



# SMART柱在线净化-HPLC/UVE 荧光同时检测花生中黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$

赵巧灵, 王萍亚, 戴意飞, 蒋玲波  
(舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 316000)

**摘要:** 建立了SMART柱在线全自动净化-高效液相串联UVE荧光同时检测食品中黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的方法。该方法以甲醇/水(4/1, v/v)提取样品, SMART柱全自动净化处理, 以XDB  $C_{18}$ 柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m)分离, 流动相为水/甲醇/乙腈溶液(60/30/15, v/v/v), 流速1.0 mL/min, 激发波长365 nm, 发射波长460 nm, 柱温度36  $^{\circ}$ C。结果表明, 4种目标物在各自的线性响应范围内线性关系良好, 相关系数( $r$ ) $\geq 0.9992$ , 黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的检出限分别为0.070、0.020、0.068、0.018  $\mu$ g/kg; 加标平均回收率( $n=3$ )为82.6%~94.6%, 相对标准偏差(RSD)为0.424%~4.879%。该方法前处理简单、净化效果好、灵敏度高、重复性好, 适合于花生中痕量黄曲霉毒素的多残留快速检测。

**关键词:** SMART柱; 在线净化; 高效液相色谱-串联UVE荧光; 黄曲霉毒素; 花生

中图分类号: TS 207.3

文献标志码: A

文章编号: 1005-9989(2016)12-0286-04

DOI:10.13684/j.cnki.spkj.2016.12.057

## Simultaneous detection of aflatoxins ( $B_1$ , $B_2$ , $G_1$ , $G_2$ ) in peanut using on-line SMART column clean-up and HPLC-UVE-fluorescence detector

ZHAO Qiao-ling, WANG Ping-ya, DAI Yi-fei, JIANG Ling-bo

(Zhoushan Institute for Food and Drug Coufrol, Zhoushan 316000)

**Abstract:** A novel method to simultaneous detect 4 kinds of aflatoxins ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ ) in peanut was developed, using on-line SMART column clean-up and HPLC-UVE-FLD. In the method, sample were extracted with methanol/water (1/1, v/v), cleared up with the SMART column. The separation of target compound was performed on a XDB  $C_{18}$  column (250 mm×4.6 mm, 5  $\mu$ m), using water-methanol-acetonitrile (60/30/15, v/v/v) as mobile phase with a flow rate of 1.0 mL/min at 36  $^{\circ}$ C. The detection wavelengths were set at 365 nm ( $\lambda_{em}$ ) and 460 nm ( $\lambda_{ex}$ ) using FLD. The results indicated that 4 aflatoxins showed good linear relationship with their respective linear response ranges, the correlation coefficients were $\geq 0.9992$ . The detection limits of AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> and AFG<sub>2</sub> were 0.070, 0.020, 0.068, 0.018  $\mu$ g/kg, respectively. The average recoveries ( $n=3$ ) were 82.6% to 94.6%, with values of relative standard deviation

收稿日期: 2016-07-27

基金项目: 浙江省分析测试科技计划项目(2016C37043); 舟山市公益类科技项目(2014C31059)。

作者简介: 赵巧灵(1985—), 女, 浙江舟山人, 博士, 主要从事色谱分析的研究工作。



(RSD) ranging between 0.424% and 4.879%. The developed method with the facile pretreatment, good purification effect, high sensitivity and reproducibility could be used for rapid detection of trace levels of multiple aflatoxins in peanut.

**Key words:** SMART column; on-line purification; HPLC-UVE-FLD; aflatoxins; peanut

黄曲霉毒素(Aflatoxin, 简称为AF)是目前为止发现毒性最大的真菌毒素,其毒性相当于氰化钾的10倍,砒霜的68倍。它可通过多种途径污染食品和饲料,直接或间接进入人类食物链,威胁人类健康和生命安全,对人体及动物内脏器官尤其是肝脏损害严重,它抑制DNA、RNA及肝脏蛋白质的合成,从而导致急性中毒,现有关黄曲霉毒素中毒事件有许多报导。该毒素是黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株的代谢产物,普遍存在于霉变的粮食及粮食制品中。但由于黄曲霉毒素性质比较稳定,耐热性好,研究表明要加热至230℃以上才可破坏黄曲霉毒素,而一般烹饪加工则达不到,无法去除,且也难以对毒素进行消除。另据世界卫生组织报导,黄曲霉毒素含量在(30~50)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时为低毒,(50~100)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时为中毒,(100~1000)  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时为高毒,1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上为极毒。鉴于黄曲霉毒素对人类的巨大危害性,世界各国陆续制定了严格的AFT的限量标准,对黄曲霉毒素也采取了更加严格的控制措施,提高了食品中的黄曲霉毒素污染限量的新要求。如中国和美国对花生和花生油中黄曲霉毒素的检测限量 $\leq 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,欧盟更是限定 $\leq 4 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,从各国对AF的检测限量要求较高,已达ppb级,需要用最精确及高效的检测技术进行测定。

HPLC在测定食品中的真菌毒素应用越来越广泛,该方法具有高效、快速、准确性好、灵敏度高、重现性好、检测下限低等优点<sup>[1-4]</sup>。液相法结合光化学柱后衍法进一步推广了液相法在真菌毒素的检测应用<sup>[5-6]</sup>,提供了检测技术的水平,同时避免了衍生试剂不稳定性和有毒性,减少测定结果不稳定和对仪器的损害的缺陷。但是在样品前处理技术采用传统的免疫亲和柱法,不仅增加了检测工作时间、且增加了检测过程中目标物的损失<sup>[7]</sup>。因此,本研究拟利用SMART柱全自动净化分析系统和液相串联UVE荧光检测仪,建立食品中多种真菌毒素的净化与检测分析一体化的检测技术,力求建立一个简单快速、高灵敏度的可同时测定4种黄曲霉毒 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的检测方

法,为黄曲霉毒素的检测方法提供一种新方法和新思路。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与材料

黄曲霉毒素 $B_1$ (AF $B_1$ )、黄曲霉毒素 $B_2$ (AF $B_2$ )、黄曲霉毒素 $G_1$ (AF $G_1$ )、黄曲霉毒素 $G_2$ (AF $G_2$ ):纯度 $W \geq 99\%$ ,美国ROMER公司;甲醇、乙腈:色谱纯,德国Merk公司;正己烷:分析纯,北京化工厂;磷酸氢二钠十二水( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )、磷酸二氢钠( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )、氯化钠( $\text{NaCl}$ ):上海安谱公司;实验用水:超纯水;花生、花生油:市售。

### 1.2 仪器与设备

Agilent 1100型高效液相色谱仪:美国Agilent公司,配自动进样器、四元梯度泵、柱温箱、荧光检测器;UVE<sup>TM</sup>光化学柱后衍生系统:德国LCTech公司;SMART-柱全自动净化分析联机系统:德国LCTech公司,系统配Freestyle三维移液系统、固相萃取系统SPE、ThermELUTE液相在线进样系统、精密移液泵、迷你免疫亲和柱架和盘;SMART免疫亲和柱:AflaCLEAN<sup>TM</sup>净化柱,德国LCTech公司;AER JSE09L31高速冷冻离心机:美国;MILLI-Q纯水机:美国Milli-Q公司。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 溶液的配制

1.3.1.1 标准溶液的配制 分别准确称取适量AF $B_1$ 、AF $B_2$ 、AF $G_1$ 、AF $G_2$ 标准于100 mL棕色容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,配制成100 mg/L的标准储备溶液,-18℃避光保存备用。使用时用流动相逐步稀释配成适当浓度的混合标准工作溶液,现配现用。

1.3.1.2 磷酸盐缓冲溶液(PBS)的配制 5 mmol/L PBS(pH7.2)储备液配制:称取50.14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 溶解于700 mL水中,同时称取9.66 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶解于350 mL水中,最后将上述2种溶液进行混合并加入42.5 g  $\text{NaCl}$ ,即配制成pH7.2 5 mmol磷酸盐缓冲溶液。1 mmol/



L PBS(pH7.2)溶液配制：取200 mL的5 mmol/L PBS(pH7.2)稀释于800 mL水中。

1.3.2 样品处理方法 准确称取样品20.0 g并加入2 g的NaCl，同时加入100 mL提取溶剂(甲醇/水，4/1，v/v)和50 mL正己烷于均质机中高速搅拌5 min。于4 ℃下10000 r/min离心10 min，用一次性吸管取下层液并用快速定性滤纸过滤，收集滤液。取14 mL过滤后的提取液加入86 mL的1 mmol/L PBS缓冲溶液(pH7.2)进行稀释处理，混匀后待上免疫亲和柱净化处理。

1.3.3 样品净化方法 本文采用SMART柱作为免疫亲和柱对提取液进行洗脱净化处理，将SMART免疫亲和柱放置于迷你免疫亲和柱架和盘。打开AflaCLEAN™净化柱上端密封盖和下端堵头后，柱中的缓冲溶液会排出，直到缓冲溶液液面达到柱中填料上层处。取适量的稀释后的提取液上柱，并控制过柱流速在1.5 mL/min，直到让所有上样品都通过柱子流出来。

1.3.4 在线SPE-HPLC/MVE荧光检测平台条件 本文采取SPE模块并结合ThermELUTE模块进行真菌毒素快速在线SPE-HPLC分析联用平台在线HPLC/MVE荧光检测花生中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>和G<sub>2</sub>。

(1)高效液相色谱分析条件：色谱柱为Agilent XDB C<sub>18</sub>，柱温：36 ℃；流动相：水:甲醇:乙腈(60:30:15，v:v:v)溶液；流速：1.0 mL/min；UVE柱后衍生反应器温度：35 ℃；荧光检测器：激发波长365 nm，发射波长460 nm。进样方式：采用Freestyle系统大体积洗脱液直接从SMART柱传输到HPLC柱，进样量为400 μL。

(2)在线SPE模块条件：本文中采用SMART-柱全自动净化分析联机洗脱，分别包括柱子准备了样品上样、柱子的淋洗、柱的干燥和样品洗脱4个步骤。采用超纯水进行柱子淋洗，流速在1.5 mL/min，并抽真空去除柱子中残余的水进行干燥处理；最后用流动相溶液洗脱柱子，流速在0.5 mL/min。最后设定400 μL洗脱液经ThermELUTE模块直接进HPLC柱进行测定。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品前处理方法的优化

真菌毒素的提取一般采用极性溶液，其中甲醇-水体系是使用较为常见的提取溶剂。本文中研究了不同比例的甲醇-水溶液的提取效果，

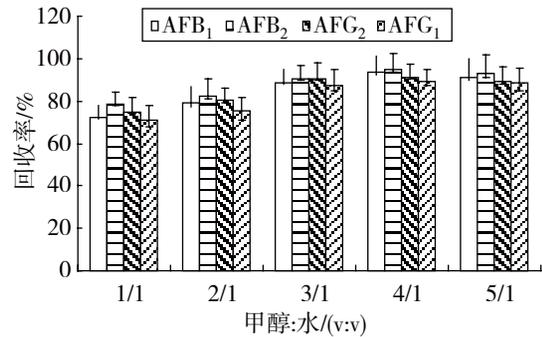
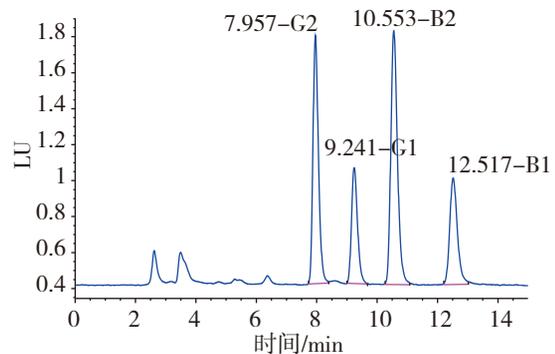


图1 不同比例的甲醇/水体系对黄曲霉毒素的提取效果分别是甲醇/水的体积比为1/1、2/1、3/1、4/1、5/1，以提取回收率为指标。从图1可知，随着甲醇量的提高，目标分析物的提取回收率逐步提高，但当甲醇的浓度超过80%时，提取回收率开始下降。因此，本文采用甲醇/水为4/1的体积比作为最适提取剂。

### 2.2 色谱条件的优化



考察了黄曲霉毒素属于极性化合物，本文中采用水/甲醇/乙腈3种溶液组合及其不同配比对色谱分离效果的影响。结果表明，当流动相中乙腈比例过多时，AFB<sub>2</sub>和AFG<sub>1</sub>分不开；而当甲醇含量过多时，AFG<sub>1</sub>和AFG<sub>2</sub>峰会有部分重叠；但当流动相中水比例超过60%时，各组分出峰时间将延长；因此，本文中选用水:甲醇:乙腈溶液(60:30:15，v:v:v)作为检测4种黄曲霉毒素的流动相。从图2标准图谱可知，目标峰和样品中的杂峰均分离良好，且4种目标峰峰形对称、相对尖锐，HPLC分析测定可在13 min内完成，比陈瑞春等<sup>[8]</sup>报道的单个样品测试时间需15 min完成还快，说明本文中所选定的流动相比比例不仅可以有效分离4种黄曲霉毒素，且提高了检测方法的速率。

### 2.3 UVE光化学柱后衍生技术的应用

虽然AFB<sub>2</sub>和AFG<sub>2</sub>在荧光检测器上有很好的响应值，但是AFB<sub>1</sub>和AFG<sub>1</sub>需要进行衍生才可以在荧光检测器上有好的响应值，因此为了提高黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和G<sub>1</sub>的检测痕量的灵敏度，需要对其进行



衍生化处理。在目前HPLC方法中,以柱前衍生法和柱后衍生法居多,但柱前衍生法由于操作过程繁琐,容易影响定量的准确性,不适合用于大量样品的常规检测。而柱后衍生法操作简单、可连续反应以实现自动化分析,适用于大量样品的连续的自动化操作。本文中采用的UVE光化学柱后衍生设备对目标物进行衍生化处理,无需任何试剂,以HPLC流动相的水作为反应试剂,且操作简单,只要将该设备连接到HPLC柱出口和荧光检测器的进口之间即可使用。

#### 2.4 方法的线性及检出限

在优化条件下,用逐级稀释的混合标准溶液系列进样分析,以峰面积(Y)对个目标溶液中对应的浓度(X)作线性回归,以研究标准溶液曲线的线性范围和相关稀释。同时,在进行加标实验,以3倍信噪比(S/N)对应的添加水平作为方法的检出限,具体结果见表1和图3。

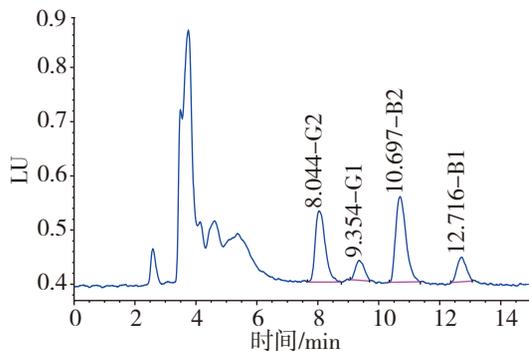


图3 加标样品的色谱图

从图3所示,在加标量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的分离效果良好。从表1可以看出,4种组分在选定的色谱条件下均具有良好的线性关系,相关系数 $(r) \geq 0.9992$ 。而加标法确定4种AFT的检出限:  $AFB_1$ 为 $0.070 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $AFB_2$ 为 $0.020 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $AFG_1$ 为 $0.068 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $AFG_2$ 为 $0.018 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表1 4种黄曲霉毒素的线性方程、线性范围、相关系数和检出限

黄曲霉毒素	回归方程	相关系数/(r)	线性范围/ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	检出限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
$AFB_1$	$y=37.2019x-0.13178$	0.99979	0.010~1.000	0.070
$AFB_2$	$y=31.1887x-0.75314$	0.99968	0.005~0.100	0.020
$AFG_1$	$y=28.6672x-0.13204$	0.99928	0.025~1.500	0.068
$AFG_2$	$y=25.2989x+0.00266$	0.99967	0.025~1.500	0.018

#### 2.5 方法的回收率和精密度

在花生和花生油中添加表2中所列的2组浓度水平的黄曲霉毒素,按上述实验条件进行回收实验,计算方法的加标回收率和精密度,每个浓度做3个平行。结果见表2可知,4种真菌毒素

的回收率在花生样品加标回收率82.6%~94.6%之间,相对标准偏差(RSD)为0.424%~4.879%;花生油样品加标回收率在93.2%~99.6%之间,RSD为0.814%~2.546%。

表2 花生和花生油样品中黄曲霉毒素的加标回收率和相对标准偏差(n=3)

样品	黄曲霉毒素	加入量/ng	测定值/ng	回收率/%	RSD/%
花生	$B_1$	0.50	0.443	88.7	1.595
	$B_2$	0.15	0.132	88.0	0.424
	$G_1$	0.50	0.441	88.2	4.879
	$G_2$	0.15	0.124	82.6	1.485
	$B_1$	1.50	1.402	93.5	2.97
	$B_2$	0.50	0.468	94.6	1.475
	$G_1$	1.50	1.369	91.3	3.606
	$G_2$	0.50	0.446	89.2	1.075
花生油	$B_1$	0.50	0.490	98.1	0.849
	$B_2$	0.15	0.146	97.4	1.273
	$G_1$	0.50	0.482	96.5	1.061
	$G_2$	0.15	0.140	93.2	1.484
	$B_1$	1.50	1.493	99.5	0.814
	$B_2$	0.50	0.498	99.6	2.333
	$G_1$	1.50	1.483	98.9	2.546
	$G_2$	0.50	0.473	94.6	1.697

### 3 结论

本文建立了SMART柱在线全自动净化系统结合高效液相色谱法串联UVE柱后衍生荧光同时测定花生和花生油中4种黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ 的方法。所建立方法灵敏度高、检测时间短、重复性好、结果准确可靠,获得的目标分析物质的检出限满足国内外的限量要求,适合于食品中多种黄曲霉毒素的同时快速检测。

#### 参考文献:

- [1] 杨红梅,王浩,郭启雷,等.凝胶渗透色谱-高效液相色谱法测定植物油中黄曲霉毒素 $B_1$ 、 $B_2$ 、 $G_1$ 、 $G_2$ [J].食品科技,2013,38(12):325-328
- [2] 胡文彦,许磊,杨军,等.基于QuEChERS提取的快速液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷基辅助食品中的9种真菌毒素[J].色谱,2014,32(2):133-138
- [3] 李向丽,谭贵良,梁波,等.多功能柱净化-超高效液相色谱串联质谱法同时测定水产品中11种真菌毒素[J].现代食品科技,2015,31(7):342-346
- [4] 田瑞红,孙健平.HPLC技术分析测定黄曲霉毒素的研究进展[J].食品研究与开发,2015,36(6):149-152
- [5] 朱鹏飞,刘文卫,凌霞,等.光化学衍生-高效液相色谱法测定粮谷类样品中黄曲霉毒素[J].食品安全质量检测学报,



# 近红外免疫层析法快速检测O1群小川型霍乱弧菌方法的建立与应用

张捷<sup>1,2</sup>, 畅晓晖<sup>1,2</sup>, 杨耀武<sup>3</sup>, 赵琢<sup>4</sup>, 李小林<sup>1,2</sup>, 杨向莹<sup>1,2\*</sup>, 陈广全<sup>1,2</sup>  
(1.北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 北京 100026; 2.出入境食品安全检测北京市重点实验室, 北京 100026; 3.中国合格评定国家认可中心, 北京 100062; 4.天津出入境检验检疫局工业产品安全技术中心, 天津 300308)

**摘要:** 目的: 建立一种快速检测O1群小川型霍乱弧菌的近红外免疫层析方法。方法: 利用近红外免疫层析技术, 采用双抗体夹心法检测O1群小川型霍乱弧菌, 制备靶向于O1群小川型霍乱弧菌的免疫层析试纸条。结果: 整个检测方法在45 min内即可完成, 检测O1群小川型霍乱弧菌的最低检出浓度为 $1 \times 10^2$  cfu/mL。特异性实验表明, 该试纸条与O1群小川型霍乱弧菌样品发生特异性反应, 与沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、志贺氏菌、单增李斯特菌、副溶血弧菌无交叉反应。与常用的胶体金方法相比, 近红外免疫层析法对靶标菌的灵敏度提高了100倍。结论: 新研制的O1群小川型霍乱弧菌试纸条具有特异性强、灵敏度高的特点, 实验简单、方便, 满足口岸现场快速检测的需要, 提高检验检疫效率。

**关键词:** O1群小川型霍乱弧菌; 免疫层析实验; 近红外免疫法; 快速检测  
**中图分类号:** TS 207.4      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1005-9989(2016)12-0290-06  
**DOI:**10.13684/j.cnki.spkj.2016.12.058

## Establishment and application of fast detection of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa based on near-infrared immunochromatography

ZHANG Jie<sup>1,2</sup>, CHANG Xiao-hui<sup>1,2</sup>, YANG Yao-wu<sup>3</sup>, ZHAO Zhuo<sup>4</sup>,  
LI Xiao-lin<sup>1,2</sup>, YANG Xiang-ying<sup>1,2\*</sup>, CHEN Guang-quan<sup>1,2</sup>

(1.Beijing Entry-Exit Inspection Quarantine Bureau Inspection Quarantine Technical Center, Beijing 100026; 2.Beijing Key Laboratory of Entry-Exit Food Safety Testing, Beijing 100026;

收稿日期: 2016-05-25      \*通讯作者  
基金项目: 质检公益性行业科研专项(201410049); 国家质检总局科技计划项目(2015IK011)。  
作者简介: 张捷(1965—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品安全评价。

2016,7(5):1798-1801

[6] 曾涛,罗晓燕,胡国媛,等.茶叶中黄曲霉毒素的碘柱后衍生化和光化学柱后衍生化-高效液相色谱法比较[J].中国卫生检验杂志,2016,26(3):323-325

[7] 王江蓉,林华,刘纯友.免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生化-高效液相色谱法检测粮油中黄曲霉毒素[J].粮油食品科技,2012,20(2):34-36

[8] 陈瑞春,段文仲,吕红英,等.免疫亲和柱净化-高效液相色谱法同时测定牛乳和乳粉中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>[J].食品科技,2011,36(8):300-304