

关于玉米中玉米赤霉烯酮(ZEA)阳性结果 确证的研究

董振霖, 苏明明, 张颖焱, 董伟峰, 李妍, 曹际娟*

(辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001)

摘要: **目的** 15批玉米样品检测玉米赤霉烯酮, 其中有2批样品疑似阳性。通过本实验对结果进行确证。**方法** 比较流动相采用等度洗脱(乙腈:水=65:35)时重复进标准样品和疑似样品对保留时间的稳定性影响, 采用等度洗脱时不同流动相配比(乙腈:水分别为65:35和55:45)时标准样品的出峰时间, 以及流动相采用等度洗脱(乙腈:水=55:45)时, 不同溶解液配比(乙腈:水为65:35和乙腈:水:甲醇为46:46:8)标准品的出峰时间。**结果** 排除干扰, 确定此两批玉米样品中玉米赤霉烯酮呈阳性。**结论** 多方面对疑似阳性结果进行确证, 为日常玉米样品的检测提供了可靠、科学的验证依据。

关键词: 玉米; 流动相; 溶解液; 玉米赤霉烯酮; 阳性

Study on confirmation of positive results of zearalenone (ZEA) in corn

DONG Zhen-Lin, SU Ming-Ming, ZHANG Ying-Yan, DONG Wei-Feng, LI Yan, CAO Ji-Juan*

(Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China)

ABSTRACT: Objective To confirm 2 out of 15 corn samples which were suspected zearalenone positive. **Methods** The stability of runtime between standard samples and suspected samples was compared when the mobile phase adopted isocratic elution (acetonitrile:water=65:35). The peak time of standard samples was compared when the mobile phase adopted different mobile phase ratio (acetonitrile:water =65:35 vs 55:45). And the peak time of standard samples was compared using different solvents when the mobile phase adopted isocratic elution (acetonitrile:water=55:45). **Results** The two batches of corn samples were positive for zearalenone. **Conclusion** This study provides a reliable scientific method for the detection of corn samples.

KEY WORDS: corn; mobile phase; dissolving liquid; zearalenone; positive

1 引言

玉米赤霉烯酮广泛存在于谷物中, 且由玉米、大麦和小麦等自然产生, 主要是由玉米赤霉菌、禾谷镰刀菌和三线镰刀菌等真菌所产生的具有雌激素作用

的真菌毒素。它对动物的生殖性能和对人体健康的负面影响都相当大, 危害仅次于黄曲霉毒素^[1]。玉米赤霉烯酮具有生殖发育毒性、免疫毒性、基因毒性和可疑致癌毒性等^[2]。对人体有引发癌变, 诱导DNA序列改变, 导致染色体不正常等影响^[3]。由于其对人的

基金项目: 辽宁省博士科研启动基金项目(20121146)、国家质检总局科技计划项目(2013IK168)

Fund: Supported by the Dr. Startup Fund (20121146) and the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2013IK168)

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: cjj0909@163.com

*Corresponding author: CAO Ji-Juan, Professor, Technical Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Zhongshan District, Dalian 116001, Liaoning Province, China. E-mail: cjj0909@163.com.

危害大, 污染谷物的种类广, 世界各国日益重视对其检测和监测。玉米赤霉烯酮的去毒方法主要有物理法、化学法、生物法^[4-7]。目前玉米赤霉烯酮的分析方法主要包括: 薄层色谱法(TLC), 酶联免疫分析法(ELISA)、胶体金免疫层析法(GICA)、免疫亲和柱-高效液相色谱法(IAC-HPLC)^[8-13]。其中, 免疫亲和柱-高效液相色谱法是现在普遍采用的分析方法。大商所送检的 15 批玉米样品中玉米赤霉烯酮的检测方法也是采用此方法, 并且有两批样品疑似阳性。采用等度洗脱(乙腈: 水= 65: 35)检测标样和疑似阳性样品, 在玉米赤霉烯酮标样出峰位置, 样品有峰出现, 保留时间相同。但是采用梯度洗脱(乙腈: 水= 65: 35), 标样与样品出峰位置有差异, 因此无法确定。为了得到准确的结论, 本研究从仪器稳定性、洗脱比例、流动相比、溶解液的配比等多方面对疑似阳性的玉米样品和标品进行比对及排除, 最终确定为玉米赤霉烯酮呈阳性。此分析过程为检测结果提供了科学、可靠的依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

HPLC 带荧光检测器(HP1100, 美国 Agilent 公司); C18 硅胶小柱(J.T.BAKER); 超声波提取仪。标准品: 玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA, 美国 Sigma 公司)用甲醇配制成标准储备液, 冰箱保存。甲醇和乙腈(色谱纯, 美国 Fisher 公司)。所用水均为重蒸水, 所用试剂除指明外, 均为分析纯。

2.2 液相色谱条件的选择

仪器条件: 色谱柱 COSMOSIL 5C18-AR-II (4.6 m×250 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司); 流速: 1.1 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 100 μL; FLD 检测器(激发波长 274 nm, 发射波长: 440 nm), VWD(260 nm)。

2.3 试样提取

大商所送检的玉米样品, 经粉碎混匀后, 称取 10.0 g 样品置于 100 mL 容量瓶中, 加 30 mL 甲醇, 50 g/L NaCl 溶液 20 mL, 摇荡 5 min 后, 超声提取 30 min, 用滤纸过滤到分液漏斗中, 加入二氯甲烷萃取(分 3 次, 每次 20 mL), 二氯甲烷层经无水硫酸钠脱水并收集于蒸发皿内, 于恒温水浴上挥干溶剂。用 6 mL 甲醇-水(40:60)分 3 次溶解残渣, 转入 C18 小柱后, 用 4 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液于具塞刻度离心管中, 用氮气吹干至 1 mL, 以 3000 r/min, 离心 5 min, 取上清液进样测定。以保留时间定性, 峰高增量法确认, 标准曲线法定量。

3 结果与讨论

3.1 流动相配比的考察

更改等度洗脱条件由原来(乙腈:水=65:35)变为(乙腈:水=55:45), 使分离度更好, 同时观察不同浓度的标保留时间是否一致, 实验证明不同浓度的标准样品以及相同浓度标准样品进样两次保留时间均一致, 但与疑似样品保留时间不一致, 详见图 1。如果单从保留时间考察, 可以确定是假阳性。

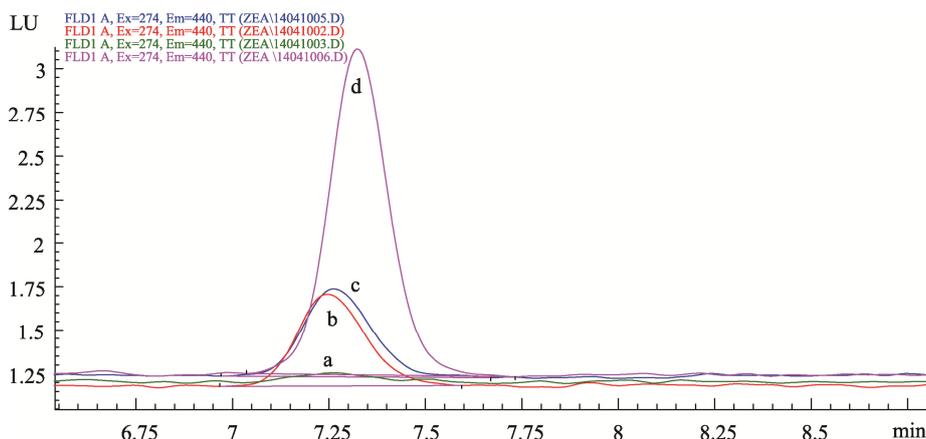


图 1 等度洗脱(乙腈: 水=55: 45)

Fig. 1 Isocratic elution (acetonitrile: water = 65: 35)
a: STD 10 ng/mL; b, c: STD 100 ng/mL; d: 疑似阳性样品

3.2 溶解液配比的考察

但从保留时间考察依然不够准确, 为了更加准确的确证结果, 排查整个实验过程, 发现一个比较容易被忽略的问题, 标准工作溶液的溶剂和样品的溶解液不一致, 标样采用 65: 35 乙腈水为溶剂, 样品定容液为乙腈: 水: 甲醇(46: 46: 8), 而且此方法进样量均为 100 μL , 如此大的进样量, 初步推断为进样量过大导致的保留时间偏差。为了证明此推断, 采用上述两种不同溶液分别配制 100 ng/mL 标准工作溶液并同时进样, 观察二者保留时间, 详见图 2。实验结论为不同溶剂的标准工作溶液保留时间也同样不一致, 而且溶剂相同的标样和疑似样品的保留时间是一致的, 详见图 3。这就找到了结论的症结: 导致标样与

疑似样品保留时间不一致是因为标样和疑似样品溶剂不同(如果进样量小, 比如 5、10 μL , 不同溶剂就不会使保留时间产生如此大的差异, 但 100 μL 的进样量过大, 就产生了如此大的差异), 并不是假阳性, 而是真阳性。

3.3 从不同的角度辅助判定是否阳性

基本确认此样品为阳性, 再通过另外一个方法侧面辅助确证其阳性。观察标和疑似阳性样品色谱峰 VWD 和 FLD 响应值之比。假如疑似样品的色谱峰为保留时间相似的干扰杂质, 那么其响应值之比与 ZEA 标的在 VWD 和 FLD 响应值之比相似的可能性不大。而本疑似阳性样品与标比值非常相近, 因此更证明此疑似阳性样品确实含有 ZEA。数据见表 1 和图 4、5。

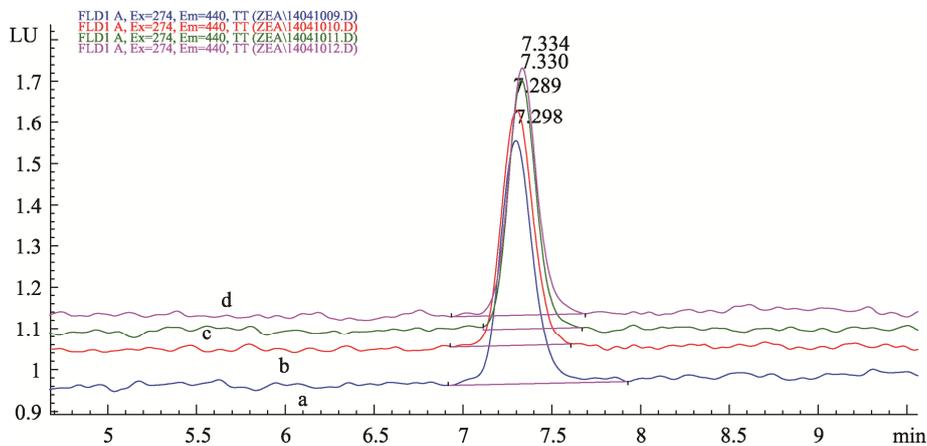


图 2 等度洗脱(乙腈: 水=55: 45)

Fig. 2 Isocratic elution (acetonitrile: water =55: 45)

a,b: STD 100 ng/mL(65: 35 乙腈-水为溶剂); c,d: STD 100 ng/mL(46: 46: 8 乙腈-水-甲醇为溶剂)

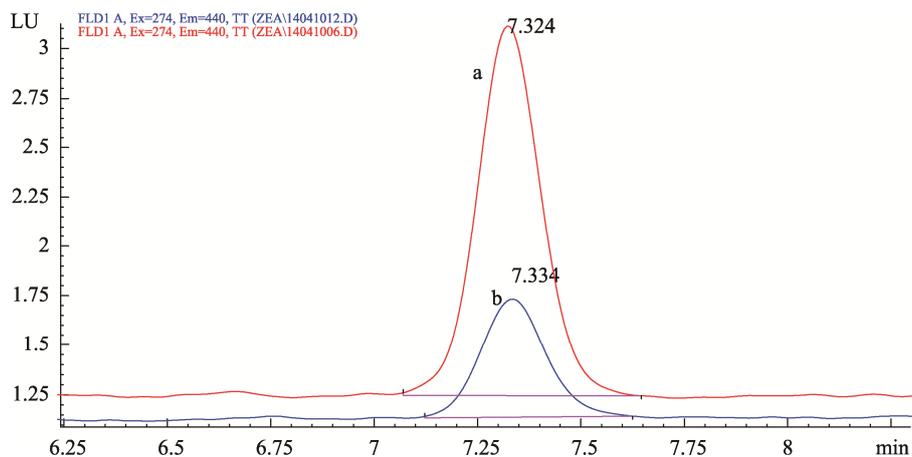


图 3 等度洗脱(乙腈: 水=55: 45)

Fig. 3 Isocratic elution (acetonitrile: water =55: 45)

a: 疑似阳性样品(46: 46: 8 乙腈水甲醇为溶剂); b: STD 100 ng/mL(46: 46: 8 乙腈水甲醇为溶剂)

表1 VWD和FLD响应值之比
Table 1 The ratio of VWD and FLD

项目	VWD面积	FLD面积	VWD/FLD响应值比
100 ng/mL 标准样品	15.1	6.0	2.5
疑似样品	54.0	20.4	2.6

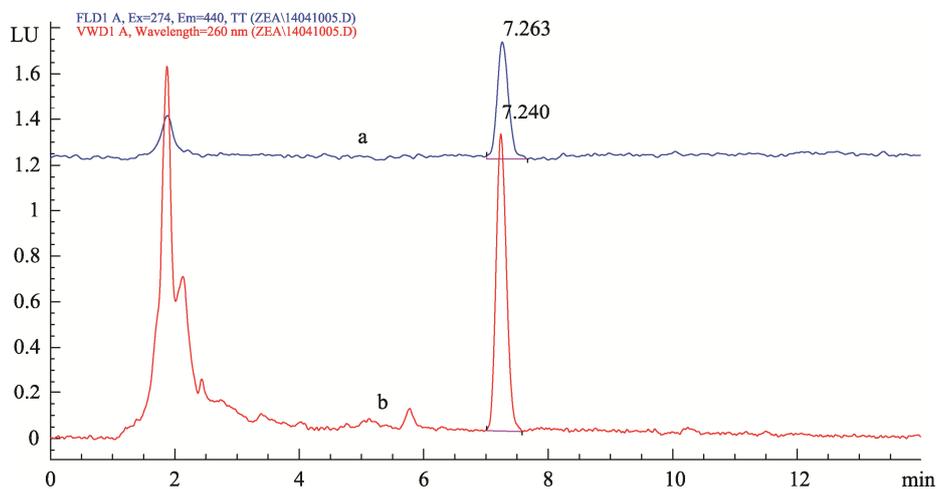


图4 100 ng/mL 标样 FLD 和 VWD 色谱图

Fig. 4 FLD and VWD chromatogram of 100 ng/mL STD
a: FLD; b: VWD

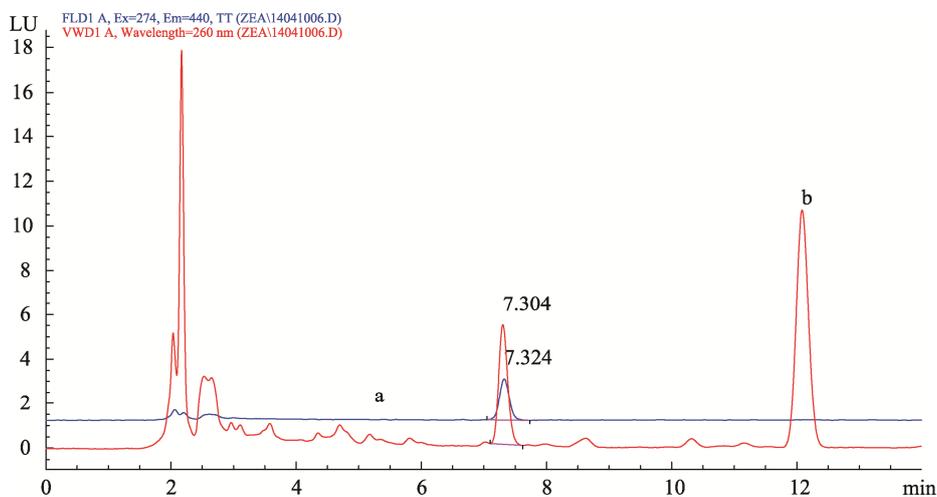


图5 疑似阳性样品 FLD 和 VWD 色谱图

Fig. 5 FLD and VWD chromatogram of suspected samples
a: FLD; b: VWD

3.4 QTOF 5600+四级杆飞行高分辨质谱仪

利用QTOF 5600+四级杆飞行高分辨质谱仪更加准确的对样品进行判定,如图6以及表2可知,样品含有ZEA。

4 结论

15批样品中只有两批检测出疑似阳性,而且免疫亲和柱选择性很好,结果较为准确。但在排除仪器

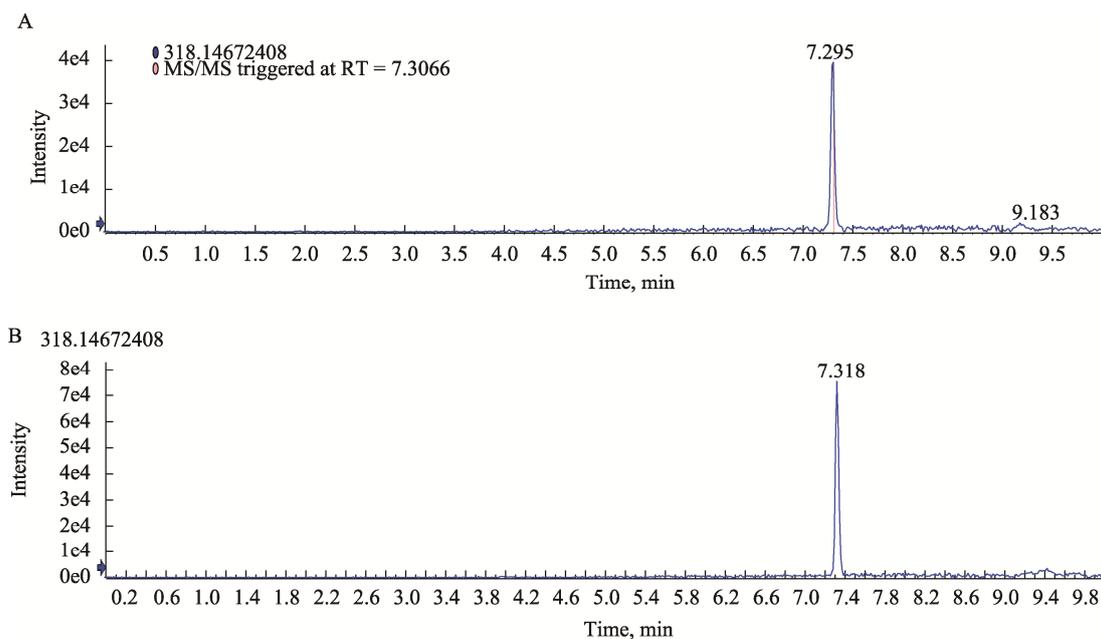


图 6 色谱分析图

Fig. 6 Chromatographic analysis diagram

A: ZEA; B: sample

表 2 疑似样品和标准品的比较

Table 2 Comparison of standard and MASS

检测对象	准确质量数 (Da)	检测质量数 (Da)	出峰时间 (min)	偏差 (ppm)
标准品	319.154	319.15396	7.295	-0.1
样品	319.154	319.15382	7.318	-0.6

稳定性等所有因素之后, 标样与疑似阳性色谱峰保留时间却存在明显的不一致, 从保留时间判断就是假阳性。两个结论明显相矛盾, 但经过逐步的推理、分析与实验后, 矛盾的症结在于标样和样品的溶解液不同, 而且进样量大(100 μ L)导致了保留时间不一致, 同时溶解液相同的标准样品和疑似样品的保留时间一致, 而且疑似样品中色谱峰与标样色谱峰在不同检测器的响应值之比也非常相近。因此可以确定此样品为阳性样品。

参考文献

- [1] 李军, 于一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素[J]. 色谱, 2006, 24(6): 55-58.
Li J, Yu Y M, Tian M, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxins, zearalenone and ochratoxin A in cereal grains by immunoaffinity column and high performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical derivatization [J]. *Chin J Chromatogr*, 2006, 24(6): 55-58.
- [2] 陈新建, 刘泓川, 孟繁静. 玉米赤霉烯酮的直接酶联免疫分析[J]. 植物生理学通讯, 1989, 5: 61-63.
Chen XJ, Liu WC, Meng FJ. ELISA analysis of zearalenone [J]. *Plant Physiol Commun*, 1989, 5: 61-63.
- [3] 雪云, 胡霞, 李玉伟. 小麦、小麦制品及玉米中玉米赤霉烯酮的薄层色谱测定[J]. 卫生研究, 1993, 22(2): 112-115.
Luo XY, Hu X, Li YW. Wheat, wheat products and corn zearalenone thin layer chromatography [J]. *Health Res*, 1993, 22(2): 112-115.
- [4] 隋凯, 李军, 卫锋, 等. 免疫亲和柱-高效液相色谱法检测玉米中的玉米赤霉烯酮[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(6): 657-658.
Sui K, Li J, Wei F, *et al.* Determination of zearalenone in corn by high-performance liquid chromatography with immunoaffinity clean-up column [J]. *Chin J Health Inspect*, 2006, 16(6): 657-658.
- [5] 李荣涛, 谢刚, 付鹏程, 等. 小麦和玉米中玉米赤霉烯酮污染情况初探 (I)[J]. 粮食储藏, 2004, 33(5): 36-38.
Li RT, Xie G, Fu PC, *et al.* Preliminary wheat and maize zearalenone contamination (I) [J]. *Grain Stor*, 2004, 33(5): 36-38.
- [6] 赵虎, 杨在宾, 杨维仁, 等. 玉米赤霉烯酮对仔猪生产性能和内脏器官发育影响的研究[J]. 粮食与饲料工业, 2008, (10): 37-38.

- Zhao H, Yang ZB, Yang WR, *et al.* Research zearalenone piglet performance and visceral organ development impact on the corn [J]. Food Feed Ind, 2008, (10): 37-38.
- [7] 罗毅, 刘锋, 冯建林, 等. 高效液相色谱和高效液相色谱-质谱法测定粮食中互隔交链孢霉醇, 互隔交链孢霉醇单甲醚及玉米赤霉烯酮[J]. 色谱, 1994, 12(5): 342-344.
- Luo Y, Liu F, Feng JL, *et al.* High performance liquid chromatography and high performance liquid chromatography - mass spectrometry in food Alternaria Neurospora alcohol, Alternaria alternata glycol monomethyl ether and zearalenone [J]. Chin J Chromatogr, 1994, 12(5): 342-344.
- [8] 曾红燕, 黎源倩, 敬海泉. 高效液相色谱法测定粮食中玉米赤霉烯酮及其代谢物[J]. 分析化学, 2006, 34(3): 351-354.
- Zeng HY, Li YQ, Jing HQ. Determination of zearalenone in grain its metabolites by HPLC [J]. Anal Chem, 2006, 34(3): 351-354.
- [9] 何庆华, 许杨. 玉米赤霉烯酮毒性研究及检测方法进展[J]. 卫生研究, 2005, 34(4): 502-504.
- He QH, Xu Y. Advances in research and testing methods zearalenone toxicity [J]. Health Res, 2005, 34(4): 502-504.
- [10] 康维钧, 王玉平, 杨福江, 等. 反相高效液相色谱法测定玉米中玉米赤霉烯酮[J]. 分析试验室, 2007, 26(10): 66-68.
- Kang WJ, Wang YP, Yang FH, *et al.* Determination of zearalenone in corn by RP-HPLC [J]. Anal Lab, 2007, 26 (10): 66-68.
- [11] 隋凯, 李军, 郑江. 多功能柱净化-高效液相色谱法检测谷物中的玉米赤霉烯酮[J]. 分析试验室, 2006, 25(1): 99-102.
- Sui K, Li J, Zheng J. Multifunction column clean - High Performance Liquid Chromatography cereals zearalenone [J]. Chin J Anal Lab, 2006, 25(1): 99-102.
- [12] 田苗, 林维宣. 单克隆免疫亲和柱-高效液相色谱法测定玉米中的玉米赤霉烯酮[J]. 冷饮与速冻食品工业, 2003, 9(2): 27-29.
- Tian M, Lin WX. Monoclonal immunoaffinity column - determination of maize zearalenone HPLC[J]. Frozen Food Ind, 2003, 9 (2): 27-29.
- [13] 何叶如, 申光荣. 玉米赤霉烯酮对种猪繁殖性能的影响[J]. 养猪, 2004, (1): 13-14.
- He YR, Shen GR. Zearalenone influence reproductive performance of swine [J]. Pig, 2004, (1): 13-14.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



董振霖, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: meng8135@163.com。



曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: cjj0909@163.com