

免疫亲和柱-高效液相色谱法测定谷物 及其制品中玉米赤霉烯酮的含量

张 伟^{1*}, 李 鹏², 李国慧³, 贾 勇⁴, 伍亚琼¹, 蒲 颇¹

(1. 四川省农业农村厅植物保护站, 成都 610041; 2. 红太阳重庆世界村生物化学有限公司, 重庆 401220;
3. 四川省北川县农业农村局植保站, 绵阳 622750; 4. 四川省资阳市农业农村局植保植检站, 资阳 641300)

摘 要: **目的** 建立免疫亲和柱-高效液相色谱法分析检测谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的方法。**方法** 样品经乙腈-去离子水(84:16, *V:V*)提取, 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱富集净化, 甲醇洗脱后, 经 C_{18} 反相色谱柱分离, 以乙腈-水-甲醇(46:46:8, *V:V:V*)为流动相, 使用高效液相色谱-荧光检测器检测, 外标法定量。**结果** 玉米赤霉烯酮在 1~100 $\mu\text{g/L}$ 线性范围内线性关系良好, 相关系数 0.9999, 检出限 0.8 $\mu\text{g/kg}$, 仪器重复测定的相对标准偏差 0.19%, 样品平行性测定相对标准偏差在 0.10%~1.89%。检测成都市内综合农贸市场和超市内谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的含量为 1.34~43.1 $\mu\text{g/kg}$, 检出率为 52.2%。**结论** 该方法具有灵敏度高、重现性好、准确度高特点, 可应用于实际市场中谷物及其制品的痕量调查。

关键词: 免疫亲和柱; 高效液相色谱; 玉米赤霉烯酮; 谷物及其制品

Determination of zearalenone in corn and its products by immunoaffinity column-high performance liquid chromatography

ZHANG Wei^{1*}, LI Peng², LI Guo-Hui³, JIA Yong⁴, WU Ya-Qiong¹, PU Po¹

(1. Plant Protection Station of Sichuan, Chengdu 610041, China; 2. Chongqing GVG Biochemistry Co., Ltd, Chongqing 401220, China; 3. Plant Protection Station of Beichuan County, Mianyang 622750, China; 4. Plant Protection Station of Ziyang City, Ziyang 641300, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for determination of zearalenone in corn and its products by immunoaffinity- high performance liquid chromatography. **Method** The samples were extracted with acetonitrile-deionized water (84:16, *V:V*), enriched and purified by zearalenone immunoaffinity column. After eluting with methanol, they were separated by C_{18} reversed-phase chromatography column using acetonitrile-water-methanol (46:46:8, *V:V:V*) as the mobile phase, detected by high performance liquid chromatography-fluorescence detector, and quantified by external standard method. **Results** Zearalenone had a good linear relationship in the linear range of 1–100 $\mu\text{g/L}$, with a correlation coefficient of 0.9999, and limit of detection was 0.8 $\mu\text{g/kg}$. The relative standard deviation of the instrument repeated determination was 0.19%, and the relative standard deviation of the sample parallelism determination were 0.10%–1.89%. The contents of zearalenone in cereals and their products in comprehensive farmers' markets and supermarkets in Chengdu were 1.34–43.1 $\mu\text{g/kg}$, and the detection rate was 52.2%. **Conclusion** This method had the advantages of high sensibility, good repeatability and high accuracy. It was fit for the trace analysis in the grain and its products in actual market investigation.

*通讯作者: 张伟, 博士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品安全监测及植物保护。E-mail: 313297692@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Wei, Ph.D, Senior Agronomist, The Plant Protection of Sichuan Province, Chengdu, 610041, China. E-mail: 313297692@qq.com

KEY WORDS: immunoaffinity; high efficiency liquid chromatography; zearalenone; corn and its products

1 引言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)又称 F-2 毒素,它由得赤霉病的玉米中分离得到。其产毒菌主要是镰刀菌属(*Fusarium*)的菌株,如禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)、三线镰刀菌(*F. tricinctum*)、黄色镰孢(*F. culmorum*)、木贼镰孢(*F. equiseti*)、半裸镰孢(*F. sernitectum*)和茄病镰孢(*F. solani*)等菌种^[1]。其化学名为 6-(10 羟基-6 氧基-十一碳烯基) β -雷锁酸内酯。玉米赤霉烯酮不仅广泛存在于玉米、大麦、小麦等谷物上^[2],并且还会由于储存条件不善,而污染其他作物制品^[3]。此外,玉米赤霉烯酮还会引起动物包括人类的一系列拟雌激素效应,甚至会导致 DNA 损伤,诱发肿瘤,对血液和免疫方面造成不良影响^[4]。

玉米赤霉烯酮的检验方法,主要包括:液相色谱法、薄层层析法和酶联免疫法^[1]等,其中,薄层层析法操作简便,成本低廉但其灵敏度也较低,仅适合定性或半定量使用^[5]。酶联免疫法有操作简单、检测速度快等优点,相较于薄层层析法,其灵敏度有大幅提高^[6]。此外,金庆日等^[7]也研究开发出基于核酸适配体检测探针的玉米赤霉烯酮的检测方法。但随着技术的不断发展和完善,以高效液相色谱作为检测器的方法逐渐成为主流^[8-14]。但国内在高效液相色谱检测前使用免疫亲和柱富集玉米中的赤霉烯酮研究相对较少。

本研究使用免疫亲和柱前处理技术提取谷物及其制品中的玉米赤霉烯酮,与化学试剂提取相比具有提取效率较高、前处理时间较短等特点,通过免疫亲和-高效液相色谱法检测成都市内主要综合农贸市场和超市内出售的玉米、小麦等谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的含量,为了解成都市内在售的以上各类制品中玉米赤霉烯酮的含量提供参考依据。

2 材料和方法

2.1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪配荧光检测器(日本岛津公司); Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司); AUW120 电子天平(日本岛津公司); 玉米赤霉烯酮标准溶液、玉米赤霉烯酮免疫亲和柱(ROMER 国际贸易有限公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,山东禹王实业有限公司化工分公司); 本实验用水均为纯水(电阻率为 18.25 M Ω ·cm)。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)的配制:称取 8.000 g 氯化钠、1.200 g 磷酸氢二钠、0.200 g 磷酸二氢钾、0.200 g 氯化钾,用 990 mL 纯水将上述试剂溶解,然后用浓盐酸调节 pH 至 7.0,再用水稀释至 1 L。

2.2 样品采集

样品来源于 2018 年 10 月前,成都市内 12 家综合农贸市场及 3 家大型连锁超市。样品共 90 份,品种为市售的切面、挂面、面包、馒头、各类烘焙饼干、玉米饼等谷物制品及当年采收及加工的鲜玉米、玉米面、玉米碴等谷物样品。

2.3 方法

2.3.1 样品前处理方法

所有待检样品,经食品加工机粉碎后,于千分之一电子天平上,准确称取(40.000 $\pm$ 0.010) g 置于具塞三角瓶中,加入 100 mL 乙腈:去离子水(84:16, V/V)提取,振荡器振荡 1 h,过滤样品提取液。将 3.00 mL 提取液和 25.00 mL PBS 缓冲液均匀混合后通过免疫亲和柱,控制流速为 1~3 mL/min,依次用 10 mL PBS 缓冲液和 10 mL 去离子水分别淋洗免疫亲和柱,再用 3 $\times$ 0.50 mL 甲醇洗脱免疫亲和柱,收集洗脱液于试管中。将收集的洗脱液于 60 $^{\circ}$ C 氮吹近干后,用 1.00 mL 混合溶液(乙腈:水:甲醇=46:46:8, V/V/V)复溶,待漩涡混合均匀后,复溶液过 0.45 μ m 滤膜后,上机检测。

2.3.2 方法的有效性

(1) 标准曲线线性和精密度

准确吸取玉米赤霉烯酮标准溶液 1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈稀释定容,摇匀,即得 1.004 μ g/mL 的玉米赤霉烯酮标准储备液,并按 100、50、20、10、5、1 μ g/L 的浓度配制标准使用液系列,制作标准曲线。重复测定 7 次 50 μ g/L 标准溶液,考查测定方法的标准曲线线性和仪器精密度。随机选取 9 份样品进行平行性测定,考查检测方法的精密度。

(2) 添加回收率和检出限

分别称取 40 g 样品(精确至 0.001 g)4 份,向其中分别添加 3.00 μ g 和 2.00 μ g 的玉米赤霉烯酮标准,分别做平行测定,考查测定方法的准确性。以 3 倍信噪比作为检出限,10 倍信噪比作为定量限。

2.3.3 仪器条件

色谱柱: Thermo Fisher BDS Hypersil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm $\times$ 150 mm, 粒度 5 μ m); 流动相: 乙腈:水:甲醇=46:46:8(V/V/V); 流速: 1.000 mL/min; 检测波长: 激发波长: 274 nm, 发射波长: 440 nm; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 100 μ L, 等度洗脱。保留时间定性,外标法定量。

3 结果与分析

3.1 条件优化

采用了免疫亲和前处理技术提取了谷物及其制品中的玉米赤霉烯酮,与化学试剂提取相比,具有提取效率较高、前处理时间较短等特点。与 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》^[9]检测方法相比,本方法检测粮食样品由 50 g 降低为 40 g,且提取液乙腈和水的比例由 9:1(*V/V*)优化为 84:16(*V/V*);同时在样品加入提取液后,延长了提取时间至 1 h,保证玉米赤霉烯酮的充分提取。使用该方法对玉米赤霉烯酮标准品进行检测验证可在 5.356 min 时观察到玉米赤霉烯酮的色谱峰出现,见图 1。

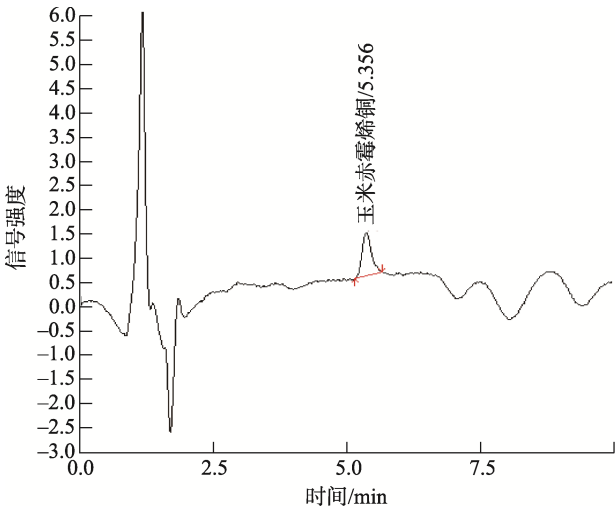


图 1 玉米赤霉烯酮标准品(5 µg/L)色谱图
Fig.1 Chromatogram of zearalenone standard (5 µg/L)

3.2 方法学验证

3.2.1 线性关系及检出限

对该方法的线性关系以及检出限进行测定,结果显示,该方法检测玉米赤霉烯酮的线性范围在 1~100 µg/L,具有较宽的线性范围;标准曲线的相关系数为 0.9999,大于相关系数 0.9990 的要求;具体线性方程可见表 1;根据 3 倍信噪比的检出限要求来看,该方法的检出限为 0.8 µg/kg,定量限为 2.7 µg/kg。

表 1 检测方法各项指标及其结果
Table 1 Indicators and results of the test method

序号	指标	结果
1	方法的标准曲线	$Y=2500.1X-2841.1$
2	相关系数	$r=0.9999$
3	线性范围/(µg/L)	1~100
4	方法检出限/(µg/kg)	0.8
5	仪器精密度/%	0.19

3.2.2 加标回收率

分别添加 0.05 µg/g 玉米赤霉烯酮标准品测定该方法的回收率,测定 6 次结果显示该方法的样品回收率为 99.02%,相对标准偏差为 0.19%,说明方法准确性较好。

3.2.3 精密度

选取 50 µg/L 的标准使用液,做了 7 次重复测定,考查荧光检测器的精密度,结果表明:7 次重复测量的相对标准偏差为 0.19%,说明荧光检测器具备较高的精密度。随机选取 9 份检测样品,做平行性测定来考查检测方法的精密度,结果表明:9 份随机样品平行性测定的相对标准偏差在 0.10%~1.89%,均小于 10%,说明检测方法的精密度较好,具体结果详见表 2。

表 2 检测方法精密度结果(*n*=3)
Table 2 Precision of the test method (*n*=3)

序号	平均值/(µg/kg)	标准差/(µg/kg)	相对标准偏差/%
1	10.0	0.168	1.68
2	2.63	0.005	0.21
3	10.8	0.092	0.85
4	18.0	0.113	0.63
5	20.4	0.021	0.10
6	10.1	0.190	1.89
7	3.23	0.014	0.44
8	3.15	0.014	0.43
9	6.15	0.020	0.32

3.3 实际样品检测

本次抽检的 90 份样品中有 47 份检出玉米赤霉烯酮,检出率为 52.2%,检出浓度在 1.34~43.1 µg/kg。因谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的限量值为 60 µg/kg^[10],本次 90 份谷物及其制品中玉米赤霉烯酮未检出超标样品。

4 结 论

本研究建立了谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的免疫亲和-高效液相色谱检测方法。该方法标准曲线线性较好,检测浓度范围较宽,具有较高的精密度和准确度,检出限较低,适应性较强,绝大部分检测实验室均适用,各项检测指标符合《实验室质量控制规范食品理化检测》中痕量污染物检测的要求^[14]。

采用本方法对成都市内主要综合农贸市场和超市内出售的玉米、小麦等谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的含量进行检测,发现检测样品中玉米赤霉烯酮的检出浓度在 1.34~43.1 µg/kg,均未超过谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的国家标准限值,且检出率为 52.2%。说明我国已认识到谷物及其制品中玉米赤霉烯酮污染的严重性,经过一段时间的治理后,起到了效果,但在谷物原料的储藏方面,应进一步采取有效措施,减少因储藏环境条件不良,引起的二次污染,另外应加强优质玉米品种的选育,从根本上减少玉米赤霉病的发生,而在作物种植期间,应及时采用有

效的杀菌制剂,防止谷类作物中玉米赤霉病的大面积感染,以减缓或者阻断赤霉病的进一步扩散,从而减少玉米赤霉烯酮的污染。

参考文献

- [1] 畅慧霞. 解读酶联免疫(ELISA)法测定食品中玉米赤霉烯酮的影响因素[J]. 粮油仓储科技通讯, 2014, 30(5): 44–46.
- Chang HX. Influencing factors in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for zearalenone detection [J]. Cere Oils Technol Commun, 2014, 30(5): 44–46.
- [2] Tralamazza SM, Bemvenuti RH, Zorzete P, *et al.* Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested wheat grains from Brazil [J]. Food Chem, 2016, 196: 445–450.
- [3] 姜淑贞, 杨维仁, 杨在宾. 玉米赤霉烯酮的代谢、毒性及其预防措施[J]. 动物营养学报, 2011, 23(2): 196–202.
- Jiang SZ, Yang WR, Yang ZB. Metabolism, toxicity and preventive measures of zearalenone [J]. Chin J Anim Nutr, 2011, 23(2): 196–202.
- [4] 邓友田, 袁慧. 玉米赤霉烯酮毒性机理研究进展[J]. 动物医学进展, 2007, 28(2): 89–92.
- Deng YT, Yuan H. The development of zearalenone toxicity mechanism [J]. Prog Vet Med, 2007, 28(2): 89–92.
- [5] 罗雪云, 刘宏道, 周桂莲. 食品卫生微生物检验标准手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 1995.
- Luo XY, Liu HD, Zhou GL. Standard manual for microbiological testing in food hygiene [M]. Beijing: China Standards Press, 1995.
- [6] 戚红卷, 荣钊, 岳丽君, 等. 一种酶联免疫检测系统用于米面中真菌毒素检测的效果评价[J]. 医疗卫生装备, 2014, 35(8): 75–78.
- Qi HJ, Rong Z, Yue LJ, *et al.* Effect evaluation of one ELISA system for cereals mycotoxins detection [J]. Chin Med Equip J, 2014, 35(8): 75–78.
- [7] 金庆日, 苗灵燕, 田广燕, 等. 利用 PicoGreen 作为检测探针建立基于核酸适配体识别的玉米赤霉烯酮快速检测方法[J]. 延边大学农学报, 2018, 140(2): 47–53.
- Jin QR, Miao LY, Tian GY, *et al.* PicoGreen as detection probe to establish a rapid detection method for ZEN based on a ptamer identification [J]. Agric Sci J Yanbian Univ, 2018, 140(2): 47–53.
- [8] 代荣遼, 吕刚, 王亮. 动物饲料中玉米赤霉烯酮的检测方法[J]. 养殖与饲料, 2017, (6): 50–51.
- Dai RK, Lv G, Wang L. Method for determination of Zearalenone in animal feed [J]. Anim Breed Feed, 2017, (6): 50–51.
- [9] 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].
- [10] 张旭晖, 高苹, 居为民, 等. 小麦赤霉病气象条件适宜程度等级预报[J]. 气象科学, 2009, 29(4): 552–556.
- Zhang XH, Gao P, Ju WM, *et al.* Prediction of the adaptability category of meteorological conditions for wheat head blight [J]. Sci Meteorol Sin, 2009, 29(4): 552–556.
- [11] Steinkellner S, Langer I. Impact of tillage on the incidence of *Fusarium* spp. in soil [J]. Plant Soil, 2004, 267(1): 13–22.
- [12] 孟娟, 张晶, 张楠, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测粮食及其制品中的玉米赤霉烯酮类真菌毒素[J]. 色谱, 2010, 28(6): 601–607.
- Meng J, Zhang J, Zhang N, *et al.* Determination of zearalenone and related mycotoxins in grain and its products by solid-phase extraction coupled with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(6): 601–607.
- [13] Vrabcheva T, Gebler R, Usleber E, *et al.* First survey on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in Bulgarian wheat [J]. Mycopathologia, 1996, 136: 47–52.
- [14] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

张伟, 博士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品安全监测及植物保护。
E-mail: 313297692@qq.com.