

鲁米诺-铁氰化钾流动注射 化学发光体系测定饮用水中棒曲霉素

马 强¹, 朱定波¹, 杨杏芳², 刘 爽¹, 唐书泽^{1,*}

(1. 暨南大学食品科学与工程系, 广东广州 510632; 2. 广东省疾病预防控制中心, 广东广州 510300)

摘 要: 基于棒曲霉素对鲁米诺-铁氰化钾发光体系显著的增敏作用, 结合流动注射技术, 建立了一种快速检测棒曲霉素的方法。在最佳实验条件下, 线性范围为 $5 \times 10^{-3} \sim 1 \text{ mg/L}$, 检出限为 $4.6 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$, RSD 为 2.6% ($n = 11$)。此方法具有简便快速、自动化程度高、可在线检测的特点, 可用于饮用水中棒曲霉素的应急预警检测。

关键词: 鲁米诺, 铁氰化钾, 化学发光, 棒曲霉素

Determination of patulin in drinking water by flow-injection chemiluminescence system of luminol and Potassium ferricyanide

MA Qiang¹, ZHU Ding-bo¹, YANG Xing-fang², LIU Shuang¹, TANG Shu-ze^{1,*}

(1. Department of Food Science and Engineering of Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Centre for Disease Control and Prevention of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China)

Abstract: Based on the enhancing effect of luminol-ferricyanide chemiluminescence system by patulin, a novel method for rapid determination of patulin was developed combined with flow injection technique. An excellent linear range for patulin determination was $5 \times 10^{-3} \sim 1 \text{ mg/L}$ under the optimal experimental condition. The limit detection of patulin was $4.6 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$ and relative standard deviation for the determination was 2.6% ($n = 11$). This method showed the advantages of simple operation, high degree of automation and could be used for on-line rapidly determination of patulin in drinking water.

Key words: luminol; potassium ferricyanide; chemiluminescence; patulin

中图分类号: TS201.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2013)15-0306-04

棒曲霉素, 又称展青霉素, 是青霉菌属 (*Penicillium*)、曲霉菌属 (*Aspergillus*)、和丝衣菌属 (*Byssoschlamys*) 真菌的次级代谢产物^[1-2], 常见于受污染的苹果及其制品中。它是一种高急性毒性的水溶性小分子物质^[3-7, 13], 小鼠口服半数致死量 (LD_{50}) 为 20 mg/kg 。急性中毒会导致啮齿动物痉挛、肺出血、皮下组织水肿、无尿直至死亡。因此世界卫生组织规定苹果汁中的最高残留量小于 $50 \mu\text{g/L}$ 。现有检测棒曲霉素的方法包括高效液相色谱法 (High Performance liquid chromatography, HPLC)^[14-16]、气相色谱-质谱法 (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、薄层色谱法 (Thin-layer chromatography, TLC)、微乳电动色谱法 (Micellar electrokinetic capillary chromatography, MEECK)、免疫法等。其中 HPLC 是目前采用最广泛的检测方法, 具有操作性强、准确度高等特点, 但其设备较为昂贵, 不能进行实时检测; GC-MS 检测灵敏度高, 缺点是样品需要衍生化处理; TLC 是最早的色谱检测方法,

只能进行定性及半定量分析; MEECK 检测灵敏度偏低; 免疫学方法发展不太成熟, 且前处理过程较繁琐。近些年, 流动化学发光法因其设备简单、灵敏度高、操作简便等优点广泛应用于环境检测和药物分析等领域^[9-12, 17]。用鲁米诺-铁氰化钾流动注射化学发光法测定饮用水中棒曲霉素的研究未见报道。本实验通过研究棒曲霉素对鲁米诺-铁氰化钾发光体系发光强度的影响, 试图建立一种简便、快速、灵敏度高的化学发光检测方法, 用于饮用水中可能出现的突发性棒曲霉素污染的应急预警。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

鲁米诺 美国 Sigma 公司, 鲁米诺溶液 (0.01 mol/L): 称取 0.4430 g 鲁米诺, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液溶解并定容于 250 mL 棕色容量瓶中, 避光储存备用; 铁氰化钾 洛阳市化学试剂厂, 铁氰化钾溶液 (0.01 mol/L): 称取 0.8238 g 铁氰化钾, 用双蒸水溶解, 并定容于 250 mL 棕色容量瓶中, 避光储存备用; 棒曲霉素标准品 以色列 Fermentek 公司, 棒曲霉素溶液: 取 1 mg 标准品溶于 pH 为 5.0 的双蒸水中, 并定溶于 50 mL 棕色容量瓶中, -4°C 储存备用; 氢氧化钠, 分析纯 天津市大茂化学试剂厂; 乙酸, 分析纯 天津市

收稿日期: 2013-01-11 * 通讯联系人

作者简介: 马强 (1988-), 男, 硕士在读, 研究方向: 食品安全预警。

基金项目: 广东省食品安全卫生应急技术研究专项 ([2011]733)。

富宇精细化工有限公司;实验用水 双蒸水。
IFIS-C 型流动注射化学发光仪、RFL-1 型超微弱化学发光/生物发光检测仪 西安瑞迈电子科技有限公司;DHG-9145A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科学仪器有限公司;PHS-3C 数字式 pH 计 上海精密科学仪器有限公司);EL104 电子天平 梅特勒-托利多仪器有限公司;0.1~1mL、0~100 μ L 微量移液枪 德国BRAND 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 进样方法 如图 1 所示,a、b、c 3 只流通管分别接棒曲霉素溶液(样品)、铁氰化钾溶液、鲁米诺溶液。鲁米诺溶液先与铁氰化钾溶液在三通阀处混合,再与棒曲霉素溶液混合,进入反应池中反应。所产生化学发光信号转变成数字信号,在计算机软件中呈现出来。选取大且重复性较好的峰值作为其化学发光值(I_s),未通入棒曲霉素溶液时产生的化学强度作为空白值(I_0)。相对化学发光强度 $\Delta I = I_s - I_0$,其与棒曲霉素的浓度在一定的范围内呈线性关系,据此定量测定。

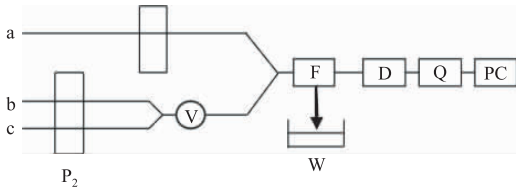


图 1 流动注射化学发光仪示意图

Fig.1 Schematic diagram of

flow-injection chemiluminescence system

注:a:棒曲霉素溶液;b:鲁米诺溶液;c:铁氰化钾溶液;

P₁、P₂:蠕动泵;V:三通阀;F:反应池;

W:废液池;D:光电倍增管;Q:放大器;PC:计算机。

1.2.2 棒曲霉素对鲁米诺-铁氰化钾发光体系影响实验 选取浓度为 10^{-5} mol/L 鲁米诺和浓度为 10^{-4} mol/L 铁氰化钾溶液,分别与 2×10^{-2} 、 4×10^{-2} 、 0.1 mg/L 棒曲霉素反应,考察棒曲霉素对鲁米诺-铁氰化钾发光体系的影响。

1.2.3 单因素实验 预实验中,棒曲霉素溶液的 pH 对发光强度影响不大,为保持其稳定性,调节溶液 pH 为 5.0。选择鲁米诺浓度(A)、铁氰化钾浓度(B)、鲁米诺溶液 pH(C)作为影响发光强度的因素进行实验,考察各因素对化学发光强度的影响。

1.2.4 正交实验 根据单因素实验结果,将对实验结果有影响的 3 个因素鲁米诺浓度(A)、铁氰化钾浓度(B)、鲁米诺溶液 pH(C)采用 $L_9(3^3)$ 表进行正交实验(表 1)。

表 1 正交实验因素水平表

Table1 Factors and levels of orthogonal experiment

水平	因素		
	A 鲁米诺浓度 ($\times 10^{-4}$ mol/L)	B 铁氰化钾浓度 ($\times 10^{-4}$ mol/L)	C 鲁米诺溶液 pH
1	1.5	1.2	12.5
2	2.0	1.5	12.7
3	2.5	1.8	13.0

2 结果与讨论

2.1 棒曲霉素对鲁米诺-铁氰化钾发光体系的影响

不同浓度的棒曲霉素分别与鲁米诺-铁氰化钾发光体系反应,实验结果如图 2 所示。

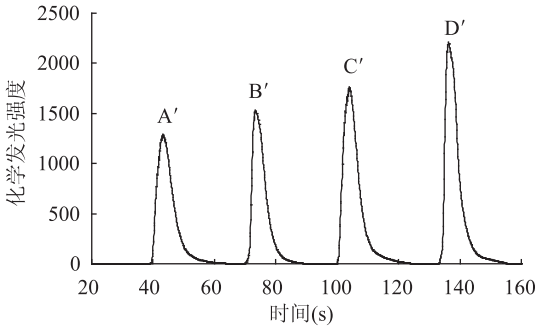


图 2 化学发光强度-时间关系

Fig.2 The chemiluminescence intensity-time profile

注:A'是空白对照组曲线,B'、C'、D'是分别添加了浓度为 2×10^{-2} 、 4×10^{-2} 、 10^{-1} mg/L 棒曲霉素后的化学发光曲线。

从图 2 中可以看出,棒曲霉素能够增强鲁米诺-铁氰化钾体系的发光强度,且相对化学发光强度与棒曲霉素浓度间有良好的线性关系。该结果与宋正华课题组研究结果相一致,即棒曲霉素能够促进鲁米诺化学发光体系的发光强度^[17]。其促进机理可能为:棒曲霉素与铁氰化钾反应生成了一种络合物,其能够促进鲁米诺的氧化过程,进而增强化学发光强度。

2.2 单因素实验结果

2.2.1 鲁米诺浓度选择 在铁氰化钾浓度 10^{-4} mol/L、棒曲霉素浓度 5×10^{-2} mg/L、鲁米诺溶液 pH12.7 条件下,不同浓度的鲁米诺溶液对相对发光强度的影响见图 3。

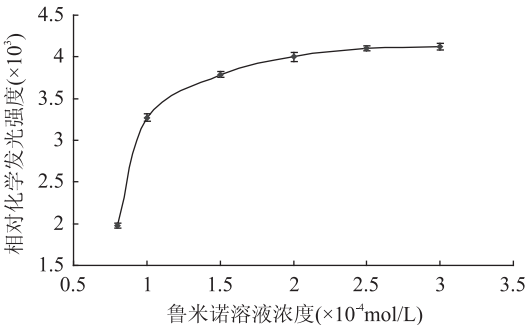


图 3 鲁米诺溶液浓度与相对化学发光强度的关系

Fig.3 Relationship between luminol concentration and relative luminescence intensity

由图可知,当鲁米诺浓度在 $8 \times 10^{-5} \sim 3 \times 10^{-4}$ mol/L 范围内,鲁米诺浓度与相对发光强度成正相关。这与鲁米诺作为体系中的发光试剂的特征相符。考虑到成本和环保,初步选定鲁米诺浓度为 2.0×10^{-4} mol/L。

2.2.2 铁氰化钾浓度选择 在鲁米诺浓度 2.0×10^{-4} mol/L、棒曲霉素浓度 5×10^{-2} mg/L、鲁米诺溶液 pH12.7 条件下,不同浓度的铁氰化钾溶液对相对化学发光强度的影响见图 4。

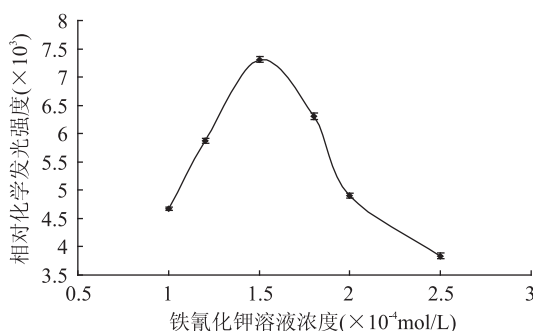


图4 铁氰化钾浓度与相对化学发光强度的关系

Fig.4 Relationship between potassium ferricyanide concentration and relative luminescence intensity

铁氰化钾在体系中起氧化作用,随着铁氰化钾浓度的增加,相对化学发光强度不断增强,在浓度为 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时,相对发光强度达到最大。当铁氰化钾浓度过高时,其会抑制激发态的3-氨基邻苯二甲酸的形成,导致发光强度降低。因此实验选择铁氰化钾浓度为 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 。

2.2.3 鲁米诺溶液 pH 选择 在鲁米诺浓度 $2.0 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 、棒曲霉素浓度 $5 \times 10^{-2} \text{ mg/L}$ 、铁氰化钾溶液浓度 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 条件下,鲁米诺溶液 pH 对相对化学发光强度影响见图5。

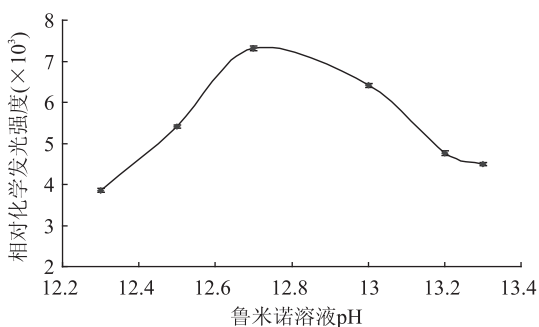


图5 鲁米诺溶液 pH 与相对化学发光强度的关系

Fig.5 Relationship between pH of luminol and relative luminescence intensity

碱性环境可增强鲁米诺发光体系的灵敏度。当鲁米诺 pH12.7 时,相对化学发光强度达到最大。当 pH 继续增大时,棒曲霉素的稳定性受到影响,使得相对发光强度降低。因此实验选择鲁米诺溶液 pH 为 12.7。

2.3 正交实验结果

根据单因素实验结果,进行正交实验,结果见表2,方差分析结果见表3。由表2极差分析可知,各因素影响主次顺序是 $C > B > A$,体系的最佳优化组合为 $A_1 B_2 C_3$,即鲁米诺浓度 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 、铁氰化钾浓度 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 、鲁米诺溶液 pH13.0,此时相对发光强度为9014.2。从表3中可知,各因素对化学相对发光强度都没有显著性影响,棒曲霉素的结构可能是导致该结果的重要原因。

2.4 标准曲线、精密度和检出限

在最佳实验条件下,棒曲霉素浓度在 $5 \times 10^{-3} \sim 0.1 \text{ mg/L}$ 、 $0.1 \sim 1.0 \text{ mg/L}$ 范围与相对化学发光强度有良好的线性关系。回归方程见表4。对 $5 \times 10^{-2} \text{ mg/L}$ 的棒曲霉素进行11次平行测定,得出相对标准偏差

为2.6%。根据化学联合会建议,计算得出其检出限为 $4.6 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$ 。

表2 正交实验结果

Table 2 Results of orthogonal array design

编号	A	B	C	相对化学发光强度
1	1	1	1	3760.6
2	1	2	2	4505.3
3	1	3	3	8739.2
4	2	1	2	4422.5
5	2	2	3	6115.0
6	2	3	1	1135.8
7	3	1	3	2878.9
8	3	2	1	6353.5
9	3	3	2	5984.3
k_1	5668.4	3687.3	3750.0	
k_2	3891.1	5658.0	4970.7	
k_3	5072.2	5286.4	5911.0	
R	1777.3	1970.6	2161.1	

表3 方差分析结果

Table 3 Results of analysis of variance

方差来源	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值
A	4909206.8		0.498	
B	6578475.5	2	0.667	4.460
C	7044635.1		0.715	

表4 标准曲线的线性范围及回归方程

Table 4 Linear range and regression equation of the calibration curves

线性范围(mg/L)	回归方程	相关系数
$5 \times 10^{-3} \sim 0.1$	$y = 0.2646x + 0.1906$	$R^2 = 0.9955$
0.1~1	$y = 0.47x + 2.55$	$R^2 = 0.9906$

2.5 干扰掩蔽实验

在最佳实验条件下,干扰样的测定结果为:当棒曲霉素浓度 0.1 mg/L ,干扰允许限 $\pm 5\%$ 时,1000 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 和500 倍 CO_3^{2-} 对实验无干扰。4 倍 Ca^{2+} 和1 倍的 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 As^+ 、 Cu^{2+} 、 Cr^{6+} 对发光体系有促进作用。为减少金属离子的影响,可加入2.5% (v/v) 0.2mol/L 的乙二胺四乙酸二钠(Ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)将其掩蔽。如果水样污染严重,可结合快速固相分离技术,净化样品以提高检测灵敏度。

2.6 饮用水分析

在最佳实验条件下,选取实验室自来水、宿舍自来水、羊城山泉牌桶装水作为样品,测定其中棒曲霉素含量。然后向样品中都加入 0.1 mg/L 的棒曲霉素做加标回收实验,结果见表5。

3 结论

棒曲霉素能显著促进鲁米诺-铁氰化钾化学发光体系发光,据此建立了饮用水中棒曲霉素的流动注射化学发光检测方法。最佳的实验条件下,即鲁米诺浓度 $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 、铁氰化钾浓度 $1.5 \times$

(下转第323页)

[8] Prochazkova D, Sairam RK, Srivastava GC, *et al.* Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves[J]. Plant Science, 2001, 161: 765-771.

[9] Havir EA, McHale NA. Biochemical and developmental characterisation of multiple forms of catalase in tobacco leaves [J]. Plant Physiology, 1987, 84: 450-455.

[10] Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplast[J]. Plant and Cell Physiology, 1981, 22: 867-880.

[11] 林琳. 鸭梨黑心病的预测及 AsA、OA 和壳聚糖对其防治机理的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2008.

[12] 林植芳, 李双顺, 林桂珠, 等. 衰老叶片和叶绿体中 H₂O₂

的累计与膜质过氧化的关系[J]. 植物生理学报, 1988, 4: 16-22.

[13] Sivapriya M, Leela S. Isolation and purification of a novel antioxidant protein from the water extract of Sundakai (Solanum torvum) seeds[J]. Food Chemistry, 2007, 100(4): 510-517.

[14] Navabpour S, Morris K, Allen R, *et al.* Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54: 2285-2292.

[15] Xue YF, Liu ZP. Antioxidant enzymes and physiological characteristics in two Jerusalem artichoke cultivars under salt stress [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2008, 55: 776-781.

(上接第 308 页)

表 5 饮用水分析结果
Table 5 Results of drinking water analysis

样品	棒曲霉素含量	加标量 (mg/L)	回收量 (mg/L)	回收率 (%)	RSD (%)	HPLC 测出量 (mg/L)	RSD (%)
实验自来水		0.1	0.863	86.3	3.51	89.6	3.14
宿舍自来水	未检出	0.1	0.874	87.4	3.27	92.0	2.69
羊城桶装水		0.1	0.942	94.2	2.87	97.8	2.32

10⁻⁴mol/L、鲁米诺溶液 pH 为 13.0 时, 其检出限 4.6 × 10⁻⁴mg/L, 线性范围 5 × 10⁻³~1mg/L。该方法可实现在线实时检测, 可应用于饮用水中可能出现的棒曲霉素安全预警。

参考文献

[1] Rodríguez A M, Rodríguez M J, Córdoba J J. Development of a multiplex real-time PCR to quantify aflatoxin, ochratoxin A and patulin producing molds in foods[J]. International Journal of Food Microbiology, 2012, 155(1-2): 10-18.

[2] 刘盼红, 岳田利, 袁亚宏, 等. 贮藏苹果中展青霉素产生菌的分离及其 ITS 序列分析鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(8): 197-202.

[3] Schumacher D M, Metzler M, Lehmann L, *et al.* DNA-DNA cross-links contribute to the mutagenic potential of the mycotoxin patulin[J]. Toxicology Letters, 2006, 166(3): 268-275.

[4] Alborch L, Bragulat M R, Castellá G, *et al.* Mycobiota and mycotoxin contamination of maize flours and popcorn kernels for human consumption commercialized in Spain [J]. Food Microbiology, 2012, 32(1): 97-103.

[5] Liu B H, Yu F Y, Wu T S, *et al.* Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2003, 199(3): 255-263.

[6] Melo F T, Rosa R M, Oliveira I M. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin[J]. Food and Chemical Toxicology, 2012, 50(10): 3548-3555.

[7] Raiola A, Meca G, Ritieni A, *et al.* Study of thermal resistance and *in vitro* bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products[J]. Food and Chemical Toxicology,

2012, 50(9): 3068-3072.

[8] Drusch S, Kopka S, Kaeding J. Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid[J]. Food Chemistry, 2005, 100(1): 192-197.

[9] 燕廷, 朱定波, 唐书泽, 等. 鲁米诺-铁氰化钾流动注射化学发光法测定饮用水中铅[J]. 广东农业科学, 2011, 35(11): 124-127.

[10] 朱定波, 马强, 唐书泽, 等. 鲁米诺-铁氰化钾流动注射化学发光体系测定饮用水中 α-茄碱[J]. 食品工业科技, 2012, 33(22): 84-86.

[11] 朱定波, 燕廷, 唐书泽, 等. 流动注射化学发光法测定饮用水中的砷Ⅲ[J]. 广东农业科学, 2012, 9: 151-153.

[12] 冯婷, 胡玉斐, 李攻科. 鲁米诺-铁氰化钾化学发光体系快速分析生物样品中莱克多巴胺[J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(1): 74-77.

[13] Fernández-Cruz M L, Mansilla M L, Tadeo J L. Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications[J]. Journal of Advanced Research, 2010, 1: 113-122.

[14] 刘雯静, 贾雷立, 刘雪林, 等. 棒曲霉素检测方法研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(10): 1978-1979.

[15] 王素梅, 杨文领. 高效液相色谱法测定浓缩苹果汁中棒曲霉素[J]. 生物技术, 2003, 13(1): 18-19.

[16] Funes G J, Resnik S L. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina[J]. Food Control, 2009, 20(3): 277-280.

[17] Liu H Y, Gao X F, Song Z H, *et al.* Rapid determination of picogram levels of patulin in apple juice using a flow injection chemiluminescence procedure[J]. Journal of Science of Food and Agriculture, 2008, 88(15): 2744-2748.