

论著

高效液相色谱法测定玉米中的黄曲霉毒素

高秀芬 计融 李燕俊 王玉平

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

**摘要:**目的 建立一种定量检测玉米中黄曲霉毒素的高效液相色谱方法。方法 样品用甲醇-盐酸溶液提取、正己烷脱脂,再经二氯甲烷萃取和硅胶柱净化,最后与 TFA 进行衍生反应,以甲醇-乙腈-水为流动相,C<sub>18</sub>柱分离并通过荧光检测器定量。结果 4 种黄曲霉毒素在 15 min 内得到良好的基线分离,样品中 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的检出限分别为 0.04、0.02、0.10 和 0.04 μg/kg。0.10~50.00 μg/kg AFB<sub>1</sub> 加标回收率为 78.2%~85.9%,相对标准偏差为 10%~16%;10.00 和 40.00 μg/kg 总黄曲霉毒素加标回收率分别为 86.5%和 89.2%,相对标准偏差分别为 13%和 9.2%。盲样测定结果在给定浓度范围内。结论 该方法灵敏度高、稳定性好、成本低,可以用于玉米中黄曲霉毒素的定量检测,并具有推广应用的前景。

**关键词:**黄曲霉毒素类;色谱法,高压液相;玉米

Determination of Aflatoxins in Corns by High Performance Liquid Chromatography

GAO Xiu-fen, JI Rong, LI Yan-jun, WANG Yur-ping

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** **Objective** A high performance liquid chromatographic method for the quantitative determination of aflatoxins in corns was established. **Methods** The samples were extracted with methanol-hydrochloric acid, defatted with hexane. The extracts were cleaned by liquid-liquid partitioning with dichloromethane and then applied to silica-gel purification column. After reaction with trifluoroacetic acid, four kinds of aflatoxins were quantified by reverse-HPLC with fluorometric detector, using methanol-toluene-water as mobile phase. The baseline separation of four kinds of aflatoxins was achieved within 15 minutes. **Results** The detection limits for AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub> were 0.04, 0.02, 0.10 and 0.04 μg/kg, respectively. The recoveries of samples spiked with AFB<sub>1</sub> of 0.10~50.00 μg/kg were 78.2%~85.9%, with the relative standard deviations of 10%~16%. The recoveries of samples spiked with total aflatoxins of 10.00 and 40.00 μg/kg were 86.5% and 89.2%, respectively, with the relative standard deviations of 13% and 9.2%, respectively. The detections of a blind sample gave results within the given range of concentration. **Conclusion** This method is highly sensitive, stable with low cost, and can be used to detect aflatoxins in corn quantitatively.

**Key word:** Aflatoxins, Chromatography, High Pressure Liquid; Corn

Blackwell science inc,1997.

[4] NEIL C E O,LEHRER S B. Seafood allergy and allergens:a review: the Institute of Food Technologists [ C ]. Expert Panel Food Satety Nutrition,2000.

[5] BYUN M W, KIM J H. Effects of Gamma Radiation on the Conformational and Antigenic Properties of a Heat-Stable Major Allergen in Brown Shrimp[J]. Food Protect ,2000 ,7 :940 - 944.

[6] LEEJ W, YOOK H S, LEE K H,et al. Conformational changes of myosin by gamma radiation[M]. Radiat Phys Chem , 1999.

[7] 李振兴,林洪,靳晓梅,等. 利用电泳纯化的微量虾类过敏原制备多克隆抗体[J]. 水产学报,2005 ,30(2) :281-284.

[8] NAGPAL S, RAJAPPA L, METCAEFE D, et al. Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (Penaeus indicus) [J]. Allergy Clin Immunol,1989 ,83(1) :26-36.

[9] THAYER D W. Food irradiation: benfits and concerns [J ]. J Food Qual ,1990 ,13 :147-169.

[收稿日期:2007-02-01]

中图分类号:R15 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2007)02-0102-04

基金项目:“十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术”课题(2001BA804A3205)

作者简介:高秀芬 女 硕士

通讯作者:计融 男 研究员

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

黄曲霉毒素是某些真菌在生长繁殖过程中产生的一组有毒代谢产物,主要由黄曲霉和寄生曲霉产生,能污染多种农作物,包括粮谷、坚果、油料种子和香料等,其中玉米、花生最易受到污染。由于其广泛存在性及其毒性,黄曲霉毒素被普遍认为是一种造成全球范围危害的真菌毒素。天然污染的黄曲霉毒素主要有 4 种,分别为黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> (简称为 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>)。黄曲霉毒素的检测方法有多种,包括薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)等,而其中荧光检测 HPLC 方法因其灵敏、稳定等特点,是最为广泛应用的定量分析方法<sup>[1]</sup>。本研究建立了一种可以用于玉米中 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 检测的 HPLC 方法。

## 1 材料与方法

1.1 试剂 分析纯甲醇、二氯甲烷、正己烷、苯、无水乙醚、丙酮、盐酸、乙酸、氯化钠、无水硫酸钠(20~40 目)均为西陇化工产品;色谱纯甲醇、乙腈,均为克来顿产品;三氟乙酸和黄曲霉毒素标准品均为 Sigma 产品;去离子水 自制。硅胶 60(0.063~0.200 mm, E. Merck 产品,使用前先活化,100 °C 加热 4 h,冷却至室温后按 1 ml/100 g 分次加入水,每次间充分混匀,加完后机械振荡 4~6 h,密闭容器放置 16 h 以上),玉米粉盲样为 VICAM 产品(AFB<sub>1</sub> 含量 5.9~10.9 µg/kg)。

1.2 仪器设备 Waters600 型高效液相系统、Waters2475 型荧光检测器、PALL PURELAB PLUS 纯水仪、TECAN 样品浓缩仪、上海亚荣旋转蒸发器、哈尔滨东联电子振荡器。

1.3 色谱条件 色谱柱为 Hypesil BDS C<sub>18</sub> 柱,4.6 mm ×150 mm,5 µm;流动相为甲醇+乙腈+水混合溶液(17+17+70,体积分数),流速 1 ml/min;检测器激发波长 360 nm,发射波长 440 nm;进样量 20 µl。

1.4 试样提取净化及衍生方法 粉碎试样通过 20 目筛,混匀后取 50 g 至 500 ml 具塞锥形瓶中,加入 200 ml 甲醇和 50 ml 0.1 mol/L 盐酸,高速振荡提取 10 min,静置后过滤上清液。取 50 ml 滤液至 250 ml 分液漏斗中,向分液漏斗中加入 50 ml 10% 氯化钠溶液,手动混合均匀,再向该分液漏斗中加入 50 ml 正己烷,手动提取约 1 min,静置分层,如有乳化,滴加少许甲醇促使分层。下层转移至另一分液漏斗,在分液漏斗中加入 25 ml 二氯甲烷,萃取分离。将二氯甲烷层收集到 150 ml 茄形瓶中,再重复萃取 2 次,收集到同一茄形瓶中,40 °C 旋转蒸发至剩余大约 2 ml 液体。

向 100 ml 烧杯中加入 2.0 g 硅胶,再加入约 20 ml 乙醚+正己烷(3+1),玻璃棒搅动使硅胶悬浮,倒入加有脱脂棉塞的玻璃柱中,冲洗烧杯及柱壁,使硅胶全部进入玻璃柱中。硅胶自然下沉完全后,打开活塞(排干过程中,加入约 1 cm 柱高的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 颗粒),使液面排至硫酸钠层上端,关闭活塞。将浓缩的提取液加入柱中,用 3~4 ml 二氯甲烷清洗茄形瓶,洗液一并加入柱中。

打开活塞,控制流速约 1 滴/s,液面流至硫酸钠层上端后,分别加入 25 ml 苯+乙酸(9+1)和 30 ml 乙醚+正己烷(3+1)进行洗涤(此时可适当加快流速,排干至 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的上端),弃去洗涤液。用 100 ml 二氯甲烷+丙酮(9+1)洗脱,收集洗脱液到 150 ml 茄形瓶中,40 °C 旋转蒸发至剩余大约 5~6 ml,移入 10 ml 试管中,并用少许二氯甲烷清洗茄形瓶,清洗液一并移入试管中。在 40 °C 铝加热块中,氮气吹干。

向提取物试管中加入 200 µl 正己烷和 50 µl 三氟乙酸(TFA),立即于涡旋混合器上混合 30 s,静置 5 min,再向试管中加入 1.950 ml 水+乙腈(9+1),混合 30 s,静置分层 10 min。下层水相用于液相色谱测定,该 2.0 ml 水相测定液相当于 10 g 试样。

1.5 浓度计算 采用单点校正法,以 50 ng/ml AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 和 25 ng/ml AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 的峰面积为参比,试样中某成分的峰面积与相应的参比峰面积相比较,求得试样测定液中黄曲霉毒素的浓度,再由测定液与原试样的关系(2 ml 测定液相当于 10 g 试样)换算得样品中的含量,计算公式如下:

$$\text{黄曲霉毒素含量}(\mu\text{g/kg}) = (P/P') \times C \times (2.0/10) \times F$$

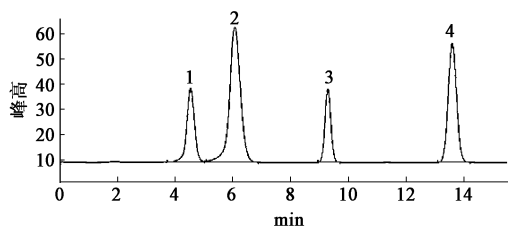
其中  $P$  和  $P'$  分别为试样中黄曲霉毒素和对应标准的峰面积; $C$  是标准浓度,AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 为 50 ng/ml,AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 为 25 ng/ml。 $F$  稀释倍数。

## 2 结果

2.1 色谱分离 在所选用色谱条件下,黄曲霉毒素得到良好的基线分离,4 种毒素在 15 min 内出峰,先后顺序为 AFG<sub>1</sub>、AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>、AFB<sub>2</sub>,图 1 为黄曲霉毒素标准色谱图。

2.2 校正曲线和检出限 以 1.00、5.00、25.00、50.00、100.00 ng/ml 标准作校正曲线,在给定条件下进行 HPLC 分析,以峰面积对浓度做校正曲线, $R^2 > 99.9\%$ ,校正曲线见图 2~5。按照信噪比为 3,AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 和 AFG<sub>2</sub> 的检出限分别为 0.20、0.10、0.50 和 0.20 ng/ml,试样的检出限依次为 0.04、0.02、0.10 和 0.04 µg/kg。

2.3 回收率 向空白样品中添加不同量的黄曲霉



1:AFG<sub>2a</sub> (AFG<sub>1</sub> 的衍生物) 2:AFB<sub>2a</sub> (AFB<sub>1</sub> 的衍生物)  
3:AFG<sub>2</sub> 4:AFB<sub>2</sub>

图1 黄曲霉毒素标准色谱图

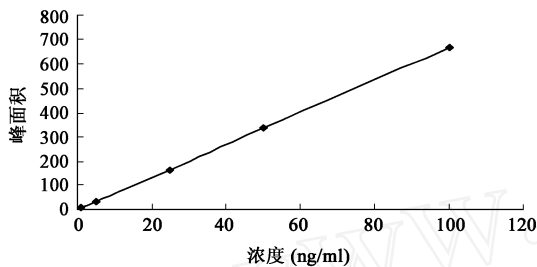


图2 AFB<sub>1</sub> 峰面积对浓度校正曲线

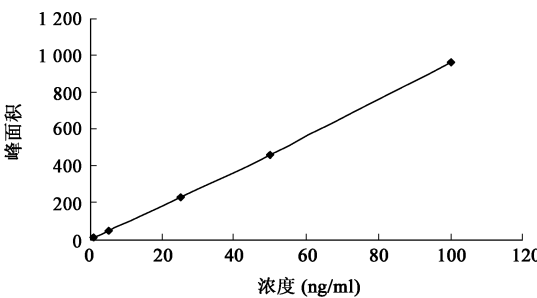


图3 AFB<sub>2</sub> 峰面积对浓度校正曲线

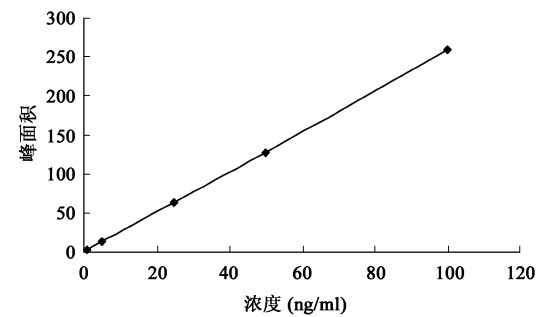


图4 AFG<sub>1</sub> 峰面积对浓度校正曲线

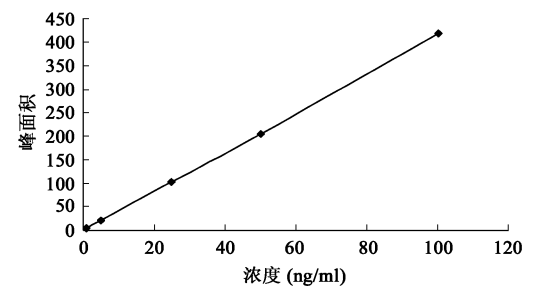


图5 AFG<sub>2</sub> 峰面积对浓度校正曲线

毒素,每个添加量做5份平行样,分别计算 AFB<sub>1</sub> 的回收率和4种毒素的平均回收率。

表1 AFB<sub>1</sub> 回收率

添加量(μg/kg)	回收率(%)	相对标准差(%)
0.10	85.9	16
1.00	78.2	12
10.00	83.5	15
50.00	80.7	10

表2 4种黄曲霉毒素的平均回收率

添加量(μg/kg)	回收率(%)	相对标准差(%)
10.00	86.5	13.0
40.00	89.2	9.2

2.4 盲样测定 从中检维康购买的 VICAM 玉米粉盲样,AFB<sub>1</sub> 的含量范围 5.9 ~ 10.9 μg/kg,3 次测定结果如下,均在给定范围内。

表3 盲样测定结果

样品编号	实测含量(μg/kg)
1	8.60
2	7.23
3	10.49

3 讨论

本研究主要参考 AOAC 990.33<sup>[2]</sup>,并进行了一些改变,使其更易于操作,例如将水浴蒸干改为低压浓缩,加快了实验速度,另外去掉 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 使用前的高温处理,在收集二氯甲烷萃取分离液时,不再通过无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,简化了操作难度,由于后续步骤还有脱水处理,没有降低实验效果。

HPLC 方法在黄曲霉毒素的检测上广泛应用,已经报道了大量不同的方法。在灵敏度方面,不同文献报道的结果稍有差别,但基本在 10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-2</sup> μg/kg 范围内<sup>[3-6]</sup>,本方法的灵敏度也在该范围内,低于绝大多数国家的限量标准,可以满足管理上的需要。在净化方法上,应用较广的有 C<sub>18</sub> 柱、硅胶柱、免疫亲和柱<sup>[7,8]</sup> 以及多功能净化柱<sup>[3,9]</sup> 等,有些净化方法操作简单并可以达到良好的净化效果,如免疫亲和柱和多功能柱,但是这些净化柱价格昂贵,每个样品检测费用需要增加 150 元左右,难以推广使用。本方法使用的硅胶柱,成本仅几元,虽然增加了操作步骤,但大大降低了成本,并且保持了较高的回收率、达到良好的净化效果。本方法使用的 TFA 衍生法与另外几种常用的衍生法如卤族元素衍生、光化学衍生、电化学衍生等相比,不需要特殊的衍生设备,易于实验室开展,大大提高了 AFB<sub>1</sub> 和 AFG<sub>1</sub> 的灵敏度。

论著

HACCP 体系在婴幼儿配方粉生产中的应用研究

李 凌<sup>1</sup> 包大跃<sup>2</sup> 徐 娇<sup>2</sup> 张立实<sup>1</sup> 史根生<sup>2</sup> 张 凤<sup>2</sup> 张贵海<sup>3</sup>

(1. 四川大学华西公共卫生学院,四川 成都 610041; 2. 卫生部卫生监督局,北京 100044;  
3. 石家庄三鹿集团股份有限公司,河北 石家庄 050071)

**摘 要:**目的 为了进一步提高婴幼儿配方粉的卫生质量,确保婴幼儿配方粉的安全。方法 选择在中国具有代表性的采用湿法工艺生产的 1 家企业作为试点单位,参照 CAC 发布的《HACCP 体系及其应用准则》进行现场调查,了解生产工艺,对婴幼儿配方粉生产所涉及的所有环节进行危害分析。确立了原料奶的验收、配料、杀菌浓缩 3 个关键控制点,确定了相应的关键限值和控制措施,建立了监控、纠偏、验证程序和文件记录保存系统。结论 建立的 HACCP 体系合理有效,能够充分保障婴幼儿配方粉的卫生质量和安全。

**关键词:**危害分析和关键控制点; 婴儿食品; 乳制品

Study on Application of HACCP in Infant Formula Enterprises

LI Ling, BAO Da-yue, XU Jiao, ZHANG Li-shi, SHI Gen-sheng, ZHANG Feng, ZHANG Gui-hai  
(Public Health School of Sichuan University, Sichuan Chengdu 610041, China)

**Abstract:** **Objective** To improve the hygienic quality of infant formula, the study on the application of HACCP in infant formula enterprises was carried out. **Method** One enterprise in which the representative wet technique was used to produce infant formula was selected as the object. According to "HACCP System and Guidelines for Its Application" issued by CAC, hazard analysis to raw material and each processing step was conducted by investigation of the technical processes on the spot. Three critical control points (CCPs) were defined: the quality of raw milk, mixing the supplementaries, sterilization and condensation. The critical limits and control measures of each CCP were set up as well. The monitor system, corrective actions, verification procedures, and documents and records keeping were also established. **Conclusion** The HACCP system was feasible and effective, and it could ensure the hygienic quality and safety of infant formula.

**Key word:** Hazard Analysis and Critical Control Point; Infant food; Dairy Products

参考文献

- [1] JAIMEZ J, FENTE C A, VAZQUEZ B I. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis[J]. Journal of Chromatography A, 2000, 882: 1-10.

[2] Method for aflatoxins in corn and peanut butter [Z]. AOAC Official Method. 990. 33.

[3] 王君,刘秀梅. 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的高效液相色谱测定方法[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(6): 498-500.

[4] 高军侠,倪余文,万昊雷. 过柱纯化- 高效液相色谱法测定玉米黄曲霉毒素[J]. 生态学杂志, 2005, 24(8): 967-969.

[5] 冯建蕾,许梓荣,史莹华. HPLC 法检测发酵玉米粉中的黄曲霉

[6] 毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> [J]. 中国饲料, 2005, 16: 25-27.

[7] 许梓荣,史莹华,冯建蕾. 光化学衍生法结合 HPLC 测定食品和饲料中的黄曲霉毒素[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(2): 71-75.

[8] 史莹华,许梓荣,冯建蕾. 免疫亲和柱高效液相色谱法测定饲料中的黄曲霉毒素[J]. 中国畜牧杂志, 2005, 41(11): 37-39.

[9] 张鹏,张艺兵,赵卫东. 免疫亲和柱净化、在线电化学衍生化高效液相色谱法检测花生中的黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2000, 18(1): 82-84.

[9] 朱孟丽. 用 MycoSep™ 净化柱和高效液相色谱法对谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 的测定[J]. 饲料工业, 2006, 27(3): 36-38.

[收稿日期: 2006 - 11 - 20]

中图分类号: R15; O657. 72; Q949. 32      文献标识码: A      文章编号: 1004 - 8456(2007)02 - 0105 - 04

作者简介: 李凌 男 硕士生  
通讯作者: 张立实 男 教授 博士生导师