

- [4] O'Leary M A, Schneider J J, Isbister G K. Use of high performance liquid chromatography to measure tetrodotoxin in serum and urine of poisoned patients[J]. *Toxicol*, 2004, 44(5): 549-553.
- [5] 戴月, 陶宁萍, 刘源, 等. 基质固相分散高效液相色谱法检测河豚毒素[J]. *光谱实验室*, 2012, 29(3): 1601-1604.
- [6] Nzoghuet J K, Campbell K, Barnes P, et al. Comparison of sample preparation methods, validation of an UPLC-MS/MS procedure for the quantification of tetrodotoxin present in marine gastropods and analysis of pufferfish [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(3/4): 1584-1589.
- [7] Cho H E, Ahn S Y, Son I S, et al. Determination and validation of tetrodotoxin in human whole blood using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectroscopy and its application [J]. *Forensic Science International*, 2014, 217(1/3): 76-80.
- [8] 梁素丹, 陈剑刚, 张瑰, 等. 高效液相色谱-串联四级杆质谱法测定鱼体中河豚毒素[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(1): 27-30.
- [9] 阮丽萍, 蔡梅, 刘华良, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定烤鱼片中的河豚毒素[J]. *江苏预防医学*, 2014, 25(2): 7-9.
- [10] 曹文卿, 林黎明, 吴振兴, 等. QuEChERS/液相色谱-串联质谱法测定红鳍东方豚肉中河豚毒素[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(5): 588-593.
- [11] Rodriguez P, Alfonso A, Otero P, et al. Liquid chromatography-mass spectrometry method to detect tetrodotoxin and its analogues in the puffer fish *Lagocephalus sceleratus* (Gmelin, 1789) from European waters[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132(2): 1103-1111.
- [12] Nakagawa T, Jang J, Yotsu-Yamashita M. Hydrophilic interaction liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry of tetrodotoxin and its analogs[J]. *Analytical Biochemistry*, 2006, 352(1): 142-144.
- [13] 骆和东, 贾玉珠, 朱宝平. 固相萃取-超过滤-液相色谱/质谱联用法测定纹织螺中的河豚毒素[J]. *色谱*, 2007, 25(6): 917-921.
- [14] ZHANG X J, YAN Z Y, WANG Y, et al. Immunoaffinity chromatography purification and ultrahigh performance liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of tetrodotoxin in marine organisms[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(12): 3129-3134.
- [15] 张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 等. 免疫亲和柱净化-超高效亲水色谱-三重四级杆质谱联用法测定人尿液和血浆中河豚毒素[J]. *分析化学*, 2014, 42(11): 1611-1616.

实验技术与方法

免疫亲和柱层析-超高效液相色谱法测定动物性食品中6种黄曲霉毒素

李可, 梁肇海, 曾胜波, 温权

(深圳市福田区疾病预防控制中心, 广东深圳 518040)

摘要:目的 建立一种快速、灵敏的超高效液相色谱法, 同时测定动物性食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁ 和 M₂。方法 甲醇-水(80:20, V/V)提取粉碎或匀浆动物性食品中的黄曲霉毒素, 取部分样液经过免疫亲和柱层析净化, 经 C₁₈ 色谱柱(3.0 mm × 50 mm, 1.7 μm)分离, 荧光检测器检测。保留时间定性, 峰面积定量。结果 5 min 内完成分离, 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁ 和 M₂ 检出限分别为 0.038、0.010、0.062、0.010、0.110、0.016 μg/kg。标准曲线线性范围分别为 AFB₁: 1.28 ~ 20.4 μg/L; AFB₂: 0.32 ~ 5.08 μg/L; AFG₁: 1.26 ~ 20.2 μg/L; AFG₂: 0.31 ~ 5.00 μg/L; AFM₁: 1.25 ~ 20.0 μg/L; AFM₂: 1.25 ~ 20.0 μg/L, 相关性在 0.999 7 ~ 0.999 9 之间。不同浓度水平 6 种黄曲霉毒素平均加标回收率在 73.2% ~ 94.1% 之间, 精密度在 0.2% ~ 3.8% 之间。结论 该方法可同时、快速、高效、准确测定动物性食品中 6 种黄曲霉毒素的含量。

关键词:黄曲霉毒素; 超高效液相色谱; 动物性食品; 免疫亲和柱; 真菌毒素; 食品污染物; 检测

中图分类号: R155 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2016)03-0310-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.03.007

Determination of six kinds of aflatoxins in animal foodstuff by immunoaffinity column-ultra-performance liquid chromatography

LI Ke, LIANG Zhao-hai, ZENG Sheng-bo, WEN Quan

(Disease Control and Prevention of Futian in Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518040, China)

Abstract: Objective A simple and rapid method for determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in animal

收稿日期: 2016-01-19

基金项目: 广东省科学技术厅公益研究与能力建设项目(2015A030302008); 深圳市福田区卫生科研项目(FTWS2014059); 中山大学水产品安全教育部重点实验室开放基金项目

作者简介: 李可 女 副主任医师 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: like06@163.com

foodstuff by UPLC were developed. **Methods** Sample was extracted and diluted with methanol-water after immune affinity column chromatography purification. Components were completely separated within 5 min on a C_{18} chromatographic column (3.0 mm \times 50 mm, 1.7 μ m) with mobile phase of methanol-acetonitrile-water (gradient elution), and detected by a fluorescence detector. The retention time was used for qualitative analysis and peak area for quantitative analysis. **Results** 6 kinds of aflatoxins were completely separated into aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , M_1 and M_2 , and detection sensitivity were 0.038, 0.010, 0.062, 0.010, 0.110 and 0.016 μ g/L respectively. Standard curve were linear, the recoveries were between 73.2% -94.1%, and precision between 0.2% -3.8%. **Conclusion** The method was simple, rapid, highly sensitive, and could be recommended for simultaneous determination of 6 kinds of aflatoxins in the animal foodstuff.

Key words: Aflatoxins; ultra-performance liquid chromatography; animal foodstuff; immunoaffinity column; mycotoxin; food contaminant; test

黄曲霉毒素是粮食及饲料霉变过程中由黄曲霉菌和寄生曲霉菌代谢生成的次级代谢产物。黄曲霉毒素属于人类致癌物质(第1组)^[1],是一类天然存在的剧毒性物质,黄曲霉毒素 B_1 (AFB_1)、 B_2 (AFB_2)、 G_1 (AFG_1)、 G_2 (AFG_2)、 M_1 (AFM_1)、 M_2 (AFM_2) 是其中最主要的6种。 AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 、 AFG_2 主要污染粮食及其制品及食用油, AFM_1 、 AFM_2 主要产生存在于动物体肌肉、内脏、血液或乳汁中^[2-3]。Ogiso 等^[4] 研究报道了检测虹鳟鱼肌肉和肝脏中黄曲霉毒素。EI-Sayed 等^[5] 研究表明海鲈鱼鱼肉对饲养海水中所含的 AFB_1 具有蓄积作用,可检出残留。随着我国人民生活水平的提高,动物性食品在膳食谱中的比例明显增加。动物肌肉、内脏组织营养丰富,但同时毒素具有蓄积作用。长期食用受黄曲霉毒素污染的食品,可能造成急性中毒或慢性中毒,并造成器官损伤。

目前对黄曲霉毒素的检测方法主要采用高效液相色谱法(HPLC)^[6-12]。动物组织基质复杂,富含脂肪和蛋白质,本文建立了对猪肉、牛肉、肝脏、鱼肉的免疫亲和柱提取净化,无需衍生,超高效液相色谱(UPLC)荧光法直接测定,取得了理想结果,具有分析时间短、分析效率高、灵敏度高等优点。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

超高效液相色谱仪(配备荧光检测器,美国 Waters)、超声提取仪、漩涡混合器、高速冷冻离心机、免疫亲和柱(黄曲霉毒素总量免疫亲和柱,美国 VICAM)。 AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 、 AFG_2 、 AFM_1 、 AFM_2 混合标准溶液均购自美国 Supelco,浓度分别为 2.04、0.508、2.02、0.500、100、100 μ g/ml,甲醇、乙腈、乙酸均为色谱纯。

1.2 方 法

1.2.1 标准溶液的配制

黄曲霉毒素标准溶液: AFB_1 、 AFB_2 、 AFG_1 、 AFG_2 、 AFM_1 、 AFM_2 混合标准溶液分别用甲醇稀释

后,配制成浓度分别为 AFB_1 : 1.28、2.55、5.10、10.2、20.4 μ g/L; AFG_1 : 1.26、2.53、5.05、10.1、20.2 μ g/L, AFB_2 : 0.32、0.64、1.27、2.54、5.08 μ g/L; AFG_2 : 0.31、0.63、1.25、2.50、5.00 μ g/L; AFM_1 、 AFM_2 : 1.25、2.50、5.00、10.0、20.0 μ g/L 的混合标准系列,进样 10 μ l 进行测定。以峰面积和浓度分别为纵坐标和横坐标,拟合线性方程,计算相关系数。保留时间定性,峰面积定量。

1.2.2 样品前处理

牛肉、猪肉、肝脏匀浆,海鲜干货粉碎。称取 10.0 g 样品于 50 ml 带刻度离心管中,加入提取液 甲醇-水(80:20, V/V) 并定容至 20 ml,漩涡混匀器混匀 5 min,超声提取 30 min,5 000 r/min 高速低温离心 5 min,甲醇-水层为提取液。准确吸取 2.0 ml 提取液于另一离心管,加入 20 ml 水高速混匀为样液。将免疫亲和柱连接于固相萃取装置上,全部样液以 1~2 滴/秒的流速全部过免疫亲和小柱,再以 20 ml 纯水淋洗小柱,弃去全部流出液,将柱吹干。用 1 ml 甲醇-乙腈(1:1, V/V) 淋洗免疫亲和小柱并吹干柱子,收集 1 ml 淋洗液于 10 ml 带刻度离心管中(1 ml 以下最小刻度可准确至 0.2 ml),再用淋洗液定容至 1 ml。在淋洗液收集管中准确加入 1% 乙酸水 1 ml,漩涡混匀为待测样液。待测样液通过 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,进样量 10 μ l,注入超高效液相色谱仪测定。

1.2.3 色谱条件

色谱柱 WATERS ACQUITY UPLC C_{18} 柱(3.0 mm \times 50 mm, 1.7 μ m),柱温 40 $^{\circ}$ C,流动相:甲醇-乙腈-水(16:16:68, V/V),流速 0.65 ml/min,进样量 10 μ l,荧光检测器,激发波长 365 nm,发射波长 455 nm。

2 结果与分析

2.1 洗脱液的选择

由于超高效液相的溶剂效应更加明显,溶剂构成的差异会导致响应值出现明显的偏差。为使样

液的溶剂组成与流动相接近,减小溶剂效应的影响,同时得到更高的洗脱效率,本研究对比了使用1 ml 甲醇-乙腈(1:1, V/V)和1 ml 甲醇做洗脱液时对免疫亲和柱上保留的黄曲霉毒素标准物质洗脱效果。将 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 混合标准溶液用甲醇配制成 AFB₁: 204 μg/L, AFG₁: 202 μg/L, AFB₂: 50.8 μg/L, AFG₂: 50.0 μg/L, AFM₁、AFM₂ 各 200 μg/L 的混合标准溶液,取混合标准溶液 20 μl,加入 10 ml 纯水。按照样品处理相同步骤过柱,过膜,上机检测。以标准溶液在免疫亲和柱上的回收率做比较,可见以甲醇-乙腈(1:1, V/V)做淋洗液,回收率更高。同时样液的组成为 50% 甲醇-乙腈(1:1, V/V) + 50% 水,构成与流动相近似,减少了溶剂效应的影响,结果见表 1。图 1 为 6 种黄曲霉毒素标准色谱分离图,6 种黄曲霉毒素在本方法色谱条件下基本达到基线分离,分离度良好,5 min 内所有标准完成出峰。图中 6 种黄曲霉毒素的浓度水平分别为 AFB₁、AFG₁: 1.28 μg/L, AFB₂、AFG₂: 0.32 μg/L, AFM₁、AFM₂: 1.25 μg/L。

表 1 两种洗脱液回收率

Table 1 Standard recovery rate of different elution liquid

黄曲霉毒素	标准浓度水平 (μg/L)	洗脱后实测浓度 水平/(μg/L)		回收率/%	
		甲醇	甲醇-乙腈	甲醇	甲醇-乙腈
AFB ₁	2.04	1.359	1.973	66.6	96.7
AFB ₂	0.508	0.370	0.475	72.8	93.5
AFG ₁	2.02	1.530	1.925	75.7	95.3
AFG ₂	0.50	0.356	0.488	71.2	97.6
AFM ₁	2.00	1.76	1.90	88.0	95.0
AFM ₂	2.00	1.63	1.78	81.5	89.0

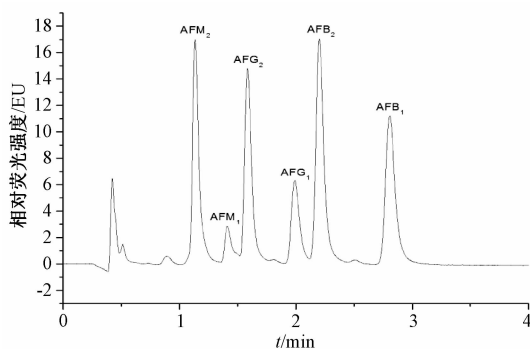


图 1 6 种黄曲霉毒素标准溶液色谱图

Figure 1 Chromatogram of 6 kinds of aflatoxins standard solution

2.2 线性关系和方法检出限

AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ 的标准曲线回归方程及相关系数见表 2。结果表明,在相应的检测范围内浓度与峰面积有良好的线性关系,6 种黄曲霉毒素 r 均 > 0.999 。

表 2 6 种黄曲霉毒素标准曲线

Table 2 Six kinds of aflatoxin standard curve

黄曲霉毒素	回归方程	相关系数 r
AFB ₁	$y = 5.09 \times 10^5 x + 3.57 \times 10^4$	0.999 9
AFB ₂	$y = 2.52 \times 10^6 x + 6.88 \times 10^4$	0.999 9
AFG ₁	$y = 2.41 \times 10^5 x + 1.78 \times 10^4$	0.999 9
AFG ₂	$y = 1.99 \times 10^6 x + 4.21 \times 10^4$	0.999 9
AFM ₁	$y = 9.04 \times 10^4 x + 1.39 \times 10^4$	0.999 7
AFM ₂	$y = 4.91 \times 10^5 x + 9.61 \times 10^4$	0.999 8

称取空白样品 10 g(精确至 0.01 g),在接近检出下限水平进行加标,按照 1.2.2 样品前处理后得到样液进机分析检测。检出峰附近 3 倍基线噪音计算检出限。AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ 的方法检出限分别为 0.038、0.010、0.062、0.010、0.110、0.016 μg/kg。图 2 为空白样品(猪肝基质)加标溶液色谱图,样品基质对标准分离无干扰。加标水平分别为 AFB₁、AFG₁: 0.51 μg/L, AFB₂、AFG₂: 0.128 μg/L, AFM₁、AFM₂: 0.50 μg/L。图 3、4 分别为猪肉、鱼肉样品基质色谱图。通过基质样品色谱图可以看到经过免疫亲和柱的处理,在待测物质出峰处,样品基质无荧光干扰物质。

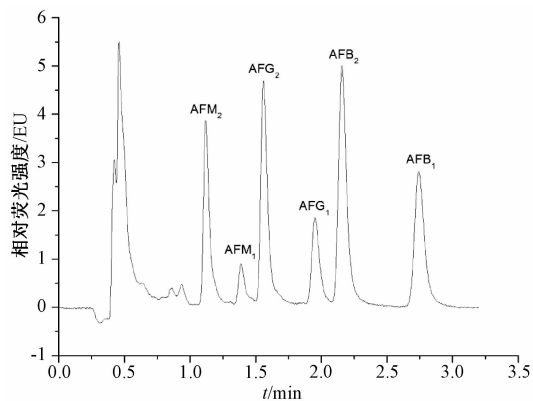


图 2 加标样品(猪肝基质)色谱图

Figure 2 Chromatogram of blank pork liver matrix standard solution

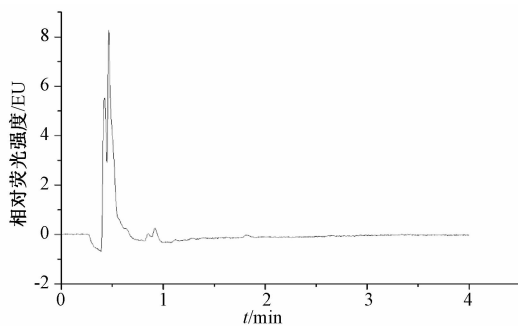


图 3 猪肉基质样品色谱图。

Figure 3 Chromatogram of blank pork sample

2.3 方法回收率和精密度

称取阴性动物肝脏平行样品 18 份,分别加入高、中、低 3 个水平的 6 种黄曲霉毒素混合标准品溶

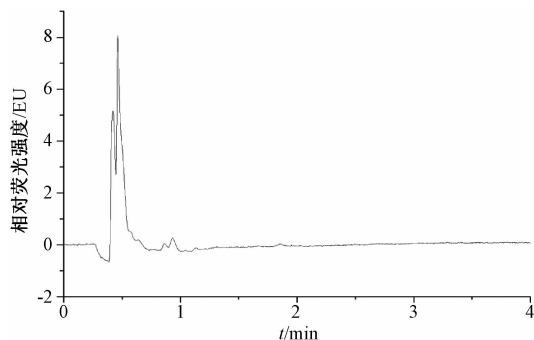


图4 鱼肉基质样品色谱图

Figure 4 Chromatogram of blank flesh sample

液(浓度见表1),每个浓度水平制备6个平行样。同样品前处理制备得到的样液按1.2.3条件进行测试,分别计算其回收率和RSD。结果见表3。

表3 6种黄曲霉毒素加标回收率和精密度($n=6$)

Table 3 Recovery rate and precision of the aflatoxins

黄曲霉毒素	添加水平 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均测定值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均加标 回收率/%	RSD /%
AFB ₁	4.08	3.18	77.9	0.4
	12.24	10.74	87.7	0.2
	16.32	14.88	91.2	0.2
AFB ₂	1.02	0.87	85.3	0.4
	3.06	2.79	91.2	0.2
	4.08	3.17	77.7	0.2
AFG ₁	4.08	3.32	81.4	0.4
	12.24	10.98	89.7	0.2
	16.32	11.94	73.2	0.2
AFG ₂	1.02	0.84	82.4	0.5
	3.06	2.80	91.5	1.3
	4.08	2.99	73.3	0.7
AFM ₁	2.00	1.64	82.0	0.9
	4.00	3.35	83.8	2.7
	8.00	7.34	91.8	3.8
AFM ₂	2.00	1.67	83.5	1.4
	4.00	3.28	82.0	3.3
	8.00	7.53	94.1	2.2

2.4 实际样品测定

抽取深圳市批发市场、农贸市场和超市在售的牛肉15份、猪肉21份、猪肝25份、海产干货24份,共85份样品进行6种黄曲霉毒素,未检出黄曲霉毒素阳性样品。

3 小结

本研究建立的免疫亲和层析-超高效液相色谱

法,操作简便,无需柱前或柱后衍生,荧光检测器直接检测动物肝脏中6种黄曲霉毒素,且检出限优于国标方法。方法的灵敏度、精确度均良好,基线平,杂质干扰小,适合肉类、肝脏、鱼肉等动物性食品中6种黄曲霉毒素同时检测。

参考文献

- [1] International Programme on Chemical Safety (IPCS) of WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants: aflatoxins. WHO Food Additives Series 40[EB/OL]. (1998-02-20)[2015-11-12]. Geneva; WHO, 1998. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v040je16.htm>.
- [2] Delialioglu N, Feza O, Didem O N, et al. Investigation of aflatoxin M₁ levels in raw and market milks in Mersin Province, Turkey [J]. Mikrobiyol Bul, 2010, 44(1): 87-91.
- [3] Corcuera L A, Ibáñez-Vea M, Vettorazzi A, et al. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B₁ and ochratoxin in rat plasma, liver and kidney [J]. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2011, 879(26): 2733-2740.
- [4] Ogiso M, Kimura A, Chikasou M, et al. A sensitive analytical method for six aflatoxins in rainbow trout muscle and liver [J]. Shkuihin Eiseigaku Zasshi, 2011, 52(3): 161-166.
- [5] El-Sayed Y S, Khalil R H. Toxicity, biochemical effects and residue of aflatoxin B (1) in marine water-reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(7): 1606-1609.
- [6] 柳洁, 何碧英. 高效液相色谱法测定食品中黄曲霉毒素的方法研究 [J]. 现代预防医学, 2002, 29(2): 137-140.
- [7] 陈思颖, 朱迪, 王永林, 等. 免疫亲和柱净化 UPLC-MS-MS 测定天麻药材中黄曲霉毒素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(1): 51-55.
- [8] 赵舰, 程莉, 胡黎黎, 等. 柱前衍生-超高效液相色谱荧光法同时测定啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ [J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 27(5): 534-537.
- [9] 张鹏, 张瑜. 高效液相色谱测定牛奶中黄曲霉毒素 M₁ [J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(6): 683-683.
- [10] 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.
- [11] 全德甫, 王晖, 孙华杰. 超高效液相色谱法检测食品黄曲霉毒素 [J]. 中外健康文摘, 2012, 9(24): 21-23.
- [12] 林裕. 高效液相色谱法测定食品中黄曲霉毒素 [J]. 中国热带医学, 2006, 6(4): 677-678.