

高效液相色谱碘柱后衍生法检测果仁类食品中的黄曲霉毒素

摘要：采用液相色谱碘柱后衍生法检测果仁类食品中的黄曲霉毒素，样品经过免疫亲和柱净化，进样液相色谱分析，经碘溶液柱后衍生后荧光检测器检测。方法简便快速，易操作。黄曲霉毒素 B1、G1 线性范围 0.01 ~ 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ，B2、G2 线性范围 0.003 ~ 0.015 $\mu\text{g/mL}$ ，线性相关系数 R 均在 0.999 以上，LOD 和 LOQ 范围分别在 0.060 ~ 0.159 ng/mL 和 0.200 ~ 0.530 ng/mL ，回收率在 89.5% ~ 101.6% 之间。

关键词：碘柱后衍生法 黄曲霉毒素 果仁

黄曲霉毒素（AF）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，可引发动物的肝癌、肾癌、胃癌等，其中 B1 的毒性最强。我国规定在玉米、花生、花生油、坚果和干果等食品中的最高允许含量为 20 $\mu\text{g/kg}$ 。1995 年，世界卫生组织制定的食品黄曲霉毒素最高允许浓度为 15 $\mu\text{g/kg}$ 。

免疫亲和柱是将特异性的黄曲霉毒素单克隆抗体与载体蛋白偶联并填柱而成，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，黄曲霉毒素吸附后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，大大简化了前处理过程，提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

由于黄曲霉毒素在水溶液中会发生荧光淬灭，反相色谱中检测黄曲霉毒素 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。

本文采用碘衍生法检测果仁类食品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的含量。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 液相色谱系统

LC-20AD（输液泵，配低压梯度洗脱单元），DGU-20A₅（在线脱气机），SIL-20A（自动进样器），CTO-20A（柱温箱），RF-20A（荧光检测器），CBM-20A（系统控制器），LCsolution（色谱工作站）；

1.1.2 柱后衍生系统

碘柱后衍生系统：LC-20AD（衍生泵），CRB-6A（化学反应箱），碘衍生柱后反应管套件，包括：三通接头，衍生管（PTFE 0.5mm I.D.×1000 cm L.）

1.1.3 其它设备和试剂

Alfa test 免疫亲和柱，VICAM 公司；玻璃纤维滤纸，VICAM 公司；黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 混标溶液，Supeclo 公司；甲醇，HPLC 级，Merck 公司；乙腈，HPLC 级，Merck 公司；纯水，Millipore 纯水机制得。

1.2 标准品溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：黄曲霉毒素混标原溶液(B1, G1: 1.0 mg/L; B2, G2: 0.30 mg/L)，经流动相稀释，配制标准溶液浓度系列。

前处理步骤：取已经粉碎过的样品约 5 g (精确到 0.01 g)，置于锥形瓶中，精密加入 60% 甲醇溶液 50 mL，往复振荡 60 min。精密量取上清液 5 mL，置于 50 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，滤纸过滤。量取滤液 25 mL，通过免疫亲和柱，流速控制约 1~2 滴/秒，用水 10 mL 洗脱，洗脱液弃取，使空气进入柱子，将水挤出柱子。再用 1 mL 甲醇，流速控制 1 滴/秒，收集洗脱液，置于 2 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，0.45 μm 滤膜过滤，待测。

1.3 分析条件

1.3.1 碘衍生分析条件

液相分离条件

流动相：乙腈/甲醇/水=20/25/55(v/v)

流速：0.8 mL/min

色谱柱：Intersil ODS-SP, 4.6 mm I.D. \times 250 mm L., 5 μm

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：20 μL

检测波长：Ex = 360 nm, Em = 440 nm

柱后衍生条件

衍生溶液：0.05% 碘溶液 (取 0.5 g 碘，加入甲醇 100 mL，用水稀释至 1000 mL)

流速：0.3 mL/min

衍生化温度：70 $^{\circ}\text{C}$

2. 结果与讨论

2.1 线性范围及检出限

黄曲霉毒素混标进样液相色谱检测，所得图谱如下图 1 所示。

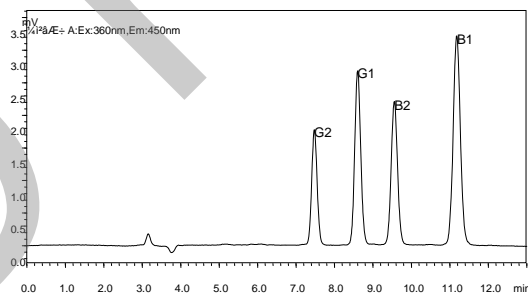


图 1. 混标溶液色谱图 (G2: 0.006 $\mu\text{g/mL}$; G1: 0.020 $\mu\text{g/mL}$; B2: 0.006 $\mu\text{g/mL}$; B1: 0.020 $\mu\text{g/mL}$)

以 B1、G1 浓度分别为 0.010、0.020、0.030、0.040、0.050 $\mu\text{g/mL}$; B2、G2 浓度分别为 0.003、0.006、0.009、0.012、0.015 $\mu\text{g/mL}$ 混标溶液，分别制作工作曲线，标准曲线图如图 2~5，标准曲线方程见表 1。

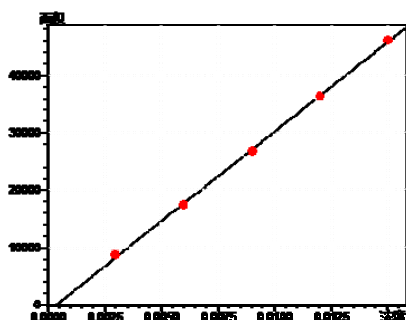


图 2. 黄曲霉毒素 G2 的校准曲线

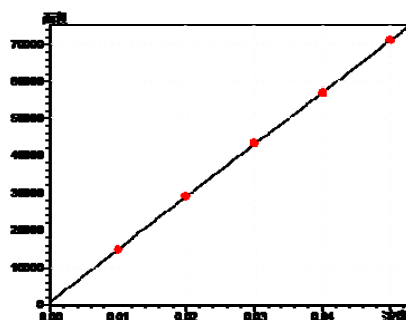


图 3. 黄曲霉毒素 G1 的校准曲线

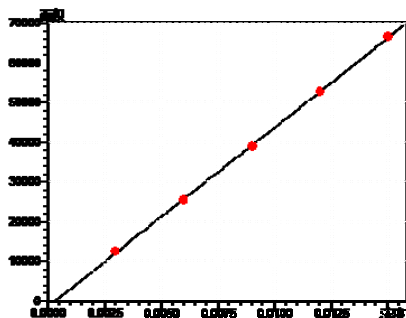


图 4. 黄曲霉毒素 B2 的校准曲线

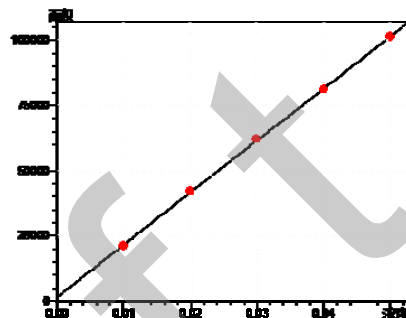


图 5. 黄曲霉毒素 B1 的校准曲线

表 1. 标准曲线方程

| 组分 | $Y=AX+ B$ | R |
|----|----------------------|-------|
| G2 | $Y=3127978 X-1147.2$ | 0.999 |
| G1 | $Y=1402621X+920.5$ | 0.999 |
| B2 | $Y=4512250 X-1413.7$ | 0.999 |
| B1 | $Y=1998433 X+1581.4$ | 0.999 |

四种 AF 的检出限和定量限，见表 2。

表 2. 四种 AF 的检出限和定量限 (ng/mL)

| 组分 | 检出限 | 定量限 |
|----|-------|-------|
| G2 | 0.074 | 0.247 |
| G1 | 0.159 | 0.530 |
| B2 | 0.060 | 0.200 |
| B1 | 0.136 | 0.454 |

2.2 重复性试验

连续进样（混合标样，G2: 0.006 $\mu\text{g/mL}$ ； G1: 0.020 $\mu\text{g/mL}$ ； B2: 0.006 $\mu\text{g/mL}$ ； B1: 0.020 $\mu\text{g/mL}$ ），考察各个组分的保留时间和峰面积重复性，分析结果如下表 3，两者的保留时间 $\text{RSD}\% \leq 0.5\%$ ，峰面积 $\text{RSD}\% \leq 1.25\%$ 。

表 3. 四种 AF 的保留时间和峰面积的重复性 (n=6)

| 组分 | 保留时间 RSD% | 峰面积 RSD% |
|----|-----------|----------|
| G2 | 0.04 | 0.40 |
| G1 | 0.05 | 0.78 |
| B2 | 0.04 | 1.25 |
| B1 | 0.05 | 0.83 |

2.3 样品分析

在某市售果仁样品中检出 B2、B1，样品色谱图见图 6，检测结果见表 4。

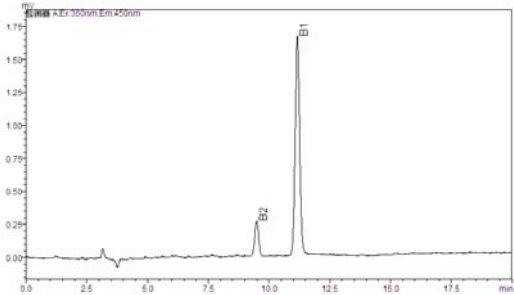


图 6. 市售果仁样品的色谱图

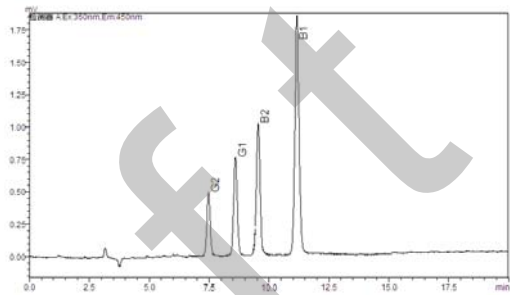


图 7. 碘衍生样品加标色谱图

表 4. 市售果仁样品的测定结果

| 组分 | 浓度 (ng/mL) | 含量(μg/kg) |
|----|------------|-----------|
| G2 | - | - |
| G1 | - | - |
| B2 | 0.53 | 4.30 |
| B1 | 10.07 | 81.76 |

2.4 回收率试验

按照上述方法处理果仁样品，取样量减少 50%，约 2.5 g，添加标样后进行检测。样品加标色谱图见图 7。样品加标回收率在 89.5%~101.6%之间，回收率结果见表 5。

表 5. 碘衍生回收率结果

| 组分 | 加标量 (μg/mL) | 回收率% |
|----|-------------|-------|
| G2 | 3 | 101.6 |
| G1 | 10 | 100.8 |
| B2 | 3 | 93.7 |
| B1 | 10 | 89.5 |

3. 结论

本文建立了液相色谱柱后碘衍生法检测果仁类食品中的黄曲霉毒素的方法。该方法线性相关系数 R 为 0.999 以上，保留时间和峰面积重复性均良好，回收率在 89.5%~101.6%之间，可用于果仁类食品中黄曲霉毒素的检测。