

高效液相色谱法对农产品中黄曲霉毒素的测定研究

马 良, 李培武, 张 文

(中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉 430062)

摘 要: 采用免疫亲和方法进行样品前处理, 用甲醇 - 乙腈 - 水三元流动相体系分离黄曲霉毒素, 氯化汞溶液在线衍生, 荧光检测器检测, 建立了新型的高效液相色谱柱后衍生测定黄曲霉毒素 (B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 、 M_1) 的方法。该方法在 13 min 内完成测定, 线性关系良好, 5 种黄曲霉毒素的线性相关系数 r 值均大于 0.999。方法成功应用于花生、花生制品、大米、玉米等农产品。对样品进行不同水平的加标回收实验, 回收率为 83% ~ 100%, 相对标准偏差 1.51% ~ 4.98% ($n = 7$), B_1 检出限 ($S/N = 3$) 和定量下限 ($S/N = 10$) 分别达到了 0.05 $\mu\text{g/kg}$ 和 0.17 $\mu\text{g/kg}$ 。

关键词: 黄曲霉毒素; 高效液相色谱; 柱后衍生; 氯化汞

中图分类号: O657.72; S895.136 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2007)06 - 0774 - 05

Determination of Aflatoxins in Agricultural Products by High Performance Liquid Chromatography

MA Liang, LI Pei-wu, ZHANG Wen

(Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China)

Abstract: A new post-column derivatization method for the determination of aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , and M_1) by HPLC was developed. Sample was purified by immuno-affinity column and full separation of five aflatoxins could be achieved by the mobile phase composed of methanol - acetonitrile - water (22 : 18 : 60 by volume) within 13 min. Aflatoxins were enhanced by mercury chloride solvent on-line and detected by fluorescence detector. The calibration curve was linear in the range of 0.5 - 60 $\mu\text{g/kg}$ and the average correlation coefficients was of 0.9995. The new method was successfully applied to the analyses of aflatoxins in contaminated peanut, peanut products, rice, corn. Recoveries of aflatoxins spiked to peanut samples at different concentration levels were 83% - 100% with relative standard deviations of 1.51% - 4.98% ($n = 7$). The limit of detection ($S/N = 3$) and the limit of quantification ($S/N = 10$) of aflatoxin B_1 were 0.05 $\mu\text{g/kg}$ and 0.17 $\mu\text{g/kg}$, respectively.

Key words: aflatoxins; HPLC; post-column derivatization; mercury chloride

黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT) 毒性极强, 据报道能致癌、致畸、致诱变^[1-4], 其化学性质稳定, 污染范围广^[5-7], 威胁人类健康, 影响地区经济^[1], 一直是农产品质量和食品安全中的重大问题之一。世界上很多国家都对 AFT 尤其是 B_1 设定了严格的限量标准。

现有的 AFT 检测方法通常利用其荧光特性进行定量检测。由于 AFT 分子在相同分析条件下荧光发射强度不同^[8-10], 荧光检测器对 AFT 结构中双呋喃环上的具有饱和结构的 B_2 、 G_2 灵敏度高, 而对 AFT 结构中双呋喃环上具有不饱和双键的 B_1 、 G_1 、 M_1 灵敏度较低^[7], 因此必须提高 AFT 尤其是 B_1 、 G_1 、 M_1 的荧光量子的产量^[11]。一般通过强氧化剂 (三氟乙酸等) 或卤族元素及其衍生物 (碘、溴、过溴化溴化吡啶等) 在柱前或者柱后进行衍生得到较强的荧光^[7,11]。但由于这些衍生试剂具有腐蚀性、挥发性, 衍生方法存在着稳定性差或耗时等各种不足, 研究反应快速而稳定的新型荧光增强剂, 提高光学系统灵敏度是研究黄曲霉毒素检测技术的重要发展方向^[8,12-13]。

本文首次将过渡金属离子作为衍生试剂与高效液相色谱相结合, 用于黄曲霉毒素的荧光分析。所

收稿日期: 2006 - 12 - 20; 修回日期: 2007 - 02 - 08

基金项目: 国家科技部重点资助项目 ([2006]G003700); 湖北省及武汉市、中国农业科学院科技攻关项目 (2006AA201B11, 200720422135)

作者简介: 马 良 (1979 -), 女 (满族), 辽宁瓦房店人, 博士; 通讯作者: 李培武, Tel: 027 - 86812943, E-mail: peiwuli@oilcrops.cn

研究的升汞溶液柱后衍生试剂反应快速稳定,无腐蚀性,与其他荧光增强剂的衍生体系相比,本文建立的高效液相色谱柱后衍生方法大大提高了检测灵敏度,回收率高,重复性好,衍生条件简单、快速稳定、干扰少,适用于多种农产品和食品中黄曲霉毒素的检测和质量控制,对黄曲霉毒素的高灵敏度检测具有积极的作用。

1 实验部分

1.1 化学试剂

黄曲霉毒素标准溶液(溶剂苯-乙腈体积比 98:2)购于 Sigma 公司。所用有机溶剂均为色谱纯,天津博迪化学试剂公司,科密欧牌。纯水为 Milli-Q A10 System Millipore 生产。氯化汞为分析纯(贵州铜仁永试剂公司)。进入 HPLC 系统分析前所有溶液均用 0.45 μm 滤膜过滤。

1.2 仪器

Hitachi F-4500 荧光分光光度计(日立,日本);Agilent 1100 系列高效液相色谱仪配荧光检测器(安捷伦公司,美国);柱后衍生器(Pickering 公司,美国)。SG-280 食品处理机(达康公司,天津);HQ-60 漩涡振荡器(北方同正生物技术发展公司,北京),KQ-50 超声波仪(昆山超声仪器有限公司,昆山);AflaTest P 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱(维康公司,美国)。

1.3 样品溶液的制备

按照 GB 5491-1985 取样方法取样,称取 5.0 g 样品,用 15 mL 体积分数为 70% 甲醇(含有 40 g/L NaCl)溶液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 超声波中水浴提取 5 min,其中每隔 1 min 漩涡振荡 1 次。提取物用定量滤纸过滤后取 4 mL 提取液加入 2 mL 石油醚脱脂,充分混匀后静置。取 3 mL 上清液加入 8 mL 纯水稀释,用 0.45 μm 滤膜过滤后,取 9 mL 稀释液以 2 mL/min 的速率通过免疫亲和柱,然后用 7 mL 纯水分成 3 次淋洗亲和柱,最后用 1 mL 色谱纯甲醇对亲和柱上富集的黄曲霉毒素进行洗脱,收集,准备 HPLC 分析。

1.4 仪器条件

色谱分离条件:ZORBAX 80A Extend-C18 色谱柱,4.6 mm $\times$ 150 mm $\times$ 5 μm (Agilent 公司);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;甲醇-乙腈-水(体积比 22:18:60)三元流动相等度洗脱分离,流动相流速 0.8 mL/min;荧光检测器检测($\lambda_{\text{激发}}=365\text{ nm}$, $\lambda_{\text{发射}}=440\text{ nm}$);进样量 10 μL 。

柱后衍生泵与 HPLC 连接,衍生试剂流速 0.4 mL/min,混合反应池温度 30 $^{\circ}\text{C}$,升汞溶液浓度为 0.01 mol/L。

2 结果与讨论

2.1 激发、发射波长的选择

室温下,在入射光和发射光狭缝宽度均为 5 nm 的条件下,用 F-4500 荧光分光光度计测定了黄曲霉毒素和衍生产物的激发光谱和发射光谱(图 1A、B)。

图 1A 是 AFB₁ 及其衍生产物在 250~500 nm 波长下的激发光谱,可以看出,AFB₁ 最大吸收峰及最大激发波长在 360 nm 左右,AFB₁-Hg 反应物体系的激发光谱的谱带形状与 AFB₁ 本身的谱带形状很相似,但是激发光谱谱带的荧光强度在 365 nm 处明显增强,因此选择 365 nm 为荧光激发波长。

在 365 nm 紫外光照激发下,扫描 AFB₁ 及其 Hg²⁺ 反应物 300~550 nm 波长范围内的荧光发射光谱见图 1B,可以看出二者的荧光发射光谱谱带形状也很相似。比较加入升汞溶液

前后的谱带位置,发现荧光发射谱带发生了红移,AFB₁-Hg²⁺ 反应物的荧光发射峰由 AFB₁ 430 nm 左右的宽带发射峰红移到 440 nm 左右,而且所发射的荧光强度明显增强了数倍,因此选择 440 nm 作为荧光发射波长,提高检测的灵敏度和选择性。

对 AFB₂、AFG₁、AFG₂、ARM₁ 作相同的分析,AFG₁、ARM₁ 与 AFB₁ 的光谱行为类似,兼顾几种

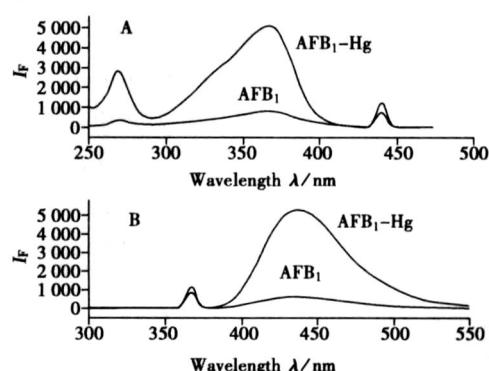


图 1 AFB₁ 及 AFB₁-Hg²⁺ 反应物的激发光谱(A)与发射光谱(B)

Fig. 1 Excitation spectra(A) and emission spectra(B) of AFB₁ and AFB₁-Hg²⁺

AFT 的荧光光谱强度及检测灵敏度, 选择 365 nm 作为荧光检测的激发波长, 440 nm 作为荧光发射波长。

2.2 色谱条件的选择

流动相组成会影响分离度、衍生反应的反应速率、产物以及产物的荧光发射强度。研究发现在甲醇-水二元流动相中加入乙腈, 可以大大提高分离度 (尤其是对 M_1 和 G_2 的分离)。在较低的极性条件下, 黄曲霉毒素的分离不是很理想, 而较高的极性条件下出峰的保留时间延迟。经多次实验最终确定流动相为甲醇-乙腈-水的体积比为 22:18:60, 在 13 min 内可以得到满意地分离 (图 2)。

2.3 衍生机理初探

从激发光谱 (图 1A) 中可以看出, AFB_1-Hg^{2+} 反应物体系的激发光谱的谱带形状与 AFB_1 本身的谱带形状很相似, 无显著变化, 这种光谱特征说明 AFB_1 和 Hg^{2+} 可能形成了配合物, 而且配合物与配体 (AFB_1) 在紫外光照后发生了相同的结构变化, 最终结构大致相似; 而 AFB_1-Hg^{2+} 反应物的激发光谱谱带在 365 nm 处的荧光强度明显增强, 并有很轻微的红移现象, 则说明 AFB_1-Hg^{2+} 反应发生了减色效应和化合物的结构变化, 可能是共轭体系增加, 使共振结构加强或引入助色团取代基等; 从荧光发射光谱 (图 1B) 可以看出 AFB_1 和 AFB_1-Hg^{2+} 反应物的荧光发射光谱谱带形状也很相似, 比较加入 Hg^{2+} 前后的谱带位置发现发射谱带发生了红移, 也说明 AFB_1 和 Hg^{2+} 很大可能发生了配位反应, 生成了 AFB_1-Hg^{2+} 配合物, 而且在较低的 365 nm 激发光能照射下所发射的荧光强度大大高于 AFB_1 本身, 而且荧光强度明显增强了数倍, 推测反应物体系中刚性结构得以加强或者共轭体系增加, 使得发出的荧光量子数增多, 而激发光谱中的减色效应造成其吸收激发光量子数减少, 根据荧光效率计算公式, 荧光效率 $\varphi_F = N_{\text{发射}}/N_{\text{吸收}}$, 式中 $N_{\text{发射}}$ 是发出的荧光量子数, $N_{\text{吸收}}$ 是吸收激发光的量子数, 判断 AFB_1-Hg^{2+} 配合物在吸收了特征频率的辐射之后, 相对提高了荧光量子产率, 具有较高的荧光效率, 使荧光响应值大大增强。

2.4 衍生反应条件的确定

2.4.1 衍生试剂流速对荧光强度的影响 图 3 比较了反应系统中衍生试剂流速对黄曲霉毒素荧光值的影响。

由于稀释作用, 不参加衍生的 B_2 、 G_2 的荧光值随着流速的增加呈下降趋势。而具有不饱和结构的黄曲霉毒素 B_1 、 G_1 、 M_1 被升汞溶液衍生, 在较低的输送流速下, 荧光增强的效果不充分, 随着流速的升高, 荧光值逐渐加大, 达到一定流速时荧光信号值又开始呈下降趋势。这是由于在低流速时 (如 0.2 mL/min) Hg^{2+} 摩尔浓度较低, 达不到最佳反应摩尔比; 而在较高流速时黄曲霉毒素的浓度被稀释, 使得增强的荧光信号值逐渐开始下降, 0.5 mL/min 开始有明显的稀释的趋势。

兼顾 5 种黄曲霉毒素的荧光增强效果, 选择 0.4 mL/min 流速作为最佳的衍生试剂流速。

2.4.2 衍生反应系统温度的确定 衍生反应的温度对 AFT 荧光信号值的增强有较大影响 (图 4)。从实验结果看, 各种黄曲霉毒素衍生产物的荧光响应值均随着温度的升高而降低。由于实验中所使用的柱后衍生器可控制的最低温度是 30, 在可控制的实验温度范围内, 黄曲霉毒素的荧光信号值在 30 时达到最大。因此选择 30 为衍生反应温度。

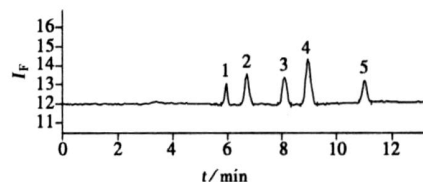


图 2 HPLC 分离 5 种黄曲霉毒素

Fig. 2 Separation of five aflatoxins by HPLC

1. AFM_1 ; 2. AFG_2 ; 3. AFG_1 ; 4. AFB_2 ; 5. AFB_1 ; other conditions: mobile phase: methanol-acetonitrile-water (22:18:60 by volume); flow rate: 0.8 mL/min; column temperature: 30 °C; flow rate of $HgCl_2$: 0.4 mL/min; reactor temperature: 30 °C; fluorescence detector: $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 440 \text{ nm}$

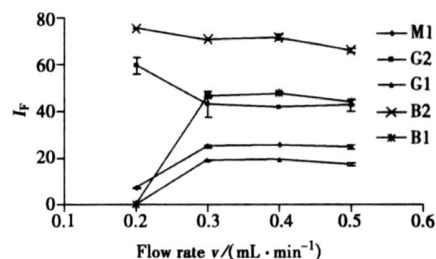


图 3 衍生剂流速对黄曲霉毒素荧光值的影响

Fig. 3 Effect of flow rate of derivatization reagent on fluorescence signal of aflatoxins

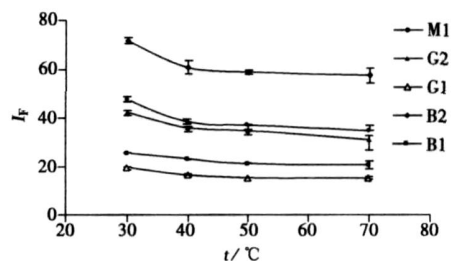


图 4 不同反应温度对黄曲霉毒素荧光值的影响

Fig. 4 Effects of different reaction temperatures on fluorescence signal of aflatoxins

2.5 方法的线性、检出限与回收率

表 1 列出了方法的线性、重复性 (用相对标准偏差表示)、日间精密度、检出限 (LOD)及定量下限 (LOQ)。

表 1 线性、重复性、日间精密度、检出限及定量下限

Table 1 Results for linearity, repeatability, intra-day variability, limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs)

Aflatoxin	Calibration curve equation *	<i>r</i>	LODs (<i>S/N</i> = 3)		LOQs (<i>S/N</i> = 10)		Repeatability (<i>n</i> = 7)		Intra-day variability	
			<i>w</i> / (μg · kg ⁻¹)		<i>w</i> / (μg · kg ⁻¹)		<i>w</i> / (μg · kg ⁻¹) ± <i>s_r</i> / % (RSD)		<i>w</i> / (μg · kg ⁻¹) ± <i>s_r</i> / % (RSD)	
AFB ₁	<i>y</i> = 5.11 <i>x</i> - 0.26	0.999 7	0.05		0.17		8.47 ±1.81		8.71 ±4.28	
AFB ₂	<i>y</i> = 8.53 <i>x</i> - 0.92	0.999 7	0.04		0.13		8.64 ±0.23		8.35 ±1.90	
AFG ₁	<i>y</i> = 2.87 <i>x</i> - 0.18	0.999 7	0.12		0.40		9.19 ±4.33		8.44 ±4.92	
AFG ₂	<i>y</i> = 5.23 <i>x</i> - 0.01	0.999 9	0.06		0.20		9.80 ±0.89		8.33 ±3.83	
AFM ₁	<i>y</i> = 3.25 <i>x</i> - 1.56	0.999 7	0.11		0.37		9.64 ±2.27		8.26 ±2.53	

* *y*: peak area; *x*: the content of aflatoxin (μg · kg⁻¹)

在 0.5 ~ 60 μg/kg 范围内 (该范围完全可以满足当前的国内外黄曲霉毒素检测的限量标准), 5 种黄曲霉毒素均呈现良好的线性, 相关系数均大于 0.999。

重复性实验是对同一加标 (10 μg/kg) 样品同一天里相同的操作条件重复测定 7 次; 日间精密度实验是在相同操作条件下 (4 避光保存), 每天对加标 (10 μg/kg) 样品进行测定, 共测定 7 d。相对标准偏差均在 5% 以下, 表明重复性和日间精密度良好。

使用 HgCl₂ 衍生剂的高效液相色谱方法灵敏度大大提高, 表现在 5 种 AFT 的检出限均低于 0.12 μg/kg (*S/N* = 3), 定量下限均低于 0.40 μg/kg (*S/N* = 10)。尤其是 B₁ 的检出限和定量下限分别达到了 0.05 μg/kg 和 0.17 μg/kg, 最低检出质量为 0.5 pg, 完全可以满足国际上针对 AFT 总量和 B₁ 分量设定的最严格的限量要求 (欧盟最大残留限量: AFT 总量不大于 4 μg/kg, B₁ 不大于 2 μg/kg)。

在花生样品中分别添加 2、5、10 μg/kg 水平的黄曲霉毒素标准品 (B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 分量), 测定黄曲霉毒素各个分量的回收率, 7 次平行测定结果见表 2。从表中结果可以看出各黄曲霉毒素分量的回收率都在 90% 左右, 相对标准偏差都在 5% 之内。

表 2 黄曲霉毒素的回收率结果

Table 2 Recovery results for aflatoxins

Spiked sample levels <i>w</i> / (μg · kg ⁻¹)	Recovery <i>R</i> / % ±RSD <i>s_r</i> / %				
	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	AFM ₁
2	91 ±4.98	93 ±3.39	100 ±4.86	90 ±3.12	90 ±3.78
5	85 ±2.52	86 ±1.55	92 ±4.65	98 ±3.72	96 ±1.34
10	87 ±3.37	84 ±1.51	84 ±4.03	83 ±3.79	83 ±2.74

2.6 实际样品的应用

本文建立的新方法目前主要应用在不同来源的农产品上。部分样品是采用黄曲霉菌接种后培育的样品, 由中国农业科学院油料作物研究所花生课题组提供。其他样品是市场上购买的天然农产品。实验测定了生花生、接种黄曲霉菌的花生、花生油、花生酱、混合花生酱 (混有芝麻酱)、大米、玉米等农产品 (表 3)。

表 3 检测实际样品中的黄曲霉毒素

Table 3 Results of aflatoxin in real samples

Samples (样品)	Content <i>w</i> / (μg · kg ⁻¹) ± <i>s_r</i> / %				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	M ₁
Raw peanut (生花生)	9.24 ±0.15	ND *	ND	ND	ND
Peanuts inoculated with <i>A. flavus</i> (黄曲霉菌接种培育的花生)	156.6 ±7.14	23.6 ±2.37	ND	ND	ND
Mixed peanut butter (混合花生酱)	2.95 ±0.13	ND	ND	ND	ND
Peanut butter (花生酱)	5.34 ±0.15	ND	ND	ND	ND
Peanut oil (花生油)	2.78 ±0.11	ND	ND	ND	ND
Rice (大米)	ND	ND	ND	ND	ND
Com (玉米)	ND	ND	ND	ND	ND

* ND: not detected

实验结果表明, 随机抽取的样品中只有经黄曲霉菌接种后的培育样品中含有黄曲霉毒素 B_1 和 B_2 , 且含量较高; 其它大部分样品不含有黄曲霉毒素, 少量样品含有黄曲霉毒素 B_1 , 但含量在最大残留限量以下。

3 结 论

本文开发研究了用升汞溶液作为新型的柱后衍生试剂对黄曲霉毒素特别是 B_1 、 G_1 、 M_1 进行荧光增强, 通过荧光信号值的显著增强直接提高了检测的灵敏度; 同现行方法比较, 液相色谱柱后氯化汞衍生法检测黄曲霉毒素 (B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 和 M_1) 具有更高的灵敏度, 好的准确度和重复性。与以往衍生法相比, 衍生试剂无腐蚀性、不挥发, 具有反应快速稳定、操作简便和试剂保存寿命长等优点。黄曲霉毒素 B_1 的检出限达到了 $0.05 \mu\text{g/kg}$, 最低质量检出限为 0.5 pg 。新方法成功应用于分析污染农产品中的黄曲霉毒素, 如花生、花生酱、花生油、大米、玉米等, 是检测农产品和食品中黄曲霉毒素可靠有效的方法。

致谢: 感谢本研究所花生课题组廖伯寿研究员和王圣玉副研究员提供黄曲霉菌接种培育的花生样品; 感谢本研究室陈洪博士对本文的建议和帮助。

参考文献:

- [1] CAVALIERE C, FOGLIA P, PASTOR NIE, et al Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources[J]. J Chromatogr. A, 2006, (1101): 69 - 78
- [2] BLESIA J, SORIANO J M, CMOLTO J, et al Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography[J]. J Chromatogr. A, 2003, (1011): 49 - 54
- [3] 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
- [4] CARLSON M A, BARGERON C B, BENSON R C. An automated, handheld biosensor for aflatoxin[J]. Biosens Bioelectron, 2000, (14): 841 - 848
- [5] SMEON N, MYERS R, BAYL C, et al Some applications of near-ultraviolet laser-induced fluorescence detection in nanomolar- and subnanomolar-range high-performance liquid chromatography or micro-high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr. A, 2001, (913): 253 - 259
- [6] VENTURA M, GOMEZ A, ANAYA I Determination of aflatoxins B_1 , G_1 , B_2 and G_2 in medicinal herbs by liquid chromatography - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr. A, 2004, (1048): 25 - 29
- [7] JAMEZ J, FENTE C A, VAZQUEZ B I, et al Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis[J]. J Chromatogr. A, 2000, (882): 1 - 10
- [8] 许梓荣, 史莹华, 冯建蕾, 等. 光化学衍生法结合 HPLC测定食品和饲料中的黄曲霉毒素 [J]. 中国粮油学报, 2005, 20(2): 71 - 75
- [9] SLUIS - CREMER N, WALLACE L, BURKE J, et al Aflatoxin B_1 and sulphobromophthalein binding to the dimeric human glutathione S-transferase A1 - 1: a fluorescence spectroscopic analysis[J]. Eur J Biochem, 1998, (257): 434 - 442
- [10] 李培武, 马 良, 杨金娥, 等. 粮油产品黄曲霉毒素 B_1 检测技术研究进展 [J]. 中国粮油作物学报, 2005, 27(2): 77 - 81
- [11] DALLASTA C, NGLETTO G, CORRADINI R. Fluorescence enhancement of aflatoxins using native and substituted cyclodextrins[J]. J Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chem, 2003, (45): 257 - 263
- [12] 任一平, 陈恒武, 陈青俊, 等. 柱后光化学衍生荧光检测高效液相色谱法测定食品中的维生素 B_1 [J]. 分析化学, 2000, 28(5): 554 - 558
- [13] 温裕云, 弓振斌, 姚剑敏. 柱后光化学反应荧光检测高效液相色谱法测定茶叶中的五种菊酯类农药残留 [J]. 分析化学, 2005, 33(3): 301 - 304