

光化学衍生-高效液相色谱法测定黄曲霉毒素含量

张春艳¹, 周孝治^{2*}, 陈菊芳³, 张文琴²

(1.湖南农业大学 食品科学技术学院,湖南 长沙 410128 ;2.广东海大集团畜牧水产研究中心,广东 广州 511400 ;
3.暨南大学 理工学院,广东 广州 510632)

摘 要:建立了一种测定饲料及饲料原料中黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 含量的光化学衍生-高效液相色谱方法。试样经甲醇与水的混合液(体积比 80:20)提取,免疫亲和柱净化、浓缩,高效液相色谱分离,在线光化学柱后衍生,荧光检测器检测,外标法定量,在优化的条件下,混合标准工作液中黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的浓度分别为 0.38 ~ 20.00 $\mu\text{g/L}$ 时,浓度与峰面积线性关系良好,相关系数为 0.999 6 ~ 0.999 9;在加标浓度 0.75 ~ 20.00 $\mu\text{g/kg}$,样品平均回收率为 81.9% ~ 98.7%,日内相对标准偏差 1.57% ~ 3.87%,日间相对标准偏差 3.01% ~ 6.87%;按信噪比 3 计算,黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的检出限分别为 0.05、0.02、0.05、0.08 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法简便快速,灵敏度高,重现性好,用于饲料及饲料原料中黄曲霉毒素的测定,效果较好。

关键词:黄曲霉毒素;饲料;饲料原料;光化学衍生;高效液相色谱

中图分类号: S816.17 ; O657.72 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)05-0569-05

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

ZHANG Chun-yan¹, ZHOU Xiao-zhi^{2*}, CHEN Ju-fang³, ZHANG Wen-qin²

(1.College of Food Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Husbandry and Aquaculture Research Center of Guangdong Haida, Guangzhou 511400, China; 3.College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography with post-column photochemical derivatization method has been developed for the simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in feed and feed stuffs. The samples were extracted with methanol-water solution (80:20, V/V), and were cleaned up by immunoaffinity columns. The separation of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were conducted by HPLC, the determination was carried out by fluorescence detector after photochemical derivatization and quantified by external standard method. Under the optimal conditions, the linear range was 0.38 ~ 20.00 $\mu\text{g/L}$, and that of the correlation coefficients were 0.999 6 ~ 0.999 9, the average recovery rates of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in feed and feed stuffs samples were in the range of 81.9% ~ 98.7% when spiked 0.75 ~ 20.00 $\mu\text{g/kg}$, inner-day RSD ranged from 1.57% to 3.87%, inter-day RSD ranged from 3.01% to 6.87%, the detection limits ($S/N=3$) of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 were 0.05, 0.02, 0.05 and 0.08 $\mu\text{g/kg}$, respectively. The method is simple, high in sensitivity and good in repeatability, which had produced satisfactory results in determination of aflatoxins in feed and feed stuffs.

Key words: aflatoxins; feed; feed stuffs; photochemical derivatization; high performance liquid chromatography

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)是由黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉菌(*Aspergillus parasiticus*)等多种真菌产生的次级代谢产物,是一类相似结构的二氢呋喃杂氧萜衍生物^[1-2],最为常见

收稿日期: 2009-12-03

基金项目: 湖南农业大学青年科学基金项目(08QN22)

作者简介: 张春艳(1981—),女,湖南浏阳人,硕士,讲师,主要从事食品检测技术和微生物研究; *通讯作者, xiaozhi_zhou@163.com

的有B1、B2、G1和G2,其中,B1的存在量和毒性最大,具有很强的致癌、致畸和致突变作用^[3-5]。黄曲霉毒素作为一种天然生物毒素,广泛存在于玉米、小麦、花生麸和DDGS等饲料原料和饲料成品中。据联合国粮农组织(FAO)估计,目前世界上每年至少有25%的谷物被霉菌毒素污染。中国饲料和原料污染霉菌毒素超标比例高达60%~70%,其中黄曲霉毒素污染最重,对畜禽危害极大^[6-7]。关于黄曲霉毒素的含量,世界卫生组织和联合国粮农组织规定食品中的最高含量为15 $\mu\text{g}/\text{kg}$,美国规定动物混合饲料中的含量不能超过20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2],欧盟规定不同用途饲料和原料中的含量为5~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。这些低限量标准的执行,对黄曲霉毒素含量的检测技术提出了更高的要求。

目前检测黄曲霉毒素含量的方法主要有薄层色谱法(TLC)^[9]、酶联免疫法(ELISA)^[10]和高效液相色谱法(HPLC)^[11-12],其中荧光检测HPLC法具有灵敏度高、稳定性好、准确可靠等优点,近年来已得到较为广泛的应用^[13]。由于黄曲霉毒素B1和G1具有荧光淬灭现象,通常需要采用柱前三氟乙酸衍生法或加碘柱后衍生法增强其荧光强度。在衍生过程中,试剂使用较多,操作繁琐,检测灵敏度和重现性受人为因素的影响很大^[11,13]。笔者采用光化学衍生-高效液相色谱法检测饲料和原料中黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的含量,样品前处理简单、干扰少,试验准确度和灵敏度高,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试验材料为猪饲料、鸡饲料、鸭饲料、虾饲料和饲料原料玉米、小麦、面粉、玉米蛋白粉、DDGS、花生麸,其样品数分别为24、18、20、15、60、21、17、16、33、21个,所有样品均由广东海大集团畜牧水产研究中心提供。

主要试剂为黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2混合标准溶液(美国Sigma公司,B1、B2、G1、G2含量分别为1 000.0、300.0、1 000.0、300.0 $\mu\text{g}/\text{L}$)和甲醇(德国Merck公司,色谱纯),试验用水为Milli-Q超纯水。

主要仪器为Agilent1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)、配荧光检测器和ChemStation色谱工作站、光化学衍生器(美国Aura公司)、AflaTest黄曲霉毒素免疫亲和柱(美国Vicam公司)、玻璃纤维滤纸(英国Whatman公司)。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

准确量取1 mL黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2混合标准溶液至10 mL棕色容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,分别配制成100.0、30.0、100.0、30.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的混合标准储备液,于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱避光保存。临用前,用体积比50:50的甲醇与水的混合溶液稀释,得到一系列混合标准工作溶液(黄曲霉毒素B1和G1的浓度分别为1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g}/\text{L}$,B2和G2的浓度分别为0.38、0.75、1.50、3.00、6.00 $\mu\text{g}/\text{L}$)。

1.2.2 色谱条件的确定及检出限的计算

色谱条件的确定:色谱柱为Agilent Eclipse XDB-C18(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm)分析柱;流动相为体积比50:50的甲醇与水的混合溶液;检测器为荧光检测器;柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流速0.8 mL/min;进样量20 μL 。

取黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2混合标准工作液,在由以上方法确定的色谱条件下进样分析,以HPLC测得的峰面积为纵坐标(y),以混合标准工作液中B1、B2、G1和G2的浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得出黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的线性回归方程、相关系数和线性范围,根据3倍信噪比计算出检出限。

1.2.3 样品前处理与净化

称取粉碎过0.45 mm筛的各试验样品25.00 g,置于250 mL碘量瓶中,加5.00 g氯化钠,加入100 mL体积比80:20的甲醇与水的混合溶液,置于恒温振荡器中120 r/min振荡30 min,静置,用定量滤纸过滤。移取10 mL滤液于50 mL容量瓶中,用纯水定容至刻度,混匀,用玻璃纤维滤纸过滤后,准确移取10 mL上述滤液,注入玻璃注射器中,调节压力,使溶液以约每秒1滴的流速通过免疫亲和柱,直至空气进入亲和柱中,然后用10 mL纯水淋洗免疫亲

和柱,弃去全部流出液,抽干小柱.在小柱加入1 mL 甲醇,将亲和柱吸附的黄曲霉毒素洗脱,流速约每秒1滴,收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中,用纯水定容至2 mL,振荡混匀后,过0.45 μm 有机滤膜,供HPLC测定.

1.2.4 回收率和精密度试验

在空白饲料、玉米和花生麸样品中添加不同浓度的黄曲霉毒素进行回收率和精密度试验,其中B1和G1分别添加2.50、10.00、20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, B2和G2分别添加0.75、3.00、6.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按本方法进行提取、净化和检测,每个浓度平行测定5次,重复5 d,

1.2.5 对实际样品的检测

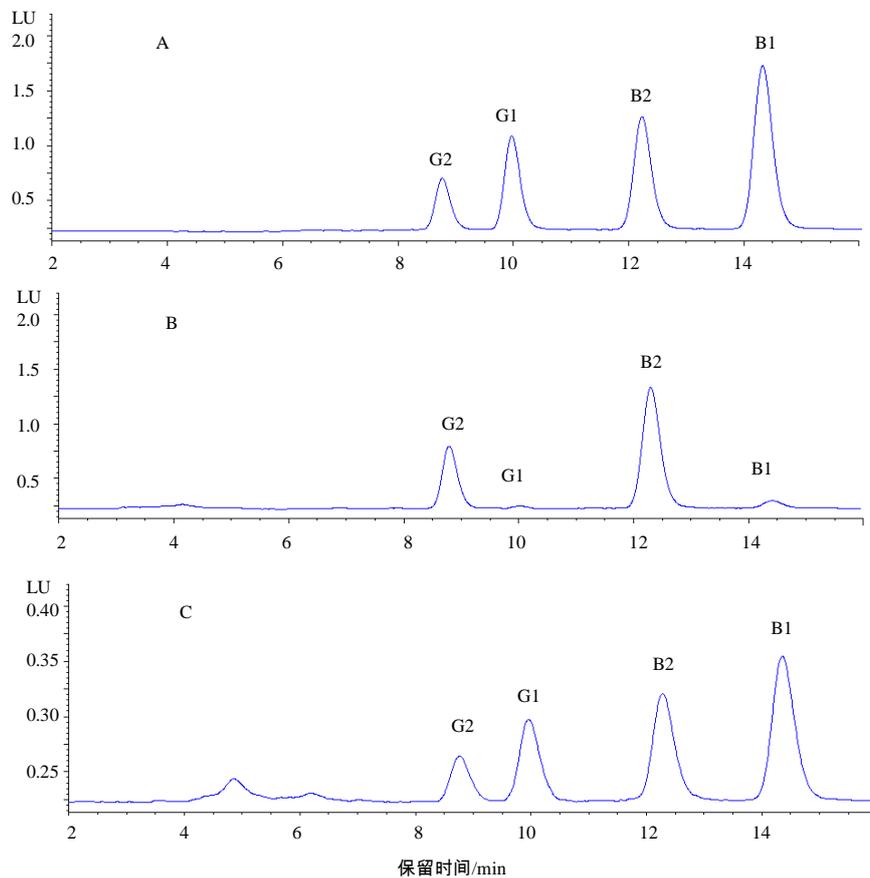
应用上述方法,对试验材料中的主要饲料和饲

料原料样品中的黄曲霉毒素进行抽样检测,得出黄曲霉毒素在样品中的检出率.

2 结果与分析

2.1 色谱条件

由图1可见,经光化学衍生后黄曲霉毒素 B1 和 G1 标准溶液的色谱图比未衍生色谱图的检测灵敏度明显提高.衍生后样品溶液色谱图中的杂峰较少,选择性强,目标峰与样品中的杂峰分离良好,色谱峰形尖锐、对称,且流动相配比简单,在此色谱条件下,黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的保留时间分别为 8.76、9.98、12.25、14.34 min .



A 衍生后的标准溶液; B 未衍生的标准溶液; C 衍生后的样品溶液.

图1 标准溶液和样品的色谱图

Fig.1 Chromatograms of standard solution and sample

黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2检测波长的选择,不同文献报道的不同^[5, 11, 14], $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 主要有360 nm/440 nm、365 nm/450 nm、355 nm/430 nm,试验过程中采用流动相作为背景溶液,对黄曲霉毒素

B1、B2、G1、G2标准液和样品溶液用荧光检测器,分别在250~380 nm和400~500 nm处对 λ_{ex} 和 λ_{em} 进行波长扫描,结果表明,黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2在 $\lambda_{ex} = 360 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$ 时,4个组分相

对吸收最大,且杂峰和基线噪音干扰少,故本试验选择 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 为360 nm/445 nm.

2.2 线性关系和检出限

由表1可知,混合标准工作液中黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2浓度为0.38~20.00 $\mu\text{g/L}$ 时,浓度与峰面积线性关系良好,相关系数为0.999 6~0.999 9,黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2检出限分别为0.05、0.02、0.05、0.08 $\mu\text{g/kg}$,表明此方法灵敏度高.

2.3 回收率和精密度

由表2可见,在加标质量浓度0.75~20.00 $\mu\text{g/kg}$,不同样品基质黄曲霉毒素添加回收率为

81.9%~98.7%,日内相对标准偏差为1.57%~3.87%,日间相对标准偏差为3.01%~6.87%,表明本方法检测的准确度和精密度良好,能满足分析的要求.

表1 黄曲霉毒素的线性回归方程、相关系数、线性范围和检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear range and detection limits of aflatoxins

黄曲霉毒素	回归方程	相关系数	线性范围 /($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	检出限 /($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
B1	$y=2.3375x+0.0149$	0.9998	1.25~20.00	0.05
B2	$y=4.9972x+0.1245$	0.9999	0.38~6.00	0.02
G1	$y=1.0845x+0.0408$	0.9996	1.25~20.00	0.05
G2	$y=1.8836x-0.0083$	0.9999	0.38~6.00	0.08

表2 不同样品中黄曲霉毒素的回收率和精密度

Table 2 Recoveries and precisions of aflatoxins in different samples

黄曲霉毒素	添加含量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	回收率/%			日内相对标准偏差/%			日间相对标准偏差/%		
		饲料	玉米	花生麸	饲料	玉米	花生麸	饲料	玉米	花生麸
B1	2.50	89.6	84.3	81.9	3.68	2.98	3.35	5.67	4.21	6.05
	10.00	83.5	86.2	86.5	3.54	2.06	2.76	4.73	4.37	5.38
	20.00	90.2	92.7	93.4	3.17	2.75	3.04	4.55	3.98	5.17
B2	0.75	91.8	89.1	86.0	2.38	2.24	2.81	3.74	3.85	4.63
	3.00	88.3	93.3	89.3	2.19	2.17	2.54	4.63	4.39	3.97
	6.00	89.8	88.6	95.6	1.95	2.33	1.57	3.05	3.78	3.01
G1	2.50	87.4	85.4	84.2	3.87	3.34	3.58	5.09	6.48	6.87
	10.00	86.9	87.2	88.7	2.09	3.65	2.79	4.78	5.76	6.03
	20.00	92.6	95.1	96.3	2.16	2.78	2.65	4.21	5.24	5.43
G2	0.75	85.9	90.7	83.8	2.63	2.39	3.04	4.87	4.32	5.28
	3.00	88.3	92.5	86.5	1.59	2.44	2.75	3.71	4.07	4.65
	6.00	90.8	98.7	88.7	2.38	1.87	2.61	4.06	3.89	4.37

2.4 对实际样品的检测结果

由表3可见,饲料和饲料原料样品都受到不同程度的黄曲霉毒素污染,不同饲料和饲料原料样品

表3 不同样品中黄曲霉毒素的检出率

Table 3 Detection rate of aflatoxins in different samples

样品	样品数/个	黄曲霉毒素检出率/%			
		B1	B2	G1	G2
猪饲料	24	75.0	37.5	8.3	12.5
鸡饲料	18	77.8	50.0	0.0	0.0
鸭饲料	20	90.0	75.0	10.0	10.0
虾饲料	15	73.3	66.7	6.7	13.3
玉米	60	60.0	53.3	10.0	33.3
小麦	21	9.5	0.0	0.0	0.0
面粉	17	5.9	0.0	0.0	0.0
玉米蛋白粉	16	87.5	43.8	0.0	6.2
DDGS	33	63.6	57.6	12.1	24.2
花生麸	21	100.0	100.0	81.0	85.7

中黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的检出率存在较大差异,从大到小依次为B1、B2、G2、G1,饲料样品中鸭饲料检出率最高,达90.0%,原料样品中花生麸检出率最高,达100.0%,表明该方法适合实际样品的测定.

3 结论与讨论

本试验采用体积比80:20的甲醇与水的混合溶液作为提取剂,在恒温振荡器中120 r/min振荡30 min,对样品中的黄曲霉毒素进行提取,然后采用含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和柱对样品进行净化,由于此抗体对黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2具有专一性,黄曲霉毒素能特效地交联在亲和柱介质中的抗体上,用水将免疫亲和柱上的杂质除

去,以甲醇通过免疫亲和柱进行洗脱,提取和净化效果良好,样品中杂质少,而且提取速度快,大大简化了样品前处理过程。

采用光化学衍生池,利用紫外光照射,使流动相光解出具有荧光特性的基团,与黄曲霉毒素B1和G1分子上的活性双键发生羟基化反应,生成荧光特性更强、更稳定的物质,可解决黄曲霉毒素B1和G1在水溶液中的荧光淬灭现象^[12]。此方法不需要特殊的化学试剂和增加额外的泵,也不需要电化学衍生池等昂贵装置,且灵敏度高,重现性好。试样中黄曲霉毒素大多采用甲醇-水、乙腈-水或氯仿等萃取剂提取,提取液经过滤、稀释后,采用C₁₈柱、硅胶柱、多功能净化柱或免疫亲和柱进行净化,去除杂质^[11-14]。本试验采用光化学衍生-高效液相色谱法结合免疫亲和柱净化检测饲料及原料中的黄曲霉毒素,样品的预处理简单快速,不受样品中其他组分的干扰,方法准确、可靠、特异性强、灵敏度高,适合饲料及饲料原料中黄曲霉毒素的快速定量分析。

参考文献:

- [1] 王海花,汪德刚,张晓峰.黄曲霉毒素检测技术的研究进展[J].食品研究与开发,2006,27(4):176-178.
- [2] 冯靓,蔡增轩,谭莹,等.HPLC同时测定食品中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2[J].中国卫生检验杂志,2007,17(3):511-513.
- [3] Jaimez J, Fente C A, Vazquez B I. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis[J]. Journal of Chromatographic : A, 2000, 882 (12) : 1-10.
- [4] Hasan A, Abdurrahman A, Sahan S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in ankara[J]. Food Control, 2005, 16 : 263-266.
- [5] 马良,李培武,张文.高效液相色谱法对农产品中黄曲霉毒素的测定研究[J].分析测试学报,2007,26(6):774-778.
- [6] 王若军,苗朝华,张震雄,等.中国饲料及饲料原料受霉菌毒素污染的调查报告[J].饲料工业,2003,24(7):58-59.
- [7] 敖志刚,陈代文.2006—2007年中国饲料及饲料原料霉菌毒素污染调查报告[J].中国畜牧兽医,2008,35(1):251-255.
- [8] 夏红民,岳宁,张鹏.出入境农产品安全卫生检验的重要对象——真菌毒素[J].检验检疫科学,2000,10(5):56-59.
- [9] Lin L M, Zhang J, Wang P. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatography methods[J]. Journal of Chromatographic : A, 1998, 815: 3-20.
- [10] Aycicek H, Aksoy A, Saygi S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in ankara, turkey[J]. Food Control, 2005, 16 : 263-266.
- [11] Andri P B, Joerg S, Elke A. Comparison of two post-column derivatization systems, ultraviolet irradiation and electrochemical determination for the liquid chromatographic determination of aflatoxin in food [J]. Journal of Chromatographic : A, 2002, 85(2) : 411-416.
- [12] Waltking A E, Wilson D. Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using post-column photochemical derivatization: collaborative study[J]. Journal of AOAC International, 2006, 89(3) : 678-692.
- [13] 王君,刘秀梅.食品中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的高效液相色谱测定方法[J].中国食品卫生杂志,2005,17(6):498-500.
- [14] 张雪辉,陈建民.高效液相色谱法与荧光光度法检测中药材中黄曲霉毒素的比较[J].药学学报,2004,39(12):997-1000.

责任编辑:王赛群

英文编辑:罗文翠