

小麦脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON) 检测方法的研究

欧阳毅,程树峰,唐芳,张海洋

(国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:建立了一种新的小麦脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)高效液相色谱检测方法。采用聚乙二醇和水对小麦样品进行振荡提取,提取液分别用活性炭、柱层析硅胶、中性氧化铝、酸性氧化铝、碱性氧化铝净化,比较几种吸附剂对小麦 DON 净化效果。结果表明,用酸性氧化铝净化效果最好,除杂率为 66.3%,净化液通过 0.22 μm 聚醚砜滤膜可直接用于 HPLC 检测;色谱条件:分离柱为 C18 柱;流动相为甲醇:水(20:80);波长为 230 nm。三水平加标平均回收率为 91.0%~103.7%,不同污染水平的小麦阳性样品精密度试验相对标准偏差(RSD)为 2.3%~8.5%;与免疫亲和柱(IAC)净化方法比较,方法间误差为 2.3%~8.4%。本方法具有操作简便、快速、准确、成本低,可满足小麦 DON 大宗样品定量测定的要求。

关键词:小麦 DON;酸性氧化铝;净化;HPLC 检测

中图分类号:TS 207.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2015)03-0069-04

Detection method of Deoxynivalenol in wheat

OU Yang-yi, CHENG Shu-feng, TANG Fang, ZHANG Hai-yang

(Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

Abstract: A new method was established to detect deoxynivalenol (DON) in wheat by high liquid chromatography detection. The wheat samples were treated by oscillation with polyethylene glycol and water. Some kinds of adsorption materials like activated carbon, silica gel column chromatography, neutral alumina, acidic alumina, basic alumina were used to purify the extract, respectively, to compare the purifying effect on DON in wheat. The result showed that acidic alumina had the best purifying effect with the rate of removing impurities 66.3%. The purification liquid though 0.22 μm polyethersulfone membrane was detected by HPLC directly with C18 column, mobile phase of methanol: water (20:80) and wavelength of 230 nm. The percent recovery in three levels was 91.0%~103.7%. The range of the relative standard deviation (RSD) of positive wheat samples with different pollution levels was 2.3%~8.5%. Compared with the result of another method by immunoaffinity column cleanup, the deviation of two methods was 2.3%~8.4%. The characteristic of simple, rapid, accurate, and low cost makes this method suitable to meet the needs of quantitative detection of DON in wheat with large number of samples.

Key words: DON in wheat; acidic alumina; purification; HPLC

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)又称呕吐毒素(Vomitoxin),是一种主要由禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、黄色镰孢菌(*F. culmorum*)等镰孢菌属真菌产生的单端孢霉烯族毒素^[1]。DON 主要污染小麦、大麦、玉米等谷类作物^[2],对谷物污染率和污染水平居镰孢菌毒素之首^[3]。DON 可导致不同程度的腹泻、呕吐、发烧等急性中毒症状,且与免疫抑制、

克山病、食管癌等疾病也有密切联系,给人畜健康、农业经济造成极大危害和损失^[4-6],世界上屡屡有人类 DON 中毒事件的报导^[7]。小麦是全球主要粮食作物之一,也是 DON 最易污染作物之一。因此,世界各国对小麦 DON 的污染都制定了严格限量标准,美国和欧盟分别为 2 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 1 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8],我国小麦中 DON 的限量标准为 1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[9]。

近几十年来,国内外有关 DON 污染检测技术的研究有大量的报导,已用于粮食、食品检验的方法主

收稿日期:2014-03-06

作者简介:欧阳毅,1987 年出生,女,硕士研究生。

要有薄层层析法 (TLC)^[10-11]、气相色谱 (GC)^[12-13]、高效液相色谱 (HPLC)^[14-16] 和酶联免疫 (ELISA)^[17-18] 等。TLC 法是一种经典的真菌毒素检测方法,曾在相当长时间里被广泛应用于真菌毒素的检测^[19-20],但这种方法操作繁琐、误差较大,随着高效色谱技术快速发展,这项技术渐渐被替代;GC 法也曾被广泛应用的一种真菌毒素检测方法,但方法操作复杂,样品需要衍生等问题,目前使用也逐渐减少;ELISA 法是一种粮食中 DON 污染的快速筛查方法,有时也可用于 DON 的半定量测定,这种方法在国内外使用十分普遍,但会因抗体与 DON 的乙酰化类似物的交叉反应而易出现假阳性现象^[21-22]。目前采用免疫亲和柱净化,HPLC 检测是国内外粮食中 DON 检测使用最为普遍的一种方法,美国^[23]、欧盟中英国^[24]、德国^[25]、瑞典^[26] 等主要国家均使用此法,我国于 2009 年制定的国家标准也是采用这种方法^[27]。但由于免疫亲和柱的成本过高,大大影响了方法的使用和推广。

我国是小麦 DON 污染重灾区,特别是在小麦主产区 DON 污染现象每年有不同程度的发生,并有逐年上升态势。小麦 DON 污染的快速、准确、低成本、大宗样品检测技术已成为我国粮食安全检测的一个瓶颈。本实验是在前人研究的基础上,对小麦 DON 提取和净化进行了改进,建立了一个小麦 DON 污染的检测新方法,以满足我国小麦 DON 污染检测工作的需要。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 仪 器

LC-10AT 高效液相色谱仪:日本 SHIMADZU 公司;高速搅拌均质器:美国 Waring Commercial 公司;JSFM-1 粮食水分测试粉碎磨:成都粮食储藏科学研究所;HY-4 调速多用振荡器:常州国华电器有限公司;PL403-IC 电子天平:上海 Mettler-Toledo 公司。

1.1.2 样 品 与 试 剂

小麦 DON 阳性和阴性样品:采自我国小麦主产区。

DON 标准品: sigma; 聚乙二醇: PEG 8000; 甲醇: 色谱纯; 活性炭、柱层析硅胶、中性氧化铝、酸性氧化铝、碱性氧化铝均为分析纯; 医用脱脂棉; 实验用水为 Millipore 制备的超纯水。

DON 标准储备液: 用甲醇将 DON 标准品配制成 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 DON 标准储备液,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存,使用时稀释成所需质量浓度的 DON 标准工作液。

1.2 方 法

1.2.1 样 品 提 取

称取 10.00 g 小麦粉,于 300 mL 三角瓶中,加 2.00 g 聚乙二醇和 100 mL 水,瓶口用薄膜密封,于 200 r/min 下振荡提取 1 h,得到小麦 DON 提取液。

1.2.2 净 化

在 5 mL 注射器筒的底部,加少许脱脂棉平铺压紧,分别加入 1.00 g 活性炭、柱层析硅胶、中性氧化铝、酸性氧化铝、碱性氧化铝,上层加少许脱脂棉压紧,注射器出口与 0.22 μm 滤膜连接,在注射器筒内加入 4.0 mL 提取液,将活塞插入针筒,控制流速为 1 滴/s,收集流出净化液,备用。免疫亲和柱净化操作与国标方法相同^[27]。

1.2.3 色 谱 条 件

色谱柱: Diamonsil C18 (2) 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇: 水 (20: 80); 流速: 0.8 mL/min; 进样体积: 10 μL ; 柱温: 常温; 检测波长: 230 nm。

2 结 果 与 分 析

2.1 样 品 提 取 时 间 的 优 化

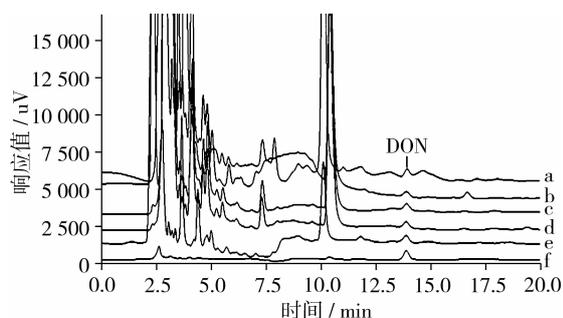
为了减少操作步骤和提高样品提取效率,以满足大宗样品分析的要求,本实验在国标提取方法基础上,将均质器单一样品提取改为振荡器批量提取。试验了在 200 r/min 振荡条件下不同提取时间 (10、20、30、40、60、80、100 min) 的提取效果。结果表明,采用在 200 r/min 振荡提取 60 min 的提取效率最高,可将待测定 DON 成分提取完全。

2.2 样 品 净 化 方 法 的 优 化

文献报道的 DON 净化的方法有固相萃取法 (solid-phase extraction, SPE)^[28-29],多功能净化柱 (multi-function column, MFC)^[30],免疫亲和柱 (immune-affinity chromatography, IAC)^[31],超临界流体提取法 (supercritical fluid extraction, SFE)^[32],目前在国内外使用最多是免疫亲和柱净化,该方法操作简便、净化效果好,但亲和柱的成本较高,处理一个样品需要 150 元左右。在本实验中用活性炭、柱层析硅胶、中性氧化铝、酸性氧化铝、碱性氧化铝五种吸附剂对小麦 DON 净化效果进行实验,并以免疫亲和柱净化方法作对照。按方法 1.2.1 和 1.2.2 步骤进行样品提取、净化和色谱测定。结果见图 1。

本实验中选择的五种吸附剂,除活性炭对小麦 DON 有吸附作用,无法用于样品净化外,其它四种吸附剂对小麦提取液均有不同程度净化效果。按净化效果排序为酸性氧化铝 > 碱性氧化铝 > 中性氧化铝 > 柱层析硅胶 (见图 1)。以净化和未净化样品在 230 nm 色谱总峰面积比计算出各吸附剂除杂率分

别为66.3%、22.0%、20.2%、0.3%。结果表明,以酸性氧化铝对小麦DON提取液净化效果最好,通过一次净化除去大部分杂质,可满足色谱分析要求。对真菌感染较重含杂质较多的样品,提取液过滤时,可增加一次净化处理步骤,即在定量滤纸内加5g酸性氧化铝,进行二次净化处理,这对色谱柱使用寿命延长有益。在试验中用免疫亲和柱作对比,从色谱图可看出,两种净化方法均可满足小麦DON色谱分离测定的要求。用酸性氧化铝净化一个样品仅需0.042元,大大降低了检测成本。



(a: 未净化样品; b: 柱层析硅胶; c: 中性氧化铝; d: 碱性氧化铝; e: 酸性氧化铝; f: 免疫亲和柱)

图1 不同吸附剂对小麦样品($C_{DON} \approx 1400 \mu\text{g}/\text{kg}$)浓度前处理除杂效果对比

2.3 线性关系、检出限及定量限

在优化的实验条件下,用甲醇将DON标准溶液配制一系列浓度进行测定,以峰面积(y)为纵坐标,DON标准液浓度($x, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标进行线性回归;以 $S/N=3$ 和 $S/N=10$ 分别确定DON在样品中的检出限(LOD)和定量限(LOQ)。得到回归方程为 $y=30716.65x-607.52$,小麦DON在 $0.02 \sim 5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内有良好的相关性($R^2=0.9995$),方法的LOD为 $0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$,LOQ为 $0.065 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。结果表明,本方法具有较高的灵敏度,可对小麦DON含量较低的样品进行检测。

2.4 回收率

选用小麦主产区阴性小麦样品,分别在样品中添加DON系列标准溶液,添加水平为500、1000、2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按方法1.2.1和1.2.2步骤进行样品提取、净化和色谱测定,计算加标平均回收率,结果见表1。

表1 回收试验($n=5$)

添加浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	实测浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%
500	518.5	103.7
1000	968.0	96.8
2000	1820.0	91.0

由表1可知小麦DON的加标平均回收率在

91.0%~103.7%。结果表明,在不同的加标水平下,小麦DON的回收率较为稳定,具有良好的准确性,可满足小麦DON检测的要求。

2.5 精密度

选用我国小麦主产区三个不同污染水平的小麦,按照方法1.2.1和1.2.2操作进行样品提取、净化和测定,结果见表2。

表2 精密度试验($n=6$)

编号	样品1/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	样品2/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	样品3/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
1	251.4	1424.3	3073.0
2	216.5	1402.4	2980.0
3	227.9	1459.7	2985.0
4	193.8	1445.6	2884.5
5	217.1	1490.3	2934.8
6	218.8	1481.5	2873.8
\bar{x}	220.9	1450.6	2955.2
RSD/%	8.5	2.3	2.5

由表2可知三个水平小麦DON阳性样品六次重复测定,样品1、样品2、样品3平均值分别为220.9、1450.6、2955.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差范围(RSD)为2.3%~8.5%。结果表明,试验所选三个阳性样品DON含量基本代表了天然小麦DON污染水平,精密度较好,可满足小麦DON的检测需求和安全性评价。

2.6 方法对比

选择三个小麦阳性样品,按照1.2.1和1.2.2方法操作进行样品提取,分别采用酸性氧化铝(AOA)和国标使用的免疫亲和柱(IAC)净化,高效液相色谱测定,比较两种净化方法差异性。结果见表3。

表3 AOA与IAC净化方法比较($n=5$)

样品 编号	样品1/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$		样品2/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$		样品3/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	
	IAC	AOA	IAC	AOA	IAC	AOA
1	3410.8	3429.3	1085.8	1004.7	355.6	353.8
2	3275.9	3653.9	1259.5	912.9	361.3	403.6
3	3255.9	3488.0	951.3	1050.0	375.8	370.0
4	3413.8	3198.1	1181.6	1034.3	362.3	365.4
5	3310.9	3284.5	1138.2	1159.8	332.6	359.2
\bar{x}	3333.5	3410.8	1123.3	1032.3	357.5	370.4
RSD/%	2.2	5.2	10.3	8.6	4.4	5.3
E/%	2.3		8.4		3.5	

注:E为方法间误差。

由表3可知,AOA和IAC两种净化方法对三个不同水平小麦DON样品净化,相对标准偏差范围(RSD)分别为5.2%~8.6%和2.2%~10.3%,方法间误差范围为2.3%~8.4%。结果表明,两种DON净化方法相对标准偏差基本处于同一水平,方法间误差较小,由此可见,两种净化方法对小麦DON色谱测定结果无明显影响。

3 结论

通过对五种吸附剂试验,建立了一种小麦脱氧雪

腐镰孢菌烯醇(DON)酸性氧化铝(AOA)净化,高效液相色谱测定新方法。本方法操作简单,加标平均回收率和精密度较好,与免疫亲和柱(IAC)净化比较,两种净化方法相对标准偏差相近,方法间误差较小,可满足小麦DON定量分析的需要,但本方法检测成本远低于现行国家标准方法。

参考文献:

- [1] Pestka J J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks[J]. *Animal feed science and technology*, 2007, 137: 283 - 298.
- [2] Victor A T. Deoxynivalenol in cereals in Russia[J]. *Toxicology letters*, 2004, 153 (1): 173 - 179.
- [3] McMullen M, Tones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: a re-emerging disease of devastating impact[J]. *Plant disease*, 1997, 81: 1340 - 1348.
- [4] Pfohl - Leskovic A. Mycotoxins food safety aspect Euro - Maghreb symposium[J]. *Molecular nutrition & food research*, 2006, 50: 467 - 469.
- [5] Margit S, Müller H M, Melanie R, et al. Survey of Fusarium toxins in foodstuffs of plant origin marketed in Germany[J]. *International journal of food microbiology*, 2005, 97: 317 - 326.
- [6] Arnold D L, McGuire P F, Nera E A, et al. The toxicity of orally administered Deoxy - nivalenol (vomitoxin) in rats and mice[J]. *Food and chemical toxicology*, 1986, 24: 935 - 941.
- [7] Li F Q, Luo X Y, Tokumi Y. Mycotoxins (trichothecenes, zearalenone and fumonisins) in cereals associated with human red - mold intoxications stored since 1989 and 1991 in china[J]. *Natural Toxins*, 1991, 7: 93 - 97.
- [8] 苏福荣,王松雪,孙辉,刘焱. 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析[J]. *粮油食品科技*, 2007, 15(6): 57 - 59.
- [9] GB2761—2005, 食品中真菌毒素限量[S].
- [10] Trucksess M W, Nesheim S, Eppley R M. Thin layer chromatographic determination of Deoxynivalenol in wheat and corn[J]. *Journal - Association of official analytical chemists*, 1984, 67(1): 40 - 43.
- [11] 魏润蕴,李文艳. 小麦中雪腐镰刀菌烯醇(NIV)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的薄层色谱测定方法[J]. *中国食品卫生杂志*, 1994, 6(1): 19 - 22.
- [12] Tacke B K, Casper H H. Determination of Deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection[J]. *Journal of AOAC international*, 1996, 79 (2): 472 - 475
- [13] 胡绪英,王令春,曹金鸿. 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇的气相色谱分析[J]. *环境化学*, 1989, 8(4): 1 - 5.
- [14] Xu Y C, Zhang G S, Chu F S. Enzyme - linked immunosorbent assay for Deoxynivalenol in corn and wheat[J]. *Journal - Association of official analytical chemists*, 1988, 71 (5): 945 - 949.
- [15] Yoshizawa T, Kohno H, Ikeda K, Shinoda T, et al. A practical method for measuring Deoxynivalenol, Nivalenol, and T - 2 + HT - 2 Toxin in foods by an Enzyme - linked immunosorbent assay using monoclonal antibodies[J]. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 2004, (10): 2076 - 2085.
- [16] 龚燕,孙秀兰,邵景东. 酶联免疫法检测呕吐毒素的方法研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(10): 473 - 476.
- [17] Klötzel M, Schmidt S, Lauber U, et al. Comparison of different clean - up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal - based food and validation of a reliable HPLC method [J]. *Chromatographia*, 2005, 62 (2): 41 - 48.
- [18] 王志萍,王德良,冯作山,等. 运用免疫亲和柱和高效液相色谱(HPLC)检测啤酒大麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. *食品与发酵工业*, 2008, 34(9): 137 - 139.
- [19] Soares L M V. Multi - Toxin TLC Methods for Aflatoxins, Ochratoxin A, Zearalenone and Sterigmatocystin in Foods[M]. *Plant Toxin Analysis*. New York: Springer - Verlag, 1992.
- [20] 阳传和,刘畅,罗雪云,等. 小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇酶联免疫吸附测定方法的研究[J]. *微生物学报*, 1994, 34(1): 65 - 70.
- [21] 游淑珠,许杨. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇分析方法的现状[J]. *卫生研究*, 2005, 34(1): 122 - 125.
- [22] 黄娟,陈松国,张晓燕,等. 固相萃取 - 高效液相色谱 - 串联质谱法检测粮食及其制品中的呕吐毒素[J]. *色谱*, 2012, 30(11): 1203 - 1207.
- [23] DON (Vomitoxin) Handbook. United States Department of Agriculture; Grain Inspection, Packers and Stockyards Administration; Federal Grain Inspection Service. Washington, DC. 2001, 11
- [24] BS EN 15891: 2010, Foodstuffs - Determination of Deoxynivalenol in cereal, cereal products and cereal based food for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection[S].
- [25] DINEN 15891: 2010, Foodstuffs - Determination of Deoxynivalenol in cereal, cereal products and cereal based food for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection[S].
- [26] BSEN 15891: 2010, Foodstuffs - Determination of Deoxynivalenol in cereal, cereal products and cereal based food for infants and young children - HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection[S].
- [27] GB/T 23503—2009, 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱层析净化高效液相色谱法[S].
- [28] Ježková A, Karasová J, Dohnal V, et al. Development of solid - phase extraction and HPLC/MS methods for Deoxynivalenol determination in barley and malt [J]. *Chemické listy*, 2009, 103: 679 - 683.
- [29] Malone B R, Humphrey C W, Romer T R, et al. One - step solid - phase extraction cleanup and fluorometric analysis of Deoxynivalenol in grains[J]. *Journal of AOAC international*, 1998, 81 (2): 448 - 452.
- [30] Biselli S, Hummert C. Development of a multi - component method for Fusarium toxins using LC - MS/MS and its application during a survey for the content of T - 2 toxin and Deoxynivalenol in various feed and food samples[J]. *Food additives & contaminants*, 2005, 22 (8): 752 - 760.
- [31] Susan M J, Danny C, Paul B, et al. Determination of Deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: inter - laboratory study[J]. *Journal of AOAC international*, 2005, 88(4): 1197 - 1204.
- [32] Huopalahti R P, Ebel J, Henion J D. Supercritical fluid extraction of mycotoxins from feeds with analysis by LC/UV and LC/MS [J]. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 1997, 20 (4): 537 - 551. ☉