

## 实验技术与方法

毛细管电泳-化学发光联用法检测粮食中的伏马菌素 B<sub>1</sub>王晓琳<sup>1</sup>, 杜红珍<sup>1</sup>, 李增宁<sup>1</sup>, 徐向东<sup>2</sup>, 连靠奇<sup>2</sup>, 谢颖<sup>1</sup>

(1. 河北医科大学第一医院营养科, 河北 石家庄 050031;

2. 河北医科大学公共卫生学院, 河北 石家庄 050017)

**摘要:**目的 建立一种基于毛细管电泳-化学发光联用法检测粮食中伏马菌素 B<sub>1</sub> 的快速检测方法。方法 基于伏马菌素 B<sub>1</sub> 对鲁米诺-三价银[Ag(III)]化学发光体系有抑制作用, 结合毛细管电泳分离技术, 对检测方法进行优化, 选择  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 硼砂为电泳缓冲溶液, 鲁米诺浓度为  $2 \times 10^{-3}$  mol/L, Ag(III) 浓度为  $3 \times 10^{-5}$  mol/L 溶解于 0.01 mol/L NaOH。结果 经过条件优化后进行试验, 伏马菌素 B<sub>1</sub> 的线性范围为 1~200 μg/ml, 检出限(S/N=3)为 1 μg/ml。对 200 μg/ml 的伏马菌素 B<sub>1</sub> 进行 8 次平行测定, 其出峰时间和峰高的相对标准偏差分别为 2.64% 和 7.86%。结论 该方法操作简便、快速、准确可靠, 可用于伏马菌素 B<sub>1</sub> 的检测, 适用于玉米中伏马菌素 B<sub>1</sub> 的测定, 结果比较理想。

**关键词:** 伏马菌素 B<sub>1</sub>; 毛细管电泳; 化学发光; 霉菌毒素; 食品污染物; 风险监测; 玉米

中图分类号: R155; O611 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)04-0382-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.04.008

A novel capillary electrophoresis-chemiluminescence method for determination of fumonisin B<sub>1</sub> in grain

WANG Xiao-lin, DU Hong-zhen, LI Zeng-ning, XU Xiang-dong, LIAN kao-qi, XIE Ying

(The First Hospital of Hebei Medical University, Hebei Medical University, Hebei Shijiazhuang 050031, China)

**Abstract: Objective** The purpose of this research is to establish and optimize a new method for accurate and rapid capillary electrophoresis-chemiluminescence detection of fumonisin B<sub>1</sub>. **Methods** The conditions for luminescence were optimized based on the effect of fumonisin B<sub>1</sub> on the chemiluminescence system of Ag(III) and luminol. The buffer solution was  $2 \times 10^{-3}$  mol/L luminol solution containing  $5 \times 10^{-3}$  mol/L borax, and the oxidation reagent was the  $3 \times 10^{-5}$  mol/L Ag(III) solution containing sodium hydroxide. **Results** After optimization of separation and detection, the linear range was from 1 to 200 μg/ml, and the detection limit (S/N=3) was 1 μg/ml. On the eight parallel detections of 200 μg/ml fumonisin B<sub>1</sub>, the relative standard deviations of peak time and peak height were 2.64% and 7.86%. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate and reliable for the detection of fumonisin B<sub>1</sub>, and could be applied to detect fumonisin B<sub>1</sub> in corn.

**Key words:** Fumonisin B<sub>1</sub>; capillary electrophoresis; chemiluminescence; mycotoxin; food contaminant; risk monitoring; corn

伏马菌素(fumonisin)是20世纪80年代末期发现的一类由串珠镰刀菌产生的真菌毒素,其广泛存在于玉米和以玉米为原料的产品中。B族伏马菌素是分布最为广泛、毒性最强的伏马菌素,其中伏马菌素 B<sub>1</sub>(FB<sub>1</sub>)是被污染玉米或串珠镰刀菌培养物中伏马菌素的主要组分,也是导致伏马菌素产生毒性作用的主要原因。长期低剂量摄入 FB<sub>1</sub> 对人类健

康有很大的影响,现如今食品安全问题越来越受到人们的重视,所以 FB<sub>1</sub> 的分离及检测对食品安全的评价有着重要的意义。目前,FB<sub>1</sub> 的检测普遍采用色谱法或电泳法结合紫外检测进行分析<sup>[1-2]</sup>。由于伏马菌素本身结构决定其无荧光及紫外特性,所以通常需要对其进行衍生化处理后才能进行检测。在衍生剂的选择及衍生时间的控制上要求较高,检测结果不够精准。毛细管电泳(CE)分离技术具有分析效率高、速率快,样品消耗量少的优点。化学发光分析法(CL)不用外加光源,可获得较高的灵敏度<sup>[3-5]</sup>。所以,本文研究采用毛细管电泳-化学发光联用技术(CE-CL)是将毛细管电泳较好的选择性与化学发光分析法较高的灵敏性相结合<sup>[6-8]</sup>,既满足

收稿日期:2015-05-20

基金项目:国家自然科学基金项目(81373046;81402723)

作者简介:王晓琳 女 硕士生 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: wxl342961656@163.com

通讯作者:李增宁 男 教授 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail: lizengning@126.com

了 FB<sub>1</sub> 检测的灵敏度又减少了衍生化处理的步骤。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

石英毛细管(河北永年锐沣色谱器件公司)、数据处理使用 HW2000 色谱工作站(上海千谱软件有限公司)、光电倍增管(北京滨松光子技术有限公司)、直流前置放大器(南京大学微弱信号检测中心)、818 型酸度计;所用器皿(包括容量瓶、烧杯、移液管等)在使用前,置于浓度为 3.6 mol/L 的 HNO<sub>3</sub> 溶液中浸泡 48 h,然后用水彻底清洗,干燥备用。毛细管电泳-化学发光检测装置由实验室自行组装<sup>[2]</sup>,见图 1。

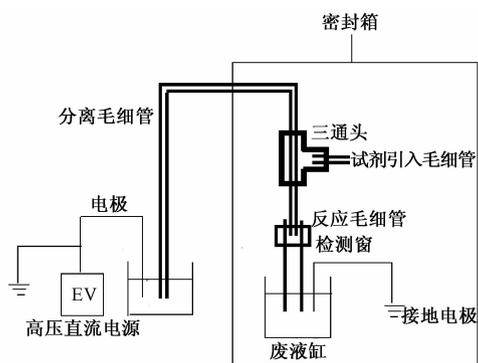


图 1 CE-CL 装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of the apparatus for the CE-CL system

FB<sub>1</sub> (F1147)、鲁米诺 (A8511) 均购自美国 Sigma, NaOH、四硼酸钠、AgNO<sub>3</sub>、KIO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>、KOH 均为分析纯,试验用水均为蒸馏水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 标准溶液制备

准确称取 1.00 mg FB<sub>1</sub> 于容量瓶中,用双蒸水定容至 5 ml,配制成 0.2 mg/ml 的储备液,避光保存于 4 ℃ 冰箱中;将标准储备液用双蒸水逐级稀释成浓度为 0.1、0.05、0.025、0.01、0.001 mg/ml 标准系列溶液,避光保存于 4 ℃ 冰箱中。

以 1 mol/L NaOH 溶液完全溶解 0.354 4 g 鲁米诺,双蒸水定容至 100 ml,得到 0.02 mol/L 鲁米诺储备液;AgNO<sub>3</sub>、KIO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>、KOH 及 200 ml 双蒸水微煮沸后加热 30 min,浓缩至 100 ml 制成 Ag(Ⅲ)储备液;紫外分光光度计于 362 nm 处测得  $\epsilon = 1.26 \times 10^4$  L/(mol·cm),通过公式:  $C = A/\epsilon L$  得 Ag(Ⅲ)储备液浓度为  $2.619 \times 10^{-2}$  mol/L<sup>[9]</sup>

#### 1.2.2 样品前处理

研究采用毛细管电泳-化学发光联用法测定玉米中的 FB<sub>1</sub>。样品采自于河北省邯郸市磁县的 30 户人家,将 30 份样品混合后,用谷物粉碎机磨碎

至粒径小于 1 mm(全部通过 1 mm 孔径的试验筛),称取 20g 粉碎样品,置于 250 ml 离心管中,加入 50 ml 乙腈:甲醇:水(1:1:2, V/V)提取液,在振荡器上水平震荡 20 min,3 000 r/min 下离心 10 min,用滤纸过滤上清液,加 40 ml PBS 缓冲液混匀,用玻璃纤维滤纸过滤,用 FB<sub>1</sub> 免疫亲和柱净化,用 1.5 ml 甲醇洗脱柱上的 FB<sub>1</sub>,60 ℃ 氮气吹干,用蒸馏水 400  $\mu$ l 复溶残留物,待测。

#### 1.2.3 仪器条件

将 530  $\mu$ m 的反应管适当位置处 1 cm 段烧去聚酰亚胺涂层做检测窗口。将 50  $\mu$ m 的分离毛细管一端 4 cm 的长度段经氢氟酸刻蚀 40 min 后,将刻蚀段端插入反应管中 1 cm 检测窗口的 1/2 处,分离毛细管长度为 80 cm。试剂引入管为 200  $\mu$ m 的毛细管,以重力方式引入试剂。3 根毛细管由三通头固定。反应管检测窗口位于光电倍增管前,发光信号由光电倍增管接收,并由色谱数据工作站记录。试验的分离、检测装置密封在实验室自制的暗箱中以降低噪声<sup>[10]</sup>

新毛细管使用前分别用 1 mol/L NaOH、0.1 mol/L HCl 及蒸馏水冲洗 10 min,然后用电泳缓冲液平衡 1 h。每次试验前,先用 0.01 mol/L 的 NaOH 冲洗分离管 10 min,活化硅羟基;换成双蒸水冲洗 10 min,冲去 NaOH;再用缓冲溶液冲洗 10 min。打开高压直流电源预热,基线平稳后进样。

## 2 结果与讨论

### 2.1 化学发光条件的选择

#### 2.1.1 Ag(Ⅲ)溶液碱度的优化

Ag(Ⅲ)溶液的 pH 值对试验结果有明显影响。本试验优化了 NaOH 浓度在 0.004 ~ 0.1 mol/L 范围内对发光信号强度的影响,结果表明,随着 NaOH 浓度的增加,化学发光信号强度随之增加,在 0.01 mol/L 时,化学发光信号最强;由于在高 pH 条件下鲁米诺容易分解,所以继续增加 NaOH 浓度,发光信号随之下降,当浓度为 0.01 mol/L 时反应信噪比最大,故将 Ag(Ⅲ)溶液中 NaOH 的最佳浓度定为 0.01 mol/L,见图 2。

#### 2.1.2 Ag(Ⅲ)溶液浓度的优化

用 0.01 mol/L 的 NaOH 调节溶液的 pH 值后,本试验优化了 Ag(Ⅲ)溶液在  $2.0 \times 10^{-5}$  ~  $8.0 \times 10^{-5}$  mol/L 浓度范围内对化学发光信号强度的影响。结果表明,随着浓度的上升,信号逐渐增强,当 Ag(Ⅲ)配合物的浓度为  $3.0 \times 10^{-5}$  mol/L 时,信号最强。继续增大溶液浓度,由于高浓度 Ag(Ⅲ)会部分吸收发光信号,信号逐渐减弱,当浓度为  $3.0 \times$

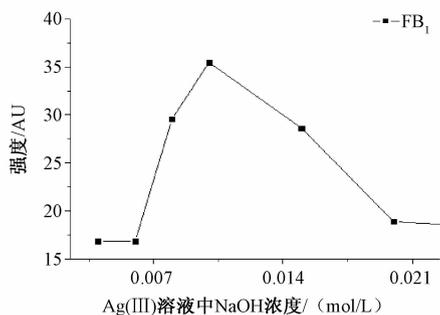


图2 Ag(III)溶液碱度对发光信号的影响

Figure 2 Effect of the alkalinity of the Ag(III) solution on the luminescence signal

$10^{-5}$  mol/L 时信号最灵敏,所以最佳的 Ag(III)溶液浓度为  $3.0 \times 10^{-5}$  mol/L。见图3。

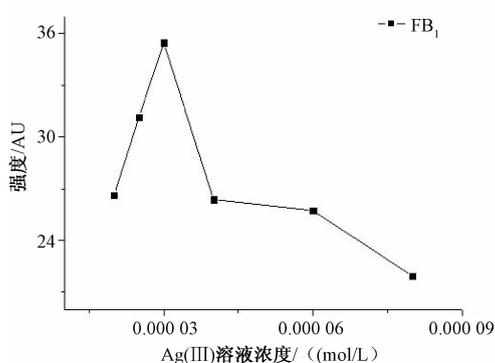


图3 Ag(III)溶液浓度对发光信号的影响

Figure 3 Effect of the concentration of the Ag(III) solution on the luminescence signal

### 2.1.3 鲁米诺浓度的优化

本试验考察了鲁米诺浓度在  $1 \times 10^{-3} \sim 3 \times 10^{-3}$  mol/L 时的化学发光信号强度。结果表明,在该范围内,随着鲁米诺浓度的增加,FB<sub>1</sub> 的化学发光信号逐渐增强,在浓度为  $2 \times 10^{-3}$  mol/L 时达到最大,继续增大鲁米诺浓度时,化学发光信号强度反而降低,见图4。

## 2.2 电泳条件的优化

### 2.2.1 硼砂缓冲溶液的优化

鲁米诺浓度为  $2 \times 10^{-3}$  mol/L 时,对鲁米诺中硼砂的浓度进行优化。本试验考察了硼砂浓度在  $1 \times 10^{-3} \sim 1.5 \times 10^{-2}$  mol/L 时 FB<sub>1</sub> 的信号强度。试验发现,随着硼砂浓度的逐渐升高,化学发光信号逐渐增强,当硼砂浓度为  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 时,信号强度最大,继续增大硼砂浓度,信号则减弱,当硼砂浓度为  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 时,信噪比最大。所以  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 为硼砂的最佳浓度,见图5。

### 2.2.2 进样时间的优化

在 20 kV 的进样电压下,采用重力进样的方式,考察了进样时间为 16 ~ 26 s 对试验结果的影响。

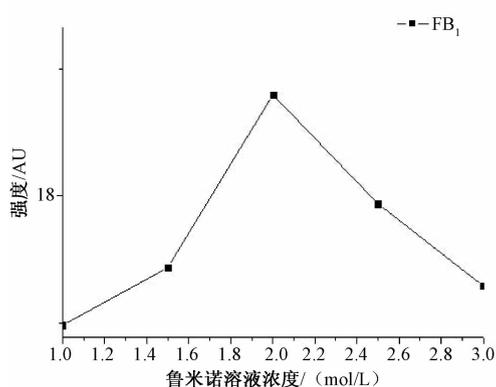


图4 鲁米诺溶液浓度对化学发光信号的影响

Figure 4 Effect of the concentration of the luminol solution on the chemiluminescence signal.

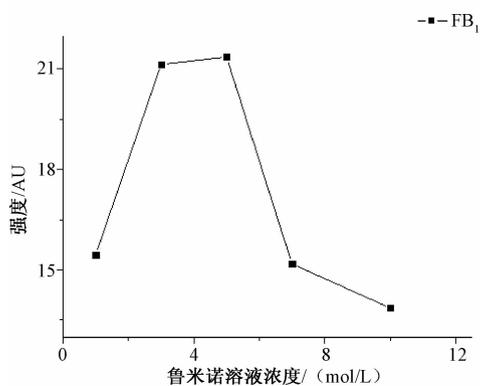


图5 鲁米诺溶液中硼砂对化学发光信号的影响

Figure 5 Effect of the borax in the luminol solution on the chemiluminescence signal

在该范围内,随着进样时间的增加,化学发光信号逐渐增强,当进样时间超过 20 s 后,峰形增宽且出峰时间明显延后,故选择 20 s 作为最佳进样时间。

### 2.2.3 进样电压的优化

毛细管电泳的分离电压强度不仅影响分离效果和迁移速度,也会影响相对化学发光信号强度及信噪比。进样时间为 20 s 时,本试验考察了不同电压对化学发光信号强度的影响。在 10 ~ 20 kV 范围内,随着电压的增大,信号逐渐增强,在 12 kV 时达到最大,并且出峰时间前移,当电泳电压 > 12 kV 时,峰高降低且信噪比增大。最终选择电压为 12 kV,见图6。

## 2.3 方法的准确度

在优化条件下,200 μg/ml FB<sub>1</sub> 标准样品毛细管电泳化学发光结果,见图7。

由图7可看出,最终优化条件下,12 min 内 FB<sub>1</sub> 开始分离。线性范围为 1 ~ 200 μg/ml,回归方程为:  $y = 111.96368x + 2.96493$ ,相关系数为 0.998 0,检出限为 1 μg/ml。出峰时间和峰高的相对标准偏差( $n = 8$ )分别为 2.64% 和 7.86%。

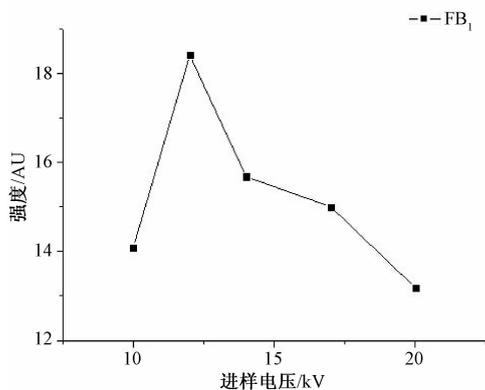


图6 进样电压对化学发光信号的影响

Figure 6 Effect of the adding voltage of the sample on the chemiluminescence signal

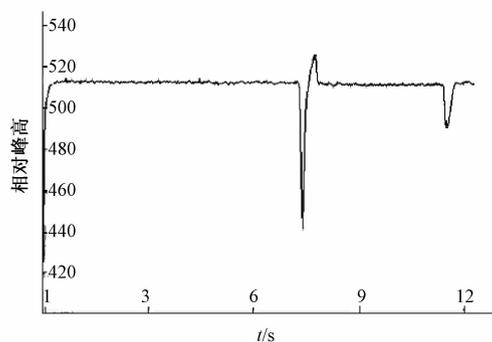


图7 200 µg/ml FB<sub>1</sub> 标准样品毛细管电泳化学发光

Figure 7 Chemiluminescence of capillary electrophoresis in 200 µg/ml standard sample of the fumonisin B<sub>1</sub> solution

### 2.4 实际样品检测

本研究用毛细管电泳-化学发光联用法测定玉米中的FB<sub>1</sub>。样品采自于河北省邯郸市磁县的30户人家,将30份样品混合后用乙腈:甲醇:水(1:1:2, V/V)提取,用FB<sub>1</sub>免疫亲和柱纯化后进行检测,未检测出FB<sub>1</sub>,空白样品和阳性样品检测结果见图8、9。

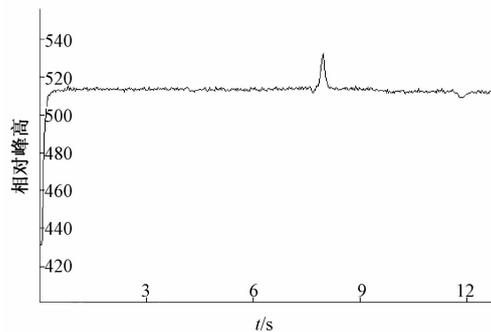


图8 空白样品中FB<sub>1</sub>的检测

Figure 8 Detection the fumonisin B<sub>1</sub> of the blank sample

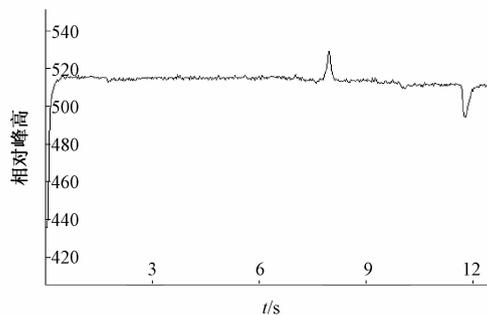


图9 阳性样品中FB<sub>1</sub>的检测

Figure 9 Detection the fumonisin B<sub>1</sub> of the positive sample

### 3 小结

本研究结合毛细管的电泳高选择性和化学发光的高灵敏度优势,建立了毛细管电泳-化学发光联用法测定FB<sub>1</sub>新方法。与以往高效液相色谱-紫外检测法相比,具有较高灵敏性的同时,还无需前期衍生,使FB<sub>1</sub>的检测步骤更简便。该方法应用范围广泛,可用于粮食、牛奶、啤酒等含有FB<sub>1</sub>物质的检测,结果比较理想。

### 参考文献

- [1] 胡涌刚,徐向东,李欣欣.毛细管电泳——化学发光法用于L-精氨酸纯度分析[J].华中科技大学学报,2006,34(3):105-121.
- [2] 张晓旭,肖志勇,张红艳,等.柱后衍生——高效液相色谱法测定玉米中伏马菌素B<sub>1</sub>和B<sub>2</sub>[J].色谱,2012,30(8):792-797.
- [3] 郭小明,胡涌刚,徐向东,等.毛细管电泳——化学发光法检测废水中的铜离子[J].化学与生物工程,2007,24(2):69-72.
- [4] 郝娟,樊丙安,魏春龙.毛细管电泳——化学发光联用新方法检测色氨酸[J].分析试验室,2012,31(10):72-75.
- [5] 尹东光,吴明红,谢春娟,等.新型毛细管电泳化学发光系统应用于氨基酸分离测定[J].分析化学,2009,37(1):152-156.
- [6] 杨新,韩凤梅,程智勇,等.银黄冲剂中黄芩苷和绿原酸的毛细管电泳分离分析[J].色谱,1999,17(6):573-575.
- [7] Tsukagoshi K, Nakahama K, Nakajima R. Direct detection of biomolecules in a capillary electrophoresis-chemiluminescence detection system[J]. Anal Chem,2004,76(15):4410-4415.
- [8] 吕元琦,郭春华,袁倬斌.毛细管电泳法测定复方鱼腥草片中的绿原酸和槲皮素[J].分析测试学报,2004,23(6):106-108.
- [9] SHI H M, XU X D, DING Y X, et al. Determination of cortisol in human blood serums by a new Ag(III) complex-luminol chemiluminescent system[J]. Anal Biochem,2009,387(2):178-183.
- [10] 朱金坤,舒露,吴敏,等.维生素B<sub>12</sub>的毛细管电泳——化学发光检测研究[J].华东师范大学学报,2013,5(9):96-101.