

# 小麦和玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌烯醇的免疫亲和净化-高效液相色谱检测方法研究

吴振兴<sup>1\*</sup>, 鲍蕾<sup>1</sup>, 静平<sup>1</sup>, 门爱军<sup>2</sup>, 庞国兴<sup>3</sup>, 赵华梅<sup>1</sup>

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266000; 2. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266000;  
3. 青岛出入境检验检疫局, 青岛 266000)

**摘要:** **目的** 建立小麦和玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌烯醇的免疫亲和净化-高效液相色谱检测方法。**方法** 样品经纯水提取后, 用免疫亲和柱净化, 经甲醇洗脱, 在 C<sub>18</sub> 色谱柱上等度洗脱分离, 采用紫外检测器检测。**结果** 标准曲线在 0.1~2.0 mg/kg 范围内线性良好。小麦基质中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 72.8%~110.1%, 精密度为 3.6%~10.8%, 实验室内 HorRat 值为 0.24~0.48; 玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 72.2%~90.6%, 精密度为 1.2%~5.2%, 实验室内 HorRat 值为 0.07~0.31。小麦基质中雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 58.9%~100.4%, 精密度为 3.6%~11.3%, 实验室内 HorRat 值为 0.23~0.63; 玉米中雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 56.9%~91.9%, 精密度为 2.5%~7.8%, 实验室内 HorRat 值为 0.11~0.43。**结论** 该方法具有灵敏度高、重现性好、操作简便、准确可靠等特点, 适用于小麦和玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌烯醇的测定。

**关键词:** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 雪腐镰刀菌烯醇; 免疫亲和净化; 高效液相色谱法

## Determination and analysis of deoxynivalenol and nivalenol in wheat and corn using immunoaffinity column cleanup and high performance liquid chromatography

WU Zhen-Xing<sup>1\*</sup>, BAO Lei<sup>1</sup>, JING Ping<sup>1</sup>, MEN Ai-Jun<sup>2</sup>, PANG Guo-Xing<sup>3</sup>, ZHAO Hua-Mei<sup>1</sup>

(1. *Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000, China;*  
2. *Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000, China;*  
3. *Qingdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000, China*)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) in wheat and corn by using immunoaffinity column cleanup and high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The sample was extracted with water, then passed through the immunoaffinity column containing antibodies specific for DON and NIV. The DON and NIV were sequentially eluted by 0.5 mL methanol and 1.5 mL acetonitrile, and then were separated on C<sub>18</sub> column. The DON and NIV were detected by HPLC/UV. **Results** The linear ranges of aflatoxin were 0.1~2.0 mg/kg, and the recoveries of

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2012IK174、2006IK105)、山东检验检疫局科技计划项目(SK201363)

**Fund:** Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2012IK174, 2006IK105) and the Scientific and Technological Project of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau (SK201363)

\*通讯作者: 吴振兴, 高级工程师, 主要研究方向为生物毒素检测。E-mail: zhxwoo@126.com

\*Corresponding author: WU Zhen-Xing, Senior Engineer, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266000, China. E-mail: zhxwoo@126.com

DON at 0.1~2.0 mg/kg spiked levels were from 72.8 % to 110.1 % for wheat matrix and from 72.2% to 90.6 % for corn matrix respectively. Recoveries of NIV at 0.1~2.0 mg/kg spiked levels were from 58.9 % to 100.4 % for wheat matrix and from 56.9% to 91.9% for corn matrix respectively. The RSDr of DON at 0.1~2.0 mg/kg spiked levels ranged from 3.6% to 10.8% for wheat matrix and from 1.2% to 5.2% for corn matrix respectively. The RSDr of NIV at 0.1~2.0 mg/kg spiked levels ranged from 3.6% to 11.3% for wheat matrix and from 2.5% to 7.8% for corn matrix respectively. The laboratory HorRat values of DON at 0.1~2.0 mg/kg spiked levels were from 0.24 to 0.48 for wheat matrix and from 0.07 to 0.31 for corn matrix respectively, and within laboratory HorRat values of NIV at 0.1~2.0 mg/kg spiked levels were from 0.23 to 0.63 for wheat matrix and from 0.11 to 0.43 for corn matrix respectively. **Conclusion** The developed method was simple and accurate, and it could be applied for the determination of DON and NIV in wheat and corn.

**KEY WORDS:** deoxynivalenol; nivalenol; immunoaffinity column cleanup; high performance liquid chromatography

## 1 引言

单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)是一大类化学性质相关的真菌毒素,由镰刀菌属、漆斑霉属、木霉属、单端孢属、头孢霉属、轮枝孢霉属和黑色葡萄状穗霉属中的一些真菌产生。单端孢霉烯族毒素对真核细胞具有多重抑制作用,通过对蛋白质、DNA 和 RNA 合成的抑制,以及对线粒体功能、细胞分裂和膜功能的抑制,从而对人类和动物的健康产生免疫抑制作用<sup>[1]</sup>。

单端孢霉烯族毒素划分为 4 种类型: A、B、C、D 型,其中, B 型单端孢霉烯族毒素比较常见。B 型单端孢霉烯族毒素是由镰刀菌产生的一类次级代谢产物,其基本结构为四环的倍半萜,其中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)与雪腐镰刀菌烯醇(nivalenol, NIV)污染范围较广,污染水平较高,广泛存在于多种谷物(小麦、玉米)及其制品中<sup>[2]</sup>。

DON 又称呕吐毒素,对饲料的污染率和污染水平居镰刀菌毒素之首,可以抑制蛋白质合成,破坏大脑神经化学物质,如果长期摄入,还会引起机体免疫能力降低。1998 年,国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)公布的评估报告中, DON 被列为第 3 类致癌物。近年来研究<sup>[3]</sup>表明, DON 与人类食管癌、IgA 肾病、胃癌、骨关节病有关。NIV 具有与前者相似的毒性,虽然其污染率与毒性相对较低,但也广泛存在于多种农作物中,危害性不容忽视。

在食品和饲料中,单端孢霉烯族毒素主要来源于被真菌污染的小麦和玉米等粮食。由这些原料加工

成的早餐麦片、焙烤制品、啤酒及配合饲料等产品中,往往含有单端孢霉烯族毒素<sup>[4,5]</sup>。如果饲养动物的饲料中含有单端孢霉烯族毒素,它们可能通过奶、肉及蛋进入人类和动物的食物链<sup>[6-8]</sup>。因此,对于小麦和玉米等原料中 DON 和 NIV 的检测对于防范毒素污染具有比较重要的意义。这些霉菌毒素可能正通过被污染的谷物、饲料和由这些饲料喂养的动物所提供的食品(奶、肉、蛋等)进入食物链。

国际上对于 DON 的检测方法研究进展很快。Trucksess 等<sup>[9,10]</sup>先后提出了薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)等检测方法;Tacke 等<sup>[11]</sup>提出了采用柱净化法结合电子捕获检测器的气相色谱法(gas chromatography/electron capturedetector, GC/ECD);Casale 等<sup>[12]</sup>提出了酶联免疫吸附试验法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。而对于 NIV 的检测方法,相关研究较少,目前也未有国家对该毒素提出限量标准。本实验提出采用免疫亲和柱(immunoaffinity column, IAC)净化结合高效液相色谱法对 DON、NIV 同时进行检测,该方法操作简便、定量准确、重复性好,可作为现有检测方法的有效补充。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: SHIMADZU LC-20A, 配备紫外检测器, 日本; 色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 4.6 mm×250 mm, 5 μm, 美国; 分析天平: METTLER PM480, 瑞士; 粉碎机: Robot Coupe Blixer 3, 法国; 高

速均质器: IKA T25, 德国; 超纯水系统: MILLIPORE Synergy, 美国; 离心机: HITACHI CR 22G, 日本; 氮吹仪: Biotage Turbovap LV, 美国。

Merk 色谱纯甲醇, 乙腈, 德国; Vicam DON-NIV WB 免疫亲和柱, 美国; Supelco DON 标准溶液(CAS 号 51481-10-8), 美国; Fluka NIV 标准溶液 CAS 号 23282-20-4), 美国; Vicam 玻璃纤维滤纸, 美国; 超纯水。

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 标准工作溶液的配制

将 DON 和 NIV 标准原液氮气吹干, 以空白基质提取液分别配置成 0、0.1、0.5、1.0、2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的标准工作液。

### 2.2.2 样品前处理

取 20 g 充分粉碎过的小麦或玉米样品, 加入 100 mL 超纯水, 高速均质 3 min, 取 40 mL 置于离心管中, 4000 r/min 离心 10 min, 离心上清液以玻璃纤维滤纸过滤。

取 5 mL 滤液缓慢通过免疫亲和柱, 流速 1 滴/s, 随后以 10 mL 超纯水淋洗免疫亲和柱, 最后以 0.5 mL 甲醇和 1.5 mL 乙腈洗脱 DON 和 NIV。洗脱液氮气吹干, 以 0.5 mL 10% 乙腈水溶液定容。

### 2.2.3 液相色谱条件

流动相: 10% 乙腈水溶液, 流速: 0.9 mL/min, 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$ , 检测波长: 218 nm, 进样量: 50  $\mu\text{L}$ 。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱条件的优化

#### 3.1.1 检测波长的确定

在液相色谱上进行紫外全波长扫描, 根据得到的光谱图分析, 如图 1 所示, DON 和 NIV 在 218 nm 处具有最强的吸收, 在该波长下测定, 既保证了检测灵敏度, 又有效避免了杂质干扰。

#### 3.1.2 流动相的优化

根据 Cahill 等<sup>[13]</sup>的研究, 流动相采用水/乙腈(9:1, v:v)对 DON 获得较好的分离效果。本实验采用该流动相体系, 同时将流速降低至 0.9 mL/min, 对 NIV 也获得了较好的分离效果。图 2 为 DON 和 NIV 标准品色谱图。

#### 3.1.3 柱温的选择

本实验比较分析了 20  $^{\circ}\text{C}$ 、30  $^{\circ}\text{C}$ 、40  $^{\circ}\text{C}$  柱温下 DON 和 NIV 保留时间、响应值等差别, 结果显示 3 种柱温条件无显著差异, 为保证检测稳定性和重现性, 以及

提高检测效率、降低能耗, 最终确定柱温为 30  $^{\circ}\text{C}$ 。

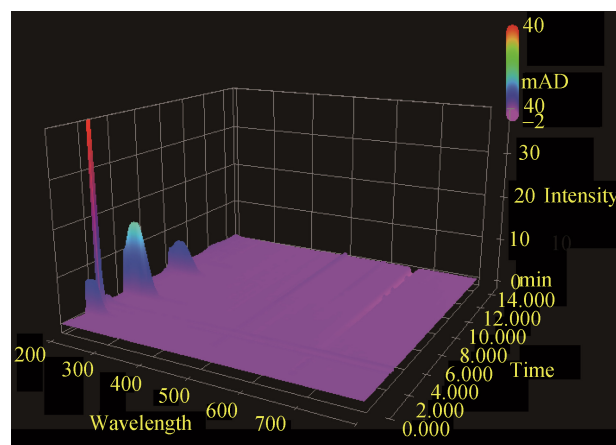


图 1 DON 和 NIV 紫外全波长扫描 3D 光谱图

Fig. 1 UV spectra of full wavelength scan of DON and NIV

#### 3.1.4 进样量的确定

本实验比较分析了 10  $\mu\text{L}$ 、50  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{L}$  进样量下 DON 和 NIV 保留时间、响应值等差别, 结果显示 3 种进样量条件无显著差异, 为最大限度提高检测灵敏度, 以及降低进样量误差, 最终确定进样量为 50  $\mu\text{L}$ 。

### 3.2 提取液和净化柱的选择

试样中 DON 和 NIV 的提取大多采用纯水、乙腈-水或甲醇-水等体系, 提取液经过离心、过滤后采用固相萃取柱、多功能净化柱、免疫亲和柱进行富集、净化<sup>[14-16]</sup>。通过本实验对以上 3 种提取体系的比较, 结果显示都具有较好的提取效率, 由于乙腈和甲醇毒性较大, 故本实验最终采用纯水作为提取剂。

免疫亲和技术是利用免疫化学反应原理, 采用大剂量的单克隆抗体, 选择性吸附提取液中的抗原物质。相比较于其他净化方式, 免疫亲和净化处理具有特异性强、灵敏度高、回收率高等优点, 而且操作简便, 快速高效, 大大提高了净化效率, 缩短了处理时间。同时又显著减少了以往净化操作中有毒有害试剂的使用量, 有利于保护实验操作人员的健康安全。

### 3.3 方法性能

#### 3.3.1 标准曲线和检测下限

以空白基质提取液配置脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌烯醇梯度系列标准溶液, 在 0.1~2.0 mg/kg 范围内, 对所得峰面积与浓度进行回归分析, 结果显示线性关系良好。回归方程和相关系数如表 1 所示。

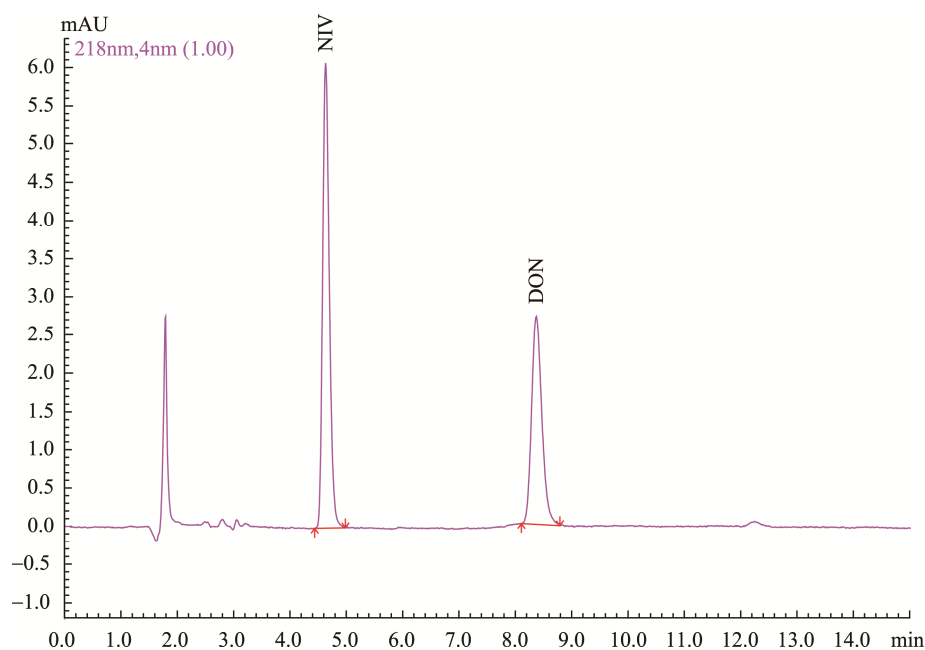


图 2 DON 和 NIV 标准品色谱图

Fig. 2 Chromatograms of DON and NIV

表 1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌烯醇线性范围和相关系数

Table 1 Linear ranges and correlation coefficients of DON and NIV

化合物	线性方程	线性范围(mg/kg)	相关系数( <i>r</i> )
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)	$Y=1.39639e^{-5}X+4.60974e^{-3}$	0.1~2.0	0.9999775
雪腐镰刀菌烯醇 (NIV)	$Y=1.98207e^{-5}X+1.37444e^{-2}$	0.1~2.0	0.9999709

该方法脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌烯醇的检测低限皆为 0.1 mg/kg, 该浓度水平下的色谱峰可以达到 10 倍信噪比要求, 同时满足国际限量要求。

### 3.3.2 回收率和精密度

在 0.1~2.0 mg/kg 范围内, 小麦基质中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 72.8%~110.1%, 精密度为 3.6%~10.8%, 实验室内 HorRat 值为 0.24~0.48; 玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 72.2%~90.6%, 精密度为 1.2%~5.2%, 实验室内 HorRat 值为 0.07~0.31。小麦基质中雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 58.9%~100.4%, 精密度为 3.6%~11.3%, 实验室内 HorRat 值为 0.23~0.63; 玉米中雪腐镰刀菌烯醇的回收率为 56.9%~91.9%, 精密度为 2.5%~7.8%, 实验室内 HorRat 值为 0.11~0.43。

## 4 结论

本研究采用免疫亲和净化结合高效液相色谱检测小麦和玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇与雪腐镰刀菌

烯醇, 该方法具有灵敏度高、重现性好、操作简便、准确可靠等特点, 可以满足日常检测业务的需求, 值得推广应用。

### 参考文献

- [1] Rocha O, Ansari K, Doohanf M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review [J]. Food Addit Contam, 2005, 22: 369-378.
- [2] Eriksen GS, Alexander J. Fusarium toxins in cereals-a risk assessment [J]. Tema Nord, 1998, 502: 7-44.
- [3] Hussein S, Jeffrey MB. Toxicity metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals [J]. Toxicology, 2001, 167(2): 101-134.
- [4] Lancova K, Hajslova J, Poustka J, *et al.* Transfer of Fusarium mycotoxins and masked deoxynivalenol (deoxynivalenol-3-glucoside) from field barley through malt to beer [J]. Food Addit Contam, 2008, 25: 732-744.
- [5] Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: a decade in review [C]. Proceedings of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, 2001:

- 153–172.
- [6] Goyarts T, Danicke S, Valenta H, *et al.* Carry-over of Fusarium toxins (deoxynivalenol and zearalenone) from naturally contaminated wheat to pigs [J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(4): 369–380.
- [7] Seeling K, Danicke S, Valenta H, *et al.* Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows [J]. *Food Addit Contam*, 2006, 23(10): 1008–20.
- [8] Valenta H, Danicke S. Study on the transmission of deoxynivalenol and deepoxy-deoxynivalenol into eggs of laying hens using a high-performance liquid chromatography-ultraviolet method with clean-up by immunoaffinity columns [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49: 779–785.
- [9] Trucksess MW, Nesheim S, Eppley RM. Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn [J]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1984, 67: 40–43.
- [10] Trucksess WM, Page SW, Wood GE, *et al.* Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran by solid-phase extraction/liquid chromatography: interlaboratory study [J]. *J AOAC Int*, 1998, 81: 880–886.
- [11] Tacke BK, Casper HH. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection [J]. *J AOAC Int*, 1996, 79(2): 472–475.
- [12] Casale WL, Pestka JJ, Hart LP. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol and several analogues [J]. *J Agr Food Chem*, 1988, 36: 663–668.
- [13] Cahill LM, Kruger SC, Mcalice BT. Quantification of deoxynivalenol in wheat using an immunoaffinity column and liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 1999, 859(1): 23–28.
- [14] Lisa MC, Scott CK, Brian TM, *et al.* Quantification of deoxynivalenol in wheat using all immunoaffinity column and liquid chromatography [J]. *J Chromat A*, 1999, 859: 23–28.
- [15] 隋凯, 李军, 卫锋, 等. 谷物中脱氧霉腐镰刀菌烯醇的高效液相色谱检测及质谱确证[J]. *分析化学*, 2005, 33(11): 1643–1646. Sui K, Li J, Wei F, *et al.* Determination of deoxynivalenol in cereal grains by high performance liquid chromatography and verified by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2005, 33(11): 1643–1646.
- [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. Mao D, Xu Y, Zhang DG, *et al.* HPLC determination of vomitoxin in cereals [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2007, 17(12): 2207–2208.

(责任编辑: 张宏梁)

#### 作者简介



吴振兴, 高级工程师, 主要研究方向为生物毒素检测。  
E-mail: zhxwoo@126.com