

免疫亲和柱净化液相色谱法 检测乳粉中的黄曲霉毒素M1

No.LC-043

摘要：建立免疫亲和柱净化液相色谱法检测乳粉中黄曲霉毒素M1方法。乳粉样品溶液离心后，经过免疫亲和柱净化，进样液相色谱分析，荧光检测器检测。方法简便快速，易操作。黄曲霉毒素M1线性范围0.1~5.0ng/mL，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ分别为0.10、0.33ng/mL，回收率87.0 ~ 88.2 %。

关键词：免疫亲和柱 黄曲霉毒素M1 乳制品

黄曲霉毒素M1 (AFM1) 是由常见的黄曲霉和寄生曲霉产生的代谢产物，结构如下图1。哺乳类动物摄入被黄曲霉毒素B1 (AFB1) 污染的饲料和食物后，部分AFB1在体内转化成AFM1，存在于动物分泌的乳汁和产生的尿液中。AFM1具有致癌性和致突变性，为强致癌剂。美国和日本规定乳及乳制品中AFM1含量不得超过0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；欧盟规定鲜乳中AFM1含量不能超过0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；我国规定婴儿乳品中AFM1不得检出，牛乳中含量不得超过0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

免疫亲和柱是将特异性的黄曲霉毒素单克隆抗体与载体蛋白偶联并填柱而成，能特效性地、高选择性地吸附黄曲霉毒素，而让其它杂质通过柱子，使样品得以纯化，黄曲霉毒素吸附后可被极性有机溶剂洗脱。免疫亲和柱将提取、净化、浓缩一次完成，大大简化了前处理过程，提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

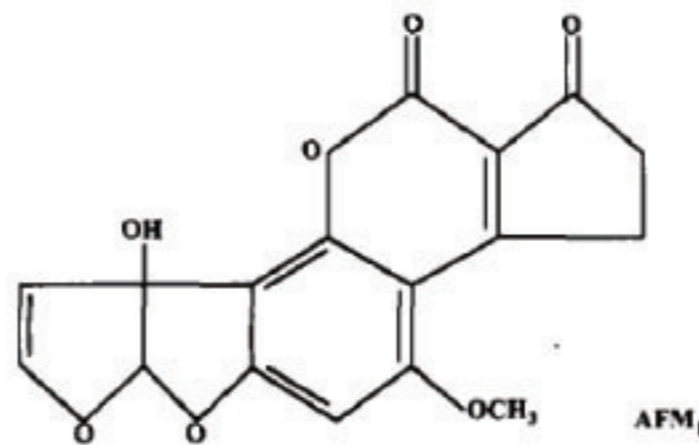


图1 黄曲霉毒素M1结构图

本文将采用免疫亲和柱净化液相色谱法检测乳制品中的黄曲霉毒素M1。

实验部分

1、仪器与试剂

LC-10ADvp (输液泵)，DGU-14A (在线脱气机)，FCV-10Avp (低压梯度单元)，SIL-HTC (自动进样器)，CTO-10Avp (柱温)，RF-10AXL (荧光检测器)，SCL-10Avp (系统控制器)，LCsolution (色谱工作站)；Alfa test免疫亲和柱，VICAM公司；黄曲霉毒素M1标准溶液，Supelco公司；甲醇，HPLC级，Merck公司；乙腈，HPLC级，Merck公司；纯水，Millipore纯水机制得。

2、标准品溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：黄曲霉毒素M1原溶液 (10g/mL)，经流动相稀释，配制标准溶液浓度系列。

前处理步骤：取乳粉样品10g (精确到0.1g)，置于50mL离心管中，加入50mL已预热到50°C的水中，振荡溶解，将其混合均匀。将溶解的乳液移入100mL容量瓶中，用少量水多次淋洗离心管，再用水定容。取适量乳液移入离心管中，离心8min (9500rpm)。收集至少50mL乳液样品。量取50mL试样，通过免疫亲和柱，流速控制约1~2滴/秒。用水10mL洗柱，洗液弃取，使空气进入柱子，抽干亲和柱，再用1.25mL甲醇洗脱，流速控制1滴/秒，加水稀释，定容至2.5mL。

3、分析条件

流动相：乙腈/甲醇/水 = 25/25/50 (v/v)

流速：0.8mL/min

进样体积：50 μ L

色谱柱：Intersil ODS-3 4.6 \times 250 mm, 5 μ m

柱温：40 $^{\circ}$ C

检测波长：Ex=365 nm, Em = 435nm

结果与讨论

1、线性范围和检出限

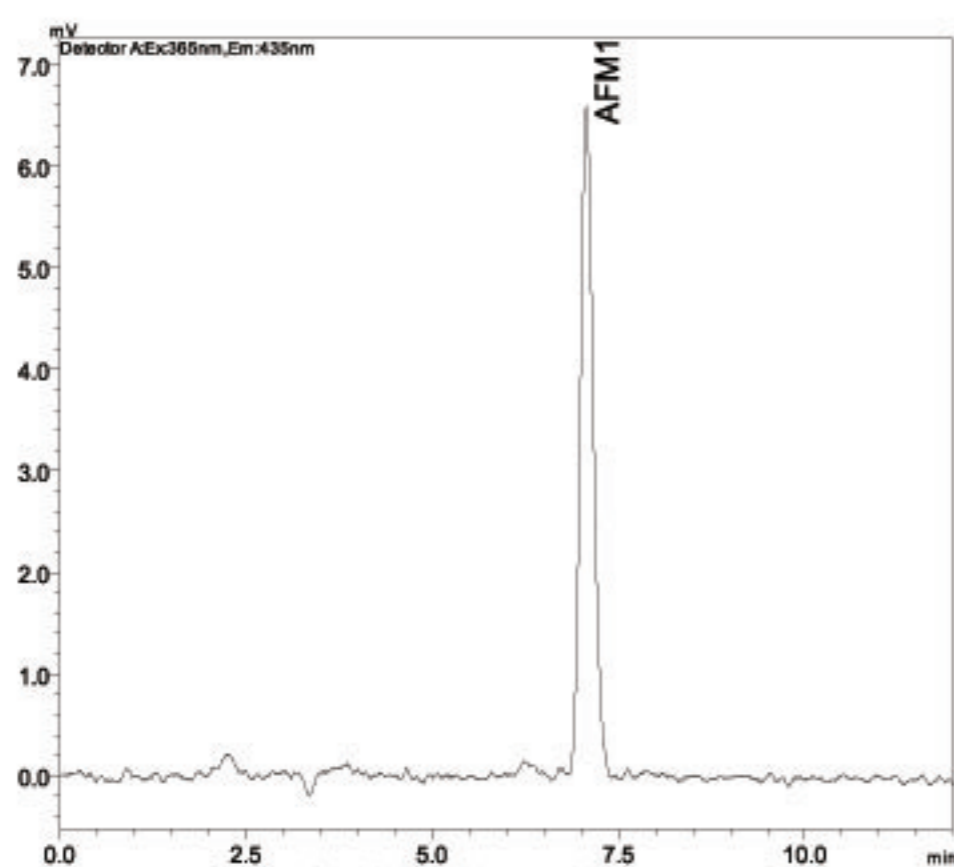


图2 AFM1标准溶液色谱图 (2.0 ng/mL)

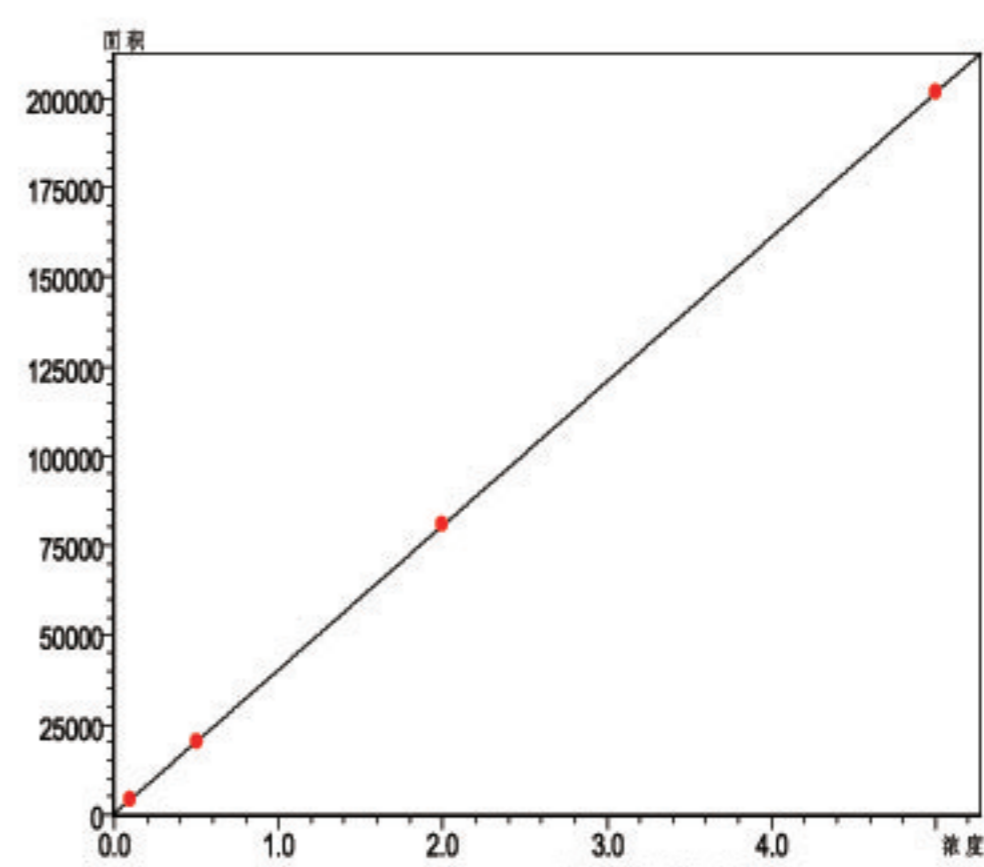


图3. AFM1的校准曲线

AFM1标准溶液浓度分别为0.1、0.5、2.0、5.0ng/mL，制作校准曲线，标准曲线图如图3，标准曲线方程见表1。

表1 AFM1标准曲线

组分	Y=AX+ B		R
	A	B	
AFM1	39761.4	498	0.9999

AFM1的仪器检出限和定量限，见表2。

表2 AFM1的仪器检出限

组分	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
AFM1	0.10	0.33

2、重现性试验

连续进样AFM1标准溶液，浓度分别为0.5、5.0ng/mL，考察化合物的保留时间和峰面积重现性，分析结果见表3，保留时间RSD% < 0.1%，峰面积RSD% < 1.0%。

表3 重现性实验结果 (n=3)

组分	浓度(ng/mL)	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
AFM1	0.5	0.07	0.89
	5.0	0.02	0.35

3、回收率试验

按照上述方法处理空白乳粉样品，样品加标色谱图见图4，回收率结果见表4。样品加标回收率在87.0%–88.2 %。

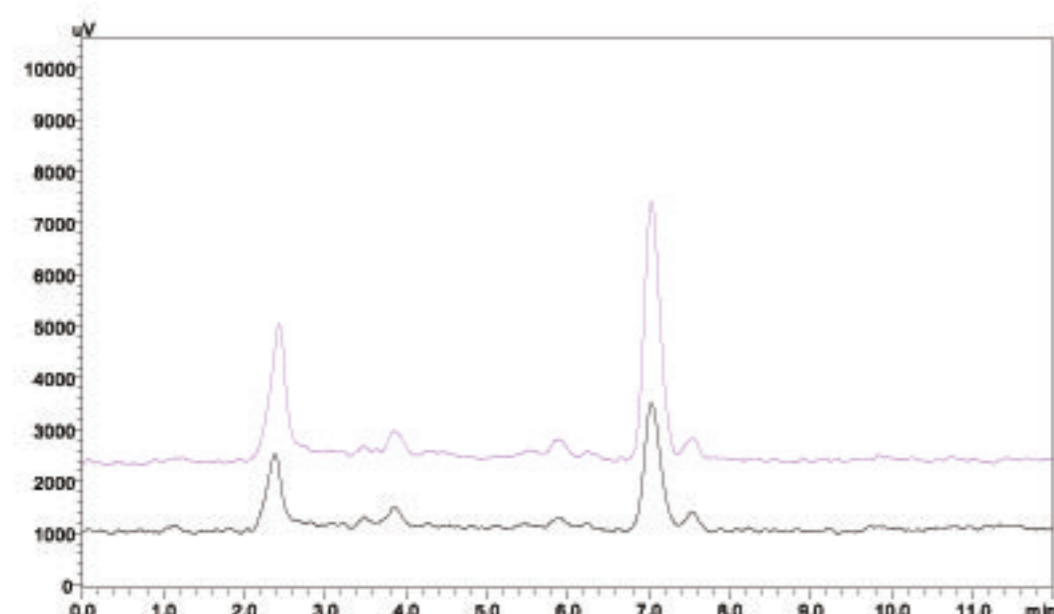


图4 样品加标色谱图

表4 回收率结果

组分	加标量 (ng/g)	回收率 (%)
AFM1	0.5	88.2
	1.0	87.0

4、样品分析

按照1.2所述方法处理某品牌雪糕粉和奶昔粉样品，未检出AFM1，样品色谱图见图5。

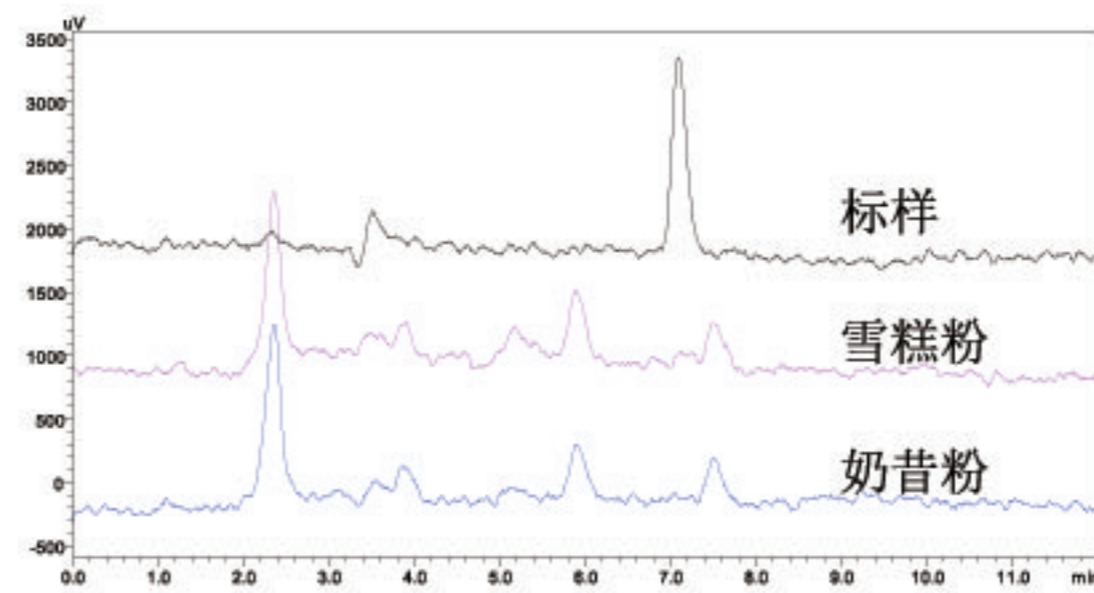


表3 4-CA重现性数据(n=6)

■ 结论

本文建立免疫亲和柱净化液相色谱法检测乳制品中的黄曲霉毒素M1方法。黄曲霉毒素M1线性范围0.1~5.0ng/mL，相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ范围分别为0.10、0.33ng/mL，回收率87.0~88.2%。