

饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的薄层层析测定法

吴小荣 殷蔚申 张耀东*

(郑州粮食学院, 郑州)

摘要 确立了一个适于测定饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, 简称 DON) 的薄层层析法。该方法可排除样品中成分复杂、干扰物质多的不利条件, 提取和净化效率高, 操作较简便, 具有较好的实用性和可靠性。标准点最低检出量为 10ng, 样品的最低检出限是 40ppb。该方法对 100、300 和 500ppb 水平的回收率分别是 85.9、88.9 和 79.2%。

关键词 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 呕吐素; 饲料

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON), 也称呕吐素(Vomitoxin), 是一种主要由禾谷镰刀菌等镰刀菌属的霉菌产生的有毒单端孢霉烯族化合物, 据报道其它的一些霉菌也可产生^[1,2,3]。DON

最早是以禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 的代谢产物在日本发现^[4]。在美国有人研究证

本工作为自然科学基金委员会资助项目。

* 我院87届毕业生酶化生等同学参加过部分工作。

实,从被禾谷镰刀菌引起霉腐的玉米穗中提取的干猪呕吐的致呕素与之是同一物质^[9]。在自然污染的小麦中 DON 污染水平可高达 3.65 pp.m^[10]。由于赤霉病麦中的 DON 毒素主要分布在麦粒皮层,麦麸中的毒素浓度较加工前的病麦高出数倍^[7],致使饲料中带有较高的 DON 毒素。近年来,由于赤霉病麦引起的农牧渔业损失引起世界范围的广泛重视,被 FAO/WHO 列为优先研究的四大类有毒物质的第二位。

目前,测定 DON 的方法有色-质联用法、气相色谱法、高压液相色谱法,但仅适于高级实验室。比较简单的薄层层析法^[6,9]只适用于干扰物质少的样品中 DON 的分析。饲料成份复杂,干扰物质极多,毒素的提取和纯化就困难得多。我们在前人工作的基础上,经反复试验确立了一个有效的提取、净化程序,并选用高效的溶剂系统,用薄层层析法测定饲料中的 DON。用薄层扫描仪对阳性样品进行定量。

材料与方 法

(一) 仪器

1. 净化柱:直径 14mm 的玻璃柱,用脱脂棉垫底,上加 30mm 高的氧化铝和 30mm 高的活性炭,以少许脱脂棉及几粒玻璃珠玉住活性炭。

2. 薄层板:称取 4.5 克青岛硅胶 G 加 10ml 15% 的 AlCl₃ 水溶液,研匀后涂成 5.5 × 20mm 薄层板,晾干后于 105℃ 活化 1 小时备用。

3. 紫外灯:波长 365nm。

4. CS-910-薄层扫描仪(日本岛津公司)。

5. U-235 记录仪, Chromatopac C-E1B 数据处理器(岛津公司)。

6. 电动振荡器、蒸发皿、抽滤瓶、平底管、微量注射器。

(二) 试剂

1. 活性炭:活性炭用 3N 盐酸浸泡过夜后用水洗至 pH 值中性,120℃ 烘干活化备用。

2. 中性氧化铝:200℃ 烘 6—8 小时。

3. 15% AlCl₃ 溶液:称取 AlCl₃·6H₂O 15 克溶于 100ml 蒸馏水中。现配现用。

4. DON 标准液:用百万分之一或十万分之一分析天平精确称取一定量 DON 结晶,溶于乙酸乙酯定容至刻度。储备液浓度 143μg/ml,点样用标准液浓度 10.0μg/ml。

5. 乙腈、乙醚、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、异丙醇。

(三) 样品的提取与净化

称取 25 克饲料样品置于 250ml 具塞三角瓶中,加 100ml 乙腈-水(90 + 10),加塞后于振荡器上强烈振荡 30 分钟,经脱脂棉或定性滤纸过滤后,取 25ml 滤液于分液漏斗中,用 50ml 正己烷分二次(25 × 2)脱脂,而后乙腈-水部分用抽气泵抽真空过净化柱,并用少许乙腈-水洗

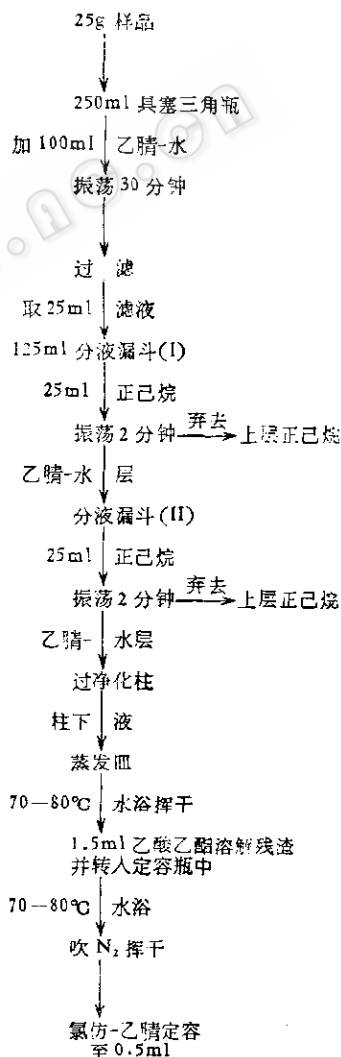


图 1 饲料样品的提取与净化流程图

柱,收集柱下液于蒸发皿中,在70—80℃水浴上挥干,趁热用乙酸乙酯液解液残渣并转入浓缩瓶中(约1.5ml乙酸乙酯,分三次),再在水浴上吹N₂挥干,最后用氯仿-乙腈(4+1)定容至0.5ml(相当于6.25克样品)备薄层层析用。整个过程如图1。

(四) 测定

1. 点样: 在距薄层板下边15mm左边8mm处点20μl样液,在同一水平距样点20mm处点10.0μg/ml DON标准液10μl,在板的上端同样位置各点一个标准定位点。

2. 展板: 样点边朝下于乙醚-丙酮(9+1)中横展至溶剂过上线4分钟取出,溶剂挥干后在氯仿-丙酮-异丙醇(8+1+1)中纵展至溶剂前缘距样点12cm左右取出挥干。

3. 显色定性: 薄层板充分挥干后在120℃烘箱烘7分钟,取出放凉后在365nm紫外光下DON点呈蓝色荧光点。根据标准点和定位点位置确定样品中是否有DON。

4. 定量测定: 若有阳性样品,在紫外光下针刺标记毒素点位置后,用CS-910薄层扫描仪测定样液点及标准点峰面积。仪器工作条件为:光源:氙灯,激发波长:313nm,发射波长:400nm滤光片,记录仪衰减:×50,纸速:20mm/min。样品中DON的含量用下式计算:

样品的DON含量(ppb)

$$= \frac{A_{\text{样}}}{A_{\text{标}}} \times 100 \times \frac{V_{\text{d}}}{V_{\text{s}}} \times \frac{1}{6.25}$$

式中A_样: 样液点DON的峰面积

A_标: 100ng标准DON点的峰面积

V_d: 样液最终定容体积(μl)

V_s: 样液点样体积(μl)

5. 标准曲线: 为使定量测定可靠、方便,作了DON标准毒素10—350ng范围的毒素量与响应值(峰面积)曲线,以确定定量分析的线性范围。

6. 回收率试验: 为验证本方法的可行性,在阴性饲料样品中添加标准DON毒素,做了100,300和500ppb水平的回收率试验。

结果与讨论

1. 用本方法分析了饲料样品147个,其中DON阳性样品为17个,占总样品数的11.6%,DON含量自16ppb至1111.2ppb不等。其中以辽宁和黑龙江的饲料污染率最高,达75%和42.9%,但污染水平不高。而甘肃、四川、吉林的饲料样品中未检出。饲料污染率最高的是云南3号样品,达1044.0ppb(表1)。

表1 DON阳性样品及其含量(ppb)

样品号	DON含量	样品号	DON含量	样品号	DON含量
广东2	313.7	云南3	1044.0	辽宁2	20.9
广东35	80.4	黑龙江3	65.3	辽宁3	21.9
广东38	337.5	黑龙江6	33.0	辽宁4	16.6
广东39	184.0	黑龙江玉米	1111.2	江苏1	20.5
陕西7	78.7	福建4	50.1	江苏5	97.3
陕西15	158.8	浙江3	359.7		

2. 测定方法的可靠性、实用性,主要从其回收率、最低检出量和操作是否简便反应出来。本实验中作了100、300和500ppb三水平的回收率试验,回收率均在75%以上。详见表2。

表2 饲料中DON回收率试验结果

回收水平	回收率(%)	平均值(%)
100ppb	75.2; 80.1; 88.8; 77.4	80.4
300ppb	79.5; 102.0; 87.8; 86.1	88.9
500ppb	79.2	79.2

由于本法的提取和净化效率高,样液中杂质少,最低检出量为10ng,此时样品的最低检出限为40ppb。在样液的提取净化、点板、展开及显色各步效果特别好时,最低检出量和最低检出限可分别达5ng和20ppb。这点从辽宁几个样品的测定结果以及定量用标准曲线(图1)中均可看出。而国外类似的方法,用来测定小麦、玉米等谷物样品的最低检出量为25ng,最低检出限为100ppb^[10]。

因饲料成份复杂,含各种干扰物质特别多,用正己烷二次脱脂、过净化柱及乙酸乙酯溶液可以充分地去除尘干扰物;而用氯仿-乙腈(4+1)定容则可使点样时样点集中,且在所用的展

开系统中分离效果好、样点扩散作用小, 确保其很低的最低检出量; 用 $AlCl_3$ 水溶液制薄层板不仅有使 DON 点荧光强度高的优点 (较 H_2SO_4 喷雾强 25 至 50 倍^[9]), 而且可使 $AlCl_3$ 在整个板上分布均匀, 样品点与标准 DON 点显色效果一致, 从而使定量结果可靠, 重复性好。样液点样量少, 样点中的干扰物少, 分辨率高, 最低检出量就低。

DON 阳性样品均用薄层扫描仪比较样点与标准点中 DON 的荧光强度进行定量。这样便省去了用目测最低检出量来定量的诸多麻烦和造成误差的因素。但要有一台薄层扫描

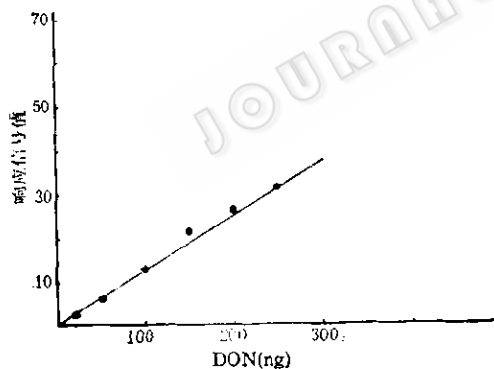


图 2 标准 DON 含量与其信号值关系曲线

仪, 并确定其适用的直接定量的线性范围。本实验中作了范围 10—350ng 标准 DON 的标准曲线。见图 2。

从图 2 中可看出, 样点 DON 含量在 250ng 以下, 其信号值(峰面积)与样点的 DON 含量有线性关系, 可直接扫描定量。若 20 μ l 样液中 DON 含量高于 250ng, 则可减少样液点样量或适当稀释后再点板, 这样不仅定量准确, 而且可节省大量时间, 减轻劳动强度。

参 考 文 献

- [1] Pathre, S. W. & Mirocha, C. J.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 992—994, 1982.
- [2] Miller, J. D. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 29: 1171—1178, 1983.
- [3] Ichinoe, M. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 1364—1369, 1983.
- [4] Yoshizawa, T., & Morocka, N.: *Agric. Biol. Chem.* 37: 2933—2934, 1973.
- [5] Vesonder, R. F. et al.: *Appl. Microbiol.*, 26: 1008—1010, 1973.
- [6] Abramson, D. et al.: *Canada J. Plant Sci.*, 67(3): 611—620, 1987.
- [7] Tanaka, T. et al.: *J. Food Hyg. Soc. Japn.* 27(6): 653—655, 1986.
- [8] Mary W. Trucksess, et al.: *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(1): 40—43, 1984.
- [9] 魏润德: 卫生研究, 15(5): 39—43, 1986.
- [10] Sanc. A., Asabe, Y. et al.: *J. Chromatogr.*, 235: 257—265, 1982.