

油脂安全

免疫亲和柱净化 - 高效液相色谱法测定 玉米油中 F-2 毒素含量的研究

罗建光

(江苏食品药品职业技术学院 食品学院, 江苏 淮安 223003)

摘要:建立免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定玉米油中 F-2 毒素的方法。样品经前处理后通过免疫亲和柱净化,采用高效液相色谱仪-荧光检测器进行检测。该方法最佳测定条件为:选用 IAC-AZ 型免疫亲和柱,柱吸附容量 4 μg ;流动相乙腈-甲醇-水(体积比 46:46:8),流速 1.0 mL/min;提取溶剂乙腈-水(体积比 90:10)。F-2 毒素的质量浓度在 0~250 ng/mL 的范围内与峰面积呈良好的线性关系,方法检出限为 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均回收率为 92.46%,RSD 为 0.942%~1.758%。该方法操作简便快捷、准确度高、重现性好,适用于玉米油中 F-2 毒素的测定。

关键词:F-2 毒素;玉米油;免疫亲和柱;高效液相色谱法

中图分类号:TS225.1;TQ646 文献标识码:A 文章编号:1003-7969(2018)05-0088-04

Determination of F-2 toxin in corn oil by immune-affinity column purification and HPLC

LUO Jianguang

(School of Food, Jiangsu Food & Pharmaceutical Science College, Huai'an 223003, Jiangsu, China)

Abstract: A method for determination of F-2 toxin in corn oil by immune-affinity column purification and HPLC was established. The sample was firstly pretreated, then purified by immune-affinity column and determined by HPLC with fluorescence detector. The optimal determination conditions were obtained as follows: IAC-AZ immune-affinity column, column adsorption capacity 4 μg , acetonitrile-methanol-water (volume ratio 46:46:8) as mobile phase, flow rate 1.0 mL/min, extraction solvent acetonitrile-water (volume ratio 90:10). The results showed that the mass concentration of F-2 toxin had good linear relationship with peak area in the range of 0-250 ng/mL, the recovery was 92.46% with RSD 0.942%-1.758%, and the limit of detection was 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The method was simple and easy to operate with high accuracy and good reproducibility, and it was suitable for the determination of F-2 toxin in corn oil.

Key words: F-2 toxin; corn oil; immune-affinity column; HPLC

F-2 毒素(ZEN)又称玉米赤霉烯酮,主要由禾谷镰刀菌、三线镰刀菌和雪腐镰刀菌等菌种产生的一种真菌毒素^[1-2]。F-2 毒素最初是从赤霉病玉米中分离出来的^[3],主要污染玉米、燕麦、小麦等粮食谷物及饲料。F-2 毒素具有较强的生殖毒性和致畸作用,可导致动物不孕或流产,这不仅对家禽家

畜造成了很大影响,也给畜牧业带来了巨大的经济损失^[4]。我国是玉米油的生产及销售大国,食用含有过量 F-2 毒素的食物,会使肿瘤的发生率增加,引起中枢神经系统的中毒症状。

近年来,F-2 毒素的致畸致毒性受到国内外越来越多研究者的重视。欧盟国家规定精炼玉米油中 F-2 毒素的含量不能超过 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5],但我国对玉米油中 F-2 毒素还没有做出明确的限量标准。

目前,国内外检测 F-2 毒素的方法有很多种,

收稿日期:2017-07-24;修回日期:2017-12-21

作者简介:罗建光(1968),男,副教授,博士,研究方向为食品生物技术(E-mail)605958962@qq.com。

如酶联免疫法^[5]、液相色谱-串联质谱法^[6]、高效液相色谱法^[7-8]、气相色谱法-串联质谱^[9]等。其中最常选择的是高效液相色谱法,但其测定方法仍不成熟^[7]。因此,本文在 GB 2009.209—2016 的基础上,对检测条件进行了优化。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

含 F-2 毒素及不含 F-2 毒素玉米油:江苏省淮安市好又多超市。

甲醇、乙腈:色谱纯;F-2 毒素标准品:纯度 ≥ 98%;其余试剂均为分析纯;水为符合国家标准的一级水。

电子天平;玻璃注射器:北京琛达射频识别技术有限公司;试验筛;空气压力泵:上海摩腾机电设备有限公司;高速均质器:上海精创电器制造有限公司;荧光检测器:美国 Organomation 公司;高效液相色谱仪:日本岛津公司;ZearaTest 型 F-2 毒素免疫亲和柱:北京泰乐祺科技有限公司;IAC-AZ 型 F-2 毒素免疫亲和柱:美国 VICAM 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

磷酸盐缓冲溶液:准确称取 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 990 mL 水将以上试剂溶解,再用浓盐酸调节 pH 至 7.0,最后用水定容到 1 L。

F-2 毒素标准储备液:准确称取一定量的 F-2 毒素标准品,用甲醇-乙腈(体积比 1:1)溶解,并配制成 0.1 mg/mL 的标准储备液,然后在 -20℃ 下低温保存。

F-2 毒素系列标准使用液:准确吸取一定量的 F-2 毒素标准储备液,用流动相稀释,配成 0、50、100、150、200、250 ng/mL 的系列标准使用液。4℃ 下低温保存。

1.2.2 标准曲线的绘制

准确吸取一定量的 F-2 毒素系列标准使用液,进行高效液相色谱检测,以 F-2 毒素的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。高效液相色谱条件: C₁₈ 色谱柱(5 μm, 150 mm × 4.6 mm);流动相为乙腈-甲醇-水(体积比 46:46:8);流速 1.0 mL/min;柱温 35℃;激发波长 274 nm,发射波长 440 nm;进样量 20 μL。

1.2.3 样品的前处理

称取 50.000 0 g 的玉米油于 100 mL 容量瓶,再

加入 5 g 氯化钠,用乙腈-水(体积比 90:10)^[10]定容并充分混匀,转至均质杯中,高速搅拌提取 2 min。用定量滤纸进行过滤,移液管移取 10 mL 滤液于 50 mL 容量瓶中,加水定容并充分混匀,用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集澄清滤液放于干净的容器内。

1.2.4 净化

将免疫亲和柱与玻璃注射器相连接,吸取上述滤液 10 mL 注入玻璃注射器中。将空气压力泵与玻璃注射器相互连接并调节压力,使溶液以约 1 滴/s 的流速进入免疫亲和柱,直到空气通过免疫亲和柱。依次用 10 mL 磷酸盐缓冲溶液和 10 mL 的水淋洗免疫亲和柱,流速为 1~2 滴/s,直到空气完全通过免疫亲和柱,弃去全部流出液,抽干小柱。

1.2.5 洗脱

准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱,流速为 1 滴/s,收集全部洗脱液于玻璃试管中,用甲醇定容至 1 mL,按照 1.2.2 进行高效液相色谱测定,并带入标准曲线方程中计算 F-2 毒素含量。

2 结果与讨论

2.1 条件优化

2.1.1 提取溶剂的优化

本实验在免疫亲和柱吸附容量 4.0 μg、其他条件不变的情况下,考察提取溶剂对 F-2 毒素回收率的影响。结果见图 1。

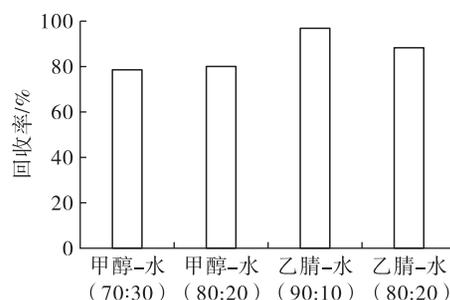


图 1 提取溶剂对 F-2 毒素回收率的影响

由图 1 可知,以乙腈-水(体积比 90:10)为提取溶剂时,F-2 毒素的回收率最高,因此选用乙腈-水(体积比 90:10)作为玉米油中 F-2 毒素的提取溶剂。

2.1.2 免疫亲和柱的选择

在其他条件不变的情况下,用 ZearaTest 型免疫亲和柱与 IAC-AZ 型免疫亲和柱进行 F-2 毒素回收率的对比分析。实验结果见表 1、表 2。

从表 1、表 2 可以看出,IAC-AZ 型免疫亲和柱的回收率高于 ZearaTest 型免疫亲和柱的回收率。所以,本实验选用 IAC-AZ 型免疫亲和柱。

表1 ZearaTest 型免疫亲和柱回收率的实验结果

添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)						平均回收率/%
	1	2	3	4	5	平均值	
9.5	9.5	9.4	9.6	10.2	10.6	9.9	104.2
60	58.6	56.5	52.4	52.7	51.3	54.3	90.5
200	190.5	193.6	186.5	175.7	188.8	187.0	93.5

表2 IAC-AZ 型免疫亲和柱回收率的实验结果

添加水平/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)						平均回收率/%
	1	2	3	4	5	平均值	
9.5	9.4	9.7	9.5	10.2	10.7	9.9	104.2
60	58.9	58.6	57.5	58.7	56.6	58.1	96.8
200	182.6	198.7	176.9	195.4	188.7	188.5	94.2

2.1.3 免疫亲和柱的吸附容量优化

在其他条件不变的情况下,改变 IAC-AZ 型免疫亲和柱的吸附容量为 1、2、3、4、5、6 μg ,考察免疫亲和柱吸附容量对 F-2 毒素回收率的影响,结果见图 2。

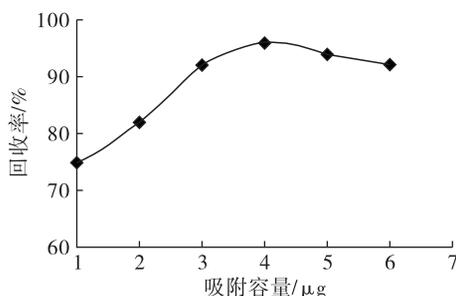


图2 IAC-AZ 型免疫亲和柱的吸附曲线

由图 2 可知,IAC-AZ 型免疫亲和柱的吸附容量为 4 μg 时对应回收率最高。当吸附容量超过 4 μg 时,回收率变化不大。因此,在实际测定时需根据 F-2 毒素含量的大致水平,对样液进行适当的稀释,可以取得理想的回收率。

2.1.4 流速的优化

在其他条件不变的情况下,改变流速分别为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 mL/min,考察流速对 F-2 毒素回收率的影响,结果见图 3。

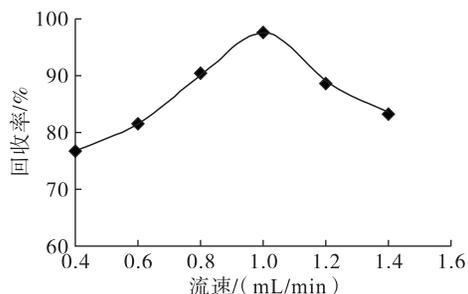


图3 流速对 F-2 毒素回收率的影响

由图 3 可知,在流速为 1.0 mL/min 时,F-2 毒素的回收率最高。此时色谱峰无前沿峰及拖尾峰,色谱峰形对称,检测效果较满意。因此,实验选择

1.0 mL/min 的流速。

2.2 标准曲线

按照 1.2.2 绘制标准曲线,F-2 毒素的质量浓度在 0~250 ng/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系,线性方程为 $y = 2941.4x - 10472$, $R^2 = 0.9914$ 。检出限为 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.3 精密度实验

采用上述方法测定玉米油中 F-2 毒素峰面积,并带入标准曲线中,计算出 F-2 毒素含量为 3.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在此基础上进行 5 次重复测定,计算精密度,结果见表 3。

表3 精密度实验结果($n=5$)

测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD/%
3.49	1.758
3.51	1.664
3.53	0.942

由表 3 可知,RSD 为 0.942%~1.758%,精密度符合要求。

2.4 加标回收实验

分别添加 10、50、500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ F-2 毒素标准品于空白玉米油中,按照本实验方法及色谱条件进行加标回收实验,每个添加水平重复进行 5 次测定。结果见表 4。

由表 4 可知,回收率在 88.80%~95.12% 之间,平均回收率为 92.46%。

3 结论

本实验将免疫亲和柱技术应用到玉米油中 F-2 毒素的测定,提取液经稀释过滤后通过免疫亲和柱净化,通过对 ZearaTest 型免疫亲和柱和 IAC-AZ 型免疫亲和柱的比较,发现 IAC-AZ 型免疫亲和柱的准确性及重复性比 ZearaTest 免疫亲和柱高。采用高效液相色谱仪-荧光检测器进行检测。该方法

最佳条件为选用 IAC - AZ 型免疫亲和柱,柱吸附容量 4 μg ;乙腈 - 甲醇 - 水(体积比 46:46:8)为流动相,流速 1.0 mL/min;乙腈 - 水(体积比90:10)为提取溶剂。该方法在 0 ~ 250 ng/mL 的范围内呈良好的线性关系,检出限为 0.06 $\mu\text{g}/\text{kg}$,精密度 RSD 为

0.942% ~ 1.758%,平均回收率为 92.46%。因此,该方法可以用于玉米油中 F-2 毒素的定量检测。

采用免疫亲和柱作为样品前处理方法,可以获得纯净的样品提取物,减少了有机溶剂乙腈的使用量,具有准确快速、方便重复使用等特点。

表 4 F-2 毒素的加标回收实验

实验号	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%
1	8.73	87.30	45.99	91.98	479.6	99.92
2	8.87	88.70	46.65	93.30	469.5	93.90
3	8.90	89.00	46.33	92.66	475.3	95.12
4	8.96	89.60	47.70	95.40	469.5	93.90
5	8.93	89.30	47.05	94.10	464.0	92.76
平均	8.88	88.80	46.74	93.49	471.58	95.12

参考文献:

- [1] 郑荣,毛丹,张道广,等. HPLC 法测定常用食品中玉米赤霉烯酮[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(11):2266 - 2267.
- [2] 裴娅晓,刘玉兰,许利丽,等. 碱炼脱除玉米油中玉米赤霉烯酮(ZEN)的研究[J]. 中国油脂,2016,41(5):56 - 60.
- [3] 隋凯,李军,卫锋,等. 免疫亲和柱 - 高效液相色谱法检测玉米中的玉米赤霉烯酮[J]. 中国卫生检验杂志,2006,16(6):657 - 658,690.
- [4] 吴文达,王宝杰,蔡兰芬,等. 薄层色谱和高效液相色谱联合检测玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 畜牧与兽医,2010,42(7):17 - 20.
- [5] 孟卫芹,武玉香,唐世云,等. 玉米油中玉米赤霉烯酮的 ELISA 测定[J]. 现代食品科技,2013(6):1431 - 1433.
- [6] 谢丹,邓春丽,赵云峰,等. 北京地区部分市售食用植物油中玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇的污染状况分析[J]. 食品安全质量检测学报,2016(5):2105 - 2113.
- [7] 罗小虎,包清彬,杨潇,等. 高效液相色谱法测定玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 食品科技,2010,35(1):266 - 270.
- [8] 尹青岗,王锋,周洪杰,等. 高效液相色谱法对玉米中玉米赤霉烯酮的测定[J]. 中国粮油学报,2009,24(7):138 - 141.
- [9] 刘苗,甘平胜,朱惠扬,等. 全自动固相萃取 - 气相色谱 - 三重四级杆质谱法检测蔬菜中 23 种农药残留[J]. 中国食品卫生杂志,2016(4):471 - 476.
- [10] 张继斌,汪咏曾,王昕,等. 免疫亲和柱同时净化 - HPLC 法测定高粱中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. 粮食科技与经济,2013,38(6):19 - 20.
- [11] 张宇. 脂肪酶催化猪油合成 L - 抗坏血酸脂肪酸酯性能测定[J]. 中国粮油学报,2013,28(9):109 - 113.
- [7] YANG Z, HUANG Z L. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in ionic liquids[J]. Catal Sci Technol, 2012(2):1767 - 1775.
- [8] GUMELA A M, ANNUAR M S M, HEIDELBERG T, et al. Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters[J]. Process Biochem, 2011(46):2079 - 2090.
- [9] 彭杨,穆青,魏微,等. 超声辅助脂肪酶催化 L - 抗坏血酸脂肪酸酯的合成[J]. 食品科学,2011,32(12):101 - 105.
- [10] 黄振华,刘晨光. 酶催化的多糖酯化反应研究进展[J]. 食品科学,2011,32(21):283 - 289.
- [11] 张宇. 脂肪酶催化猪油合成 L - 抗坏血酸脂肪酸酯[J]. 南京:南京农业大学,2010.
- [12] 马素换,郭萍梅,黄凤洪. 魔芋葡甘聚糖及其油酸酯化物的体外抗氧化初步研究[J]. 中国油脂,2017,42(9):55 - 59.
- [13] 廖启金,李光吉,丁锐,等. 非水介质中酶催化葡甘聚糖的转酯化反应[J]. 天然产物研究与开发,2006(18):198 - 202.
- [14] 杨白靖,俞志刚. 超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J]. 食品与机械,2011,27(1):170 - 174.
- [15] 徐小丽,曹雁平. 超声技术在食品工业中的研究进展[J]. 食品科技,2006,7(4):1 - 4.
- [16] 胡爱军,李立,郑捷,等. 超声波作用下棕榈油酯交换反应的研究[J]. 中国油脂,2015,40(2):36 - 40.

(上接第 69 页)