相关性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):223-228.
- [6] Wilcox J, Donnelly C, Leeman D, et al. The use of immunoaffinity columns connected in tandem for selective and cost-effective mycotoxin clean-up prior to multi-mycotoxin liquid chromatographic-tandem mass spectrometric analysis in food matrices[J]. Journal of Chromatography A, 2015, 1400: 91-97.
- [7] 牟仁祥,曹赵云,金连登,等. 免疫亲和柱净化-液相色谱质谱法对粮谷中 T-2 与 HT-2 毒素的测定[J]. 分析测试学报,2009,

28(3):368-371.

- [8] Zhang Z, Hu X F, Zhang Q, et al. Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using HPLC-MS/MS via a multiple antibody immunoaffinity column[J]. Journal of Chromatography B (Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences), 2016, 1021: 145-152.
- [9] Valle-Algarra F M, Medina A, 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.
- [10] Njunbe E E, van Poucke C, de Saeger S. A multi-analyte LC-MS/MS method for the analysis of 23 mycotoxins in different sorghum varieties; the forgotten sample matrix[J]. Food Chemistry, 2015, 177: 397-404.
- [11] Jiménez M, Mateo J J, Mateo R. Determination of type A trichothecenes by high-performance liquid chromatography with coumarin-3-carbonyl chloride derivatisation and fluorescence detection[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 870(1/2): 473-481.
- [12] Klötzl M, Lauber U, Humpf H U. A new solid phase extraction clean-up method for the determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals and cereal-based food by LC-MS/MS[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2006, 50(3): 261-269.
- [13] 王松雪,张喆. 样品扦样与制备-真菌毒素准确分析中的决定性因素[J]. 检验检疫学刊,2010,20(5): 60-63, 51.
- [14] Tapani Y M, Sari R, Taha H, et al. Different grain grinding methods affect detection of *Fusarium graminearum* DNA and mycotoxins[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2017, 56(1): 167-174.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 出口花生、谷类及其制品中黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素 B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素、HT-2 毒素的测定: SN/T 3136-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [16] 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 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定: GB 5009.111-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [17] Codex Alimentarius Commission. Codex general standard for contaminants and toxins in food and feed: 193-1995[S]. Codex Alimentarius Commission, 1995.
- [18] 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 食品中玉米赤霉烯酮的测定: GB 5009.209-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.