

LC-30A 无需衍生快速测定粮食中黄曲霉毒素的含量

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 无需衍生快速测定粮食中黄曲霉毒素的方法。实验结果表明: G1、B1 线性范围 0.2 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$, G2、B2 线性范围 0.06 $\mu\text{g/L}$ ~ 15 $\mu\text{g/L}$, 相关系数均大于 0.9999; 进样量 2 μL , 仪器检出限为 0.002 ~ 0.019 $\mu\text{g/L}$, 仪器定量限为 0.007 ~ 0.065 $\mu\text{g/L}$; 三个浓度(G1、B1 为 0.5、2、10 $\mu\text{g/L}$, G2、B2 为 0.15、0.6、3 $\mu\text{g/L}$)标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.11~0.39%和 0.13~1.34%之间; 玉米样品三个浓度加标回收率为 88.8%~108%。

关键词: 黄曲霉毒素 无需 超高效液相色谱 免疫亲和柱

黄曲霉毒素(AFT)是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物, 具有极强的毒性和致癌性。黄曲霉毒素广泛存在于粮油食品中, 其中以花生和玉米污染最为严重。我国食品安全国家标准《GB2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定玉米及其制品中黄曲霉毒素 B1 限量为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。

由于反相洗脱会使黄曲霉毒素 B1 和 G1 的荧光效应发生猝灭, 通常需要进行衍生化以增强其荧光强度。衍生化的方法一般有柱前和柱后两类, 柱前衍生一般使用三氟乙酸, 柱后衍生有碘液、过溴化吡啶溴以及电化学和光化学衍生等方法。这些方法耗时较长, 且柱前衍生法前处理操作较复杂, 柱后衍生法所需的柱后反应器或电化学单元价格昂贵。

免疫亲和柱能特效性地、高选择性地吸附黄曲霉毒素, 而让其它杂质通过柱子, 使样品得以纯化。吸附后的黄曲霉毒素可被极性有机溶剂洗脱。免疫亲和柱将提取、净化、浓缩一次完成, 操作简便, 净化效果好, 提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

本文参考《粮油检验 粮食中黄曲霉毒素的测定 超高效液相色谱法》中的要求, 采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A, 免疫亲和柱净化, 无需衍生快速测定了玉米中的黄曲霉毒素 G1、B1、G2、B2, 供相关检测人员参考。

1. 实验条件

1.1 仪器和材料

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-20Alite 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.42SP3 色谱工作站, Romer AflaStar R 黄曲霉毒素免疫亲和柱。

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III 2.0 mmI.D.×50 mm L., 1.6 μm

流动相: 甲醇/水 (45/55,v/v)

流速: 0.2mL/min

进样体积: 2 μL

柱温: 30℃

检测波长: Ex=360 nm, Em=440 nm

1.3 样品制备

①标准溶液配制: 黄曲霉毒素混标溶液(B1,G1: 1.0 mg/L; B2,G2: 0.30 mg/L), 经流动相逐级稀释成 B1、G1: 0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50 μg/L; B2、G2: 0.06、0.15、0.30、0.60、1.5、3.0、6.0、15 μg/L 8 个标准溶液浓度系列。

②样品前处理方法: 取 25 g±0.1 g 经 20 目筛筛分的玉米样品于 250 mL 锥形瓶中, 加入 100 mL 甲醇/水 (80/20,v/v), 高速均质 2 min, 用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清。取 2 mL 滤液与 12mL 超纯水混合均匀, 以 1~2 滴/s 的速度全部通过免疫亲和柱。再以 2×5 mL 水以 1~2 滴/s 的速度洗柱, 抽干小柱。用 2×0.5 mL 甲醇, 2×0.5 mL 水依次洗脱, 收集洗脱液, 定容至 2mL, 经 0.22 μm 滤膜过滤后供测定。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

标准样品色谱图如图1所示。其中, G1、B1浓度为0.5 μg/L, G2、B2浓度为0.15 μg/L。保留时间分别为2.110、2.584、3.288、4.105。

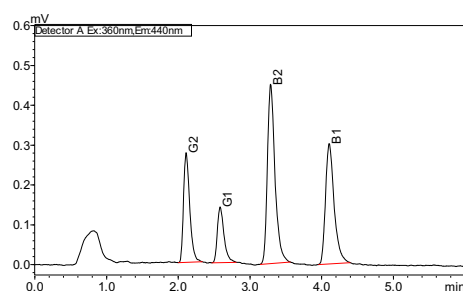


图1 黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 标准样品色谱图

2.2 线性关系

将 8 个不同浓度的黄曲霉毒素标准工作溶液，按 1.2 中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、图 3、图 4、图 5 所示。标准曲线方程和相关系数结果见表 2。

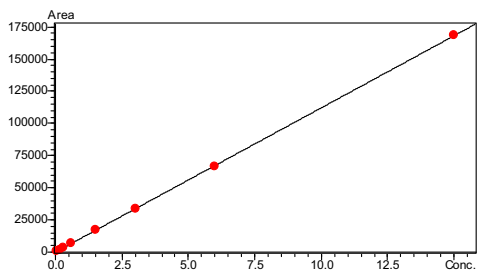


图 2 黄曲霉毒素 G2 的标准工作曲线

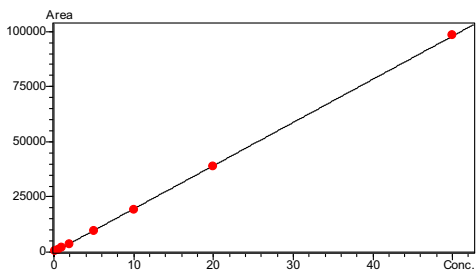


图 3 黄曲霉毒素 G1 的标准工作曲线

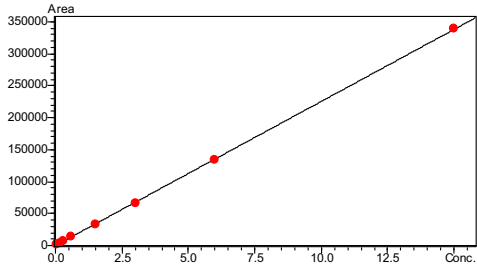


图 4 黄曲霉毒素 B2 的标准工作曲线

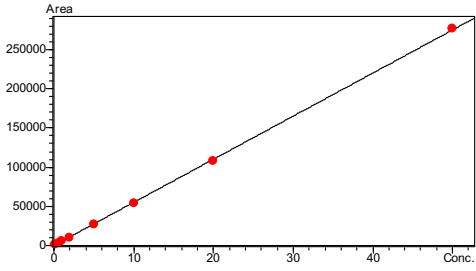


图 5 黄曲霉毒素 B1 的标准工作曲线

表 2 标准曲线方程

组分名称	CAS No.	Y= aX+b	R
G2(Aflatoxin G2)	7241-98-7	Y=11213.00X	0.9999
G1(Aflatoxin G1)	7220-81-7	Y=1958.68X	0.9999
B2(Aflatoxin B2)	1165-39-5	Y=22545.30X	0.9999
B1(Aflatoxin B1)	1162-65-8	Y=5506.77X	0.9999

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点计算仪器的灵敏度（G1、B1：0.2 μg/L；G2、B2：0.06 μg/L），通过 LabSolutions 软件，按照 ASTM 计算信噪比，选取基线为 4.75-5.75 min 计算信噪比，仪器检测限（3 倍噪声计算）、定量限（10 倍噪声计算），结果见表 3。色谱图如图 6 所示。

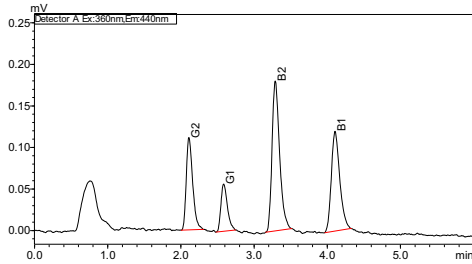


图 6 标准溶液的色谱图

表 3 仪器检出限和定量限($\mu\text{g/L}$)

组分	检出限	定量限
G2	0.003	0.011
G1	0.019	0.065
B2	0.002	0.007
B1	0.009	0.030

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 0.11~0.39%和 0.13~1.34%之间，仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

组分	浓度	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
G1	0.5	0.128	1.344
	2.0	0.390	0.687
	10	0.122	0.219
B1	0.5	0.140	1.333
	2.0	0.374	0.274
	10	0.111	0.472
G2	0.15	0.126	1.034
	0.60	0.379	0.147
	3.0	0.116	0.116
B2	0.15	0.140	0.562
	0.60	0.370	0.296
	3.0	0.116	0.130

2.5 基质加标实验

按照 1.3 所述方法处理全程序空白样品（除不加玉米外，其他步骤和实际样品的处理相同）和玉米样品，上机测试，均未检出黄曲霉毒素。全程序空白样品色谱图如图 7 所示。玉米样品色谱图如图 8 所示。玉米样品加标色谱图如图 9、图 10、图 11 所示。基质加标回收结果如表 5 所示。

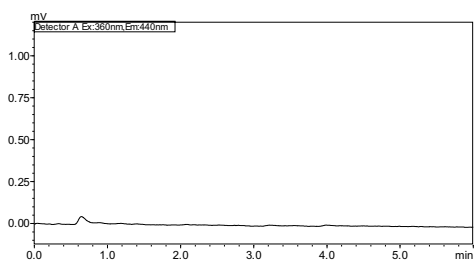


图 7 全程序空白样品的色谱图

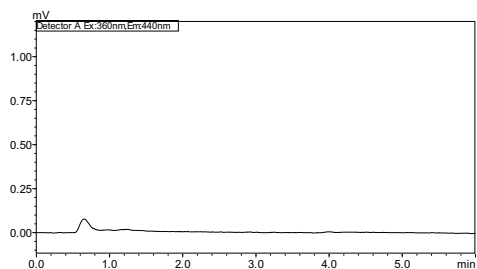


图 8 玉米样品的色谱图

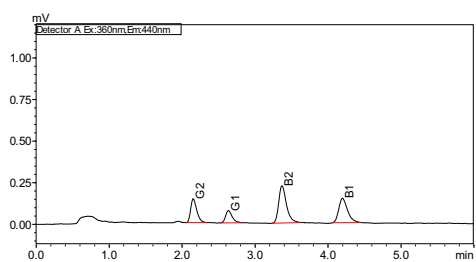


图 9 玉米加标样品的色谱图

(G1、B1:2 μ g/kg; G2、B2:0.6 μ g/kg)

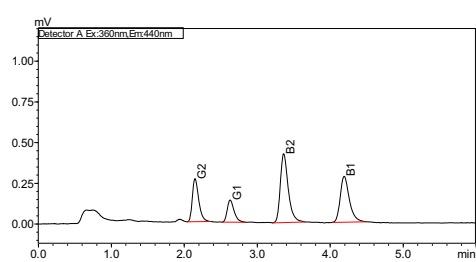


图 10 玉米加标样品的色谱图

(G1、B1:1 μ g/kg; G2、B2:0.3 μ g/kg)

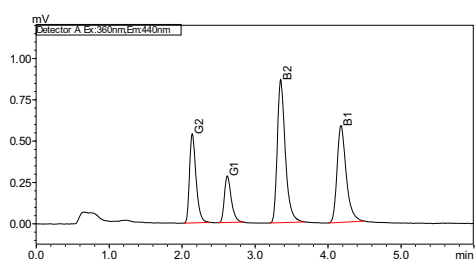


图 11 玉米加标样品的色谱图

(G1、B1:4 μ g/kg; G2、B2:1.2 μ g/kg)

表 5 基质加标回收结果

组分	加标量 (μ g/kg)	实测值 (μ g/kg)	回收率 (%)
G1	1.0	0.948	94.8
	2.0	1.820	91
	4.0	4.132	103
B1	1.0	0.896	89.6
	2.0	1.776	88.8
	4.0	4.3	108

	0.3	0.296	98.7
G2	0.6	0.572	95.3
	1.2	1.212	101
	0.3	0.292	94.3
B2	0.6	0.568	94.7
	1.2	1.248	104

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中黄曲霉毒素的方法。实验结果表明：G1、B1 线性范围 0.2 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$ ，G2、B2 线性范围 0.06 $\mu\text{g/L}$ ~ 15 $\mu\text{g/L}$ ，相关系数均大于 0.9999；进样量 2 μL ，仪器检出限为 0.002 ~ 0.019 $\mu\text{g/L}$ ，仪器定量限为 0.007 ~ 0.065 $\mu\text{g/L}$ ；低、中、高三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.11~0.39%和 0.13~1.34%之间；玉米样品三个浓度下的加标回收率在 88.8%~108%之间。本方法无需衍生，操作简单，免疫亲和柱净化效果良好，准确度和灵敏度高，适用于粮食中黄曲霉毒素的快速、准确检测。