

LC-30A 免疫亲和层析净化法测定粮食中呕吐毒素的含量

LC-094

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中呕吐毒素的方法。玉米样品磨碎、过筛后用水匀浆提取, 提取液经过免疫亲和柱净化, 超高效液相色谱 LC-30A 进行梯度洗脱分离, 二极管阵列检测器检测。该方法简便快速, 且易操作。实验结果表明: 线性范围 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 10 $\mu\text{g/mL}$, 相关系数大于 0.9999; 标准样品的仪器检出限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 0.09 $\mu\text{g/mL}$; 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 和 5 $\mu\text{g/mL}$ 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.06~0.14% 和 0.43~1.08% 之间; 1 mg/kg 玉米样品平均加标回收率为 95.4%。

关键词: 呕吐毒素 粮食 超高效液相色谱 免疫亲和层析净化

呕吐毒素, 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, 简称 DON, CAS 号: 51481-10-8), 可引起猪的呕吐, 故得名。呕吐毒素是食品中常见的真菌毒素, 主要由镰刀菌产生, 在自然界中广泛存在, 主要污染玉米、小麦等谷类作物。人摄入了被 DON 污染的食物后, 会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状, 严重时损害造血系统造成死亡。欧盟分类标准为三级致癌物。欧盟要求呕吐毒素含量应小于 1.0 mg/kg。我国食品安全国家标准《GB2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定玉米等谷物及其制品中呕吐毒素限量为 1.0 mg/kg。

免疫亲和柱能特效性地、高选择性地吸附呕吐毒素, 而让其它杂质通过柱子, 使样品得以纯化。吸附后的呕

吐毒素可被极性有机溶剂洗脱。免疫亲和柱将提取、净化、浓缩一次完成, 大大简化了前处理过程, 提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

国家标准《GB/T23503-2009 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法》对粮食和粮食制品、酒类、酱油、醋、酱及酱制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇做了相关的检测规定, 其中对于粮食和粮食制品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检出限规定为 0.5 mg/kg。

本文参考 GB/T23503-2009 中的要求, 采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A, 免疫亲和柱净化法分析了玉米中的呕吐毒素, 供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 二元高压梯度系统。具体配置为: LC-30AD 输液泵, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, CBM-20Alite 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.42 SP3 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. \times 50 mm L., 1.6 μm

流动相: A - 水; B - 甲醇

流速: 0.6 mL/min

进样体积: 3 μL

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长: 218 nm (波长范围: 190~370 nm)

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	30
1.50	Pumps	Pump B Conc.	30
1.51	Pumps	Pump B Conc.	15
5.00	Controller	Stop	

1.3 样品制备

①标准溶液配制：用甲醇配制 100 $\mu\text{g/mL}$ 的呕吐毒素标准储备液。以甲醇 - 水 (15:85, V/V) 将标准储备液稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 不同浓度的标准工作溶液。

②样品前处理方法：将玉米样品研磨并过筛 (1 mm 孔径)，称取 25 g 磨碎的试样于 100 mL 容量瓶中加入 5 g 聚乙二醇，用水定容至刻度，混匀，转移至烧杯中，高速匀浆 2 min。玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清。将免疫亲和柱连接于注射器下，准确移取 2 mL 滤液至注射器中，使溶液以 1 滴每秒的流速流过免疫亲和柱，直至空气进入柱中。用 5 mL 水淋洗免疫亲和柱，流速约为 1 滴每秒 ~2 滴每秒，使约 2~3 mL 空气进入柱中。准确加入 1 mL 的甲醇洗脱，流速约为 1 滴/s，收集全部洗脱液于小瓶中，以氮气吹至近干，用甲醇 - 水 (15:85, V/V) 定容至 1 mL，经 0.22 μm 针式滤器过滤后进样。

实验结果

2.1 标准样品的色谱图

标准样品的色谱如图 1 所示，保留时间为 1.031 min，最大吸收波长 218 nm。

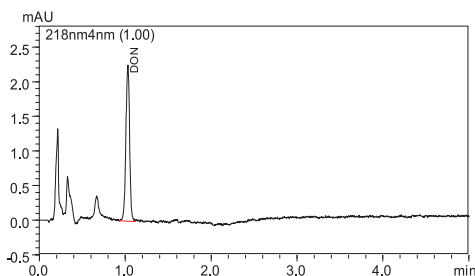


图 1 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的色谱图

2.2 线性关系

将 7 个不同浓度的呕吐毒素标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，结果如图 2 所示。线性方程为 $Y = (3651.0)X + (-212.315)$ 、线性范围 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$ ，相关系数大于 0.9999，线性关系良好。

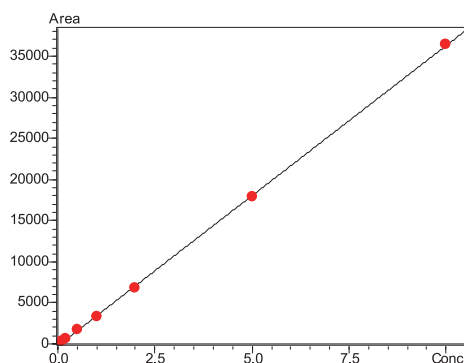


图 2 呕吐毒素的标准工作曲线

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 计算仪器的灵敏度，通过 LabSolutions 软件计算信噪比、仪器检测限 (3 倍噪声计算)、定量限 (10 倍噪声计算)。则仪器信噪比为 17.81、检出限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为 0.09 $\mu\text{g/mL}$ 。0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标样色谱图如下。

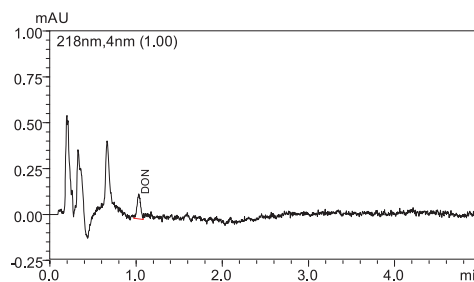


图 3 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的色谱

2.4 精密度实验

取标准工作液中 0.2 mg/L、1 mg/L 和 5 mg/L 三个浓度，分别平行进样 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.14% 和 0.43~1.08% 之间，仪器精密度良好。

表 2 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度(mg/L)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
0.2	0.10%	1.08%
1	0.14%	0.88%
5	0.06%	0.43%

2.5 基质加标实验

按照 1.3 所述方法处理玉米样品，上机测试，该玉米样品中未检出呕吐毒素。在玉米样品中添加标样，加标含量为 1 mg/kg，平行 2 次。0.5 μg/mL 标准溶液的色谱图如图 4 所示。玉米样品色谱图如图 5 所示。玉米样品加标色谱图如图 6 所示。呕吐毒素的平均回收率为 95.4%。详细结果见表 3。

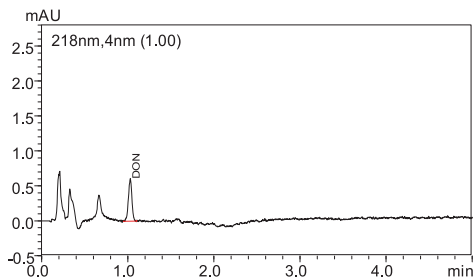


图 4 0.5 μg/mL 标准溶液的色谱图

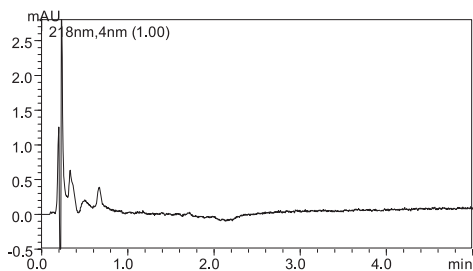


图 5 玉米空白样品的色谱图

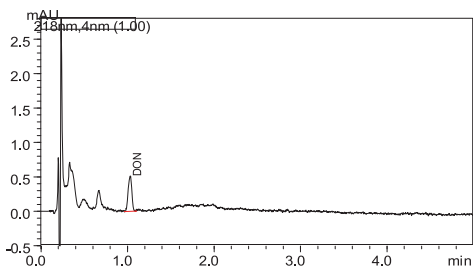


图 6 1 mg/kg 玉米加标样品的色谱图

表 3 基质加标回收率结果

名称	理论浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	回收率 (%)
加标-1	1	0.946	94.6
加标-2	1	0.962	96.2
平均值	/	/	95.4

实验总结和讨论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30 A 测定粮食中呕吐毒素的方法。实验结果表明：该法线性范围宽，在 0.1 μg/mL~10 μg/mL 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.9999；标准样品的仪器检出限为 0.03 μg/mL，仪器定量限为 0.09 μg/mL。0.2 μg/mL、1 μg/mL 和 5 μg/mL 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.06~0.14% 和 0.43~1.08% 之间，仪器精密度良好；1 mg/kg 玉米样品平均加标回收率为 95.4%。本方法适合作为粮食及粮食制品中呕吐毒素的快速分析方法。