

实验技术与方法

免疫亲和柱——高效液相色谱法测定肾脏中的赭曲霉毒素 A

韩惠雯 黄菲菲

(农业部食品质量监督检验测试中心, 上海 200072)

摘要:目的 针对动物肾脏中可能污染的赭曲霉毒素 A(OTA),建立了肾脏中赭曲霉毒素 A 的高效液相色谱方法。方法 试样用磷酸酸化后经乙酸乙酯提取,免疫亲和柱净化,以乙腈-水-冰醋酸(450+525+25)为流动相,C₁₈柱分离并通过荧光检测器定量。结果 赭曲霉毒素 A 标准溶液浓度在 0.10~20 μg/L 范围内呈线性相关($r=1.0000$),不同浓度水平的添加回收率为 72.5%~87.4%,检出限为 0.012 μg/kg。结论 使用免疫亲和柱净化能够达到良好的净化效果,是一种准确、方便的测定猪肾中赭曲霉毒素 A 的分析方法。

关键词:食品污染;真菌毒素;化学分析;色谱法,亲和;色谱法,高压液相;肾

Determination of Ochratoxin A in Kidney by Immunoaffinity Column and High Performance Liquid Chromatography

HAN Hui-wen, HUANG Fei-fei

(Shanghai Food Quality Supervision and Inspection Center of Ministry of Agriculture of China, Shanghai 200072, China)

Abstract: Objective To develop a method on Ochratoxin A (OTA) in kidney determinate by immuno-affinity column (IAC) and high performance liquid chromatography (HPLC). **Method** Samples were extracted by ethyl acetate, after cleaned up by

表 1 方法的准确度、精密度实验

本底值 (μg)	加标值 (μg)	测定值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD %
2.0	1.0	2.7	90.0	93.3	7.51
		3.1	103.3		
		2.8	93.3		
		2.6	86.7		
		3.0	100.0		
		2.6	86.7		
		3.0	100.0		
2.0	4.0	5.8	96.7	94.2	6.00
		5.5	91.7		
		5.9	98.3		
		5.4	90.0		
		5.2	86.7		
		6.1	101.7		
		5.8	96.7		
2.0	7.5	8.1	85.2	90.3	7.16
		8.9	93.6		
		9.4	98.9		
		7.7	81.0		
		8.9	93.6		
		8.5	89.5		
		8.5	89.5		

表 2 实际样品中阿魏酸的测定

样品编号	检测结果
1	2.04 mg/100 ml
2	1.89 mg/100 ml
3	1.56 mg/100 ml
4	4.32 mg/100 g
5	4.00 mg/100 g
6	3.68 mg/100 g

参考文献

- [1] 胡益勇,徐晓玉. 阿魏酸的化学和药理研究进展. 中成药[J]. 2006,28(2):253-255.
- [2] 张惠,李祥,周红燕,等. HPLC 法测定脉络宁注射液中阿魏酸含量. 医学进展[J]. 2008,32(12):556-558.
- [3] 毕跃峰,田野,裴珊珊,等. 金银花化学成分分析. 郑州大学学报[J]. 2007,39(2):184-186.
- [4] 李波霞,魏玉辉,段好刚,等. HPLC 法测定四物合剂中芍药苷和阿魏酸的含量. 中国药房[J]. 2008,19(36):2853-2854.
- [5] 程东岩,王隶书,王海生,等. 高效液相色谱法测定慈航颗粒中阿魏酸的含量. 中国实验方剂学杂志[J]. 2008,14(11):16-17.

[收稿日期:2009-03-18]

结果与药检部门用其他方法检测的结果是一致的,说明该方法是适用的。

中图分类号:R15;O652.63;TS207.3;O656 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2009)03-0248-03

作者简介:韩惠雯 女 高级畜牧师

IAC. The contents of OTA were quantified by reverse-HPLC with fluorometric detector, and acetonitrile-water-acetic acid (450 + 525 + 25) were used as mobile phase. **Results** The method had a good relativity ($r = 1.0000$) and good analytic precision ($RSD < 10\%$). The recoveries of the method were within the scope of 72.5% ~ 87.4% with the LOD of 0.012 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Conclusion This method was fast, simple, reliable and could be applied in the determination of OTA in kidney.

Key words: Food Contamination; Mycotoxins; Chemistry, Analytical; Chromatography, Affinity; Chromatography, High Pressure Liquid; Kidney

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 是由曲霉属和青霉属的某些菌种产生的次生代谢产物。赭曲霉毒素广泛分布于饲料及饲料原料中,并已在许多食品中检测到了赭曲霉毒素 A,如咖啡、啤酒、葡萄酒、巧克力和奶制品等^[1]。动物试验表明赭曲霉毒素 A 对肾脏、肝脏等具有较强的毒性。目前对食品、农产品中赭曲霉毒素 A 的检测方法主要有薄层色谱法^[2]、酶联免疫法^[3]、免疫亲和柱净化荧光光度法和免疫亲和柱净化高效液相色谱法^[4-6]、固相萃取高效液相色谱法^[7]等。资料表明,赭曲霉毒素 A 在动物体内有残留,并且在肝脏及肾脏内有较高的残留^[8]。本法采用免疫亲和柱净化内脏样品,高效液相色谱法检测猪肾中的赭曲霉毒素 A 含量。

1 材料与与方法

1.1 试剂

乙酸乙酯、氯化钠、无水磷酸氢二钠、无水磷酸二氢钾、氯化钾、磷酸、醋酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈、冰醋酸(色谱纯, Sigma 公司)赭曲霉毒素 A 标准品(Biopure 公司);实验用水自制。

磷酸盐缓冲液(PBS):称取 8.0 g 氯化钠,1.44 g 无水磷酸氢二钠,0.2 g 无水磷酸二氢钾和 0.2 g 氯化钾,用水溶解并定容至 1 L,用盐酸或氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.4。

赭曲霉毒素 A 标准品:纯度 99%(Biopure);赭曲霉毒素 A 标准储备溶液:用乙腈配制 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的赭曲霉毒素 A 标准储备液,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用;赭曲霉毒素 A 标准工作溶液:准确移取适量的赭曲霉毒素 A 标准储备液,用乙腈稀释成标准工作溶液。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪(配有荧光检测器),美国 VIRIAN 公司;免疫亲和柱 Ochrastar IAC Column,新加坡 Romer Labs 公司;氮吹仪,上海安谱科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 试样处理 准确称取 5.0 g 试样于 50 ml 离心管中,加入 5 ml 磷酸溶液(1 mol/L),漩涡震荡,加入 10 ml 乙酸乙酯,震荡 1 h,离心,将有机相转移至另一个 50 ml 离心管中,重复上述提取步骤一次,合

并有有机相,在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下氮气吹至尽干。

在上述离心管中加入 4 ml 乙腈-水混合液(60 + 40)进行溶解,加入 28 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)混匀,如有混浊,过滤,取清液待测。将稀释的样液全部通过免疫亲和柱,用 2 \times 10 ml 醋酸铵溶液(0.2 mol/L)洗涤柱子,再用 3 \times 1 ml 甲醇/冰醋酸(98 + 2)混合液进行洗脱,由 5 ml 试管收集洗脱液。将洗脱液在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下,氮气吹至近干,用 0.5 ml 流动相溶解残渣,漩涡振荡 1 min,经 0.45 μm 滤膜过滤,待高效液相色谱用。

1.3.2 色谱条件 色谱柱为 ODS C_{18} 柱,150 mm \times 4.6 mm(i.d.),粒径 5 μm ;流动相为乙腈-水-冰醋酸溶液(450 + 525 + 25,体积分数);流速 1.0 ml/min;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;荧光检测器激发波长 330 nm,发射波长 460 nm;进样量为 50 μl 。

1.3.3 赭曲霉毒素 A 标准品的高效液相色谱图见图 1。

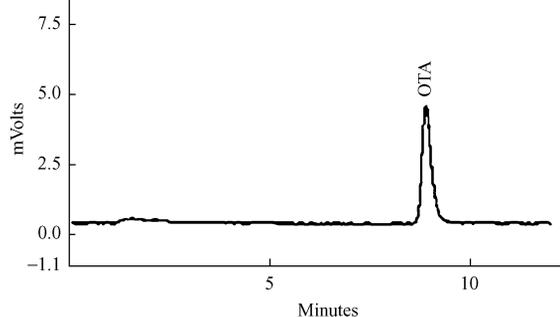


图 1 赭曲霉毒素 A 标准溶液的高效液相色谱图

2 结果与讨论

2.1 方法的线性关系

以流动相为溶剂,配成赭曲霉毒素 A 含量分别为 0.10、0.25、0.50、1.0、5.0、10、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准系列,在规定的色谱条件下进行测定,赭曲霉毒素 A 系列标准溶液的液相色谱响应值与浓度的线性关系见表 1。测定表明,在该浓度范围内,峰面积与浓度呈线性关系,符合定量要求,其相关系数 r 为 1。

2.2 检出限

当信噪比 $S/N = 3$,取样量为 5 g,定容体积为 0.5 ml 时,本方法的检出限(LOD)为 0.012 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.3 准确度及精密度

本实验对猪肾分别进行了 0.02、0.10、0.50

表1 赭曲霉毒素A标准溶液浓度与响应值的线性关系

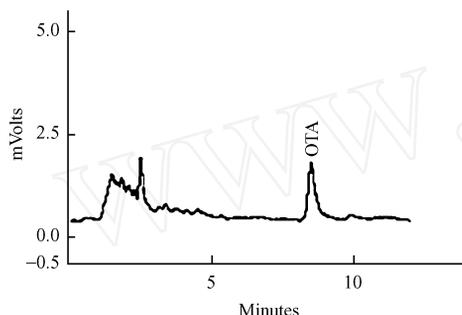
浓度($\mu\text{g/L}$)	0.10	0.25	0.50	1.0	5.0	10	20
峰面积	1294	3183	6420	12960	64620	130820	263692

注:线性方程: $y = 13\,178x - 376.72 (r = 1)$

$\mu\text{g/kg}$ 3个浓度的加标回收,实验结果见表2。加标浓度为 $0.50\ \mu\text{g/kg}$ 的猪肾样品的液相色谱图见图2。

表2 内脏中赭曲霉毒素A的添加回收精密度试验

	添加水平($\mu\text{g/kg}$)			
	0.020	0.10	0.50	
测定值($\mu\text{g/kg}$)	1	0.0140	0.0771	0.434
	2	0.0145	0.0732	0.429
	3	0.0143	0.0722	0.436
	4	0.0146	0.0820	0.446
	5	0.0153	0.0750	0.439
平均测定值($\mu\text{g/kg}$)	0.0145	0.0759	0.437	
平均回收率(%)	72.5	75.9	87.4	
RSD%	3.2	5.4	1.4	

图2 加标浓度 $0.50\ \mu\text{g/kg}$ 的高效液相色谱图

从表2中可以看出,试样的总体加标回收率范围为 $72.5\% \sim 87.4\%$,符合赭曲霉毒素A的检测要求,方法的准确度满足建立该方法的要求。对每个浓度的标准溶液添加回收进行5次平行测定,RSD范围为 $1.4\% \sim 5.4\%$,见表2。

2.4 猪肾样品进行赭曲霉毒素A的测定

选择10个猪肾样品进行OTA测定,测定结果有8个样品为未检出,有2个样品为阳性,含量分别为 $0.092, 0.64\ \mu\text{g/kg}$ 。空白样品及阳性样品的色谱峰分别见图3、图4。

3 结论

本方法采用免疫亲和柱净化,高效液相色谱法检测猪肾中的赭曲霉毒素A含量。对猪肾分别进行了 $0.02, 0.10, 0.50\ \mu\text{g/kg}$ 3个浓度的加标回收,添加回收率为 $72.5\% \sim 87.4\%$,检出限为 $0.012\ \mu\text{g/kg}$ 。使用免疫亲和柱净化能够达到良好的净化效果,是

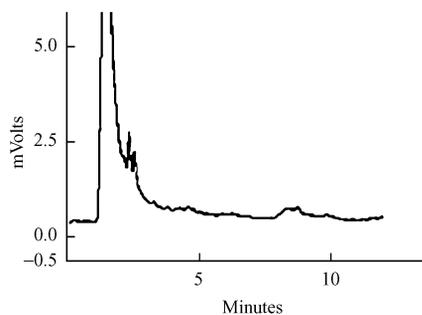


图3 空白样品的高效液相色谱图

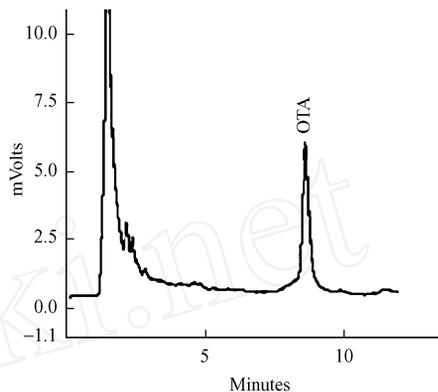


图4 阳性样品高效液相色谱图

一种准确、方便的测定猪肾中赭曲霉毒素A的分析方法。

参考文献

- [1] 李凤琴. 赭曲霉毒素A分析方法进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2004, 16(4): 545-550.
- [2] GB/T 13111—2003. 谷物和大豆中赭曲霉毒素A的测定方法[S].
- [3] DE SAEGER S, VAN PETEGHEM C. Flow-through membrane based enzyme immunoassay for rapid detection of ochratoxin A in wheat[J]. Fod Prot, 1999, 62: 65.
- [4] 褚庆华, 郭德华, 王敏, 等. 谷物和酒类中赭曲霉毒素A的测定[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29(4): 109-112.
- [5] 褚庆华, 郭德华, 王敏, 等. 香辛料和藤蓼水果干中赭曲霉毒素A的测定[J]. 化学试剂, 2006, 28(10): 597-600.
- [6] 李军, 于一茫, 田苗, 等. 免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生-高效液相色谱法同时检测粮谷中的黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A[J]. 色谱, 2006, 24(6): 581-584.
- [7] 马莉, 李珊, 牛凌梅, 等. 固相萃取-高效液相色谱检测啤酒中赭曲霉毒素A[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(8): 1345-1346.
- [8] KRISZTINA Bir ó, L. ÁSZL Ó Solti, ILDIKÓ Barna-Vetr ó, et al. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. Avian Pathology, 2002, 31, 141-148.

[收稿日期: 2009-01-10]

中图分类号: R15; O65; O657.7; O658; R991 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2009)03-0250-03