



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103336084 A

(43) 申请公布日 2013.10.02

(21) 申请号 201310282559.3

(22) 申请日 2013.07.05

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 杨富裕 马永强 关文碧 周静

梁超 张蕴薇 玉柱

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王朋飞

(51) Int. Cl.

G01N 30/88 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种测定苜蓿干草中麦角固醇含量的方法

(57) 摘要

本发明提供一种测定苜蓿干草中麦角固醇含量的方法,其包括步骤:1) 苜蓿干草粉样品加入甲醇与三氯甲烷混合溶液,震荡提取后分离出提取液,蒸馏至干,用正己烷定容;2) 定容得到的溶液进行衍生化反应,衍生化反应8-15min之后加入纯净水使反应终止,除水后过滤;3) 过滤得到的样品中加入灭蚊灵的正己烷溶液,用气相色谱质谱联用方法测定,与标准曲线比较。本发明的方法克服了高效液相色谱对苜蓿干草不能测出特征峰的缺陷,通过合理设置萃取、分离等测定条件,能够高效、准确地得到苜蓿干草中麦角固醇的测定结果,操作简单、安全。

1. 一种测定苜蓿干草中麦角固醇含量的方法,其特征在于,包括步骤:

1) 苜蓿干草粉样品加入甲醇与三氯甲烷混合溶液,震荡提取后分离出提取液,蒸馏至干,用正己烷定容,定容的体积与苜蓿干草粉质量比例为 2-3:1;

2) 定容得到的溶液与三甲基氯硅烷、N-三甲基硅烷咪唑和无水正己烷的混合溶液进行衍生化反应,衍生化反应 8-15min 之后加入纯净水使反应终止,用硫酸钠除水,过滤;

3) 过滤得到的样品中加入灭蚁灵的正己烷溶液 1000mg/L,用气相色谱质谱联用方法测定,与标准曲线比较。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述苜蓿干草粉样品与甲醇、三氯甲烷混合溶液的质量体积比为 2:20-40;甲醇、三氯甲烷混合溶液中甲醇与三氯甲烷体积比为 1:0.8-1.5。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中三甲基氯硅烷加入量为 50-120mg/L。

4. 根据权利要求 1-3 任一所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中三甲基氯硅烷、N-三甲基硅烷咪唑的体积比为 1:40-60 微升,正己烷的体积为三甲基氯硅烷、N-三甲基硅烷咪唑体积合的 15-30 倍。

5. 根据权利要求 1-3 任一所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中衍生化反应之后加入纯净水的体积是所述定容得到的溶液体积的 1/3-1/5。

6. 根据权利要求 1-3 任一所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中过滤得到的样品与灭蚁灵的正己烷溶液体积比为 40-50:1。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中,气相色谱质谱联用方法中,

气相色谱条件:柱流速:0.8-1.2mL/min,进样量:1.0 μ L;进样口温度:280-300 $^{\circ}$ C,初始温度 120 $^{\circ}$ C,升温速度 28-35 $^{\circ}$ C/min;

质谱条件:电子轰击离子源,单四极杆质量分析器,离子源温度 230 $^{\circ}$ C,四极杆温度 150 $^{\circ}$ C,传输线温度 280 $^{\circ}$ C。

8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,所述质谱条件中,选择特征性离子为:m/z272、237、332、404、363、468、337、378,定量离子为:m/z363、272。

9. 根据权利要求 1-3 任一所述的方法,其特征在于,所述步骤 3) 中的标准曲线是以麦角固醇标准溶液为样品,用气相色谱质谱联用方法测峰面积,绘制的标准曲线。

一种测定苜蓿干草中麦角固醇含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于有机化学领域,具体为一种牧草中的麦角固醇检测的方法。

背景技术

[0002] 麦角固醇的化学名称为 24B- 甲基胆固醇 -5,7 烯. 3B- 羟基;在真菌的生长过程中,它在确保膜结构的完整性、与膜结合酶的活性、膜的流动性、细胞活力以及物质运输方面起着重要作用。为了研究麦角固醇含量和真菌毒素关系,从而判断真菌的生物量,以及建立快速测定干草中麦角固醇含量的近红外模型等工作,都需要对麦角固醇进行准确的化学方法测定,以更好地检测牧草、饲料、土壤等物质中的生物量。

[0003] 现在,测定麦角固醇含量的分析方法,主要是利用高效液相色谱法(HPLC)来测定谷物、饲料、土壤及纯菌种中麦角固醇的含量。采用高效液相色谱法(HPLC)分析麦角固醇的含量:试样中加入甲醇(CH₃OH)、氢氧化钾(KOH),在 85 ~ 90℃ 的恒温水浴锅中回流皂化一定时间后,冷却至室温,加入乙醚在超声波振荡器中震荡,取上清液在 60℃ 水浴条件下蒸干乙醚后充氮气进行干燥,用无水乙醇定容,经有机膜过滤后,用高效液相色谱仪测定。

[0004] 高效液相色谱法(HPLC)较好地完成了在谷物、土壤、及纯菌种中麦角固醇的含量测定分析,但是,用此方法对紫花苜蓿干草中麦角固醇的含量进行测定分析时,麦角固醇在高效色谱仪上(282nm 位置)不出峰。

[0005] 高效液相色谱法(HPLC)能很好地检测谷物、蛋白质饲料(例如吴秀群等,高效液相色谱法(HPLC)测定饲料中麦角固醇,安徽农业科学,201038(33):18881-18883)、土壤及纯菌种中麦角固醇的含量,但是,此方法不能准确地测定紫花苜蓿干草中麦角固醇的含量,因此,我们通过实验,建立了气相色谱质谱法(GC-MS)测定紫花苜蓿干草中麦角固醇的含量。

发明内容

[0006] 针对本领域研究方面之不足,本发明的目的提供一种准确测定紫花苜蓿干草中麦角固醇的含量,为建立快速测定干草中麦角固醇含量的近红外模型奠定基础。

[0007] 实现本发明目的的具体技术方案为:

[0008] 一种测定苜蓿干草中麦角固醇含量的方法,其包括步骤:

[0009] 1) 苜蓿干草粉样品加入甲醇与三氯甲烷混合溶液,震荡提取后分离出提取液,蒸馏至干,用正己烷定容,定容的体积与苜蓿干草粉质量比例为 2-3:1;苜蓿干草粉为干草磨碎后过 0.25mm 孔筛的干草粉。

[0010] 2) 定容得到的溶液与三甲基氯硅烷(TMCS)、N- 三甲基硅烷咪唑(TMSI)和无水正己烷的混合溶液进行衍生化反应,衍生化反应 8-15min 之后加入纯净水使反应终止,取上层液用硫酸钠除水,涡旋 10s 使硫酸钠和溶液充分混合,过滤;过滤可选用 0.2-05 μm 滤孔的滤膜。

[0011] 3) 过滤得到的样品中加入灭蚁灵的正己烷溶液,用气相色谱质谱联用方法测定,与标准曲线比较。灭蚁灵的正己烷溶液通常为 1000mg/L 的溶液。

[0012] 其中,所述苜蓿干草粉样品与甲醇、三氯甲烷混合溶液的质量体积比为 2:20-40; 甲醇、三氯甲烷混合溶液中甲醇与三氯甲烷体积比为 1:0.8-1.5。用甲醇、三氯甲烷混合溶液提取后没有固体杂质,可以直接旋蒸。

[0013] 其中,所述步骤 2) 中三甲基氯硅烷加入量为 25-50mg/L。三甲基氯硅烷、N-三甲基硅烷咪唑的体积比为 1:40-60。通常紫花苜蓿干草中麦角固醇含量低于 200mg/L,麦角固醇与三甲基氯硅烷衍生化反应是 1:1 摩尔比,因此控制三甲基氯硅烷过量,以完成衍生化反应。

[0014] 其中,所述步骤 2) 中衍生化反应之后加入纯净水的体积是所述定容得到的溶液体积的 1/3-1/5。

[0015] 其中,所述步骤 3) 中过滤得到的样品与灭蚁灵的正己烷溶液体积比为 40-50:1。

[0016] 所述步骤 3) 中,气相色谱质谱联用方法中,

[0017] 气相色谱条件:柱流速:0.8-1.2mL/min,进样量:1.0 μ L;进样口温度:280-300 $^{\circ}$ C,初始温度 120 $^{\circ}$ C,升温速度 28-35 $^{\circ}$ C/min;

[0018] 质谱条件:电子轰击离子源,单四极杆质量分析器,离子源温度 230 $^{\circ}$ C,四极杆温度 150 $^{\circ}$ C,传输线温度 280 $^{\circ}$ C。

[0019] 所述质谱条件中,选择特征性离子为:m/z272、237、332、404、363、468、337、378,定量离子:m/z363、272。

[0020] 其中,所述步骤 3) 中的标准曲线是以麦角固醇标准溶液为样品,用气相色谱质谱联用方法测峰面积,绘制的标准曲线。

[0021] 本发明的优良效果在于:

[0022] 本发明的方法克服了高效液相色谱对苜蓿干草不能测出特征峰的缺陷,通过合理设置萃取、分离等测定条件,能够高效、准确地得到苜蓿干草中麦角固醇的测定结果,操作简单、安全。

附图说明

[0023] 图 1 为麦角固醇的标准曲线。

具体实施方式

[0024] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0025] 样品:紫花苜蓿干草,磨成颗粒,过 0.25mm 筛的粉末。

[0026] 实施例:

[0027] 准确称取紫花苜蓿干草粉 2.0g 于 50mL 塑料离心管中,加入 30mL 色谱纯甲醇与三氯甲烷的混合溶液(V:V=1:1),220r/min 振荡提取 1h,3800r/min 离心 5min,取 15mL 上清液于一干净的鸡心瓶中,30 $^{\circ}$ C 减压蒸馏至干,用 2mL 无水色谱纯正己烷定容,待衍生。

[0028] 麦角固醇的衍生化试剂为三甲基氯硅烷(TMCS)、N-三甲基硅烷咪唑(TMSI)和无水正己烷的混合溶液,V(TMCS)/V(TMSI)=1/50,三甲基氯硅烷(TMCS)1 微升、N-三甲基硅烷咪唑(TMSI)50 微升,无水正己烷补足至 1mL。已知麦角固醇和 TMCS 的反应摩尔比为 1:1,取过量的 TMCS,即取二倍于麦角固醇经验值最大量 200ppm 的 TMCS,按 110mg/L 的加入量进行反应,加入衍生化试剂后,剧烈手摇 10min 使反应完全。加入 500 μ L 纯净水使反应终止,

取 1mL 上层液到装无水 Na_2SO_4 的 2mL 离心管中,放在涡旋机上涡旋 10s 以除水,静止后得到麦角固醇衍生物的正己烷溶液,过 0.22 μm 的滤膜(除去残余硫酸钠),取 490 μL 麦角固醇提取液于进样小瓶中,再加入 10 μL 灭蚁灵(内标)的正己烷溶液(浓度 1000mg/L),待 GC-MS 分析。

[0029] GC-MS 分析:

[0030] 1) 仪器条件 6890N-5975B inert XL EI MSD 气相色谱质谱联用仪

[0031] 气相色谱条件:载气为高纯氦气,吹扫流速 60mL/min,吹扫时间 1.5min,柱流速 1.0mL/min,进样量 1.0 μL ,不分流进样;进样口温度:290 $^{\circ}\text{C}$,色谱柱升温程序:初始温度 120 $^{\circ}\text{C}$,保持 1min,以 30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升温至 300 $^{\circ}\text{C}$,保持 6min。

[0032] 质谱条件:电子轰击离子源(EI),单四极杆质量分析器,离子源温度 230 $^{\circ}\text{C}$,四极杆温度 150 $^{\circ}\text{C}$,传输线温度 280 $^{\circ}\text{C}$ 。溶剂延迟 6min,SIM 模式选择离子(特征性离子):m/z272、237、332、404、363、468、337、378,定量离子:m/z363、272。(灭蚁灵在 272 处峰面积最大,麦角固醇在 363 处峰面积最大)

[0033] 1) 标准曲线:在牧草的空白提取液中加入一定量的麦角固醇标准溶液,经衍生化后,得到相对应麦角固醇的浓度为 1、2、5、10、20、50、100mg/L 的牧草基质标准溶液(每个处理 2 个重复),经 GC-MS 测定,以麦角固醇牧草基质标准溶液浓度对应麦角固醇衍生物峰(出峰时间 13.56min)面积与内标峰面积(内标峰面积为灭蚁灵显示的峰面积,出峰时间 10.23min)的比值作标准曲线,以峰面积的比值为纵坐标 y,样品浓度为横坐标 x(图 1),麦角固醇在 1-100mg/kg 范围内的线性回归方程为 $y=0.0064x+0.0058$,相关系数为 $R^2=0.9938$,最低检测限为 0.43mg/kg,方法定量限为 1.45mg/kg。

[0034] 2) 添加回收在空白牧草基质(紫花苜蓿干草)中添加麦角固醇标准溶液,添加浓度分别为 1、2、5、10、20、50 和 100mg/kg(每个处理 5 个重复),按上述方法进行测定,所得回收率在 70%-110% 范围内,RSD<10%(表 1),符合分析测定的要求。

[0035] 表 1 空白牧草基质中麦角固醇的添加回收率(n=5)

添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						RSD (%)
	1	2	3	4	5	平均值	
1	88.9	101.7	91.3	102.4	102.5	97.4	6.69
2	105.4	92.1	104.2	98.5	93.5	98.7	6.04
5	95.4	100.3	94.2	100.8	102.7	98.7	3.68
10	89.5	102.7	104.0	93.4	103.8	98.7	6.76
20	106.1	88.5	95.5	86.0	96.2	94.5	7.85
100	84.2	87.5	88.0	91.1	86.9	87.5	2.47

[0037] 3) 样品测试

[0038] 发霉充分的紫花苜蓿干草粉 2g(高温高湿条件,发霉 10 天),共取三个平行样,加入 30mL 色谱纯甲醇与三氯甲烷混合溶液,震荡 1h 后离心 5min,取上层液 15mL 旋蒸干,加 2mL

无水正己烷定容,衍生 10min,加入 500 μ L 纯净水使反应终止,取 1ml 上层液于无水 Na_2SO_4 中除水,上层液过 0.22 μ m 有机滤膜,取 490 μ L 提取液,加入 10 μ L 内标,待 GC-MS 测定。

[0039] 测定得到数值为 146.4ppm,与平均值偏差为 0.99%。体现了良好的测定精确度。

[0040] 没有发霉的紫花苜蓿干草粉 2g,共取三个平行样,测定得到数值为 4.1ppm,与平均值偏差为 0.80%。发酵充分的样品和完全没有发酵的样品麦角固醇含量正确体现了麦角固醇含量和真菌侵染程度关系。

[0041] 以上的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通工程技术人员对本发明的技术方案作出的各种变型和改进,均应落入本发明的权利要求书确定的保护范围内。

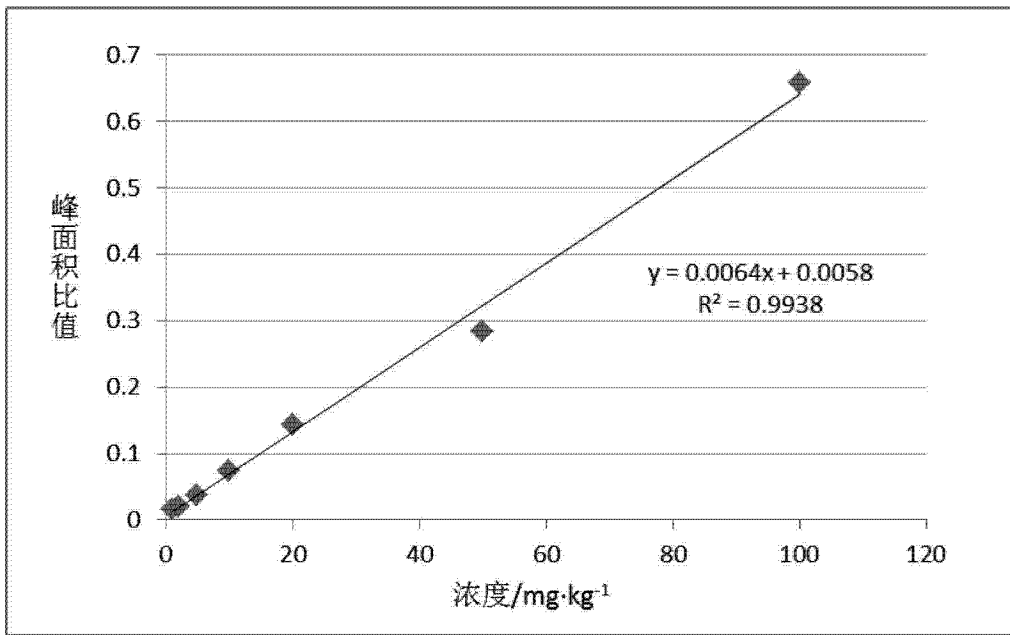


图 1