

酵米面和银耳及其制品中毒黄素和热诚菌素的检测方法的建立及稳定性比较

汪辉^{1,2*}, 邓楠¹, 崔晓娇^{1,2}, 陈先桂¹, 王璐¹, 袁圆^{1,2}, 陈高超¹, 周策睿¹

(1. 长沙市食品药品检验所, 国家酒类产品质量检验检测中心(湖南), 湖南长沙 410016)

(2. 食品安全监测与预警湖南省重点实验室, 湖南长沙 410111)

摘要: 建立了测定酵米面和银耳及其制品中的毒黄素和热诚菌素的高效液相色谱法。样品经提取后, 以 C18 色谱柱分离目标化合物, 保留时间和光谱图定性, 外标法定量。对建立的方法与现有的方法进行了对比, 同时比较了两种目标物在不同条件下的稳定性。结果表明: 两种目标物在 0.20~20.00 mg/L 浓度范围内呈良好线性, $R^2 > 0.999$, 检出限分别均为 0.15 mg/kg (酵米面) 和 0.30 mg/kg (银耳及其制品), 方法回收率为 79.77%~104.36%, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.96%~8.91% ($n=6$)。毒黄素和热诚菌素在碱性条件下含量均迅速降解至 40% 以下, 毒黄素在酸性条件下会在 5 个月内降解至 26% 以下, 而热诚菌素在酸性条件下以及两者在甲醇溶液中 5 个月内稳定性较好, 吸光值 RSD 均小于 3.18%。该方法较现有的方法简便快捷、干扰小、准确度高, 可应用于酵米面和银耳及其制品中的毒黄素和热诚菌素的检测。稳定性试验可为后期的解毒或避毒提供有力的参考。

关键词: 高效液相色谱法; 酵米面; 银耳; 毒黄素; 热诚菌素

文章编号: 1673-9078(2022)09-345-354

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.1256

Establishment and Stability Comparison of Detection Methods for Toxicflavin and Fervenulin in Fermented Corn Flour, Tremella Fuciformis and Its Processed Products

WANG Hui^{1,2*}, DENG Nan¹, CUI Xiaojiao^{1,2}, CHEN Xiangui¹, WANG Lu¹, YUAN Yuan^{1,2}, CHEN Gaochao¹, ZHOU Cerui¹

(1. Changsha Institute for Food and Drug Control, National Alcohol Products Quality Inspection and Testing Center (Hunan), Changsha 410016, China)

(2. Hunan Provincial Key Laboratory of Food Safety Monitoring and Early Warning, Changsha 410111, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography method was developed to determine toxoflavin and fervenulin, in fermented corn flour, as well as in *Tremella fuciformis* and its products. After extraction, the target compounds were separated using a C18 column. The retention times and spectrograms were used for qualitative determination, and the levels were quantitatively measured using external standards. The established method was compared with the existing methods. The stability of the two target compounds, namely toxoflavin and fervenulin, under different conditions were also compared. The results suggest that the two target compounds show good linearity in the concentration range of 0.20~20.00 mg/L, $R^2 > 0.999$. The limits of detection of toxoflavin and fervenulin were 0.15 mg/kg (fermented corn flour) and 0.30 mg/kg (*T. fuciformis* and its products), respectively. The recovery rates were 79.77%~104.36% with relative standard deviations (RSDs) of 0.96%~8.91% ($n=6$). The levels of both toxoflavin and fervenulin rapidly

引文格式:

汪辉, 邓楠, 崔晓娇, 等. 酵米面和银耳及其制品中毒黄素和热诚菌素的检测方法的建立及稳定性比较[J]. 现代食品科技, 2022, 38(9): 345-354

WANG Hui, DENG Nan, CUI Xiaojiao, et al. Establishment and stability comparison of detection methods for toxicflavin and fervenulin in fermented corn flour, tremella fuciformis and its processed products [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 345-354

收稿日期: 2021-11-08

基金项目: 食品安全监测与预警湖南省重点实验室开放基金项目 (2020KFJJ07)

作者简介: 汪辉 (1983-), 男, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全分析, E-mail: wanghuei158@163.com

decreased to less than 40% under alkaline conditions. In contrast, the toxoflavin content reduced to less than 26% under acidic conditions in 5 months, whereas ferverulin remained stable under the same condition. Both compounds were stable in methanol within the tested period (5 months). The RSDs of absorbance were less than 3.18%. Compared with the existing methods, the proposed method is simple and rapid, with low interference and high accuracy. It could be applied for the determination of toxoflavin and ferverulin in fermented corn flour as well as in *T. fuciformis* and its products. The stability test can provide an excellent reference for detoxification or poisoning avoidance in future.

Key words: high performance liquid chromatography, fermented corn flour, *Tremella fuciformis*, toxoflavin, ferverulin

随着人们生活质量的提高, 食品安全问题日益受到大众的关注。近年来, 细菌性食物中毒时常发生, 其中关于唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)中毒事件较为突出^[1-6]。2020年10月, 黑龙江鸡西市发生的“酸子汤”(酵米面)事件造成9名中毒者全部死亡, 经当地卫健部门定性为由椰毒假单胞菌污染引起的食物中毒事件。银耳如果储存不当或时间过长, 也易受该菌污染而引起中毒^[1,5]。引起中毒的原因是唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)产生了米酵菌酸和毒黄素^[4,7-9]。总体来说, 米酵菌酸的毒性较大, 关注度较高, 检测方法较成熟, 且有食品安全国家标准检测方法^[10]。但毒黄素(见图1)的毒理学表明: 小鼠静脉口服毒黄素 LD₅₀ 为 8.39 mg/kg^[8], 毒性也较大, 对人、动物、许多微生物及植物皆有有毒性作用^[11-13]。关于其作用部位、致毒机理的研究也有不少报道^[14-16]。热诚菌素是毒黄素的同分异构体(见图1), 和毒黄素一样, 拥有嘧啶并三嗪环骨架结构, 且在一定化学条件下两者能够相互转化^[17]。其毒理学表明: 仓鼠腹腔注射 LD₅₀ 为 11.2 mg/kg。由于两者毒性均较高, 中毒后需尽快解毒, 所以其稳定性研究很有必要, 但目前该研究尚属空白。因此, 为了预防唐菖蒲伯克霍尔德氏菌中毒事件的发生以及后期中毒的鉴定和分析, 需建立酵米面和银耳及其制品中的毒黄素和热诚菌素的测定方法, 并对目标物进行稳定性考察。

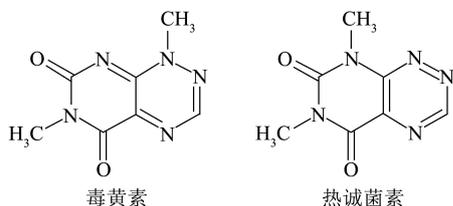


图1 毒黄素和热诚菌素的结构式

Fig.1 Structural formulas of toxoflavin and ferverulin

目前, 毒黄素和热诚菌素的稳定性研究较少, 关于毒黄素的检测方法较多, 关于热诚菌素的检测方法较少, 主要有薄层色谱法^[18]、分光光度法^[19,20]、高效液相色谱法^[21]、高效液相-质谱法^[7]及流动注射化学发光法在线监测法^[22]等。这些方法大多应用于细菌培养液中高浓度毒黄素的测定, 不适用于食品中低含量毒

素的测定。张伟等^[7]采用了较昂贵的超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱质谱, 一般实验室难以实现, 且对人员操作要求较高; 周鹏等^[23]和王朝霞等^[24]建立的高效液相色谱法采用低波长检测, 可能存在一定干扰, 且灵敏度有待提高。本文以酵米面和银耳及其制品为研究对象, 建立了一种测定酵米面和银耳及其制品中毒黄素和热诚菌素的高效液相色谱法。同时, 对毒黄素和热诚菌素的稳定性进行考察, 以期为后期解毒或避毒研究提供参考。该方法前处理简单, 干扰较小, 准确度和灵敏度较高, 具有一定的应用价值, 可以为毒黄素和热诚菌素的致毒机理及解毒方法的研究提供新的技术支撑, 同时也可以更好地应对和处理此类食品安全事故, 以寻找抢救的最佳方案, 减少死亡率。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1260型高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; UV-2450紫外分光光度计, 日本岛津公司; Milli-Q Direct 8超纯水仪, 德国MERCK公司。

毒黄素纯度为97.22%, 热诚菌素纯度为98.17%, 香港标准物质研究所; GBW(E)130417紫外分光光度计用溶液标准物质(重铬酸钾溶液), 四川中测标物科技有限公司; 甲醇为色谱纯, 德国MERCK公司; 甲酸为色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 氨水为色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 食用小苏打(碳酸氢钠), 长沙智腾食品贸易有限公司; 食用纯碱(碳酸钠), 武汉成达食品有限公司; 实验用水为Milli-Q Direct 8超纯水仪制得的超纯水。

1.2 标准溶液配制

分别精确称取毒黄素和热诚菌素各10 mg于25 mL容量瓶中, 用甲醇溶解并定容至刻度, 得到浓度为400 mg/L标准储备液, 冷冻条件下(-18 °C)可保存5个月。采用体积分数0.1%甲酸溶液配制成标准系列使用液, 供高效液相色谱分析。

1.3 波长的选择

采用不接色谱柱直接进样, 高效液相色谱仪二极管阵列检测器对毒黄素和热诚菌素在 210~600 nm 进行光谱扫描, 根据扫描结果设置合适波长进行标准溶液和样品溶液测试, 根据测试结果选择波长。

1.4 进样溶剂优化

采用 0.1% 甲酸水、0.1% 甲酸水-甲醇 (95:5, V/V)、0.1% 甲酸水-甲醇 (90:10, V/V)、0.1% 甲酸水-甲醇 (80:20, V/V) 和 0.1% 甲酸水-甲醇 (70:30, V/V) 配制 20 mg/L 混合标准溶液, 考察进样溶剂对目标物的色谱峰形的影响。

1.5 提取溶剂的选择

毒黄素和热诚菌素溶于甲醇和水, 本试验参考流动相考察采用 0.1% 甲酸水和甲醇提取样品, 观察提取时样品状态和后期样品溶液过滤状态。

1.6 色谱条件

色谱柱: Agilent TC-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A 为 0.1% 甲酸水, B 为甲醇, 梯度洗脱程序: 0~5.00 min, 6% B, 5.00~10.00 min, 6% B~50% B, 10.00~12.00 min, 50% B, 12.01 min, 6% B; 毒黄素检测波长: 398 nm, 热诚菌素检测波长: 338 nm, 柱温: 35 °C; 进样量: 80 μL。

1.7 样品前处理

取 10 g 酵米面 (取样前混匀) 或 5 g 银耳罐头 (取样前匀浆) 于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 0.1% 甲酸超声提取 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于 25 mL 容量瓶中, 重复提取一次, 合并上清液, 用 0.1% 甲酸溶液定容至刻度, 混匀, 取溶液过 0.45 μm 滤膜, 待测。

取 5 g 鲜银耳 (取样前粉碎至颗粒状) 或干银耳 (取样前粉碎至粉末状) 于 50 mL 离心管中, 加入

25 mL 甲醇超声提取 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 1 mL 于 10 mL 刻度塑料离心管中, 45 °C 氮吹至近干, 0.1% 甲酸溶液定容至 1 mL, 涡旋复溶 1 min, 取溶液过 0.45 μm 滤膜, 待测。

1.8 方法学验证

标准曲线、检出限和定量限: 配制浓度为 0.20、0.40、0.80、1.00、2.00、4.00、8.00、10.00、20.00 mg/L 的毒黄素和热诚菌素混合标准工作液, 每个浓度平行测定 3 次。以 3 倍信噪比计算检出限, 10 倍信噪比计算定量限。

加标回收率和精密度: 在空白酵米面中添加 0.50、1.00、5.00 mg/kg 的毒黄素和热诚菌素混合标准溶液, 在空白鲜银耳、干银耳和银耳罐头分别添加 1.00、2.00、10.00 mg/kg 的毒黄素和热诚菌素混合标准溶液, 按照 1.4 节方法进行前处理和 1.2 节仪器条件进行测定, 每个添加水平浓度平行测定 6 次, 计算加标回收率和精密度。

专属性试验: 毒黄素和热诚菌素是水溶性黄色色素。本试验配制了实验室常测的水溶性橙黄色色素 (酸性橙 1、酸性橙 2、碱性橙 2、碱性橙 22、柠檬黄、日落黄) 和生物毒素 (黄曲霉毒素 B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A) 标准溶液, 采用建立的方法进行分析, 考察对目标分析物有无影响。

1.9 稳定性比对

采用甲醇配制 100 mg/L 的毒黄素和热诚菌素的标准储备液, 分别采用 0.1% 甲酸, 1% 甲酸和 0.1% 氨水配制 10 mg/L 的毒黄素和热诚菌素的标准使用液。在相应的环境中分别保存 0、1、2、3、4、5 个月, 采用紫外可见分光光度计测定毒黄素 (258 nm 和 398 nm) 和热诚菌素 (240 nm 和 338 nm) 的吸光度 (见表 1)。每次测定前采用 GBW(E)130417 紫外分光光度计用溶液标准物质 (重铬酸钾溶液) 对紫外分光光度计进行透射比测定。

表 1 毒黄素和热诚菌素的稳定性试验

Table 1 Stability tests of toxoflavin and fervenulin

温度/°C	毒黄素 (258 nm, 398 nm)				热诚菌素 (240 nm, 338 nm)			
	100 mg/L		10 mg/L		100 mg/L		10 mg/L	
	甲醇	0.1% 氨水	0.1% 甲酸	1% 甲酸	甲醇	0.1% 氨水	0.1% 甲酸	1% 甲酸
-18±4	+	-	-	-	+	-	-	-
4±4	-	+	+	+	-	+	+	+
20±4	-	+	+	+	-	+	+	+

注: +: 已试验; -: 未试验。

1.10 数据处理

本文化合物结构式采用 ACD/Labs release: 12.00 软件绘图, 其他绘图均采用 OriginPro 2018C(64-bit) SR1 b9.5.195 软件进行数据处理。

2 结果与讨论

2.1 波长的选择

毒黄素在 258 nm 和 398 nm 有较大吸收峰, 热诚菌素在 240 nm 和 338 nm 有较大吸收峰, 且两种目标物在低波长的吸收峰均高于高波长吸收峰 (见图 2)。在分析标准溶液时, 采用对应的低波长测定时两种目标物的灵敏度均高于高波长 (见图 3), 但采用低波长分析样品溶液时, 由于大多数化合物在低波长均有一定的吸收, 且样品基质较复杂, 杂质对目标物的测定

干扰较严重。当波长为 398 nm, 毒黄素能获得较高的灵敏度, 当波长为 338 nm 时, 热诚菌素能获得较高的灵敏度, 且在这两种波长下目标化合物的干扰较小^[23]。因此, 本方法选择在 398 nm 波长下测定毒黄素和在 338 nm 波长下测定热诚菌素。

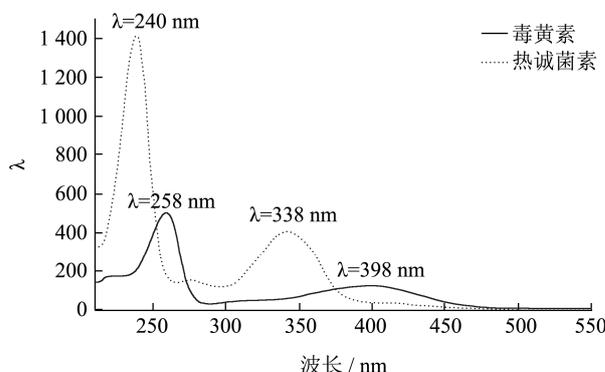


图 2 毒黄素和热诚菌素的光谱图

Fig.2 Spectrograms of toxoflavin and fervenulin

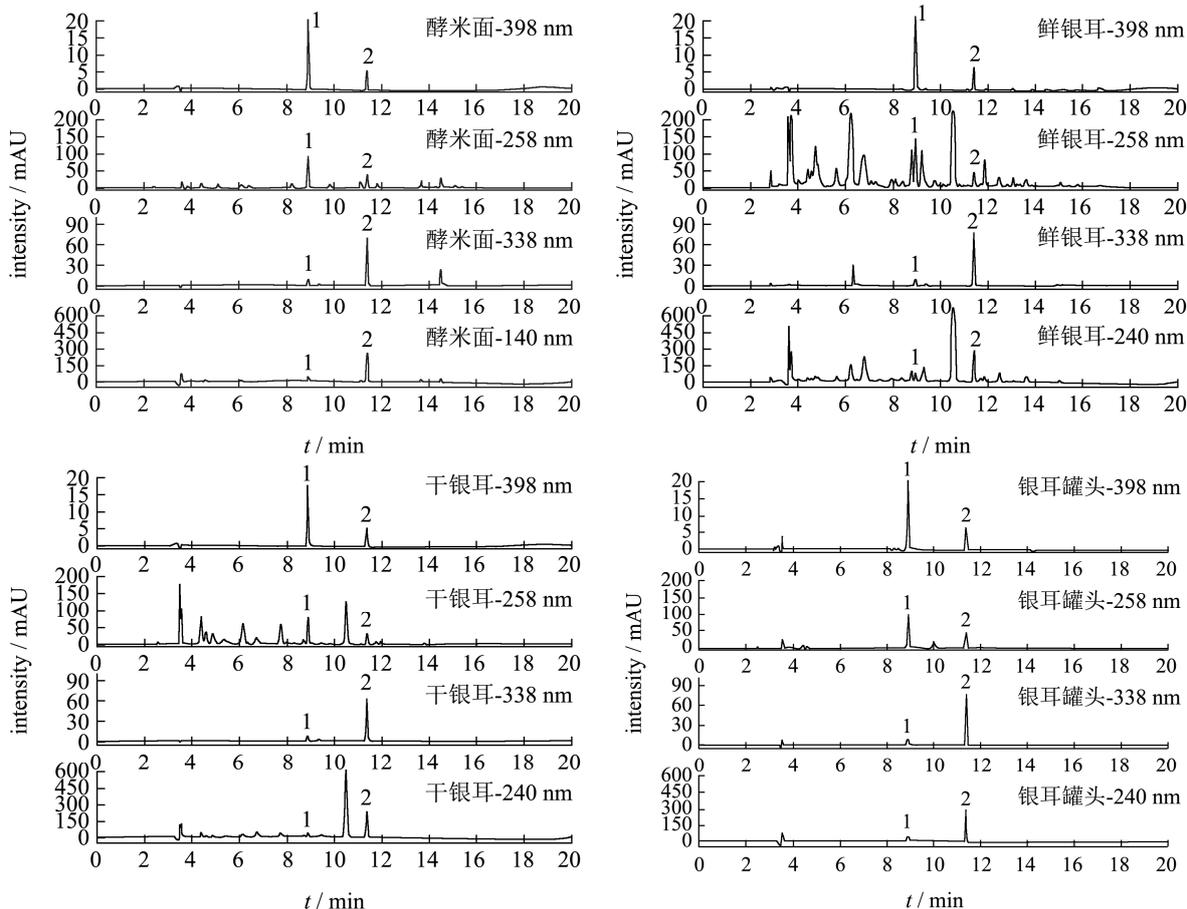


图 3 4 种加标样品溶液在不同波长下的色谱图

Fig.3 Chromatograms of 4 kinds of spiked sample solutions at different wavelength

注: 1: 毒黄素; 2: 热诚菌素。

2.2 进样体积的选择和进样溶剂优化

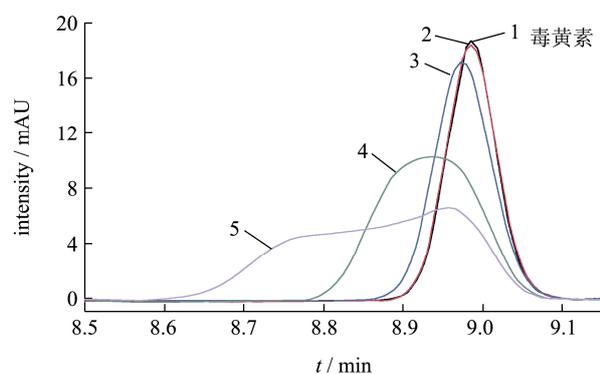
本试验使用的进样器的进样范围为 0.1~100 μL, 为得到更低的检出限值, 又避免采用进样器极限值, 最终

选用较大体积即 80 μL 作为进样体积^[25]。进样溶剂对目标物的色谱峰形影响较大, 且对毒黄素的色谱峰形的影响大于热诚菌素 (见图 4)。当溶剂为 0.1% 甲酸水和 0.1% 甲酸水-甲醇 (95:5, V/V) 时, 两种目标物的峰形对称

且尖锐。当甲醇含量 $\geq 10\%$ 时, 毒黄素峰形开始出现展宽, 当甲醇含量 $\geq 20\%$ 时, 热诚菌素的峰形也开始出现展宽, 当甲醇含量为 30% 时, 毒黄素出现了肩峰。因此, 选用 0.1% 甲酸水作进样溶剂, 操作较简便。

2.3 提取溶剂的选择

采用 0.1% 甲酸水时, 较适合酵米面和银耳罐头中



目标物的提取, 提取率大于 85% ; 但干银耳和鲜银耳会吸水, 提取溶液较粘稠, 后期无法通过滤膜; 而采用甲醇时, 适合所有类型的样品中目标物的提取, 提取率大于 80% 。考虑本实验采用有机溶剂提取, 后期需要浓缩后置换溶剂, 使前处理过程变得复杂, 最终选用 0.1% 甲酸水溶液提取酵米面和银耳罐头, 甲醇溶液提取干银耳和鲜银耳。

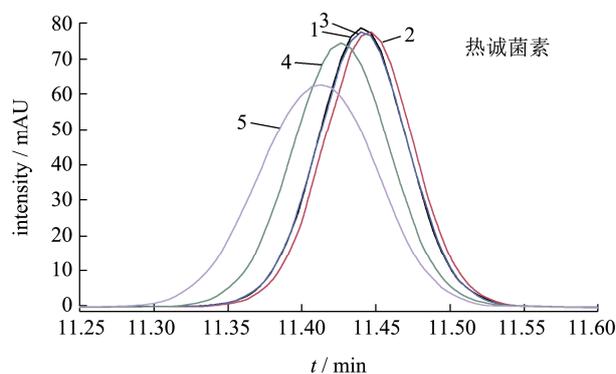


图4 不同溶剂配制的毒黄素和热诚菌素标准溶液色谱图

Fig.4 Chromatograms of toxoflavin and fervenulin n standard solution prepared with different solvent

注: 1: 0.1% 甲酸水 (V/V); 2: 0.1% 甲酸水-甲醇 (95:5, V/V); 3: 0.1% 甲酸水-甲醇 (90:10, V/V); 4: 0.1% 甲酸水-甲醇 (80:20, V/V); 5: 0.1% 甲酸水-甲醇 (70:30, V/V)。

表2 方法的检出限、定量限、线性范围、回归方程和 R^2

Table 2 LODs, LOQs, linear ranges, regression equations and R^2 of this method

化合物	样品	检出限/(mg/kg)	定量限/(mg/kg)	线性范围/(mg/L)	回归方程	R^2
毒黄素	酵米面	0.15	0.50	0.20-20.0	$Y=51.06X+1.06$	0.999 9
	银耳及其制品	0.30	1.00			
热诚菌素	酵米面	0.15	0.50	0.20-20.0	$Y=167.95X+9.86$	0.999 8
	银耳及其制品	0.30	1.00			

2.4 标准曲线、检出限和定量限

以质量浓度 (mg/L) 为横坐标, 平均峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 两种目标物在 $0.20\sim 20.00$ mg/L 呈良好线性。酵米面中的毒黄素和热诚菌素的检出限均为 0.15 mg/kg, 定量限为 0.50 mg/kg; 银耳及其制品中的毒黄素和热诚菌素的检出限均为 0.30 mg/kg, 定量限为 1.00 mg/kg, 具体结果见表 2。

2.5 加标回收率和精密度

回收率试验结果表明: 四种样品基质中毒黄素的加标回收率为 $79.77\%\sim 104.02\%$, 相对标准偏差为 $1.50\%\sim 8.91\%$; 热诚菌素的加标回收率为 $93.31\%\sim 104.36\%$, 相对标准偏差为 $0.96\%\sim 5.77\%$, 具体结果见表 3。

2.6 专属性试验

生物毒素(黄曲霉毒素 B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、

玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A) 在 338 nm 和 398 nm 波长处无吸收, 在色谱图中无响应, 橙黄色色素(酸性橙 1、酸性橙 2、碱性橙 2、碱性橙 22、柠檬黄、日落黄) 虽有响应, 但在目标物出峰处均无干扰(见图 5), 说明该方法有一定的抗干扰能力, 专属性较好。

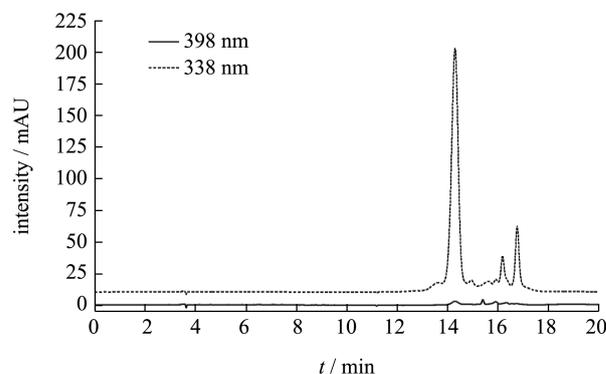


图5 干扰试验的色谱图

Fig.5 Chromatogram of interference test

表 3 回收率试验和精密度

Table 3 Recovery and precision test (n=6)

样品	化合物	加标水平/(mg/kg)	回收率/%	精密度/%
酵米面	毒黄素	0.50	102.28	2.79
		1.00	98.51	5.24
		5.00	102.19	3.44
	热诚菌素	0.50	97.07	2.20
		1.00	93.42	5.77
		5.00	101.23	3.45
鲜银耳	毒黄素	1.00	90.19	3.63
		2.00	85.60	6.45
		10.00	92.03	4.34
	热诚菌素	1.00	93.31	3.34
		2.00	98.66	3.98
		10.00	100.58	3.86
干银耳	毒黄素	1.00	83.88	5.73
		2.00	79.77	8.91
		10.00	90.68	4.09
	热诚菌素	1.00	95.99	4.17
		2.00	102.56	0.96
		10.00	96.13	2.20
银耳罐头	毒黄素	1.00	100.67	6.46
		2.00	102.54	1.50
		10.00	104.02	2.14
	热诚菌素	1.00	104.36	4.78
		2.00	102.41	1.09
		10.00	103.20	2.31

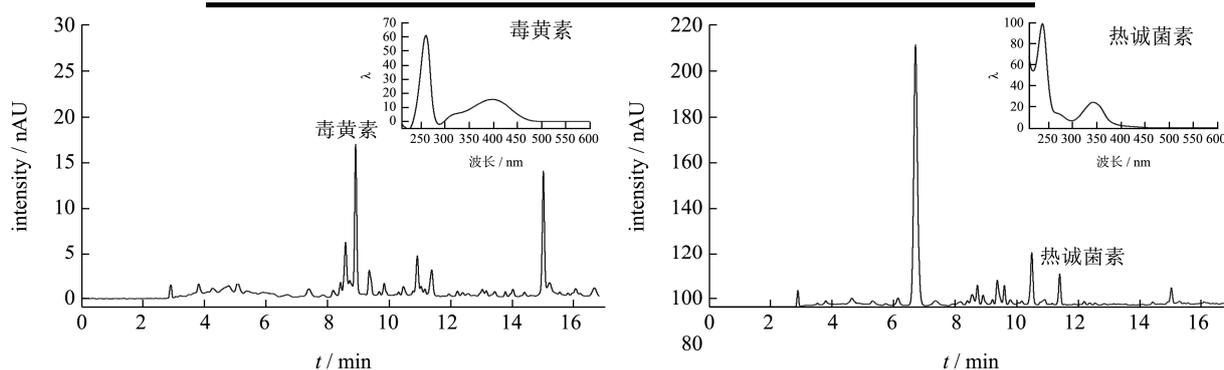


图 6 典型阳性样品色谱图和光谱图

Fig.6 Chromatograms and spectrograms of typical positive samples

2.7 实际样品分析

应用建立的方法测定 4 个酵米面、6 个干银耳、2 个银耳罐头，均未检出毒黄素 (<检出限) 和热诚菌素 (<检出限)，测定 10 个鲜银耳，2 个鲜银耳样品检出毒黄素，含量范围为 1.50~7.77 mg/kg；3 个样品鲜银耳检出热诚菌素，含量范围为 1.01~3.41 mg/kg。

典型阳性样品色谱图和光谱图见图 6。

2.8 与现有方法的对比

本方法与现在方法进行了对比，结果见表 4。张伟等^[7]建立的超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱串联质谱法 (UPLC-MS/MS/Q-Trap) 检出限能达到 0.004 μg/kg，但该设备较昂贵，对检测人员要求

也较高,一般实验室难以实现;刘倩好等^[22]建立的流动注射化学发光法灵敏度也较高,方法检出限可达到0.01 mg/L,但分析对象仅适用于饮用水,且只能检测毒黄素;周鹏等^[23]建立的高效液相色谱法(HPLC)虽然分析了三种目标物,但采用低波长检测样品时会导致基线较高,方法检出限仅为3 mg/kg,且分析的新鲜银耳样品为已泡发的样品,有一定的局限性;王朝霞等^[24]建立高效液相色谱法(HPLC),虽同样采用低波长检测,但前处理采用液液萃取方法,可以一定程度上净化样品,从而使方法灵敏度有了一定的提高,检出限为0.8 mg/kg,但方法不适用于酵米面和银耳及

其制品的分析;本方法针对酵米面、鲜银耳、干银耳和银耳罐头样品特性,采用不同的提取溶剂进行提取,并克服溶剂效应,采用大体积进样^[25],利用毒黄素和热诚菌素的高波长作为检测波长,大大降低了杂质的干扰,同时提高方法灵敏度,方法检出限相对于周鹏等建立的方法降低了一个数量级,即0.15 mg/kg。本文采用梯度洗脱排除了等度洗脱会导致后出峰组色谱峰展宽和杂质富集色谱柱的影响,大体积进样和高波长检测有效地解决了复杂基质的干扰,大大提高了方法的稳定性和灵敏度。经方法验证和实际样品测定,本方法切实可行,效果令人满意。

表4 与现有方法的对比

Table 4 Comparison with existing methods

分析基质	分析物	分析条件	前处理技术	线性范围	检出限	样品测定结果	稳定性研究	参考文献
酵米面、银耳	毒黄素	UPLC-MS/MS/Q-Trap	固相萃取	0.05~5.0 ng/mL	0.004 μg/kg	无报道	无	[7]
饮用水	毒黄素	微弱发光测定仪	流动注射化学发光法	0.005~5.00 mg/L	0.01 mg/L	无报道	无	[22]
酵米面、新鲜银耳(已泡发)、玉米淀粉	毒黄素、路霉素、热诚菌素	HPLC 240 nm 等度洗脱	直接浸提	0~12 mg/L	3 mg/kg	一个银耳样品检出毒黄素(5.25 mg/kg)、热诚菌素(7.16 mg/kg)	无	[23]
植物油	毒黄素、路霉素、热诚菌素	HPLC 240 nm 等度洗脱	液液萃取	0~40.0 mg/L	0.8 mg/kg	样品均未检出目标物	无	[24]
酵米面、鲜银耳、干银耳、银耳罐头	毒黄素、热诚菌素	HPLC 毒黄素 398 nm, 热诚菌素 338 nm; 梯度洗脱	直接浸提; 直接浸提, 浓缩, 置换溶剂。	0.2~20.0 mg/L	0.15 mg/kg	2个鲜银耳样品检出毒黄素, 含量范围为1.5~7.8 mg/kg; 3个鲜银耳样品检出热诚菌素, 含量范围为1.0~3.4 mg/kg。	无	本文

2.9 稳定性比对

采用GBW(E)130417紫外分光光度计用溶液标准物质(重铬酸钾溶液)对紫外分光光度计进行透射比测定,每次三次平行测定的透射比允许误差符合I级标准,且连续5个月的透射比的RSD小于0.65%,说明仪器的稳定性较好^[26]。稳定性试验结果(见图7)表明:采用甲醇配制100 mg/L的标准储备液,在冷冻条件下(-18℃),两种目标化合物5个月内的吸光值相对标准偏差分别为0.90%和0.58%,说明在此条件下,毒黄素和热诚菌素较稳定;采用0.1%甲酸(V/V)和1%甲酸(V/V)配制10 mg/L的使用液,毒黄素的吸光值会随着时间变长而变小,5个月内降解至26%以下,且采用1%甲酸(V/V)配制的标准溶液降解速度快于0.1%甲酸(V/V),而热诚菌素在5个月内吸光值的相对标准偏差均小于3.18%,说明在此条件下,热诚菌素较稳

定。另外,同一浓度毒黄素和热诚菌素在高波长下吸光值较低波长的吸光值稳定,说明在高波长下测定两种目标物偏差较小;采用0.1%氨水(V/V)配制10 mg/L的使用液颜色较采用0.1%甲酸(V/V)配制10 mg/L的使用液浅,其中毒黄素的吸光值不到后者的40%,热诚菌素的吸光值不到后者的20%,说明在此条件下,毒黄素和热诚菌素极不稳定,易发生降解。

根据毒黄素和热诚菌素在碱性条件下不稳定的现象,我们采用0.1%、0.5%、1.0%、2.0%食用小苏打(m/m)和0.1%、0.5%、1.0%、2.0%食用纯碱(m/m)分别配制毒黄素和热诚菌素溶液进一步实验,发现采用食用小苏打溶液(m/m)配制的毒黄素变化不明显,热诚菌素的吸光值(338 nm)变为0.1%甲酸(V/V)配制的热诚菌素溶液的85%左右,且随着溶液浓度升高变化不显著;采用食用纯碱(m/m)配制的两种目标物溶液颜色迅速变浅,其中采用0.1%食用纯碱(m/m)配制的毒黄素,吸光值

(398 nm) 为 0.1% 甲酸 (V/V) 配制的毒黄毒素溶液的 18.28%，随着食用纯碱 (m/m) 的浓度增大，降解比例随之降低，当浓度为 1% 时，降解比例达到 12.48%；而热诚菌素的降解更为明显，当采用 0.1% 食用纯碱 (m/m) 配制的热诚菌素，吸光值 (338 nm) 为 0.1% 甲酸 (V/V) 配制的热诚菌素溶液的 1.11%，且随着食用纯碱 (m/m) 浓度增加，变化不显著 (见图 8)。因此，我们在日常生活中采用 1% 食用纯碱 (m/m) 清洗或浸泡相关食品，可以大幅度降解毒黄毒素和热诚菌素，从而降低中毒的风险。

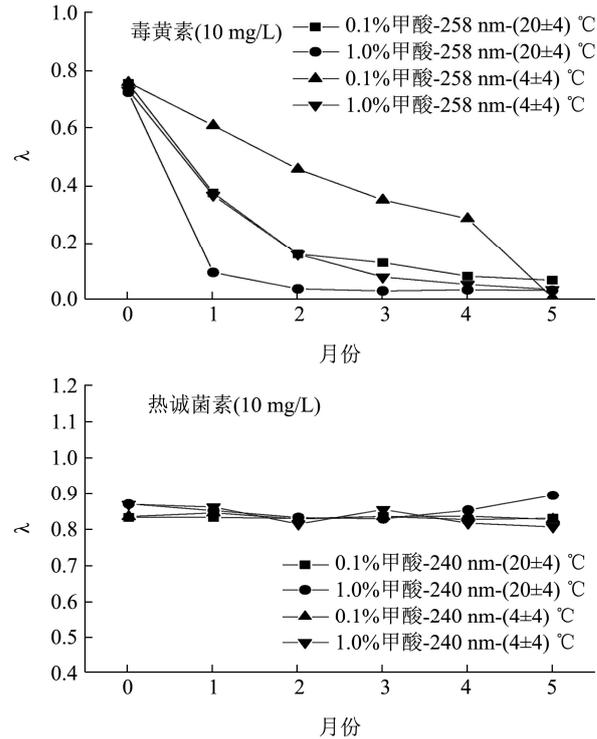
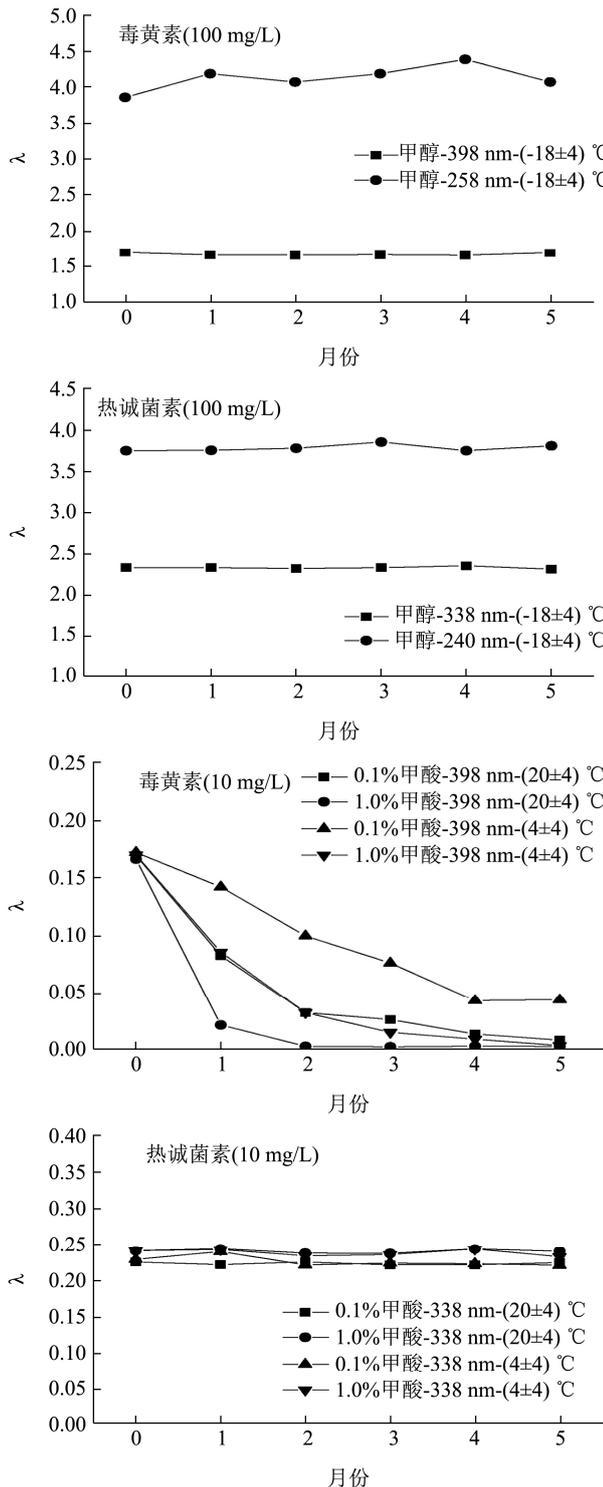


图7 毒黄毒素和热诚菌素在不同溶液和不同储存环境中的稳定性
Fig.7 Stability of toxoflavin and fervernulin in different solution and storage environment

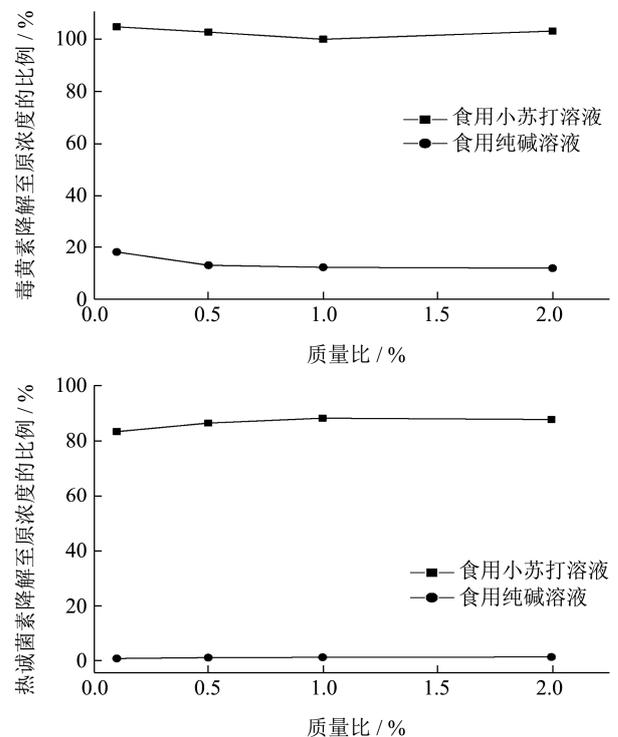


图8 毒黄毒素和热诚菌素在不同质量浓度的食用小苏打和纯碱溶液中降解至原浓度的比例
Fig.8 The ratio of toxoflavin and fervernulin degraded to their original concentrations in different concentrations of edible baking soda and sodium carbonate

3 结论

本文以酵米面和银耳及其制品为研究对象,采用C18色谱柱对目标物进行分离,在其高波长下进行分析,建立测定毒黄素和热诚菌素的高效液相色谱法。采用该方法对样品进行测定,经保留时间和光谱图定性,外标法定量,检测出部分鲜银耳中含有目标物。该方法与现有的方法比较,前处理简单易行,干扰较小,准确度和灵敏度较高,可适用于酵米面、银耳及其制品中毒黄素和热诚菌素的定性定量分析,可为食品安全监管和风险防控提供技术支撑。目标物的稳定性研究表明,毒黄素和热诚菌素在碱性条件下易发生降解,日常生活中,采用1%食用纯碱(m/m)清洗或浸泡相关食品,可能会降低毒黄素和热诚菌素中毒的风险。毒黄素在酸性条件下会随着时间变长慢慢降解,热诚菌素在酸性条件下稳定性较好。稳定性对比结果可为后期的解毒(如果降解产物毒性小)或避毒(如果降解产物毒性大)提供了有力的参考。

参考文献

- [1] 李俊发,黄煜强,雷柳冰,等.食品中椰毒假单胞菌的污染原因及其检测方法[J].广东化工,2021,48(6):145-146
LI Fajun, HUANG Yuqiang, LEI Liubing, et al. The contamination and detection methods of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. in food [J]. Guangdong Chemical Industry, 2021, 48(6): 145-146
- [2] 耿雪峰,张晶,庄众,等.2002-2016年中国椰毒假单胞菌食物中毒报告事件的流行病学分析[J].卫生研究,2020,49(4):648-650
GENG Xuefeng, ZHANG Jing, ZHUANG Zhong, et al. Epidemiological analysis of reported incidents of *Pseudomonas* coconut poisoning in China from 2002 to 2016 [J]. Journal of Hygiene Research, 2020, 49(4): 648-650
- [3] 陈荣桥,陈汉金,胡均鹏,等.米和食用淀粉中椰毒假单胞菌酵米面亚种污染调查与风险分析[J].现代食品科技,2021,37(1):260-267
CHEN Rongqiao, CHEN Hanjin, HU Junpeng, et al. Investigation and risk analysis of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* from rice and edible starch [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(1): 260-267
- [4] 范璐,栾杰.云南省一例唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(椰毒假单胞菌酵米面亚种)食物中毒事件调查分析[J].食品安全质量检测学报,2019,10(23):8098-8101
FAN Lu, LUAN Jie. Investigation and analysis for an event of *Burkholderia gladioli* (*Pseudomonas cocovenenans* subtype *farinofermentans*) food poison in Yunnan province [J]. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2019, 10(23): 8098-8101
- [5] 陈佳.椰毒假单胞菌中毒机理及其预防措施研究[J].现代食品,2019,13:102-104
CHEN Jia. Study on the poisoning mechanism and precaution measures of *Pseudomonas cocovenenans* [J]. Modern Food, 2019, 13: 102-104
- [6] 国译丹,杨祖顺,汤晓召,等.云南省椰毒假单胞菌酵米面亚种污染分析及 PFGE 分型[J].昆明医科大学学报,2019,40(10):73-76
GUO Yidan, YANG Zushun, TANG Xiaozhao, et al. Contamination analysis and PFGE typing of *Pseudomonas cocovenenans* Subsp. *farinofermentans* in Yunnan province [J]. Journal of Kunming Medical University, 2019, 40(10): 73-76
- [7] 张伟,冯光伟,赵东阳,等.超高效液相色谱-三重四极杆/复合线性离子阱串联质谱法快速检测食物中毒样品中的毒黄素[J].中国卫生检验杂志,2021,31(15):1811-1813,1817
ZHANG Wei, FENG Guangwei, ZHAO Dongyang, et al. Rapid determination of toxoflavins in food poisoning samples by ultra-high performance liquid chromatography-triple quadrupole/linear ion trap tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2021, 31(15): 1811-1813, 1817
- [8] 翁晨辉,李红艳,陈小珍,等.毒黄素的合成、分离及其检测技术研究进展[J].生命科学,2017,4:79-85
WENG Chenhui, LI Hongyan, CHEN Xiaozhen, et al. Advances in the synthesis, separation and detection technology of toxoflavin [J]. Life Science, 2017, 4: 79-85
- [9] 明浩,宗赞,谢荃沁,等.SIRT1 阻滞剂毒黄素对肺鳞癌细胞株 SK-MES-1 增殖、凋亡及迁移的影响[J].中国医药生物技术,2016,11(2):137-141
MING Hao, ZONG Yun, XIE Quanqin, et al. Inhibitory effects of toxoflavin on the proliferation, apoptosis and migration of human lung squamous carcinoma cell SK-MES-1 [J]. China Medical Biotechnology, 2016, 11(2): 137-141
- [10] GB/T 5009.189-2016,食品安全国家标准食品中米酵菌酸的测定[S]
GB/T 5009.189-2016, National Food Safety Standard Determination of Bongkrekic Acid in Food [S]
- [11] Radosveta G, Cheng Q, Arnér E S J. Efficient selenocysteine-dependent reduction of toxoflavin by

- mammalian thioredoxin reductase [J]. *Bba-Gen*, 2018, 1862(11): 2511-2517
- [12] Annam H, Maham S, Maria T, et al. Re-genome sequence and analysis of *Burkholderia glumae* strain AU6208 and evidence of toxoflavin: a potential bacterial toxin [J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2020, 86: 107245
- [13] 徐以华,孙磊,王玲,等.水稻细菌性穗枯病菌分离条件的优化及产毒黄素观察[J].*植物保护*,2018,44(6):38-44
XU Yihua, SUN Lei, WANG Ling, et al. Optimization of *Burkholderia glumae* isolation and observation of toxoflavin production [J]. *Plant Protection*, 2018, 44(6): 38-44
- [14] 岳启安,张式暖.毒黄素对呼吸和循环系统的毒性研究[J].*潍坊医学院学报*,1998,20(1):6-7
YUE Qian, ZHANG Shinuan. Study of toxication to the respiratory system and the circulatory system [J]. *Journal of Weifang Medical College*, 1998, 20(1): 6-7
- [15] 吴洪娟,李锋杰,张圣明.毒黄素对小鼠肾脏毒性作用的超微病理观察[J].*电子显微学报*,2012,31(1):51-55
WU Hongjuan, LI Fengjie, ZHANG Shengming. Ultrathin pathological observation of toxic effect of toxoflavin on kidney of experiential mice [J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2012, 31(1): 51-55
- [16] 楚海荣,马麦生,杨媛媛,等.毒黄素对 HepG2 细胞的毒性作用及其机制研究[J].*中国病原生物学杂志*,2009,7:493-495
CHU Hairong, MA Maisheng, YANG Yuanyuan, et al. The toxic effect and the mechanism of toxoflavin on HepG2 cells [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2009, 7: 493-495
- [17] F Yoneda, Nagamatsu T. Transformation of toxoflavin into ferverulin via 1-demethyltoxoflavin [J]. *Tetrahedron Letters*, 1973, 14(17): 1577-1580
- [18] Lee J, Park J, Kim S, et al. Differential regulation of toxoflavin production and its role in the enhanced virulence of *Burkholderia gladioli* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(1): 65-76
- [19] Suzuki F, Sawada H, Azegami K, et al. Molecular characterization of the tox operon involved in toxoflavin biosynthesis of *Burkholderia glumae* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2004, 70(2): 97-107
- [20] 李晓丹.药用植物内生细菌 HDXY-02 抗真菌物质毒黄素的分离鉴定和合成调控机制[D].南京:南京师范大学,2020
LI Xiaodan. Identification and synthesis regulation mechanism of the antifungal substance toxanthin from the endophytic bacteria HDXY-02 in medicinal plants [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2020
- [21] ZHU Dewen, WU Zhengyun, LUO Aimin, et al. Characterization and detection of toxoflavin - producing *Burkholderia* in rice straws and Daqu for Chinese Maotai-flavour liquor brewing [J]. *Journal of the Institute of Brewing*, 2015, 121(2): 290-294
- [22] 刘倩妤,唐书泽,李梁,等.流动注射化学发光法在线监测城市饮水中毒黄素突发性污染[J].*食品与机械*,2020,36(2):73-79
LIU Qianshu, TANG Shuze, LI Liang, et al. On-line monitoring the emergency pollution of toxoflavin in the municipal drinking water by flow injection chemiluminescence [J]. *Food & Machinery*, 2020, 36(2): 73-79
- [23] 周鹏,王朝霞,崔晓娇,等.高效液相色谱法测定食品中的毒黄素、路霉素和热诚菌素[J].*食品科技*,2021,46(8):325-329
ZHOU Peng, WANG Zhaoxia, CUI Xiaojiao, et al. Determination of toxoflavin, reumycin and ferverulin in food by HPLC [J]. *Food Science and Technology*, 2021, 46(8): 325-329
- [24] 王朝霞,尹芳平,汪辉,等.液液萃取-高效液相色谱法同时测定植物油中的毒黄素、路霉素和热诚菌素[J].*中国粮油学报*,2022,1:175-181
WANG Zhaoxia, YIN Fangping, WANG Hui, et al. Determination of toxoflavin, reumycin and ferverulin in vegetable oil by liquid-liquid extraction-high performance liquid chromatography [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2022, 1: 175-181
- [25] GB 5009.209-2016,食品中玉米赤霉烯酮的测定[S]
GB 5009.209-2016, Determination of Zearalenone in Food [S]
- [26] GB/T 26813-2011,双光束紫外可见分光光度计[S]
GB/T 26813-2011, Double Beam UV/VIS Spectrophotometer [S]