

# LC-30A 快速测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量

LC-109

**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 快速测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法。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 紫外检测器检测。实验结果表明: 线性范围 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ~ 10  $\mu\text{g/mL}$ , 相关系数大于 0.9999; 标准样品的仪器检出限为 0.016  $\mu\text{g/mL}$ , 仪器定量限为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ; 0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$  和 5.0  $\mu\text{g/mL}$  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 0.041~0.043% 和 0.11~1.57% 之间; 玉米样品三个浓度加标回收率在 81.2~90.0% 之间。该方法简便快速, 且易操作。

**关键词:** 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 粮食 超高效液相色谱 免疫亲和层析净化

脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (呕吐毒素, DON), 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。

本文参考《粮油检验 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 超高效液相色谱法》标准征求意见稿中的要求, 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。

## 实验条件

### 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-20A 紫外检测器, CBM-20A lite 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  $\mu\text{m}$

流动相: 乙腈 / 水 (10/90, v/v)

流速: 0.2 mL/min

进样体积: 2  $\mu\text{L}$

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长: 218 nm

### 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。以流动相将标准储备液稀释成 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 、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  $\mu\text{g/mL}$  等 8 个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 于锥形瓶中, 加入 5 g 聚乙二醇, 加入 100 mL 超纯水, 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, 以 1 滴每秒的流速过柱, 至空气进入柱中。用 5 mL 水以 1 滴每秒的流速淋洗免疫亲和柱, 使约 2~3 mL 空气进入柱中。准确加入 1 mL 的甲醇, 以 1 滴每秒的流速洗脱, 洗脱液氮吹至干, 用 0.5 mL 流动相涡旋溶解, 经 0.22  $\mu\text{m}$  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。

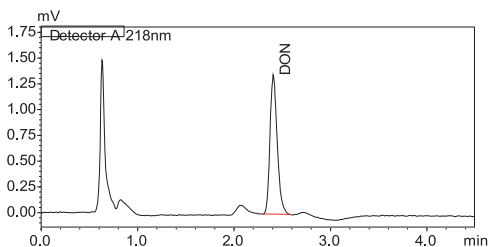


图 1 1.0 µg/mL 标准溶液的色谱图

### 2.2 线性关系

将 8 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，结果见图 2。线性方程为  $Y = (7120.0)X + (-11.402)$ 、线性范围 0.05~10 µg/mL，相关系数大于 0.9999，线性关系良好。

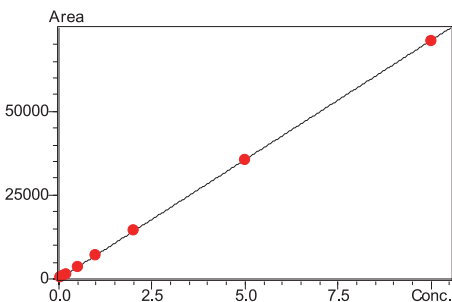


图 2 呕吐毒素的标准工作曲线

### 2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 0.05 µg/mL 计算仪器的灵敏度，通过 LabSolutions 软件按照 ASTM 规则，选取基线为 1.45~1.95 min 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 10.87、检出限为 0.016 µg/mL，定量限为 0.050 µg/mL。0.05 µg/mL 的标样色谱图如下。

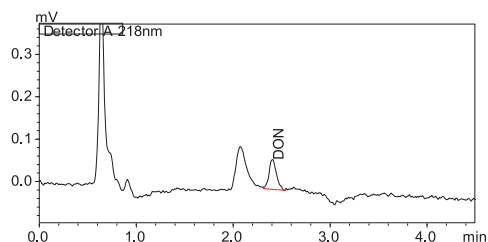


图 3 0.05 µg/mL 标准溶液的色谱图

### 2.4 精密度实验

取标准工作液中 0.2 mg/L、1 mg/L 和 5mg/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 0.041~0.043% 和 0.11~1.57% 之间，仪器精密度良好。

表 1 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	0.043%	1.57%
1.0	0.042%	0.50%
5.0	0.041%	0.11%

### 2.5 加标回收实验

按照 1.3 所述方法处理全程序空白样品（除不加玉米外，其他步骤和实际样品的处理相同）和玉米样品，上机测试，玉米样品检出呕吐毒素。全程序空白样品色谱图如图 4 所示。玉米样品色谱图如图 5 所示。玉米加标样品色谱图如图 6、图 7、图 8 所示。加标回收实验结果如表 2 所示。

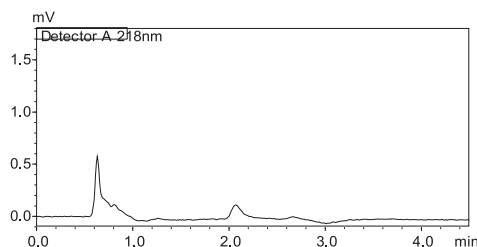


图 4 全程序空白色谱图

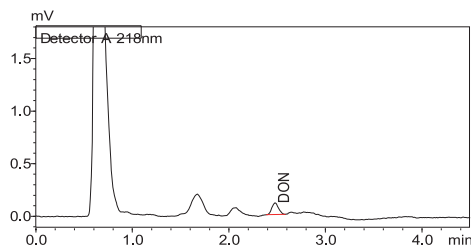


图 5 玉米样品色谱图

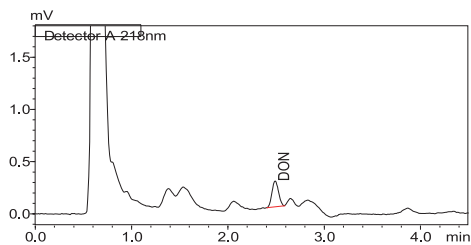


图 6 玉米加标样品色谱图(0.1mg/kg)

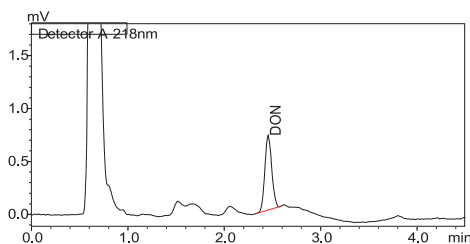


图 7 玉米加标样品色谱图 (0.5mg/kg)

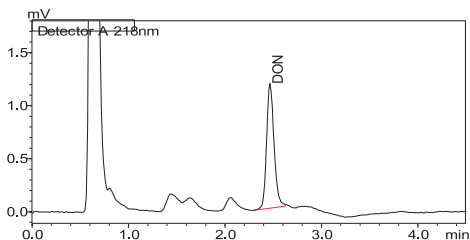


图 8 玉米加标样品的色谱图(1 mg/kg)

表 2 加标回收结果

样品含量 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)	回收率 (%)
0.075	0.1	0.165	90.0
	0.5	0.499	84.8
	1.0	0.887	81.2

## 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 快速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 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ~10  $\mu\text{g/mL}$  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 0.016  $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 。0.2  $\mu\text{g/mL}$ 、1.0  $\mu\text{g/mL}$  和 5.0  $\mu\text{g/mL}$  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 0.041~0.043% 和 0.11~1.57% 之间，仪器精密度良好；玉米样品三个浓度加标回收率在 81.2~90.0% 之间。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。

附录：

表 3 呕吐毒素化合物信息表

中文名称	英文名称	CAS号
脱氧雪腐镰刀菌	Deoxynivalenol	
烯醇 (呕吐毒素)	(DON)	51481-10-8