

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

李 军¹, 于一茫¹, 田 苗¹, 王宏伟¹, 卫 锋¹, 李 莉¹, 王 雄²

(1. 辽宁省出入境检验检疫局, 辽宁 大连 116001 ; 2. 北京中检维康技术有限公司, 北京 100044)

摘要 :建立了同时检测粮谷中黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁ 和 G₂)、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 的免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱方法。样品经过甲醇-水(体积比为 80: 20)提取, 通过免疫亲和柱富集和净化, 采用 Waters Nova-Pak[®] 色谱柱(3.9 mm i. d. × 150 mm μ m), 以甲醇、乙腈和 1% 的磷酸溶液为流动相, 梯度洗脱, 柱后光化学衍生、改变波长荧光检测。黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁ 和 G₂)、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 检出限分别为 0.24 μ g/kg 和 0.5 μ g/kg, 标准曲线的线性范围分别为 0.24 ~ 6.0 μ g/kg 和 0.5 ~ 40.0 μ g/L, 在小麦、玉米、黑麦样品中, 平均加标回收率为 70.8% ~ 94.0%, 相对标准偏差为 2.79% ~ 9.38%。

关键词 :免疫亲和柱 ;光化学衍生 ;高效液相色谱 ;真菌毒素 ;粮谷

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)06-0581-04 栏目类别 :研究论文

Simultaneous Determination of Aflatoxins , Zearalenone and Ochratoxin A in Cereal Grains by Immunoaffinity Column and High Performance Liquid Chromatography Coupled with Post-Column Photochemical Derivatization

LI Jun¹, YU Yimang¹, TIAN Miao¹, WANG Hongwei¹, WEI Feng¹, LI Li¹, WANG Xiong²

(1. Liaoning Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian 116001, China ;

2. Clove Technology Group Inc., Beijing 100044, China)

Abstract : A method was developed for the simultaneous determination of aflatoxins (AFs) (B₁, B₂, G₁ and G₂), zearalenone (ZEA) and ochratoxin A (OTA) in cereal grains by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection after immunoaffinity column clean-up and post-column derivatization. Cereal grain sample was extracted with methanol-water (80: 20, v/v). The extract was purified by immunoaffinity column and the toxins were separated by reversed-phase HPLC, and quantified with fluorescence detection after photochemical derivatization. The separation was performed on a Nova-Pak[®] column (3.9 mm i. d. × 150 mm, μ m, Waters) with a linear gradient of methanol-acetonitrile-1% phosphoric acid mixture. The calibration curves for mycotoxins were made in the concentration range of 0.24 - 6.0 for AFs (B₁, B₂, G₁ and G₂), 4.0 - 100.0 for ZEA and 0.5 - 40.0 μ g/L for OTA. Recoveries of the different cereal grains (wheat, rice, rye) spiked with mycotoxins at levels ranged from 0.24 - 1.0 μ g/kg for AFs (B₁, B₂, G₁ and G₂), 4.0 - 16.0 μ g/kg for ZEA and 0.5 - 3.0 μ g/kg for OTA were from 70.8% to 94.0% and relative standard deviations were between 2.79% and 9.38%. The limits of detection were 0.24 μ g/kg for AFs (B₁, B₂, G₁ and G₂), 0.5 μ g/kg for OTA and 4.0 μ g/kg for ZEA.

Key words : immunoaffinity column ; photochemical derivatization ; high performance liquid chromatography (HPLC) ; mycotoxin ; cereal grain

目前全世界粮谷、饲料中出现真菌毒素的比例高达 25% , 除了对畜牧产业造成显著的经济损失外, 部分真菌毒素还具有致癌性和致畸胎性, 可经食物传至人类。同时真菌毒素的存在还可以降低农作物

的产量及质量。据保守估计,真菌毒素对饲料和家畜业的影响,仅在美国和加拿大每年造成的损失就有 50 亿美元。在发展中国家,食物中的真菌毒素甚至影响人口的数量,并缩短人的平均寿命。现已查明自然界存在的真菌毒素在 200 种以上,按真菌毒素的重要性及危害依次排列为:黄曲霉毒素(aflatoxin ,AF)、赭曲霉毒素 A(ochratoxin ,OTA)、单端孢霉烯族毒素(trichothecenes)、玉米赤霉烯酮(zearalenone ,ZEA)^[1]。

世界各国对上述真菌毒素的限量标准都有严格的规定。欧盟在 98/53/EC 指令中规定人类直接食用的花生中黄曲霉毒素的限量为 AFB₁ 小于 2 μg/kg,AFs(B₁ + B₂ + G₁ + G₂)小于 4 μg/kg;国际食品法典委员会提议赭曲霉毒素 A 在粮谷及其制品中不得超过 5 μg/kg;我国规定粮谷中玉米赤霉烯酮限量标准为 60 μg/kg^[2]。本文重点研究了在粮谷中同时检测黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁、G₂)、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A(结构式见图 1)的方法。

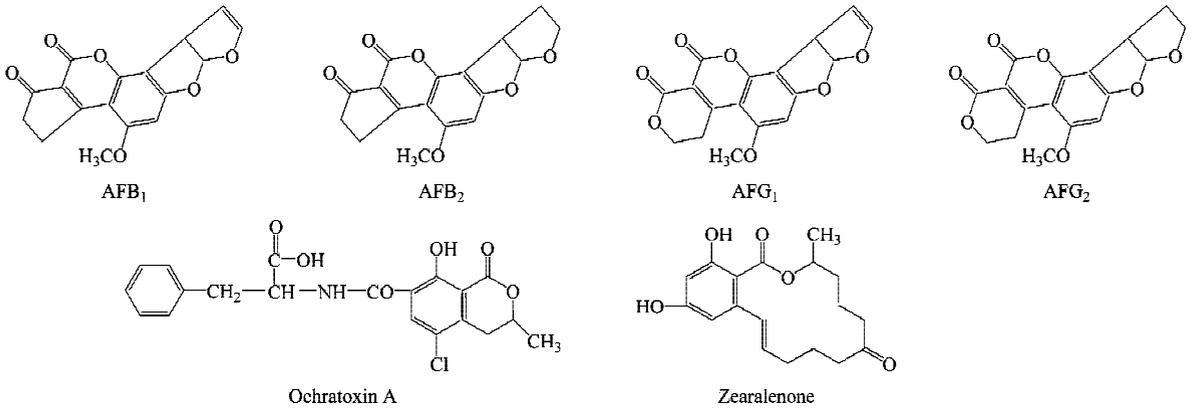


图 1 真菌毒素的结构式
Fig. 1 Mycotoxin structures

目前对食品、农产品中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 等真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法、酶联免疫吸附法、免疫亲和柱净化荧光光度法和免疫亲和柱净化高效液相色谱法、多功能柱色谱净化高效液相色谱法等^[3]。前 3 种方法定量准确度较差,而后 2 种方法只能检测单一种类的真菌毒素。本实验采用免疫亲和柱净化-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(B₁、B₂、G₁ 和 G₂)、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A。该方法简便、快速、净化效果好,各项技术指标均符合真菌毒素检测的要求,可以满足国际上对粮谷中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 的限量检测要求。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司);高速均质器;N-EVAPTM 112 氮吹仪(美国 Organomation 公司);光化学衍生池(美国 AURA 公司)和高速离心机(北京医用离心机厂);高速搅拌均质器(美国 Waring Commercial 公司);6 孔泵流架(中检维康公司);AOZ Test HPLC 免疫亲和柱(美国 Vicam 公司);玻璃纤维滤纸(英国 Whatman 公司)。

乙腈、甲醇(色谱纯,迪马公司);磷酸(优级纯);AFs(B₁、B₂、G₁、和 G₂)、OTA、ZEA 标准品(Sigma 公司);实验用水为 Millipore 制备的超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱:Waters Nova-Pak[®] C₁₈ 柱(3.9 mm i. d. × 150 mm 4 μm) (美国 Waters 公司);流动相:1%磷酸溶液(A)、甲醇(B)、乙腈(C)。梯度洗脱程序:0 ~ 20 min,流动相组成为 70% A + 15% B + 15% C(此时间段打开光化学衍生池检测黄曲霉毒素);20 ~ 30 min,流动相组成为 40% A + 30% B + 30% C(此时间段关闭光化学衍生池检测其他目标组分);流速:1 mL/min。柱温:25 °C;可变荧光检测波长:0 ~ 20 min,激发波长 365 nm,发射波长 425 nm;20 ~ 30 min,激发波长 315 nm,发射波长 425 nm。

1.3 标准溶液的配制

AFs(B₁、B₂、G₁、和 G₂)、ZEA 和 OTA 标准溶液:分别称取适量的上述标准物质溶于乙腈,配制成 AFs(B₁、B₂、G₁、和 G₂)、ZEA 和 OTA 质量浓度分别为 60.0、400.0 和 50.0 μg/L 的混合标准储备溶液。临用前,取适量体积的混合标准储备溶液用氮气吹干,再用流动相配成适当浓度的混合标准溶液。

1.4 提取与净化

准确称取 25.0 g 谷物样品于 250 mL 均质杯

中,加入 100 mL 甲醇-水(体积比为 80:20),高速均质 2 min,用槽纹滤纸过滤到干净的烧杯中。取 10 mL 滤液,加入 40 mL 水混匀,用玻璃纤维滤纸过滤。取滤液 20 mL,以 2~3 mL/min 的速率将其通过 AOZ Test HPLC 免疫亲和柱,直至空气吹出柱内的全部液体,再用 10 mL 超纯水以 2~3 mL/min 淋洗亲和柱直至空气吹出柱内的全部液体。最后用 1 mL 甲醇淋洗亲和柱,收集淋洗液于玻璃试管中,供 HPLC 测定。

2 结果与讨论

2.1 光化学衍生化反应

由于黄曲霉毒素 B₁ 在水溶液中会发生荧光淬灭,以往测定时常采用柱后碘和三氟乙酸等方法进行化学衍生^[4],实验中试剂使用较多、衍生过程复杂、操作繁琐、检测灵敏度及重现性受人为因素影响很大。本实验利用环状化合物在紫外光照射下能产生荧光这一特性,采用光化学衍生技术^[5]对黄曲霉毒素进行衍生化处理,从而实现对其进行测定的目的。黄曲霉毒素是结构相似的一组化合物,均为二呋喃香豆素的衍生物,具有芳香环并带有给电子取代基,在芳香烃上导入给电子基团—OH 会增强荧光强度。采用光化学衍生可以使流动相中的水与黄曲霉毒素 B₁ 作用,生成荧光特性更强、更稳定的化合物(aflatoxin B_{2a}, 反应示意图见图 2),从而解决了黄曲霉毒素 B₁ 在水溶液中发生荧光淬灭的问题。而玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 本身就是具有较强荧光特性的化合物,测定时不需要衍生。

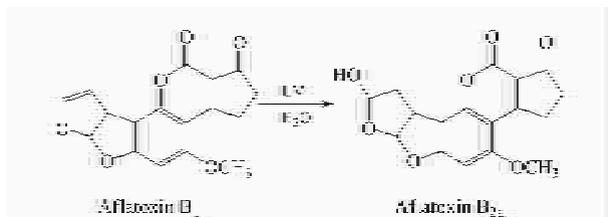


图 2 黄曲霉毒素 B₁ 的光化学衍生示意图

Fig. 2 Schematic representation of mechanism for the conversion of AFB₁ to AFB_{2a} by a photolysis reaction

2.2 免疫亲和柱的吸附特性

免疫亲和柱是 20 世纪 90 年代在分析领域得到应用的一种新技术,它是将一定量的单克隆抗体固定在合适的担体上,制成相应的免疫亲和柱。该柱具有高选择性吸附和抗干扰的特性,净化效果好,检测灵敏度高,是目前国际上较为常用的检测真菌毒素样品前处理方法之一^[6]。本文选用美国维康公司的 AOZ Test HPLC 免疫亲和柱,对粮谷样品中的

黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 进行富集净化,取得了十分理想的效果。

2.3 提取净化条件的选择

为了得到满意的提取效率,本文针对所研究的真菌毒素均具有较高的极性的特点,重点考察了极性提取液体系对提取效果的影响。分别以甲醇-水(体积比分别为 20:80,60:40,80:20)和乙腈-水(体积比分别为 20:80,60:40,80:20)为提取剂对样品进行提取,结果表明,以甲醇-水(体积比为 80:20)和乙腈-水(体积比为 60:40)的提取效率最高,回收率均在 93% 以上。考虑到甲醇的潜在毒性相对较低,因此最终选择以甲醇-水(体积比为 80:20)作为提取剂。

虽然 AOZ Test HPLC 免疫亲和柱具有选择性吸附的特性,但是样品基质中某些具有生物活性的杂质也会有少量的吸附,为消除这些杂质,本方法用水进行淋洗来消除杂质。比较了用 5,10,15 mL 水淋洗对提取结果的影响,结果表明:用 5 mL 水淋洗时杂质对测试有干扰,用 10 mL 及 15 mL 水淋洗时能有效消除杂质的干扰,故本法选用 10 mL 水淋洗。

2.4 线性范围及检出限

分别取适量的黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁ 和 G₂)、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 混合标准储备液,用甲醇配制成为系列浓度的混合标准溶液,按选定的条件测定。黄曲霉毒素(B₁、B₂、G₁ 和 G₂)、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 的质量浓度与其峰面积具有良好的线性关系,结果见表 1。在空白样品中加入标准品,根据 3 倍信噪比的峰响应值,得出方法的检出限分别为 0.24 μg/kg(AFS(B₁、B₂、G₁、和 G₂))、4.0 μg/kg(ZEA)和 0.5 μg/kg(OTA)。

表 1 真菌毒素的线性回归方程
Table 1 Regression equations of mycotoxins

Mycotoxin	Linear range/ (μg/L)	Regression equation	r
AFG ₂	0.24 - 6.0	$y = 3.3471x - 0.1132$	0.9998
AFG ₁	0.24 - 6.0	$y = 11.0073x - 0.8093$	0.9995
AFB ₂	0.24 - 6.0	$y = 1.0676x - 0.1234$	0.9991
AFB ₁	0.24 - 6.0	$y = 3.9163x - 0.4044$	0.9987
ZEA	4.0 - 100.0	$y = 0.0809x - 0.0727$	0.9995
OTA	0.5 - 40.0	$y = 2.0812x - 0.7229$	0.9948

y : peak area; x : mass concentration, μg/L.

2.5 回收率试验和精密度

在小麦、玉米和黑麦中添加表 2 中所列的 3 组浓度水平的真菌毒素,按上述实验条件进行回收试验,测得的回收率和精密度结果见表 2。标准溶液、小麦空白样品及小麦加标样品的色谱图见图 3。

表 2 粮谷样品中真菌毒素的加标回收率和精密度($n=6$)

Table 2 Recoveries and relative standard deviations of mycotoxins in cereal grains ($n=6$)

Mycotoxin	Added/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Found/($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Recovery/%			RSD/%		
		wheat	rice	rye	wheat	rice	rye	wheat	rice	rye
AFG ₂	0.24	0.18	0.19	0.17	75.0	79.2	70.8	3.51	3.25	4.72
	0.48	0.41	0.43	0.42	85.4	89.6	87.5	4.03	2.94	4.24
	1.00	0.92	0.89	0.93	92.0	89.0	93.0	2.97	3.11	5.67
AFG ₁	0.24	0.17	0.18	0.21	70.8	75.0	87.5	7.82	4.83	6.81
	0.48	0.38	0.40	0.39	79.2	83.3	81.2	5.96	5.06	4.95
	1.00	0.73	0.79	0.77	73.0	79.0	77.0	4.47	4.57	5.56
AFB ₂	0.24	0.20	0.22	0.19	83.3	91.7	79.2	4.23	4.44	2.87
	0.48	0.43	0.45	0.44	89.6	93.8	91.7	3.95	3.73	3.01
	1.00	0.88	0.94	0.85	88.0	94.0	85.0	3.66	4.09	3.55
AFB ₁	0.24	0.19	0.18	0.21	79.2	75.0	87.5	8.47	8.19	6.74
	0.48	0.41	0.39	0.44	85.4	81.2	91.7	5.21	6.78	9.38
	1.00	0.86	0.81	0.93	86.0	81.0	93.0	6.02	9.15	8.26
ZEA	4.00	3.41	3.23	3.54	85.2	80.8	88.5	4.38	5.32	4.83
	8.00	6.33	6.54	6.47	79.1	81.8	80.9	5.27	6.18	3.72
	16.00	13.79	12.97	14.02	86.2	81.1	87.6	4.19	4.76	3.13
OTA	0.50	0.42	0.40	0.39	84.0	80.0	78.0	3.86	3.87	5.21
	1.50	1.17	1.21	1.19	78.0	80.7	79.3	4.67	4.62	3.66
	3.00	2.45	2.69	2.68	81.7	89.7	89.3	4.09	2.79	6.48

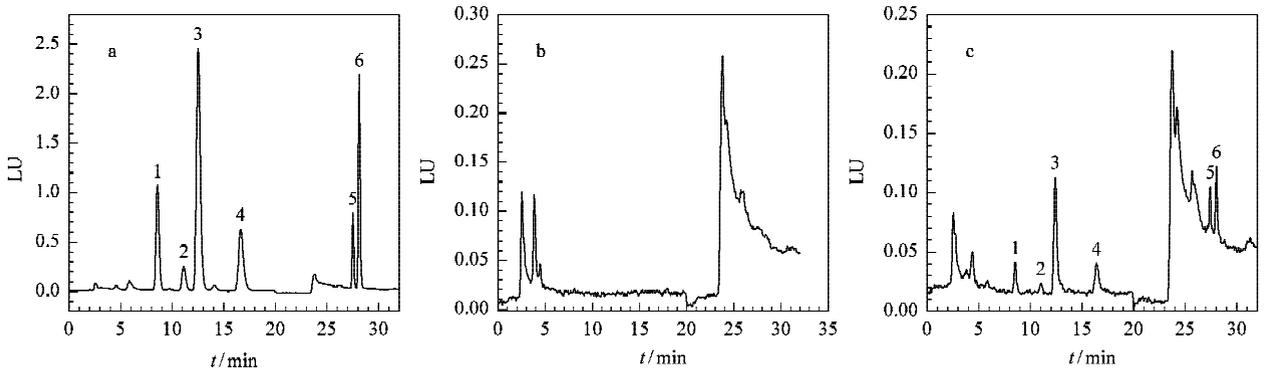


图 3 (a)混合标准溶液、(b)小麦空白样品和(c)小麦加标样品的色谱图

Fig.3 Chromatograms of (a) a mixture of standards, (b) a blank wheat sample and (c) a wheat sample spiked with AFG₂, ZEA and OTA (spiked levels :0.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for AFG₁, AFG₂, G₁ and G₂), 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for ZEA and 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for OTA)

1. AFG₂; 2. AFG₁; 3. AFB₂; 4. AFB₁; 5. ZEA; 6. OTA.

参考文献 :

[1] Wu Yongning. Present Knowledge in Food Safety. Beijing : Chemical Industry Press (吴永宁. 现代食品安全科学. 北京 : 化学工业出版社), 2003 : 279

[2] Wang Jing, Wang Lin, Huang Xiaorong. Rapid Determination Technology of Foodstuff Safety. Beijing : Chemical Industry Press (王晶, 王林, 黄晓蓉. 食品安全快速检测技术.

北京 : 化学工业出版社), 2002 : 90

[3] Yang Jiebin, Wang Jing, Wang Baiqin. Food Safety. Beijing : China Light Industry Press (杨洁彬, 王晶, 王柏琴. 食品安全性. 北京 : 中国轻工业出版社), 2002 : 145

[4] Jimenez M, Mateo J J, Mateo R. J Chromatogr A, 2000, 870 : 473

[5] Papadopoulou-Bouraoui A, Stroka J, Anklam E. J AOAC Int, 2002, 85 : 411

[6] Gobel R, Lusky K. J AOAC Int, 2004, 87 : 411