

超高效液相色谱电化学衍生法高灵敏度快速检测黄曲霉毒素

LC-084

摘要：建立了超高效液相色谱荧光电化学柱后衍生法检测黄曲霉毒素的方法。实验结果表明，黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准工作液线性范围是 0.104 ~ 2.08 ng/mL，相关系数 R 均大于 0.999。黄曲霉毒素 B₁ 定量限和检测限分别为 0.04 ng/mL 和 0.013 ng/mL。对低浓度标准品连续多次进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.330% 和 3.288% 以下，仪器精密度良好。该方法具有简便快速，易操作的特点。

关键词：超高效液相色谱 荧光电化学柱后衍生 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT) 是一组具有强毒性和致癌性的次级真菌代谢产物，主要有 B₁、B₂、G₁ 和 G₂，其中 B₁ 毒性最大，欧盟规定了人类直接食用的花生等食品中黄曲霉毒素的限量为总量不超过 4 μg/kg，B₁ 不超过 2 μg/kg。目前，黄曲霉毒素检测方法主要有薄层色谱法、酶联高效液相色谱法和免疫亲和柱-荧光分光光度法等。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。免疫亲和柱荧光光度法采用了单克隆抗体免疫技术，高效特异性地将样品中的黄曲霉毒素分离，然后用荧光计进行定量筛选检测。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。

本文采用柱后电化学衍生，以在线发生的溴为衍生剂，通过将电化学衍生装置连接于色谱柱和检测器之间，使其反应腔内流动相中的 KBr 在电流作用下被还原产生 Br₂，Br₂ 可与 B₁ 及 G₁ 反应产生其溴化物以提高荧光强度。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 Nexera LC-30A 超高效液相色谱系统。具体配置为 LC-30AD × 2 输液泵 DGU-20A₅ 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，RF-20A_{XS} 荧光检测器，CBM-20A 系统控制器和 LabSolutions Ver. 5.41 色谱工作站。

1.2 分析条件

荧光检测：激发波长 365 nm；发射波长 435 nm
柱后衍生系统 KOBRA CELL[®] (电化学衍生反应器)
衍生电流：100 μA
色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III 2.0 mm I.D. × 150 mm L., 2.2 μm
流动相：A—甲醇乙腈混合溶液 (3/1；v/v)
B—250 mL 水中加入硝酸 100 μL 和溴化钾 50 mg
流速：0.40 mL/min
进样体积：5 μL
柱温：40℃
洗脱方式：等度洗脱；A/B = 63/37(v/v)

1.3 标准品溶液的配制

取 104 ng/mL 的黄曲霉毒素混标原液，用流动相逐级稀释成 0.104、0.208、0.624、1.04 和 2.08 ng/mL 的不同浓度混标，分别经 0.22 μm 滤膜过滤后进样。

结果讨论

2.1 标准样品色谱图

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准样品分析结果如图 1 所示。其中，黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 浓度分别为 0.08、0.024、0.08、0.024 ng/mL，总量为 0.208 ng/mL。

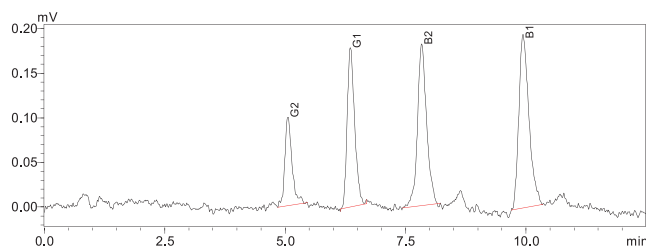
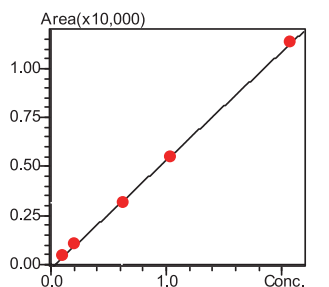


图 1 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准样品的色谱图 (总浓度 0.208 ng/mL)

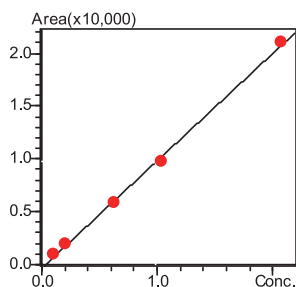
2.2 线性范围

以 0.104、0.208、0.624、1.04、2.08 ng/mL 的不同浓度混合标准工作液做标准曲线, 所得标准曲线如图 2、图 3、图 4 和图 5 所示。



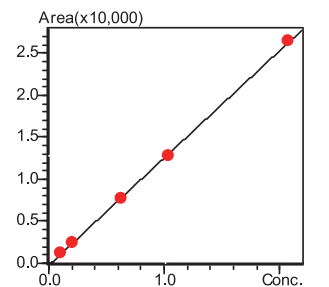
线性方程 $Y = (5516.65)X + (-189.304)$
 $R = 0.9999$

图 2 黄曲霉毒素 G₂ 的标准曲线



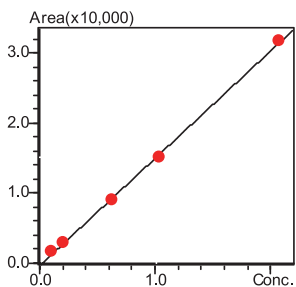
线性方程 $Y = (10161.0)X + (-342.329)$
 $R = 0.9992$

图 3 黄曲霉毒素 G₁ 的标准曲线



线性方程 $Y = (12769.4)X + (-229.674)$
 $R = 0.9998$

图 4 黄曲霉毒素 B₂ 的标准曲线



线性方程 $Y = (15336.9)X + (-349.647)$
 $R = 0.9997$

图 5 黄曲霉毒素 B₁ 的标准曲线

2.3 精密度实验

对 1.04 ng/mL 浓度的混合标准工作液连续测定 5 次, 考察方法的重现性, 保留时间和峰面积的重现性结果如表 1 所示, 重现性良好。

表 1 保留时间和峰面积重现性结果 (n=5)

名称	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
黄曲霉毒素 G ₂	0.330	2.338
黄曲霉毒素 G ₁	0.313	0.989
黄曲霉毒素 B ₂	0.318	2.234
黄曲霉毒素 B ₁	0.319	3.288

2.4 灵敏度考察

测定 0.104 ng/mL 浓度的黄曲霉毒素混合标准工作液, 结果如图 6 所示。其中, 黄曲霉毒素 B₁ 的信噪比为 11.2, 计算得到其定量限和检测限分别为 0.04 ng/mL 和 0.013 ng/mL。

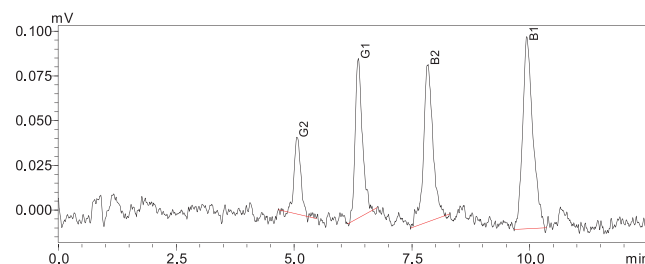


图 6 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准样品的色谱图
(总浓度 0.104 ng/mL)

讨论

本文建立了一种使用岛津 Nexera LC-30A 超高效液相色谱荧光电化学柱后衍生法检测黄曲霉毒素的方法。结果表明, 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准工作液线性范围是 0.104 ~ 2.08 ng/mL, 相关系数 R 均大于 0.999。黄曲霉毒素 B₁ 定量限和检测限分别为 0.04 ng/mL 和 0.013 ng/mL。对低浓度标准品连续多次进样, 保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.330% 和 3.288% 以下, 仪器精密度良好。