

# 多功能柱净化-高效液相色谱法检测粮谷 及其制品中的呕吐毒素

鲍蕾\*, 吴振兴, 石媛媛, 静平, 梁成珠

(山东出入境检验检疫局技术中心, 青岛 266002)

**摘要:** **目的** 建立呕吐毒素的多功能柱净化-高效液相色谱检测方法, 并建立液相色谱-串联质谱确证方法。**方法** 样品经乙腈-水溶液(84 : 16, v:v)提取、多功能柱净化、吹干、定容后, 最后以液相色谱-紫外检测器进行定量分析, 阳性检出以液相色谱-串联质谱法确证。**结果** 该方法定量限为 0.3  $\mu\text{g/g}$ , 在 0.5、1.0、1.5  $\mu\text{g/g}$  的添加水平下, 样品回收率为 66.0%~98.3%, 室内相对标准偏差(RSDr)为 1.9%~12.7%, 室内 HorRat 值为 0.1~0.7。**结论** 该方法操作简便, 灵敏度高, 选择性好, 适用于粮谷及其制品中呕吐毒素的检测。**关键词:** 呕吐毒素; 多功能柱; 液相色谱法; 液相色谱-串联质谱法; 粮谷及其制品

## Determination of deoxynivalenol in grain and grain products by multifunctional column clean-up and high performance liquid chromatography

BAO Lei\*, WU Zhen-Xing, SHI Yuan-Yuan, JING Ping, LIANG Cheng-Zhu

(Technology Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 26602, China)

**ABSTRACT: Objectives** To establish a simple and rapid determination method of deoxynivalenol (DON) in grain and grain products by multifunctional column clean-up and high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Samples were extracted with acetonitrile-water (84 : 16, v:v), and the extracted liquid was purified by multifunctional columns. After drying, and re-dissolved in the mobile phase, the toxins were subjected to HPLC-UV analysis. The positive results were confirmed using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis. **Results** Recoveries of DON added at levels ranging from 0.5 to 1.5  $\mu\text{g/g}$  for all tested samples were from 66.0% to 98.3%. Relative standard deviation (RSDr) ranged from 1.9% to 12.7%. Within-laboratory HorRat values were from 0.1 to 0.7. **Conclusion** This method is simply clean-up, rapid and of high sensitivity, and suitable for the identification and quantification of DON in grain and grain products.

**KEY WORDS:** deoxynivalenol; multifunctional column; high performance liquid chromatography; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; grain and grain products

单端孢霉烯族真菌毒素(trichothecenes)是近年来危害人类健康、阻碍国际贸易的一大类真菌毒素,

主要由镰刀霉菌产生。迄今为止, 已有 170 多种单端孢霉烯族真菌毒素得到鉴定。呕吐毒素又称脱氧

\*通讯作者: 鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为真菌毒素检测及科研。E-mail: baol@aoacchina.org

\*Corresponding author: BAO Lei, Professor, No. 70 Qutangxia Road, Technology Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China. E-mail: baol@aoacchina.org

雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 是单端孢霉烯族化合物中对人类危害较大的一种真菌毒素<sup>[1]</sup>。DON 广泛存在于粮谷及其制品中, 如大麦、小麦、玉米、燕麦、啤酒和面包等, 具有急性毒性、免疫毒性和胚胎毒性等特征, DON 的化学结构式见图 1。

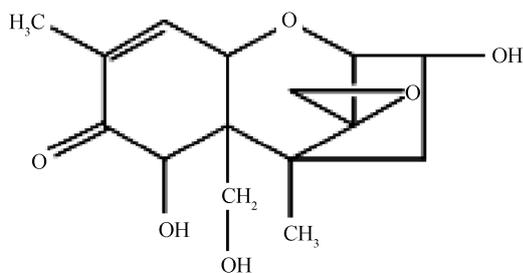


图 1 DON 化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of deoxynivalenol (DON)

鉴于 DON 存在的广泛性及对农产品污染、对动物及人类健康的重大危害, 许多国家已制定了限量标准。目前, 世界上已有 42 个国家制定了 DON 限量规定, 限量范围 300~2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 我国规定了谷物及其制品中 DON 含量不得超过 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[2]</sup>; 美国 FDA 也针对供人类消费的小麦加工终产品, 规定了 DON 的控制浓度为 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>; 欧盟规定了人类直接食用的谷物和谷物淀粉中 DON 的浓度不得超过 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[4]</sup>; 联合国粮农组织(FAO)规定了供人类使用的小麦制品中 DON 含量不得超过 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

为了保证食品安全和消费者的健康, 有必要建立一个准确的食物中 DON 的分析方法。目前 DON 的检测方法主要有薄层层析色谱法(TLC)、酶联免疫吸附试验法(ELISA)、高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)等。在这些检测方法中, HPLC 连接多种检测器进行定量检测最为常用<sup>[5-7]</sup>, 而液相色谱-串联质谱法可以实现目标化合物的定性、定量检测<sup>[8]</sup>。DON 前处理包含几种不同类型的净化方式, 如多功能柱净化、免疫亲和柱净化和其他固相萃取净化<sup>[9]</sup>。本实验建立了多功能柱净化-高效液相色谱法检测粮谷及其制品如大麦、全麦粉、面粉(不含麸皮)、小麦、玉米粉等中的 DON, 并采用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)对 DON 阳性样品进行了确证分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

色谱级甲醇、乙腈, 超纯水。提取液: 乙腈-水溶液(84:16, v:v); 多功能柱(MycoSep225, ROMER); DON 标准品(1 mg, Sigma-Aldrich)。

DON 标准储备液(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 配制: 用乙腈将 DON 固体标准品溶解为标准储备液, 浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 呕吐标准中间液(20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )配制: 用乙腈稀释标准储备液至大约 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 紫外光谱仪记录该溶液在 220 nm 波长处的最大吸光度, 根据以下公式计算 DON 标准中间液的准确浓度,  $\text{DON} (\text{mg}/\text{mL}) = [(A \times \text{MW} \times 1000) / \epsilon] \times 25$ , ( $A$  是吸光度,  $\text{MW}$  为 DON 的分子量,  $\epsilon$  是摩尔吸光系数); 制备系列标准工作液(浓度分别为 0.0625、0.1250、0.2500、0.5000、1.0000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ): 用流动相 A 甲醇-乙腈-水溶液(80:60:860, v:v:v)将标准中间液分别稀释成 0.0625、0.1250、0.2500、0.5000、1.0000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列标准工作液。

### 1.2 仪器和设备

高效液相色谱仪(Waters 2695 Alliance)配紫外检测器; 超纯水系统(MILLIPORE Synergy® UV); 氮吹仪(N-EVAPTM 111, Organomation Associates, Inc.); 分析天平(PM480, METTLER); 高速均质器(ULTRA-TURRAX T-25, IKA); 串联质谱仪(AB SCIEX API 4000)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 提取

大麦、全麦粉、面粉、小麦、玉米粉均购于超市。准确称取粉碎样品 25 g(精确至 0.01 g)于 500 mL 具塞锥形瓶中, 加入 100 mL 乙腈-水(84:16, v:v)提取液, 以均质器高速搅拌 3 min。收集提取液, 取 7 mL 提取液于 10 mL 试管。待净化。

#### 1.3.2 净化、定容

缓慢推压多功能净化柱, 使试管内提取液缓慢滤过净化柱, 大约在半分钟内通过 2.5 mL 净化液。取净化液 2 mL, 40  $^{\circ}\text{C}$  氮气吹干, 用流动相 A 甲醇-乙腈-水溶液(80:60:860, v:v:v)定容至 500  $\mu\text{L}$ 。涡旋 2 min, 转移至 Eppendorf 管, 14000 r/min 离心, 取上清液进行高效液相色谱分析。

#### 1.3.3 高效液相色谱条件

依次进样试剂空白(流动相)、系列标准工作液

(0.0625、0.1250、0.2500、0.5000、1.0000  $\mu\text{g/mL}$ )和测试样品各 50  $\mu\text{L}$ 。通过比较样品与标准品的 DON 特征峰的保留时间进行定性。通过标准曲线测定样品中 DON 的浓度。色谱柱为 YMC ODS-AQ S-3(150 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ , 进样时保持室温(22 $\pm$ 2)  $^{\circ}\text{C}$ 。流速 0.8 mL/min, 进样量 50  $\mu\text{L}$ 。采用梯度洗脱条件, 流动相 A 为甲醇/乙腈/水(80:60:860, v:v:v), 流动相 B 为甲醇/水溶液(1:1, v:v), 0~14 min, A 为 100%; 14~20 min, B 为 100%; 20~35 min, A 为 100%。检测波长 220 nm。

#### 1.4 定量和计算

对测试样品中 DON 进行定量, 需要测定特征峰面积并与标准曲线进行比较。以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标( $\mu\text{g/mL}$ ), 过原点做标准曲线, 根据以下公式计算 DON 的含量,  $\text{DON}(\mu\text{g/g}) = \{[(R/S) \times V]/W\} \times F$ , R 为样液中 DON 的峰面积; V 为样液最终定容体积, 0.5 mL; F 为稀释系数; W 为最终样液所代表的试样量, 0.5 g。

#### 1.5 回收率实验

选取大麦、全麦粉、面粉、小麦和玉米粉共 5 种样品空白基质(DON 含量小于 0.1  $\mu\text{g/g}$ ), 采用 DON 标准储备液(500  $\mu\text{g/mL}$ ), 对空白样品分别进行 0.5、1.0、1.5  $\mu\text{g/g}$  3 个浓度水平、4 个平行样品的

添加。检测前, 添加样品在室温放置至少 1 h。

#### 1.6 液相色谱-串联质谱条件

色谱条件: 色谱柱 Waters Atlantic dC<sub>18</sub> 柱(2.1 mm $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 进样体积 20  $\mu\text{L}$ , 流动相采用梯度洗脱条件, 如表 1 所示。流动相 A 为水, 流动相 B 为 95%乙腈水溶液, A、B 项都含有 0.05%甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵。质谱条件: 离子化方式为电喷雾离子化负模式(ESI<sup>-</sup>), 检测方式为多反应监测(MRM)。离子源条件: 碰撞气压力(CAD)为 12, 气帘气压力(CUR)为 10; 电喷雾电压(IS): -4000 V; 离子源温度(TEM)为 600  $^{\circ}\text{C}$ 。化合物的多反应监测离子对及质谱相关参数如表 2 所示。液相色谱-串联质谱检测方法检测限(信噪比大于 10)0.1  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 多功能柱的选择

目前许多方法能检测粮谷及其制品中的 DON<sup>[10]</sup>, 如液相色谱法、薄层色谱法、气相色谱法和酶联免疫法, 但是部分方法的前处理步骤复杂、耗时。固相萃取柱可以起到很好的富集、净化效果。相比其他固相萃取柱, 采用多功能柱净化, 操作使用简便, 回收率高。本研究在实验过程中曾尝试使用部分免疫亲和柱净化, 发现在 DON 的保留时间附近存在许多杂峰,

表 1 梯度洗脱条件

Table 1 Gradient elution condition

时间	流速( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	水(%)	95%乙腈水溶液(%)
0.0	300	95	5
2.0	300	95	5
4.0	300	10	90
7.0	300	10	90
7.1	300	95	5
12.0	300	95	5

表 2 DON 的多反应监测离子对及质谱相关参数表

Table 2 Multiple reaction monitoring transition and mass spectrometry parameters of deoxynivalenol

化合物	电离模式	母离子	子离子( $m/z$ )	去簇电压(V)	碰撞能量(V)
DON	ESI <sup>-</sup>	295.0	265.0*	-64	-15
			138.1	-55	-21

\*为定量离子

当添加 1.0~1.5  $\mu\text{g/g}$  的毒素时, 得到的回收率为 50%~70%。因此在本实验中选用了多功能柱净化高效液相色谱检测、结合串联质谱法确证检测粮谷及其制品中的 DON。

## 2.2 流动相的选择

对于面粉、玉米粉等较为简单的样品基质, 采用 17% 的甲醇作流动相比较合适。但对于小麦、全麦粉等较为复杂的样品基质, 当采用 17% 的甲醇为流动相时, 在 DON 保留时间附近有一些干扰峰。因此, 针对较为复杂的样品基质, 尝试了不同比例的甲醇、乙腈和水混合后作为流动相。实验结果发现, 当甲醇、乙腈、水的体积比例为 80:60:860 时, 检测时可将

DON 峰与干扰峰分开。待 DON 洗脱后, 采用 50% 的甲醇作为流动相, 将色谱柱中强极性的杂质洗脱下来。DON 的保留时间约为 11.5 min, 详见图 2。

## 2.3 进样量的选择

增大进样量可以提高目标物的响应值, 但进样量过大会导致峰型变差、峰宽变宽等情况。实验证明, 将样品溶液的最终定容体积从 200  $\mu\text{L}$  提高到 500  $\mu\text{L}$ , 既获得了较好的峰型, 又能为液相色谱的分离和定量、串联质谱的确证提供足够的样品量。图 2 是 0.5  $\mu\text{g/mL}$  DON 标准品色谱图、0.5  $\mu\text{g/g}$  DON 添加水平的玉米粉样品色谱图和天然污染的玉米粉阳性样品色谱图。

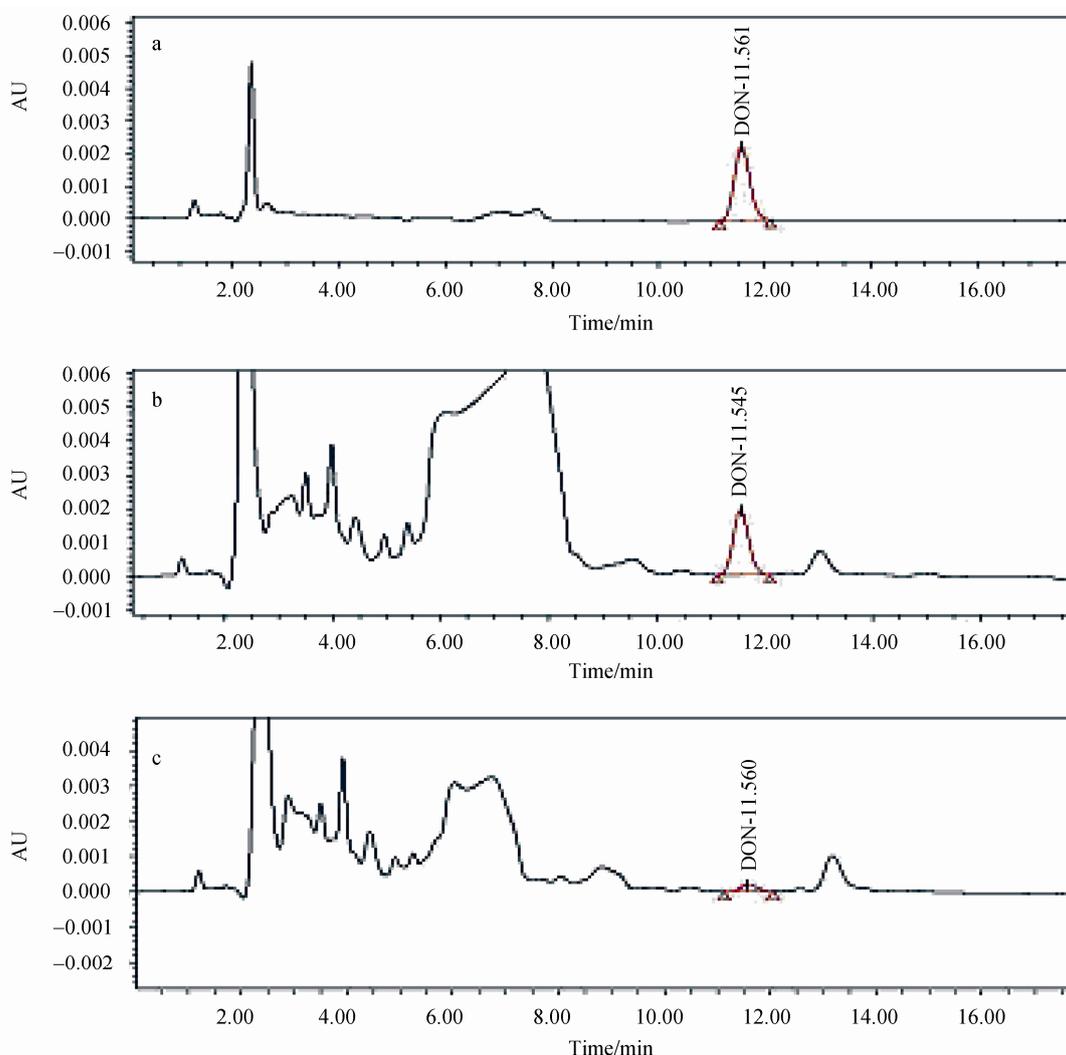


图 2 液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatograms

a; 0.5  $\mu\text{g/mL}$  浓度 DON 标准品色谱图; b: 0.5  $\mu\text{g/g}$  添加水平玉米粉色谱图; c: 天然玉米粉样品色谱图

## 2.4 线性关系、检出限、检测限

依次进样试剂空白(流动相)、系列标准工作液(浓度分别为 0.0625、0.1250、0.2500、0.5000、1.0000 $\mu\text{g/mL}$ ),以峰面积( $Y$ 轴)对应的 DON 各组分浓度( $X$ 轴)作图,结果表明,测定的 DON 浓度与对应的峰面积呈现良好的线性关系( $r=0.99943$ )。

该方法的检出限为 0.1  $\mu\text{g/g}$ (信噪比大于 3),检测限为 0.3  $\mu\text{g/g}$ (信噪比大于 10)。

## 2.5 回收率和精密度

在 0.5、1.0、1.5  $\mu\text{g/g}$  的添加水平下,样品回收率为 66.0%~97.3%,室内相对标准偏差(RSD<sub>r</sub>)为 1.9%~12.7%,室内 HorRat 值为 0.1~0.7,详见表 3。

## 2.6 串联质谱确证

本研究采用了液相串联质谱法对 DON 阳性样品进行确证。母离子质荷比为 296.0,进行二级质谱碎片分析,得到特征子离子信息,根据其质谱图中的碎片离子选择丰度相对较高或相对分子量较大的碎片,最后确定特征子离子。确定离子对后再对 MRM 参数进行自动优化。0.5  $\mu\text{g/g}$  浓度水平 DON 添加回收样品质谱图见图 3。

## 3 结 论

利用多功能柱净化-高效液相色谱法检测粮谷及其制品中 DON 方法的检出限为 0.1  $\mu\text{g/g}$ ,检测限为 0.3  $\mu\text{g/g}$ ,相对标准偏差(RSD)为 1.4%~10.1%,室内

表 3 粮谷及其加工食品的加标回收率,标准偏差,室内相对标准偏差和室内 HorRat 值  
Table 3 Average recoveries, SD, RSD<sub>r</sub>, and the HorRat values for DON in grains and processed foods

基质	添加水平(mg/kg)	回收率(%)	室内相对标准偏差(%)	室内 HorRat 值
全麦粉	0.5	97.3	7.2	0.4
	1.0	97.0	4.0	0.3
	1.5	96.3	3.4	0.2
面粉	0.5	84.1	6.4	0.4
	1.0	93.6	5.1	0.3
	1.5	74.4	2.6	0.2
小麦	0.5	91.1	12.7	0.7
	1.0	75.2	3.5	0.2
	1.5	66.0	2.2	0.1
大麦	0.5	87.1	3.2	0.4
	1.0	75.0	1.9	0.1
	1.5	88.4	7.1	0.5
玉米粉	0.5	93.5	5.7	0.3
	1.0	94.2	5.9	0.4
	1.5	98.3	2.7	0.2

室内 HorRat 值 = (RSD<sub>r</sub>/预计室内 RSD), HorRat 值 < 1.3 是可接受的。回收率的计算公式为:回收率(%) = (添加样品中毒素的检测值/添加值) × 100

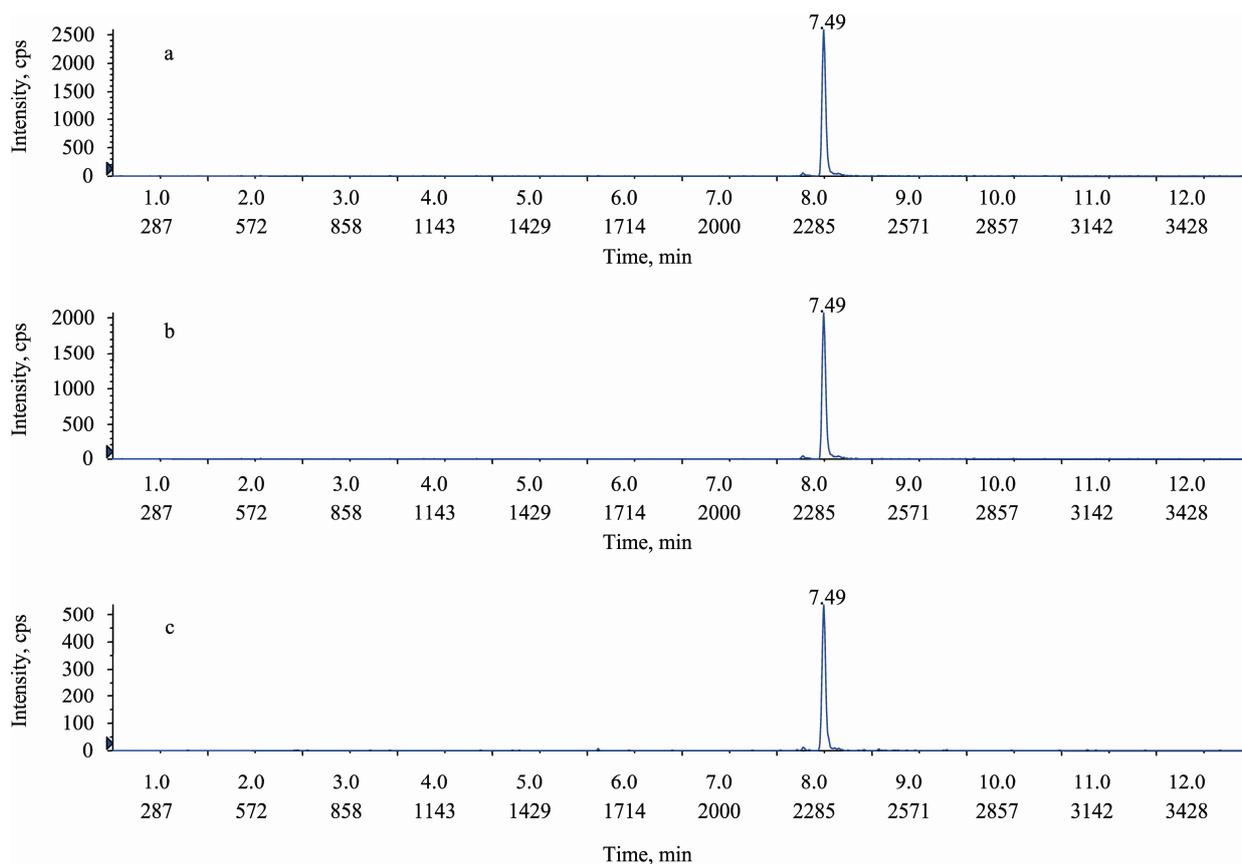


图 3 0.5  $\mu\text{g/g}$  浓度水平 DON 添加回收样品质谱图

Fig. 3 LC-MS/MS chromatograms of spiked corn flour sample with 0.5  $\mu\text{g/g}$  DON

a: 总离子流图; b: 295.0/265.0 选择离子流图; c: 295.0/138.1 选择离子流图

相对标准偏差为 1.9%~12.7%, 室内 HorRat 值为 0.1~0.7, 回收率为 66.0%~98.3%。该方法具有操作简单、检测速度快、灵敏度高等优点, 适用于粮谷及其制品, 如大麦、全麦粉、面粉、小麦、玉米粉中 DON 的测定。

#### 参考文献

- [1] Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, *et al.* Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(9): 1422-1428.
- [2] GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量[S].  
GB 2761-2011 Maximum levels of mycotoxins in foods [S].
- [3] U.S. Food and Drug Administration Guidance for Industry and FDA: Advisory Levels for Deoxynivalenol (DON) in Finished Wheat Products for Human Consumption and Grains and Grain By-Products used for Animal Feed [Z]. 2010.
- [4] Commission Regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [Z]. *Official Journal of the European Union*, 2006.
- [5] Papp E, Otta HK, Zaray G, *et al.* Liquid chromatographic determination of aflatoxins [J]. *Food Addit Contam*, 2004, 21(11): 1096-1106.
- [6] Sugita-Konishi Y, Tanaka T, Tabata S. Validation of an HPLC analytical method coupled to a multifunctional clean-up column for the determination of deoxynivalenol [J]. *Mycopathologia*, 2006, 161 (4): 239-243.
- [7] Fazekas B, Tar A. Determination of zearalenone content in cereals and feedstuffs by immunoaffinity column coupled with liquid chromatography [J]. *AOAC Int*, 2001, 84(5): 1453-1459.
- [8] Meritxell V, Antonio G, Ianaya J, *et al.* Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1048: 25-29.
- [9] Moazami EF, Jinap S. Optimisation of the determination of

deoxynivalenol in wheat flour by HPLC and a comparison of four clean-up procedures [J]. Food Addit Contam, 2009, 26: 1290-1297.

- [10] MacDonald SJ, Chan D, Brereton P, *et al.* Determination of deoxynivalenol in cereals and cereal products by immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography: interlaboratory study [J]. J AOAC Int, 2005, 88:1197-1204

(责任编辑: 张宏梁)

## 作者简介



鲍蕾, 研究员, 主要研究方向为真菌毒素检测及科研。

E-mail: baol@aoacchina.org

---

## “乳制品质量与安全”专题征稿

乳制品以其丰富的营养成分, 被认为是最理想、最接近于母乳的完美天然食品。随着人们生活水平的提高, 乳制品已经由原来个别群体的营养保健品转变为面向大众消费的食品, 乳品业得到了长足的发展, 取得了巨大的成就, 然而日益激烈的市场竞争使得国内外乳品企业屡现食品安全问题, 如三聚氰胺毒奶粉事件、安徽阜阳劣质奶粉事件, 金黄色葡萄球菌污染乳制品引起食物中毒事件以及困扰我国乳业发展的牛奶掺假现象等, 表明乳制品安全问题不容忽视, 如何解决我国乳制品安全问题, 成为科学工作者关注的热点。

鉴于此, 本刊特别策划了“**乳制品质量与安全**”专题, 由北京工商大学的**杨贞耐教授**担任专题主编, 围绕**乳制品产业发展现状、国内外乳制品质量检测标准、乳制品中有毒有害物质的检测方法、新型乳制品的开发研究、生物技术在乳制品中的应用等**或您认为**本领域有意义的问题**进行论述, 计划在**2014年5月份**出版。

本刊编辑部及陈教授欢迎各位专家为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述、实验报告、研究论文均可, 请在**2014年4月20日**前通过网站或 Email 投稿。我们将快速处理并优先发表。

感谢您的参与和支持!

投稿方式:

网站: [www.chinafoodj.com](http://www.chinafoodj.com)

Email: [jfoodsqa@126.com](mailto:jfoodsqa@126.com)

《食品安全质量检测学报》编辑部