

# 饲料中玉米赤霉烯酮快速定量检测方法的研究

王 雄 王 津 （北京中检维康技术有限公司）

程宗佳 博士 （美国大豆协会北京办事处饲料技术主任）

摘要：利用免疫亲和柱荧光光度法测定了饲料中玉米赤霉烯酮，检测灵敏度为 0.1mg/kg，检测范围为：0~5mg/kg，变异系数为 3.3%~13.3%，在其检测范围内的回收率为 97%~106%，分析 1 个样品的时间只需 25min。

关键词：玉米赤霉烯酮；饲料；检测

玉米赤霉烯酮（zearalenone, ZEN），又称 F2 毒素，是由禾谷镰刀菌等菌种产生的有毒代谢产物，是一种雌激素真菌毒素，化学名为 6-(10 羟基-6 氧基-1-炭稀基)β-雷琐酸-μ-内脂，是一种白色的结晶，分子式为 C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>，分子量为 318；熔点为 164~165℃；紫外线光谱最大吸收 236nm、274nm 和 316nm；红外线光谱最大吸收为 970nm。纯的玉米赤霉烯酮不溶于水、二硫化碳和四氯化碳；溶于碱性水溶液、乙醚、苯、氯仿、二氯甲烷、醋酸乙酯、乙腈和乙醇；微溶于石油醚（b. p. 30~60℃），在紫外线照射下呈蓝绿色（刘继业，2001）。

米赤霉烯酮最初是从赤霉病玉米中分离出来的，有 15 种以上的衍生物，其主要存在于玉米和玉米制品中，小麦、大麦、高粱、大米中也有一定程度的分布，ZEN 主要污染玉米、麦类、谷物等，在世界各地各种粮谷与饲料中均有存在。

玉米赤霉烯酮具有较强的生殖毒性和致畸作用，可引起动物发生雌激素亢进症，导致动物不孕或流产，对家禽、猪、牛和羊的影响较大，给畜牧业带来很大的经济损失。

目前玉米赤霉烯酮的测定方法有薄层色谱法（Quiroga 等，1994；杨曙明等，1994）、气相色谱法-质谱（Bennett 等，1994）、酶联免疫吸附法（Bagnati 等，1991）等。Fazekas 等(2001)和 Visconti 等(1998)利用免疫亲和柱-HPLC 法测定了玉米样品中的玉米赤霉烯酮，Scott 等(1999)利用免疫亲和柱-荧光法和免疫亲和柱-HPLC 法快速测定了玉米样品中的玉米赤霉烯酮。本研究中采用玉米赤霉烯酮免疫亲和柱对样品中的玉米赤霉烯酮进行特异性的吸附分离，然后用已标定好的荧光计进行定量检测。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与溶液

1.1.1 甲醇：色谱纯，美国 J. T. Baker。

1.1.2 玉米赤霉烯酮标准品，美国 Sigma。

1.1.3 氯化钠，分析纯。

1.1.4 磷酸氢二钠，分析纯。

1.1.5 磷酸二氢钾，分析纯。

1.1.6 氯化钾，分析纯。

1.1.7 吐温-20，分析纯。

1.1.8 0.1%吐温-20/PBS 缓冲液：称取 8.0g NaCl+1.2g

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 0.2\text{gKH}_2\text{P}_2\text{O}_4 + 0.2\text{g KCl}$ ，用 990 mL 纯水将上述试剂溶解，加入 1mL 的吐温-20，然后用浓 HCl 调 pH 至 7.0，最后用纯水稀释至 1000mL。

1.1.9 玉米赤霉烯酮衍生物：美国 Vicam（用 50mL 的色谱级甲醇将 2.5g 的固态六水氯化铝  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  完全溶解，该衍生物在室温下可存放 1 个月）。

1.1.10 硫酸溶液（0.05mol/L）：美国 Vicam（取 2.8mL 浓硫酸，缓慢加入适量水中，冷却后定容至 1000mL，此溶液标定荧光计其读数相当于  $0\mu\text{g/L}$  玉米赤霉烯酮标准溶液）。

1.1.11 荧光光度计校准溶液：美国 Vicam（称取 3.40g 二水硫酸奎宁用 0.05mol/L 硫酸溶液稀释至 100mL，此溶液标定荧光计其读数相当于  $450\mu\text{g/L}$  玉米赤霉烯酮溶液）。

## 1.2 仪器设备

1.2.1 荧光计（激发波长 360nm，发射波长 450nm）：美国 Vicam。

1.2.2 高速均质器：18 000~22 000 r/min，美国 Vicam。

1.2.3 玉米赤霉烯酮免疫亲和柱：美国 Vicam。

1.2.4 玻璃纤维滤纸：直径 11cm，孔径  $1.0\mu\text{m}$ ，英国 Whatman。

1.2.5 玻璃注射器：10mL，20mL。

1.2.6 玻璃试管：直径 12mm，长 75mm，无荧光特性。

1.2.7 空气压力泵。

## 1.3 荧光光度计校准

在激发波长 360nm，发射波长 450nm 条件下，以 0.05mol/L 硫酸溶液为空白，调节荧光光度计的读数值为  $0\text{mg/L}$ ；以荧光光度计校准溶液调节荧光光度计的读数值为  $0.45\text{mg/L}$ 。

## 1.4 样品处理

1.4.1 提取：准确称取经过磨细（粒度小于 2mm）的试样 20.0g 于 250mL 具塞锥形瓶中（玉米赤霉烯酮标准品添加试验：计算出所需要添加的体积，取一定体积的玉米赤霉烯酮标准品于 250mL 具塞锥形瓶中，用氮气吹干，然后加入 20.0g 试样）。加入 2.0g 氯化钠及准确加入 50.0mL ( $V_1$ ) 甲醇-水 (8+2)，以均质器高速搅拌提取 2min。定量滤纸过滤，准确移取 10.0mL ( $V_2$ ) 滤液并加入 40.0mL ( $V_3$ ) 0.1%吐温-20/PBS 缓冲液稀释，用  $1.0\mu\text{m}$  的玻璃纤维滤纸过滤，取 10.0mL 滤液备用。

1.4.2 净化：将玉米赤霉烯酮免疫亲和柱连接于 10.0mL 玻璃注射器筒下。准确移取 10mL ( $V_4$ ) 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，调节压力使溶液以约  $2\sim 3\text{mL/min}$  流速缓慢通过免疫亲和柱（不要超过  $5\text{mL/min}$  流速）。用 10.0mL 0.1%的吐温-20/PBS 缓冲液清洗，再以 10.0mL 水分别清洗柱子 2 次，弃去全部流出液，并使  $2\sim 3\text{mL}$  空气通过柱体。准确加入 1.0mL ( $V$ ) 色谱级甲醇将免疫亲和柱吸附的玉米赤霉烯酮洗脱，流速为  $1\sim 2\text{mL/min}$ ，收集全部洗脱液于玻璃试管中，供荧光光度计定量测定用。

## 1.4.3 测定

取上述净化后的 1.0mL 甲醇洗脱液加入 1.0mL 玉米赤霉烯酮衍生物，混匀，插入荧光光度计中，5min 后仪器自动读取样液中玉米赤霉烯酮衍生物的浓度  $c_1$  (mg/L)。用水或者空白样品代替试样，按上述步骤做空白试验，测得浓度为  $c_0$  (mg/L)。

## 1.5 测定结果的计算

检测结果按公式 (1) 和 (2) 计算:

$$X_1 = \frac{(c_1 - c_0) \cdot V}{W} \dots\dots\dots (1)$$

$$W = \frac{m}{V_1} \times \frac{V_2}{(V_2 + V_3)} \times V_4 \dots\dots\dots (2)$$

- 式中:  $X_1$ - 试样中玉米赤霉烯酮的含量/ (mg/kg) ;  
 $c_1$ - 试样中玉米赤霉烯酮的含量/ (mg/L) ;  
 $c_0$ - 空白试验玉米赤霉烯酮的含量/ (mg/L) ;  
 $V$ - 最终甲醇洗脱液体积/mL;  
 $W$ - 最终净化洗脱液所含的试样质量/g;  
 $m$ - 试样称取量/g;  
 $V_1$ - 样品和提取液总体积/mL;  
 $V_2$ - 稀释用样品滤液体积/mL;  
 $V_3$ - 稀释液体积/mL;  
 $V_4$ - 通过亲和柱的样品提取液体积/mL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 回收率试验 (表 1)

表 1 配合饲料中玉米赤霉烯酮的添加回收率

添加水平 /(mg/kg)	检测结果/(mg/kg)							平均值 /(mg/kg)	标准偏差	回收率/%	变异系数 /%
	1	2	3	4	5	6	7				
0.1	0.09	0.12	0.09	0.11	0.09	0.09	0.09	0.097	0.0129	97	13.3
1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	0.9	0.9	1.1	1.043	0.127	104	12.2
2.0	2.0	2.2	1.9	2.3	2.3	2.0	2.1	2.11	0.158	106	7.5
5.0	5.3	5.2	5.2	4.9	5.3	5.4	5.4	5.24	0.172	105	3.3

2.2 实际样品的检测应用 利用免疫亲和柱-荧光法测定 150 个玉米原料、混合猪饲料、混合鸡饲料、混合虾饲料, 发现玉米赤霉烯酮的含量在 0~4.8mg/kg 之间。玉米赤霉烯酮在玉米原料和饲料中含量的分布情况见表 2, 由此可见玉米

原料和饲料中普遍存在有玉米赤霉烯酮。其中，玉米赤霉烯酮含量在 0.1~1.0mg/kg 之间，比例最高，而且超过 1mg/kg 的比例也比较高。所以，饲料厂及养殖场应该经常检测玉米赤霉烯酮，以便能够及时采取措施，防止对猪、牛的生长和生殖产生不良影响，而造成巨大的经济损失。

表 2 玉米赤霉烯酮在玉米原料和饲料中含量的分布情况

含量/ (mg/kg)	玉米		饲料	
	样品数/个	百分率/%	样品数/个	百分率/%
0-0.1	11	10.1	2	4.9
0.1-1.0	58	53.2	18	43.9
1.0-5.0	40	26.7	21	51.2

2.3 从表 1 中可以看到，免疫亲和柱-荧光法测定玉米赤霉烯酮的检测灵敏度为 0.1mg/kg，检测范围 0~5mg/kg，在其检测范围内的回收率为 97%~106%，变异系数为 3.3%~13.3%。如果玉米赤霉烯酮的含量超过 5mg/kg，可以将样品取样量减少 1 倍或者 2 倍，其他操作步骤不变，最后荧光计测定的结果乘以相应的稀释倍数 2 或者 3 即为样品的实际浓度值。

致谢：本试验经费由美国大豆协会提供，试验期间得到了美国大豆协会专家的大力支持，在此一并感谢。