

光化学衍生-高效液相色谱法检测食品中的黄曲霉毒素

宋月, 陈颖, 白欣

大连市疾病预防控制中心理化所, 辽宁 大连 116021

摘要: **目的** 建立食品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的光化学衍生高效液相色谱荧光检测方法。 **方法** 用乙腈-水提取样品中的黄曲霉毒素, 经多功能柱净化, 以 38/62 的甲醇-水为流动相等度洗脱, 高效液相色谱分离, 光化学衍生器衍生, 荧光检测器检测。 **结果** 4 种黄曲霉毒素在 24 min 内得到良好的基线分离, 黄曲霉毒素 B1、G1 的检出限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 黄曲霉毒素 B2、G2 的检出限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在 1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加范围内, 加标回收率为 84.0%~94.6%, 相对标准偏差为 3.4%~6.5%。 **结论** 该方法灵敏度高, 操作简便, 准确可靠, 重现性好, 适于对食品中黄曲霉毒素的日常检测。

关键词: 黄曲霉毒素; 光化学衍生; 高效液相色谱

中图分类号: O657.7 文献标识码: B 文章编号: 1006-3110(2016)07-0882-03 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2016.07.037

Determination of aflatoxins in food by high performance liquid chromatography coupled with post-column photochemical derivatization

SONG Yue, CHEN Ying, BAI Xin

*Institute of Physical and Chemical Detection, Dalian Municipal Center
for Disease Control and Prevention, Dalian, Liaoning 116021, China*

Abstract: **Objective** To develop a method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with post-column photochemical derivatization. **Methods** The aflatoxins were extracted by acetonitrile-water solution, and purified by multifunctional clean-up columns. The extract was separated by HPLC with methanol-water isocratic elution, and quantified by fluorescence detection after photochemical derivatization. **Results** The baseline separation of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 was achieved within 24 minutes. The detection limits of aflatoxins B1, G1 and aflatoxins B2, G2 were 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. The average recovery of standard addition for spiked samples in 1.0~5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was 84.0%~94.6%, and the relative standard deviation was 3.4%~6.5%. **Conclusions** This method possesses several advantages, including high sensitivity, simplicity, precision and repeatability, and it is applicable to the batch analysis of aflatoxins.

Key words: Aflatoxin; Photochemical derivatization; High performance liquid chromatography

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是由黄曲霉和寄生曲霉次级代谢产生的一组化学结构类似的化合物,对人类和家畜的健康有很大的危害性。植物来源的样品中通常易污染 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2,它们具有极强的急性毒性,是目前已知毒性最强的化合物之一,并有确切的三致作用,其中 AFB1 毒性最强^[1]。GB2761-2011 规定在一般粮谷类制品中 AFB1 的限量为 5~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2],欧盟规定 AFB1 在食品中的残留限量为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,黄曲霉毒素总量(AFB1+AFB2+AFG1+AFG2)小于 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[3]。高效液相色谱法荧光检测是黄曲霉毒素分析的主要手段,为了提高检测灵敏度需要进行衍生化,常用的衍生化方法有柱前三氟乙酸衍生^[4],

柱后溴衍生化^[5],柱后碘衍生化^[6]等,这些衍生化方法操作繁琐,重现性受人为因素影响很大,且需要使用刺激性强的试剂,对检测人员的技术要求较高。国际分析化学家协会标准 AOAC Official Method 2005.08 采用柱后光化学衍生-液相色谱法检测黄曲霉毒素^[7],在样品净化过程中使用免疫亲和柱。本研究采用具有多重吸附原理的多功能柱对提取液进行净化,高效液相色谱分离-柱后光化学衍生-荧光检测,进一步降低了检测成本,具有操作简便、灵敏度高、环保等特点,适用于食品中黄曲霉毒素的日常监测。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料 黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 标准溶液(各 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,新加坡 Pribolab),甲醇、乙腈(色谱

作者简介:宋月(1980-),女,硕士,主管技师,研究方向:液相色谱检测及方法研究,E-mail:songyue116@163.com。

纯,德国 Merck),超纯水机(Milli-Q,美国 Millipore 公司),多功能净化柱(PriboFast M228 型,新加坡 Pribo-lab),移液器(10~100 μl ,德国 Eppendorf),0.22 μm 微孔滤膜。

1.2 仪器及设备 LC-10A 高效液相色谱仪配荧光检测器(日本岛津),T25 均质机(德国 IKA 公司),CF16RXII 低温高速离心机(日本 HITACHI),光化学衍生装置(美国 Aura 公司),旋涡混合器,色谱柱 XSELECT HSS T3(4.6 \times 150 mm,5 μm ,Waters 公司)。

1.3 测定方法

1.3.1 色谱条件 柱温 40 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μl ,流动相:甲醇/水=38/62 等度洗脱,流速 1.0 ml/min,荧光检测器激发波长 360 nm,发射波长 440 nm。

1.3.2 标准溶液 标准储备液 200 $\mu\text{g/L}$:用移液器分别移取 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 标准溶液 80 μl ,用乙腈溶解并定容至 10.0 ml。标准工作液 20 $\mu\text{g/L}$:分别量取标准储备液 1.00 ml 用乙腈定容至 10.0 ml。标准曲线:将标准工作溶液用流动相配制成混合标准系列,使 AFB₁、AFG₁ 浓度为 0.50、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/L}$,AFB₂、AFG₂ 浓度为 0.25、0.50、1.0、2.0、5.0、10.0 $\mu\text{g/L}$,用 HPLC 进样分析,以标准系列的峰面积对浓度分别绘制各组分的标准曲线。标准溶液色谱图见图 1。

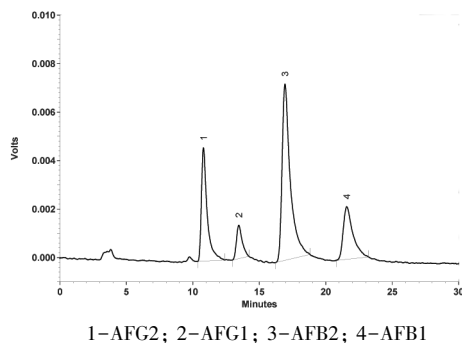


图 1 1.25 $\mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素混合标准溶液色谱图

1.3.3 样品前处理 准确称取混匀且彻底粉碎的样品 25.00 g 于 250 ml 锥形瓶中,加入 100 ml 乙腈-水(84:16),高速均质 2 min,浸泡 30 min,超声提取 30 min,10 000 rpm 离心 5 min,收集上清液。取 8 ml 上清液至多功能净化柱的玻璃管中,将净化柱缓缓推入玻璃管底部,吸取 4.0 ml 净化柱上部净化液,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹干,加入 1.0 ml 流动相溶解,涡旋混匀 30 s,经 0.22 μm 滤膜过滤,制备成待测样液。

2 结果与讨论

2.1 线性范围及检出限 在选定的实验条件下,AFB₁、AFG₁ 在 0.50~10.0 $\mu\text{g/L}$,AFB₂、AFG₂ 在 0.25

~10.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内,均具有良好的线性关系,相关系数为 0.9993~0.9998。AFB₁、AFG₁ 检出限为 0.2 $\mu\text{g/L}$,AFB₂、AFG₂ 检出限为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。当取样量为 25.00 g,提取液为 100 ml 时,AFB₁、AFG₁ 检出含量为 0.2 $\mu\text{g/kg}$,AFB₂、AFG₂ 检出含量为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.2 准确度与精密性 向 25.00 g 经检测不含黄曲霉毒素的玉米粉中(空白玉米粉)添加标准溶液,使其含量分别为 1.0、2.0、5.0 $\mu\text{g/kg}$,放置 2 h,按 1.3.3 方法处理样品,每个添加水平平行测定 5 次,回收率为 84.0%~94.6%,相对标准偏差(RSD)为 3.4%~6.5%。

2.3 色谱条件的选择 本研究考察了普通 C18 柱和 XSELECT HSS T3 型色谱柱对黄曲霉毒素的保留行为。试验发现,用普通 C18 柱分离四种黄曲霉毒素异构体时一般需要采用梯度洗脱,导致色谱图基线不稳,出峰后需要较长的平衡时间。而 HSS T3 型色谱柱增强了对极性分析物的保留,在四种毒素分离中选择性更好。经淋洗液条件优化,兼顾保留时间与分离度,选择甲醇/水=38/62 等度洗脱,此色谱条件下基线平稳,分析结果的重现性更好。

2.4 衍生化方式的选择 由于 AFB₁ 在含水的溶剂中容易发生荧光淬灭,一般需对黄曲霉毒素进行衍生化以提高检测灵敏度。柱前三氟乙酸衍生需使用刺激性强的试剂,操作繁琐,且残留的三氟乙酸可能会损害色谱柱。柱后碘衍生化、溴衍生化等化学衍生方法需配备专业的柱后衍生化系统,成本较高。本研究利用黄曲霉毒素的环状结构在紫外光照射下能产生荧光的特点,对黄曲霉毒素进行光化学衍生。AFB₁ 与流动相中的水在紫外光的作用下,生成荧光特性更强、更稳定的化合物^[3],提高了检测灵敏度,且对环境及检测者比较安全。光化学衍生器价格较低,可直接连接于色谱柱和检测器之间,流路简单,易于操作。

2.5 净化方式的选择 多功能净化柱采用多重复合填料吸附杂质,干扰物被截留在柱内,待测毒素通过净化柱,一步快速净化,时间短,效率高。与另一种常用于黄曲霉毒素净化的免疫亲和柱相比,多功能净化柱具有操作简便、价格更低、柱稳定性高等特点。本研究使用多功能净化柱对玉米、花生等不同基体的样品进行前处理,添加回收率在 84.0%~94.6%,可以满足多种基体中黄曲霉毒素的检测要求。

2.6 样品分析 采集玉米、花生制品 25 份,按上述方法对样品进行提取、净化,有 3 份样品检出 AFB₁,含量分别为 0.80、1.2 和 2.1 $\mu\text{g/kg}$,均未超过国家标准限值。

3 小 结

本研究建立了多功能柱净化-高效液相色谱柱后光化学衍生-荧光检测法检测食品中的黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2。实验表明,本方法灵敏度高,操作简便,结果准确可靠,安全环保,适于一般实验室对黄曲霉毒素的分析与监测。

参考文献

- [1] 刘立芳. 黄曲霉毒素的检测及其降解方法进展[J]. 中国酿造, 2014, 33(1): 23-26.
- [2] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量 GB2761-2011 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [3] 李军, 于一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效

液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A [J]. 色谱, 2006, 24(6): 581-584.

- [4] 张英, 蔡志斌, 郑志伟. 超高效液相色谱法同时测定油炸食品中 4 种黄曲霉毒素[J]. 实用预防医学, 2011, 18(8): 1556-1559.
- [5] 国家质量监督检验检疫总局. 牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2 的测定 液相色谱-荧光检测法 GB/T 23212-2008 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [6] 王新丽, 张玉黔. HPLC 柱后衍生同时测定黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(2): 225-226.
- [7] Waliking AE, Wilson D. Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using post-column photochemical derivatization: collaborative study [J]. J AOAC Int, 2006, 89(3): 678-692.

收稿日期: 2015-11-12

(接 790 页)

3 讨 论

近年来,通过常规免疫和强化免疫,我国麻疹报告发病率下降至历史最低水平,但 2013 年我国报告麻疹发病率有所上升,明显高于前 4 年同期水平^[10-12]。随着麻疹减毒活疫苗的广泛使用,由此带来的一系列问题逐渐出现,如免疫后出现麻疹症状,免疫不成功等^[13]。湖南省近年来通过高强度免疫计划,已使麻疹发病率降低到较低的水平,但在临床上发现一些具有接种史的麻疹疑似患者,很难判断其由麻疹疫苗株感染还是由于接种不成功感染野毒株。因此通过建立一种实验室检测方法来区别野毒株和疫苗株感染,以及评价麻疹免疫效果显得尤为重要。周剑惠等^[14]建立的 RT-PCR-RFLP 方法能从分子水平鉴定麻疹疫苗株与野毒株,给各省市陆续报道的接种麻疹疫苗后感染的病例提供了确证的技术依据。本研究利用 RT-PCR-RFLP 方法成功建立了本市诊断麻疹疫苗株与野毒株感染的实验室检测方法,为麻疹的临床诊断与清除计划提供帮助。

本文对长沙 2013-2014 年麻疹核酸阳性标本进行了疫苗株与野毒株的鉴定。对发现的 9 例具有麻疹疫苗接种史患者,进行 RT-PCR-RFLP 方法鉴定,结果为野毒株型,排除由减毒疫苗株造成的感染。进一步研究发现,9 例麻疹毒株在遗传距离上与 China 93/4 较近,基因型为 H1a。说明长沙市目前流行的麻疹毒株基因型较为稳定。流行病学资料调查发现这 9 例感染者为儿童和学生,且 4 例儿童患者疫苗接种时间与发病时间间隔不超过 3 个月,说明免疫存在一定的失败率,因此麻疹清除阶段应进行强化免疫,特别是幼儿阶段应提高接种质量^[5,15],进行第二次免疫。从麻疹接种覆盖率来看,224 例患者中仅有 9 例患者有明确

的疫苗接种史,其余为未接种或者接种史不详,因此在本市麻疹疫苗接种的普及率还有待提升。

临床上由于很难区分疫苗株和野毒株的感染,给麻疹的诊断工作带来很大困扰,RT-PCR-RFLP 由于其简单快捷的优点,给麻疹清除阶段的免疫效果评价带来极大的方便。因此,将使用该方法从分子生物学水平加大对长沙麻疹疫苗接种情况及免疫效果的监测。

参考文献

- [1] 许文波. 麻疹病毒的分子流行病学[J]. 中国计划免疫, 2001, 7(1): 57-62.
- [2] 杨宏, 余文周. 世界卫生组织关于消除麻疹和风疹证实框架文件[J]. 中国疫苗和免疫, 2013, 19(4): 372-374.
- [3] 马雷钧, 徐闻青, 徐帆洪, 等. 沪-(191)麻疹病毒疫苗株的核蛋白基因分析[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(3): 175-180.
- [4] 郝桂玲, 高学军. 接种 MV 所致麻疹 1 例报告[J]. 中国保健营养, 2012, 23(18): 3830.
- [5] 李慧, 张晓曙, 漆可发, 等. 麻疹发病与麻疹疫苗接种的病例对照研究[J]. 中国计划免疫, 2006, 12(1): 29-31.
- [6] 赵国涛, 周剑惠, 张帆, 等. 麻疹疫苗株和野毒株病毒鉴别方法应用于接种麻疹减毒活疫苗后的麻疹样病例标本鉴定[J]. 中国疫苗和免疫, 2010, 16(5): 427-429.
- [7] 周剑惠, 王爽, 陈超, 等. 中国麻疹病毒疫苗株与野毒株鉴别方法的建立[J]. 中国疫苗和免疫, 2009, 15(4): 310-315.
- [8] 周剑惠, 王爽, 陈超, 等. 限制性片段长度多态性分析方法应用于中国麻疹野病毒基因型别的鉴定[J]. 中国计划免疫, 2005, 11(1): 7-10.
- [9] 李立群, 余文, 赵智娟, 等. 应用限制性片段长度多态性分析方法鉴别 H-1 基因型麻疹病毒感染病例和麻疹疫苗相关病例[J]. 中国疫苗和免疫, 2012, 18(5): 429-431+47.
- [10] 罗美玲, 林希建, 刘浩, 等. 长沙市 2013 年麻疹流行病学特征分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2014, 25(4): 90-92.
- [11] 陈定仪. 长沙县 2007-2010 年麻疹疫情流行病学分析及强化免疫效果评价[J]. 实用预防医学, 2011, 18(8): 1442-1443.
- [12] 戴德芳, 张红, 刘运芝, 等. 湖南省麻疹实验室网络运转状况分析[J]. 现代预防医学, 2009, 36(11): 2134-2136.
- [13] 黄晖, 阮峰, 关天姬, 等. 珠海市 2005-2011 年麻疹减毒活疫苗强化免疫前后麻疹流行病学特征[J]. 实用预防医学, 2013, 20(2): 183-184.
- [14] 徐宏基, 李微, 夏建华, 等. 国产冻干麻疹腮腺炎风疹联合减毒活疫苗的接种反应和免疫原性观察[J]. 中国生物制品学杂志, 2008, 19(12): 1111-1114.
- [15] 张绍丽, 晁灵, 杨奇春. 南宁市 2010 年麻疹疫苗强化免疫后麻疹发病情况分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21(12): 1460-1461.

收稿日期: 2016-01-20