

高效液相色谱法测定原粮中玉米赤霉烯酮的改进研究

任丹丹, 李少晖, 谢云峰, 杨永坛*

(中粮营养健康研究院, 北京市营养健康与食品安全重点实验室, 北京 102209)

摘要: **目的** 对原粮中玉米赤霉烯酮免疫亲和层析净化高效液相色谱测定方法进行改进和研究。**方法** 样品粉碎后经体积分数为84%的乙腈溶液超声提取, 采用免疫亲和柱净化, C₁₈色谱柱进行分离, 以乙腈-水-甲醇(46:46:8)为流动相, 最后用高效液相色谱荧光检测器对玉米赤霉烯酮进行测定, 激发波长为274 nm, 发射波长为440 nm。**结果** 在优化实验条件下, 测得玉米赤霉烯酮的线性相关系数为0.9998, 相对标准偏差为5.24%~7.96%, 检出限为5 μg/kg, 加标回收率为92.6%~108.0%。**结论** 改进后的方法适用于常用市售免疫亲和柱净化原粮中玉米赤霉烯酮。

关键词: 高效液相色谱法; 免疫亲和柱; 玉米赤霉烯酮; 原粮

Improvement research on determination of zearalenone in grain by high performance liquid chromatography

REN Dan-Dan, LI Shao-hui, XIE Yun-Feng, YANG Yong-Tan*

(Beijing Key Laboratory of Nutrition Health and Food Safety, COFCO Nutrition and Health Research Institute, Beijing 102209, China)

ABSTRACT: Objective To improve immunoaffinity column clean-up and high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of zearalenone in grain. **Methods** Ground sample was extracted with 84% acetonitrile solution (v:v) by ultrasonic wave. The chromatographic purification was performed on an immunoaffinity column and separated on a C₁₈ column, using a mixture of acetonitrile, water and ethanol (v:v:v=46:46:8) as mobile phase, then the analyte was detected by HPLC with fluorescence detector ($E_x=274$ nm, $E_m=440$ nm). **Results** Under the optimal conditions, the correlation coefficient (r) was more than 0.9998. The relative standard deviations (RSDs) were in the range of 5.24%~7.96%, the limit of detection (LOD) was 5 μg/kg and the spiked recoveries were between 92.6%~108.0%. **Conclusion** The proposed method is suitable for fast, accurate and sensitive detection of zearalenone in grain with various immunoaffinity columns in market.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; immunoaffinity column; zearalenone; grain

基金项目: 中粮集团公司资助项目(2013-C2-F001)

Fund: Supported by the Fundamental Research Project of COFCO Corporation (2013-C2-F001)

*通讯作者: 杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: yangyongtan@cofco.com

*Corresponding author: YANG Yong-Tan, Senior Engineer, Food Quality & Safety Center, COFCO Nutrition & Health Research Institute, No.4 Road, Future Science and Technology Park South, Beiqijia, Changping, Beijing 102209, China. E-mail: yangyongtan@cofco.com

1 引言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN), 又名 F2 毒素, 主要是由粉红镰刀菌(*Fusarium roseum*)及禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)产生的一种非甾体霉菌毒素。首先从赤霉病玉米中分离, 广泛存在于霉变的玉米、高粱、小麦、燕麦、大麦等谷类作物以及奶中, 是世界上污染范围最广的一种镰刀菌毒素^[1,2]。ZEN 的结构与动物内源雌激素相似, 故能与雌激素受体结合表现出弱雌激素活性。实验表明, ZEN 所具有的类雌激素作用, 对免疫系统具有潜在毒害作用, 可引发动物雌激素亢进症, 进而引起动物流产、死胎等生殖机能异常, 还能导致生长下降、免疫抑制、不育、畸形等, 尤其是猪对 ZEN 最为敏感^[3-5]。玉米赤霉烯酮污染饲料和食品后, 不仅使农业经济受到严重影响, 而且还会带来严重的食品安全问题, 威胁到人类的健康。由于 ZEN 对人和动物产生的危害, 目前已有很多国家制订了食品中 ZEN 限量标准。我国规定, 粮谷和食品中 ZEN 含量不能超过 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[6], 饲料中 ZEN 含量不得超过 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7]。

目前食品和饲料中 ZEN 的分析方法主要有酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[8]、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC)^[9]、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[10] 和液-质联用法 (liquid chromatography-mass spectrum, LC-MS)^[11] 等, 其中以 HPLC 方法使用最为广泛。在 GB/T 23504-2009《食品中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法》中 ZEN 采用免疫亲和柱净化^[12]。免疫亲和柱净化原理是基于毒素与特异性抗体之间的相互作用, 对 ZEN 具有高度专一的吸附特性, 但是由于 ZEN 在实际样品中含量甚微且共存干扰物质多, 不同品牌免疫亲和柱制备工艺存在差异, 在 ZEN 实际测定中, 净化效果受试验条件影响显著, 造成国标方法的适用性受到一定限制^[13,14]。本试验针对现行免疫亲和柱净化-高效液相色谱国标方法进行改进研究, 选取常用三种市售免疫亲和柱, 对原粮中 ZEN 的净化条件进行优化, 建立普遍适用的样品前处理方法, 并对 ZEN 检测过程中存在的一些问题作了较为深入的讨论。

2 材料与方 法

2.1 主要仪器与试剂

Thermo Ultimate 3000Dual 高效液相色谱仪, 配备荧光检测器(美国 Thermo 公司); Millipore Advantage 超纯水机(美国 Millipore 公司); Allegra 64R 台式高速冷冻离心机(美国贝克曼公司); TTL DC 氮吹仪(中国同泰联科技); 玻璃纤维滤纸(英国 Whatman 公司)。

玉米赤霉烯酮标准品购自 Sigma 公司。甲醇和乙腈(色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 其他试剂除指明外均为分析纯。

磷酸盐缓冲溶液(PBS): 取氯化钠 8.0 g、磷酸氢二钠 1.2 g、磷酸二氢钾 0.2 g 溶于纯水, 定容至 1 L, 用浓盐酸调 pH 值至 7.0。

玉米赤霉烯酮免疫亲和柱: 柱子 A: Romer Labs, COIAC 4000; 柱子 B: 华安麦科, HCM0515; 柱子 C: VICAM, #G1012。

2.2 色谱条件

色谱柱: Agilent Extend C₁₈ (4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈:水:甲醇(46:46:8); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样器温度: 4 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 50 μL ; 检测波长: 激发波长 274 nm, 发射波长 440 nm。

2.3 样品处理方法

称取 10 g(精确到 0.01 g)样品于 50 mL 离心管中, 加入 2.5 g 氯化钠和 40 mL 提取液, 混匀。超声 1 h 后, 8000 r/min 离心 10 min。移取 10.0 mL 上清液于 50 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 混匀。用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清, 收集滤液于干净烧杯中。

准确移取 10.0 mL 滤液注入免疫亲和柱, 调节压力, 使溶液以约 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱, 直至空气进入亲和柱中。用 10 mL PBS 清洗缓冲液和 10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱, 流速约为 1~2 滴/s, 直至空气进入亲和柱中, 抽干小柱。准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱, 流速约为 1 滴/s, 洗脱液收集于干净的玻璃试管中。在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮气吹干, 用流动相溶解残渣并定容到 1.0 mL, 供 HPLC 测定。

3 结果与讨论

3.1 提取条件的优化

ZEN 易溶于乙腈、乙醇等极性溶剂和碱性水溶

液,不溶于水。GB/T 23504-2009方法中对粮食及其制品选用的是乙腈和水(90:10)的混合提取液。选用市售三种不同品牌的免疫亲和柱对该方法进行验证,结果显示该比例的提取液对柱子A有影响,导致测定结果不稳定,且回收率仅能达到28%。分析原因可能是提取液中乙腈含量太高,影响ZEN抗原抗体结合反应^[15]。因此,考虑降低提取液中乙腈的含量进行实验,选用乙腈和水(84:16)的混合提取液。重复实验结果显示,提取液对免疫亲和柱的干扰得以消除(如图1)。

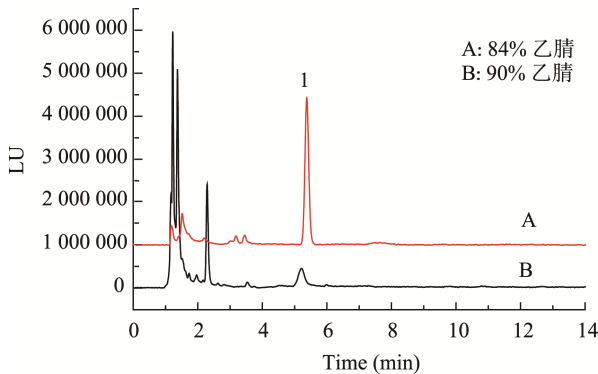


图1 不同提取液下ZEN对比图(A: 90%乙腈; B: 84%乙腈)
Fig. 1 Chromatogram of zearalenone at different extraction solvent

对样品提取方式进行考察,测定结果显示高速均质和超声提取两种方法的加标回收测定结果分别为87.6%和89.6%,表明两种方法都可以取得较为满意的结果。高速匀浆的方法处理单个样品虽然省时快速,但是为避免交叉污染每次操作都需要清洗。相比较超声处理的方法则更适用于大批量的样品同时测定,较节省人力。

3.2 洗脱液条件的优化

GB/T 23504-2009方法中最后洗脱免疫亲和柱选用甲醇。经实验验证,发现甲醇洗脱液在色谱图上显示出显著的溶剂效应,影响ZEN含量的定量。因此,将甲醇洗脱液在40℃下用氮气吹干,用流动相溶解残渣并定容到1.0 mL,再进行上机测定。

3.3 净化过程的优化

免疫亲和柱是利用特异性抗体与待测物结合技术,将含有ZEN的特异性抗体与凝胶载体结合制成的一种净化柱。这些抗体在纯化过程中与ZEN毒素

分子相结合,在之后的洗脱过程中与毒素分离,有效地对ZEN进行纯化和浓缩。考察上柱前的过滤过程对净化效果的影响,对比提取液直接上柱与过滤后上柱的实验结果。如图2所示,未经过滤步骤直接上柱,洗脱液中含有大量杂质,对ZEN的色谱峰产生干扰。经过两次过滤的提取液得到的色谱图杂峰干扰小,分离效果好。

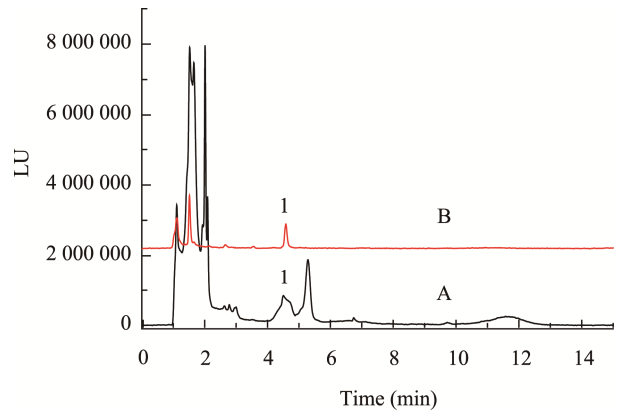


图2 过滤前后ZEN对比图(A过滤前; B过滤后)
Fig. 2 Chromatogram of zearalenone with and without filter

GB/T 23504-2009方法中,样品经提取后进行定性滤纸过滤,因样品粘稠,操作较费时,考虑采用离心方法代替。结果表明,用离心方法代替定性滤纸过滤,同样可以达到去除杂质的效果。两种方法相比较,离心过滤的方法处理样品更加省时快速,节省人力。

3.4 免疫亲和柱的测定比对

称取两个平行玉米质控样品,选用三种市售免疫亲和柱进行重复性测试,结果如表1所示。

表1 不同免疫亲和柱测试结果
Table 1 The results of determination by different immunoaffinity columns

柱子	含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		含量平均值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	S1-1	S1-2	
A	581.8	577.7	579.8
B	642.5	601.9	622.2
C	626.2	580.9	603.6

质控样品中ZEN的含量为:(472.1 \pm 157.0) $\mu\text{g}/\text{kg}$ ($k=2$)。由重复性实验结果可以看出,检测结果均落在质控样品中ZEN含量范围内,三个品牌的柱子测定结果均满意。

表 2 方法回收率和精密度($n=6$)
Table 2 Recovery and precision ($n=6$)

项目	加标量(μg)	本底值(μg)	测得值(μg)	回收率(%)	RSD(%)
玉米赤霉烯酮	1.25	0	1.30	102	5.91
	1.25	0	1.24		
	2.50	0	2.29	92.6	7.69
	2.50	0	2.34		
	5.00	0	5.40		
	5.00	0	5.40		

表 3 原粮样品中玉米赤霉烯酮含量测定结果
Table 3 The concentration of ZEN in different grain samples

样品	含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		含量平均值($\mu\text{g}/\text{mL}$)	添加值($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测定值($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率%
	S1-1	S1-2				
玉米	75.86	76.53	76.20	50.0	123.7	96.9
稻谷	20.03	17.08	18.56	50.0	66.71	96.3
小麦	18.97	15.91	17.44	50.0	64.97	95.1

3.5 最小检出限

根据国标 GB/T 23504-2009 中要求, 将 ZEN 标准品溶液适当稀释后制得一系列不同浓度的标准品溶液, 每个浓度进样 $50 \mu\text{L}$, 记录峰面积。分别以进样浓度为横坐标(X)、峰面积积分值(Y)为纵坐标绘制标准曲线并计算回归方程, 以 3 倍信噪比(S/N)作为检出限(LOD)。

根据浓度与峰面积的关系制得标准曲线, 线性回归方程为 $Y=1775.4X-6881$ ($r=0.9998$)。在空白样品中加入标准品, 根据 3 倍信噪比的峰响应值, 得出方法的检出限为 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.6 方法的回收率和精密度

取面粉空白样品, 分别向样品中添加高、中、低水平含量的 ZEN 标准溶液, 测定加标回收率, 结果如表 2 所示。

对高、中、低水平加标的三种面粉空白样品进行测定, 每种样品分别进行 6 次重复实验。取 6 次含量结果进行精密度计算。如表 2 所示, ZEN 的相对标准偏差范围分别 5.24%~7.69%, 精密度良好。

3.7 实际样品测定

应用优化后的免疫亲和层析净化高效液相色谱法测定玉米、小麦、稻米中 ZEN 含量, 回收率均在

90%以上, 结果如表 3 所示。

4 结 论

对免疫亲和柱净化-高效液相色谱法进行改进研究, 建立了适用性更广的玉米赤霉烯酮免疫亲和净化方法。本法基于免疫亲和柱对玉米赤霉烯酮的特异性吸附原理, 优化样品提取、净化和洗脱条件, 建立对主要市售免疫亲和柱都适用的样品净化方法。本文所述方法回收率高, 重复性良好, 测定结果可靠, 可用于原粮中 ZEN 的灵敏、准确检测。

参考文献

- [1] 张艺兵, 鲍蕾, 褚庆华, 等. 农产品中真菌毒素的检测分析 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
Zhang YB, Bao L, Zhe QH, *et al.* Detection and analysis of mycotoxins in agricultural products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.
- [2] Zinedine A, Soriano JM, Moltó JC, *et al.* Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone [J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(1): 1-18.
- [3] Ruddick JA, Scott PA. Teratological evaluation of zearalenone administered orally to the rat [J]. B Environ Contam Tox, 1974, 15: 678.
- [4] Blaney BJ, Bloomfield RC, Moore CJ. Zearalenone intoxication

- of pigs [J]. Aust Vet J, 1984, 61(1): 24–27.
- [5] Minervini F, Dell'Aquilab ME, Maritato F, *et al.* Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro maturation of bovineocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures [J]. ToxicolIn Vitro, 2001, 15: 489–495.
- [6] GB 2761-2011 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S]. GB 2761-2011 National food safety standard maximum levels of mycotoxinsin foods [S].
- [7] GB 13078.2-2006 饲料卫生标准饲料中赭曲霉毒素 A 和玉米赤霉烯酮的允许量[S]. GB 13078.2-2006 Hygienical standard for feeds-toleration of ochratoxin A and zearalenone in feeds [S].
- [8] Bennett GA, Nelsen TC, Miller BM. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in corn, wheat, and pig feed: collaborative study [J]. J AOAC Int, 1994, 77(6): 500–1509.
- [9] Nicol RW. Analysis of fusariumtoxins in maize and wheat using thin layer chromatography [J]. Mycopathologia, 1998, 142(2): 107–113.
- [10] Reza OM, Hajimahmoodi M, Memarian S, *et al.* Determination of zearalenone in corn flour and a cheese snack product using high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Food Addit Contam, 2005, 22 (5): 443– 448.
- [11] 梁颖, 刘邻渭, 张春晖. 液质联用同时检测小麦中三种镰刀菌毒素[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(6): 160–162. Liang Y, Liu LW, Zhang CH. Simultaneously detecting three fusarium mycotoxinsin wheat by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J. Chin Cereal Oil Ass, 2006, 21(6): 160–162.
- [12] GB/T 23504-2009 食品中玉米赤霉烯酮的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法[S]. GB/T 23504-2009 Determination of zearalenone in food high performance liquid chromatographic method with immunoaffinity column clean-up [S].
- [13] 鲍蕾, 吕宁, 吴振兴, 等. 免疫亲和柱同时净化-HPLC 法测定植物油中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. 食品工业科技, 2013, 34(9): 306–309. Bao L, Lv N, Wu ZX, *et al.* Determination of zearalenonein edible oil by HPLC-fluorometry with immunoaffinity column clean up [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(9): 306–309.
- [14] 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, 03: 351–354. Zeng HY, Li YQ, Jing HQ. Determination of zearalenoneand its metabolites in grains by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2006, 3: 351–354.
- [15] 罗小虎, 包清彬, 杨潇, 等. 高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 食品科技, 2010, (1): 266–270. Luo XH, Bao QB, Yang X, *et al.* Determination method of zearalenone by means ofhigh-performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol, 2010, (1): 266–270.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



任丹丹, 研发专员, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: rendd@cofco.com



杨永坛, 高级工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: yangyongtan@cofco.com