

应用真菌毒素筛查系统测定牛奶中的黄曲霉毒素 M1

LC-163

摘要：本文建立了一种使用岛津 i-Series 方法包霉菌毒素筛查系统对牛奶中的黄曲霉毒素 M1 进行检测的方法。实验结果表明：该方法线性范围宽，在 0.1 µg/L~ 20 µg/L 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。0.2 µg/L、1 µg/L 和 10 µg/L 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.12~0.22% 和 0.08~1.83% 之间，仪器精密度良好；牛奶样品加标回收率大于 97%。经验证，采用真菌筛查系统检测 AFM1 简便、快速、准确。

关键词：i-Series 方法包 真菌毒素筛查系统 牛奶 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱

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。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，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 µg/kg；欧盟规定鲜乳中 AFM1 含量不能超过 0.05 µg/kg；我国规定牛乳中含量不得超过 0.5 µg/kg。

免疫亲和柱能特效性地、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。吸附后的黄曲霉毒素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，操作简便，净化效果好，提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

本文采用岛津推出的 i-Series 方法包霉菌毒素筛查系统对牛奶中的黄曲霉毒素 M1 进行检测。本筛选系统是将体积小且操作简便的一体化 HPLC “i-Series” 与含预处理方法在内的分析方法组合使用，本试验可为相关检测人员提供参考。

实验部分

1.1 仪器和试剂

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera-i 系统。具体配置为：LC-2040C 3D, RF-20A_{XS} 荧光检测器，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站，i-Series 方法包（霉菌毒素筛查系统），黄曲霉毒素 M1 标准品 (0.5 mg/L, Romer Labs)，AflaStarTM R(Romer Labs) 黄曲霉毒素免疫亲和柱。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 (3.0 mm I.D. x 75 mmL., 2 µm)

流动相：A 相 -20 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH2.5)，
B 相 - 乙腈，C 相 - 甲醇

流速：1.0 mL/min

进样体积：10 µL

柱温：55°C

检测波长：Ex=365 nm, Em=450 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，洗脱程序见表 1。

表1 梯度洗脱程序

Time (min)	B(%)	C(%)
0.00	5	0
2.30	9	0
2.31	15	15
6.50	15	20
6.51	35	15
10.00	35	15
10.01	5	0
14.00	5	0

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

用流动相初始比例乙腈水溶液将标准储备液 (0.5 mg/L) 逐级稀释成 0.1、0.2、0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{g/L}$ 等 8 个标准溶液浓度系列。

1.3.2 样品前处理方法

①试样的制备

将牛奶加热至 37°C，趁热用玻璃纤维滤纸过滤样品。生乳等含脂肪的样品需均质化后再离心处理 (2000 rpm 以上，15 分钟) 后，去除上层的脂肪层。下层的液体再用玻璃纤维滤纸过滤，作为样品。

②试样的提取和净化

将黄曲霉毒素免疫亲和小柱放于室温至恒温，弃掉柱内剩余保护液；用 pH7.0 的 PBS 溶液平衡小柱 (3 mL \times 3)；收集试样制备得到的乳液 20 g，过黄曲霉毒素免疫亲和小柱；用 3 mL 水洗柱，并再重复 4 次，抽干小柱；用 1mL 乙腈洗柱，并再重复 2 次，收集全部洗脱液于离心管中；在 50°C 下用氮吹仪以氮气吹干，残留物用 1 mL 初始流动相复溶，10000 rpm 离心 15 分钟后取上清液进样分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的色谱图

标准样品色谱图如图 1 所示。AFM1 保留时间为 5.353 min。

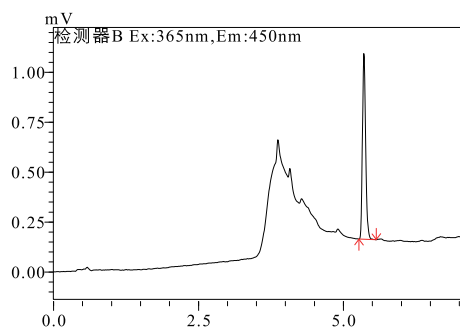


图1 黄曲霉毒素M1标准样品色谱图(1.0 $\mu\text{g/L}$)

2.2 线性关系

将 8 个不同浓度的黄曲霉毒素标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件进行测定。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，结果如图 2 所示。线性方程为 $Y = (3631.65)X + (-6.03976)$ 、线性范围 0.1~20 $\mu\text{g/L}$ ，相关系数大于 0.9998，线性良好。

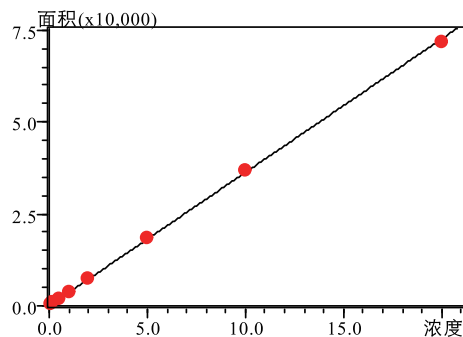


图2 黄曲霉毒素M1的标准工作曲线

2.3 精密度实验

取低、中、高三不同浓度标准溶液，分别平行进样 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.12~0.22% 和 0.08~1.83% 之间，仪器精密度良好。

表2 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

浓度($\mu\text{g/L}$)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
0.2	0.12%	1.83%
1	0.22%	0.39%
10	0.19%	0.08%

2.4 加标回收实验

按照 1.3 所述方法处理全程序空白样品 (除不加样品外，其他步骤和实际样品的处理相同)、市售纯牛奶样品，上机测试。全程序空白样品色谱图如图 3 所示。纯牛奶样品色谱图如图 4 所示。纯牛奶样品加标色谱图如图 6、图 7 所示。加标回收结果见表 3。

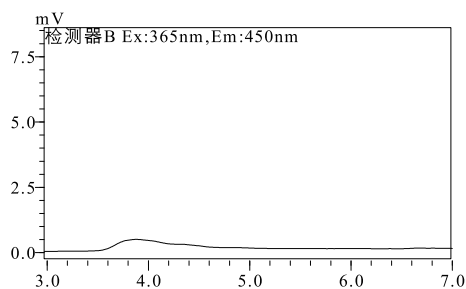


图3 全程序空白样品的色谱图

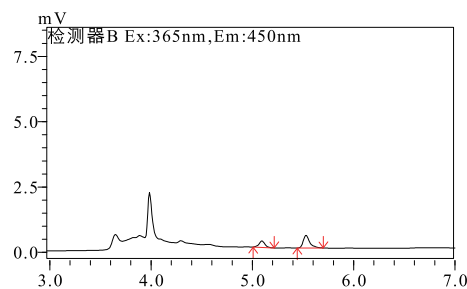


图4 纯牛奶样品的色谱图

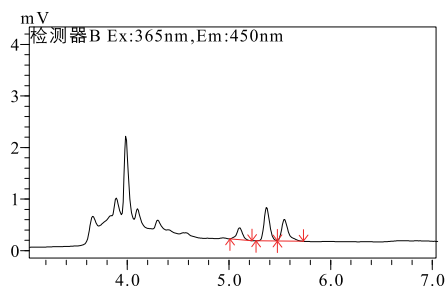


图5 纯牛奶加标样品的色谱图
(加标量: 0.05 $\mu\text{g/kg}$)

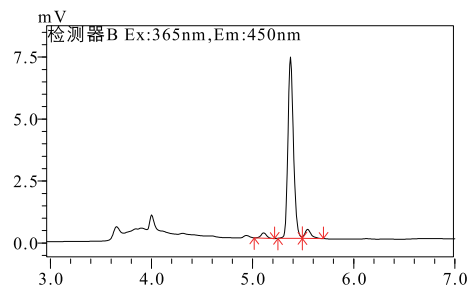


图6 纯牛奶加标样品的色谱图
(加标量: 0.5 $\mu\text{g/kg}$)

表3 加标回收结果(n=3)

基质	样品 μg/kg	加标量 μg/kg	平均回收率	RSD
牛奶	N.D.	0.05	97.0%	5.33%
		0.50	98.3%	2.51%

注：N.D.表示未检出

■ 结论

本文建立了一种使用使用岛津 i-Series 方法包霉菌毒素筛查系统对牛奶中的黄曲霉毒素 M1 进行检测的方法。实验结果表明：该方法线性范围宽，在 0.1 μg/L~20 μg/L 浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.999。0.2 μg/L、1 μg/L 和 10 μg/L 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.12~0.22% 和 0.08~1.83% 之间，仪器精密度良好；牛奶样品加标回收率大于 97%。本方法适合作为乳及乳制品中黄曲霉毒素 M1 的快速分析。

附录：

表4 黄曲霉毒素M1化合物信息表

中文名称	英文名称	CAS 号
黄曲霉毒素 M1	Aflatoxin M1	6795-23-9