

免疫亲和净化-光化学衍生-高效液相色谱法 检测动物肝脏中六种黄曲霉毒素

陈冬东¹, 代汉霞¹, 彭涛¹, 姚佳², 王昕², 张建新², 里南³, 王雄^{3*}

(1. 中国检验检疫科学研究院, 北京 10025; 2. 西北农林科技大学, 杨凌 712100;

3. 北京中检维康生物技术有限公司, 北京 100044)

摘要: **目的** 以鸡、猪等动物肝脏为研究对象, 二氯甲烷为提取溶剂, 建立免疫亲和柱净化、高效液相色谱-光化学衍生-荧光检测器检测六种黄曲霉毒素的分析方法。**方法** 样品经提取、过滤、浓缩、复溶后经免疫亲和柱净化, 进样后采用光化学衍生器在线对黄曲霉毒素 G₁、B₁ 衍生, 荧光检测器分析 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 六种黄曲霉毒素。**结果** 在不同加标水平, 不同肝脏回收率在 70.2%~94.1% 之间, 变异系数为 2.67%~12.90%, 检测低限为 0.16 μg/kg。**结论** 该方法的准确度与精密度较高, 可以满足痕量分析要求。

关键词: 黄曲霉毒素; 肝脏; 高效液相色谱法; 免疫亲和柱

Determination of six aflatoxins in animal liver by photochemical derivative-high performance liquid chromatography combining with immunoaffinity column clean-up

CHEN Dong-Dong¹, DAI Han-Xia¹, PENG Tao¹, YAO Jia², WANG Xin², ZHANG Jian-Xin²,
LI Nan³, WANG Xiong^{3*}

(1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100025, China; 2. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100 China; 3. Beijing Clovertech Limited Company, Beijing 100044, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for detecting six aflatoxins in chicken and pig liver. **Methods** Samples were extracted, filtered, concentrated and reconstituted purified by immunoaffinity column, derivatized aflatoxin G₁, B₁ using photochemical derivatization unit online after injection. Then six aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, and M₂ were analyzed by fluorescence detector. **Results** The recoveries of samples with different spiking levels were 70.2%~94.1%. The RSD were 2.67%~12.90%. The lowest limit of quantification was 0.16 μg/kg. **Conclusion** This method is of high accuracy and precision, and can meet the requirements for trace analysis.

KEY WORDS: aflatoxins; liver; high performance liquid chromatography; immunoaffinity column

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAK08B01)

Fund: Supported by National Key R&D Program (2012BAK08B01)

*通讯作者: 王雄, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测与超微量分析化学。E-mail: wangx@clovertex.com

*Corresponding author: WANG Xiong, Senior Engineer, Beijing Clovertech Limited Company, No.56A South Street, Zhongguancun, Fangyuan Mansion, Suite B0201, Beijing 100044, China. E-mail: wangx@clovertex.com

1 引言

黄曲霉毒素是一组化学结构类似的二呋喃香豆素衍生物^[1],目前已分离鉴定出的黄曲霉毒素有17种,主要是黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂以及由B₁和B₂在体内经过羟化而衍生生成的代谢产物M₁、M₂等。黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为一类致癌物。已有动物实验表明,3 μg/kg BW剂量的黄曲霉毒素B₁就会引起雏鸭肝脏细胞DNA发生显著损伤^[2],而饲喂黄曲霉毒素9周的大鼠,在改喂常规饲料两年后即出现肝癌^[3]。动物摄入含有黄曲霉毒素的饲料后,会造成黄曲霉毒素B及其代谢物M在肝脏蓄积,食用含有黄曲霉毒素的动物肝脏,存在对人体造成伤害的风险。目前检测动物肝脏黄曲霉毒素的方法主要有固相萃取-液相色谱法^[3],薄层色谱法^[4],液相色谱-串联质谱法^[5]等。但固相萃取和薄层法存在前处理复杂,净化效果不理想,试剂消耗大,对健康有危害等问题,而液相色谱-串联质谱法虽然灵敏度高但仪器成本高,很多实验室不具备。斯洛文尼亚科学家^[6]采用硅藻土净化后过免疫亲和柱,液相色谱检测黄曲霉毒素B₁,达到较高的灵敏度,但目前未见同时检测六种黄曲霉毒素的方法。本研究采用免疫亲和柱对样品进行净化、富集,液相色谱法检测,前处理简单,净化效果和灵敏度均满足痕量分析要求。

2 材料与方 法

2.1 仪器设备

2.1.1 仪 器

高效液相色谱仪(HITACHI),荧光检测器(HITACHI),旋转混合器,氮吹仪,泵流操作架。

免疫亲和柱泵流系统:6位泵流操作架,北京中检维康技术有限公司

2.1.2 液相色谱条件

色谱柱:Cloversil ODS-C₁₈柱(4.6mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈:甲醇:水=25:20:55(v/v/v);流速:1 mL/min;光化学衍生器:Aura PHRED;激发波长/发射波长:360 nm/440 nm。

2.2 材料与试剂

2.2.1 实验材料

鸡肝、猪肝为未加工的生鲜样品,购自菜市场。

滤纸、玻璃试管、量筒,微量移液器等。

2.2.2 标准溶液及试剂

黄曲霉毒素标准溶液: M₁ 113 ng/mL; M₂ 100 ng/mL; B₁ 114 ng/mL, B₂ 34.5 ng/mL, G₁ 116 ng/mL, G₂ 31.7 ng/mL,以Sigma公司液体标准品稀释配制。黄曲霉毒素免疫亲和柱:IAC-SEP[®]AFLA,北京中检维康技术有限公司。二氯甲烷、甲醇、无水硫酸钠:分析纯。甲醇、乙腈(液相用):色谱级。

2.3 样品处理方法

2.3.1 提 取

称取5.0 g绞碎的样品,加入50.0 mL二氯甲烷,均匀震荡1 h,过滤后,滤液中加入5.0 g无水硫酸钠,再次过滤。

2.3.2 浓 缩

取10.0 mL滤液于60 °C用氮吹仪吹干浓缩至近干后,加入2.0 mL甲醇溶解。在2.0 mL甲醇溶解液中,再加入8.0 mL水,混匀。

2.3.3 免疫亲和柱操作

将10.0 mL提取液过柱,用10.0 mL水洗柱2次,最后用1.0 mL色谱级甲醇洗脱,保持液体通过亲和柱的流速为1~2滴/秒。最后在收集的洗脱液中加入1.0 mL水,混合,进HPLC分析。

2.4 添加回收实验

分别选择猪肝和鸡肝样品进行添加回收实验,样品加标水平为0.5、2.5、5.0 μg/kg。每个加标水平做3组平行实验,计算回收率和变异系数。

3 结果与分析

3.1 灵敏度

以0.5 μg/kg加标水平的样品色谱峰信噪比计算方法检出限和定量限。通过计算,鸡肝和猪肝黄曲霉毒素的检出限和定量限,见表1。

3.2 线性范围

分别加入2.5、5.0、10.0、50.0、200.0、200.0 μL黄曲霉毒素M₁、M₂和B₁、B₂、G₁、G₂混合标准品配制六种黄曲霉毒素的混合标准系列。由于标准储备液浓度不同,最终配成的标准系列M₂浓度分别为0.25、0.50、1.00、5.00、10.00、20.00 μg/kg,其他五种黄曲霉毒素需计算各自的浓度系列。由浓度从低到高的顺序进样,以黄曲霉毒素的峰面积Y对含量X

(ng)进行线性回归。在线性范围内, 六条回归方程线性良好, 相关系数 R^2 在 0.9993~0.9999。

3.3 方法的准确度与精密度

本研究选取具有代表性的动物肝脏鸡肝和猪肝

进行方法验证。样品本底中六种黄曲霉毒素均未检出。进行 0.5、2.5、5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平加标回收, 鸡肝样品六种黄曲霉毒素回收率为 70.2%~94.1%, 猪肝回收率为 72.8%~90.2%, 准确性均较好。两种基质每

表 1 方法检出限和定量限($n=3$)
Table 1 The detection limit and the limit of quantification ($n=3$)

样品基质	$\mu\text{g}/\text{kg}$	M_2	M_1	G_2	G_1	B_2	B_1
鸡肝	LOD	0.48	0.57	0.36	0.53	0.21	0.39
	LOQ	0.14	0.17	0.11	0.16	0.063	0.12
猪肝	LOD	0.45	0.59	0.33	0.54	0.16	0.41
	LOQ	0.14	0.18	0.10	0.16	0.048	0.12

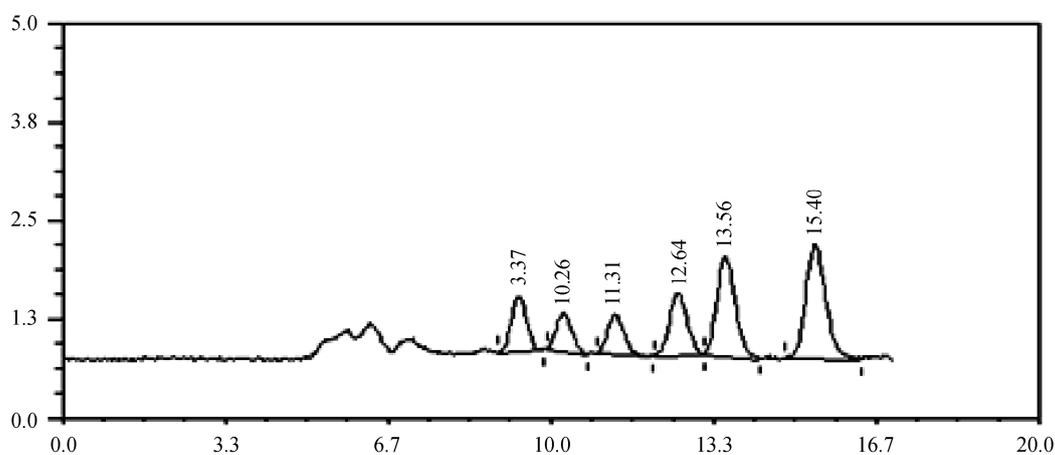


图 1 猪肝加标色谱图

Fig. 1 Chromatogram of liver

出峰顺序: M_2 、 M_1 、 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 ; 标准加入量($\mu\text{g}/\text{kg}$): 0.50、0.57、0.16、0.58、0.17、0.57

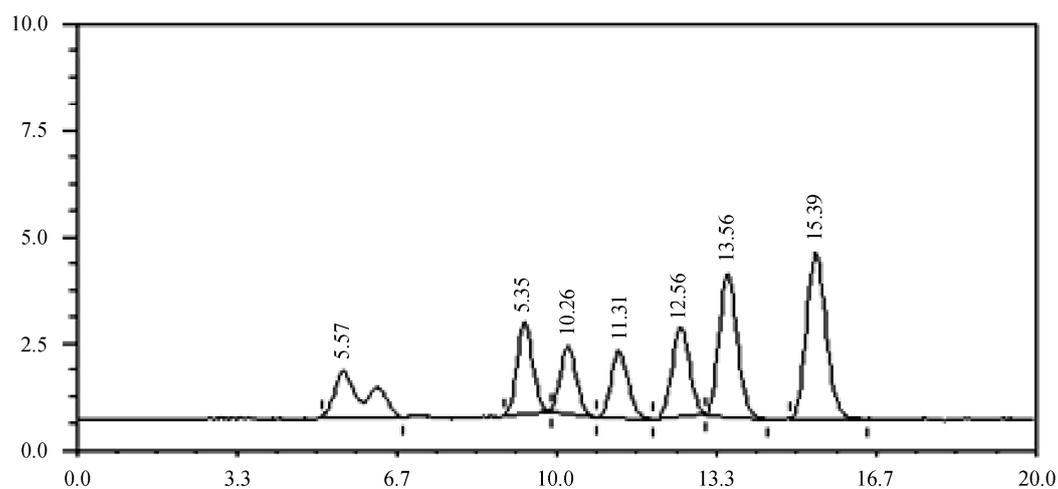


图 2 六种黄曲霉毒素混标色谱图

Fig. 2 Chromatogram of six mixed aflatoxins standards

(出峰顺序: M_2 、 M_1 、 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 : 2.00、2.28、0.64、2.23、0.68、2.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$)

表 2 样品加标回收结果 ($n=3$)
Table 2 Recovery results of spiked sample ($n=3$)

AF	M_2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				M_1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				G_2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	添加水平	平均值	回收率(%)	RSD (%)	添加水平	平均值	回收率(%)	RSD (%)	添加水平	平均值	回收率(%)	RSD (%)
鸡肝	0.50	0.36	72.0	7.22	0.57	0.40	70.2	5.49	0.16	0.13	81.3	10.2
	2.50	1.77	70.8	12.5	2.85	2.33	81.7	5.24	0.80	0.61	76.4	7.57
	5.00	3.52	70.4	10.2	5.70	4.38	76.9	3.58	1.60	1.27	79.3	6.86
猪肝	0.50	0.37	73.0	6.28	0.57	0.42	72.8	6.71	0.16	0.12	72.9	8.92
	2.50	1.91	76.2	5.25	2.83	2.23	78.8	2.67	0.80	0.60	75.0	5.74
	5.00	3.73	74.6	8.95	5.70	4.44	77.8	10.1	1.60	1.25	78.1	9.81
AF	G_1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				B_2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				B_1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	添加水平	平均值	回收率(%)	RSD (%)	添加水平	平均值	回收率(%)	RSD (%)	添加水平	平均值	回收率(%)	RSD (%)
鸡肝	0.58	0.45	77.6	6.89	0.17	0.16	94.1	6.28	0.57	0.45	78.9	5.47
	2.90	2.40	82.8	5.05	0.85	0.64	75.7	11.4	2.85	2.42	84.9	8.92
	5.80	4.25	73.3	4.46	1.70	1.36	79.8	9.12	5.70	4.02	70.6	5.91
猪肝	0.58	0.47	80.2	7.72	0.17	0.15	90.2	12.3	0.57	0.47	82.5	12.9
	2.90	2.35	81.1	6.40	0.85	0.69	81.0	5.10	2.85	2.33	81.8	6.74
	5.80	4.43	76.3	3.56	1.70	1.25	73.6	6.81	5.70	4.37	76.7	9.55

个加标水平做 3 水平重复实验, 变异系数(RSD)最大值来源于猪肝黄曲霉毒素 B_1 加标 $0.47 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时的重复实验, 为 12.9%。目前我国尚无黄曲霉毒素的验证标准, 依照欧盟发布的黄曲霉毒素检测方法的验证标准^[7], 在黄曲霉毒素 B_1 小于 $1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 加标水平, RSD_r 应小于 40%, 回收率在 50%~120%, $1.0\sim 10.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 加标水平, RSD_r 应小于 20%, 回收率在 70%~110%。黄曲霉毒素 M_1 大于 $0.05 \text{ ng}/\text{L}$ 加标水平, RSD_r 应小于 20%, 回收率在 70%~110%(表 2)。本方法验证六种黄曲霉毒素的结果均符合且优于该标准。

3.4 实际样品的检测

从市场采集了 5 个鸡肝样品和 10 个猪肝样品进行检测, 6 种黄曲霉毒素的含量均为 0。

4 结 论

本研究以具有代表性的鸡肝和猪肝为研究对象, 建立并验证了免疫亲和柱富集净化-光化学衍生-高效液相色谱-荧光法检测动物肝脏中六种黄曲霉毒素含量的方法。同以往的检测方法^[5,8]仅针对四种黄曲霉毒素相比, 该方法首次实现对肝脏中六种黄曲霉毒素的同时检测。经验证, 该方法在线性范围内相关

性良好, 方法检出限满足痕量分析要求, 在不同加标水平六种黄曲霉毒素回收率均大于 70%, 优于文献^[8]方法(68.71%~83.42%)。同水平下多次重复试验变异系数均小于 12.9%, 表现出较高的准确度与精密度。同时方法前处理简单, 不需消化处理, 样品干扰较小, 不需要特殊的质谱联用等检测仪器即可完成分析, 可满足一般实验室的检测条件。

参考文献

- [1] 张义兵, 鲍蕾, 褚庆华. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
Zhang YB, Bao L, Chu QH. Test analysis of mycotoxins in agricultural products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [2] 王瑞国, 侯水生, 苏晓鸥. 黄曲霉毒素 B_1 致雏鸭肝脏细胞 DNA 的损伤效应[J]. 中国农业科学, 2010, 43(4): 821-827.
Wang RG, Hou SS, Su XO. Study on the Induction of DNA damage in hepatic cells by aflatoxin B_1 in ducklings [J]. Chin Acad Agric Sci, 2010, 43(4): 821-827.
- [3] 许力伟, 钱耕菽, 瞿永华, 等. 苯巴比妥钠对大鼠代谢黄曲霉毒素 B_1 为 M_1 的影响[J]. 肿瘤, 1982, 2(5): 1-3.
Xu LW, Qian GS, Qu YH, et al. The effect of sodium phenobarbital on met abolism of aflatoxin B_1 to aflatoxin M_1 [J].

- Tumor, 1982, 2(5): 1-3.
- [4] GB 5009. 24—2010. 食品中黄曲霉毒素 M₁ 和 B₁ 的测定[S].
GB 5009. 24—2010. National food safety standard determination of aflatoxins M₁ and B₁ in foods [S].
- [5] 彭康年, 王远兴. 液相色谱-串联质谱法测定动物肝脏中黄曲霉毒素[J]. 分析科学学报, 2012, 28(3): 12-16.
Peng KN, Wang YX. Determination of aflatoxins in animal liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Anal Sci, 2012, 28(3): 12-16.
- [6] Gabrijela TK, Katarina V, Uros P, *et al.* Validation of the procedure for the determination of aflatoxin B₁ in animal liver using immunoaffinity columns and liquid chromatography with postcolumn derivatisation and fluorescence detection [J]. Food Control, 2007, 18(4): 333-337.
- [7] CEN (European Committee for Standardization), CR 13505: 1999, Food analysis-Biotoxins-Criteria of analytical methods of mycotoxins [S].
- [8] 史莹华, 许梓荣, 冯建蕾, 等. 高效液相色谱法测定动物组织样品中黄曲霉毒素的残留量[J]. 分析化学, 2005, 33(6): 850-852
- Shi YH, Xu ZR, Feng JL, *et al.* Determination of aflatoxin residue in animal tissues by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2005, 33(6): 850-852.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介

陈冬东, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: cdd2240@126.com

王雄, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测与超微量分析化学。

E-mail: wangx@clovertex.com