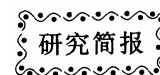


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.00186



高效液相色谱-紫外法同时检测小麦中 DON、15ACDON 和 3ACDON

杨 丹 耿志明 马鸿翔* 姚金保 张 旭 张平平 张 鹏

江苏省农业科学院 / 江苏省农业生物学重点实验室, 江苏南京 210014

摘 要: 建立了测定小麦中 B 型单端孢霉烯族毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3-ACDON)和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15-ACDON)的高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)检测方法。用水提取小麦样品, 提取液经无水乙醇等体积沉淀, 再结合 Oasis HLB 固相萃取小柱可取得较好的净化效果。采用乙腈-0.005%磷酸水溶液二元梯度洗脱程序在高效液相色谱-紫外检测器上完成 DON、15ACDON 和 3ACDON 的定性定量分析。结果表明, 在 0.5~15.0 mg L⁻¹ 线性范围内, DON、15ACDON 和 3ACDON 的平均加标回收率分别为 89.8%、93.4%和 92.9%, 相对标准偏差分别为 2.2%、2.0%和 2.5% ($n=3$); 检测限分别为 12.2、10.5 和 16.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 。该方法准确、重现性好, 样品净化方法使杂峰干扰少, 大幅减少有机溶剂的使用, 成本低, 适用于小麦中 B 型单端孢霉烯族毒素的大批量检测。

关键词: 小麦; B 型单端孢霉烯族毒素; 高效液相色谱-紫外检测法

Establishment of a HPLC-UV Method for Simultaneous Determination of DON, 15ACDON, and 3ACDON in Wheat

YANG Dan, GENG Zhi-Ming, MA Hong-Xiang*, YAO Jin-Bao, ZHANG Xu, ZHANG Ping-Ping, and ZHANG Peng

Provincial Key Laboratory of Agrobiolgy / Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: A HPLC-UV method was established to determine deoxynivalenol (DON), 3-acetyldeoxynivalenol (3-ACDON) and 15-acetyldeoxynivalenol (15-ACDON) in wheat. Wheat sample was extracted by water, and the extracting solution was precipitated with an equal volume of ethanol followed by solid phase extraction with Oasis HLB cartridge. Qualitative and quantitative analyses of DON, 15ACDON and 3ACDON were done by HPLC-UV using gradient elution program with acetonitrile and 0.005% phosphoric acid solution. Results showed that at the linear range of 0.5–15.0 mg L⁻¹, the recoveries were 89.8%, 93.4%, and 92.9%, respectively. The relative standard deviations were 2.2%, 2.0%, and 2.5%, respectively, and the detection limit levels were 12.2, 10.5, and 16.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively. The method was accurate and reproducible. Sample purification lessened interference peaks, and due to the use of organic solvents was greatly reduced, the cost was decreased. Therefore, the method was suitable for the large batch determination of type B trichothecenes in wheat.

Keywords: Wheat; B trichothecenes; HPLC-UV

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)及其衍生物属于单端孢霉烯族 B 类, 基本结构为四环的倍半萜, 以 C8 位上的羰基为特征^[1]。王裕中和 Miller^[2]依据 DON 乙酰化的位置不同, 将 DON 的化学型又分为 3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(3-acetyldeoxynivalenol, 3-ACDON)和 15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇(15-acetyldeoxynivalenol, 15-ACDON)。其中, DON 对谷物污染率和污染水平居于镰刀

菌毒素之首, 给人、家畜的健康造成巨大威胁^[3]。2010 年, 根据 FAO 和 WHO 食品安全评估委员会的最新毒性数据结果, 由于在有机体内乙酰化代谢产物转变成 DON 而增大了其诱导毒性, 联合食品添加剂专家委员会(JECFA)规定, DON 及其乙酰化衍生物的一组暂定最大每日耐受摄入量(PTMDI)为 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ BW^[4]。单端孢霉烯族类化合物较为耐热, 在酸和碱中也较稳定, 通常的烹调加工难

本研究由江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(10)128], 现代农业产业技术体系项目(nycytx-03), 国家科技部国际合作项目(2009DFA32020)和国家转基因生物新品种培育重大专项(2008ZX08002-001)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 马鸿翔, E-mail: mahx@jaas.ac.cn

第一作者联系方式: E-mail: yangdan1290@163.com

Received(收稿日期): 2011-05-27; Accepted(接受日期): 2011-09-18; Published online(网络出版日期): 2011-09-30.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110930.1725.002.html>

以破坏其活性^[5]。易受污染的食品主要包括玉米、小麦、黑麦、燕麦等谷物。因此,检测单端孢霉烯族毒素在粮食中的存在情况,对保证人类食品安全是非常必要的。镰刀菌毒素的检测方法较多,可分为 3 类:①生物检测法,包括皮肤毒性试验、种子发芽试验等^[6];②理化检测法,包括薄层层析^[7]、高效液相色谱^[8]、气相色谱^[9-10]、气(液)质联用等^[11-12];③免疫化学检测法,包括放射性免疫法^[13]、荧光极性免疫分析法^[14]和酶联免疫吸附(ELISA)法^[15-16]。

国内有关 DON 的检测方法报道较多,而 DON 的乙酰化衍生物同样具有细胞毒性和致突变、致畸、致癌等危害^[19-21],用 HPLC-UV 检测 15ACDON 和 3ACDON 的方法尚未见报道。使用 HPLC-UV 检测样品中的 DON 及乙酰化衍生物时,净化效果是关键,对于自然污染的粮食样品,经多功能柱和免疫亲和柱净化后出现毒素和粮食基体物质共提取、谱图分离度差等问题^[17],并且这 2 种净化柱价格较贵。本研究旨在建立一种新的样品净化方法及色谱检测条件,使样品前处理简单,极大地减少有机溶剂的使用,成本低,同分异构体 15ACDON 和 3ACDON 达到有效的基线分离,适合大批量检测小麦样品中的 DON、15ACDON 和 3ACDON。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

U-3000 高效液相色谱仪(美国 Dionex), VWD-3000 可变波长紫外检测器; 3K30 高速台式冷冻离心机(德国 Sigma); 乙腈为色谱纯(美国 ROE Scientific Inc.), 水为去离子水,其余试剂均为分析纯;标准品纯度分别为 DON 99.4、3-ACDON 98%、15-ACDON 98.8% (Sigma-Aldrich); Oasis HLB 固相萃取小柱(Waters, 3 mL 60 mg⁻¹);供试小麦样品有 2010 年收获的宁麦 11、宁麦 9 号及有恒面粉(购于超市)。

1.2 试验方法

标准溶液配制: DON、15ACDON 和 3ACDON 储备液的浓度均为 100 mg L⁻¹,溶剂为乙腈。用水把 DON、15ACDON 和 3ACDON 储备液配制成 0.5、2.0、5.0、10.0、15.0 和 20.0 mg L⁻¹ 的混合标准溶液。

样品制备:称取粉碎后的小麦样品 5.00 g 于 50 mL 的离心管中,加入 25 mL 的 H₂O 振荡提取 15 min, 3 500×g 离心 10 min,取 10 mL 上清液加入等体积的无水乙醇 4℃ 沉淀 1 h,在 10 000×g 离心 20 min,取上清液旋转蒸发至干,用 1.0 mL H₂O 分 2 次振荡溶解,合并样液过 Oasis HLB 固相萃取小柱。分别用 3.0 mL 甲醇和纯水活化小柱;上样量 2.0 mL,自然流速,用 2.0 mL 纯水洗涤,然后在真空下抽气干燥 30 min;用 2.0 mL 乙酸乙酯分 2 次洗脱小柱,收集洗脱液,旋转蒸发至干后,加 0.5 mL H₂O 溶解,过 0.22 μm 微孔滤膜,上机。

色谱条件:色谱柱为 Xtimate C18 (4.6 mm×250 mm

i.d., 5 μm); 乙腈为流动相 A, 0.005% 磷酸水溶液为流动相 B,按一定比例梯度洗脱;检测波长 224 nm;流速 0.7 mL min⁻¹;柱温 35℃;进样量 10 μL。

方法学考察:将混合标准溶液以峰面积平均值和质量浓度进行回归处理,分析线性关系;分别在一日内不同时间制备样品 5 次,计算日内精密性,再连续测定 5 d,计算日间精密性;取空白样品,按 S/N=3 确定检测限(LOD), S/N=10 确定定量限(LOQ);取 5.00 g 空白样品,分别加入适量的 DON、15ACDON 和 3ACDON 储备液,分析加标回收率。

1.3 样品测定

取小麦样品宁麦 11、宁麦 9 号及有恒面粉按照方法 1.2 进行样品制备,根据回归方程计算 DON、15ACDON 和 3ACDON 的质量分数。

2 结果与分析

2.1 测定方法评价

在选定的色谱条件下, DON、15ACDON 和 3ACDON 在 0.5~15.0 mg L⁻¹ 范围内的线性回归方程分别为 $y = 0.2904x - 0.0182$ ($R^2=0.9989$)、 $y = 0.2631x - 0.0150$ ($R^2=0.9975$)、 $y = 0.2732x - 0.0189$ ($R^2=0.9976$);精密性试验测得 DON、15ACDON 和 3ACDON 的日内相对标准偏差分别为 2.97%、2.65% 和 2.18%, 日间相对标准偏差分别为 3.43%、3.82% 和 3.11%;以 3 倍信噪比(S/N=3)可得出检测限分别为 12.2、10.5 和 16.7 μg kg⁻¹,以 10 倍信噪比可得出定量限分别为 40.7、35.0 和 55.7 μg kg⁻¹;平均加标回收率分别为 89.8%、93.4% 和 92.9%, 相对标准偏差分别为 2.2%、2.0% 和 2.5% (表 1)。

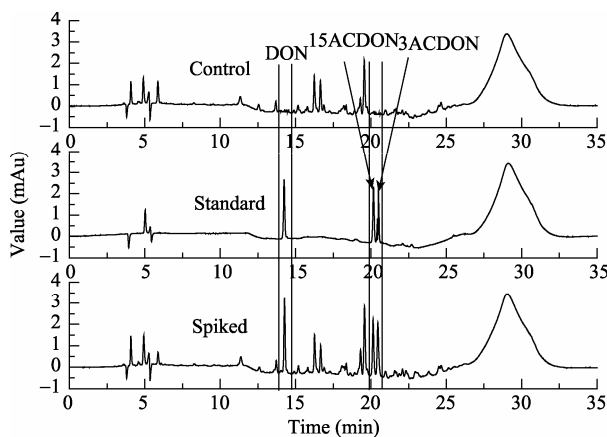


图 1 小麦空白样品及加标样品的 HPLC-UV 图谱(标样 0.5 mg L⁻¹)
Fig. 1 HPLC-UV chromatograms of wheat blank samples and spiked samples (standard 0.5 mg L⁻¹)

2.2 样品测定

经检测 3 个样品中均含有 DON, 未检测到 15ACDON 和 3ACDON (表 2)。图 1 中标样 DON、15ACDON 和 3ACDON 的出峰时间分别为 13.94、20.05 和 20.46 min。15ACDON 和 3ACDON 达到基线分离, 分离度为 2.0, 符合分离度>1.5 的要求。

表 1 回收率试验结果
Table 1 Results of the recovery ($n=3$)

分析物 Analyte	加入量 Additive ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	测得量 Measured ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	回收率 Recovery (%)	平均回收率 Mean recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
DON	2500	2185	87.40	89.8	2.2
	2500	2242	89.68		
	2500	2296	91.84		
15ACDON	2500	2258	90.32	93.4	2.0
	2500	2193	87.72		
	2500	2297	91.88		
3ACDON	2000	1883	94.15	92.9	2.5
	2000	1867	93.35		
	2000	1906	95.30		

表 2 样品测定结果
Table 2 Determination result of samples ($\mu\text{g kg}^{-1}$)

样品 Sample	DON	15ACDON	3ACDON
宁麦 11 Ningmai 11	725	-	-
宁麦 9 号 Ningmai 9	450	-	-
有恒面粉 Youheng flour	563	-	-

- 表示测定值低于定量下限。
- denotes the detected concentration is below LOQ.

3 讨论

3.1 样品净化方法的选择

在自然污染的小麦样品中除了毒素外, 尚含有蛋白质、脂肪、色素等干扰物质, 它们随着样品进入提取液, 干扰了 DON 及乙酰化衍生物的测定。如 Klötzel 等^[17]曾报道应用 2 种免疫亲和柱和基于活性炭和氧化铝柱子作为填料的 MycoSep 多功能柱对自然污染小麦样品的净化检测, 结果表明, 用紫外检测器检测, 杂质峰较多, 受基质干扰严重。毒素存在和粮食基体物质共提取的非特异性相互作用, 共提取的峰和毒素信号重叠、覆盖, 而且 HPLC 色谱柱要每个序列结束后冲洗, 保护柱也须经常替换。因此, 我们根据 DON、15ACDON 和 3ACDON 易溶于水 and 甲醇、乙醇、乙腈、丙酮及乙酸乙酯等极性溶剂的性质, 选用水为提取溶剂, 向提取液中加入无水乙醇, 在低温下可使绝大部分蛋白质、酶、核酸、糖、氨基酸等溶解度降低并析出, 通过离心可很好地去除沉淀。并且, 当无水乙醇: 提取液(V/V)=1:1 时, 沉淀效果最好, 杂质干扰少。

在通过 Oasis 固相萃取小柱时, DON、15ACDON 和 3ACDON 可以完全保留在小柱上, 可用 2 mL 水洗脱小柱, 去除水溶性杂质的干扰, 而分析物不会被洗脱下来。比较了 3 种洗脱剂甲醇、乙腈和乙酸乙酯的净化效果, 用甲醇和乙腈洗脱下来的杂质较多, 在 20~21 min 的位置干扰 15ACDON 和 3ACDON 的测定, 并且基线波动较大。用乙酸乙酯洗脱, 图谱很干净(图 2), 无须经常更换保护柱, 可消除 20~21 min 的杂峰干扰, 基线比较平稳。分析物的

回收率在 89.8%~93.4%之间。添加回收率试验证明本文方法选择性高。本研究采用乙醇沉淀结合 Oasis 固相萃取小柱净化样品, 获得了很好的效果, 成本低, 极大地减少了有机溶剂的使用, 适合大批量检测样品。

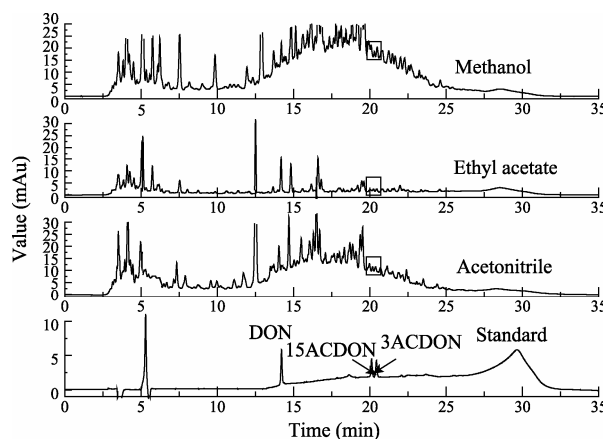


图 2 3 种有机溶剂洗脱固相萃取小柱的 HPLC-UV 图谱
Fig. 2 HPLC-UV Chromatograms of three kinds of organic solvents eluting solid phase extraction column

3.2 HPLC 分离条件的选择

因为 15ACDON 和 3ACDON 为同分异构体, 使用紫外检测器并且在非衍生的条件下, 很难达到基线分离, 比如 Jiménez 等^[18]报道, 使用甲醇-水(35:65)为流动相, 15ADON 和 3ADON 以一个峰出现。我们比较了最常用的流动相系统乙腈-水和甲醇-水体系, 结果表明, 以乙腈-水体系为流动相时, 改善了分离效果, 但效果依然不理想, 且色谱峰有拖尾现象。而以甲醇-水为流动相时, 色谱峰很难分离。由于毒素的分子结构中带有多个羟基, 流动相的 pH 对化合物的峰形、分离度和保留时间会产生影响。因此尝试采用乙腈-(0.001%~0.01%)磷酸水溶液和乙腈-(0.01%~0.1%)三氟乙酸水溶液来改善峰形, 消除拖尾。经过反复试验发现, 乙腈-0.005%磷酸水溶液梯度洗脱时, 分离度好、峰形尖锐。对柱温(20~70℃)的比较分析中发现, 柱温只对毒素的保留时间有影响, 对分离度没有影响, 选择 35℃保留时间较为适宜。

References

- [1] Cavaliere C, D'Ascenzo G, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Laganà A. Determination of type B trichothecenes and macrocyclic lactone mycotoxins in field contaminated maize. *Food Chem*, 2005, 92: 559–568
- [2] Wang Y-Z(王裕中), Miller J D. Toxin producing potential of *Fusarium graminearum* from China. *Mycosystema* (真菌学报), 1994, 13(3): 229–234 (in Chinese with English abstract)
- [3] Zhang P(张鹏), Ma H-X(马鸿翔). Biosynthesis and regulation of trichothecenes in *Fusarium* species. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2009, (1): 11–15 (in Chinese with English abstract)
- [4] FAO/WHO. Summary report of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Issued 16th March 2010, available at http://www.who.int/foodsafety/chem/summary72_rev.pdf
- [5] Wolf C E, Bullerman L B. Heat and pH alter the concentration of deoxynivalenol in an aqueous environment. *Food Prot*, 1998, 61: 365–367
- [6] Wang Y-Z(王裕中), Chen H-G(陈怀古), Yang X-Y(杨新宁), Lu M(陆鸣), Wu Z-F(吴志凤). Bioactivity of crude toxin produced by *Fusarium graminearum* and its application in identification of fusarium head blight resistance of wheat cultivars. *China Agric Sci* (中国农业科学), 1989, 2(4): 54–57 (in Chinese with English abstract)
- [7] Wei R-Y(魏润蕴). Thin-layer chromatography determining of deoxynivalenol in wheat. *J Hyg Res* (卫生研究), 1986, 15(5): 40–43 (in Chinese)
- [8] Trucksess M W, Page S W, Wood G E, Cho T H. Determination of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour, and bran by solid-phase extraction/liquid chromatography: interlaboratory study. *J AOAC Intl*, 1998, 81: 880–886
- [9] Scott P M, Kanhere S R. Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. *J Chromatogr*, 1986, 368: 374–380
- [10] Tacke B K, Casper H H. Determination of deoxynivalenol in wheat, barley, and malt by column cleanup and gas chromatography with electron capture detection. *J AOAC Intl*, 1996, 79: 472–475
- [11] Jestoi M, Ritieni A, Rizzo A. Analysis of the *Fusarium* mycotoxins fusaproliferin and trichothecenes in grains using gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 1464–1469
- [12] Klötzel M, Gutsche B, Lauber U, Humpf H U. Determination of 12 type A and B trichothecenes in cereals by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2005, 53: 8904–8910
- [13] Park J J, Chu F S. Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *J AOAC Intl*, 1996, 79: 465–471
- [14] Casale W L, Pestka J J, Hart L P. Enzyme-linked immunosorbent assay employing monoclonal antibody specific for deoxynivalenol (vomitoxin) and several analogues. *J Agric Food Chem*, 1988, 36: 663–668
- [15] Laamanen I, Veijalainen P. Factors affecting the results of T-2 mycotoxin ELISA assay. *J Food Add Contam*, 1992, 9: 337–343
- [16] Turner N W, Subrahmanyam S, Piletsky S A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. *Anal Chim Acta*, 2009, 632: 168–180
- [17] Klötzel M, Schmidt S, Lauber U, Thielert G, Humpf H U. Comparison of different clean-up procedures for the analysis of deoxynivalenol in cereal-based food and validation of a reliable HPLC method. *Chromatographia*, 2005, 62: 41–48
- [18] Jiménez M, Mateo R. Determination of mycotoxins produced by *Fusarium* isolates from banana fruits by capillary gas chromatography and highperformance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1997, 778: 363–372
- [19] Luongo D, Severino L, Bergamo P, D'Arienzo R, Rossi M. Trichothecenes NIV and DON modulate the maturation of murine dendritic cells. *Toxicon*, 2010, 55: 73–80
- [20] Yasuaki D, Sayaka K, Masaomi K, Yukie S, Tomoaki H, Keisuke S, Kunitoshi M, Susumu K, Yoshiko S K, Makoto S. Rapid deposition of glomerular IgA in BALB/c mice by nivalenol and its modifying effect on high IgA strain (HIGA) mice. *Exp Toxicol Pathol*, 2011, 63: 17–24
- [21] Bony S, Olivier-Loiseau L, Carcelen M, Devaux A. Genotoxic potential associated with low levels of the *Fusarium* mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line. *Toxicol in Vitro*, 2007, 21: 457–465