

免疫亲和柱-高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素*

郭雪梅, 许 杨, 刘仁荣

(南昌大学中德联合研究院, 教育部食品科学国家重点实验室, 江西南昌, 330047)

摘 要 制备抗桔霉素(citrinin, CIT)单克隆抗体免疫亲和柱(IAC), 建立了检测红曲米中 CIT 的免疫亲和柱-高效液相色谱检测方法。采用甲醇-水提取红曲米样品, 将提取液用 PBS 稀释后过免疫亲和柱, 甲醇洗脱后以高效液相色谱法检测, 激发波长为 331 nm, 发射波长为 500 nm, 流动相采用乙腈-磷酸溶液(体积比为 45:55, pH2.0)。每根抗 CIT 单克隆抗体免疫亲和柱使用 0.5 mL 溴化氰活化的 4FF 琼脂糖凝胶, 0.5 mg 桔霉素单克隆抗体, 柱容量为 0.35 μ g。红曲米样品添加 CIT 标品 0.1~0.6 mg/kg, 平均回收率为 74.2%~87.14%, 相对标准偏差为 2.85%~13.12%。最低检出限为 0.1 mg/kg(S/N=3)。

关键词 桔霉素(CIT), 免疫亲和柱, 高效液相色谱, 红曲米

桔霉素(CIT)是由真菌产生的次级代谢产物, 是一种真菌毒素, 其主要作用的靶器官是肾脏, 也称为肾毒素, 同时, 桔霉素还有致畸性。主要污染红曲类产品、玉米、大米、奶酪等, 对人和动物的健康危害较大。纯品桔霉素为黄色, 无味, 酸性, 针状棱形晶体, 其分子式为 $C_{13}H_{14}O_5$, 相对分子质量为 250.25, 化学命名为(3R, 4S)-4, 6-二氢-8-羟基-3, 4, 5-三甲基-6-氧-3H-2-苯吡-7-羧酸。桔霉素不溶于水, 完全溶于甲醇、乙腈、乙醇、丙酮、苯、 $CHCl_3$ 等有机溶剂中^[1]。研究中将纯化好的抗桔霉素单克隆抗体与溴化氢活化的载体偶联。采用紫外扫描鉴定偶联反应, 高效液相色谱法对制备好的 IAC 进行评价, 并使用该 IAC 对市售的 16 份红曲米样品进行了检测。

1 仪 器

D-37520 离心机(Thermo, Germany), Lambda 35 紫外分光光度计(Perkin Elmer), MK3 酶标仪(Thermo, 热电(上海)仪器有限公司), ZHWY-211D 恒温培养振荡器(上海智城分析仪器制造有限公司), Agilent 1100 高效液相色谱(美国安捷伦公司)。

2 材料与试剂

CIT 标准品购自美国 Sigma 公司。实验用水为 Millipore 制备的超纯水。抗 CIT 单克隆抗体小鼠腹水(实验室自制)。96 孔酶标板(Costar 公司), CNBr 活化的 Sepharose 4FF(Amarsham)。甲醇、乙腈(色

谱纯)。0.02% NaN_3 的 PBS 平衡缓冲液($NaCl$ 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.9 g, KCl 0.2 g, NaN_3 0.2g, 加蒸馏水定容至 1 000 mL)。

3 实验方法

3.1 HPLC 法

HPLC 条件: 反相 C_{18} 色谱柱(Agilent, Zorbax Extend- C_{18} , 4.6 \times 150 mm, 5 μ m); 进样量: 10 μ L, 流速 1 mL/min; 荧光检测: E_x =331 nm, E_m =500 nm; 流动相: V (乙腈): V (水)=45:55, 磷酸调 pH 值至 2.0。

桔霉素 HPLC 检测方法的标准曲线的绘制: 10 μ L 不同浓度的 CIT 标品溶液(1~250 ng/mL, 溶于甲醇)用 HPLC 检测, 重复进样 3 次, 绘制标准曲线。

3.2 抗 CIT 单克隆抗体的纯化^[2]

采用辛酸-硫酸铵法纯化含抗 CIT 单克隆抗体的小鼠腹水。

3.3 抗 CIT 单克隆抗体纯度的测定(SDS-PAGE)^[3]3.4 抗 CIT 单抗的活性测定(间接非竞争 ELISA 法)^[4]

3.5 抗 CIT 单克隆抗体免疫亲和柱的制备

制备方法参照 CNBr 活化的 Sepharose 4FF 产品说明书略作修改, 具体方法如下:

干胶于沙芯漏斗中用等体积的 0.1 mmol/L HCl 洗涤 12~15 次; 预先将需偶联的抗 CIT 单抗置于偶联缓冲液中透析 12 h 过夜。经洗涤胶于沙芯漏斗中用偶联缓冲液快速抽洗, 将胶迅速倒入抗 CIT 单抗溶液中, 室温缓慢搅拌偶联 2~4 h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。加入封阻缓冲液室温缓慢搅拌封阻 2 h。先后用约 3

*第一作者: 硕士研究生(许杨教授为通讯作者)。

*“十五”国家重大科技专项“食品安全关键技术”课题, 江西省科技厅 2004 年科技攻关课题

收稿日期: 2007-06-01, 改回日期: 2007-07-30

倍体积的 0.1 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0, 含 0.5 mmol/L NaCl) 和 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 3.6, 含 0.5 mmol/L NaCl) 交替洗涤 3~6 次。加含 0.02 % NaN₃ 的 PBS 平衡缓冲液于 4 ℃ 保存, 用时取出装柱。

3.6 使用 IAC 净化样品溶液中 CIT 的过程

单克隆抗体免疫亲和柱及各种缓冲液平衡至室温, 用 10 mL 平衡缓冲液预洗亲和柱。将可能含有 CIT 的样品溶液通过 IAC, 此时 CIT 被免疫亲和柱上对应的单克隆抗体特异性吸附。用 10 mL 磷酸缓冲液淋洗 IAC, 此时非特异性吸附的杂质被洗去。用 1.5 mL 甲醇洗脱液通过 IAC, 此时 CIT 与其单克隆抗体间的结合被破坏, CIT 被洗脱下来。用 20 mL 平衡缓冲液流过 IAC。

3.7 样品加标回收率实验

选择柱容量 0.35 μg 的抗 CIT 单抗亲和柱。分别将 0.1、0.2、0.4 和 0.5 μg 的 CIT 标准品加入到 1g 粉碎的红曲米阴性样品 (HPLC 法, ELISA 法检测都为阴性的样品) 中, 加入 5 mL 甲醇-水 (70+30) 提取, 振荡 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 0.25 mL, 用 PBS 稀释 7 倍, 再用 0.2 mol/L HCl 调节 pH 至 6.5 后用 IAC 净化。

4 实验结果

4.1 桔霉素 HPLC 检测方法的建立

在本实验条件下, CIT 的 HPLC 保留时间为 6.5 min, 如图 1 所示; 样品加标回收率实验色谱峰, 如图 2 所示。

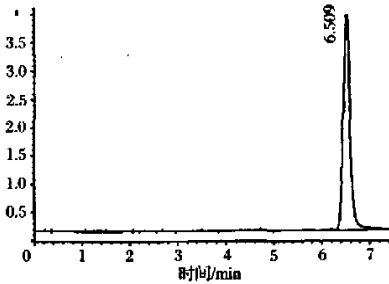


图 1 CIT 标品 (250 ng/mL) 的 HPLC 色谱图
桔霉素 R_f 值 = 6.5 min

分析不同浓度 CIT 标准溶液 HPLC 检测结果 (见表 1), 在浓度为 1~250 ng/mL 时, 峰面积与 CIT 浓度之间的线性关系如图 3 所示。标准曲线方程 $y = 0.1488x + 0.0023$, $R = 0.9999$ 。在本实验条件下, CIT 的最低检测限为 0.5 ng/mL。

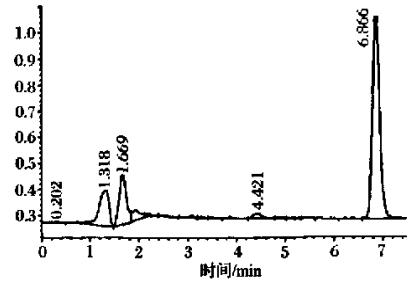


图 2 阳性样品经过 IAC 柱后的 HPLC 色谱图
峰 4 为桔霉素的色谱峰

表 1 不同浓度 CIT 标准溶液 HPLC 检测结果 (n=3)

CIT 标准品浓度 /ng · mL ⁻¹	峰面积 (LU · s)	CIT 标准品浓度 /ng · mL ⁻¹	峰面积 (LU · s)
1.0	0.2174	25.0	3.708 8
2.5	0.412 9	50.0	7.358 8
5.0	0.756 9	125.0	18.477 4
12.5	1.884 1	250.0	37.267 43

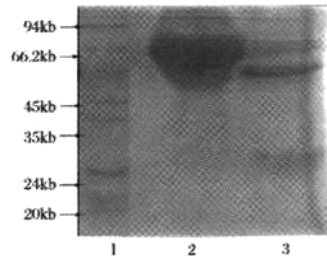
4.2 小鼠腹水中 CIT 单抗纯化效果的评价

4.2.1 紫外扫描测腹水、腹水纯化后抗体蛋白含量

使用紫外扫描分别测得小鼠腹水及腹水纯化后抗体中蛋白含量分别为 20.30、3.52 mg/mL, 蛋白回收率为 17.34%。可见采用辛酸-硫酸铵两步沉淀法纯化抗 CIT 单克隆抗体可除去大部分杂蛋白。

4.2.2 抗 CIT 单克隆抗体纯度测定 (SDS-PAGE 电泳)

纯化出的抗 CIT 单克隆抗体和原始腹水的 SDS-PAGE 电泳结果如图 3 所示。由图 3 可见, 原始腹水的蛋白质成分复杂, 经纯化后所得到抗体纯度较高。



1—10 μg Marker, 2—McAb, 3—purified McAb of CIT

图 3 抗 CIT 单克隆抗体纯化前后 SDS-PAGE 电泳图

4.2.3 抗 CIT 单抗的活性测定 (间接非竞争 ELISA 法)

采用间接非竞争 ELISA 法测定抗 CIT 单抗的效价, 以同比例稀释的阴性血清吸光值的 2 倍作为效价, 测得原始腹水和纯化后的单抗效价分别为 1:3

$\times 10^6$, $1:2 \times 10^6$, 由此可见, 单抗纯化的活性回收率较高。

4.3 CIT 单抗 IAC 的研制

4.3.1 抗 CIT 单克隆抗体与载体的偶联

将抗 CIT 单克隆抗体与 Sepharose 4FF 偶联, 每 30 min 取样紫外扫描, 结果显示, 在偶联到 120 min 后, 抗 CIT 单克隆抗体与载体的偶联率为 98%。

4.3.2 抗体含量与柱容量的关系

当抗体含量分别为 250、300、400 和 500 μg 时, 抗 CIT 单克隆抗体 IAC 的柱容量分别为 0.11、0.19、0.28、0.35 μg , 且柱容量随抗体含量的增加而增大, 呈线性关系, 回归方程 $y = 0.0009x - 0.1054$, $R^2 = 0.9747$ 。

4.3.3 上样条件的确定

每支 IAC 柱的 CIT 上样量为 80 ng, 分别用 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.4 的磷酸缓冲液上样, 再用 HPLC 对不同 pH 的上样缓冲液的上样效果进行分析, 计算 CIT 回收率, 结果如图 4 所示。得到上样缓冲液的 pH 值为 6.5 时, CIT 回收率最高。

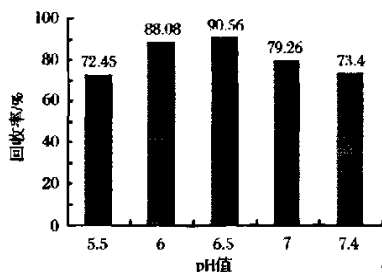


图 4 样缓冲液 pH 值上样效果

4.3.4 淋洗条件的确定

每支 IAC 柱的 CIT 上样量为 60 ng, 分别用 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.4 的磷酸缓冲液淋洗, 再用 HPLC 对不同 pH 的淋洗缓冲液的淋洗效果进行分析, 计算 CIT 回收率, 结果如图 5 所示。得到淋洗缓冲液的 pH 值为 7.4 时, CIT 回收率最高。

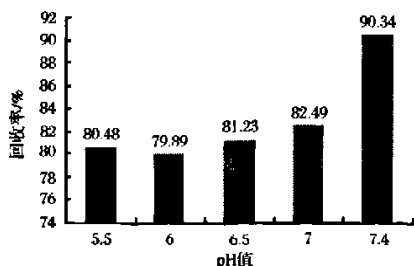


图 5 淋洗缓冲液 pH 值淋洗效果

4.4 样品加标回收率的测定

使用本实验室制备的抗 CIT 单抗 IAC 对红曲米样品进行了 4 个不同浓度水平的加标回收实验, 结果如表 2 所示。

表 2 红曲米样品 CIT 加标回收实验结果 ($n=3$)

CIT 加标量/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	100	200	400	600
回收率/%	74.2	83.67	84.36	87.14
变异系数/%	13.12	2.85	4.17	5.98

4.5 建立 HPLC-IAC 方法检测市售红曲类样品中的 CIT 含量

使用本实验室制备的抗 CIT 单抗免疫亲和柱建立了 HPLC-IAC 方法并检测市售红曲米样品 16 份, 结果显示 12 份样品为阳性, 阳性率 75%, 样品中 CIT 含量为 100.6~443.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 信噪比为 3:1 时, 检测下限为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

表 3 抗 CIT 单抗 IAC-HPLC 法检测市售红曲类样品中的 CIT 含量

样品	CIT 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	样品	CIT 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
红曲米 1	0.282	红曲米 9	0.222
红曲米 2	0.167	红曲米 10	0.199
红曲米 3	0.150	红曲米 11	<0.1
红曲米 4	0.328	红曲米 12	0.323
红曲米 5	<0.1	红曲米 13	0.100
红曲米 6	0.122	红曲米 14	0.443
红曲米 7	<0.1	红曲米 15	0.218
红曲米 8	0.120	红曲米 16	<0.1

5 小 结

目前, 桔霉素的检测方法主要有薄层层析法 (TLC)^[5,6]、高效液相色谱法^[7,8]、酶联免疫法^[9]及抑菌圈法等。TLC 法是最早应用于桔霉素的检测方法, 灵敏度较低, 操作繁琐; 高效液相色谱法灵敏、准确、重现性好, 但是对样品纯度要求较高, 检测前必须对样品进行净化处理; 酶联免疫法快速、灵敏, 但是干扰因素较多, 重现性差。免疫亲和柱净化方法利用抗原抗体高度特异性亲和作用, 能快速特异地将桔霉素从样品中分离出来, 并同时完成净化和浓缩步骤, 是目前真菌毒素检测中应用最广、最简便的一种净化方法。采用 IAC-HPLC 检测红曲米中的桔霉素, 方法的检出限为 0.1 mg/kg 。

参 考 文 献

- 1 Bao-jun Xu, Xiao-qin Jia, Li-juan Gu, et al. Review on the qualitative and quantitative analysis of the mycotoxin cit-

- rinin[J]. Food Control, 2006, (17): 271~28
- 2 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 56
 - 3 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 77~101
 - 4 Fusheng Chen, Xiaoqing Hu. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, (103): 331~337
 - 5 Maria Victoria Criado, Virginia E Fernandez Pinto, Alicia Badessari, et al. Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water[J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 99: 343~349
 - 6 官慧梅, 赵树欣, 邹海晏. 用双向薄层层析检测红曲中的桔霉素[J]. 酿酒科技, 2002: 83~84
 - 7 Anne Molinié, Virginie Faucet, Marcel Castegnaro, et al. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin [J]. Food Chemistry, 2005, (92): 391~400
 - 8 赖卫华, 龚春来, 黄秋阳, 等. 红曲霉培养过程中桔霉素积累规律的初步研究[J]. 食品工业科技, 2003, (7): 28~32
 - 9 Fusheng Chen, Xiaoqing Hu. Study on red fermented rice with high concentration of monacolin K and low concentration of citrinin [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, (103): 331~337

Determination of Citrinin in Red Rice by High Performance Liquid Chromatography with Immunoaffinity Clean-up Column

Guo Xuemei, Xu Yang, Liu Renrong

(Key Laboratory of Food Science of Ministry of Education, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT To prepare immunoaffinity column of citrinin, high performance liquid chromatography with immunoaffinity clean-up column to quantify citrinin in Red rice is described. Methods: samples were extracted with methanol-water and the extract was diluted with methanol-PBS ($v:v=1:10$) and applied to a citrinin test immunoaffinity column. The column was washed with PBS, and citrinin was eluted with methanol and quantified by reversed-phase HPLC with fluorometric detection ($E_x=331\text{ nm}$, $E_m=500\text{ nm}$) using acetonitrile- H_2O ($v:v=45:55$, pH2.0) as mobile phase. Average recoveries of citrinin from Red rice spiked at levels of 0.1~0.6 mg/kg ranged from 74.2% to 87.12%. The detection limit was 0.1 mg/kg based on a signal to noise ratio of 3:1.

Key words citrinin, immunoaffinity column, high performance liquid chromatograph, red rice

信息窗

日本成功开发“干制番茄提取物”

日本东和工业公司最近利用意大利产的干制番茄开发成功了“干制番茄提取物”产品。该制法目前正在申请专利权。

使用有非常强鲜味的干制番茄原料制成的提取物产品,是蔬菜鲜味与番茄风味良好组合而成的调味料新产品,现已在比萨饼沙司中正式采用。今后,加工咖喱卤和通心面条等使用的配套沙司类产品以及以米饭辅助食品为中心的各种加工食品等,是进一步利用的方向。

新产品利用的是南意大利产,经日晒、风干的干制番茄。干制番茄在干燥过程中原含的谷氨酸成分得到了浓缩,加上成熟番茄中没有尿素,因此有很强的调味料基础。通过独特的加工、提取法,进一步增强了原材料固有的风味,制成的调味料很受市场欢迎。该调味料除可用于沙司类和米饭、浇汁类、调味料、色拉调味汁和肉类菜肴等,由于不产生混浊,也可以用于制汤,添加量大致在 0.2%~3%。

虽然干制西红柿在日本的市场认知度较低,但意大利等地中海地区的调味基料被广泛使用。东和工业公司开发的新产品在商标表示方面可以用“干制番茄提取物”,不必标明过敏原和是否使用转基因原料。提取物调味料的价格设定在每千克 2 500 日元左右。现在,公司正在研究开发粉末状产品,不久将推向市场。