



孟佳佳,郭文博,聂冬霞,等.农产品检测用脱氧雪腐镰刀菌烯醇纯度标准物质的研制[J].南京农业大学学报,2024,47(3):564-574.  
MENG Jiajia, GUO Wenbo, NIE Dongxia, et al. Development of deoxynivalenol purity certified reference materials for agricultural products detection[J].  
Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(3): 564-574.

## 农产品检测用脱氧雪腐镰刀菌烯醇纯度标准物质的研制

孟佳佳<sup>1</sup>,郭文博<sup>1</sup>,聂冬霞<sup>1</sup>,韦阳<sup>2</sup>,赵志辉<sup>1</sup>,韩铮<sup>1\*</sup>

(1.上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所,上海 201403;2.上海交通大学农业与生物学院,上海 200240)

**摘要:**[目的]本文旨在研制脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)国家级纯度标准物质,为农产品中DON的检测等工作提供物质基础。[方法]利用质量平衡法和定量核磁共振法对DON纯度标准物质进行纯度定值。质量平衡法包括采用液相色谱面积归一化法测定DON主成分含量,采用卡尔费休库仑法测定纯度标准物质中水分含量,采用顶空气相色谱-质谱法测定挥发性杂质含量,以及采用电感耦合等离子体质谱法测定无机离子杂质含量。定量核磁共振法采用苯甲酸为内标,选择合适的共振峰,内标法定量标准物质的纯度,并对标准物质进行均匀性、稳定性检测和不确定度评估。[结果]质量平衡法的纯度定值结果为99.47%,定量核磁共振法定值结果为99.45%,最终所研制的DON纯度标准物质的纯度为99.5%,扩展不确定度为0.4%,均匀性良好,且满足12个月以上的稳定性要求。[结论]本试验所研制的DON纯度标准物质符合国家标准物质技术规范,目前已被批准为国家一级标准物质,并已被用于小麦、玉米等农产品实际检测过程中。

**关键词:**脱氧雪腐镰刀菌烯醇;标准物质;质量平衡法;定量核磁共振法;不确定度评估

中图分类号:O652.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)03-0564-11

## Development of deoxynivalenol purity certified reference materials for agricultural products detection

MENG Jiajia<sup>1</sup>, GUO Wenbo<sup>1</sup>, NIE Dongxia<sup>1</sup>, WEI Yang<sup>2</sup>, ZHAO Zhihui<sup>1</sup>, HAN Zheng<sup>1\*</sup>

(1. Institute for Agro-food Standards and Testing Technology, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China;

2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** [Objectives] The purpose of this paper was to develop the certified reference material (CRM) of deoxynivalenol (DON), so as to provide materials basis for the requirements of DON detection in agricultural products. [Methods] The purity of the prepared DON CRM was determined by two methods, including mass balance method and quantitative nuclear magnetic resonance (qNMR) method. The mass balance method included the determination of DON principal component content by liquid chromatography-area normalization method, the determination of moisture content in DON purity certified reference material by Karl Fischer Coulomb method, the determination of volatile impurity content by headspace gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), and the determination of inorganic ion impurity content by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). With regard to qNMR approach, benzoic acid was used as the internal standard, and the purity was accurately quantified by the internal standard method with appropriate resonance peaks. The obtained DON CRM was further verified by determination of the uniformity and stability, and the uncertainties were thoroughly evaluated. [Results] The purities of DON determined by mass balance method and qNMR approach were 99.47% and 99.45%, respectively. The purity of the prepared CRM was assigned as 99.5% with the expanded uncertainty of 0.4%. The homogeneity and the stability for 12 months at storage conditions were satisfactory. [Conclusions] The newly developed CRM in this experiment fulfilled the requirements of the Regulation of Reference Materials. It had been approved as first class of National CRM and had been used in actual DON detection in agricultural products, i.e., maize and wheat.

**Keywords:** deoxynivalenol; reference material; mass balance method; quantitative nuclear magnetic resonance method; evaluation of uncertainty

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),又称呕吐毒素,是由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)等产生的一种重要的单端孢霉烯族类真菌毒素<sup>[1-5]</sup>。DON具有急性毒性(腹泻、呕吐、直肠出血等)和慢性毒性(厌食、体重减轻、发育不良等),国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将其列为三类致癌物之一<sup>[6-9]</sup>。

收稿日期:2023-04-12

基金项目:国家自然科学基金项目(32272442)

\*通信作者:韩铮,研究员,主要从事农产品质量安全研究, E-mail: hanzheng@saas.sh.cn。

DON 污染小麦、玉米、大麦等谷物及其制品,污染地区遍布全球,给人和动物健康带来巨大的安全风险<sup>[10-18]</sup>。目前,世界范围内对食品中 DON 的限量标准都做了明确规定,我国《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017》规定谷物及其制品中 DON 的限量标准为  $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ <sup>[19]</sup>。DON 检测是农产品质量安全管理和控制的重要内容,而 DON 纯度标准物质是获得准确、可靠检测结果的保证。目前,检测实验室主要采用标准品代替有证标准物质开展相关研究工作<sup>[20-23]</sup>,无法保证检测结果的准确、可靠及可溯源性,因此,研制 DON 纯度标准物质并将其用于农产品检测中十分必要。

标准物质是一种确定了具有一个或多个足够均匀的特性值的物质或材料,具有准确性、均匀性、稳定性等特点,在日常仪器的校准等领域具有重要作用<sup>[24-26]</sup>。真菌毒素纯度标准物质在农产品质量安全分析过程中的质量控制、方法确认和能力验证中发挥重要作用。美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)、英国政府化学实验室(Laboratory of the Government Chemist, LGC)、欧盟标准物质与测量研究院(Institute for Reference Materials and Measurements, IRMM)已经研制了多种 DON 标准物质,主要包括 IRMM 研制的乙腈中 DON 溶液标准物质(IRMM-315)、玉米粉中 DON 空白成分分析标准物质(BCR-377 和 BCR-396)和玉米粉中真菌毒素成分分析标准物质(ERM-BC717)。而纯度标准物质仅有 Romer 实验室研制的 DON 标准品 B-MYC0320-C 和 B-MYC0325-C。国内目前也已研制多种 DON 标准物质,主要包括浙江省疾病预防控制中心研制的面粉中 DON 成分分析标准物质(GBW10112、GBW10113 和 GBW10114);国家粮食和物资储备局科学研究院研制的全麦粉中 DON 成分分析标准物质[GBW(E)100382]、全麦粉中 DON 和玉米赤霉烯酮成分分析标准物质[GBW(E)100383]、全麦粉中 4 种真菌毒素成分分析标准物质[GBW(E)100816 和 GBW(E)100817]和乙腈中 DON 溶液标准物质[GBW(E)100304];国家海洋环境监测中心研制的甲醇中 DON 溶液标准物质[GBW(E)100784 和 GBW(E)100785]<sup>[27]</sup>。目前国内关于 DON 标准物质的研究主要集中在溶液标准物质和成分分析标准物质上,未见 DON 有证纯度标准物质的报道。DON 国家一级纯度标准物质尚处于空白,亟待研究。本研究以自主纯化得到的 DON 为原料,根据《一级标准物质技术规范:JJF 1006—1994》<sup>[28]</sup>要求,采用质量平衡法和定量核磁共振法对 DON 进行准确定值<sup>[29-30]</sup>,系统考察了 DON 纯度标准物质的均匀性、稳定性并且评估其不确定度,建立量值准确、可靠、可溯源的 DON 纯度标准物质,为农产品中 DON 的检测工作提供物质基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

基准苯甲酸纯度(酸量)标准物质[GBW06117,纯度为 99.993%,扩展不确定度( $k=2$ )为 0.02%]、固体水分标准物质[GBW13518,量值为  $(9.90\pm 0.20)\times 10^{-3}$ ]、甲醇(GBW06111)、乙腈(GBW06113)、正己烷(GBW06116)、丙酮(GBW06115)、乙酸乙酯(GBW06114)均购自中国计量科学研究院;Coulomat AK 库仑法阳极液购自德国 Fluka 公司;氘代甲醇购自美国 Sigma 公司。

XEVOTQ-S 超高效液相色谱-串联质谱仪(UPLC-MS/MS)和超高效液相色谱仪-二极管阵列检测器(UPLC-PDA)均购自美国 Waters 公司;METTLER TOLEDO C30S 卡尔费休水分仪和 WXTS3DU Mettler Toledo 电子天平均购自瑞士梅特勒-托利多公司;Agilent 7890A-5975C 顶空自动进样气相色谱-质谱仪(GC-MS)购自美国 AGILENT 公司;AC-80 核磁共振波谱仪购自德国 Bruker 公司;iCAP TQ 电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)购自美国赛默飞公司。

### 1.2 候选物的选择及标准物质的制备

DON 标准物质原料为本实验室自主制备并经过进一步纯化得到,已采用紫外光谱、质谱等方法进行了定性鉴定<sup>[31]</sup>。将本次制备得到的 5.15 g DON 纯度标准物质候选物,全部置于棕色瓶中 4 °C 密封保存。在开展 DON 标准物质纯度定值(包括质量平衡法和定量核磁共振法)后,将剩余的 DON 纯度标准物质候选物,每份准确称取 20 mg,分装于棕色西林瓶内,共密封 100 个包装,每个包装为 1 个包装单元,置于 -20 °C 保存。

### 1.3 均匀性检验

按照《一级标准物质规范:JJG 1006—1994》<sup>[27]</sup>的相关规定,从制备获得的 DON 纯度标准物质中随机取样 15 个包装单元,每个包装单元中取样 5.0 mg(最小取样量为 5.0 mg),重复取样 3 次,转移至检定合格的 10 mL 容量瓶中,乙腈定容,振荡、混匀。从每份样品中取 400  $\mu\text{L}$  的样品液于 1 mL 容量瓶中,采用甲

醇/水(20:80,体积比)定容,振荡混匀后采用超高效液相色谱-二极管阵列检测法(UPLC-PDA)平行测定3次,取平均值。测定结果采用方差分析法经 $F$ 检验,统计检验标准物质的均匀性。

UPLC-PDA 检测条件:色谱柱:Agilent Poroshell 120EC-C<sub>18</sub>(100 mm×3.0 mm,2.7 μm);流动相:A相为甲醇,B相为水。洗脱程序:甲醇/水(15:85,体积比)等度洗脱;流速:0.2 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:3 μL;检测波长:218 nm;柱温:40 ℃。

#### 1.4 稳定性考察

根据《一级标准物质规范:JJG 1006—1994》<sup>[27]</sup>的要求,将样品分别置于4 ℃(模拟低温运输条件)、60 ℃(模拟极限运输条件)下储存,分别在0、2、4、6、8 d进行短期稳定性监测。标准物质的长期稳定性考察,根据实际长期储藏条件,按照先密后疏的原则,考察其在-20 ℃条件下0、1、3、6和12个月的稳定性。每次抽取3个包装单元,每个包装单元中取样5.0 mg,重复取样3次,转移至检定合格的10 mL容量瓶中,乙腈定容,振荡、混匀。从每份样品中取400 μL的样品液于1 mL容量瓶中,采用甲醇/水(20:80,体积比)定容,振荡混匀后采用UPLC-PDA法(同均匀性检测方法)平行测定3次,取平均值,采用直线拟合法对检测结果进行统计分析。

#### 1.5 DON 纯度标准物质定值

**1.5.1 质量平衡法** 采用质量平衡法对DON纯度标准物质定值,包括采用液相色谱面积归一化方法测定主成分纯度,采用卡尔费休库伦法测定水分含量,采用GC-MS测定挥发性杂质含量,以及采用ICP-MS测定无机离子含量。为保证测量结果的溯源性与准确性,使用的仪器设备均经过计量检定或标准物质校准。

主成分纯度( $P_0$ )分析:液相色谱条件:UPLC-PDA 检测器;色谱柱:Agilent Poroshell 120EC-C<sub>18</sub>(100 mm×3.0 mm,2.7 μm);流动相:甲醇/水(体积比为15:85);流速:0.2 mL·min<sup>-1</sup>;进样量:3 μL;UV波长:218 nm。

水分含量( $X_w$ )测定:采用标准溶液进行卡尔费休水分仪校正后,准确称取DON纯度标准物质50 mg,迅速加入滴定池进行滴定。此外,为了消除空气中水分对测定结果的影响,模拟加样过程、质量和时间,计算空气中水分空白值,测定值扣除空白后得到最终结果。

挥发性杂质( $X_v$ )含量测定:DON在制备过程,用到甲醇、乙腈等有机溶剂,因此本试验分析了5种常用试剂(甲醇、乙腈、正己烷、丙酮、乙酸乙酯)在DON纯度标准物质中的残留情况。准确称取50 mg DON样品置于20 mL顶空瓶中,迅速向顶空瓶中加入2.0 mL水,立即密封,待测。同时制备空白溶液和标准品溶液。GC-MS的色/质谱条件:顶空条件:平衡温度为85 ℃;传输线温度:220/110 ℃;进样口温度:220/100 ℃。色谱柱:DB-INNOWax(30 m×250 μm,0.25 μm);载气:氦气;流速:1.5 mL·min<sup>-1</sup>。质谱条件:电离方式:电子轰击源(EI);离子源温度:230 ℃;电离能量:70 eV;四级杆温度:150 ℃;全扫描监测模式,扫描范围20~100 amu。

无机离子杂质( $X_n$ )含量测定:采用ICP-MS法测定14种(钠、镁、钙、钾、锶、铁、铝、铜、锌、锰、铬、砷、镉、铅)最常见、存在最广泛的元素在DON样品中的含量。准确称取DON纯度物质50 mg于微波消解内罐中,加入5 mL硝酸,按照微波消解仪标准操作步骤进行消解。冷却后取出,缓慢打开罐盖排气,用少量水冲洗内盖,将消解罐放在超声水浴箱中,超声脱气5 min,用水定容至10 mL,混匀备用,同时制备空白和标准品。

质量平衡法纯度计算公式如下:

$$P = P_0 \times (1 - X_w - X_n - X_v),$$

式中: $P$ 为质量平衡法测定DON纯度物质的最终纯度; $P_0$ 为主色谱的面积归一化法计算获得的纯度; $X_w$ 为水分含量; $X_n$ 为无机离子含量; $X_v$ 为挥发性杂质含量。

**1.5.2 定量核磁共振法** 定量核磁共振法是基于核磁共振谱图中信号的积分面积与产生相应共振谱线的原子核数之间的正比关系,利用一个纯度已知且结构不同的标准物质,直接测定主成分纯度的方法<sup>[32]</sup>。

分别称取10 mg(精确至0.01 mg)DON纯度标准物质和10 mg(精确至0.01 mg)内标物(苯甲酸)于同一个西林瓶,加氘代甲醇振荡至完全溶解,转移至直径为5 mm核磁管中,平行6份,待测。

<sup>1</sup>HNMR测定参数:激发脉冲角度30°,扫描谱宽(SW)16.0 ppm,激发中心(O1P)7.0 ppm,弛豫时间(D1)5 s,采样次数128次,探头温度295.8 K,接收增益228,脉冲序列zg30,定量峰6.60 ppm(dq, $J=5.9$ ,1.4 Hz,1H,H-10)和7.59 ppm(tt, $J=7.4$ ,1.4 Hz)。

$$P_{\text{NMR}} = \frac{I_x \cdot n_{\text{std}} \cdot M_x \cdot m_{\text{std}}}{I_{\text{std}} \cdot n_x \cdot M_{\text{std}} \cdot m_x} \cdot P_{\text{std}}$$

式中: $P_{\text{NMR}}$ 为采用核磁共振法测得的DON纯度标准物质的纯度; $I_x$ 为DON指定峰的积分面积; $I_{\text{std}}$ 为内标物指定峰的积分面积; $n_{\text{std}}$ 为内标物指定峰的核群核个数; $n_x$ 为DON指定峰的核群核个数; $M_x$ 为DON的分子质量; $M_{\text{std}}$ 为内标物的分子质量; $m_{\text{std}}$ 为添加内标物的质量; $m_x$ 为DON纯度标准物质的称样量; $P_{\text{std}}$ 为内标物的纯度。

### 1.6 不确定度评估

DON纯度标准物质的不确定度主要由3部分组成:均匀性检查引入的不确定度( $u_{\text{bb}}$ )、稳定性考察引入的不确定度(长期稳定性 $u_{\text{lis}}$ 和短期稳定性 $u_{\text{sts}}$ )、纯度定值引入的不确定度( $u_{\text{char}}$ )。

### 1.7 数据分析和统计

所有数据采用Excel 2010软件进行统计分析。采用单因素方差分析法进行组内和组间的均匀性检验,采用直线拟合法统计分析稳定性结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 DON纯度标准物质均匀性检验

采用单因素方差分析法进行组内和组间的均匀性检验,测定结果如表1所示。 $F < F_{0.05}(14, 30)$ ,表明组内和组间无明显差异,DON纯度标准物质的均匀性良好,符合标准物质技术规范要求。

表1 DON纯度标准物质均匀性检验

Table 1 Uniformity determination of DON purity certified reference material

瓶号 Bottle number	均匀性/% Uniformity		
	1	2	3
1	99.46	99.39	99.41
2	99.50	99.45	99.44
3	99.37	99.49	99.42
4	99.54	99.49	99.43
5	99.39	99.40	99.41
6	99.38	99.39	99.44
7	99.55	99.48	99.39
8	99.48	99.46	99.54
9	99.49	99.44	99.47
10	99.46	99.42	99.52
11	99.48	99.45	99.47
12	99.42	99.38	99.47
13	99.44	99.47	99.55
14	99.44	99.51	99.43
15	99.48	99.41	99.47
平均值 Average		99.45	
组间方差( $S_1^2$ ) Intra-group variance		0.002 8	
组内方差( $S_2^2$ ) Inter-group variance		0.002	
$F$		1.37	
$F_{0.05}(14, 30)$		2.04	

### 2.2 DON纯度标准物质稳定性检验

将样品置于4℃和60℃恒温箱中保存,分别在0、2、4、6、8 d进行短期稳定性监测。同时,在-20℃条件下储存12个月,分别在0、1、3、6和12个月时对样品进行长期稳定性检测,检测数据和统计结果见表2。 $|b_1| < s(b_1) \cdot t_{0.95, n-2}$ ,表明制备得到的标准物质短期稳定性和长期稳定性均良好,符合标准物质技术规范要求。

### 2.3 质量平衡法定值

通过对样品的进样浓度、色谱柱、流动相、定值波长优化,以杂质峰的个数、主峰对称性、主成分与杂质峰的分离度为依据,确定定值的最优条件见1.5.1节。在该条件下,杂质峰与主峰分离度较好(图1),利用该色谱条件测定6瓶DON纯度标准物质,主成分纯度的测定结果如表3所示。

表 2 DON 纯度标准物质短期和长期稳定性检验结果

Table 2 Short-term and long-term stability determination of DON purity certified reference material

短期稳定性/% Short-term stability			长期稳定性/% Long-term stability	
时间/d Time	4 °C	60 °C	时间(月) Time (Month)	-20 °C
0	99.45	99.44	0	99.47
2	99.46	99.54	1	99.46
4	99.51	99.49	3	99.45
6	99.43	99.45	6	99.44
8	99.47	99.46	12	99.48
平均值 Average	99.46	99.48	平均值 Average	99.46
$b_1$	0.000 5	-0.002 5	$b_1$	0.001
$b_0$	99.46	99.49	$b_0$	99.46
拟合直线方程 Linearity	$Y=0.000 5X+99.46$	$Y=-0.002 5X+99.49$	拟合直线方程 Linearity	$Y=0.001 0X+99.46$
$s$	0.034 2	0.045 7	$s$	0.017 4
$s(b_1)$	0.005 4	0.007 2	$s(b_1)$	0.001 8
$t_{0.95,n-2}$	3.18	3.18	$t_{0.95,n-2}$	3.18
$s(b_1) \cdot t_{0.95,n-2}$	0.017 2	0.023 0	$s(b_1) \cdot t_{0.95,n-2}$	0.005 7

注:  $b_1$  代表斜率;  $b_0$  代表截距;  $S$  代表直线的标准偏差;  $S_{(b_1)}$  代表斜率的标准偏差;  $t_{0.95,n-2}$  代表置信概率为 0.95、自由度为  $n-2$  的  $t$  分布的临界值。

Note:  $b_1$  represents the slope;  $b_0$  represents the intercept;  $S$  is the standard deviation of the line;  $S_{(b_1)}$  represents the standard deviation of the slope;  $t_{0.95,n-2}$  represents the critical value of a  $t$ -distribution with a confidence probability of 0.95 and  $n-2$  degrees of freedom.

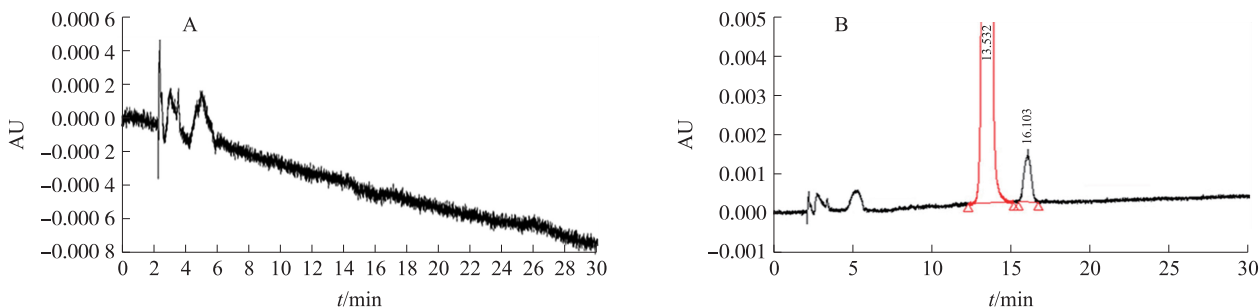


图 1 DON 纯度标准物质的 UPLC-PDA 色谱图

Fig. 1 UPLC-PDA chromatograms of DON purity certified reference material

A. 空白溶液(甲醇/水, 20:80, 体积比)的色谱图; B. 制备得到的 DON 纯度标准物质溶解在甲醇/水(20:80, 体积比)中的色谱图, 浓度为  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

A. UPLC-PDA chromatogram of blank solution (methanol/water, 20:80, V/V); B. UPLC-PDA chromatogram of the prepared DON certified reference material dissolved in methanol/water (20:80, V/V) at a concentration of  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

考虑到 DON 分离过程中用到的有机试剂, 测定了甲醇、乙腈、正己烷、丙酮、乙酸乙酯 5 种常用有机试剂在样品中的残留, 结果如图 2 所示, DON 纯度标准物质中无相关挥发性杂质的残留。

采用卡尔费休库伦法测定了 DON 纯度标准物质中的水分含量, 采用 ICP-MS 法测定了无机离子的含量, 结果如表 3 所示。计算得到 DON 纯度物质最终纯度为 99.47%。

#### 2.4 定量核磁共振法定值

为保证定量核磁共振结果的准确性, 针对氘代试剂、内标物、定量峰、核磁仪器测定参数等进行了系统优化和分析。氘代溶剂的选择要求 DON 和内标物同时在该氘代溶剂中具有良好的溶解度, 且不与 DON 和内标物发生反应<sup>[33-34]</sup>。由于 DON 的极性较大, 选择氘代甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ )作为本研究的氘代试剂。

内标物的选择标准为: 易溶于氘代试剂, 化学结构稳定, 不与待测化合物反应, 属于国家一级标准物质<sup>[35]</sup>。可用于本研究的标准物质包括: 基准物质苯甲酸(GBW06117, 纯度  $99.993\% \pm 0.020\%$ ), 一级标准物质邻苯二甲酸氢钾(GBW06106, 纯度  $99.990\% \pm 0.008\%$ )。由于邻苯二甲酸氢钾在氘代甲醇中不溶解, 故选择苯甲酸作为定值的内标物。

定量峰必须满足积分范围内无干扰, 受到微量杂质的影响概率小, 且基线平稳等条件。本研究选择 DON 的定量峰为 6.60 ppm(dq,  $J=5.9, 1.4 \text{ Hz}$ , 1H, H-10), 苯甲酸的定量峰为 7.59 ppm(tt,  $J=7.4, 1.4 \text{ Hz}$ )。

在最佳条件下, 定量核磁谱图如图 3 所示。6 个样品定量核磁共振法测定纯度分别为 99.43%、99.45%、99.41%、99.48%、99.45%和 99.47%, 平均值为 99.45%, 即定量核磁共振法纯度定值结果为 99.45%。

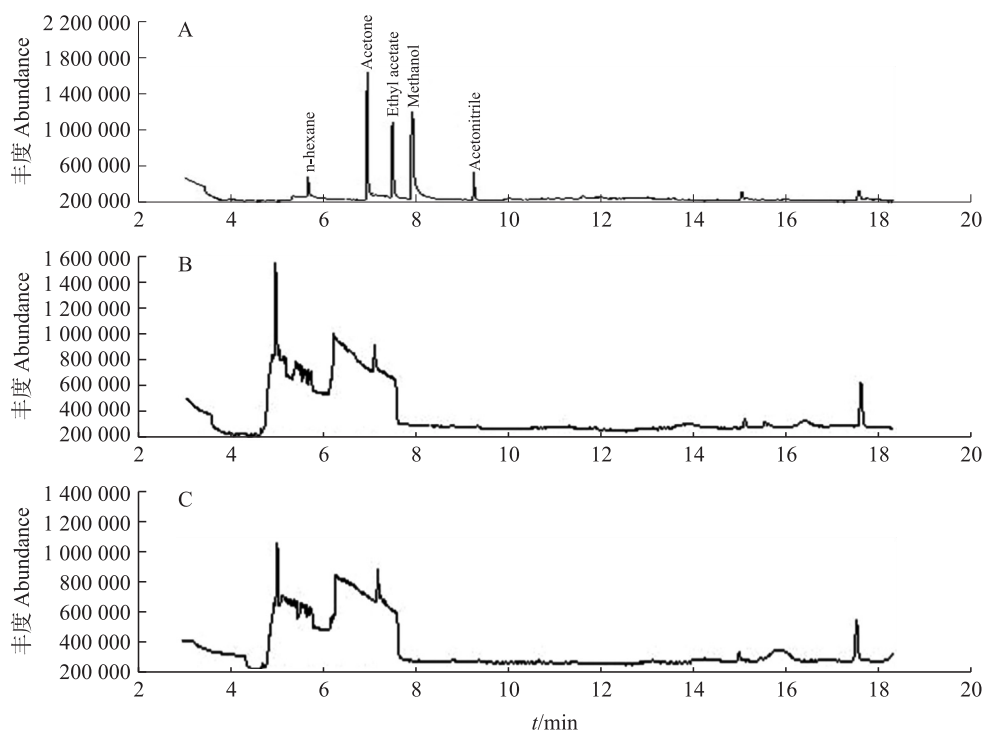


图2 5种挥发性溶剂(甲醇、乙腈、正己烷、丙酮、乙酸乙酯)(A)、空白(B)和DON纯度标准物质(C)的标准GC-MS图谱

Fig. 2 The standard GC-MS chromatogram of five volatile solvents(methanol, acetonitrile, n-hexane, acetone, ethyl acetate)(A), blank(B) and DON certified reference material(C)

表3 DON纯度标准物质经质量平衡法测定的最终纯度

Table 3 The final purity of DON purity certified reference material by mass balance method

指标 Index	瓶号 Bottle number	测定值 Measured data	平均值 Average	标准偏差 Standard deviation	%
主成分纯度 Principal component purity	1	99.68	99.69	0.007	
	2	99.69			
	3	99.70			
	4	99.69			
	5	99.70			
	6	99.69			
水分含量 Water content	1	0.162	0.159	0.004	
	2	0.159			
	3	0.157			
	4	0.159			
	5	0.152			
	6	0.162			
无机离子杂质含量 Content of inorganic ionic impurities	1	0.062	0.061	0.002	
	2	0.059			
	3	0.060			
	4	0.063			
	5	0.064			
	6	0.060			
最终纯度 Final purity			99.47		

## 2.5 2种不同原理的方法纯度定值结果

DON纯度标准物质的定值由2种方法确定,首先利用 $F$ 检验对2种方法定值的数据进行等精度检验。经计算证明2种方法等精度。随后采用 $t$ 检验进行一致性检验,经计算证明2种方法的测定值之间无明显差异。

综上所述,通过 $F$ 检验和 $t$ 检验,表明2种方法的测定值等精度,且2种纯度定值方法无显著性差异。该DON纯度物质定值结果为2种不同原理方法结果的平均值,即99.5%。

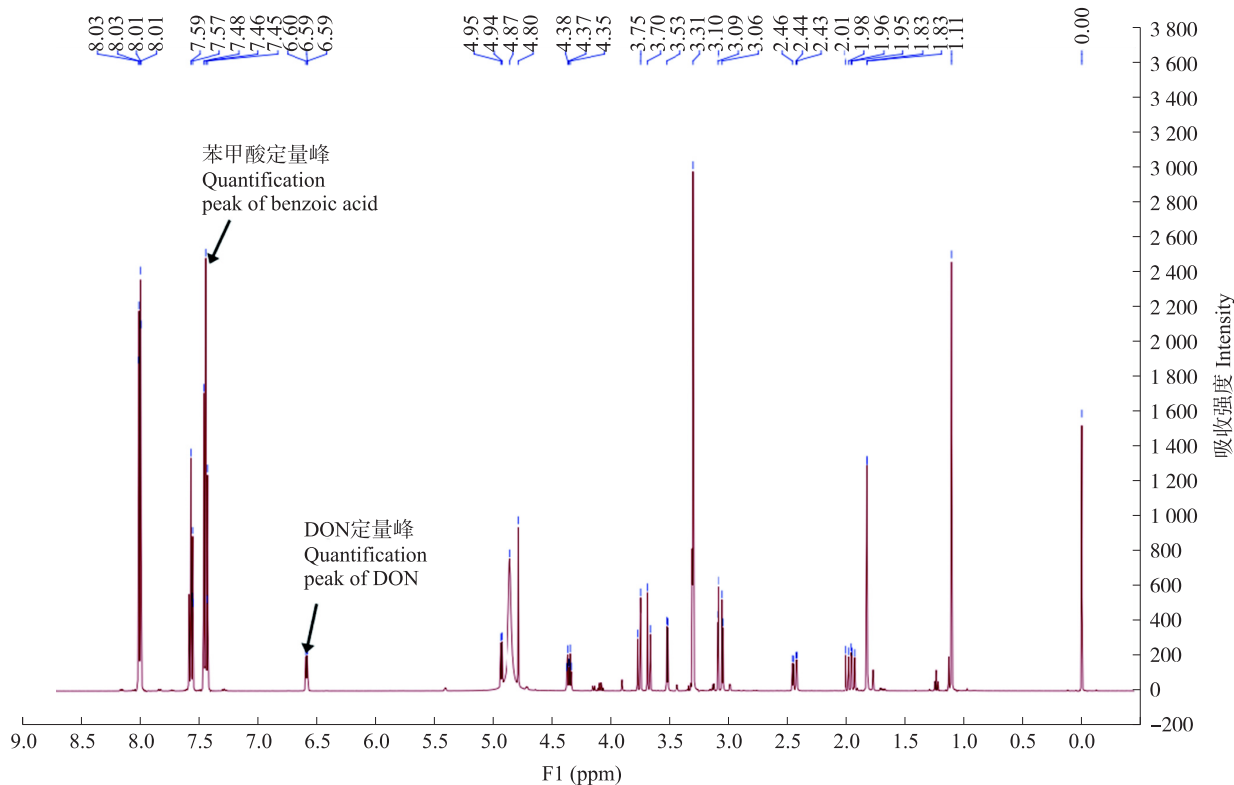


图 3 DON 纯度标准物质和苯甲酸(内标)在氘代甲醇中的定量氢谱

Fig. 3 Quantitative hydrogen profiling of DON purity certified reference material and benzoic acid in  $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$

## 2.6 不确定度评估

### 2.6.1 均匀性检验引入的不确定度

DON 纯度标准物质均匀性引入的不确定度:

$$u_{\text{bb}} = S_{\text{H}} = \sqrt{\frac{1}{n}(S_1^2 - S_2^2)} = 0.0159\%$$

式中:  $S_{\text{H}}$  为均匀性标准偏差;  $S_1^2$  为组间方差;  $S_2^2$  为组内方差;  $n$  为组内测定次数。

**2.6.2 稳定检验引入的不确定度** 短期稳定性引入的不确定度分别为 4 °C 的  $u_{\text{sts1}} = s(b_1) \cdot t = 0.0433\%$  和 60 °C 的  $u_{\text{sts2}} = 0.0578\%$ 。选择其最大值作为稳定性引起的不确定度。即短期稳定性考察引入的不确定度  $u_{\text{sts}} = u_{\text{sts2}} = 0.0578\%$ 。长期稳定性引入的不确定度:  $u_{\text{lis}} = s(b_1) \cdot t = 0.0217\%$ 。其中,  $s(b_1)$  为拟合直线斜率的标准偏差,  $t$  为稳定性监测时间。

### 2.6.3 定值引入的不确定度

1) 质量平衡法引入的不确定度:

#### ①主成分液相色谱-面积归一化法引入的不确定度 [ $u(P_0)$ ]

测定重复性引入的标准不确定度  $u_1$ : 随机选取 1 个包装单元, 连续进样 6 次, 考察 UPLC-PDA 法测定的重复性, 测定结果为 99.77%、99.82%、99.81%、99.78%、99.74%、99.75%, 平均值为 99.78%, 标准偏差为 0.0319%, 测定重复性引入的标准不确定度  $u_1 = 0.0319\%$ 。

各成分在不同检测波长下响应差异引入的不确定度 ( $u_2$ ), 计算公式如下:

$$u_2 = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n u_{2-i}^2}}{\sqrt{3}} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (B_{\text{imax}\lambda} - B_{\text{定值}\lambda})^2}}{\sqrt{3}},$$

式中:  $B_{\text{imax}\lambda}$  为在 5 个检测波长下成分  $i$  的最大百分比含量;  $B_{\text{定值}\lambda}$  为定值波长下成分  $i$  的百分比含量;  $u_{2-i}$  为成分  $i$  的不确定度分量。

分别测定了 210、218、230、240 和 254 nm 波长下 DON 和杂质峰的峰面积百分比, 计算得到  $u_2$  为 0.01%。仪器检测限引入的不确定度为  $u_3$ 。由于分析过程中均在仪器检测限范围内进样, 故该部分不确定度可忽略不计。

$$u(P_0) = \sqrt{u_1^2 + u_2^2} = 0.0334\%$$

## ②水分测定引入的不确定度

主要包括天平的不确定度和水分测定仪测量重复性引起的不确定度。由天平校准证书可得校准结果的扩展不确定度为 0.03 mg, 假设服从正态分布, 则换算成 B 类不确定度为  $0.03 \text{ mg}/2=0.015 \text{ mg}$ , 所以相对标准不确定度为 0.03%; 另外, 由测定结果可知, 卡尔费休水分测定仪测量的重复性引起的不确定度为 0.004%。

因此, 水分测定引入的不确定度:  $u(X_w) = \sqrt{0.03\%^2 + 0.004\%^2} = 0.03\%$ 。

## ③无机离子杂质测定引入的不确定度

主要包括天平的不确定度和 ICP-MS 测量重复性引起的不确定度。由天平校准证书可得校准结果的扩展不确定度为 0.03 mg, 假设服从正态分布, 则换算成 B 类不确定度为  $0.03 \text{ mg}/2=0.015 \text{ mg}$ , 所以相对标准不确定度为 0.015%。另外, 由测定结果可知, ICP-MS 测量重复性引起的不确定度为 0.002%。

无机离子杂质测定引入的不确定度:  $u(X_n) = \sqrt{0.015\%^2 + 0.002\%^2} = 0.015\%$ 。

## ④质量平衡法的不确定度

质量平衡法的不确定度  $u(P)$  计算公式如下:

$$u(P) = P \times \sqrt{\left(\frac{u(P_0)}{P_0}\right)^2 + \frac{u^2(X_w) + u^2(X_n) + u^2(X_v)}{(1 - X_w - X_n - X_v)^2}} = 99.47\% \times \sqrt{\left(\frac{0.0334\%}{99.69\%}\right)^2 + \frac{0.03\%^2 + 0.015\%^2}{(1 - 0.159\% - 0.061\%)^2}} = 0.0472\%$$

## 2) 定量核磁共振法引入的不确定度:

定量核磁共振法不确定度  $[u(P_{\text{NMR}})]$  包括测量的不确定度、分子质量的不确定度、称量不确定度、内标物纯度不确定度。

①积分面积测量的不确定度  $u(I_x/I_{\text{std}})$ 

采用 A 类不确定度评定, 用 qNMR 法测定结果的相对标准偏差表示, 不确定度为 0.018%。

②内标物苯甲酸标准物质和 DON 纯度标准物质天平称量不确定度  $u(m_{\text{std}})$  和  $u(m_x)$ 

由天平校准证书可得校准结果的扩展不确定度为 0.03 mg, 假设服从正态分布, 则换算成 B 类不确定度为  $0.03 \text{ mg}/2=0.015 \text{ mg}$ 。

天平称量的不确定度:  $u(m) = \sqrt{0.015^2 + 0.015^2} = 0.02 \text{ mg}$ 。

③内标物纯度不确定度  $u(P_{\text{std}})$ 

内标物苯甲酸的纯度不确定度由标准物质证书获得, 扩展不确定度为 0.02%, B 类不确定度为  $0.02\%/2=0.01\%$ 。内标物纯度相对标准不确定度为  $0.01\%/99.993\%=0.01\%$ 。

④分子质量的不确定度  $u(M_x)$  和  $u(M_{\text{std}})$ 

DON 和内标物苯甲酸相对分子质量的标准不确定度计算公式:

$$u(M) = \sqrt{\sum_{j=1}^n [N_j u_j]^2}$$

式中:  $N_j$  为  $j$  元素的原子个数;  $u_j$  为  $j$  元素的相对原子质量的不确定度。

根据 IUPAC 国际原子量表, 3 种原子的相对原子质量及不确定度: C 为  $12.0106 \pm 0.000577$ ; H 为  $1.007975 \pm 0.0000779$ ; O 为  $15.9994 \pm 0.000214$ 。对于每个元素, 其标准不确定度是按照均匀分布转化而来, DON 的分子式为  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$ , 相对分子质量是 296.3149。其标准不确定度:

$$u(M) = \sqrt{\left(15 \times \frac{0.000577}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(20 \times \frac{0.0000779}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(6 \times \frac{0.000214}{\sqrt{3}}\right)^2} = 0.0051$$

同理, 内标物苯甲酸 ( $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$ ) 的相对分子质量为 122.1209, 其标准不确定度  $u(M_{\text{std}}) = 0.0024$ 。

综上, 核磁定量法纯度测量的合成标准不确定度:

$$u(P_{\text{NMR}}) = P_{\text{NMR}} \times \sqrt{\left(\frac{u(I_x/I_{\text{std}})}{I_x/I_{\text{std}}}\right)^2 + \left(\frac{u(M_x)}{M_x}\right)^2 + \left(\frac{u(M_{\text{std}})}{M_{\text{std}}}\right)^2 + \left(\frac{u(m_x)}{m_x}\right)^2 + \left(\frac{u(m_{\text{std}})}{m_{\text{std}}}\right)^2 + \left(\frac{u(P_{\text{std}})}{P_{\text{std}}}\right)^2}$$

式中:  $u(I_x/I_{\text{std}})/(I_x/I_{\text{std}})$  为积分面积测量的相对标准不确定度;  $u(M_x)/M_x$  为 DON 相对分子质量的相对

标准不确定度; $u(M_{\text{std}})/M_{\text{std}}$ 为苯甲酸相对分子质量的相对标准不确定度; $u(m_x)/m_x$ 为 DON 纯度标准物质称量的相对标准不确定度; $u(m_{\text{std}})/m_{\text{std}}$ 为内标物苯甲酸称量的相对标准不确定度; $u(P_{\text{std}})/P_{\text{std}}$ 为内标物苯甲酸纯度的相对标准不确定度。

$$u(P_{\text{NMR}}) = 99.45\% \times$$

$$\sqrt{(0.018\%)^2 + (0.005 \text{ 1}/296.314 \text{ 9})^2 + (0.002 \text{ 4}/122.120 \text{ 9})^2 + (0.02/10)^2 + (0.02/10)^2 + (0.01\%)^2} = 0.283 \text{ 6}\%$$

由于 2 种方法定值结果精度相同,因此,定值结果不确定度( $u_{\text{char}}$ )计算如下:

$$u_{\text{char}} = \frac{\sqrt{0.047 \text{ 2}\%^2 + 0.283 \text{ 6}\%^2}}{2} = 0.143 \text{ 8}\%$$

**2.6.4 合成标准不确定度** 由以上各不确定度分量可得合成不确定度( $u_{\text{CRM}}$ ),计算如下:

$$u_{\text{CRM}} = \sqrt{u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{sts}}^2 + u_{\text{its}}^2} = 0.157 \text{ 3}\%$$

**2.6.5 扩展不确定度** 扩展不确定度( $U$ ): $U = k \cdot u_{\text{CRM}} = 2 \times 0.157 \text{ 3}\% \approx 0.4\%$  ( $k = 2$ )。

### 3 讨论与结论

DON 在世界范围内的谷物及其制品中广泛存在,给人和动物健康带来巨大的安全风险。标准物质是开展其检测、科研等工作的必要原料之一。然而,目前世界范围内 DON 标准物质相对较少,尤其是其纯度标准物质缺乏,严重制约了相关研究工作的开展。

本研究采用质量平衡法和定量核磁共振法 2 种不同原理的方法对研制的 DON 纯度标准物质进行定值。质量平衡法是一种使用广泛、准确、快速、简便的定值方法,公认用于化合物的纯度测定。它是一种间接定值方法,将水分、挥发性组分、无机离子等杂质的含量从 100% 中扣除,再根据主要组分在有机组分中的百分比来确定化合物的纯度<sup>[36]</sup>。该方法假定所有杂质都能被检测和定量,因此,某些不能够完全定量的杂质(如无紫外吸收的杂质成分)可能会影响定值结果。为了确保质量平衡法测量结果的准确性,我们进一步采用定量核磁共振法进行纯度定值,它是利用分子特定基团的质子数与相应谱峰峰面积之间的关系进行定量,可以有效克服和弥补质量平衡法的不足。并且该方法具有样品前处理简单、样品用量少、测定时间短,结果准确,操作简单等优点,目前已成为一种重要的化合物纯度测定方法。本研究中定量核磁共振法测定结果与质量平衡法测定结果一致,证明定值结果准确、可靠。

不确定度是衡量试验数据质量高低的量化指标,分析不确定度对于提高试验质量具有指导意义<sup>[37]</sup>。本研究中不确定度的评估综合考虑了均匀性检验引入的不确定度、稳定性考察引入的不确定度以及纯度定值(质量平衡法和定量核磁共振法 2 种定值方法)引入的不确定度。其中,定量核磁共振法引入的不确定度占主要部分。并且在定量核磁共振法定值引入的不确定度中,天平称量(包括称量内标物和 DON)引入的不确定度分量相对较高。后期可以通过提高天平的精密度来降低定量核磁共振法定值引入的不确定度,进而提高试验的准确性和可靠性。

通过 COMAR 数据库、国家标准物质信息服务平台查询发现,国内未见 DON 有证纯度标准物质,国际上仅有 Romer 实验室研制的 DON 标准品 B-MYC0320-C 和 B-MYC0325-C,其纯度为 99.4%,不确定度为 0.6%,纯度低于本研究的 DON 纯度标准物质的纯度 99.5%,而不确定度大于本研究中 DON 纯度标准物质的不确定度 0.4%。可见,本研究研制的 DON 纯度标准物质达到国际先进水平。

总之,本研究成功研制了 DON 纯度标准物质,量值为 99.5%±0.4%,均匀性良好,且满足 12 个月以上的稳定性要求。研制单位已采用该方法研制并成功申报国家一级标准物质,编号为 GBW10166,可用于农产品中 DON 的定性和定量检测,以及 DON 检测方法的评价。该标准物质的研制成功,填补了目前国内 DON 一级纯度标准物质的空白,为国家农产品质量安全风险评估与监测溯源体系的建立提供了重要的技术支持与物质保证。

#### 参考文献 References:

- [1] Gagiu V, Mateescu E, Dobre A A, et al. Deoxynivalenol occurrence in *Triticale* crops in Romania during the 2012–2014 period with extreme weather events[J]. *Toxins*, 2021, 13(7): 456.
- [2] Feizollahi E, Roopesh M S. Mechanisms of deoxynivalenol (DON) degradation during different treatments: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2022, 62(21): 5903–5924.

- [3] Dong F, Xing Y J, Lee Y W, et al. Occurrence of *Fusarium* mycotoxins and toxigenic *Fusarium* species in freshly harvested rice in Jiangsu, China[J]. *World Mycotoxin Journal*, 2020, 13(2): 201–212.
- [4] Ganesan A R, Mohan K N, Karthick Rajan D K, et al. Distribution, toxicity, interactive effects, and detection of ochratoxin and deoxynivalenol in food: a review[J]. *Food Chemistry*, 2022, 378: 131978.
- [5] Alfonso N, Luigi C, Luana I, et al. Deoxynivalenol contamination in cereal-based foodstuffs from Spain: systematic review and meta-analysis approach for exposure assessment[J]. *Food Control*, 2022, 132: 108521.
- [6] Hou S L, Ma J J, Cheng Y Q, et al. The toxicity mechanisms of DON to humans and animals and potential biological treatment strategies[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(6): 790–812.
- [7] Sun Y, Jiang J, Mu P Q, et al. Toxicokinetics and metabolism of deoxynivalenol in animals and humans[J]. *Archives of Toxicology*, 2022, 96(10): 2639–2654.
- [8] Wang S, Wu K T, Xue D F, et al. Mechanism of deoxynivalenol mediated gastrointestinal toxicity: insights from mitochondrial dysfunction[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2021, 153: 112214.
- [9] Kamle M, Mahato D K, Gupta A, et al. Deoxynivalenol: an overview on occurrence, chemistry, biosynthesis, health effects and its detection, management, and control strategies in food and feed[J]. *Microbiology Research*, 2022, 13(2): 292–314.
- [10] Sanders M, Landschoot S, Audenaert K, et al. Deoxynivalenol content in wheat dust versus wheat grain: a comparative study[J]. *World Mycotoxin Journal*, 2014, 7(3): 285–290.
- [11] Kalantari H, Khodayar M J, Shirani K, et al. Mycotoxin contamination of consumed rice in Iran: a review[J]. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 2021, 15(4): e94663.
- [12] Lombaert G A, Pellaers P, Roscoe V, et al. Mycotoxins in infant cereal foods from the Canadian retail market[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2003, 20(5): 494–504.
- [13] Herrera M, Bervis N, Carraminana J J, et al. Occurrence and exposure assessment of aflatoxins and deoxynivalenol in cereal-based baby foods for infants[J]. *Toxins*, 2019, 11(3): 150.
- [14] Mishra S, Srivastava S, Dewangan J, et al. Global occurrence of deoxynivalenol in food commodities and exposure risk assessment in humans in the last decade: a survey[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(8): 1346–1374.
- [15] Alfonso N, Luigi C, Luana I, et al. Deoxynivalenol contamination in cereal-based foodstuffs from Spain: systematic review and meta-analysis approach for exposure assessment[J]. *Food Control*, 2022, 132: 108521.
- [16] Bryla M, Ksieniewica-Wozniak E, Waskiewicz A, et al. Natural occurrence of nivalenol, deoxynivalenol, and deoxynivalenol-3-glucoside in Polish winter wheat[J]. *Toxins*, 2018, 10(2): 81.
- [17] Simsek S, Ovando-Martinez M, Ozsisi B, et al. Occurrence of deoxynivalenol and deoxynivalenol-3-glucoside in hard red spring wheat grown in the USA[J]. *Toxins*, 2013, 5(12): 2656–2670.
- [18] Skendi A, Papageorgiou M, Iraikli M, et al. Presence of mycotoxins, heavy metals and nitrate residues in organic commercial cereal-based foods sold in the Greek market[J]. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2020, 15(2): 109–119.
- [19] 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真菌毒素限量: GB 2761—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.  
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration. National standard for food safety limits of mycotoxins in food: GB 2761—2017[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese).
- [20] Rehder Silinski M A, Gilliam J A, Fernando R A, et al. Development of an analytical method for quantitation of deoxynivalenol by UPLC-MS-MS: a preliminary assessment of gestational and lactational transfer in rats[J]. *Journal of Analytical Toxicology*, 2021, 45(6): 566–572.
- [21] Romera D, Mateo E M, Mateo-Castro R, et al. Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC-MS/MS and UPLC-QTOF-MS[J]. *Food Chemistry*, 2018, 267: 140–148.
- [22] Wang Y, Cao X Y, Li Y S, et al. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in rice by UPLC-MS/MS[J]. *Analytical Methods*, 2012, 4(12): 4077–4082.
- [23] van der Veen A M H. Implementing the GUM in the certification of reference materials: the revision of ISO Guide 35[J]. *Accreditation and Quality Assurance*, 2002, 7(1): 2–6.
- [24] Huang T, Li H M, Zhang G W. Metrological technical specification for purity assessment of organic pure substance certified reference materials in China[J]. *Accreditation and Quality Assurance*, 2021, 26(6): 279–284.
- [25] Olivares I R B, Souza G B, Nogueira A R A, et al. Trends in developments of certified reference materials for chemical analysis-focus on food, water, soil, and sediment matrices[J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2018, 100: 53–64.
- [26] 国家市场监督管理总局, 中国计量科学研究院. 国家标准物质资源共享平台[DB/OL]. [2022-12-08]. <https://www.ncrm.org.cn/>.  
State Administration for Market Regulation, National Institute of Metrology, China. National sharing platform for reference materials[DB/OL]. [2022-12-08]. <https://www.ncrm.org.cn/> (in Chinese).
- [27] 国家标准物质研究中心. 一级标准物质技术规范: JJF 1006—1994[S]. 北京: 中国计量出版社, 1994.  
National Research Center for Standard Materials. Technical norm primary reference material: JJF 1006—1994[S]. Beijing: China Metrology Press, 1994 (in Chinese).
- [28] Sun X, Zhang W, Huang T, et al. Purity determination of pyributicarb by internal standard correction-high-performance liquid chromatography-

- quantitative nuclear magnetic resonance[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(25): 6983–6993.
- [29] Yun S, Yoon J, Kim B, et al. Purity assessment of fumonisin B1 by quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy[J]. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2020, 41: 413–417.
- [30] 郭文博, 韩铮, 杨俊花, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的制备与鉴定[J]. *分析测试学报*, 2015, 34(8): 928–933.  
Guo W B, Han Z, Yang J H, et al. Preparation and identification of deoxynivalenol[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2015, 34(8): 928–933 (in Chinese with English abstract).
- [31] 黄挺, 张伟, 全灿, 等. 定量核磁共振新方法在纯度定值的应用[J]. *计量技术*, 2018(9): 8–9.  
Huang T, Zhang W, Quan C, et al. Application of a new quantitative nuclear magnetic resonance method in purity determination [J]. *Measurement Technique*, 2018(9): 8–9 (in Chinese).
- [32] 徐雪晶, 万向勇, 赵锦漪, 等. 氢核磁共振定量法初探[J]. *广东化工*, 2020, 47(4): 104, 87.  
Xu X J, Wan X Y, Zhao J Y, et al. The study on quantitative hydrogen nuclear magnetic resonance[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2020, 47(4): 104, 87 (in Chinese with English abstract).
- [33] 张芬芬, 沈文斌, 徐开兵, 等. 定量核磁共振氢谱测定新药替格瑞洛[J]. *波谱学杂志*, 2020, 37(2): 216–223.  
Zhang F F, Shen W B, Xu K B, et al. A proton nuclear magnetic resonance method for quantitative analysis of ticagrelor[J]. *Chinese Journal of Magnetic Resonance*, 2020, 37(2): 216–223 (in Chinese with English abstract).
- [34] 马惠钟, 杨宏天, 王和欣, 等. 核磁共振定量法测定连翘苷的绝对含量[J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(5): 913–916.  
Ma H Z, Yang H T, Wang H X, et al. Quantitative determination of phillyrin by qNMR[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2022, 42(5): 913–916 (in Chinese with English abstract).
- [35] 张庆合, 杨吉双, 焦慧, 等. 基于质量平衡法的有机物纯度测量技术进展[J]. *化学试剂*, 2020, 42(8): 931–939.  
Zhang Q H, Yang J S, Jiao H, et al. Advancement in organic chemical purity measurement by mass balance method[J]. *Chemical Reagents*, 2020, 42(8): 931–939 (in Chinese with English abstract).
- [36] 赵全东, 高娜, 李天爽, 等. 水产品中铜含量的不确定度评估[J]. *食品安全导刊*, 2023(3): 108–110, 114.  
Zhao Q D, Gao N, Li T S, et al. Uncertainty evaluation for the determination of copper in aquatic products[J]. *China Food Safety Magazine*, 2023(3): 108–110, 114 (in Chinese with English abstract).

责任编辑: 范雪梅