

实验技术与方法

HPLC 法测定乳制品中的黄曲霉毒素 M₁

郑荣¹ 毛丹¹ 王柯¹ 季申¹ 王雄² 沈建英³

(1. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 2. 北京中检维康技术有限公司, 北京 100044;
3. 上海博尼生物科技有限公司, 上海 200032)

摘要:目的 建立乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的 HPLC 的检测方法。方法 样品经提取、过免疫亲和柱净化后, 用高效液相色谱 - 荧光检测器进行分析。结果 黄曲霉毒素 M₁ 在 0.1 ~ 1 μg/L 范围内线性关系良好, > 0.999。回收率在 90 % ~ 110 % 之间, 定量限为 5 pg, 检测限为 2 pg。结论 该方法快速、简便、准确, 改善了现有国标 GB/T 18980—2003 操作繁琐, 测定结果易受操作影响的缺点, 可作为乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的定量测定。

关键词: 色谱法; 高压液相; 黄曲霉毒素 M₁; 乳制品

Determination of Aflatoxin M₁ in Milk and Milk Product by HPLC

ZHENG Rong, MAO Dan, WANG Ke, JI Shen, WANG Xiong, SHEN Jianying
(Shanghai Institute For Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract: Objective To establish HPLC method for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk product. **Method** Extracted samples were purified by immunoaffinity column and aflatoxin M₁. Purified sample were analyzed by HPLC with Fluorescence Detection. **Results** The linear relationship of aflatoxin M₁ was good at contents of 0.1 ~ 1 mg/L (> 0.999). The recovery rates of aflatoxin M₁ were between 90 % and 110 %. **Conclusion** HPLC method may be simple, accurate, and could overcomes the disadvantages of GB/T 18980—2003 and could be used to determine aflatoxin M₁ in milk and milk product.

Key word: Chromatography, High Pressure Liquid; Aflatoxin M₁; Dairy Products

黄曲霉毒素 M₁ 是动物摄入黄曲霉毒素 B₁ 后在体内经过羟化而生成的代谢产物, 一部分从尿和乳汁中排出, 一部分存在于动物细胞的可食部分如肝、蛋类、肾、血和肌肉中, 其中以乳最为常见。黄曲霉毒素 M₁ 的毒性和致癌性与黄曲霉毒素 B₁ 的相当, 由于牛乳及其制品是人类, 特别是婴幼儿的主要食品, 所以含有黄曲霉毒素 M₁ 的牛奶危害性很大。

目前黄曲霉毒素 M₁ 的分析一般采用薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和酶联吸附免疫法 (ELISA)。TLC 虽然简便, 但灵敏度差。常规的 HPLC 虽然比 TLC 灵敏度高, 但样品处理繁琐, 操作复杂。ELISA 方法具有重复性差、试剂寿命短需要低温保存的缺点。此外, 上述方法都具有如下共同的不足之处: (1) 在对试样进行预处理过程中, 需要使用多种有毒、异味的有机溶剂, 不仅危害操作人员健康, 而且污染环境。(2) 操作过程繁琐、时间长, 劳动强度大。(3) 检测方法灵敏度不能满足欧盟等国

的限量要求。现有国标 (GB/T 18980—2003)^[1] 虽然采用免疫亲和柱净化 - 高效液相色谱 - 荧光检测器测定牛奶和奶粉中的黄曲霉毒素 M₁, 但该方法中样品净化采用 4 ml 乙腈进行洗脱毒素, 然后用缓和的氮气将洗脱液蒸发至体积为 50 ~ 500 μl, 再用水稀释 10 倍作为供试品溶液, 经实验发现具有如下缺点: (1) 氮吹效果不容易控制, 蒸发过干会造成黄曲霉毒素 M₁ 的损失, 而标准规定的 50 ~ 500 μl 又不易准确估量。(2) 实验人员对氮吹所得浓缩液体积的估量偏差, 直接导致了供试溶液体积测定的不准确, 也就无法保证测定结果的准确可靠。(3) 对供试液成分要求较高, 当供试溶液中乙腈含量大于 10 % 时, 色谱分离效果较差。本文经实验摸索研究, 建立了回收率高、重复性好、操作简便、快速灵敏的黄曲霉毒素 M₁ 的测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料 黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱 (AflaTest @ P, 美国 VICAM 公司)、美国 Agilent 1100 高效液相色谱仪, 荧光检测器。

作者简介: 郑荣 女 硕士
通讯作者: 季申 女 主任药师

黄曲霉毒素 M₁ 标准品溶液 美国 SUPELCO 公司提供 Lot LB 34754 黄曲霉毒素 M₁。

奶粉标准物质 30 g 英国 FAPAS, 编号 T0465, 真值为 0.084 μg/kg, 允许范围为 0.047 ~ 0.121 μg/kg。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件: INERTSIL ODS-3 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 粒度 5 μm), 甲醇 + 水 (45 + 55) 为流动相, 柱温 30 °C, 流速 0.8 ml/min; 荧光检测器激发波长 365 nm, 发射波长 435 nm, 进样体积为 50 μl。

1.2.2 线性关系 将标准品溶液储备液 (浓度: 10 μg/ml, 溶剂: 甲醇) 用 50% 甲醇适当稀释后制得浓度分别为 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 μg/L 的标准品溶液, 进样分析, 结果表明, 黄曲霉毒素 M₁ 在 0.1 ~ 1 μg/L 浓度范围内线性关系良好。线性方程如下。

$$y = 8.39223 \times 10^{-1}x + 1.91515 \times 10^{-2}, \\ = 0.99909。$$

1.2.3 试样的前处理 取乳粉 10 g, 置于烧杯中, 用已预热到 50 °C 的水多次少量地加到试样中使其溶解, 待冷却后转移并定容至 100 ml (牛奶试样加热至 35 ~ 37 °C, 即可)。离心, 将 50 ml 上清液通过免疫亲和柱, 用 10 ml 水洗脱杂质, 再用 1 ml 甲醇进行

毒素洗脱, 收集洗脱液, 用水定容至 2 ml (相当于 2.5 g 乳粉), 混匀后用于 HPLC 分析。

2 结果

2.1 检测限 将标准品溶液储备液适当稀释后制得一系列不同浓度的标准品溶液, 进样分析, 以信噪比 3:1 作为检出限, 黄曲霉毒素 M₁ 的检出限为 2 pg; 以信噪比 10:1 作为定量限, 黄曲霉毒素 M₁ 的定量限为 5 pg。

2.2 精密度试验 取标准品溶液, 连续进样 6 次, 结果表明, 黄曲霉毒素 M₁ 的 RSD 为 1.1%, 精密度良好。

2.3 重复性试验 取试样 (以乳粉为例), 1 式 5 份平行样, 分别照供试品溶液制备项下方法操作, 结果表明, 黄曲霉毒素 M₁ 的 RSD 为 1.9%, 重复性良好。

2.4 稳定性试验 取重复性试验用试样, 每隔 4 h 进样分析, 记录峰面积, 结果表明, 在 0 ~ 24 h 之内, 黄曲霉毒素 M₁ 化学性质基本稳定。

2.5 回收率试验 取黄曲霉毒素 M₁ 阳性的乳粉 5 g, 加入浓度为 4 μg/L 的黄曲霉毒素标准溶液 1 ml, 照供试品溶液制备项下方法依法操作, 测定。

表 1 回收率试验

测得总量 (μg/kg)	样品本底量 (μg/kg)	测得的加入量 (μg/kg)	实际添加量 (μg/kg)	回收率 (%)	RSD (%)
1.5063	0.6698	0.8365	0.7977	104.9	
1.4708	0.6509	0.8199	0.8059	101.7	
1.4593	0.6474	0.8119	0.8023	101.2	2.0
1.3138	0.6183	0.6955	0.6621	105.0	
1.2397	0.5872	0.6525	0.6154	106.0	
1.2234	0.5799	0.6435	0.6100	105.5	

2.6 标准物质测定及国际实验室能力测试结果

取黄曲霉毒素 M₁ 阳性的奶粉标准物质 30 g (真值为 0.084 μg/kg), 1 式 3 份平行样, 分别按供试品溶液制备方法操作, 测得结果为 0.08112、0.08307、0.08361 μg/kg, 3 次测定结果均在允许范围内, 与真值相接近。采用此方法参加由英国著名实验室 FAPAS 举行的国际实验室能力测试, 以奶粉为测试样品 (Test Round 0492), 结果令人满意。

2.7 样品测定结果 从超市随机购买了 103 种牛奶, 按本文所述方法进行检验, 测定结果为: 阳性样品数 68 件, 阳性率 66%, 污染水平范围 0.004 ~ 0.1 μg/L, 中位值为 0.02 μg/L。目前我国规定黄曲霉毒素 M₁ 的限量标准为 0.5 μg/kg。^[21] 据此, 上述检测的样品均符合规定, 说明目前上海牛奶市场中黄曲霉

毒素 M₁ 污染水平在国家允许标准内。

3 讨论

本法基于免疫亲和柱对黄曲霉毒素吸附的专一性, 利用 HPLC 的良好分离效果, 达到了灵敏、准确的检测效果。与原国标方法相比较, 本文所述方法简单易行, 操作性较强, 不仅缩短了操作时间, 节省了有机试剂的使用, 还保证了测定结果的准确可靠, 重复性良好, 适合于大批量样品的快速检测。

国标方法中标准品溶液采用 10% 乙腈配制, 以 25% 的乙腈作为流动相, 在此条件下, 若乙腈含量超过 10% 则色谱峰变宽。本文采用 50% 的甲醇作为标准品溶液及供试品溶液的配制溶剂, 同时采用甲

[下转第 335 页]

《食品卫生法》第33条第4项食品卫生监督职责中明确规定,对食品生产经营企业的新建、扩建、改建工程的选址和设计进行卫生审查,并参加工程验收。由于缺乏预防性卫生监督管理办法或其他配套的规章和规范性文件,该项工作在河北甚至全国一直没有得到很好的开展。尽快出台与餐饮业预防性卫生监督相关的政策法规,可有效避免餐饮业基础设施及结构布局建成后改造难的现象,解决餐饮业卫生许可时出现的结构布局不合理,各项配套设施不完善的问题,促进餐饮业的卫生许可及监督管理工作。

强化农村餐饮业经营者、从业人员以及消费者的食品卫生安全意识,确保农村餐饮业食品卫生安全。农村餐饮业食品卫生安全问题关系到人民群众的切身利益,一直受到社会的广泛关注,要彻底改变农村餐饮业现状,就要加大对餐饮单位经营者及其从业人员的培训力度,提高他们的食品卫生安全意识,使其从被动接受监督转变为主动发现问题,自觉按照食品卫生法律法规办事。加大食品卫生安全知识的宣传力度,提高农村地区人民群众的食品卫生安全知识水平,各级卫生行政部门及卫生监督部门要深入广大农村地区,利用广播、电视、报纸等宣传途径,采用通俗易懂的形式定期开展食品卫生知识宣传活动,教育广大人民群众,不到无卫生许可证或卫生许可条件不符合卫生要求的餐饮单位就餐,使那些卫生许可条件较差的单位失去存在的土壤。

推进农村餐饮业量化分级管理工作,形成农村餐饮业优胜劣汰的良性循环机制。严格按照餐饮业卫生许可审查及经常性卫生监督量化评分表的要求去做,可进一步规范餐饮单位食品加工过程。现行的餐饮业卫生许可审查量化评分表,部分监督项目不太适合农村餐饮业使用,尽快制定适合农村餐饮单位的量化评分表,推进中、小餐饮业量化分级管理工作,逐步开展农村餐饮单位的量化分级管理,推出一些让人民群众放心的A级餐饮单位,淘汰不符合卫生条件的D级单位,进一步规范B、C级餐饮单位,既能提高卫生监督效率,又能有效促进餐饮单位的自身管理,极大改善餐饮单位的卫生状况,引导消费者明白消费,健康消费。

加大卫生监督执法力度,规范农村餐饮业卫生许可及经营行为。在基层卫生监督力量较薄弱的情况下,联合政府、工商、公安等部门,不定期地开展农村餐饮业专项整治工作,各部门在分工协作的基础上,严格按照相关法律法规办事,严谨和公正地执法,对无证单位坚决予以取缔,对不符合卫生许可条件的餐饮单位不予办证,对在监督检查中发现的不符合卫生要求的单位要求其立即整改,从根本上改善农村餐饮业的整体卫生许可状况,使其逐步进入规范和良性的发展轨道。

[收稿日期:2006-12-10]

中图分类号:R15;R127 文献标识码:C 文章编号:1004-8456(2007)04-0333-03

[上接第319页]

醇+水作为流动相,在此条件下,溶剂中甲醇的浓度对色谱峰的峰形影响较小。

原国标方法中用4 ml乙腈进行免疫亲和柱的洗脱,氮气吹至近干后用低于10%的乙腈进行溶解作为供试品溶液。该步骤中不仅用到毒性较大的乙腈,还涉及到氮吹仪的操作,而且氮气吹结果的好坏直接影响最终测定结果的准确与否。本文经研究证明,仅用1 ml甲醇进行洗脱即可将黄曲霉毒素 M_1 洗脱完全,而且洗脱液不需要进行进一步的浓缩,这样不仅避免了乙腈的使用,节省了溶剂,还省却了氮吹的步骤,既保证了测定结果的准确可靠,又使得整个操作流程的时间缩短,适合于大批量样品的检测。

采用本文所述方法,可以检测到浓度低至0.1 $\mu\text{g/L}$ 的黄曲霉毒素 M_1 ,即乳粉的最低检测限可达0.04 $\mu\text{g/kg}$,乳中的最低检测限可达0.004 $\mu\text{g/L}$ 。

由于黄曲霉毒素系毒性较强的物质,操作者需采取必要的防护措施。所有实验器皿需经次氯酸钠溶液处理后方可再次使用或丢弃。

参考文献

- [1] GB/T 18980—2003. 乳和乳粉中黄曲霉毒素 M_1 的测定-免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法[S].
- [2] GB 2761—2005. 食品中真菌毒素限量[S].

[收稿日期:2007-03-02]

中图分类号:R15;O657.72;Q949.32 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2007)04-0318-03