

免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生-高效液相色谱-荧光检测法快速测定食品中的黄曲霉毒素含量

马占峰*

(哈尔滨市产品质量监督检验院, 哈尔滨 150036)

摘要: **目的** 通过建立免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生-高效液相色谱-荧光检测法探索快速测定食品中的黄曲霉毒素含量的方法。**方法** 样品经甲醇-水(V:V, 7:3)提取, 免疫亲和柱净化、富集、淋洗后, 收集洗脱液, 洗脱液经 Acclaim®120 C₁₈ 柱分离, 在 254 nm 紫外光下进行光化学衍生, 用荧光检测器进行测定。**结果** 黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 检测限均小于 2 µg/kg, 加标回收率为 94.3%~108.8%。**结论** 该方法能连续操作, 节省人力, 可用于食品中黄曲霉毒素含量的测定。

关键词: 免疫亲和柱; 衍生化; 高效液相色谱; 荧光检测; 食品; 黄曲霉毒素

Fast determination of aflatoxins in food by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column with online post-column photochemical derivatization

MA Zhan-Feng*

(Harbin Product Quality Supervision and Inspection Institute, Harbin 150036, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for fast determination of aflatoxins in food by HPLC-FLD after using an immunoaffinity column with online post-column photochemical derivatization. **Methods** Samples were extracted with MeOH:H₂O (V:V, 7:3), cleaned up by immunoaffinity column, eluted with mobile phase, separated by Acclaim®120 C₁₈ column and analyzed by fluorescence detector after the photochemical derivatization. **Results** The detection limit was less than 2 µg/kg. The recoveries of aflatoxins were from 94.3% to 108.8%. **Conclusion** The method can be operated consecutively and can economize on the manpower, which is suitable for the determination of aflatoxins in food.

KEY WORDS: immunoaffinity column; derivatization; HPLC; fluorescence detection; food; aflatoxins

1 引言

黄曲霉毒素由生长在土壤和腐烂植被中的黄曲霉菌产生, 是强致癌毒素。食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂(结构式见图 1)的含量在许多国家都有明确的限定, 例如欧盟对谷物中黄曲霉毒素 B₁ 的限量

为 2.0~8.0 µg/kg, 对黄曲霉毒素限量为 4.0~15.0 µg/kg^[1]。美国 FDA 对谷物及食品中黄曲霉毒素限量为 20 µg/kg^[2]。

对于食品中黄曲霉毒素的检测, 常规方法为先进进行索氏提取, 提取液经固相萃取(SPE)柱净化后进行 HPLC 分离检测, 但该方法操作繁琐, 费时费力^[3,4]。

*通讯作者: 马占峰, 男, 高级工程师, 仪器部部长, Email: tct1998@163.com。

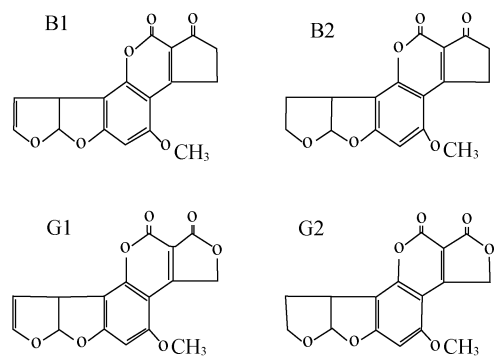


图 1 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 结构图

Fig. 1 Chemical structure of aflatoxin B1, B2, G1, G2

本文采用免疫亲和柱层析净化在线连接高效液相色谱方法,可节省时间及人力,提高样品通量,该方法操作准确,回收率高,精密度良好,检测限小于 2 μg/kg,符合欧盟、美国 FDA 对食品中黄曲霉毒素限量要求^[5]。

2 材料与方法

2.1 试剂与材料

开心果、玉米(均为市售商品);甲醇,色谱纯(迪马公司);氯化钠,分析纯;玻璃纤维滤纸(中检维康公司);黄曲霉毒素 G1, G2, B1, B2 标准品(中检维康公司)。

2.2 仪器与设备

Ultimate DGP3600 系统(美国戴安公司),由在线脱气单元的双三元梯度泵、自动进样器、六通阀的柱温箱、衍生装置、FLD 检测器组成;黄曲霉毒素免疫亲和柱(中检维康公司)。

2.3 标准溶液的配制及混标的配置

将 5 mg 黄曲霉毒素 G1, G2, B1, B2 标准品分别配制成 10 mL 储备,于 4 °C 下贮存备用;使用时取出黄曲霉毒素标准储备液,分别稀释成 20 μg/kg、4.5 μg/kg 的标准系列工作溶液,用于制作标准工作曲线。

2.4 样品前处理

准确称取磨细(粒度小于 2 mm)的试样 25.0 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 5.0 g 氯化钠和 125.0 mL 甲醇-水(7:3, V:V)的混合液,均质提取 2 min 后,用定量滤纸过滤,准确移取 15.0 mL 滤液于 30.0 mL 水中,用玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,至滤液澄清,备用。

2.5 测定条件

分析柱: Acclaim®120 C₁₈(4.6 mm×150 mm); 富集柱: 黄曲霉毒素免疫亲和柱; 进样量: 5 μL; 激发波长 365 nm, 发射波长 425 nm; 淋洗液组成及流速见表 1; 梯度洗脱条件如表 2 所示。

表 1 淋洗液组成及流速		
Table 1 Eluent composition and flow rate		
	富集泵(Left pump)	分析泵(Right pump)
流动相 A	10 mmol/L 磷酸盐+0.15 mol/L NaCl 混合缓冲盐溶液, pH=7	20%ACN+80%H ₂ O
流动相 B	H ₂ O	22.5/22.5/55 MeOH/ACN/H ₂ O
流速	1.0 mL/min	1.0 mL/min

表 2 梯度淋洗条件			
Table 2 Gradient elution conditions			
时间(min)	阀位置	富集泵(%B)	分析泵(%B)
0	1-2	0	0
5.0	1-2	0	0
5.1	1-2	100	0
10.0	6-1	100	0
10.1	6-1	0	0
14.5	6-1	0	0
14.6	1-2	0	100
27.6	1-2	0	100
27.7	1-2	0	0
40.0	1-2	0	0

经免疫亲和柱富集后的黄曲霉毒素被反冲转载至 Acclaim®120 C₁₈ 柱上进行分离。分离之后, B1、G1 在 254 nm 紫外光下进行化学衍生,再用荧光检测器检测,而紫外光对 B2、G2 无作用,黄曲霉毒素 B1 在 254 nm 紫外光照射下的衍生化反应如图 2 所示。

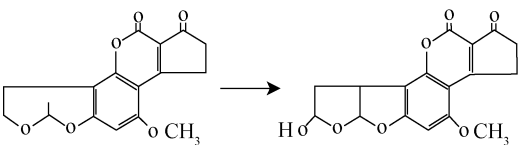


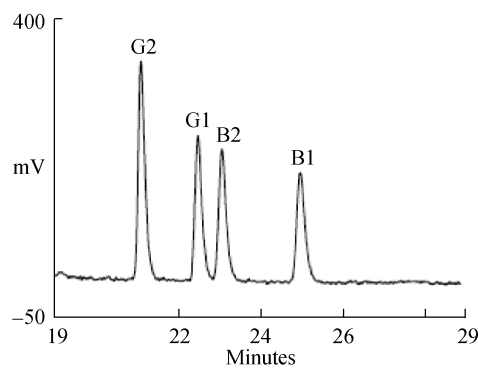
图 2 黄曲霉毒素 B1 在 254 nm 紫外光照射下的衍生化反应

Fig. 2 Derivatization reaction of aflatoxin B1 irradiated with 254 nm UV light

3 结果和讨论

3.1 标准品色谱图

本实验研制了一种全自动进样品除杂及检测的免疫亲和-高效液相色谱方法,按照 2.5 节条件进行分析,黄曲霉毒素标样 G1, G2, B1, B2 的色谱图如图 3 所示。



黄曲霉毒素 G1、B1 的浓度为 20 $\mu\text{g/L}$, G2、B2 的浓度为 6 $\mu\text{g/L}$, 进样量 5 μL

图 3 黄曲霉毒素标样 G1, G2, B1, B2 色谱图
Fig. 3 Chromatogram of aflatoxin G1, G2, B1, B2

3.2 回收率试验

本实验通过对比标准品在分析柱单柱以及在分析柱-免疫亲和柱双柱上的出峰情况, 研究了黄曲霉毒素在免疫亲和柱上的回收率、线性、精度及检出限(见表 3)。

表 3 黄曲霉毒素 G1, G2, B1, B2 的加标回收率($n=2$)
Table 3 Recoveries of aflatoxin G1, G2, B1, B2($n=2$)

黄曲霉毒素	直接进样峰面积 (mAU*min)	过柱后峰面积 (mAU*min)	回收率 (%)
G2	35.58	38.71	108.8
G1	46.67	44	94.3
B2	52.54	54	102.8
B1	72.80	72.8	100.0

3.3 线性范围和检出限

配制浓度范围为 0~20 $\mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素标准溶液, 在 2.5 节色谱条件下测定, 以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算得到回归方程, 结果见表 4。

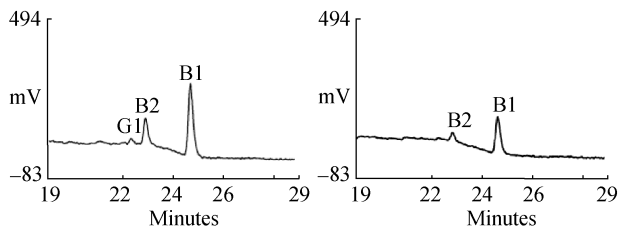
表 4 线性相关系数、精密度及检出限
Table 4 Correlation coefficients, precisions and detection limits

化合物	回归系数(R^2)	保留时间精度 (%RSD)	峰面积精度 (%RSD)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)
G2	0.997	0.11	1.28	0.6
G1	0.996	0.15	1.34	2.0
B2	0.996	0.14	1.31	0.6
B1	0.996	0.22	1.52	2.0

取混标溶液(黄曲霉毒素 G1, B1, G2, B2 的质量浓度分别为 20 $\mu\text{g/kg}$, 20 $\mu\text{g/kg}$, 4.5 $\mu\text{g/kg}$, 4.5 $\mu\text{g/kg}$), 连续进样, 记录峰面积。

3.4 实际样品的分析

杏仁和玉米样品经免疫亲和柱层析净化萃取衍生化后, 采用高效液相色谱法分析检测, 样品谱图见图 4。



左为杏仁样品的色谱图, 右为玉米样品的色谱图
图 4 样品色谱图
Fig. 4 Chromatograms of samples

4 结 论

本研究采用的免疫亲和柱层析净化提取--在线柱后光化学衍生-高效液相色谱-荧光检测食品中黄曲霉毒素的方法, 由于采用在线自动处理技术, 与传统色谱分析比较: 离线样品前处理再进行色谱分析, 可节省时间和人力, 提高样品通量, 本方法在有效浓度范围内线性、精度、选择性和回收率都很理想。

参考文献

[1] Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Level for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006, 49, L364, 5-24.

[2] Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. Industry Activities Staff Booklet. U. S. Food and Drug Administration, Washington, DC, 2000.

[3] 陈建民, 张雪辉, 杨美华, 等. 黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, (24): 1890-1894

[4] 谢广有. 黄曲霉毒素检测方法进展[J]. 职业与健康, 2011, (6): 694-695

[5] 范蓓, 李庆鹏, 哈益明. 关注黄曲霉毒素国内外限量标准, 完善食品安全保障措施[J]. 食品工业科技, 2010, (12): 26

(责任编辑: 孙媛媛)

作者简介



马占峰, 男, 高级工程师, 仪器部部长,
Email: tct1998@163.com
E-mail: tct1998@163.com