

LC-30A 柱前衍生法测定粮食中伏马毒素的含量

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中伏马毒素的方法。实验结果表明：B1、B2 在浓度范围 0.125 $\mu\text{g/mL}$ ~ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 之间时，曲线相关系数均大于 0.9995；进样量 2 μL ，仪器检出限分别为 0.02 和 0.01 $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 0.06 和 0.03 $\mu\text{g/mL}$ ；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 0.048~0.085% 和 1.337~1.798%之间；玉米样品平均加标回收率为 78.4%~87.5%。该方法简便快速，且易操作。

关键词：伏马毒素 粮食 超高效液相色谱 柱前衍生

伏马毒素 (Fumonisin, FB) 是一种霉菌毒素，是由串珠镰刀菌产生的水溶性代谢产物，对热稳定，不易被蒸煮破坏，在多数粮食加工处理过程均比较稳定。粮食在加工、贮存、运输过程中均易产生此种毒素。有报道指出，伏马毒素对人、畜不仅是一种促癌物，而且完全是一种致癌物。动物试验和流行病学资料已表明，伏马毒素主要损害肝肾功能，能引起马脑白质软化症和猪肺水肿等，并与我国和南非部分地区高发的食道癌有关，现已引起世界范围的广泛注意。我国食品安全国家标准《GB2761-2011 食品中真菌毒素限量》中还没有规定粮食中伏马毒素的限量。但美国 FDA 规定的人类食用玉米中伏马毒素最高限量为 2 mg/kg 可以作为粮食安全标准的参考。

伏马毒素的检测先后使用过薄层色谱法、气相色谱法、酶联免疫法、高效液相色谱法等，目前研究和应用得最多的是利用免疫亲和柱净化后衍生并用荧光检测器检测的高效液相色谱法。

本文采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A，柱前衍生法分析了玉米中的伏马毒素 B1 和 B2，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

1.2.1 提取剂：取 25 mL 甲醇加入 25 mL 乙腈和 50 mL 水。

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。

1.2.3 OPA 衍生液：将 40 mg OPA 溶解在 1 mL 甲醇中，用 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液 5mL 稀释。

加 2-巯基乙醇（MCE）50 μL ，混匀。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. \times 75 mm L., 2.2 μm

流动相：A—0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液；B—甲醇（72:28，v/v）（pH 3.5）

流速：1.0 mL/min

进样体积：2 μL 柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：Ex=335 nm，Em=440 nm

洗脱方式：等度洗脱

1.4 样品制备

1.4.1 标准溶液配制：B1、B2 经乙腈+水（1+1）稀释成 0.125、0.25、0.5、1.0、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液浓度系列。

1.4.2 样品前处理方法：

①提取：称取 20 g 粉碎试样，置于 250 mL 的离心管中，加 50 mL 提取液，在振荡器上水平振荡 20 min。在离心力为 2500 g 条件下离心 10 min，用滤纸过滤上清液，在离心管的残渣中再加 50 mL 提取液，以上述方式提取离心后，仍用上次的滤纸过滤，合并两次滤液。混合均匀后，量取 10 mL 滤液置于 100 mL 的烧杯中，加 40 mL PBS 缓冲液，混匀。用玻璃纤维滤纸过滤，取 10 mL 滤液用于免疫亲和柱净化。

②净化：将免疫亲和柱与 10 mL 玻璃注射器下端连接。准确移取 10 mL 上述滤液于玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器上端连接，调节压力使滤液以约 1~2 滴/秒的流速通过亲和柱，弃掉流出液。用上述方式，再以 10 mL PBS 缓冲液清洗亲和柱，直至液体完全流出，空气通过，弃掉全部流出液。最后加入 1.5 mL 甲醇将亲和柱中的伏马毒素洗脱，控制流速为 1 mL/min ~2 mL/min，收集全部洗脱液于玻璃试管中，在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下用氮吹仪以氮气吹干，残留物置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下存放，备用。测定前用乙腈+水（1+1）400 μL 溶解残留物，过 0.22 μm 滤膜，此为供高效液相色谱测定用样品净化液。

③衍生：分别取上述净化液和标准工作溶液各 50 μL ，分别置于 1 mL 的各个试管中，各加入 50 μL OPA 衍生液，涡流混合器上混合 30 s，静置 3 min 后，立即取 2 μL 衍生液进超高效液相色谱仪分析。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

浓度为2.5 μg/mL标准样品色谱图如图1所示。B1和B2的保留时间分别为2.456 min和6.927 min。

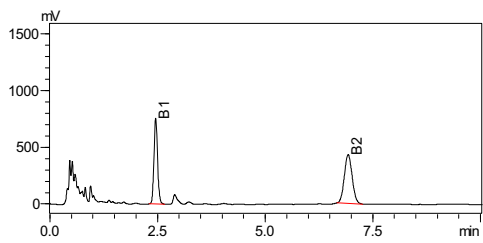


图 1 伏马毒素 B₁、B₂ 标准样品色谱图

2.2 线性关系

将 5 个不同浓度的伏马毒素标准工作溶液，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、图 3 所示。标准曲线方程和相关系数结果见表 1。

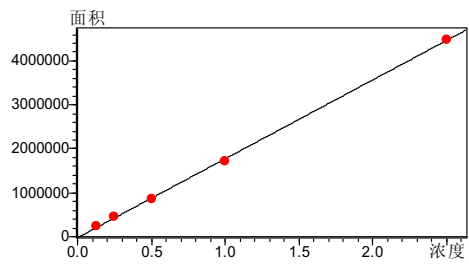


图 2 伏马毒素 B₁ 的标准工作曲线

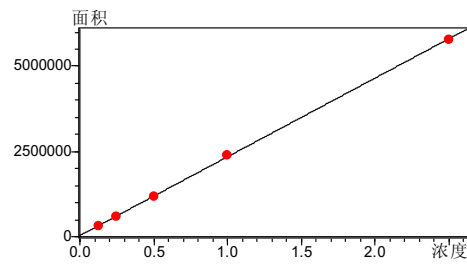


图 3 伏马毒素 B₂ 的标准工作曲线

表 1 标准曲线方程

组分	CAS No.	Y= aX+b	R
伏马毒素 B1(Fumonisin B1, FB1)	116355-83-0	Y=182437X-3393	0.9995
伏马毒素 B2(Fumonisin B2, FB2)	116355-84-1	Y=232351X-2991	0.9999

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点（0.125 μg/mL）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），结果见表 2。色谱图如图 4 所示。

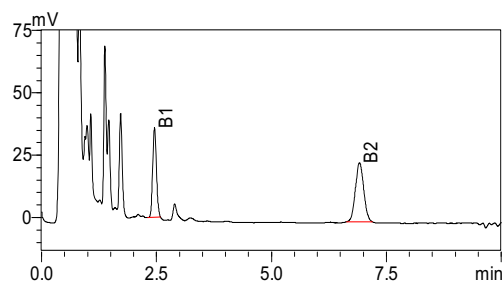


图 4 标准溶液的色谱图

表 2 仪器检出限和定量限($\mu\text{g/mL}$)

组分	检出限	定量限
B1	0.02	0.06
B2	0.01	0.03

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 0.048~0.085%和 1.337~1.798%之间，仪器精密度良好。

表 3 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度($\mu\text{g/mL}$)	组分	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
0.2	B1	0.079	1.765
	B2	0.064	1.337
1.0	B1	0.085	1.558
	B2	0.072	1.332
2.0	B1	0.048	1.652
	B2	0.064	1.798

2.5 基质加标实验

按照上述方法处理玉米样品，上机测试，检出了伏马毒素 B1，浓度为 0.04 mg/kg。在玉米样品中添加标样，平行 5 次。玉米样品色谱图如图 5 所示。玉米样品加标色谱图如图 6 所示。基质加标回收结果如表 4 所示。

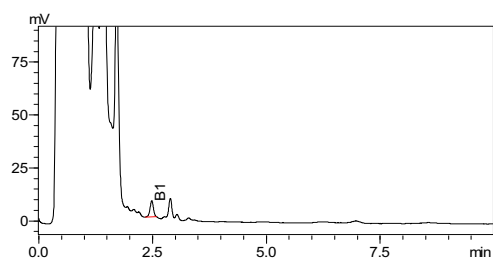


图 5 玉米空白样品的色谱图

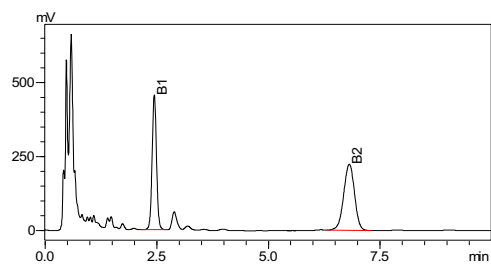


图 6 玉米加标样品的色谱图(添加浓度为 2.0 mg/kg)

表 4 基质加标回收结果

添加浓度 级别	组分	加标量 (mg/kg)	平均回收率 (%)
1	B1	0.2	87.0
	B2	0.2	82.7
2	B1	1.0	84.6
	B2	1.0	78.4
3	B1	2.0	87.5
	B2	2.0	81.7

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中伏马毒素的方法。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。