

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2020.03.011

高效液相色谱法快速检测小麦中 交链孢酚单甲醚

Rapid detection of Alternaria monomethyl ether in wheat by high performance liquid chromatography

徐群英¹ 翟羽恒²XU Qun-ying¹ ZHAI Yu-heng²

(1. 武汉轻工大学食品科学与工程学院, 湖北 武汉 430023; 2. 江南大学粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122)

(1. School of Food Science and Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan, Hubei 430023, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

摘要:开发了一种高效检测小麦中交链孢酚单甲醚(alternariolmethyl ether, AME)的高效液相色谱(HPLC)检测方法。将样品采用乙腈/甲醇/水(45/10/45, 体积比), 30 °C 振荡提取 30 min 后, 经 Bond Elut Plexa 固相萃取小柱净化后, 上样检测, 检测器采用紫外检测器。该方法 AME 检测限为 2.52 μg/kg, 定量限为 8.40 μg/kg, 线性范围为 0.25~2.00 μg/mL, 加标样品中不同浓度的 AME 回收率为 80.1%~88.3%, 日内精密度和日间精密度分别为 2.13%~6.59% 和 3.57%~8.43%。

关键词:高效液相色谱; 交链孢酚单甲醚; 小麦; 检测方法

Abstract: In this study, a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the efficient detection of alternariolmethyl ether (AME) in wheat was developed. The sample was extracted with acetonitrile/ methanol/ water (volume ratio 45/10/45), shaken at 30 °C for 30 minutes, and purified by Bond Elut Plexa solid-phase extraction cartridge. Then the sample was detected with a Variable wavelength detector. In this method, the limit of detection (LOD) of AME was 2.52 μg/kg, and the limit of quantification (LOQ) was 8.40 μg/kg, and the linear range was 0.25~2.00 μg/mL. The concentration of AME recovery was 80.1%~88.3%, the intra-day precision and inter-day precision were 2.13%~6.59% and 3.57%~8.43%, respectively.

Keywords: high performance liquid chromatography; Alzheimer monomethyl ether; wheat; detection method

基金项目:国家重点研发计划项目(编号:2017YFC1600900)

作者简介:徐群英(1961—), 女, 武汉轻工大学高级实验师。

E-mail: 953831621@qq.com

收稿日期:2019-12-11

交链孢霉菌(Alternaria species)在自然界中普遍存在, 营寄生或腐生生活, 在低温下生长繁殖, 具有植物致病性^[1]。交链孢霉菌能产生 70 多种真菌毒素和植物毒素, 统称为交链孢毒素。研究^[2]表明, 人及动物食用被交链孢毒素污染的谷物及饲料会面临急性和慢性毒性、致畸和致癌性、发育和生殖毒性等风险。交链孢酚单甲醚(alternariolmethyl ether, AME)是其中一种主要的、毒性较强的交链孢霉菌代谢产物, 属于二苯- α -吡喃酮类化合物, 也是谷物及其产品中检出率较高的一种交链孢毒素^[3]。

小麦是中国重要粮食作物之一, 在一些地区由于收获、加工和贮藏方法不当, 小麦交链孢毒素检出率较高, 严重影响人畜健康^[4-6]。谢莉等^[7]对在河南省部分地区销售的 95 份小麦粉样品进行交链孢毒素检测, 发现 AME 检出率高达 98.0%, 平均含量为 0.0~94.1 μg/kg。目前有关谷物中交链孢毒素降解和消除技术的研究较少^[8], 且谷物中交链孢毒素的限量标准和相关检测方法尚未颁布。

目前, 定量检测交链孢毒素的方法主要有薄层色谱法(TLC)^[9]、气相色谱法(GC)^[10]、气质联用法(GC-MS)^[11]、液相色谱法(LC)^[5, 12-13]、液质联用法(LC-MS)^[14-16]和酶联免疫法(ELISA)^[17]等。其中, 高效液相色谱法(HPLC)是应用最广的检测交链孢毒素的方法, 该方法准确性高、分析速度快^[18-19], 而检测交链孢霉毒素的液相色谱法主要选用荧光检测器和紫外检测器^[4, 12]。试验拟通过考察检测器种类和小麦样品前处理条件对 AME 的分离和检测效果, 以期建立一种检测效果好、准

确性强、耗时短、高效的小麦中 AME 定量分析方法,为标准的制定提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

小麦:市售;

甲醇、乙腈:美国 Fisher Scientific 公司;

AME 标准品:纯度 $\geq 99\%$,美国 Supelco 公司;

固相萃取小柱: Bond Elut Plexa, 200 mg, 6 mL, 美国 Agilent 公司;

色谱柱: ZORBAX SB-aq, 150 mm \times 4.6 mm, 粒径 5 μ m, 美国 Agilent 公司;

氮气、氧气(纯度 $\geq 99.8\%$):无锡新南化学气体有限公司;

其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 仪器与设备

超纯水仪: Simplicity UV 型, 电阻 ≥ 18.2 M Ω /cm, 美国 Millipore 公司;

高效液相色谱仪: 1260 系列, 带紫外(VWD)和荧光检测器(FLD), 美国 Agilent 公司;

真空萃取装置: Vac Elut 12, 美国 Agilent 公司;

氮吹仪: DCY-12G 型, 青岛海科仪器股份有限公司;

分析天平: BSA124S-CW 型, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;

振荡器: VORTEX 1 型, 艾卡(广州)仪器设备有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 AME 标准储备液和工作液的配制 将 AME 标准品溶于乙腈溶液, 配制成 100 μ g/mL 的标准储备液, -20 $^{\circ}$ C 贮藏。临用前, 取适量 AME 标准储备液, 加入相应的流动相, 配制成 1 μ g/mL 的标准工作液, 4 $^{\circ}$ C 贮藏。

1.2.2 液相色谱检测条件优化

(1) HPLC-FLD 液相条件: 参考陈月萌等^[12]的方法略作修改, 进样量 10 μ L, 流速 1.0 mL/min。

(2) HPLC-VWD 液相条件: 进样量 10 μ L, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 流动相采用甲醇和 1% 磷酸水溶液梯度洗脱。0~15 min, 55% 甲醇, 流速 0.7 mL/min; 15~18 min, 55%~65% 甲醇, 保持 3 min, 流速 1.0 mL/min; 然后将甲醇浓度恢复至 55%, 流速 0.7 mL/min, 并维持 1 min。紫外检测器波长 256 nm。

1.2.3 样品提取条件的优化 未污染的小麦经磨粉过 0.18 mm 孔径筛后, 称取 250 g 小麦粉, 加入 AME 标准工作液, 使加标后的样品中 AME 浓度为 400 μ g/kg, 室温放置过夜后待测。分别称取 9 份 25 g 加标小麦粉于 150 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 溶剂(乙腈/甲醇/水, 45/10/45, 体积比, pH 3), 分别于 20, 30, 40 $^{\circ}$ C 下提取 30, 45,

60 min, 取上层提取液过滤待用。

1.2.4 样品净化 将 Bond Elut Plexa 固相萃取小柱依次用甲醇和水活化, 取 5 mL 样品提取液过柱上样, 然后用 5 mL H_2O 淋洗, 3 kPa 真空干燥 2 min。用 5 mL 乙腈洗脱, 收集洗脱液, 50 $^{\circ}$ C 下氮吹仪吹至近干, 将固体粉末用流动相复溶。制样时溶液过 0.22 μ m 有机针孔滤膜, 滤液供液相色谱仪检测分析。

1.2.5 数据处理 试验结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示, 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析。单因素方差分析组间差异性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 条件优化

由图 1 可知, AME 在 FLD 中出峰时间为 7.6 min, 与陈月萌等^[12]的研究结果相似; 在 VWD 中出峰时间为 22.5 min, Pavón 等^[20]使用 VWD 检测 AME 的检出时间为 15.6 min, 加标回收率为 93.6%~101.3%, 检出时间和加标回收效果较优于试验结果, 可能是由于其使用了粒径更小的色谱柱, 使得 AME 与杂质的分离效果有较大的提高。AME 标品在 FLD 中虽然出峰时间较短但检测信号较低, 综合选取 VWD 及其相应的色谱条件进行 AME 检测。

2.2 样品提取条件的优化

由表 1 可知, 采用乙腈/甲醇/水(45/10/45, 体积比)作为提取溶剂, 当提取温度为 30 $^{\circ}$ C, 振荡 30 min 时, AME 回收率最高, 达 90.60%。

2.3 方法验证

由图 2 可知, AME 检测具有良好的线性, R^2 为 0.999 5, 线性范围为 0.25~2.00 μ g/mL, AME 的检出限($S/N=3$)为 2.52 μ g/kg, 定量限($S/N=10$)为 8.40 μ g/kg。

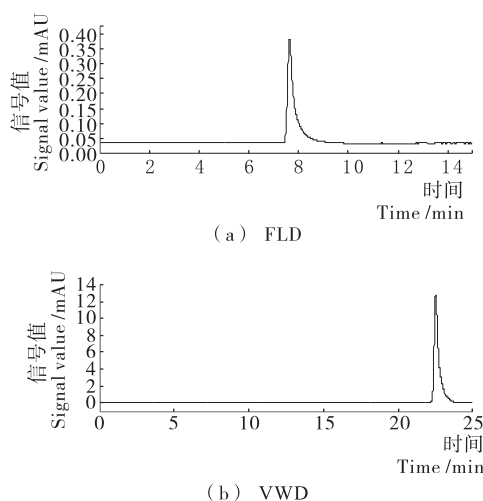


图 1 AME 标准品的检测色谱图

Figure 1 Detection chromatograms of AME standard (1.0 μ g/mL)

表 1 加标小麦样品中 AME 的提取效果[†]
Table 1 Extraction effect of AME in spiked wheat samples

提取时间/min	提取温度/℃	回收率/%
30	20	74.78±0.90 ^b
	30	90.60±0.84 ^a
	40	61.29±0.37 ^c
45	20	82.58±1.03 ^b
	30	87.39±2.22 ^a
	40	73.63±0.78 ^c
60	20	83.19±2.43 ^b
	30	90.24±0.78 ^a
	40	84.00±2.03 ^b

† 小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。

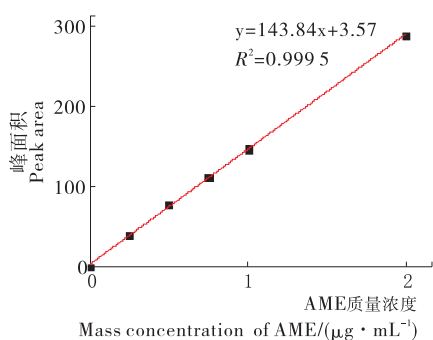


图 2 AME 检测标准曲线
Figure 2 AME detection standard curve

由表 2 可知, AME 回收率为 80.1%~88.3%, 日内精密度和日间精密度分别为 2.13%~6.59%, 3.57%~8.43%。试验方法对加标小麦中 AME 检测具有良好的回收率和精密度, 故此法的重现性好, 相对稳定, 可用于小麦中 AME 的检测。

3 结论

当使用 VWD 检测器, 提取温度 30 ℃, 提取时间 30 min 时, 污染 AME 的小麦样品经 HPLC 检测效果最佳。方法的检出限为 2.52 μg/kg, 定量限为 8.40 μg/kg,

表 2 AME 检测的准确度和精密度

Table 2 Accuracy and precision of AME detection

加标浓度/ (μg · kg ⁻¹)	回收率/ %	日内精密度/ %	日间精密度/ %
50	80.1	6.59	8.43
100	81.6	5.57	7.12
200	82.2	4.63	5.78
400	84.7	3.35	4.32
800	88.3	2.13	3.57

线性范围为 0.25~2.00 μg/mL, AME 回收率为 80.1%~88.3%, 具有良好的日内、日间精密度。后续可通过调节色谱分离柱等方式同时快速检测小麦的主要几种交链孢毒素。

参考文献

[1] 何国鑫, 邓青芳, 周欣. 链格孢霉毒素的分析方法及其毒理机制研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(4): 342-346.

[2] 闫璐, 高贵田, 哈益明, 等. 谷物中链格孢霉毒素的研究进展[J]. 核农学报, 2017, 31(2): 334-341.

[3] 姜冬梅, 王瑶, 姜楠, 等. 农产品及其制品中交链孢酚和交链孢酚单甲醚研究进展[J]. 食品科学, 2017, 38(21): 287-293.

[4] MUELLER M E H, KORN U. Alternaria mycotoxins in wheat: A 10 years survey in the Northeast of Germany[J]. Food Control, 2013, 34(1): 191-197.

[5] AZCARATE M P, PATRIARCA A, TERMINIELLO L, et al. Alternaria toxins in wheat during the 2004 to 2005 Argentinean harvest[J]. Journal of Food Protection, 2008, 71(6): 1 262-1 265.

[6] LI Feng-qin, YOSHIZAWA T. Alternaria mycotoxins in weathered wheat from China[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(7): 2 920-2 924.

[7] 谢莉, 贾永平, 范传彩. 河南省部分地区小麦粉中 4 种交链孢毒素污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2019, 29(7): 868-869.

[8] SIEGEL D, MERKEL S, BREMSER W, et al. Degradation kinetics of the Alternaria mycotoxin tenuazonic acid in aqueous solutions [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397(2): 453-462.

[9] MATYSIK G, GIRYN H. Gradient thin-layer chromatography and densitometry determination of alternaria mycotoxins [J]. Chromatographia, 1996, 42(9/10): 555-558.

[10] HARVAN D J, PERO R W. Gas chromatographic analysis of the Alternaria metabolite, tenuazonic acid[J]. Journal of Chromatography A, 1974, 101(1): 222-224.

[11] SCOTT P M, WEBER D, KANHERE S R. Gas chromatography-mass spectrometry of Alternaria mycotoxins[J]. Journal of Chromatography A, 1997, 765(2): 255-263.

[12] 陈月萌, 李建华, 张静, 等. 高效液相色谱-荧光检测法同时测定水果中的 3 种链格孢霉毒素[J]. 分析试验室, 2012, 31(6): 70-73.

[13] ALBERTO R Y, LIDIA N G, MARÍA C P, et al. Rapid determination of Alternaria mycotoxins in tomato samples by pressurised liquid extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2018, 35(11): 2 175-2 182.

(下转第 118 页)

由图 6 可知:颗粒做周向及径向运动,且运动轨迹很复杂,覆盖面广,说明运动特性很好;颗粒在某些点会临时停留并在局部转圈,说明在物料的相互冲击下,颗粒不断翻滚。相比正反转搅拌机构颗粒运动轨迹曲线图,行星搅拌机构颗粒运动轨迹曲线更长,说明颗粒在相同时间作用下运动速度更快,而且翻转更频繁。说明行星搅拌机构搅拌效果相比正反转搅拌机构更优。

为了更全面地确定行星搅拌机构的搅拌效果,将搅拌时间设置延长到 12 s,即 10 r。沿径向方向选取 4 颗颗粒分别标识为 a、b、c 和 d,得到的运动轨迹如图 7 所示。由图 7 可知,行星搅拌机构的搅拌效果理想,满足设计需求。

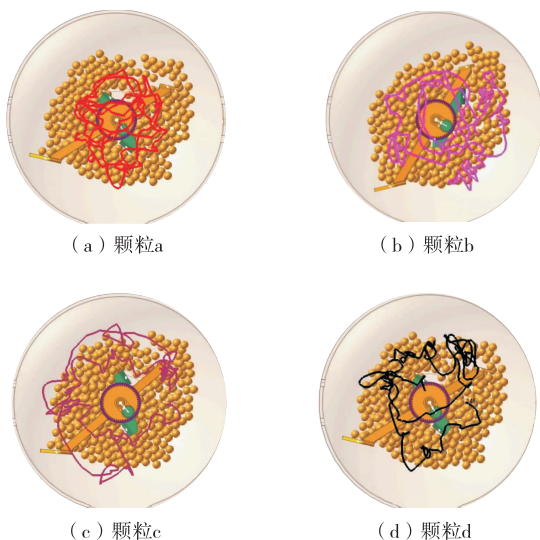


图 7 行星搅拌机构对物料的搅拌效果

Figure 7 Stirring effect of planetary stirring mechanism on materials

3 结论

试验对某类型烹饪机器人设计的 3 款搅拌机构进行了研究,通过多体动力学仿真软件对其进行分析。研究表明:单轴搅拌机构搅拌效果最差,行星搅拌机构搅拌性能最优,其运动轨迹复杂,能使物料充分混合。试验行星搅拌机构适用于商用餐厅或家用烹饪机器人。后续将通过多体动力学仿真软件对搅拌片的流向进行优化,以期获得更好的搅拌效果。

参考文献

[1] YAN Wei-xin, GUAN En-guang, MA Wen-tao, et al. Automatic cooking robot with a novel feeding system[C]// ICIRA 2010, Part I, LNAI 6424. Berlin Heidelberg GER: Springer-Verlag, 2010: 519-529.

[2] 刘银华, 闫维新, 周晓燕, 等. 自动烹饪机器人[J]. 上海交通大学学报, 2007(1): 119-122.

[3] 祝俊. 智能炒菜机及其关键技术的研究[D]. 武汉: 武汉工程大学, 2014: 6-10.

[4] 李鲜明. 炒菜机关键机构的研究与设计[D]. 武汉: 华中科技大学, 2006: 3-24.

[5] 雷鸣, 管声启, 王杰, 等. 新型商用炒菜机器人搅拌系统结构与轨迹分析[J]. 西安理工大学学报, 2019, 33(6): 660-665.

[6] 彭放. 家用炒菜机的关键技术研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2016: 11-22.

[7] 周晓燕, 朱云龙, 张建军, 等. 一种用于烹调设备的翻动工具: 中国, 200610035592.6[P]. 2007-11-28.

[8] 贾晓芸, 葛文化, 邓鹏飞, 等. 用于烹饪机器人的搅拌组件及烹饪机器人: 中国, 201810082713.5[P]. 2018-06-08.

[9] 艾德江, 李亚明, 林国汉, 等. 一种烹饪系统: 中国, 201910845997.3[P]. 2019-12-13.

[10] 郭鸿. 复杂颗粒流体力学特征仿真模拟[M]. 北京: 科学出版社, 2019: 1-3.

[11] 焦志勇, 段玉如, 杨春宏, 等. 基于 RecurDyn 的斗轮取料机铲斗工作过程仿真[J]. 天津科技大学学报, 2011, 26(5): 44-46, 60.

[12] 贾树强, 尚涛, 王昕, 等. 新型摆动式球磨机运动机理及性能[J]. 吉林大学学报, 2012, 42(1): 71-76.

[13] 张翀, 舒赣平. 筒仓卸料的颗粒流模拟及仓壁侧压力研究[J]. 四川建筑科学研究, 2016, 42(4): 11-16.

[14] 何华, 陈兴强, 刘春景. 基于颗粒流理论的敞车静侧压力研究[J]. 华东交通大学学报, 2018, 35(5): 17-21.

[15] 李力, 吕敬科. 基于颗粒流理论的海底沉积物剪切特性模拟研究[J]. 矿冶工程, 2017(6): 1-6.

[16] 杨洋, 唐寿高. 颗粒流的离散元法模拟及其进展[J]. 中国粉体技术, 2006, 13(5): 38-43.

[17] 孙其诚, 王光谦. 颗粒流动力学及其离散模型评述[J]. 力学进展, 2008, 38(1): 87-100.

(上接第 62 页)

[14] 吴振兴, 程果, 肖西志, 等. 固相萃取-液相色谱-串联质谱法检测番茄酱中 6 种交链孢霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(3): 700-704.

[15] 周贻兵, 李磊, 吴玉田, 等. QuEChERS 净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定番茄中 5 种链格孢霉毒素的含量[J]. 理化检验: 化学分册, 2019, 55(9): 1 036-1 041.

[16] 何强, 李建华, 孔祥虹, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定浓缩苹果汁中的 4 种链格孢霉毒素[J]. 色谱, 2010, 28(12): 1 128-1 131.

[17] 马良, 钟红, 王佳曼, 等. 细交链格孢菌酮酸化学发光酶联免疫吸附分析方法[J]. 分析实验室, 2017, 36(6): 667-670.

[18] 向俊, 王芳斌, 荆辉华, 等. 基于不同检测器高效液相色谱法测定食品中糖醇的研究[J]. 食品与机械, 2018, 34(9): 92-95.

[19] 邓维琴, 李阿霜, 彭贤, 等. 高效液相色谱-紫外检测法测定微生物降解体系中己烯雌酚含量[J]. 食品与机械, 2016, 32(1): 51-55.

[20] PAVÓN M Á, LUNA A, DE LA CRUZ S, et al. PCR-based assay for the detection of Alternaria species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products[J]. Food Control, 2012, 25(1): 45-52.