

啤酒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇含量的测定

彭晓斌, 李新良

(上海尤特生化有限公司, 上海 浦东 201201)

摘要: 采用高效液相色谱法对啤酒中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)进行分析检测。选用色谱柱 Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液(体积比 20:80), 柱温 30℃, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 210 nm。在此条件下, DON 得到很好分离, 在 0.75~100 mg/L 范围内线性关系良好, $R^2=0.9993$, 外加标回收率在 85.36%~96.92% 之间, RSD 为 4.21%, 该方法可以简便、准确地测定啤酒中 DON 含量。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 啤酒; 高效液相色谱

中图分类号: TS 262.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2012)04-0438-05

Determination of Deoxynivalenol in Beer

PENG Xiao-bin, LI Xin-liang

(Shanghai Youtell Biochemical Co., Ltd., Shanghai 201201, China)

Abstract: An analytical method was developed to determine deoxynivalenol content in beer by high performance liquid chromatography in this study. Separations were achieved on a Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm) in a linear gradient, and the mobile phase was a mixture of methanol and water with phosphoric acid(0.05%, v/v) at (20:80, v/v). In addition, the column temperature was maintained at 30℃ with a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wave length was set at 210 nm. There was a good linear relationship between 0.75 mg/L-100 mg/L ($R^2=0.9993$). The average recovery was between 85.36%~96.92%, and RSD was 4.21%. It was proved to be a convenient and accurate method for analyzing deoxynivalenol content in beer.

Key words: deoxynivalenol, beer, HPLC

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, 缩写为 DON)于 1970 年由日本诸冈信一首先分离提纯, 化学名称为 3 α , 7 α , 15-三羟基草镰孢菌-9-烯-8-酮。属单端孢霉烯族化合物, 因一定剂量 DON 能使动物呕吐故又名呕吐毒素(后文脱氧雪腐镰刀菌烯醇均以呕吐毒素简称), 结构式见图 1。纯品为白色长方形结晶, 相对分子质量 296.3, 熔点为 151~153℃, 主要是由于感染镰刀菌的小麦、大麦、玉米等谷物,

在田间生长过程或制麦过程中产生, 从而将毒素带入啤酒。国外学者研究发现在酿造过程中, 麦汁煮沸时呕吐毒素含量增加了 3 倍^[2], 呕吐毒素从原料到成品大约有 60%~80% 残留^[3]。目前国内外采用酶联免疫法、高效液相色谱或气相色谱法对酿造原料及产品中的呕吐毒素进行检测^[4-9], 由于酶本身不稳定, 可能产生假阳、阴性结果, 重复性差, 检测精度有待于提高, 气相色谱检测则需要对样品进行衍

收稿日期: 2011-05-01

作者简介: 彭晓斌(1984-), 男, 湖南娄底人, 工学硕士, 主要从事啤酒酿造方面的研究。E-mail: pxb212698@163.com

生化处理。所以液相或液相质谱是近年来使用最为广泛的方法。作者建立一种高效液相色谱-紫外检测法测定啤酒中呕吐毒素含量的方法。

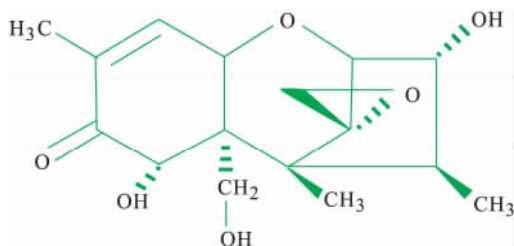


图1 呕吐毒素化学结构图

Fig. 1 Chemical structure of deoxynivalenol

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

啤酒样品:市售与公司送样;脱氧雪腐镰刀菌烯醇标样:购自 Sigma 公司,纯度 $\geq 99\%$;甲醇:色谱纯;水:Mili Q;三氯甲烷、石油醚、磷酸:均为国产分析纯。

Waters 600 高效液相色谱仪, Waters 600 泵, Waters Platform ZMD 4600, Breeze 色谱工作站,真空旋转蒸发仪。

1.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m), 流动相为甲醇-0.05%(体积分数)磷酸水溶液(体积比 20 : 80)等浓度洗脱, 检测波长 210 nm^[5], 柱温 30 $^{\circ}$ C, 进样量 10 μ L。

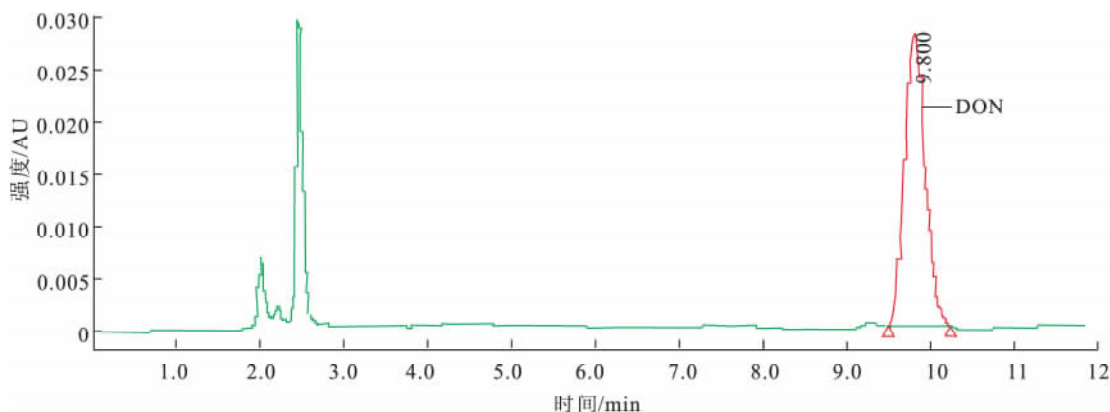


图2 呕吐毒素标样 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of the deoxynivalenol standard

1.3 实验方法

1.3.1 标样配制 准确称取呕吐毒素固体标准样品 1 mg, (精确到 0.01 mg), 转移到 10 mL 容量瓶, 在 20 $^{\circ}$ C 下用色谱纯甲醇定容到刻度, 作为储备液储存于 2 ~ 4 $^{\circ}$ C 的冰箱。

1.3.2 样品预处理 取 100 mL 除气啤酒, 加入 6 g NaCl 混合均匀后, 倒入 250 mL 分液漏斗, 取 100 mL 氯仿, 分 3 次萃取(40, 30, 30 mL), 静置分层, 取下层液体, 最后合并萃取剂, 于 45 $^{\circ}$ C 下旋转蒸发至干, 再分别用 50 mL 石油醚与 30 mL 体积分数 80% 甲醇水溶液溶解萃取物倒入 250 mL 分液漏斗, 摇匀静置分层后, 取下层液体, 再于 55 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至干, 1 mL 流动相洗脱并定容, 用 0.22 μ m 无机滤膜过滤, 冷冻保存备用。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相条件对分离的影响 分别考虑了用甲醇和乙腈作为流动相, 发现分离效果差不多, 但是甲醇的毒性与价格都相对较低。然后比较了甲醇-水(含体积分数 0.05% 磷酸)体系含甲醇体积分数 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%, 发现在 20% 时杂质与呕吐毒素能有效分离, 分离度较好。作者选择甲醇-0.05%(体积分数)磷酸水溶液(体积比 20 : 80)作流动相。

2.1.2 流速对分离的影响 在上述色谱条件下, 考察了流速分别为 0.5、0.8、1.0 mL/min 对分离度的影响。结果表明, 采用 1.0 mL/min 的流速时啤酒中的呕吐毒素分离度最好, 柱效较高, 样品的杂质峰与目的峰能够明显分开, 结果见图 2~4。

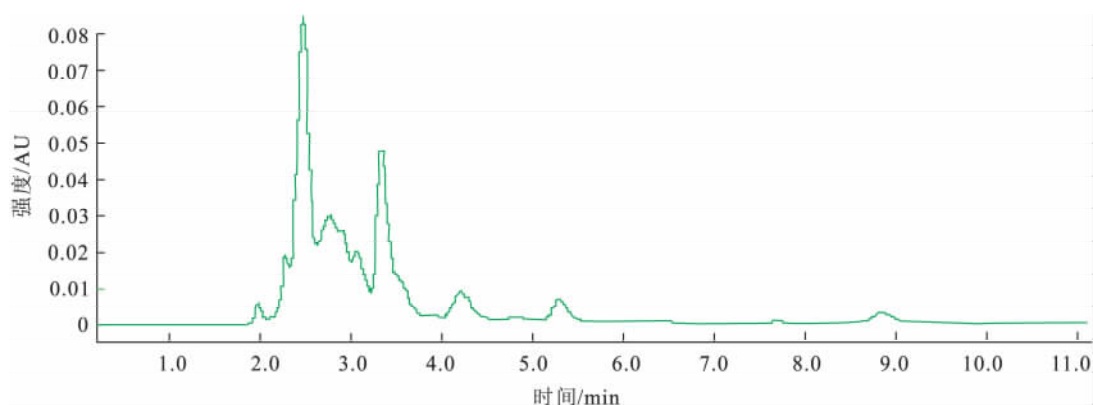


图3 市售啤酒 HPLC 图谱

Fig. 3 HPLC chromatogram of the market beer

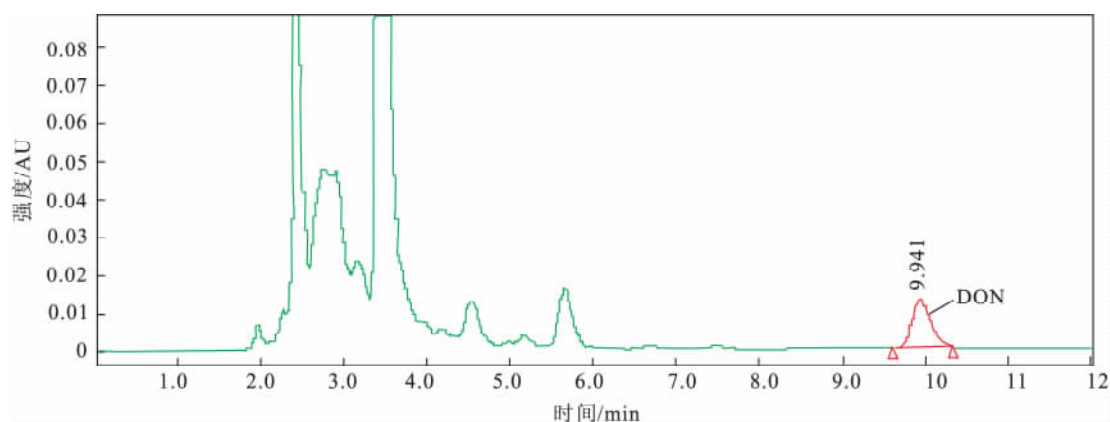


图4 由镰刀菌污染麦芽制成啤酒 HPLC 图谱

Fig. 4 HPLC chromatogram of the beer produced from Fusarium infected malt

2.1.3 加盐量对萃取效果的影响 选取质量浓度 0、3、6、9 g/dL 四个梯度的加盐量进行实验,每个做 3 次重复,考察其对呕吐毒素萃取效果的影响。结果见图 5。啤酒中水分含量很高,加盐可以改变呕吐毒素在水相和有机相中比例,使毒素尽可能进入有机相,有利于萃取。通过比较发现,加盐的质量浓度超过 6 g/dL 之后,峰面积基本保持不变,故选择质量浓度 6 g/dL 的加盐量。

2.2 方法有效性研究

2.2.1 线性关系与检出限 将呕吐毒素标样分别配成 150、100、75、30、15、7.5、5.0、0.75、0.5 mg/L 9 个不同质量浓度标准溶液,采用上述色谱条件分析。以样品的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线得到线性回归方程为: $y = 33434x - 8215.2$, $R^2 = 0.9993$, 呕吐毒素标准液在 0.75~100 mg/L, 线性关系良好。最低检出限 ($S/N=3$) 为 0.02 mg/L, 最低定量限 ($S/N=10$) 为 0.06 mg/L, 见图 6。

$N=3$) 为 0.02 mg/L, 最低定量限 ($S/N=10$) 为 0.06 mg/L, 见图 6。

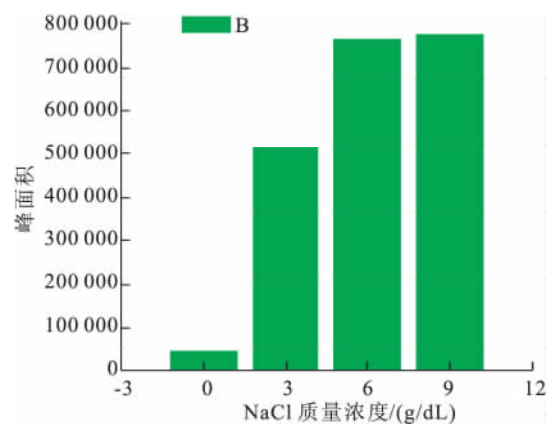


图5 不同 NaCl 质量浓度下啤酒中呕吐毒素峰面积

Fig. 5 Deoxynivalenol peak area of beer under different NaCl concentration

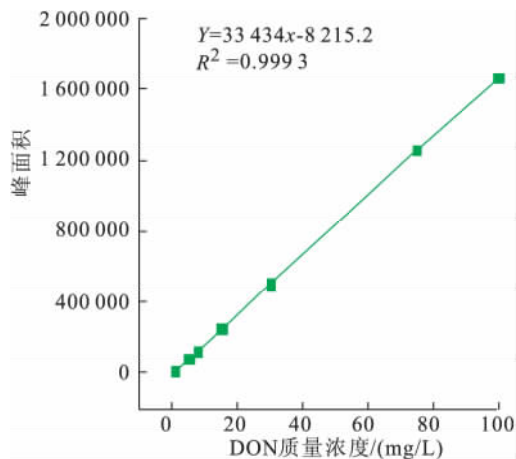


图6 呕吐毒素标准曲线

Fig. 6 The standard curve of deoxynivalenol

2.2.2 精密度 取 30 mg/L 的呕吐毒素标准溶液,连续进样 9 次,测定呕吐毒素标样色谱峰面积,

考察标样的 RSD 为 0.98%;采用同样的色谱条件检测啤酒样品处理溶液,测定样品呕吐毒素色谱峰峰面积,采用外标法定量,同一个样品连续测定 5 次,计算样品的 RSD 为 1.58%。从上述结果可知,此检测方法的 RSD<2%,精密度良好。

2.2.3 稳定性 取某一污染啤酒样品按照 1.3.2 方法预处理后,室温下放置 0、4、8、12、24、48 h 后进样,测定呕吐毒素色谱峰峰面积,计算 RSD 为 1.68%,表明供试溶液室温放置 48 h 内基本稳定。

2.2.4 回收率 分别取 3 种已知呕吐毒素含量(采用竞争酶联免疫法,通过呕吐毒素试剂盒测定,视为标准含量,方法参照 GB/T5009.111-2003)的啤酒 100 mL,分别添加 30 mg/L 的标准溶液 1 mL,每种加标的啤酒样作 3 次平行,按照本研究建立的方法测定,计算平均回收率,结果见表 1。

表 1 啤酒加标回收率

Tab. 1 Percent recovery of beer

组号	加标前质量浓度/(mg/L)	加标水平/(mg/L)	加标后平均质量浓度/(mg/L)	回收率/%	平均回收率/%
1	0.100 0	0.3000	0.351 4	87.85	87.81
			0.341 5	85.36	
			0.360 8	90.21	
2	0.430 1	0.300 0	0.647 1	88.65	91.55
			0.677 6	92.82	
			0.680 1	93.17	
3	0.791 2	0.300 0	1.025 2	93.95	95.53
			1.044 6	95.73	
			1.057 6	96.92	

通过对样品进行加标测定,可以看出回收率在 85.36%~96.92% 范围内,说明该方法准确性较好,基本可以保证测量结果的可靠性。

2.3 啤酒中呕吐毒素质量浓度的检测

按照作者所建立的方法检测一系列啤酒中呕吐毒素质量浓度(市售啤酒与染镰刀菌麦芽酿制啤酒),结果见表 2。

从表 2 可知,除了由染镰刀菌麦芽酿制啤酒中呕吐毒素的质量浓度相对较高,目前国内普通市售啤酒中呕吐毒素质量浓度很低或者未检出。虽然在很多国家已有不同的法规^[10-11],但是普遍限值在 1 mg/kg,欧盟准备设定谷物重最高限值标准,德国

政府通过了征求标准,谷物产品中的最高限值是 0.5 mg/kg,但是面包和相关产品则为 0.35 mg/kg,荷兰暂时允许的限值 0.5 mg/kg,瑞士已规定谷物中的限值标准 0.5 mg/kg。参照以上规定,本研究中 HPLC 方法的最低定量限为 0.06 mg/L 是可以满足检测要求的。

表 2 不同啤酒中呕吐毒素质量浓度

Tab. 2 Deoxynivalenol content of different beer

序号	酶联免疫法 测定结果/(mg/L)	本法液相 测定结果/(mg/L)
污染啤酒 1	0.4301	0.4511
污染啤酒 2	0.7912	0.7720

续表 2

序号	酶联免疫法 测定结果/(mg/L)	本法液相 测定结果/(mg/L)
市售啤酒 1	0.100 0	0.105 2
市售啤酒 2	0.082 7	0.080 0
市售啤酒 3	0.071 8	0.075 5
市售啤酒 4	0	未检出
市售啤酒 5	0	未检出
市售啤酒 6	0	未检出
市售啤酒 7	0	未检出
市售啤酒 8	0	未检出

3 结 语

采用反相高效液相色谱测定啤酒中呕吐毒素, 精密度、重复性、稳定性的 $RSD < 2\%$, 回收率在 $85.36\% \sim 96.92\%$ 之间, 方法简便, 成本较低, 操作方便。准确度较高、精密度高, 是分析啤酒中呕吐毒素的有效方法。

参考文献(References):

- [1] Liu Z S. Food Pathogenic Microorganisms[M]. Bei Jing: China Light Industry Press, 2007, 146—211.
- [2] Hernandez M C, Sachet B Back W. Codex Committee on food additives and contaminant[J]. **Brauwelt**, 2000, 140(35): 1385—1392.
- [3] Charlene E, Wolf-H. Mold and mycotoxin problems encountered during malting and brewing[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 2007 (119): 89—94.
- [4] The People Republic of China Nation Standards. GB/T5009. 111-2003. The determination of grain and its products the content of deoxynivalenol[M]. Bei Jing: Standards Press of China, 2003.
- [5] Igor Jajic, Verica Juric, Biljana Abramovic. First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia[J]. **Food Control**, 2008 (19): 545—550.
- [6] Maria-Angeles Castillo, Rosa Montes, Adriana Navarro, et al. Occurrence of deoxynivalenol and nivalenol in Spanish corn-based food products[J]. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2008, (21): 423-427.
- [7] Muthomi J W, Ndungu J K, Gathumbi J K, et al. The occurrence of *Fusarium* species and mycotoxins in Kenyan wheat [J]. **Crop Protection**, 2008, (27): 1215—1219.
- [8] Scott P M, Kanhere R S, Weber D. Analysis of Canadian and imported beers for *Fusarium mycotoxin* by gas chromatography-massspectrometry[J]. **Food additives and Contaminants**, 1993, (10): 381—389.
- [9] Qi L L, Chen Z B, Zou H, et al. HPLC determination of microcystin in Taihu lake[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(1): 97—101.
- [10] Gulden Z Omurtag, Diren Beyoglu. Occurrence of deoxynivalenol (vomitoxin) in beer in turkey detected by HPLC[J]. **Food Control**, 2007, 18: 163—166.
- [11] SU F R, Wang S X, Sun H, et al. The state of mycotoxin maximum limit of grain[J]. **Science and Technology of Cereals, Oil and Foods**, 2007, 15(6): 57—59.