

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2018.05.010

# 高效液相色谱法测定全麦粉中 呕吐毒素含量

张春娥, 刘新保, 廖若宇, 段兰萍, 王兴磊

(宁夏回族自治区粮油产品质量检测中心, 宁夏 银川 750004)

**摘要:** 对高效液相色谱法测定全麦粉中呕吐毒素含量进行了研究,分析了前处理方法、提取方式和提取时间、标准曲线及色谱柱等因素对全麦粉中呕吐毒素含量测定结果的影响。结果表明:与多功能净化柱法相比,对于样品提取液色泽深的陈麦粉,采用0.1%吐温洗脱添加样品后的免疫亲和柱,样品处理干净,色谱图杂峰少,利于目标峰分离;与GB 5009.111—2016中的色谱测定条件相比,C18, 5  $\mu$ m 4.6 $\times$ 250 mm型号的色谱柱更适用于全麦粉中呕吐毒素含量的测定。

**关键词:** 免疫亲和柱; 多功能净化柱; 色谱分析柱; 标准曲线; 高效液相色谱法(HPLC)

中图分类号: TS 211.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2018)05-0053-05

## Determination of the contents of vomiting toxin (DON) in whole wheat flour by HPLC

ZHANG Chun-e, LIU Xin-bao, LIAO Ruo-yu, DUAN Lan-ping, WANG Xing-lei  
(Ningxia Grain & Oil Products Quality Inspection Center, Yinchuan Ningxia 750004)

**Abstract:** The content of deoxynivalenol (DON) in whole wheat flour was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). The influence of pretreatment method, extraction mode and extraction time, standard curve and chromatographic column on the determination were analyzed. The results indicated that in contrast to the multifunctional purification column treatment method, the immuno-affinity column method used 0.1% of tween leachate sample solution for ageing flour with deep color, the sample was treated clean and the measured chromatogram had less peaks, which was beneficial to the separation of the target peak. Compared with the chromatographic conditions of GB 5009.111-2016, the chromatographic column of C18 and 5  $\mu$ m 4.6  $\times$  250 mm was more suitable for the determination of the content of vomiting toxin in whole wheat flour.

**Key words:** immune affinity column; multi-functional purification column; chromatographic column; standard curve; high performance liquid chromatography (HPLC)

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)又称为呕吐毒素,是一种全球性的污染谷物的霉菌毒素之一,通常在小麦和玉米等<sup>[1]</sup>农作物中浓度较高。小麦在田间种植阶段、收获阶段及贮藏阶段,因为气候、温湿度、污染及霉变,均会产生呕吐毒素。人畜摄入了被DON污染的小麦后,

会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳和反应迟钝等急性中毒症状,严重时造成骨髓组织的坏死和内脏器官的出血、母畜不孕或流产以及死亡<sup>[2-3]</sup>。DON对心肌细胞、血管内皮细胞、软骨细胞等也有一定的毒性<sup>[4]</sup>。目前,粮食中呕吐毒素的检测方法有薄层色谱法、试剂条/卡法、试剂盒法、真菌毒素及重金属快速检测及监测分析系统、气相色谱法和液相色谱法<sup>[5]</sup>。也有部分研究致力于改进检测方法,缩短分析时间的DON快

收稿日期: 2018-03-18

基金项目: 宁夏青年科技人才托举工程专项

作者简介: 张春娥, 1987年出生,女,工程师。

速检测分析法,如近红外光谱法<sup>[6]</sup>,荧光极性免疫法<sup>[7]</sup>。研究小麦籽粒中 DON 的分布情况,需要将小麦籽粒磨成粉末状样品,经前处理用 HPLC 进行分析测定。陈慧等对江苏、安徽一带小麦感染 DON 毒素情况进行了分析研究,结果表明感染 DON 的小麦, DON 大部分集中在表皮,其含量由表及里呈递减趋势分布,麸皮集聚近一半的 DON<sup>[8]</sup>,对于麸皮含量少、麸皮颜色浅的样品,选取多功能净化柱法处理样品,不仅操作简单,且节省时间,提高工作效率。但是对于颜色深、麸皮含量大的样品,利用抗原特异性的免疫亲和柱法处理的样品更清洁。因此本研究以五种浓度的 DON 全麦粉质控样品为研究对象,比较两种不同的样品前处理方法及两种不同长度的色谱柱对全麦粉中呕吐毒素含量的测定影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

LC-20AT 型 HPLC:岛津国际贸易有限公司;免疫亲和柱:北京华安麦科生物技术有限公司;免疫亲和柱:河北伊莱莎生物技术有限公司;漩涡混合器:QL-901 海门市其林贝尔仪器制造有限公司;调速多用振荡器:HY-4 江苏省金坛市科学仪器厂;旋转蒸发浓缩仪:RV 10 Control 艾卡仪器设备有限公司;吐温 20(化学纯):成都市科龙化工试剂厂;DON 标品(100 μg/mL):Pribolab 公司;乙腈(HPLC 级):Fisher Chemical 公司;甲醇(HPLC 级):Fisher Chemical 公司;色谱柱:Inertsil ODS-SP 5 μm 4.6 × 150 mm;色谱柱:Inertsil ODS-SP 5 μm 4.6 × 250 mm;Romermycosep 227 多功能净化柱;不同浓度系列 DON 质控样品;固相萃取装置。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品前处理

1.2.1.1 免疫亲和柱法:称取样品 5.00 g 于 100 mL 离心管中,加入 25 mL 去离子水,充分溶解,摇匀,涡混提取 5 min 后在 4 000 r/min 条件下离心 5 min,将上清液通过玻璃纤维滤纸过滤,收集滤液作为上样液。免疫亲和柱回温至室温,将免疫亲和柱与注射器连接,取 2.5 mL 上样液通过免疫亲和柱,用 10 mL 去离子水(对色素深的

陈粮或者红麦,采用 0.1%吐温水溶液)洗涤两次免疫亲和柱,用快速定性滤纸将免疫亲和柱内壁沾干,用洗耳球将免疫亲和柱底部吹干至不再有水滴滴至滤纸上,上样 1 mL 甲醇,流速 1 滴/s,收集洗脱液并旋蒸浓缩干燥,用 1 mL 流动相复溶,复溶液用 0.22 μm 有机针式过滤器过滤后转移至样品瓶,用于 HPLC 仪器分析。

1.2.1.2 多功能净化柱法:称取样品 5.00 g 于 100 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈水( $V_{乙腈}:V_{水}=84:16$ ),充分溶解,摇匀,涡混提取 10 min 后在 4 000 r/min 条件下离心 5 min,将上清液通过快速定性滤纸过滤,并将样品过滤液转移至 227 净化柱配套试管中,混合并推动 227 净化柱,使液体通过净化柱净化,取 2 mL 样品净化液至旋蒸瓶中浓缩蒸发至干燥,然后用 1 mL 水、乙腈和甲醇( $V_{水}:V_{乙腈}:V_{甲醇}=96:2:2$ )溶液复溶,用 0.22 μm 有机针式过滤器过滤,转移至样品瓶,用于 HPLC 仪器分析。

#### 1.2.2 高效液相色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP 5 μm 4.6 × 250 mm;其余色谱条件参照标准 GB 5009.111—2016<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 前处理方法对测定结果的影响

A、B、C、D、E 五个质控样品的浓度分别为 365、460、285、80 和 120 ng/mL,每个样品分别采用 1.2.1.1 和 1.2.1.2 两种前处理方法进行处理,每个样品做五个平行处理,其中 A、B、E 三组质控样品提取液颜色较深,有红棕色出现,C、D 提取液近乎无色。在相同测定条件下,测定结果取平均值,计算测定值与真值的正负相对误差,如图 1。结果表明:采用免疫亲和柱提取呕吐毒素时,0.1%吐温能很好洗脱掉上样液的色素,因此 1.2.1.1 法更适用于提取液色泽深的陈全麦粉质控样品中的呕吐毒素含量分析,对于颜色浅、近乎无色的 C、D 提取液,1.2.1.1 和 1.2.1.2 两种前处理方法均适合。采用 1.2.1.2 法处理的样品,对于色泽深的陈全麦粉质控样,色谱图杂峰多,目标峰与杂峰没有分离,影响测定结果的准确性(图 2),对于色泽浅的质控样品,目标峰清晰(图 3)。

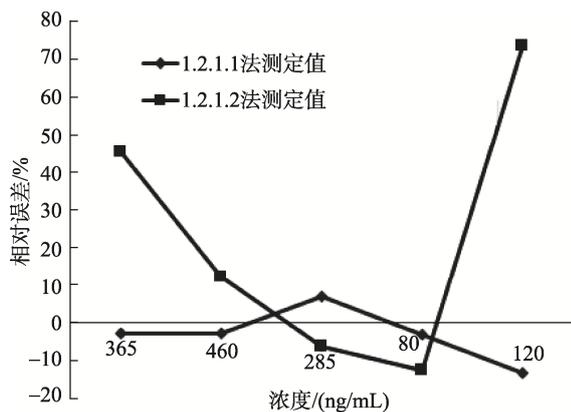


图 1 免疫亲和柱法和多功能净化柱法处理的样品测定值与真值相对误差变化趋势

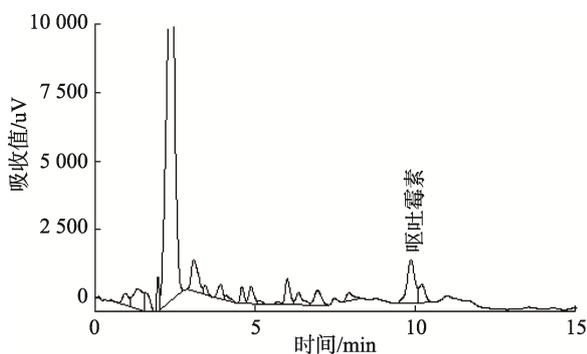


图 2 1.2.1.2 法处理深色样品色谱图

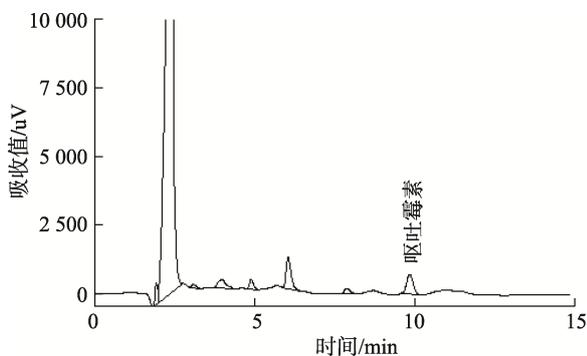


图 3 1.2.1.2 法处理浅色样品色谱图

## 2.2 提取时间和提取方式对 DON 含量的影响

以 1.2.1.1 为前处理方法,在相同色谱条件下测定,考察了采用旋涡混合器涡混提取方式和调速多用振荡器振荡方式对 DON 含量测定的影响。图 4 为 460 ng/mL 的质控样品在两种提取方式不同提取时间下 DON 含量的变化趋势,由图可知,以水为提取溶剂,提取到一定时间后两种提取方式 DON 含量不再增加,在 10 min 时,涡混提取方式能最大程度地提取样品中的呕吐毒素,相对于振荡提取,涡混提取方式节约提取时间,省去了转移和定性滤纸过滤步骤,测定结果更接近于

真值,其他四个浓度的质控样品 DON 含量变化趋势与图 4 近乎一致。对浓度分别为 365、460、285、80 和 120 ng/mL 的 A、B、C、D、E 五个浓度质控样品,每个浓度质控样品提取六次,以涡混提取方式提取 DON 测定值的标准偏差 (RSD) 分别为 5.69%、8.66%、1.71%、1.57%、4.26%,振荡提取方式提取 DON 测定值的标准偏差 (RSD) 分别为 7.48%、9.56%、5.34%、1.98%、5.27%。但是 DON 的稳定性与提取溶剂及提取时间的关系有待进一步研究。

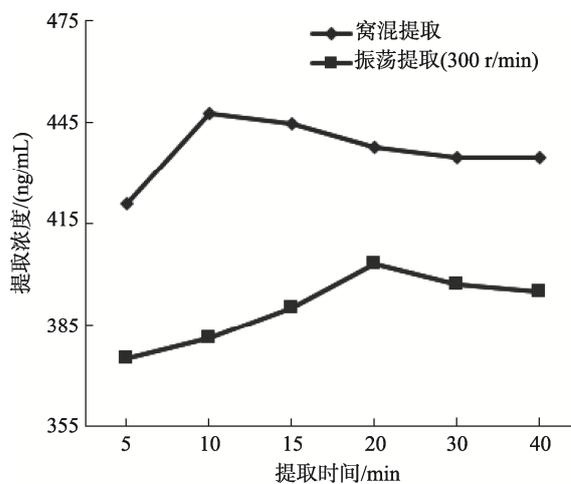


图 4 提取方式与提取时间对测定 DON 含量的影响

## 2.3 标准曲线变化对 DON 含量定量的影响

在相同条件下,在标准曲线 A (100, 200, 500, 800, 1 000, 1 600, 2 000 ng/mL)、B (100, 300, 500, 700, 900, 1 200, 1 500 ng/mL)、C (200, 400, 600, 800, 1 000, 1 200, 1 600 ng/mL)、D (200, 400, 800, 1 600, 2 000, 3 200 ng/mL)、E (100, 200, 500, 1 000, 2 000, 5 000 ng/mL) 的条件下,分别采用 4.6 × 250 mm 和 4.6 × 150 mm 的色谱柱分析测定同一浓度的质控样品。

### 2.3.1 标准曲线变化对分析结果定值的影响

分析在同一色谱柱下,不同浓度系列的标准曲线对测定值与真值的相对误差变化趋势,由图 5 可知,采用填料粒径 5 μm,长度为 4.6 × 250 mm 色谱柱测定全麦粉中 DON 含量,标准曲线浓度系列变化对样品测定值的变化影响不大,与真值的误差在 GB 5009.111—2016 所要求的范围内,有利于测定结果的定值。采用填料粒径 5 μm,长度为 4.6 × 150 mm 色谱柱测定全麦粉中 DON 含

量,测定结果波动大,与真值差距大,不利于定值。建议采用长度为  $4.6 \times 150$  mm 色谱柱测定全麦粉中 DON 含量时,应注意标准曲线浓度系列选择的合理性。

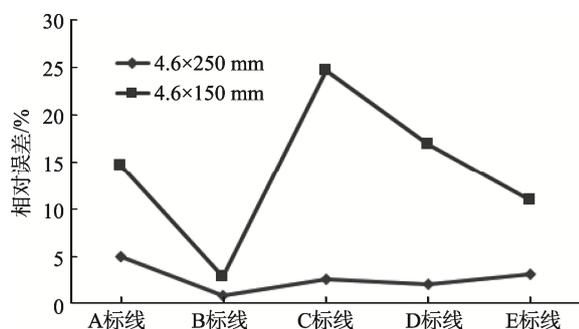


图 5 标准曲线对测定值与真值相对误差的变化趋势影响

### 2.3.2 标准曲线变化对加标回收率的影响

分析同一色谱柱下,不同浓度系列的加标回收率与空白加标回收率的变化趋势。由图 6 可知,当标准曲线浓度发生变化时,采用填料粒径  $5 \mu\text{m}$ ,长度为  $4.6 \times 250$  mm 色谱柱对样品加标回收率的变化趋势影响不明显,但是空白加标回收率的波动超过 5%。采用填料粒径  $5 \mu\text{m}$ ,长度为  $4.6 \times 150$  mm 色谱柱测定全麦粉中 DON 含量,随着标准曲线浓度的变化,样品加标回收率和空白加标回收率变化趋势波动大,无规律。

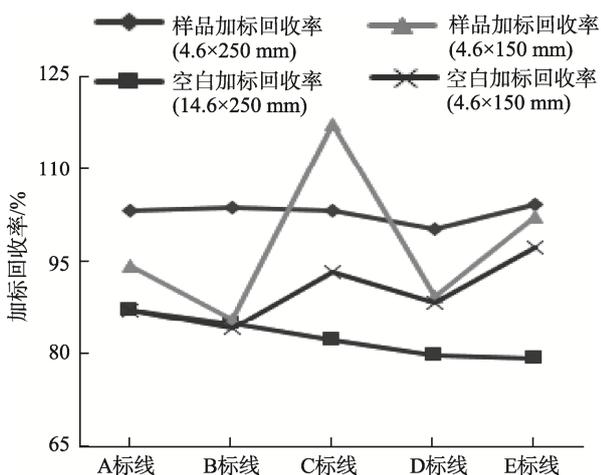


图 6 标准曲线变化对样品加标和空白加标回收率的影响

### 2.4 色谱分析柱对测定结果的影响

在相同条件下,分别采用长度为  $4.6 \times 150$  mm 色谱分析柱和长度为  $4.6 \times 250$  mm 色谱柱测定同一浓度质控样品的 DON 含量,如色谱图 7 和色谱图 8,长度为  $4.6 \times 150$  mm 色谱柱对杂峰和目标峰的分离效果不好。综合 2.3 的影响,建议采用长度为  $4.6 \times 250$  mm 的色谱柱测定全麦粉中 DON 的含量。

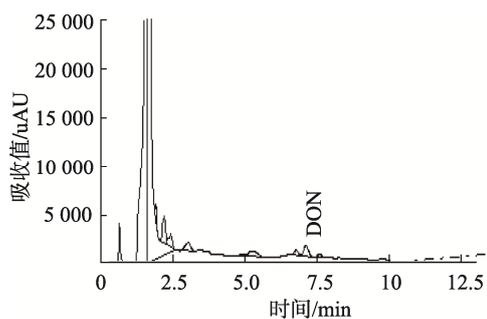


图 7  $4.6 \times 150$  mm 色谱柱测定全麦粉中 DON 含量色谱图

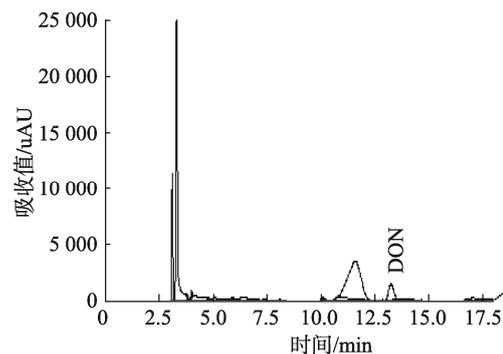


图 8  $4.6 \times 250$  mm 色谱柱测定全麦粉中 DON 含量色谱图

### 2.5 免疫亲和柱对测定结果的影响

考察了北京华安麦科生物技术有限公司和河北伊莱莎生物技术有限公司的 DON 免疫亲和柱在 DON 测定中的应用效果,如表 1,经两种免疫亲和柱处理的样品测定结果符合 GB 5009.111—2016 方法中精密度要求和 GB/T 27404—2008<sup>[10]</sup> 方法中回收率要求,因此两种免疫亲和柱均适用于全麦粉中 DON 含量的测定。可根据免疫亲和柱的使用便捷性和经济型选购使用。

表 1 两种型号的免疫亲和柱处理同质控样品的 DON 测定结果

亲和柱	测定次数及测定值/(ng/mL)					平均值/(ng/mL)	真值/(ng/mL)	相对误差/%	平均回收率/%
	1	2	3	4	5				
伊莱莎	296.24	282.65	291.3	297.8	296.10	292.80	285	2.74	91.76
华安麦科	273.93	268.26	262.0	265.1	270.07	267.86	285	6.01	86.68

### 3 结论

通过对前处理方法、提取时间和提取方式、标准曲线变化以及色谱柱型号等因素分析,建议在测定全麦粉中呕吐毒素含量时,前处理方法采用免疫亲和柱法,选用 C18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm 型号的色谱柱。采用液相色谱法分析测定 DON 含量时,样品净化是必须的前处理措施之一,与多功能净化柱法相比,利用抗原特异性的免疫亲和柱法处理样品更清洁。对于小麦粉及色泽浅的样品,在食品安全风险监测等大批量样品测定时,可选多功能净化柱法处理样品,不仅操作简单,且节省时间,提高工作效率。对于色泽较深的陈粮和全麦粉,建议采用免疫亲和柱法处理样品,用 0.1% 吐温代替去离子水洗脱免疫亲和柱两次,能避免色素导致测定值偏高的现象。

#### 参考文献:

- [1] 武传欣,程小丽,孙伟. 粮食中呕吐毒素的研究进展[J]. 粮食加工, 2016, 41(4): 48-51.
- [2] PESTKA J J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks[J]. Animal feed science and technology, 2007, 137(3): 283-298.
- [3] PESTKA J J, ZHOU H R, MOON Y, et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox[J]. Toxicology Letters, 2004, 153(1): 61-73.
- [4] SERGENT T, RIBONNET L, KOLOSOVA A, et al. Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level[J]. Food and chemical toxicology, 2008, 46(3): 813-841.
- [5] 盛林霞,付豪,吴芝影,应玲红,陈舒萍. 粮食中呕吐毒素检测方法的研究进展[J]. 粮食储藏, 2018(1): 32-34.
- [6] 孙玉侠. 近红外光谱技术在粮食工业中的应用[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(1): 58-60.
- [7] CHENGLONG LI, KAI WEN, et al. A universal multi-wavelength fluorescence polarization immunoassay for multiplexed detection of mycotoxins in maize[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 79: 258-265.
- [8] 陈慧,包成龙. 受污染小麦呕吐毒素分布研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29(1): 67-68.
- [9] GB5009.111—2016, 食品安全国家标准食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定[S].
- [10] GB/T27404—2008, 实验室质量控制规范食品理化检测[S].

## 欢迎订阅 2019 年《粮食与油脂》杂志

中文核心期刊《粮食与油脂》是由上海良友(集团)有限公司主管、上海市粮食科学研究所主办有关粮食、油脂及相关食品等专业的科技综合性期刊。主要内容:粮油新产品开发、粮油加工、粮油资源利用、粮油生物工程、粮油检测、功能性食品、食品添加剂等。本刊为月刊,标准大 16 开本,每月 10 日出版。每期定价 10.00 元,全年 120.00 元。公开发行,邮发代码:4-675,国内刊号 CN31-1235/TS,国际统一刊号 ISSN 1008-9578, E-mail: SLYZHS@163.com, 欢迎新老读者到当地邮局订阅。

地址:上海市普陀区府村路 445 号 1 号楼 邮编:200333

电话:(021) 62058191