

免疫亲和柱净化—高效液相色谱法同时检测小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物

王培¹,徐广超²,尹丽梅³,黎睿⁴,谢刚⁴

(1. 山东省粮油检测中心,山东 济南 253303;2. 国家粮食局标准质量中心,北京 100037;
3. 北京华安麦科生物技术有限公司,北京 102002;4. 国家粮食局科学研究院,北京 100037)

摘要:建立脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)及其衍生物3-乙酰基—脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-A-DON)和15-乙酰基—脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-A-DON)的免疫亲和柱净化—高效液相色谱同时检测方法。小麦样品经超纯水提取、免疫亲和柱净化、吹干、定容后,用配有紫外检测器的高效液相色谱仪进行DON、3-A-DON和15-A-DON三种毒素的同时检测,并与液相色谱质谱法比对。结果表明:该方法检出限,DON、3-A-DON和15-A-DON均为100 μg/kg,样品加标回收率范围86.6%~96.5%,变异系数小于10%,具有较好的准确性和精密度。该方法简单、快速、灵敏度高、选择性好,适用于小麦中DON、3-A-DON和15-A-DON的同时检测。

关键词:免疫亲和柱;脱氧雪腐镰刀菌烯醇;3-乙酰基—脱氧雪腐镰刀菌烯醇;15-乙酰基—脱氧雪腐镰刀菌烯醇;高效液相色谱

中图分类号:R 155.5 文献标识码:A 文章编号:1007-7561(2015)01-0063-04

Simultaneous determination of deoxynivalenol and ramification in wheat by immune affinity column and high performance liquid chromatography

WANG Pei¹, XU Guang-chao², YIN Li-mei³, LI Rui⁴, XIE Gang⁴

(1. Shandong Grain and Oil Testing Center, Jinan Shandong 250014; 2. Standards and Quality Center of State Administration of Grain, Beijing 100037; 3. Hua-an Magnech Biotech Co., Ltd, Beijing 102200;
4. Academy of State Administration of Grain, Beijing 100037)

Abstract: The method to determine deoxynivalenol (DON), 3-acetyl-deoxynivalenol (3-A-DON) and 15-acetyl-deoxynivalenol (15-A-DON) in wheat simultaneously by immune affinity column clean-up and high performance liquid chromatography was established. The wheat samples were extracted by ultrapure water, cleared up with the immuno-affinity column (IAC). After drying and constant volume, three toxins, DON, 3-A-DON and 15-A-DON, were detected simultaneously by high performance liquid chromatograph with UV detector, and compared with that by Liquid chromatography mass spectrometry. The result showed that the detection limit of method was 100 μg/kg for DON, 3-A-DON and 15-A-DON respectively. Recovery rates in wheat spiked with DON, 3-A-DON, and 15-A-DON, ranged from 86.6% to 96.5%. The variation coefficient was less than 10%. This method was suitable for determination of DON, 3-A-DON, and 15-A-DON in wheat, with the advantages of simplicity, rapidness, sensitivity and good selectivity, veracity and precision.

Key words: immune affinity column; deoxynivalenol (DON); 3-acetyl-deoxynivalenol; 15-acetyl-deoxynivalenol; high performance liquid chromatography

收稿日期:2014-08-05

基金项目:十二五国家科技支撑计划(2012AA101609)

作者简介:王培,1963年出生,男,高级工程师。

通讯作者:谢刚,1974年出生,男,副研究员。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 俗称呕吐毒素(vomitoxin), 是一种由镰刀菌属等产生

的毒性代谢产物,属于单端孢霉烯族化合物^[1],3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyl-deoxynivalenol, 3-A-DON)和15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyl-deoxynivalenol, 15-A-DON)是其衍生物^[2]。这类毒素化学性质非常稳定,在加工、储存及烹调过程中一般不会被破坏。其毒性主要表现为急性毒性、免疫毒性、细胞毒性、生殖毒性和三致作用等^[3-5]。目前已经被联合国粮农组织和世界卫生组织确定为最危险的自然发生食品污染物。过去对其毒性认识仅限于DON,随着认识的深入,对DON衍生物的控制也日益重视。食品添加剂联合专家委员会(JECFA)在2010年4月第72次会议上决定,将原来针对DON的暂定每日容许最大摄入量(PMTDI)改为针对DON、3-A-DON、15-A-DON化合物组的 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,我国2014年国家食品安全风险监测计划中明确要求检测小麦粉、燕麦(含燕麦片)、婴幼儿谷物类辅助食品中的DON、3-A-DON和15-A-DON三种化合物。

DON、3-A-DON和15-A-DON的病原菌是镰刀菌,该菌在湿润多雨的温带气候条件下特别容易繁殖,主要污染小麦、大麦、玉米等粮食作物^[6-8]。Tutelyan^[9]、Trucksess^[10]、Dexter^[11]、Ji^[12]等研究人员分别调查了俄罗斯、美国、德国和我国小麦、玉米等中DON的污染水平,检出率均超过40%。甄阳光等调研我国主要饲料原料及产品呕吐毒素污染分布规律^[13],发现呕吐毒素在我国的污染仍较为普遍,其分布存在着一定的规律。2010年,中国疾病预防控制中心调研发现^[14],12个省(直辖市/自治区)采集到的玉米及其制品、小麦粉、大米和花生共计650份样品,污染最严重的玉米样品中DON的检出率为84.65%,3-A-DON的检出率为71.63%,15-A-DON的检出率为92.56%,说明我国粮食中DON的污染不容乐观。因此,建立快速、有效的检测手段刻不容缓。

国内外已开展DON单种毒素的高效液相色谱检测方法研究,Klotzel^[15]比较了不同净化处理对食品中DON检测的高效液相色谱检测效果;毛丹等^[16]采用免疫亲和柱净化后用高效液相色谱法测定粮谷中的呕吐毒素;但已有液相色谱检测方法无法实现DON及其衍生物同时检测。另外,耿玉辉等^[17]采用酶联免疫试剂盒法测定呕吐毒素。目前行业标准SNT 3137—2012中采用的是固相萃取柱净化^[18],样本前处理过程相对比较复杂,净化除杂效果不是很好,必须配合灵敏度非常高的LC/MS/MS才能满足检测需求,同时要求检测人员具有较

高的检测技能。本实验采用免疫亲和柱净化,HPLC法即可同时检测小麦中DON、3-A-DON和15-A-DON。该方法操作简便、经济实用,适用于多种毒素的同时检测,易推广使用。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

高效液相色谱仪(配紫外检测器):美国Agilent公司;Unitary-C18柱:上海华谱公司;粉碎机:美国Romer公司;电子天平:梅特勒公司;涡旋混合器:美国Scientific Industries公司;离心机:无锡市瑞江分析仪器有限公司;免疫亲和柱气控操作系统:北京华安麦科生物技术有限公司;纯水仪:美国Millipore公司;免疫亲和柱:北京华安麦科生物技术有限公司;DON、3-A-DON和15-A-DON标准溶液:美国Supelco公司;甲醇、乙腈(色谱级);小麦样品:从特定地区采集。

1.2 液相条件

测定DON、3-A-DON和15-A-DON的液相色谱条件:

色谱柱:Unitary—C18柱;填料 $5\ \mu\text{m}$;直径 \times 长度 $=4.6\ \text{mm}\times 150\ \text{mm}$;流动相:乙腈水溶液;

梯度洗脱条件:0~4 min,15%乙腈;4~4.1 min,30%乙腈;4.1~9 min,30%乙腈;9~12 min,15%乙腈;流速:1 mL/min;进样量:20 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;紫外检测波长:224 nm

1.3 实验方法

1.3.1 样品的提取

参考DON免疫亲和柱说明书中推荐的提取方法进行提取,由于DON为强极性物质,易溶于水,而且有机溶剂易导致亲和柱中的抗体失活,因此采用超纯水作为提取液。

称取5 g(精确至0.01 g)样品于50 mL离心管中,加入25 mL超纯水,于涡旋混合器上涡旋提取5 min,4 000 r/m离心5 min。取上清液10 mL,然后用玻璃纤维滤纸过滤,收集滤液备用。

1.3.2 免疫亲和柱净化

上样:将免疫亲和柱与注射器的针筒连接,安装在气控操作架上,取2.3.1中的滤液2.5 mL(相当于0.5 g样品)注入针筒中,调节流速至1~2滴/秒。洗涤:用超纯水洗涤免疫亲和柱,调节流速至2~3滴/秒,每次10 mL,洗涤两次。洗脱:将柱内液体全部排干后,加入1 mL甲醇(色谱级)清洗柱子,调节流速约1滴/秒,并收集于10 mL离心管中。

1.3.3 最佳洗脱条件的确定

分别考察不同比例乙腈-水溶液等度洗脱和梯度洗脱对DON及其衍生物分离效果的影响。以组分色谱峰面积和分离度作为考察指标,确定最佳洗

脱条件。

1.3.4 液相色谱测定

将上述洗脱液在 50 °C 下氮气吹干,加入 1 mL 20% 乙腈水溶液复溶,复溶液用 0.22 μm 针式滤器过滤,然后注入液相色谱仪中进行分析。

2 结果与分析

2.1 洗脱条件的确定

2.1.1 等度洗脱

用 25% 乙腈—水作为洗脱液,在流速 1 mL/min、柱温 30 °C 的条件下进行等度洗脱。用紫外检测器检测,检测波长 224 nm,液相色谱图如图 1 所示,DON 出峰较快,4 min 时即出峰,没有和溶剂峰分离开来。

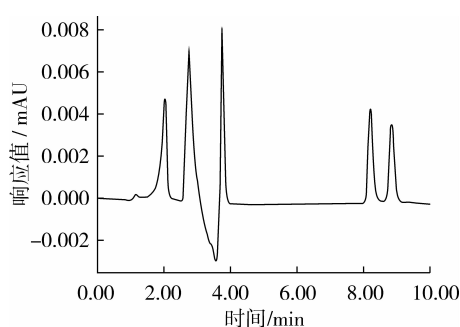


图1 25%乙腈等度洗脱液相色谱图

再用 20% 乙腈—水作为洗脱液,在流速 1 mL/min、柱温 30 °C 的条件下进行等度洗脱。用紫外检测器在波长 224 nm 下进行监测,结果的液相色谱图如图 2 所示,DON 出峰时间延后,分离较好,但 3-A-DON 和 15-A-DON 未能完全分离,有部分重合。可见使用等度洗脱分离这 3 种真菌毒素效果并不好。

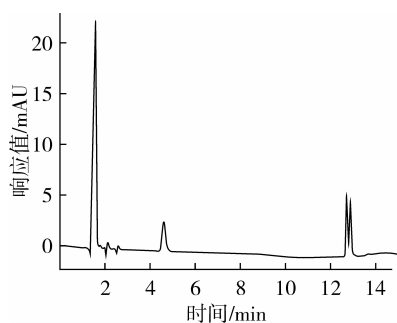


图2 20%乙腈等度洗脱液相色谱图

2.1.2 梯度洗脱

在流速 1 mL/min、柱温 30 °C 的条件下,将洗脱比例分为两个阶段进行梯度洗脱,第一阶段将 DON 洗脱出峰,发现使用 15% 乙腈可在 5 min 内使 DON 峰分离良好。第二阶段为了使 3-A-DON 和 15-A-DON 洗脱出峰并保证分离度良好,分别尝试了 20%、25%、30% 和 35% 的乙腈水,结果显示使用 30% 乙腈水洗脱时峰面积最大、分离度最好且基线

最平稳,见图 3。因此确定使用梯度洗脱,洗脱条件为:0 ~ 4 min, 15% 乙腈; 4 ~ 4.1 min, 30% 乙腈; 4.1 ~ 9 min, 30% 乙腈; 9 ~ 12 min, 15% 乙腈。

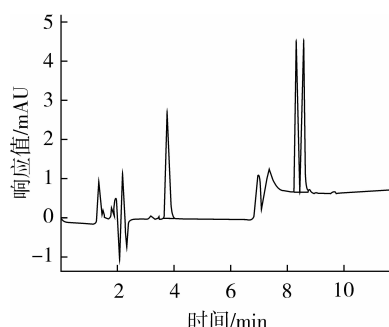


图3 小麦样品免疫亲和柱净化-HPLC法检测DON及其衍生物的色谱图

2.2 标准曲线的建立

按照 2.2 的液相色谱测定条件,分别建立 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 的标准曲线,由标准曲线可得标准方程及相关系数,见表 1。

表1 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 的线性方程和相关系数

毒素种类	线性方程	相关系数(R ²)	标准溶液浓度/(ng/mL)
DON	y = 58.332x - 487.41	0.9999	50, 100, 200, 500, 1000, 2000
3-A-DON	y = 51.341x - 355.62	1.0000	50, 100, 200, 500, 1000, 2000
15-A-DON	y = 51.331x - 669.68	0.9999	50, 100, 200, 500, 1000, 2000

应用液相色谱计算软件计算,以 3 倍信噪比对应的毒素含量为检出限(S/N = 3),得出 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 的检出限均为 100 μg/kg。三种毒素的标准曲线的相关系数 R² 均大于 0.999 9,结果表明,DON、3-A-DON 和 15-A-DON 在 50 ~ 2000 μg/L 范围内具有良好的线性关系。

2.3 准确性和精密度

为了验证方法的准确性和可靠性,对测定方法进行加标回收和重复性测定。在阴性小麦样品中同时添加 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 三种毒素,每种毒素三个添加水平,然后进行 5 次重复试验,其检测结果见表 2。

表2 小麦样品加标回收率及变异系数

毒素种类	添加浓度/(μg/kg)	重复测定五次平均值/(μg/kg)	平均回收率/%	变异系数 CV/%
DON	200	183.68	91.84	2.7
	500	467.02	93.40	7.91
	1000	965.12	96.51	5.91
3-A-DON	200	173.26	86.63	8.24
	500	462.72	92.54	8.19
	1000	946.21	94.62	9.28
15-A-DON	200	175.26	87.63	8.24
	500	454.22	90.84	8.19
	1000	941.65	94.16	9.28

从表2中回收率及精密度数据可以看出,本方法测定 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 的回收率全部在 86%~97% 之间,室内三个水平添加五次重复的变异系数在 10% 以内。说明该方法检测的准确度、精密度良好,满足样本中 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 检测的要求。

2.4 实际样品验证

选取小麦样本数份,对建立的免疫亲和柱净化高效液相色谱法进行验证,以确定该方法的准确性和适用性。样本的检测结果如表3所示,与我国质检系统采用的多功能萃取柱净化高效液相色谱—质谱法检测的结果一致,重复性较好。与本研究建立的方法相比,标准方法采用多功能净化柱净化处理,除杂抗干扰能力欠佳,必须配合高效液相色谱—质谱仪器才可以检测,使用和维护成本较高,对专业人员的操作技能提出较高的要求。本方法利用抗原抗体间高度特异性结合的特点,实现 DON 及其衍生物 3-A-DON 和 15-A-DON 的同时净化,净化效果好,采用高效液相色谱分析即可达到较高的灵敏度。

表3 小麦样本检测方法比对

编号	项目	固相萃取 -LC/MS	免疫亲和柱 -HPLC	符合率 /%
1	DON	1 206.24	1 235.54	102.43
	3-A-DON	/	/	/
	15-A-DON	/	/	/
2	DON	2 058.62	2 178.37	105.82
	3-A-DON	346.71	356.16	102.73
	15-A-DON	539.94	537.09	99.47
3	DON	621.96	658.26	105.84
	3-A-DON	/	/	/
	15-A-DON	/	/	/
4	DON	1 679.53	1 784.25	106.24
	3-A-DON	347.24	356.13	102.56
	15-A-DON	444.65	467.12	105.05
5	DON	864.22	832.98	96.39
	3-A-DON	/	/	/
	15-A-DON	/	/	/

3 结论

利用免疫亲和柱同时净化样本中的 DON、3-A-DON 和 15-A-DON,用高效液相色谱进行检测,建立了小麦中 DON、3-A-DON 和 15-A-DON 同时检测的方法。加标回收和重复性测定结果表明,该方法具有较好的准确性和精密度。经实际样品验证,与质检系统采用的多功能净化柱高效液相色谱—质谱法检测的结果一致,重复性较好,该方法具有较好的可行性和适用性。

参考文献:

[1]付杨,李洪军,贺稚非,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇研究进展[J]. 食品科学, 2011, 32(21):289-292.

[2]Pestka J,刘小川,杨在宾. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的毒性、作用机制以及对动物健康的危害(一)[J]. 饲料与畜牧:新饲料, 2012(1):16-19.

[3]Pestka J. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy - aberrant mucosal immune response with systemic repercussions [J]. Toxicology Letters, 2003, 140:287-295.

[4]Sprando R L, Collins T F X, Black T N, et al. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints [J]. Food and Chemical Toxicology, 2005, 43(4): 623-635.

[5]庞炜,王治伦,吕社民. 真菌毒素 DON 研究进展[J]. 中国地方病防治杂志,1996,11(6): 349-351.

[6]Pestka J J, Smolinski A T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans [J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, 2005, 8(1): 39-69.

[7]Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, et al. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenolglucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2005, 53(9): 3421-3425.

[8]鲍淑青,张克英,陈海军. 饲料中呕吐毒素的危害与防治[J]. 中国饲料, 2007, 17:34-36.

[9]Tutelyan V A. Deoxynivalenol in cereals in Russia[J]. Toxicology Letters, 2004, 153(1):173-182.

[10]Trucksess M W, Thomas F, Young K, et al. Survey of deoxynivalenol in US 1993 wheat and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of AOAC International, 1994, 78(3): 631-636.

[11]Dexter J E, Wood P J. Recent applications of debranning of wheat before milling[J]. Trends in Food Science & Technology, 1996, 7(2): 35-41.

[12]Ji L, Cao K, Hu T, et al. Determination of deoxynivalenol and nivalenol chemotypes of Fusarium graminearum isolates from China by PCR assay [J]. Journal of phytopathology, 2007, 155(7-8): 505-512.

[13]甄阳光,柏凡,张克英,等. 我国主要饲料原料及产品呕吐毒素污染分布规律研究[J]. 中国畜牧杂志,2009, 45(8):21-28.

[14]马皎洁,邵兵,林肖惠,等. 我国部分地区 2010 年产谷物及其制品中多组分真菌毒素污染状况研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6): 481-488.

[15]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(1-2): 41-48.

[16]毛丹,许勇,张道广,等. HPLC 法测定粮谷中的呕吐毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2207-2208.

[17]耿玉辉,高艳. 玉米呕吐毒素、玉米赤霉烯酮检测方法的探讨[J]. 2012(13):221.

[18]SN/T 3137—2012,出口食品中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及其代谢物的测定液相色谱-质谱法[S].