

运用免疫亲和柱和高效液相色谱(HPLC)检测啤酒 大麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇

王志萍¹, 王德良², 冯作山¹, 杨静¹, 王晓娟¹, 陈旭¹

1(新疆农业大学食品科学学院, 新疆 乌鲁木齐, 830052) 2(中国食品发酵工业研究院酒类安全评价中心, 北京, 100027)

摘要 采用免疫亲和柱净化、高效液相色谱定量等方法对啤酒大麦中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)进行检测。向啤酒大麦中加入标准品, 加标的范围在 0.10~2.00 $\mu\text{g/g}$, 加标回收率为 92.04%~97.29%, 相对标准偏差是 0.92%~2.67%。检出限是 0.01 $\mu\text{g/g}$ 。所测样品中 DON 的含量范围在 0.0123~0.0926 $\mu\text{g/g}$, 其中江浙、云南和东北产区的啤酒大麦中 DON 含量较高。

关键词 脱氧雪腐镰刀菌烯醇, 高效液相色谱, 啤酒大麦, 免疫亲和柱

啤酒大麦易感染的真菌毒素主要有脱氧雪腐镰刀菌烯醇和赭曲霉毒素 A 等, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇^[1] (Deoxynivalenol, DON), 化学名为 3a, 7a, 15-三羟基-12, 13-环氧单端孢霉-9-烯-8-酮, 是四环的倍半萜。DON 分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_6$, 分子量 296.3, 又叫呕吐毒素(Vomitoxin), 自然界中广泛存在于小麦、大麦、玉米等粮谷类农作物中。可导致人的急性中毒, 症状是胃部不适、恶心、呕吐、头痛、头晕、腹痛、腹泻。还有全身无力、口干、流涎等症状, 少数患者有发烧、颜面潮红等症状, 已被联合国粮农组织和世界卫生组织确定为最危险的自然发生食品污染物, 其含量和危害性列入国际控制研究的优先地位。欧盟委员会规则 EC1881/2006 号规定了谷物和谷物食品中 DON 的限量标准。其中未经加工谷物的最大限量为 1 250 $\mu\text{g/kg}$, 而经过粉碎的粉状物的最大限量为 750 $\mu\text{g/kg}$, 我国谷物中 DON 的限量标准为 1 000 $\mu\text{g/kg}$ 。啤酒大麦是啤酒酿造的主要原料, 很容易感染 DON, 制麦过程中, DON 会影响大麦发芽, 使啤酒大麦的发芽率低于 95%^[2], 导致产生的酶和浸出物减少。DON 还可能导致啤酒的喷涌, 啤酒色泽的改变或产生臭味等^[3]。

目前主要的检测方法有薄层色谱法(TLC)、酶联免疫法(ELISA)、气相色谱法(GC)、液相色谱法(LC)等。TLC 是最早建立的一种检测方法, 具有简便、经济、对检验人员要求不高等特点。但是 TLC 样品提纯较繁琐, 在定量方面不够精确。酶联免疫法应用比较普及^[4], 操作简便, 检测的样品通常不需要净

化, 但是检测出的毒素中常含有一些其它衍生物, 另外复合抗原的制备有困难。气相色谱法具有快速、灵敏度高、准确等优点。但是需要衍生化, 操作繁琐、重现性较差^[5]。本实验用 DON 免疫亲和柱进行净化, 采用 HPLC 的方法对 DON 进行检测和定量, 操作简单、灵敏度高、准确性和精确性好。

1 材料与方法

1.1 实验材料

甲醇: HPLC 级色谱纯; DON 标准品: 美国 SIGMA 公司, 纯度 99%; 聚乙二醇(PEG): 分子量 8000。除特殊注明外, 所用试剂均为分析纯, 水为超纯水。

1.2 主要仪器

Perkin Elmer 公司 Series 200 高效液相色谱仪; ZORBAX SB-C18 柱(安捷伦公司); 氮气吹干仪 KL512J(北京康林科技有限责任公司); KQ-100DE 型医用数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); DON Test HPLC 免疫亲和柱(VICAM 公司); 微纤维滤纸(VICAM 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 采样

准确测定啤酒大麦中的 DON 含量决定于多个因素, 正确采样是首先应解决的问题。DON 在大麦中分布非常不均匀, 如 1 个麦粒 DON 的污染可达到 20 mg/g , 而很多的麦粒却完全没有受到污染, 因此, 获得具有代表性的样品很困难, 为了降低取样的差异性, 在单一的分析中必须采集大量有效的样品。从尽可能多的位点采集, 对于一堆货物, 要根据要求, 分别从里到外, 从上到下各个部位取样, 然后粉碎混合均

第一作者: 硕士研究生(王德良为通讯作者)。

收稿日期: 2008-05-08, 改回日期: 2008-07-14

匀,再从中取小部分用于实验。

1.3.2 提取

研磨采集的样品,但不要研成粉末,使粉碎样品的95%通过20目筛。称取25.00 g至于三角瓶中,加入5 g 聚乙二醇8000(PEG)和100 mL的超纯水,放到超声波清洗器中均质1 h,采用快速滤纸过滤,再用微纤维滤纸过滤,收集滤液。

1.3.3 净化

将免疫亲和柱连接于玻璃注射器下。准确移取1 mL上述滤液注入玻璃注射器中,将空气压力泵与玻璃注射器连接,调节压力使溶液以1滴/秒流速缓慢通过免疫亲和柱,直至空气进入柱子。用5 mL的超纯水以2滴/s的流速快速冲洗柱子,直至空气进入柱子。加入1.5 mL色谱级甲醇洗脱,流速为1滴/s,收集洗脱液于玻璃试管中,再用 N_2 在50℃下吹干。用0.25 mL流动相定容,供液相色谱检测。

1.3.4 色谱条件

色谱柱:ZORBAX SB-C₁₈柱(4.6 mm×250 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(20:80);流速:1.0 mL/min,进样量:20 μL;检测器:紫外检测器;检测波长:218 nm。

2 结果与讨论

2.1 免疫亲和柱的使用

免疫亲和柱(immunoaffinity column,IAC)作用原理为:通过生物体接触DON的人工抗原,由于生物体自身的免疫作用,使生物体内形成免疫淋巴细胞而生成特异性的抗DON抗体。提取这些抗体后与骨髓瘤细胞融合,产生杂交瘤细胞,经筛选后再经克隆化,成为单克隆抗体,最后与载体蛋白偶联并将其填柱形成免疫亲和柱。

其优点是,由于抗原抗体有一一对应的特异性吸附关系,所以免疫亲和柱具有特效性和高选择性,提高了方法的准确性、精密度和灵敏度,并且大大缩短了前处理的时间,提高了效率。

2.2 净化条件的优化

尽管免疫亲和柱具有选择吸附的特异性,但是样品中还是会有少量的具有生物活性的杂质残留。所以,进化过程中采用蒸馏水对杂质进行淋洗,去除杂质对DON检测的干扰。由于DON是可溶于水的,所以水的淋洗体积就直接影响DON的回收率。分别用5、10、15和20 mL的水淋洗,净化后所得的回收率数据表明,采用10、15和20 mL淋洗后样品很

干净,但10 mL时的回收率是72%左右,15 mL时的回收率是63%左右,而20 mL时回收率最低,为50%左右,而采用5 mL的水淋洗,回收率为85%以上,尽管有少量的杂质,但是已经不影响DON的检测,所以采用5 mL的水淋洗。

2.3 流动相的选择

根据DON的性质可知,流动相可以采用甲醇、乙腈、水或者它们之间不同配比的混合液,实验中考虑了甲醇和水,以及乙腈和水按不同的配比组成流动相,根据保留时间、峰的分离度等因素确定理想的流动相。分别设定甲醇和水的体积比为,80:20,70:30,50:50,20:80,乙腈和水的体积比为90:10,60:40,40:60,10:90,最终发现当流动相为甲醇-水(20:80)和乙腈-水(10:90)时,DON的保留时间较合适,且峰形较好,见图1,考虑到甲醇潜在毒性相对较小,因此最终选择甲醇-水(体积比20:80)作为流动相。

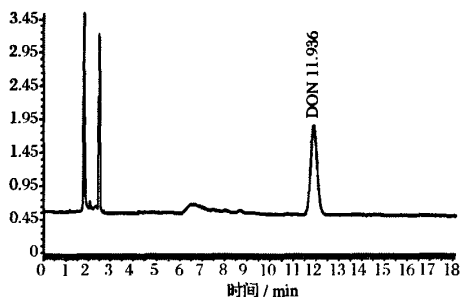


图1 流动相甲醇-水(20:80)的DON的标准谱图

2.4 DON标准曲线

配制DON标准液浓度分别为0.025、0.050、0.250、0.500、1.000和2.000 mg/L,按上述实验条件处理进样,用所得峰面积对浓度进行回归分析,线性关系较好,如图2,回归方程为 $y = -672.40 + 23532x$, $R^2 = 0.9994$ 。

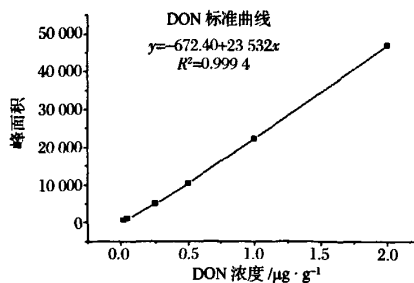


图2 DON的标准曲线

2.5 方法的回收率、精密度和检出限

在空白的啤酒大麦样品中,分别添加0.10,

0.25, 0.50, 1.00, 2.00 $\mu\text{g/g}$ 含量的 DON, 每个水平作 6 次平行实验, 按上述方法定量检测, 结果见表 1。

添加范围从 0.10 ~ 2.00 $\mu\text{g/g}$, 回收率为 92.04% ~ 97.29%, $\text{RSD}\% < 3$, 在本实验条件下, 将 DON 的标准溶液连续稀释后进行空白样品的加标回收实验, 根据 3 倍噪音的峰响应值、取样量和进样量, 得出方法的检出限为 0.01 $\mu\text{g/g}$ 。

表 1 样品的加标回收率和精密度试验 ($n=6$)

添加量 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	测定值 / $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	SD	RSD /%	回收率 /%
0.10	0.0927	0.0025	2.67	92.72
0.25	0.2341	0.0044	1.88	93.63
0.50	0.4864	0.0083	1.72	97.29
1.00	0.9523	0.0088	0.92	95.23
2.00	1.8408	0.0195	1.06	92.04

2.6 实际样品的检测

分别对我国 4 大产区的啤酒大麦和国外进口大麦进行抽样检测, 如图 3。所测样品中的 DON 的含量范围在 0.012 3 ~ 0.092 6 $\mu\text{g/g}$, 其含量远远低于 DON 的限量标准。由图 4 可知, 江浙、东北和云南产区大麦中的 DON 含量较高一些, 而西北产区、加拿大和澳洲大麦中的 DON 含量较低一些, 主要原因可

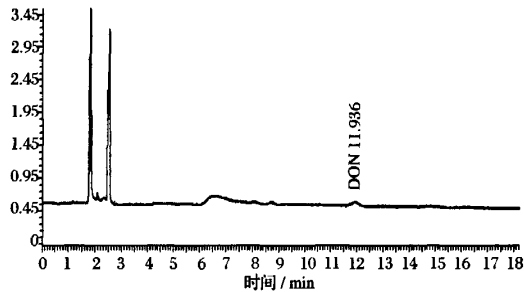


图 3 实际样品中 DON 谱图

能是气候的原因, 因为江浙、东北和云南地区气候较为湿润, 有利于真菌的生长。而西北、加拿大和澳洲气候较为干燥。

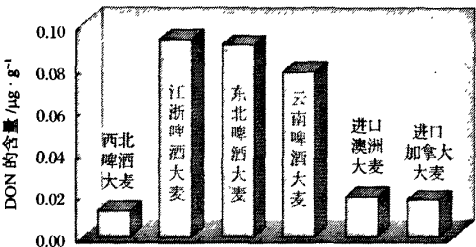


图 4 实际样品中 DON 的含量

3 结 论

实验表明, 采用免疫亲和柱净化, 高效液相色谱检测啤酒大麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法净化效果好、特异性强、方法准确、灵敏度高、分析速度快、操作简单。

参 考 文 献

1 张艺兵, 鲍 蕾. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006. 10~20
2 Charlene E, Wolf-Hall. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing [J]. Food Micro, 2007, 119: 89~94
3 Schwarz P B, Casper H H. Fate and development of naturally occurring Fusarium mycotoxins during malting and brewing [J]. Am Soc Brew Chem, 1995, 53: 121~127
4 Schneider L, Pichler H, Krska R. An enzyme linked immunoassay for the determination of deoxynival in wheat based on chicken egg yolk antibodies [J]. Anal Chem, 2000, 367: 98~100
5 Mario Vega, Daniela Castillo. Determination of deoxynivalenol in wheat by validated GC/ECD method; comparison with HPTLC/FLD [J]. Elec Food and Plants Chem, 2006, 1(1): 16~20

Detection of Deoxynivalenol in Malting Barley by Immunoaffinity Column Clear up and High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Wang Zhiping¹, Wang Deliang², Feng Zuoshan¹, Yang Jing¹, Wang Xiaojuan¹, Chen Xu¹

1 (College of Food Science, Xinjiang Agriculture University, Urumqi, 830052, China)

2 (Food Safety Center of Beer and Distilling Alcohol, China National Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing, 100027, China)

ABSTRACT An analytical study was conducted based on immunoaffinity column clear up, and High Performance Liquid Chromatography for purification and quantity detection of Deoxynivalenol in malting barley. With malting barley addition level from 0.10 $\mu\text{g/g}$ to 2.00 $\mu\text{g/g}$, recoveries of Deoxynivalenol from malting barley spiked ranged from 92.04% ~ 97.29%, and relative standard deviation was between 0.92% and 2.67%. The limit of detection was 0.01 $\mu\text{g/g}$. Of the total samples that contained DON, concentration ranged from 0.0123 to 0.0926 $\mu\text{g/g}$. A higher level of DON was found in the malting barely from Jiangzhe, Yunnan and Northeast.

Key words Deoxynivalenol(DON), HPLC, malting barley, immunoaffinity column