

钟玉心, 陈悦铭, 王宇, 等. SPE-HPLC 法快速测定食品中的米酵菌酸及其膳食风险评估 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 256-262. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100070

ZHONG Yuxin, CHEN Yueming, WANG Yu, et al. Rapid Determination and Dietary Risk Assessment of Bongkreki Acid in Foods by SPE-HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 256-262. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100070

· 分析检测 ·

SPE-HPLC 法快速测定食品中的米酵菌酸及其膳食风险评估

钟玉心, 陈悦铭, 王宇, 黄景初, 彭名军, 苏燕瑜, 陈嘉欣, 蔡伟谊*
(广州市食品检验所, 广东广州 511405)

摘要:建立了固相萃取-高效液相色谱测定食品中米酵菌酸残留的方法, 并评估了米酵菌酸的膳食风险水平。以米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料为研究对象, 样品经过 1% 乙酸-乙腈 (V/V) 提取后, 采用 Poly-Sery MAX 强阴离子交换柱进行净化, Athena C₁₈-WP (4.6×250 mm, 5 μm) 分离, 以甲醇: 1% 乙酸-水 (80:20, V/V) 为流动相, 269 nm 为定量波长, 二极管阵列检测器分析。结果表明, 在优化色谱条件下, 米酵菌酸在 0.01~2.0 μg/mL 的质量浓度范围内线性良好, 相关系数为 0.9999; 在 4 种基质中进行低、中、高 3 个水平加标, 加标回收率在 90.0%~104.0%, 相对标准偏差 < 5% (n=6), 检出限和定量限分别为 2.0、6.7 μg/kg, 该方法前处理简便快速, 精确灵敏, 回收率高, 适用于各类食品中米酵菌酸含量的准确定量分析; 膳食风险评估结果表明, 米酵菌酸的膳食危害商值为 0.0747, 远低于临界值 1, 对消费者的膳食安全构成威胁的概率较低。

关键词: 固相萃取, 高效液相色谱, 米酵菌酸, 膳食风险, 离子交换柱

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)17-0256-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020100070



本文网刊:

Rapid Determination and Dietary Risk Assessment of Bongkreki Acid in Foods by SPE-HPLC

ZHONG Yuxin, CHEN Yueming, WANG Yu, HUANG Jingchu, PENG Mingjun, SU Yanyu,
CHEN Jiixin, CAI Weiyi*

(Guangzhou Institute of Food Inspection, Guangzhou 511405, China)

Abstract: A solid phase extraction (SPE)-high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of bongkreki acid (BKA) in foods was established and the dietary risk level was assessed. Rice flour, tremella, corn flour and coconut fermented beverage were taken as the research objects. The samples were extracted with 1% acetic acid acetonitrile(V/V), and then purified on a Poly-Sery MAX cartridge and finally separated on a Athena C₁₈-WP(4.6×250 mm, 5 μm) column using a mobile phase consisting of methanol and 1% acetic acid aqueous solution (80:20, V/V). BKA was analyzed by the diode array detector at 269 nm wavelength. The results showed that under the optimized chromatographic conditions, the BKA had a good linearity in the concentration range of 0.01~2.0 μg/mL, and the correlation coefficient was 0.9999. Three spiked levels (low, medium, high) were carried out in 4 matrices, the spiked recovery rate was 90.0%~104.0%, the relative standard deviation was less than 5% (n=6), and the detection limit and quantification limit were 2.0 μg/kg and 6.7 μg/kg, respectively. This method is simple, rapid, accurate and sensitive, and has a high recovery rate. It is suitable for the accurate quantitative analysis of BKA in various foods. The results of the dietary risk assessment showed that the dietary hazard quotient of BKA was 0.0747, which was far below the threshold value of 1, and the probability of posing a threat to consumers' dietary safety was low.

收稿日期: 2020-10-14

基金项目: 广东省食品质量安全重点实验室开放课题 (2020KF006); 广州市科技计划项目 (201804010403)。

作者简介: 钟玉心 (1986-), 女, 本科, 工程师, 研究方向: 食品添加剂, E-mail: 1121947359@qq.com。

* 通信作者: 蔡伟谊 (1987-), 女, 本科, 高级工程师, 研究方向: 食品添加剂, E-mail: 260983950@qq.com。

Key words: solid phase extraction; high performance liquid chromatography; Bongkrelic acid; dietary risk; ion exchange column

米酵菌酸(Bongkrelic acid, BKA),也叫黄杆菌毒素 A,是椰毒假单胞菌属产生的一种线粒体毒素,其化学结构较为稳定(见图 1),主要存在于谷类发酵制品、薯类制品、银耳、黑木耳及椰子发酵制品等,难以去除^[1-3]。研究表明,米酵菌酸通过抑制线粒体 ATP 的合成,损害肝、脑以及肾脏,人食用了被米酵菌酸污染的食物会导致严重的食源性疾病^[4-7]。近年来,米酵菌酸中毒事件时有发生,给消费者的身体健康造成重大威胁^[8-11]。

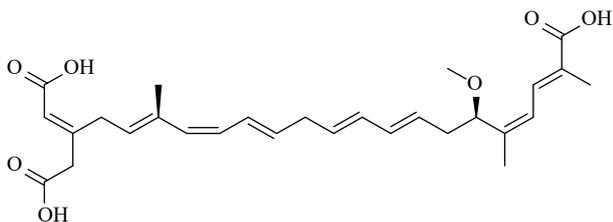


图 1 米酵菌酸的化学结构

Fig.1 Chemical structure of bongkrelic acid

在 GB 7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》中,规定银耳及其制品中米酵菌酸含量不能超 0.25 mg/kg^[12],但未对其他食品作出明确的限量要求。有研究表明,摄入 1~1.5 mg 米酵菌酸可使人致命^[11]。由于缺乏相应技术规范,在生产过程中容易造成米酵菌酸超标,导致米酵菌酸中毒事件频发^[13-14],因此,有必要对市场流通的银耳及其制品、酵米面及其制品和发酵型饮料等食品中米酵菌酸的含量进行检测,并对其膳食暴露风险进行评估。为此,建立一种准确、快速、高效的米酵菌酸检测方法,对加强食品安全监管尤为关键。

目前,米酵菌酸的测定方法主要有荧光免疫层析法^[15]、高效液相色谱法^[16-20]、液相色谱质谱法^[21-24]等。其中荧光免疫层析法方便快捷,适用于现场快速筛查,但其假阳性率较高,难以满足监管执法要求;质谱法灵敏度高、检出限低,但设备昂贵,难以推广。我国现行的检测标准《GB 5009.189-2016 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定》^[25]只适用于银耳及其制品、发酵米面及其制品等样品,基质类别覆盖面小,而且液液萃取法需要消耗大量高毒性的有机溶剂,对环境不友好,回收率低^[17-18]。

本研究拟建立一种 SPE-HPLC 法快速测定食品中米酵菌酸含量的方法,并结合膳食暴露风险评估技术,对不同类别食品中米酵菌酸的含量展开初步风险评估,以期客观、科学地评估食品中米酵菌酸的含量状况,为食品安全生产及政府相关部门的监管提供科学参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

米酵菌酸标准品 纯度 $\geq 99.9\%$,上海安谱实验

科技股份有限公司;甲醇 LC/MS 级,美国 Thermo 公司;氨水(优级纯)、甲酸、乙酸、乙腈(色谱纯)、无水硫酸钠、氯化钠、无水硫酸镁(分析纯) 天津科密欧化学试剂公司;米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料样品 均购自广州市某农贸市场。

Waters 2695 高效液相色谱仪(配 PDA 检测器)、Oasis HLB 固相萃取柱(500 mg/6 mL)、XSelect HSS T3(4.6 \times 250 mm, 5 μ m) 美国 Waters 公司;CP225D 电子天平 德国赛多利斯公司;TurboVap 氮吹仪 美国 Caliper 公司;Milli-Q Academic 超纯水系统 德国默克密理博公司;MA3basic 圆周振荡器 德国 IKA 公司;台式高速冷冻离心机 3-18 KS 德国 SIGMA 公司;C₁₈ 固相萃取柱(1000 mg/6 mL)、弱阴离子交换柱 Strata[®]-X-AW(500 mg/6 mL) 美国 Phenomenex 公司;Poly-Sery MAX 固相萃取柱(1000 mg/10 mL)、色谱柱(Athena C₁₈-WP, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m) 上海安谱实验科技股份有限公司;Hypersil GOLD aQ(4.6 \times 250 mm, 5 μ m) 美国赛默飞公司;Eclipse XDB-C₁₈(4.6 \times 250 mm, 5 μ m) 美国安捷伦公司。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

1.2.1.1 米酵菌酸标准储备液(1000 μ g/mL) 准确称取米酵菌酸标准品 10 mg(精确至 0.01 mg),用甲醇溶解后,转移至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。置于 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存。

1.2.1.2 米酵菌酸标准中间液(10 μ g/mL) 准确吸取 100 μ L 米酵菌酸标准储备液至 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度。置于 2~8 $^{\circ}$ C 冰箱中避光保存。

1.2.1.3 米酵菌酸标准工作液 分别移取适量米酵菌酸标准中间液,用甲醇稀释定容,配制成 0.01、0.05、0.1、0.3、0.5、1.0、2.0 μ g/mL 的标准工作溶液,临用时配制。

1.2.2 样品前处理

1.2.2.1 样品提取 准确称取 10 g 样品(银耳样品称取 5 g,精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 超纯水,20 mL 1% 乙酸-乙腈(V/V),4 g 无水硫酸钠、1 g 氯化钠,2 g 无水硫酸镁,迅速振散混匀,涡旋提取 30 min,以 8000 r/min 离心 3 min,取全部乙腈层浓缩至近干,3 mL 甲醇复溶,待净化。

1.2.2.2 样品净化 依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 水活化 Poly-Sery MAX 强阴离子交换柱,保持填料湿润。加入 100 μ L 氨水将 3 mL 上样液 pH 调节至 9~10 过柱,弃去流出液,依次用 8 mL 水和 8 mL 甲醇淋洗小柱后,弃去淋洗液,最后用 8 mL 甲酸-甲醇溶液(4%)洗脱并将洗脱液浓缩近干后用 1 mL 甲醇

定容,过 0.45 μm 有机微孔滤膜,上机测定。

1.2.3 色谱条件 Athena C₁₈-WP 液相色谱柱(4.6×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇:1% 乙酸-水(80:20, V/V); 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 波长 269 nm; 进样量 50 μL 。

1.2.4 液相色谱条件的优化

1.2.4.1 检测波长的选择 检测波长对方法的灵敏度、准确度及选择性具有较为关键的影响,本实验对米酵菌酸在 190~400 nm 进行全波长扫描,根据“收最大,干扰最小吸”的原则,选择出最佳的检测波长。

1.2.4.2 色谱柱的选择 色谱柱是色谱分离的核心。本实验以甲醇:1% 乙酸-水(80:20, V/V)为流动相,在其他参数相同的条件下,分别考察了米酵菌酸标准溶液在 Athena C18-WP、XSelect HSS T3、Hypersil GOLD aQ 及 Eclipse XDB-C18 4 种不同 C18 柱上的分离情况,筛选出最佳色谱柱。

1.2.4.3 流动相比比例的选择 米酵菌酸具有 3 个羧基,在酸性体系可有效抑制米酵菌酸的解离,得到更对称的峰型。因此,本实验在甲醇:1% 乙酸-水(80:20, V/V)体系中,采用米酵菌酸标准溶液,分别考察了 75%、80%、85% 3 个不同比例甲醇初始流动相的出峰情况,优化出最佳的流动相配比。

1.2.5 样品前处理方法的优化

1.2.5.1 样品提取溶剂的优化 为优化出最佳的样品提取溶剂,本实验采用空白样品加标的方式,选取米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料为基质,以加标回收率作为评价指标,分别考察了甲醇、氨水-甲醇-水(1:80:19)、乙腈、1% 乙酸-乙腈(1:99, V/V)的提取效果。

1.2.5.2 固相萃取柱的选择 在无净化处理的情况下,杂质干扰大,无法进行准确测定。因此,在其他条件一定的情况下,本实验采用银耳作为研究基质,分别考察了 C₁₈、HLB、弱阴离子交换柱 strata X-AW、强阴离子交换柱 CNW Poly-Sery MAX 4 种固相萃取柱的净化效果,筛选出最佳的净化柱。

1.2.6 米酵菌酸稳定性考察 有关文献提到米酵菌酸在酸性环境及光照情况下不稳定^[16],本实验选取米酵菌酸五个浓度(0.1~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的标准品分别置于冰箱避光保存、室内光照 3 d、酸性条件保存 3 d,在最佳色谱条件下,分别进行上机检测,通过对比其峰面积的变化,考察米酵菌酸稳定性。

1.2.7 方法学考察

1.2.7.1 线性范围及检出限 取系列米酵菌酸标准工作液,经高效液相色谱分析,以米酵菌酸的浓度为横坐标(x),峰面积为纵坐标(y)进行线性回归分析,绘制标准曲线;以 3 倍 S/N 为检出限,10 倍 S/N 为定量限。

1.2.7.2 回收率和精密度 选择米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料 4 种基质空白样品,加入低、中、

高(米粉、玉米粉及椰子发酵饮料:0.030、0.060、0.10 mg/kg; 银耳:0.060、0.012、0.10 mg/kg)3 个水平的米酵菌酸标准溶液,每个加标水平进行 6 次平行测定,按照 1.2.2 节进行前处理后,进行高效液相色谱测定,根据测定结果对其回收率及精密度进行分析。

1.3 膳食风险评估

在食品安全风险评估方面,我国已取得一些成果,但仍处于初级阶段,相关工作仍参考国外膳食暴露风险评估技术^[26-27]。本研究参照文献^[28]的评价方法,计算米酵菌酸的危害商 HQ,当 HQ>1 时,表明米酵菌酸的膳食暴露风险较大;反之,当 HQ<1 时,则其暴露风险较小。HQ 的具体计算公式如下:

$$HQ = \frac{\text{理论含量} \times \text{平均膳食量}}{\text{平均体重} \times \text{ADI} \times 1000}$$

其中“理论含量”采用食品中米酵菌酸的含量,在未检出的样品中,米酵菌酸的含量以上述所建方法检出限的一半计算;参照文献及国家食品安全风险评估委员会的相关规定,米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料的每日平均膳食量分别按 300、300、300、500 g 计算;平均体重按 60 kg 计算;ADI 为每日允许摄入量。

1.4 数据处理

本实验采用 SPSS Statistics 22(美国 IBM 公司)及 Microsoft Excel(美国 Microsoft 公司)对检测结果进行相关分析。

2 结果与分析

2.1 液相色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 由米酵菌酸的全波长扫描图(图 2)可知,在 269 nm 处出现最大吸收峰,235 nm 次之,根据“收最大,干扰最小吸”的原则,本实验采用 269 nm 为米酵菌酸的最佳检测波长。此结果与李红艳等^[16]报道的一致。

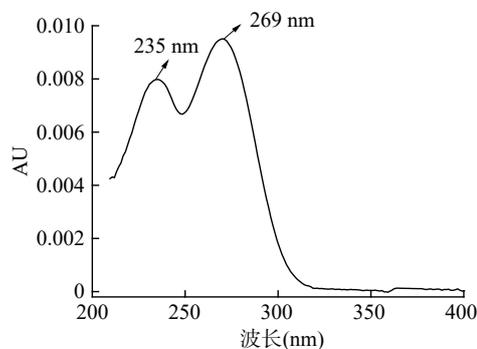


图 2 米酵菌酸吸收光谱图

Fig.2 Absorption spectrum of bongkrekic acid

2.1.2 色谱柱的选择 分别采用 Athena C₁₈-WP、XSelect HSS T3、Hypersil GOLD aQ 及 Eclipse XDB-C₁₈ 4 种不同型号的 C₁₈ 柱对米酵菌酸标准溶

液进行分析, 结果见图 3。由图 3 可知, 米酵菌酸在 pH 耐受范围为 1.5~10 的 Athena C₁₈-WP 液相色谱柱上能够得到最佳的分离效果和稳定的响应值, 基质峰不对目标峰造成干扰, 因此本实验选择 Athena C₁₈-WP 色谱柱进行分离。

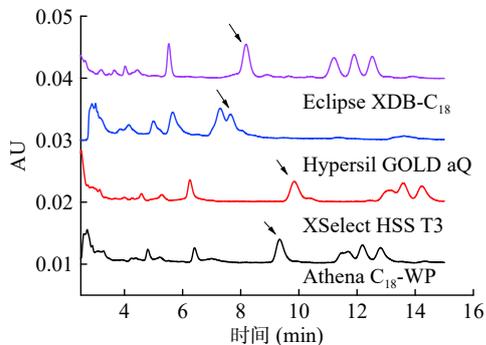


图 3 不同 C₁₈ 柱的分离效果

Fig.3 Separation efficiency of different C₁₈ Columns

注: “→”所标注的峰为米酵菌酸。

2.1.3 流动相比例的选择 按照 1.2.4.3 节的方法进行试验, 结果见图 4。由图 4 可知, 当甲醇比例为 75% 时, 米酵菌酸的出峰时间为 13.2 min, 且峰宽较大, 分离度差; 当提高甲醇的比例 85% 时, 米酵菌酸的出峰时间提前至 6.2 min, 峰形较好, 但空白基质样品在 6.3 min 附近有干扰峰, 不利于准确测定。因此将流动相调节为 1% 乙酸水-甲醇(20:80)等度洗脱, 米酵菌酸在 9.5 min 出峰, 出峰时间短, 且无杂质干扰。

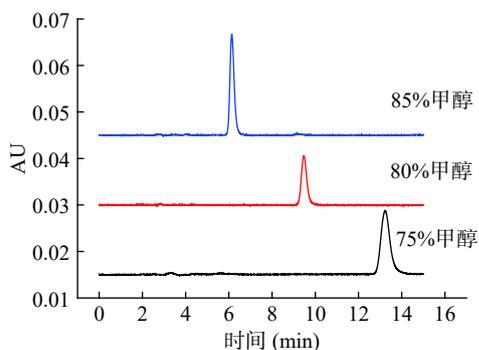


图 4 不同流动相中米酵菌酸的标准色谱图

Fig.4 Standard chromatograms of BKA in different mobile phase

2.2 样品前处理条件的优化

2.2.1 样品提取溶剂的优化 以米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料为基质, 分别考察甲醇、氨水-甲醇-水(1:80:19, V/V)、乙腈及 1% 乙酸-乙腈(1:99, V/V)4 种不同提取溶剂的提取效果, 回收率结果见表 1。由表 1 可知, 采用甲醇及乙腈作为提取溶剂时, 对 4 种基质中米酵菌酸的回收率只有 40%~65%, 不能满足分析要求; 采用氨水-甲醇-水作为提取溶剂时, 米粉、玉米粉及椰子发酵饮料中的回收率较高, 但是在银耳中的回收率只有 60%, 而且甲醇和水相

不分离导致氮吹浓缩时间较长; 另外, 对于成分复杂的银耳样品, 由于多糖(中性多糖和酸性多糖)含量较高, 碱性条件下提取会导致多糖及色素大量溶出, 且提取液体较为粘稠, 在过柱时容易导致固相萃取柱堵塞或者过载; 1% 乙酸-乙腈对 4 种样品基质中米酵菌酸的提取效果较好, 回收率均大于 90%, 而且, 在酸性条件下, 米酵菌酸的解离受到抑制, 有利于从水相转移到有机相, 另外, 水相层可以去除部分水溶性干扰物, 减少固相萃取柱过载现象, 因此, 本实验 1% 乙酸-乙腈(1:99, V/V)作为最佳提取溶剂。

表 1 不同提取剂对米酵菌酸的回收率
Table 1 The recovery rate of bongkrekkic acid by different extractants

样品	加标回收率(%)			
	甲醇	氨水-甲醇-水 (1:80:19, V/V)	乙腈	1%乙酸-乙腈 (1:99, V/V)
米粉	65	95	55	96
银耳	45	60	40	92
玉米粉	65	95	50	94
椰子发酵饮料	60	80	45	97

2.3 固相萃取柱的选择

本实验考察了 C₁₈、HLB、弱阴离子交换柱 strata X-AW, 强阴离子交换柱 CNW Poly-Sery MAX 4 种固相萃取柱的净化效果, 结果见图 5。由图 5 可知, 米酵菌酸在 C₁₈、HLB 固相萃取柱上几无保留, 而在阴离子交换柱 strata X-AW, Poly-Sery MAX 有保留, 而非文献报道的米酵菌酸于弱阴离子交换柱上无法保留^[29]。

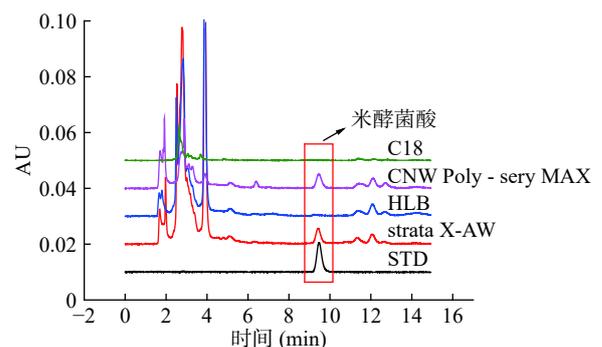


图 5 不同型号 SPE 小柱净化效果

Fig.5 Purification efficiency of different SPE

Strata X-AW 为混合弱阴离子交换柱, 含有弱碱性基团, 包括伯胺基(-NH₂), 仲胺基(-NHR), 叔胺基(-NR₂), 在水中能解离出 OH 而呈弱碱性, 可在中性和酸性条件下使用, 其正电基团能与目标化合物的羧基相结合而使得米酵菌酸保留; Poly-Sery MAX 为混合性强阴离子交换柱, 含有强碱性季胺基团, pH 耐受范围为 2~12, 在水溶液中任何 pH 条件下都能使硅胶键合相带上正电荷, 正电基团能与米酵菌酸的羧基相结合, 所以上样液 pH 调节至 9~10 可使得米酵菌酸完全离子化为阴离子, 与强阴离子交换柱的季胺

正离子发生高效的离子相互作用而使得米酵菌酸保留。从图5可知, Strata X-AW及 Poly-Sery MAX柱子的净化效果较好,米酵菌酸出峰位置无其他杂质峰干扰。

另外,本实验对 strata X-AW及 Poly-Sery MAX固相萃取柱的加标回收率进行了考察,结果显示,弱阴离子交换柱子 strata X-AW的加标回收率为76%,回收率较低;而 Poly-Sery MAX强阴离子交换柱子的加标回收率达98%,满足检测要求。因此,本实验选用 Poly-Sery MAX固相萃取柱用于样品的净化处理。净化步骤为:依次用5 mL甲醇和5 mL水活化小柱;用氨水将待净化液的pH调节至9~10过柱,弃去流出液,依次用水和甲醇淋洗小柱,除掉糖类及蛋白质,弃去淋洗液;最后用4%甲酸-甲醇溶液洗脱,并将洗脱液浓缩近干后用1 mL甲醇定容。

2.4 米酵菌酸稳定性考察

按照1.2.6节进行米酵菌酸的稳定性试验,结果见图6。由图6可知,在室内灯光照射与酸性条件下米酵菌酸较为稳定,实验过程使用的酸性条件及室内灯光照射不会影响检测结果。

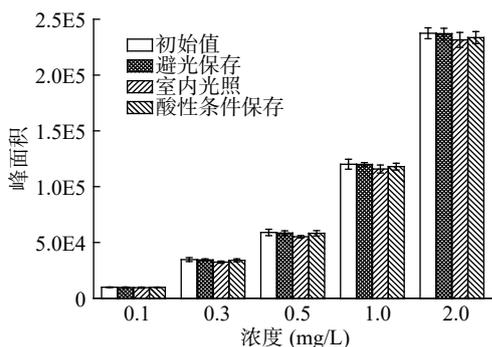


图6 保存条件对米酵菌酸稳定性的影响
Fig.6 Effect of storage conditions on stability of bongkreikic acid

2.5 方法学考察

2.5.1 线性范围及检出限 配制系列标准工作液,在上述最佳分析条件下进行上机检测,以浓度为横坐标,相应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线,线性方程为 $y=1.49 \times 10^5 x - 319$ ($R^2=0.9999$)。结果表明,在0.01~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性良好。米酵菌酸的检出限($S/N=3$)和定量限($S/N=10$)分别为2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和6.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5.2 回收率和精密度 采用米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料4种不同基质,考察所建方法的回收率及精密度($n=6$),结果见表2。由表2可知,4种样品平均加标回收率在90.0%~104.0%,相对标准偏差小于5%,结果表明所建方法精密度高,重现性好,适用于四种高危基质中米酵菌酸的测定。

表2 米酵菌酸回收率及精密度结果($n=6$)
Table 2 Results of recovery and relative standard deviation ($n=6$)

样品	添加量 (mg/kg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
米粉	0.030	95.0~100.3	96.8	1.94
	0.060	92.3~101.7	96.1	3.95
	0.10	98.10~105.0	100.7	2.37
银耳	0.060	90.0~93.3	91.7	1.99
	0.012	90.0~95.0	92.4	1.85
	0.10	98.0~102.1	100.3	1.64
玉米粉	0.030	90.0~96.7	92.5	2.73
	0.060	91.7~97.5	94.0	2.13
	0.10	97.1~104.0	99.1	3.05
椰子发酵饮料	0.030	87.3~93.3	90.0	2.55
	0.060	91.8~100.0	97.3	2.97
	0.10	102.6~105.1	104.0	0.97

2.6 膳食风险评估

为评估广州市在售食品中米酵菌酸膳食风险水平,从广州市市场随机抽取米粉、银耳、玉米粉、椰子发酵饮料样品各10份,采用所建立的方法进行分析。结果显示,所抽取的40分样品中,共有8个样品检出米酵菌酸,含量在10.6~50.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,均低于GB 7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》中0.25 mg/kg 的限量,其中银耳样品检出米酵菌酸最高达50.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$,其余样品均未检出米酵菌酸(含量低于2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

目前,国内外对米酵菌酸的ADI值未有明确的规定。本文根据风险最大化原则,参考GB 7096-2014《食品安全国家标准 食用菌及其制品》规定银耳及其制品米酵菌酸理化指标,中国居民的平均体重以60 kg计,每日平均膳食量按0.5 kg计,估算出米酵菌酸的ADI值为2.08 $\mu\text{g}/(\text{kg bw})$;以随意抽取的40份样品中米酵菌酸的含量为对象,按1.3节的方法对米酵菌酸膳食风险进行评估,结果见表3。由表3可知,米酵菌酸的膳食危害商值为0.0747,远低于临界值1,即米酵菌酸的膳食风险较低,对消费者的膳

表3 米酵菌酸膳食风险评估计算结果

Table 3 The results of the dietary risk assessment of bongkreikic acid

样品	米酵菌酸检测结果				膳食量 (kg/d)	参考限量值 (mg/kg)	NEDI ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	危害商HQ
	检出样品数	含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)						
米粉	2	35.6	10.8	/	0.3	0.25	0.0262	0.0747
银耳	3	50.8	38.2	40.6	0.3		0.0683	
玉米粉	2	30.8	10.6	/	0.3		0.0247	
椰子发酵饮料	1	24.4	/	/	0.5		0.0362	

食安全构成威胁的概率较低。

3 结论

本研究建立了食品中米酵菌酸含量的检测方法。本方法处理简单快速、有机试剂消耗量少、准确性高、适用范围较广,方法学指标满足实际检测要求,是现有标准的细化和补充,适用于对米酵菌酸的风险监控,对检测部门开展相应的常规分析检测具有重要的意义;以随意抽取的 40 份样品中米酵菌酸的含量为对象,结合膳食风险评估方法,初步评估了米酵菌酸的膳食暴露风险水平。结果显示,米酵菌酸的膳食暴露风险概率为 0.0747,远低于临界值 1,对一般消费者的健康产生威胁的概率较低。

目前,我国只针对银耳及其制品中米酵菌酸含量作出限量要求,而其他食品中的米酵菌酸含量仍未有明确的规定。因此,建议相关研究人员针对其他食品中米酵菌酸含量进行全面、科学的安全风险评估,并建立相关食品安全标准规范,以加强对米酵菌酸的安全监控,保障消费者的健康。

参考文献

- [1] E S Gudo, K Cook, A M Kasper, et al. Description of a mass poisoning in a rural district in Mozambique: The first documented bongkrelic acid poisoning in Africa[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2018, 66(9): 1400-1406.
- [2] 王岗,郭云昌,裴晓燕.米酵菌酸的生物合成及其机制研究进展[J].*卫生研究*, 2012, 41(2): 341-344. [Wang Gang, Guo Yunchang, Pei Xiaoyan, et al. Research progress on the biosynthesis of orychoic acid and its mechanism[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2012, 41(2): 341-344.]
- [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(01): 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(01): 260-267.]
- [4] N Moebius, C Ross, K Scherlach, et al. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrelic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*[J]. *Chem Biol*, 2012, 19(9): 1164-1174.
- [5] 刘坤,孟灵芝,王圣博,等.米酵菌酸在食品检测中的研究新进展[J].*吉林农业*, 2018, 434(17): 87. [Liu Kun, Meng Lingzhi, Wang Shengbo, et al. New progress in the research of orychoic acid in food testing[J]. *Agriculture of Jilin*, 2018, 434(17): 87.]
- [6] Kano A, Iwasaki T, Shindo M. Bongkrelic acid facilitates glycolysis in cultured cells and induces cell death under low glucose conditions[J]. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 2019, 20: 100683.
- [7] Fujita S, Suyama M, Matsumoto K, et al. Synthesis and evaluation of simplified functionalized bongkrelic acid analogs[J]. *Tetrahedron*, 2018, 74(9): 962-969.
- [8] 施蕊娟,戴运达,张能培,等.米酵菌酸中毒引起急性肝功损害死亡 1 例[J].*法医学杂志*, 2020, 36(3): 396-398. [Shi Ruijuan, Dai Yunda, Zhang Nengpei, et al. A death case of acute liver damage caused by orychoic acidosis[J]. *Journal of Forensic*

Medicine, 2020, 36(3): 396-398.]

- [9] 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 *Farino fermentans*) food poison in Yunnan province[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(23): 8098-8101.]
- [10] Mehruba Anwar, Amelia Kasper, Alaina R. Steck, et al. Bongkrelic acid—a review of a Lesser-Known Mitochondrial toxin[J]. *Journal of Medical Toxicology*, 2017, 13(2): 173-179.
- [11] Jinghua L I, Zhou L U, Long C, et al. An investigation of bongkrelic acid poisoning caused by consumption of a nonfermented rice noodle product without noticeable signs of spoilage[J]. *Journal of Food Protection*, 2019, 82(10): 1650-1654.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 7096-2014 食品安全国家标准 食用菌及其制品[S].北京:中国标准出版社, 2014. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. GB 7096-2014 Food safety national standard-Edible fungi and their products[S]. Beijing: China Standard Press, 2014.]
- [13] 王海燕,宋曼丹,王建,等.广东省首起米粉米酵菌酸中毒病原菌鉴定研究[J].*中国食品卫生杂志*, 2019(4): 81-81. [Wang Haiyan, Song Mandan, Wang Jian, et al. Identification of the pathogen in rice noodles in relation to food poisoning caused by bongkrelic acid in Guangdong Province[J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2019(4): 81-81.]
- [14] Falconer T M, Kern S E, Brzezinski J L, et al. Identification of the potent toxin bongkrelic acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak[J]. *Forensic Science International*, 2016(270): e5-e11.
- [15] 张小波,温国原,辛苗苗,等.米酵菌酸荧光定量检测卡的开发和应用[J].*食品安全质量检测学报*, 2019, 10(11): 3584-3589. [Zhang Xiaobo, Wen Guoyuan, Xin Miaomiao, et al. Development and application of fluorescence quantitative detection card for bongkrelic acid[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2019, 10(11): 3584-3589.]
- [16] 李红艳,金燕飞,黄海智,等.高效液相色谱-二极管阵列检测器结合固相萃取法快速测定食品中米酵菌酸残留[J].*食品科学*, 2016, 37(24): 247-251. [Li Hongyan, Jin Yanfei, Huang Haizhi, et al. Fast determination of bongkrelic acid in foods using mixed-mode weak anion exchange solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)[J]. *Food Science*, 2016, 37(24): 247-251.]
- [17] 侯佰立.固相萃取-高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸残留[J].*现代食品*, 2019(9): 169-172. [Hou Baili. Fast determination of bongkrelic acid in foods using solid phase extraction-high performance liquid chromatography[J]. *Modern Food*, 2019(9): 169-172.]
- [18] 周霞,陈万勤,傅红雪,等.全自动固相萃取-超高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸含量[J].*安徽农业科学*, 2018, 46(8): 159-160,182. [Zhou Xia, Chen Wanqin, Fu Hongxue, et al.

Fast determination of bongkreki acid in food by auto solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 159-160,182.]

[19] 苏永恒, 张伟, 张榕杰, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定食品中米酵菌酸含量[J]. 中国卫生工程学, 2017(4): 438-439.

[Su Yongheng, Zhang Wei, Zhang Rongjie, et al. Determination of bongkreki acid in food by solid extraction-high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2017(4): 438-439.]

[20] 任琳, 秦忠雪, 胡彬, 等. 尿样中米酵菌酸高效液相色谱法测定[J]. 中国公共卫生, 2017, 35(3): 439-440. [Ren Lin, Qin Zhongxue, Hu Bin, et al. Determination of bongkreki acid in urban with high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Public Health, 2017, 35(3): 439-440.]

[21] 王俊虎, 乔勇升, 王建, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定六神曲中的米酵菌酸[J]. 色谱, 2019, 37(9): 963-968.

[Wang Junhu, Qiao Yongsheng, Wang Jian, et al. Rapid determination of bongkreki acid in Liushenqu by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2019, 37(9): 963-968.]

[22] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法测定血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸[J]. 质谱学报, 2020, 041(3): 268-277. [Zhang Xiuyao, Cai Xinxin, Zhang Xiaoyi, et al. Determination of bongkreki acid and isobongkreki acid in plasma and urine by ultra-Performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2020, 041(3): 268-277.]

[23] 徐小民, 陈苒, 黄百芬, 等. 液相色谱-串联质谱法测定食源性中毒患者血浆中米酵菌酸[J]. 预防医学, 2019, 31(12): 1205-1209. [Xu Xiaomin, Chen Jie, Huang Baifen, et al. Determination of bongkreki acid in plasma of food poisoning patients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Preventive Medicine, 2019, 31(12): 1205-1209.]

[24] 李红娜, 袁飞, 张辰阳, 等. 液相色谱和飞行时间质谱联用检测米酵菌酸[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 319-323. [Li Hongna, Yuan Fei, Zhang Chenyang, et al. The research of detection bongkreki acid (BA) by LC-ESI-TOF technology[J]. The Food Industry, 2018, 39(7): 319-323.]

[25] 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. GB5009.189-2016 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, National Food and Drug Administration. GB5009.189-2016 Food safety national standard-the determination of rice yeast acid in food[J]. Beijing: China Standard Press, 2016.]

[26] 平华, 杜远芳, 颜世伟, 等. 猕猴桃农药残留状况及风险评估[J]. 食品工业, 2019, 279(12): 208-213. [Ping Hua, Du Yuanfang, Yan Shiwei, et al. Pesticide residues status and risk assessment of kiwifruit[J]. The Food Industry, 2019, 279(12): 208-213.]

[27] Feng J, Tang H, Chen D, et al. Monitoring and risk assessment of pesticide residues in tea samples from China[J]. Human & Ecological Risk Assessment An International Journal, 2015, 21(1): 169-183.

[28] 林涛, 彭丽媛, 陈兴连, 等. 滇红茶加工过程中氟虫腈及其代谢物降解规律分析及膳食暴露评估[J]. 食品工业科技, 2020, 41(21): 218-223. [Lin Tao, Peng Liyuan, Chen Xinglian, et al. Degradation of fipronil and its metabolites during processing of yunnan black tea and dietary exposure assessment[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(21): 218-223.]

[29] 周鹏. 超高效液相色谱串联质谱法测定银耳中米酵菌酸[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(22): 123-126. [Zhou Peng. Determination of bongkreki acid in tremella fuciformis berk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Research and Development, 2015, 36(22): 123-126.]