

## 检测分析

# 高效液相色谱法定量检测玉米油中玉米赤霉烯酮的溶剂萃取预处理方法研究

朱文倩, 黄健花, 金青哲, 王兴国

(江南大学 食品学院, 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心, 江苏 无锡 214122)

**摘要:**研究了高效液相色谱法(HPLC)定量检测精炼玉米油中玉米赤霉烯酮(ZEN)的溶剂萃取预处理方法,优化了溶剂萃取预处理条件并进行了方法的评估。结果表明:溶剂萃取预处理的最优条件为乙腈-水(体积比9:1)混合溶液萃取、料液比1:4、超声萃取时间20 min,该萃取预处理条件可实现ZEN准确定量测定,检出限达4.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;10、100、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加标水平下的加标回收率分别为77.9%、105.7%、95.0%,相对标准偏差2.05%~8.43%,优于传统免疫亲和柱净化预处理方法。

**关键词:**玉米赤霉烯酮;玉米油;溶剂萃取;预处理;高效液相色谱法

中图分类号:TS225.1;O657.7 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)06-0140-04

## Solvent extraction pretreatment for determination of zearalenone in maize oil by HPLC

ZHU Wenqian, HUANG Jianhua, JIN Qingzhe, WANG Xingguo

(Collaborative Innovation Center of Food Safety and Quality Control in Jiangsu Province, School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China)

**Abstract:** The solvent extraction pretreatment method for determination of zearalenone (ZEN) in refined maize oil by HPLC (SE-HPLC) was established and assessed. The results showed that the optimal conditions of solvent extraction pretreatment were obtained as follows: with 90% acetonitrile water solution as extraction solution, ratio of material to liquid 1:4 and ultrasonic extraction time 20 min. The extraction pretreatment conditions realized the accurately quantitative determination of ZEN. The detection limit of SE-HPLC method was 4.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The mean recoveries of the target compounds (spiked at three concentration levels: 10, 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) were 77.9%, 105.7% and 95.0% respectively and the relative standard deviations (RSDs) were ranged from 2.05% to 8.43%. Through comparative analysis, the method was better than traditional immune affinity column pretreatment method.

**Key words:** zearalenone; maize oil; solvent extraction; pretreatment; HPLC

玉米赤霉烯酮(ZEN)是一种由镰刀菌属霉菌产生的有毒代谢物<sup>[1]</sup>,具有免疫毒性、肝毒性和细胞毒性<sup>[2]</sup>。玉米油作为玉米制品,在收获、加工、运输

等过程中易受镰刀菌污染产生ZEN。

目前,国内外测定食品中ZEN的方法主要有酶联免疫法<sup>[3-4]</sup>、胶体金快速测试法<sup>[5]</sup>、薄层色谱法<sup>[6]</sup>、液相色谱法<sup>[7-9]</sup>等。前3种方法多用于定性检测,定量检测则以液相色谱法(HPLC)最为常用,且常与免疫亲和柱(IAC)层析<sup>[10]</sup>、净化柱层析<sup>[11]</sup>的预处理方法结合使用。对于食用油中ZEN的定量分析,同样以HPLC最为常用。我国食品安全国家标准GB 5009.209—2016规定食用植物油中ZEN

收稿日期:2017-09-20;修回日期:2017-10-17

基金项目:“十三五”国家重点研发计划(2016YFD0401400)

作者简介:朱文倩(1993),女,在读硕士,研究方向为脂质科学与技术(E-mail) zhuwenqian23@163.com。

通信作者:黄健花,副教授,硕士生导师(E-mail) huangjianhua1124@126.com。

的含量采用 IAC-HPLC(荧光检测器 FLD)测定,但该法检出限仅为  $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[12]</sup>。IAC-HPLC 定量检测受 IAC 品质、操作人员熟练程度等影响较大,且 IAC 价格昂贵。近期有文献报道,不进行 IAC 净化,而采用溶剂萃取预处理即可采用 HPLC 进行玉米油 ZEN 的定量检测,该方法采用紫外检测器(UVD),检出限达  $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,具有良好的重现性,但由于 ZEN 的等外响应较弱,导致该法所测定谱图峰形较宽,峰高较小,信噪比不佳,ZEN 质量浓度为  $1\ 000 \mu\text{g}/\text{kg}$  的样品对应峰面积仅为  $407.9$ <sup>[7]</sup>。

鉴于此,本文采用 HPLC-FLD 进行 ZEN 的定量测定,探讨预处理对定量测定的影响。首先评估了 IAC 预处理对 HPLC 测定精炼玉米油(以下简称玉米油)中 ZEN 含量的影响,其次优化了溶剂萃取条件,并将其与传统的 IAC 进行了比较,为建立一种简单、稳定的玉米油中 ZEN 定量检测方法提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

ZEN 标准品(纯度不低于 99%),购自百灵威公司;市售玉米油(国标方法和本实验方法均未检出 ZEN)加标配制成 ZEN 含量为  $1\ 000 \mu\text{g}/\text{kg}$  的玉米油样品;某 6 个主流品牌的 ZEN 免疫亲和柱;乙腈、甲醇均为色谱纯;吐温 20 为化学纯;其余试剂均为分析纯。

AR2140 电子天平,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;MixPlus 旋涡振荡仪;超声波清洗机;GT16-3 高速台式离心机;Agilent 1260 高效液相色谱仪(HPLC-FLD),美国安捷伦科技公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 IAC 预处理提取油样中 ZEN

参考 GB 5009.209—2016 方法<sup>[12]</sup>,将最后所得过 IAC 柱的甲醇洗脱液经  $50\text{ }^\circ\text{C}$  氮吹后加入  $0.8\ \text{mL}$   $50\%$  甲醇水溶液复溶、混匀,待测。

#### 1.2.2 溶剂萃取预处理提取油样中 ZEN

玉米油样  $2.0\ \text{g}$ ,按一定的料液比加入萃取溶剂,混匀后  $25\text{ }^\circ\text{C}$  超声萃取,  $4\ 800\ \text{r}/\text{min}$  离心  $5\ \text{min}$ ,取上清液  $8\ \text{mL}$ ,  $50\text{ }^\circ\text{C}$  氮吹,加入  $1\ \text{mL}$   $50\%$  甲醇水溶液复溶、混匀,测定 ZEN 质量浓度,计算玉米油的 ZEN 含量和回收率。

#### 1.2.3 HPLC 测定 ZEN 含量

Cloversil ODS-C<sub>18</sub> 柱( $5\ \mu\text{m} \times 4.6\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$ );流动相为乙腈-甲醇-水(体积比 46:46:8);流速  $1\ \text{mL}/\text{min}$ ;进样量  $10\ \mu\text{L}$ ;柱温  $35\text{ }^\circ\text{C}$ ;荧光检测

器激发波长  $274\ \text{nm}$ ,发射波长  $440\ \text{nm}$ 。外标法计算得测定液中 ZEN 质量浓度。同时进行空白实验测定 ZEN 质量浓度。

#### 1.2.4 ZEN 含量的计算

IAC-HPLC 测得样品中 ZEN 的含量,按 GB 5009.209—2016<sup>[12]</sup> 计算。

溶剂萃取-HPLC 测得样品中 ZEN 的含量按下式计算:

$$X = \frac{(c_1 - c_0) \times V}{m \times V_2} \times V_1 \times 1\ 000$$

式中: $X$  为油样中 ZEN 的含量,  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;  $c_1$  为 HPLC 进样液中 ZEN 的质量浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $c_0$  为空白实验 HPLC 进样液中 ZEN 的质量浓度,  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;  $V$  为用于溶解氮吹后 ZEN 的  $50\%$  甲醇水溶液体积,为  $1\ \text{mL}$ ;  $V_1$  为萃取溶液的体积,  $\text{mL}$ ;  $V_2$  为用于氮吹的上清液体积,为  $8\ \text{mL}$ ;  $m$  为称取样品的质量,为  $2\ \text{g}$ 。

#### 1.2.5 加标回收实验

玉米油中添加不同量的 ZEN 标准品,进行加标回收实验,评估方法的准确度和精密度。配制 ZEN 质量浓度分别为  $10$ 、 $100$ 、 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$  玉米油。每天选取每个加标水平的样品 3 份,进行溶剂萃取-HPLC 定量检测,连续检测 6 d,计算加标回收率和日间精密度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 溶剂萃取条件优化

#### 2.1.1 萃取溶剂对 ZEN 萃取效果的影响

ZEN 不溶于水,但溶于乙腈、甲醇等有机溶剂。因此,本文以不同体积比的乙腈水溶液为萃取溶剂,在料液比 1:4、超声萃取  $20\ \text{min}$  条件下,考察萃取溶剂对玉米油中 ZEN 定量检测的影响。所采用萃取溶剂分别为  $100\%$  乙腈及体积比分别为 9:1、4:1 的乙腈水溶液,根据检测结果计算回收率,结果如表 1 所示。由表 1 可知,乙腈-水(体积比 9:1)的萃取效果最理想。

表 1 不同萃取溶剂萃取玉米油中 ZEN 的回收率比较

萃取溶剂	回收率/%
100% 乙腈	$85 \pm 3$
乙腈-水(体积比 9:1)	$91 \pm 2$
乙腈-水(体积比 4:1)	$72 \pm 6$

#### 2.1.2 料液比对 ZEN 萃取效果的影响

以乙腈-水(体积比 9:1)溶液为萃取溶剂,超声萃取  $20\ \text{min}$ ,考察料液比对玉米油中 ZEN 萃取效果的影响,结果如图 1 所示。

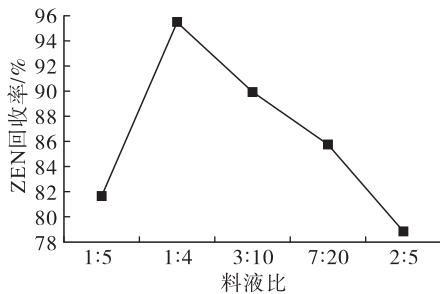


图1 料液比对 ZEN 回收率的影响

由图1可知,随着料液比的增加,ZEN回收率先增加后降低。当料液比1:4时,ZEN回收率最大,萃取效果最佳,达95.4%。

### 2.1.3 超声萃取时间对 ZEN 萃取效果的影响

在萃取液为乙腈-水(体积比9:1)、料液比1:4的条件下,考察超声萃取时间对 ZEN 萃取效果的影响,结果如图2所示。

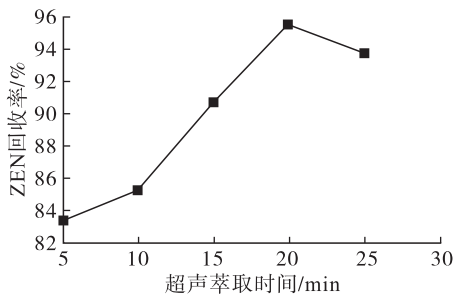


图2 超声萃取时间对 ZEN 回收率的影响

由图2可知,当超声萃取时间较短时,随着超声萃取时间的延长,ZEN回收率增加;但超声萃取时间超过20 min后,ZEN回收率逐渐下降。当超声萃取时间为20 min时,ZEN回收率最大,萃取效果最佳,达95.5%。

综上所述,采用溶剂萃取预处理的最优条件为:乙腈-水(体积比9:1)混合溶液萃取,料液比1:4,超声萃取时间20 min。

## 2.2 溶剂萃取-HPLC测定 ZEN 的效果评价

### 2.2.1 测定谱图

溶剂萃取后 ZEN 的色谱图如图3所示,该图同时给出了 IAC 预处理的色谱图。

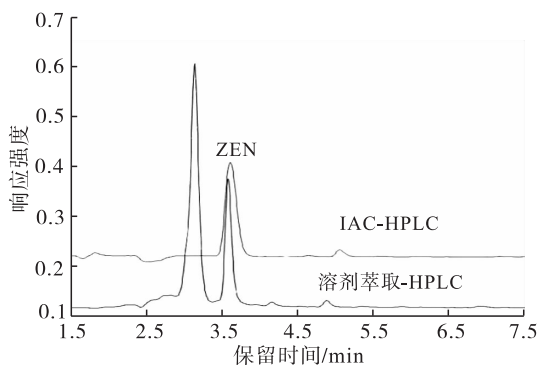


图3 IAC-HPLC和溶剂萃取-HPLC定量检测玉米油中 ZEN 色谱图

由图3可知,预处理方法并不影响 ZEN 的出峰时间。与 IAC 预处理相比,溶剂萃取后的色谱图中有一相邻杂峰,但该峰与 ZEN 峰实现很好的基线分离,不影响 ZEN 的定量检测。因此,采用溶剂萃取预处理即可保证后续 HPLC 分析的有效分离检测。

### 2.2.2 检出限和定量限

以50%甲醇水溶液为溶剂,分别配制0.025、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.75、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 ZEN 标准溶液,进行 HPLC 分析,以质量浓度( $x$ )与峰面积( $y$ )绘制标准曲线,得线性回归方程  $y = 1\ 088\ 530x + 9\ 413.8$ ,  $R^2 = 0.998\ 9$ 。

方法检出限以加标样品检测色谱峰信噪比  $S/N \geq 3$  确定,方法定量限以加标样品检测色谱峰信噪比  $S/N \geq 10$  确定。根据线性回归方程,得到该方法对于成品玉米油中 ZEN 的检出限为 4.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,定量限为 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,优于国家标准所述 IAC-HPLC 的检出限(10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )和定量限(33  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )<sup>[12]</sup>。

### 2.2.3 回收率和精密度(见表2)

表2 ZEN 在不同加标水平下的加标回收率以及相对标准偏差( $n=6$ )

加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%	RSD/%
10	77.9	6.23
100	105.7	8.43
1 000	95.0	2.05

由表2可知,在10、100、1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 加标水平下,6 d加标回收实验的平均回收率分别为77.9%、105.7%、95.0%,相对标准偏差为2.05%~8.43%,可见 ZEN 在不同添加水平均具有较好的回收率和方法重复性。

为进一步评估本提取方法,将其与传统 IAC 方法进行比较。含1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ZEN 的玉米油样,分别经6个不同厂家 IAC 柱预处理后,进行 ZEN 含量测定,所有实验平行测定5次,ZEN 平均回收率为88.0%,RSD为6.47%。

显然,溶剂萃取预处理优于 IAC 预处理,溶剂萃取-HPLC测得的数据可靠性优于 IAC-HPLC。

## 3 结论

高效液相色谱法定量检测玉米油中玉米赤霉烯酮的溶剂萃取预处理的最优条件为乙腈-水(体积比9:1)混合溶液萃取、料液比1:4、超声萃取时间20 min,该萃取预处理条件能实现 ZEN 的准确定量,检出限达4.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ;10、100、1 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 加标水平下的加标回收率分别为77.9%、105.7%、95.0%,相对标准偏差为2.05%~8.43%,优于传统 IAC 预处理方法。

## 参考文献:

- [1] 邵瑞婷, 张丽华, 史娜, 等. 免疫亲和净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定食品中玉米赤霉烯酮类真菌毒素[J]. 食品科学, 2017, 38(16): 274-279.
- [2] DANICKE S, KEESE C, MEYER U, et al. Zearalenone (ZEN) metabolism and residue concentrations in physiological specimens of dairy cows exposed long-term to ZEN-contaminated diets differing in concentrate feed proportions[J]. Arch Anim Nutr, 2014, 68(6): 492-506.
- [3] 王文珺, 刘怡菲, 韩霄, 等. 玉米赤霉烯酮一步ELISA法的建立及应用[J]. 食品工业科技, 2016(14): 78-82, 9.
- [4] 李妍, 裴世春, 王岩, 等. ELISA和UPLC-MS/MS联合检测粮食中玉米赤霉烯酮残留[J]. 食品科学, 2016, 37(16): 229-234.
- [5] 丁木, 姜霞, 王蕊, 等. 原料乳中玉米赤霉烯酮胶体金免疫试纸条检测方法的建立[J]. 中国乳品工业, 2016(11): 59-61.
- [6] 吴文达, 王宝杰, 蔡兰芬, 等. 薄层色谱和高效液相色谱联合检测玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 畜牧与兽医, 2010(7): 17-20.
- [7] 张婷, 向仲朝. 玉米等谷物中玉米赤霉烯酮的高效液相色谱测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2016(16): 2327-2328.
- [8] 徐存宽, 薛云才, 孙宝胜. 高效液相色谱在粮食检测中的应用[J]. 现代面粉工业, 2016(5): 24-25.
- [9] 林有裕. 高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮的方法[J]. 现代食品, 2016(20): 106-107.
- [10] 姚佳. 免疫亲和柱-HPLC/MS/MS检测乳及乳制品中氯霉素、莱克多巴胺、玉米赤霉醇分析方法的研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2014.
- [11] 孟娟, 张晶, 张楠, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测粮食及其制品中的玉米赤霉烯酮类真菌毒素[J]. 色谱, 2010(6): 601-607.
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定: GB 5009.209-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- (上接第136页)
- [31] ALLAHYARIBAKE S, JAHANIAN R. Effects of dietary fat source and supplemental lysophosphatidylcholine on performance, immune responses, and ileal nutrient digestibility in broilers fed corn/soybean meal - or corn/wheat/soybean meal - based diets[J]. Poult Sci, 2017, 96(5): 1149-1158.
- [32] SHAH P, CHEASTY A, FOXTON C, et al. Discovery of potent inhibitors of the lysophospholipase autotaxin[J]. Bioorgan Med Chem Lett, 2016, 26(22): 5403-5410.
- [33] XU A, AHSANUL K K M, CHEN F, et al. Overexpression of autotaxin is associated with human renal cell carcinoma and bladder carcinoma and their progression[J]. Med Oncol, 2016, 33(11): 131.
- [34] MURPH M, TANAKA T, PANG J, et al. Liquid chromatography mass spectrometry for quantifying plasma lysophospholipids: potential biomarkers for cancer diagnosis[J]. Methods Enzymol, 2007, 433: 1-25.
- [35] DEL BAS J M, CAIMARI A, RODRIGUEZ N M I, et al. Impairment of lysophospholipid metabolism in obesity: altered plasma profile and desensitization to the modulatory properties of n-3 polyunsaturated fatty acids in a randomized controlled trial[J]. Am J Clin Nutr, 2016, 104(2): 266-279.
- [36] KLINGLER C, ZHAO X, ADHIKARY T, et al. Lysophosphatidylcholines activate PPAR and protect human skeletal muscle cells from lipotoxicity[J]. Biochim Biophys Acta (BBA) - Mol Cell Biol Lipids, 2016, 1861(12): 1980-1992.
- [37] XIONG Z L, YANG J, HUANG Y, et al. Serum metabolomics study of anti-depressive effect of Xiao-Chai-Hu-Tang on rat model of chronic unpredictable mild stress[J]. J Chromatogr B, 2016(1029/1030): 28-35.
- [38] LIU X, JIA L, PENG Z, et al. Plasma lipidomics reveals potential lipid markers of major depressive disorder[J]. Analyt Bioanal Chem, 2016, 408(23): 1-11.
- [39] STANCIC A, JANDL K, HASENOHRL C, et al. The GPR55 antagonist CID16020046 protects against intestinal inflammation[J]. Neurogastroenterol Motility Official J Eur Gastrointestinal Motility Soc, 2015, 27(10): 1432-1445.
- [40] DENIMAL D, NGUYEN A, JP P D B, et al. Major changes in the sphingophospholipidome of HDL in non-diabetic patients with metabolic syndrome[J]. Atherosclerosis, 2016, 246: 106.
- [41] AMARO A L, ALMEIDA D P F. Lysophosphatidylethanolamine effects on horticultural commodities: a review[J]. Postharvest Biol Technol, 2013, 78(4): 92-102.