

LC-30A 测定粮食中赭曲霉毒素 A 的含量

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中赭曲霉毒素 A 的方法。实验结果表明：在浓度范围 0.5 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 内，校准曲线相关系数大于 0.9999；进样量 2 μL ，仪器检出限为 0.15 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。三个浓度下标准品的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.31%和 0.41~1.91%之间；玉米样品平均加标回收率为 88.3%~96.7%。该方法简便快速，且易操作。

关键词：赭曲霉毒素 A 粮食 超高效液相色谱

赭曲霉毒素 (Ochratoxins)是一组结构类似的真菌毒素，有 A、B、C、D 4 种化合物，主要危及人和动物肾脏，其中毒性最大、与人类健康关系最密切、产毒量最高、对农作物的污染最重、分布最广的是赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A ,OTA)。赭曲霉毒素 A 是被国际癌症研究机构确定为 II B 类致癌物的一种真菌毒素，它能致癌、致畸、破坏免疫系统，对肝、肾脏造成损害，还可导致神经中毒。赭曲霉毒素 A 首先在玉米中发现以后又相继从谷物和大豆中检出。我国食品安全国家标准《GB2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定谷物及豆类制品中赭曲霉毒素 A 限量为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

目前报道用于检测赭曲霉毒素 A 的分析方法有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附法和荧光比色法等。

本文参照 GB/T 5009.96-2003，采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A，分析了玉米中的赭曲霉毒素 A，得到了令人满意的分析结果。

1. 实验条件

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 二元高压梯度系统。具体配置为：LC-30AD 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，RF-20AXS 荧光检测器，CBM-20A 系统控制器，LabSolutions Ver. 5.42SP3 色谱工作站。

1.2 试剂

1.2.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)：将 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾溶解于 990 mL 水中，用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.0，最后定容为 1 L。装于具塞棕色瓶中，室温避光处可以储藏 1 周。

1.3 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II 3.0 mm I.D.×75 mm L., 2.2 μm

流动相: A—2%乙酸水溶液; B—乙腈 (60:40, V/V)

流速: 1.0 mL/min

进样体积: 2 μL 柱温: 40℃

检测波长: Ex=333 nm, Em=460 nm

洗脱方式: 等度洗脱

1.4 样品制备

1.4.1 标准溶液配制

用甲醇配置赭曲霉毒素 A 标准工作溶液, 浓度为 0.5 μg/L、1 μg/L、2 μg/L、5 μg/L、20 μg/L、50 μg/L。

1.4.2 样品前处理方法:

①提取: 准确称取试样 50.0 g 于搅拌杯中, 加入 5.0 g 氯化钠, 100 mL 甲醇-水 (80+20)。将搅拌杯置于均质器上, 于 22000 r/min 高速搅拌提取 2 min。提取液经折叠快速定性滤纸过滤于干净的烧杯中。准确移取 10.0 mL 滤液并加入 40.0 mL PBS 缓冲液稀释, 混合均匀, 经玻璃纤维滤纸过滤得到样品提取液。

②净化: 将免疫亲和柱连接于 10 mL 玻璃注射器下。准确移取 10.0 mL 样品提取液于玻璃注射器中, 将空气压力泵与玻璃注射器相连接, 调节压力使溶液以约 1~2 滴/秒流速缓慢通过免疫亲和柱, 直至 2 mL~3 mL 空气通过免疫亲和柱。以 10 mL PBS 缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱, 弃去全部流出液, 并使 2 mL~3 mL 空气通过免疫亲和柱。准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱, 流速为 1 mL/min~2 mL/min。收集全部洗脱液于玻璃试管中, 过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱测定。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

5 μg/L 的标准样品色谱图如图1所示。保留时间为4.656 min.

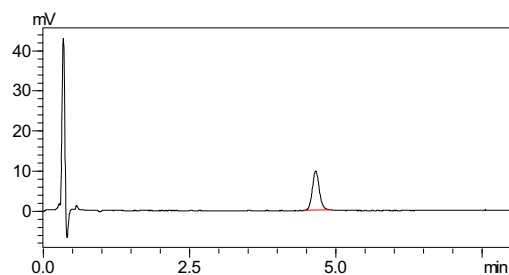


图 1 赭曲霉毒素 A 标准样品色谱图

2.2 线性关系

将 6 个不同浓度的赭曲霉毒素 A 标准工作溶液，按前述的分析条件进行测定。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，结果如图 2 所示。标准曲线方程和相关系数结果见表 1。

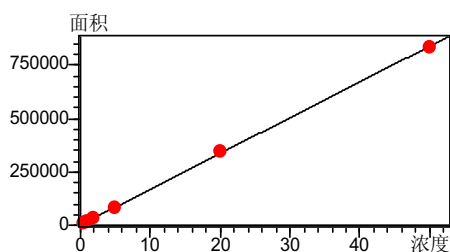


图 2 赭曲霉毒素 A 的标准工作曲线

表 1 标准曲线方程

目标物	CAS No.	$Y = aX + b$	R
赭曲霉毒素 A(Ochratoxins A ,OTA)	303-47-9	$Y = 16794.1X + 224.25$	0.9999

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 ($0.5 \mu\text{g/L}$) 计算仪器的灵敏度，仪器检测限 (3 倍噪声计算)、定量限 (10 倍噪声计算) 分别为 $0.15 \mu\text{g/L}$ 和 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。色谱图如图 3 所示。

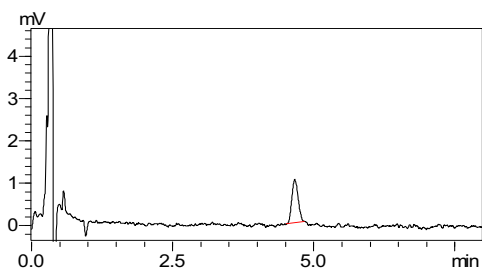


图 3 标准溶液的色谱图

2.4 精密度实验

取低、中、高三个不同浓度标准溶液，分别平行进样 6 次，目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.03~0.31%和 0.41~1.91%之间，仪器精密度良好。

表 2 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度(μg/L)	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
0.5	0.31	1.91
5	0.04	1.01
20	0.03	0.41

2.5 基质加标实验

按照上述方法处理玉米样品，上机测试，检出赭曲霉毒素 A。在玉米样品中添加标样，平行 5 次。玉米样品色谱图如图 4 所示。玉米样品加标色谱图如图 5 所示。基质加标回收结果如表 3 所示。

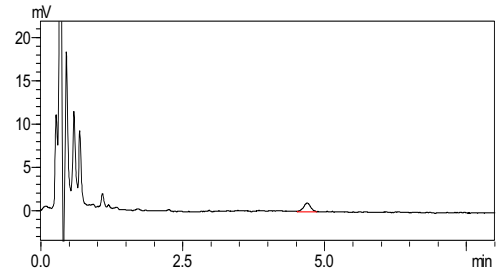


图 4 玉米空白样品的色谱图

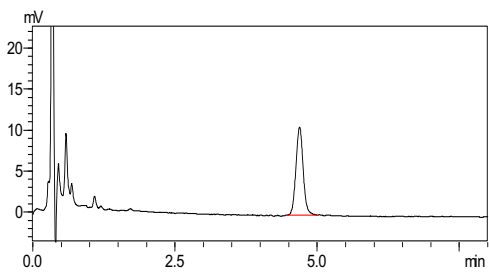


图 5 玉米加标样品的色谱图(添加浓度为 5 μg/kg)

表 3 基质加标回收结果

添加浓度 级别	加标量 (μg/kg)	玉米空白含量 (μg/kg)	平均回收率 (%)
1	2	0.5	96.7
2	5	0.5	88.3
3	10	0.5	92.4

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中赭曲霉毒素 A 的方法。实验结果表明：方法的灵敏度、重复性及线性均良好，可以满足对此种毒素的分析要求。