

## LC-30A 柱前衍生法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 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 0.5  $\mu\text{g/L}$  ~ 10  $\mu\text{g/L}$ ，G2、B2 线性范围 0.15  $\mu\text{g/L}$  ~ 3  $\mu\text{g/L}$ ，相关系数均大于 0.999；进样量 2  $\mu\text{L}$ ，仪器检出限为 0.002 ~ 0.011  $\mu\text{g/L}$ ，仪器定量限为 0.007 ~ 0.038  $\mu\text{g/L}$ ；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 0.04~0.20%和 0.15~0.80%之间；玉米样品平均加标回收率为 89.4%~103%。该方法简便快速，且易操作。

**关键词：**黄曲霉毒素 粮食 超高效液相色谱 柱前衍生

黄曲霉毒素(Aflatoxin, 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  $\mu\text{g/kg}$ 。

由于黄曲霉毒素在水溶液中会发生荧光淬灭，反相色谱中 B1 和 G1 两种异构体荧光强度很弱，需进行衍生化。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。

多功能净化柱（MFC）是一种特殊的固相萃取柱，可选择性吸附样液中的脂类、蛋白类等杂质，AFT 不被吸附而直接通过。MFC 直接上样，10 秒内完成净化，操作简便快速，净化效果理想。

本文参考 GB/T5009.23-2006 中的要求，采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A，多功能柱净化、柱前衍生法分析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

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。

### 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：A—水；B—甲醇:乙腈（3:1，v/v）

流速：0.6 mL/min

进样体积：2 μL      柱温：40℃

检测波长：Ex=360 nm，Em=440 nm

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 22%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Pumps	Pump B Conc.	45
3.00	Pumps	Pump B Conc.	60
5.00	Pumps	Pump B Conc.	60
5.10	Pumps	Pump B Conc.	22
8.00	Controller	Stop	

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)，经乙腈稀释成 B1、G1: 0.50、1.0、2.0、5.0、10 μg/L；B2、G2: 0.15、0.30、0.60、1.5、3.0 μg/L 标准溶液浓度系列。各取 200 μL，室温下氮气吹干，按照样品前处理方法衍生，氮气吹干，以 200 μL 水-乙腈（85+15）溶解，0.22 μm 滤膜过滤后供测定。

②样品前处理方法：按照 GB/T5009.23-2006 中 14.1~14.3 进行前处理，样品溶液经 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， G<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>浓度为2μg/L， G<sub>2</sub>、B<sub>2</sub>浓度为0.6μg/L。保留时间分别为1.689、2.102、2.363、2.762。

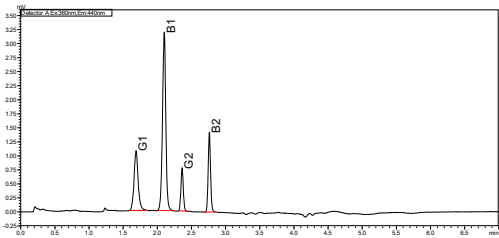


图 1 黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、B<sub>2</sub> 标准样品色谱图

2.2 线性关系

将 5 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。

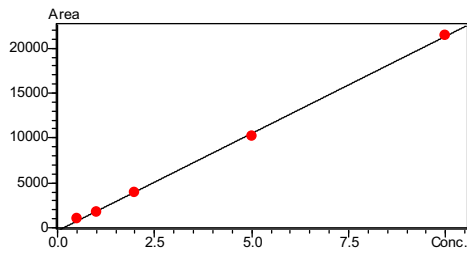


图 2 黄曲霉毒素 G1 的标准工作曲线

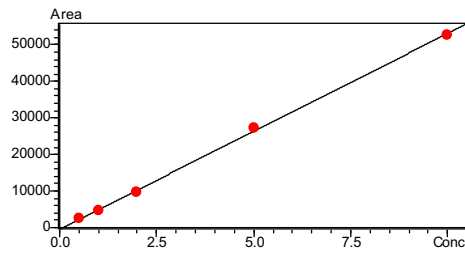


图 3 黄曲霉毒素 B1 的标准工作曲线

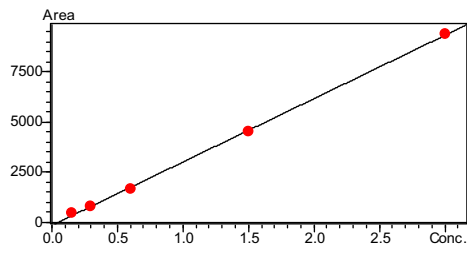


图 4 黄曲霉毒素 G2 的标准工作曲线

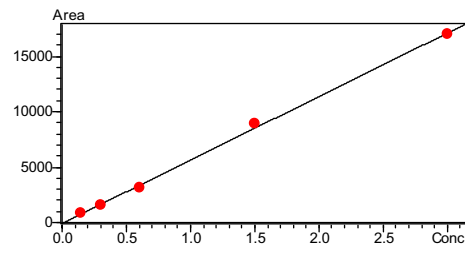


图 5 黄曲霉毒素 B2 的标准工作曲线

表 2 标准曲线方程

中文名称	英文名称	CAS No.	$Y = aX + b$	R
黄曲霉毒素 G1	Aflatoxin G1	1165-39-5	$Y = 2164.99X - 352.090$	0.9996
黄曲霉毒素 B1	Aflatoxin B1	1162-65-8	$Y = 5352.15X - 439.673$	0.9994
黄曲霉毒素 G2	Aflatoxin G2	7241-98-7	$Y = 3159.62X - 142.456$	0.9997
黄曲霉毒素 B2	Aflatoxin B2	7220-81-7	$Y = 5733.56X - 94.928$	0.9992

### 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、B1：0.5  $\mu\text{g/L}$ ；G2、B2：0.15  $\mu\text{g/L}$ ），通过 LabSolutions 软件计算信噪比，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。

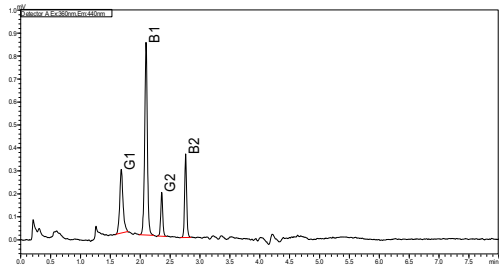


图 6 标准溶液的色谱图

表 3 仪器检出限和定量限(μg/L)

组分	检出限	定量限
G1	0.011	0.038
B1	0.003	0.011
G2	0.005	0.016
B2	0.002	0.007

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 0.04~0.20%和 0.15~0.80%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)

浓度(μg/L)	组分	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
0.5	G1	0.20%	0.67%
	B1	0.09%	0.37%
0.15	G2	0.05%	0.80%
	B2	0.04%	0.49%
2	G1	0.20%	0.16%
	B1	0.19%	0.15%
0.6	G2	0.20%	0.22%
	B2	0.18%	0.19%
10	G1	0.18%	0.22%
	B1	0.18%	0.21%
3	G2	0.17%	0.23%
	B2	0.16%	0.18%

2.5 基质加标实验

按照 1.3 所述方法处理玉米样品，上机测试，检出黄曲霉毒素。在玉米样品中添加标样，平行 2 次。玉米样品色谱图如图 7 所示。玉米样品加标色谱图如图 8 所示。基质加标回收结果如表 5 所示。

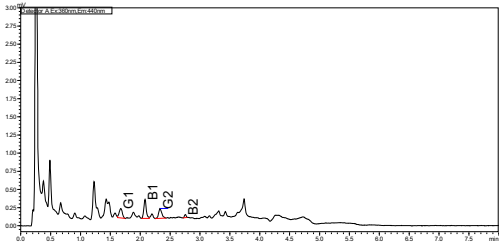


图 7 玉米空白样品的色谱图

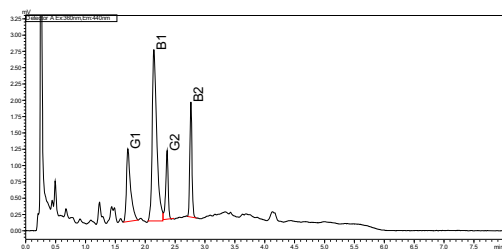


图 8 玉米加标样品的色谱图

表 5 基质加标回收结果

组分	样品含量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	加标量 ( $\mu\text{g/kg}$ )	平均回收率 (%)
G1	0.153	1.0	89.4
B1	0.088	1.0	99.3
G2	0.082	0.3	103
B2	0.013	0.3	99.1

### 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  $0.5 \mu\text{g/L} \sim 10 \mu\text{g/L}$ ，G2、B2 线性范围  $0.15 \mu\text{g/L} \sim 3 \mu\text{g/L}$ ，相关系数均大于 0.999；进样量  $2 \mu\text{L}$ ，仪器检出限为  $0.002 \sim 0.011 \mu\text{g/L}$ ，仪器定量限为  $0.007 \sim 0.038 \mu\text{g/L}$ ；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 0.04~0.20%和 0.15~0.80%之间；玉米样品平均加标回收率为 89.4%~103%。