

超高效液相色谱检测奶及奶制品中的 M族黄曲霉毒素

蔡增轩¹, 胡玲玲², 王军淋¹, 柳家鹏³, 任一平^{1,2*}

(1. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051; 2. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 杭州 310014;
3. 北京华安麦科生物技术有限公司, 北京 102200)

摘要: **目的** 建立一种免疫亲和柱净化-超高效液相色谱法同时测定奶及奶制品中 M 族黄曲霉毒素的方法。**方法** 以乙腈为提取剂和蛋白沉淀剂, 采用涡旋混合及超声提取, 免疫亲和柱净化。**结果** 经 Welch Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)分离, 应用大体积流通池荧光检测, 流动相为水和乙腈/甲醇(1:1)。线性范围在 0.01~5.00 ng/mL 之间, 线性系数均大于 0.999, 黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的检出限为 0.003 μg/kg。免疫亲和柱对黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的回收率均在 80%以上, 液态奶中添加 0.05、0.2、1.0 μg/kg 的回收率在 85.6%~106.4% 之间, 奶粉中添加 0.5、2.0、10.0 μg/kg 的回收率在 81.5%~93.4% 之间。**结论** 该方法可以适用于奶粉、液态奶中 M 族黄曲霉毒素检测。

关键词: 奶制品; 黄曲霉毒素 M₁; 黄曲霉毒素 M₂; 超高效液相色谱法; 大体积流通池

Determination of M aflatoxins in milk and milk products by ultra high performance liquid chromatography

CAI Zeng-Xuan¹, HU Ling-Ling², WANG Jun-Lin¹, LIU Jia-Peng³, REN Yi-Ping^{1,2*}

(1. Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, Hangzhou 310051, China;
2. College of Chemical Engineering Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;
3. Beijing Huan Magnech Bio-Tech Co., Ltd., Beijing, 102200, China)

ABSTRACT: Objectives To develop the method of simultaneous determination of M aflatoxins in milk and milk products by ultra high performance liquid chromatography (UPLC) coupled with immunoaffinity column (IAC) clean-up. **Methods** Samples were extracted with acetonitrile after vortex mixing and ultrasound, meanwhile, acetonitrile was used as a protein precipitant, then extraction solution was clean-up with IAC. **Results** The analytes were separated on Welch Ultimate XB-C₁₈ (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), and eluted with a mobile phase consisting of (a) waters and (b) acetonitrile: methanol (50: 50, v/v). The separated compounds were detected with fluorescence detection (FLD) equipped with a large volume flow cell. Meanwhile, high correlation coefficient ($R^2 > 0.999$) was obtained within linear range from 0.01 to 5.0 ng/mL, and the limits of determination (LOD) of M aflatoxins were 0.003 μg/kg. Reasonable recovery

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项项目(2011YQ060084)、浙江省重点科技创新团队计划(2011R50021)

Fund: Supported by National Instrumentation Program (2011YQ060084) and Program for Zhejiang Leading Team of Science and Technology Innovation (2011R50021)

*通讯作者: 任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检测技术。E-mail: renyiping@263.net

*Corresponding author: REN Yi-Ping, Professorate Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, NO. 3399, Bingsheng Road, Binjiang District, Hangzhou 310051, China, E-mail: renyiping@263.net

ries (above 80%) were demonstrated for aflatoxin M₁ and M₂ with aflatoxin M₁ immunoaffinity column, and recoveries (85.6%~106.4%) were in 3 spiked levels (0.05, 0.2, 1.0 µg/kg) for milk, and recoveries (81.5%~93.4%) were in 3 spiked levels (0.5, 2.0, 10.0 µg/kg) for milk powder. **Conclusion** This quantitative method can be applied to the determination and quantification of M aflatoxins in milk and milk products.

KEY WORDS: milk products; aflatoxin M₁; aflatoxin M₂; ultra high performance liquid chromatography; large volume flow cell

1 引言

黄曲霉毒素是一组化学结构类似的二呋喃香豆素的衍生化合物,可由曲霉菌黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪溜曲霉 4 种产生,目前已分离鉴定出 12 种包括: B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂、P₁、Q、H₁、GM、B_{2a} 和毒醇。黄曲霉毒素的主要形式包括 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 等。其中黄曲霉毒素 M₁、M₂ (AFT M₁、M₂ 是黄曲霉毒素 B₁、B₂ 在动物体内经过羟化生成的代谢产物,主要存在动物的乳、肾脏、肝脏、蛋、肉和尿中,其中以乳中最为常见。黄曲霉毒素 M₁、M₂ 也可由一些黄曲霉菌和寄生曲霉菌直接产生,但与其他毒素相比,比例相当低^[1]。黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的相对分子质量分别为 328、330,结构上及其相近,其结构式如图 1 所示。

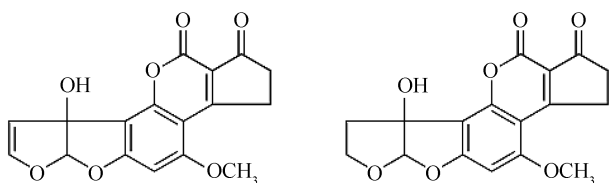


图 1 黄曲霉毒素 M 族的结构式

Fig. 1 Structures of group M aflatoxins

a: 黄曲霉毒素 M₁; b: 黄曲霉毒素 M₂

a: aflatoxin M₁; b: aflatoxin M₂

1963 年, Alleroft 首先发现牛奶中还有类似黄曲霉毒素的有毒物质,直到 1965 年,这种“奶毒素”才被命名为黄曲霉毒素 M(aflatoxin M),并区分为 M₁、M₂。黄曲霉毒素 M₁ 是一种强致癌性物质,毒性仅次于黄曲霉毒素 B₁,急性毒性与黄曲霉毒素 B₁ 类似,WHO 将其列为 II B 类致癌物^[2],牛奶经巴氏杀菌后,黄曲霉毒素几乎不被破坏。目前,关于

奶及奶制品中黄曲霉毒素的检测,大多也只关注了黄曲霉毒素 M₁^[3-5],而少有同时检测奶及奶制品中黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的报道^[6-8],有关报道的前处理过程也较为复杂。

目前检测 M 族黄曲霉毒素的方法主要有薄层色谱法(TLC)^[9,10]、酶联免疫法(ELISA)^[11,12]、荧光光度法^[4,13]、SNAP 法^[14,15]、高效液相色谱荧光法(HPLC-FLD)^[12,14-17]和液相色谱-质谱联用法(LC-MS)^[18,19]。TLC 法操作繁琐,且只能测黄曲霉毒素总量;而酶联免疫法一般作为筛选法,易出现假阳性现象。液相色谱-质谱联用仪器价格昂贵,难以普及,且容易受到基质效用的影响。而 HPLC-FLD 法具有操作简单、灵敏度高、稳定性好等优点,在国内已得到较为广泛的应用。

本研究采用乙腈/水作为提取溶剂(液态乳中直接加入乙腈),免疫亲和柱净化,光化学衍生荧光检测器检测,可以同时测定奶及奶制品中黄曲霉毒素 M₁ 和 M₂。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

液相色谱仪:美国 Waters Acquity 超高效液相色谱仪配荧光检测器(带大体积流通池)。离心机(贝克曼 64AR 型),旋转蒸发器(步琪 R-205 型),氮吹仪(Organomation N-EVAP 112 型),自动固相萃取装置(Gilson Aspec GX-274 型)。

黄曲霉毒素 M₁ 购自 Sigma 公司(46319-U, 10 µg/mL), M₂ 标准品购自北京华安麦科生物公司;黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱由北京华安麦科生物公司提供。

乙腈、甲醇(色谱纯)购自 Merck 公司;氯化钾、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠等为分析纯,购自国药集团;实验用水由超纯水仪(Millipore, USA)

制备。

PBS 缓冲液: 8.0 g 氯化钠, 1.2 g 磷酸氢二钠, 0.2 g 磷酸二氢钾, 0.2 g 氯化钾, 用水定容至 1 L, 用盐酸调 pH 值至 7.4。

2.2 样品提取与净化

液态奶样品, 称取 10.0 g 于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 乙腈, 充分涡旋 3 min 后, 超声提取 10 min, 8000 r/min 条件下离心 5 min, 取全部上清液旋蒸至 10 mL 以下, 全部转移至 50 mL 容量瓶中, 以 PBS 溶液定容至刻度。取 25 mL 溶液过黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱, 以 10 mL PBS 缓冲液淋洗柱子, 弃去全部流出液, 用 5 mL 甲醇洗脱免疫亲和柱, 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 55 °C 下氮吹干, 用 1.0 mL 乙腈:水 (20:80) 溶液溶解残留物, 过 0.22 μm 滤膜, 收集滤液于进样瓶中, 供上机检测。过柱净化处理在自动固相萃取装置上进行。

奶粉样品, 称取 1.00 g 样品, 加入 10 mL 水溶解。其余过程同液态奶样品。

2.3 液相色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate XB-C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μL; 激发波长: 360 nm; 发射波长: 420 nm; 流动相: A: 纯水; B: 甲醇:乙腈(50:50); 梯度条件: 0~4.0 min, 30%B; 4.2~4.7 min, 100% B; 5 min, 30% B。

3 结果与讨论

3.1 波长选择

采用流动相作为背景溶液, 分别扫描黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的激发波长和发射波长(图 2, 图 3)。固定发射波长 420 nm, 激发波长从 300 nm 扫描到 400 nm; 固定激发波长 360 nm, 发射波长从 390 nm 扫描到 500 nm。结果表明黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的最佳激发波长为 360 nm, 最佳发射波长分别为 420 nm 和 426 nm。黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的结构很相似, 因此波长也相差不多。考虑到简化检测条件, 因此取激发波长为 360 nm, 发射波长为 420 nm。

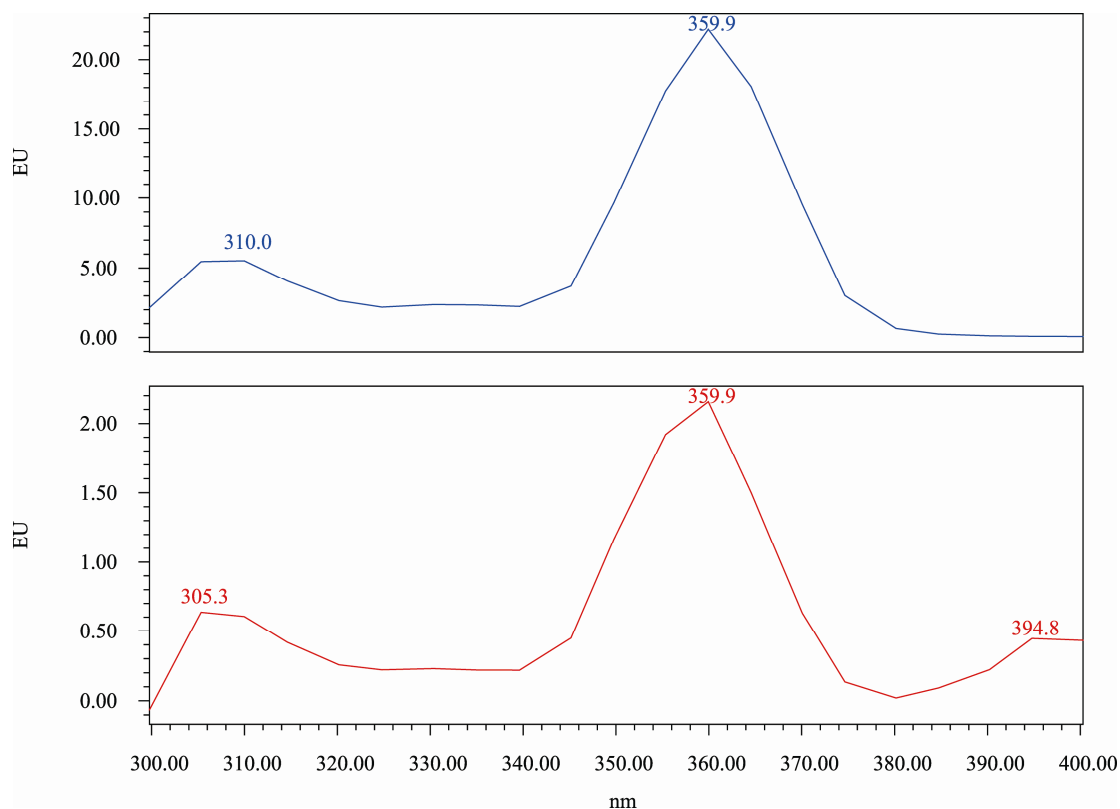


图 2 黄曲霉毒素 M₁、M₂ 激发波长扫描谱图

Fig. 2 FLR excitation spectrum of AFT M₁ and M₂

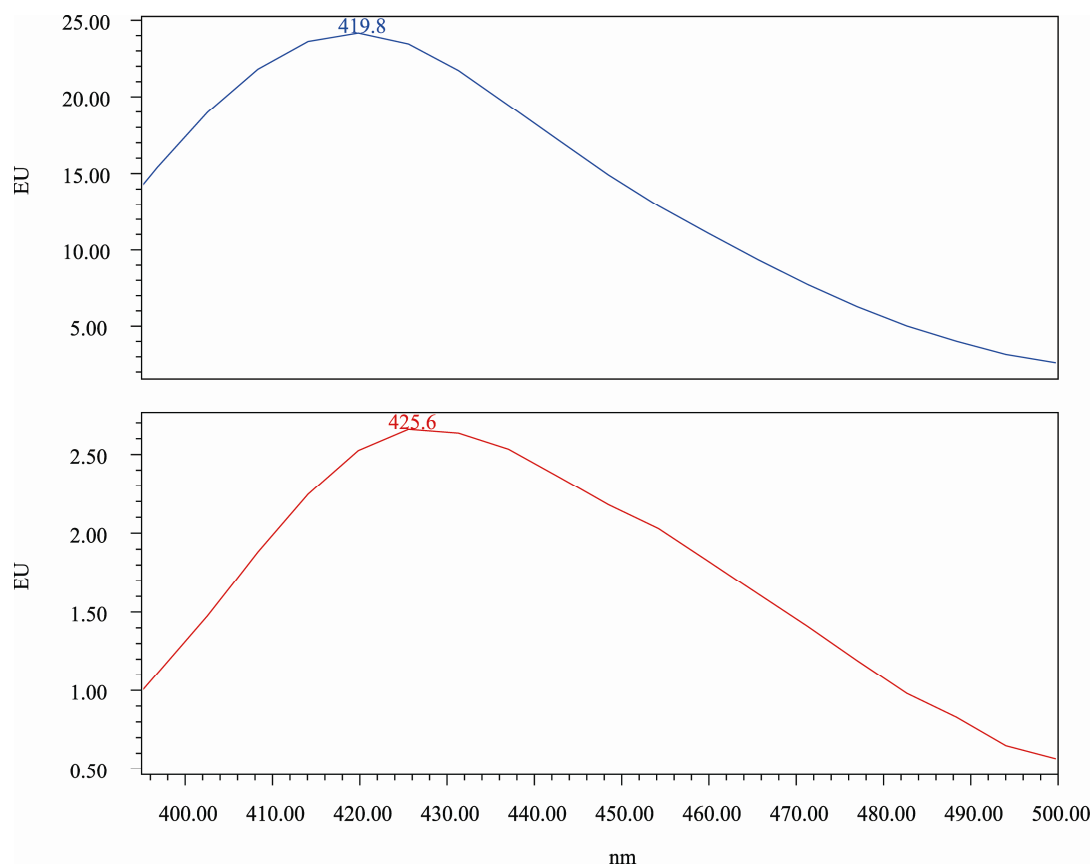


图 3 黄曲霉毒素 M₁、M₂ 发射波长扫描谱图

Fig. 3 FLR emission spectrum of AFT M₁ and M₂

3.2 线性范围与检出限

以 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 ng/mL 的黄曲霉毒素 M₁、M₂ 混合标准溶液作校准曲线, 在给定条件下进行 UPLC 分析, 以峰面积为 Y 轴, 浓度为 X 轴做校准曲线。

分别取空白基质样品, 加入混合标准溶液, 经放置待加入的标准品与基质充分混合后, 按方法前处理, 根据 3 倍信噪比的峰响应值, 得出此方法检出限, 根据 10 倍信噪比, 得出线性范围的下限。结果见表 1。

3.3 加标回收及精密度

实验中所用的免疫亲和柱为黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱, 为了验证该柱对黄曲霉毒素 M₂ 的适用性, 以稀释后的标准溶液过黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱, 3 个平行, 回收率见表 2。平均回收率均大于 80%。

向空白牛奶样品中添加不同量的黄曲霉毒素 M₁、M₂ 混合标准溶液, 每个添加量做 3 个平行, 计

算黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的平均回收率及相对标准偏差, 结果见表 2。取中等水平的添加样品做精密度 ($n=5$) 试验, 液态乳中黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的日内精密度 (RSD) 分别为 2.7%、4.8%, 乳粉中黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的日内精密度 (RSD) 分别为 2.1%、4.5%。

3.4 实际样品测定

实验中对市售的 50 份牛奶及奶粉样品进行了检测, 其中黄曲霉毒素 M₁ 的检出率为 80%, 发现奶粉超标样品 2 份。黄曲霉毒素 M₁ 的含量分别为 0.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.79 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 同时, 发现这两份奶粉样品同时含有黄曲霉毒素 M₂, 含量分别为 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。阳性样品谱图见图 4。

4 结 论

本研究应用免疫亲和柱净化, 同时检测了两种 M 族黄曲霉毒素。黄曲霉毒素 M₁ 和黄曲霉毒素 M₂ 具有相似的结构, 可以使用相同的检测波长检测。

表 1 黄曲霉毒素 M₁、M₂ 检测方法的线性回归方程及相关系数
Table 1 Linear and coefficient of AFT M₁ and M₂ detection method

名称	线性范围(ng/mL)	回归方程	相关系数(R ²)	检出限 (μg/kg)
黄曲霉毒素 M ₁ Aflatoxin M ₁	0.1~5.0	$Y=2.59E+004X+3.17E+002$	0.9991	0.003
黄曲霉毒素 M ₂ Aflatoxin M ₂	0.1~5.0	$Y=2.26E+005X-1.26E+003$	0.9997	0.003

表 2 牛奶样品黄曲霉毒素 M₁、M₂ 的加标回收率(n=3)
Table 2 Recoveries and precision of aflatoxin M₁ and M₂ in milk (n=3)

样品基质	添加量(μg/kg)	毒素种类	平均检测结果(μg/kg)	RSD/%	平均回收率(%)	
溶剂	10.00	AFT M ₁	8.150	3.9	81.5	
		AFT M ₂	9.890	2.5	98.9	
	0.05	AFT M ₁	0.502	2.0	100.4	
		AFT M ₂	0.532	3.7	106.4	
液态奶	0.20	AFT M ₁	0.175	3.2	87.5	
		AFT M ₂	0.172	2.2	86.0	
	1.00	AFT M ₁	0.845	1.8	84.5	
		AFT M ₂	0.856	2.4	85.6	
	0.50	AFT M ₁	0.418	4.6	83.6	
		AFT M ₂	0.426	3.7	85.2	
	奶粉	2.00	AFT M ₁	1.750	1.4	87.5
			AFT M ₂	1.630	2.0	81.5
10.00		AFT M ₁	8.560	2.3	85.6	
		AFT M ₂	9.340	3.4	93.4	

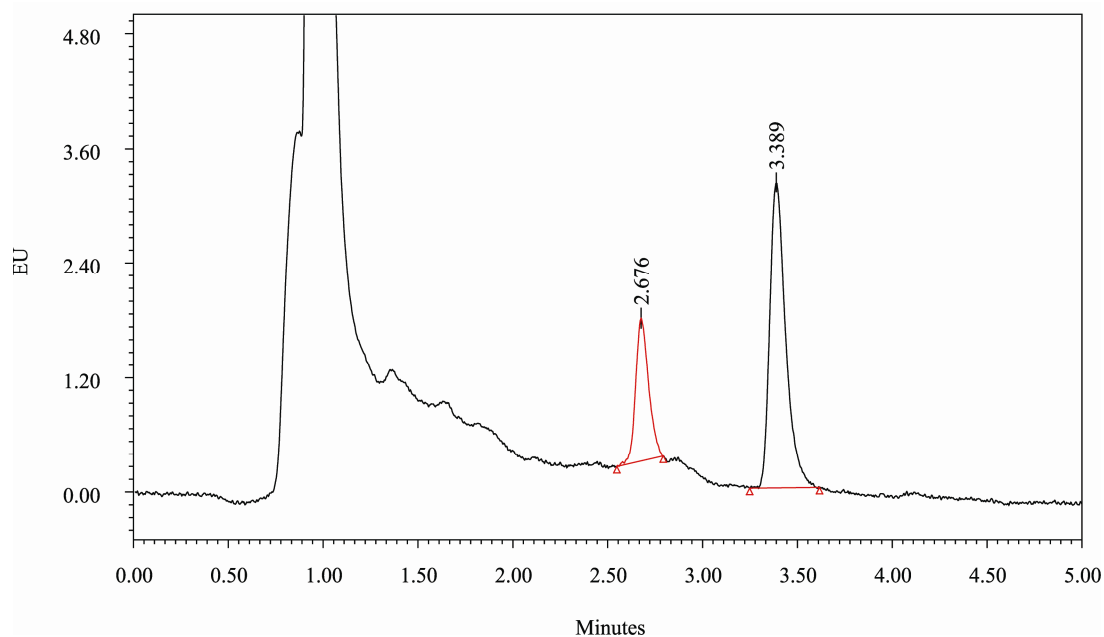


图 4 黄曲霉毒素 M₁、M₂ 样品谱图

Fig. 4 Liquid chromatograms of AFT M₁ and M₂

市售的黄曲霉毒素 M₁ 免疫亲和柱适用于两种 M 族黄曲霉毒素, 具有良好的回收率。同时检测两种 M 族黄曲霉毒素, 满足了对奶及奶制品中黄曲霉毒素准确定量的需求, 可以由两种毒素的含量, 根据其毒性当量, 准确的对奶及奶制品中 M 族黄曲霉毒素进行风险评估。使用了大体积流通池的高效液相色谱荧光法, 不需要增加衍生设备, 简化了操作, 提高了灵敏度, 较现有方法更为简便。所建立的方法同时适用于液态奶及奶粉, 并在含有黄曲霉毒素 M₁ 的阳性奶粉样品中同时检出黄曲霉毒素 M₂。两份阳性样品中黄曲霉毒素 M₁ 与黄曲霉毒素 M₂ 的含量比都约为 4:-1 的关系。是否在污染的奶中两种黄曲霉毒素存在这种比例关系, 需要对大量阳性样品进行统计, 可以在后续的研究中进行关注。

参考文献

- [1] Hesseltine CW. Toxic Micro organismmy cotoxin [M]. Washington, 1968.
- [2] Rastogi S, Dwivedi PD, Khanna SK, *et al.* Dectection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian market by ELISA [J]. Food Control, 2004, 15(4): 287- 290.
- [3] Elzupir AO, Elhussein AM. Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan [J]. Food Control, 2010, 21(6): 945-946.
- [4] 张鹏, 张艺兵, 王晶, 等. 牛奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 的快速检测[J]. 中国乳品工业, 2002, 30(6): 30-32.
Zhang P, Zhang YB, Wang J, *et al.* Rapid determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder [J]. China Dairy Ind, 2002, 30(6):30-32.
- [5] 王军淋, 蔡增轩, 任一平, 超高效液相色谱-大体积流通池荧光法直接检测奶及奶制品中的黄曲霉毒素 M₁[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2013, 39(2): 191-196.
Wang JL, Cai ZX, Ren YP, Determination of aflatoxin M₁ in milk by ultra-performance liquid chromatography and fluorimetric detection combined with large volume flow cell [J] J Zhejiang Univ (Agr Life Sci), 2013, 39(2): 191-196.
- [6] Aflatoxins M₁ and M₂ in fluid milk. Liquid Chromatographic Method 986.16. In: Official Method of Analysis of AOAC International 17th Edition, Volume II Ed Patricia Cinnif Cap 49(49306 E) Natural Toxins Peter M Scott P [C]. 2000: 40-41.
- [7] 王军淋, 胡玲玲, 蔡增轩. 现行黄曲霉毒素液相色谱检测法的比较与评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(3): 645-654.
Wang JL, Hu LL, Cai ZX, *et al.* Comparison and assessment of aflatoxins determination by ultra-pressure liquid chromatography[J]. J Food Saf Qual, 2013, 4(3): 645-654.
- [8] 李孝宁 译, 快速液相色谱测定人工污染奶中黄曲霉毒素 M₁ 和 M₂[J]. 食品工业, 1989, 2: 26-29.
Li XN translated, Determination of aflatoxin M₁ and M₂ in artificially polluted milk by rapid liquid chromatography [J]. J Food Ind, 1989, 2: 26-29.
- [9] Carvalho KL, Gonçalves GAA, Lopes AL, *et al.* Modeling uncertainty estimation determination of aflatoxin M₁ in milk by visual and densitometric thin-layer chromatography with immunoaffinity column clean-up [J]. Food Addit Contam, 2012, 29(4): 679-693.
- [10] Kamkar A. A study on the occurrence of aflatoxin M₁ in Iranian Feta cheese [J]. Food Control, 2006, 17(10): 768-775.
- [11] Elkak A, Atat OE, Habib J, *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in cheese processed and marketed in Lebanon [J]. Food Control, 2012, 25(1): 140-143.
- [12] Rosi P, Borsari A, Lasi G, *et al.* Aflatoxin M₁ in milk: Reliability of the immunoenzymatic assay [J]. Int Dairy J, 2007, 17(5): 429-435 .
- [13] 褚庆华, 徐超一, 刘岩, 等. 免疫亲和柱-荧光分析法测定鲜乳和乳粉中的黄曲霉毒素 M₁[J]. 检验检疫科学, 2003, 13(2): 41-42, 52.
Chu QH, Xu CY, Liu Y, *et al.* Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder by immunoaffinity column and fluorimetry [J]. Inspect Quarant Sci, 2003, 13(2): 41-42, 52.
- [14] 付成平, 欧阳华学, 胡莉. SNAP 快速检测法与高效液相色谱法测定牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的比较分析[J]. 西南农业学报, 2002(5): 1435-1438.
Fu CP, Ouyang HX, Hu L. Comparision and analysis of aflatoxins M₁ in milk by SNAP rapid detecting and HPLC [J]. South-west China J Agric Sci, 2009, 22(5): 1435-1438.
- [15] 陈敏, 王颖, 顾其芳, 等. SNAPTM 检测系统用于筛选牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 探讨[J]. 上海预防医学, 2004, 16(1): 5-6.
Chen M, Wang Y, Gu QF, *et al.* Exploration on the screening of Aflatoxin M₁ in milk by SNAPTM system [J]. Shanghai J Prev Med, 2004, 16(1): 5-6.
- [16] Asi MR, Iqbal SZ, Arino A, *et al.* Effect of seasonal variations and lactation times on aflatoxin M₁ contamination in milk of different species from Punjab, Pakistan [J]. Food Control, 2012, 25(1): 34-38
- [17] Elzupir AO, Elhussein AM. Determination of aflatoxin M₁ in dairy cattle milk in Khartoum State, Sudan [J]. Food Control, 2010, 21(6): 945-946.
- [18] 董彬, 杨立新, 李斌, 等. 多功能柱净化液相色谱-质谱-质谱

法测定牛奶中黄曲霉毒素 M₁[J]. 现代农药, 2011, 10(4): 38-40.

Dong B, Yang LX, Li B, *et al.* Multifunctional column clean-up and determination of aflatoxin M₁ in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Mod Agrochem, 2011, 10(4): 38-40.

- [19] GB 5413.37-2010. 乳与乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 的测定[S].
GB 5413.37-2010. Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk product [S].

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



蔡增轩, 博士, 副研究员, 主要从事液相色谱及液质联用应用技术研究。
E-mail: caizx_cdc@163.com



任一平, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检测技术
E-mail: renyiping@263.net

超高效液相色谱检测奶及奶制品中的M族黄曲霉毒素

作者: 蔡增轩, 胡玲玲, 王军淋, 柳家鹏, 任一平, CAI Zeng-Xuan, HU Ling-Ling, WANG Jun-Lin, LIU Jia-Peng, REN Yi-Ping

作者单位: 蔡增轩, 王军淋, CAI Zeng-Xuan, WANG Jun-Lin(浙江省疾病预防控制中心, 杭州, 310051), 胡玲玲, HU Ling-Ling(浙江工业大学化学工程与材料学院, 杭州, 310014), 柳家鹏, LIU Jia-Peng(北京华安麦科生物技术有限公司, 北京, 102200), 任一平, REN Yi-Ping(浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051; 浙江工业大学化学工程与材料学院, 杭州 310014)

刊名: 食品安全质量检测学报

英文刊名: Journal of Food Safety & Quality

年, 卷(期): 2014(3)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_spaqzljcjs201403031.aspx