

Essentia 黄曲霉毒素分析系统测定玉米粉和奶粉中的黄曲霉毒素

LC-333

摘要： 本文使用岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统建立一种高效、快捷的黄曲霉毒素测定方法。参照《GB 5009.22-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》柱后碘衍生法，对样本进行前处理并上机测定。结果表明：AFT G₂ 和 AFT B₂ 在 0.03~12 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数在 0.999 以上，AFT G₁ 和 AFT B₁ 在 0.1~ 40 ng/mL 浓度范围内线性关系良好，相关系数在 0.999 以上；0.5 ng/mL（以 AFT B₁ 浓度计）标准品溶液连续 6 针进样，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.026~ 0.043% 和 0.54~0.92%；玉米粉不同浓度的加标回收率结果在 71.80~114.70% 之间；奶粉不同浓度的加标回收率结果在 81.33~92.63%。

关键词： 高效液相色谱仪 黄曲霉毒素 柱后碘衍生 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱

黄曲霉毒素是一种由黄曲霉和寄生曲霉等某些菌株产生的双呋喃类毒素，1993 年，被世界卫生组织（WHO）癌症研究机构划定为一类天然存在的致癌物，是毒性极强的剧毒物质。其衍生物有约 20 种，分别命名为 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 等，其中以 B₁ 毒性最大，致癌性最强。

黄曲霉毒素主要污染粮油及其制品，各种植物性和动物性食品也能被污染。由于基质复杂，给分析检测带来不便，其常用的前处理方法有液液萃取（LLE），固相萃取（SPE），多功能净化柱等传统方法，存在操作步骤繁琐，样品损失严重，耗时长，耗费大量溶剂且回收率不高；相比于传统的方法，

AFB&G 免疫亲和柱中含有和黄曲霉毒素结合的单克隆抗体，能高效性、高选择性吸附黄曲霉毒素，而让其他杂质通过柱子，使样品得以纯化，黄曲霉毒素被吸附后可以被甲醇洗脱。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。

由于目前尚无绝对有效的措施避免黄曲霉毒素的污染，因此国家制定相应的标准并进行严格的检测。本研究参考《GB 5009.22-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》柱后碘衍生法，使用 Essentia 黄曲霉毒素分析系统对玉米粉和奶粉中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 进行测定。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20Alite

柱温箱：CTO-16

脱气机：DGU-20A_{5R}

检测器：RF-20A

自动进样器：SIL-16

输液泵：LC-16×3

化学反应箱：CRB-40

色谱工作站：Labsolutions Essentia Ver. 5.98

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18（250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm；

流动相 A：水

柱温：40℃

进样量：50 μL

流动相 B：乙腈 - 甲醇溶液（50:50,v/v）

波长：Ex=360 nm，Em=440 nm

衍生溶液：0.05% 碘溶液

流速: 1.0 mL/min

衍生液流速: 0.2 mL/min

等度洗脱: A:B=68:32(v/v)

衍生化温度: 70°C

1.3 混合标准溶液的制备

准确吸取一定量的黄曲霉毒素混合对照品溶液 (AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂ 标识浓度分别为 1 µg/mL、0.3 µg/mL、1 µg/mL、0.3 µg/mL)，用流动相稀释成 (含 AFT B₁ 和 AFT G₁ 浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL, AFT B₂ 和 AFT G₂ 浓度为 0.03 ng/mL、0.015 ng/mL、0.6 ng/mL、1.5 ng/mL、3 ng/mL、6 ng/mL、12 ng/mL) 七个浓度的混合标准溶液，现用现配。

■ 样品前处理

参照免疫亲和柱说明书测试步骤对样品进行前处理。

称取粉碎好的样品 20 g，加入 4 g 氯化钠，加入 100 mL 70% 甲醇 - 水溶液，振摇 30 min，4000 r/min 离心 5 min。取上清液 10 mL，加入 20 mL 水摇匀，4000 r/min 离心 5 min。取过膜后的上清液 15 mL 注入免疫亲和柱，弃去流出液，加 20 mL 水冲洗，弃去流出液，吹干。加 1 mL 甲醇洗脱，收集流出液，上机检测

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

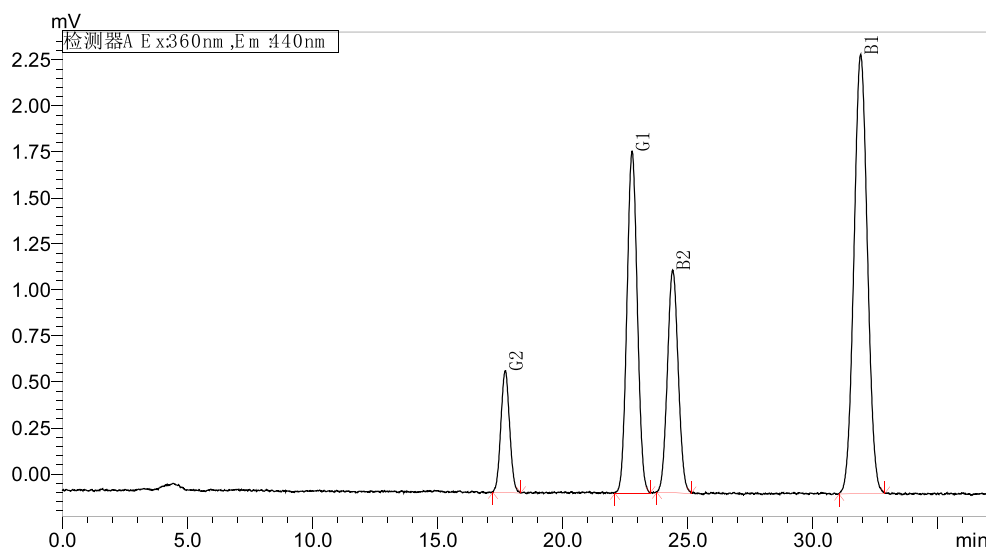


图 1 黄曲霉毒素标准溶液色谱图

(AFT B₁ 和 AFT G₁ 浓度 0.5 ng/mL; AFT B₂ 和 AFT G₂ 浓度 0.15 ng/mL)

3.2 校准曲线、检出限和定量限

将黄曲霉毒素标准工作溶液，按“1.2 分析条件”进行测定，使用外标法定量。以峰面积为纵坐标，对应的标准工作溶液浓度为横坐标，绘制校准曲线，如图 2 所示。校准曲线线性关系良好，相关系数均大于 0.999，准确度在 93.4 %~103.3 % 之间。LabSolutions 软件依据信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10)。校准曲线方程、相关系数、检出限及定量限结果见表 1。

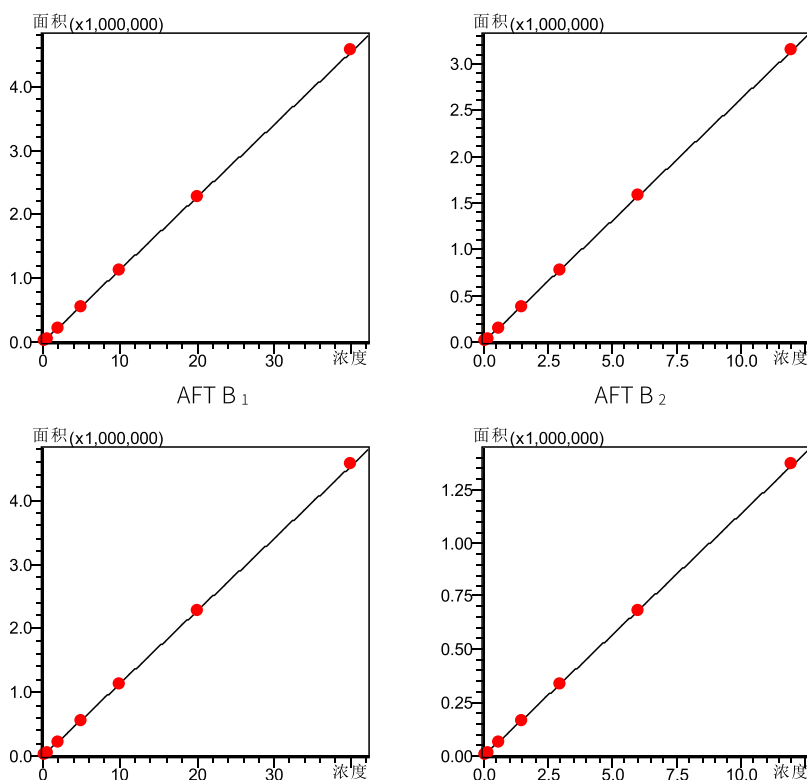


图2 黄曲霉毒素校准曲线

表1 校准曲线、检出限和定量限结果

No.	化合物	校准曲线	相关系数 r	线性范围 (ng/mL)	准确度 %	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	AFT B ₁	$Y = 187263X + 1823.19$	0.9994	0.1-40	93.6-103.2	0.006	0.019
2	AFT B ₂	$Y = 255501X + 670.109$	0.9994	0.03-12	93.4-103.3	0.003	0.010
3	AFT G ₁	$Y = 111374X + 1147.02$	0.9996	0.1-40	94.4-102.5	0.006	0.019
4	AFT G ₂	$Y = 111230X + 466.649$	0.9994	0.03-12	93.6-102.6	0.005	0.016

3.3 精密度

取 AFT B₁、AFT B₂、AFT G₁、AFT G₂ 浓度为 0.5 ng/mL、0.15 ng/mL、0.5 ng/mL、0.15 ng/mL 混合标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 2 所示。结果显示：各化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差分别为 0.026~0.041 % 和 0.54~0.92 % 之间，表明仪器精密度良好。

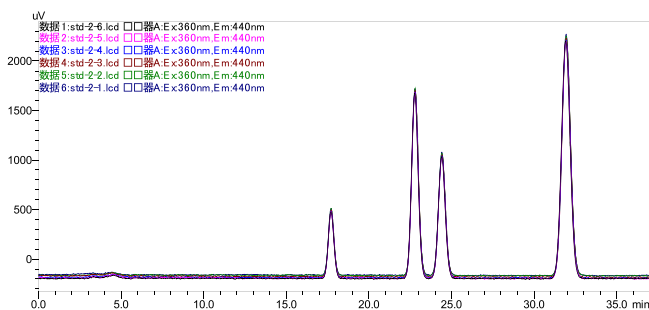


图3 黄曲霉毒素重复性色谱图叠加

表 2 峰面积和保留时间重复性结果 (n=6)

#	AFT B ₁		AFT B ₂		AFT G ₁		AFT G ₂	
	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间
1	91038	31.930	37485	24.413	54031	22.789	16440	17.713
2	90898	31.942	37061	24.412	54808	22.792	16549	17.710
3	89489	31.941	37130	24.429	54412	22.797	16230	17.715
4	90298	31.934	37127	24.418	54396	22.787	16134	17.707
5	89831	31.916	36854	24.414	54019	22.778	16293	17.704
6	89302	31.911	36599	24.408	54262	22.770	16281	17.705
RSD (%)	0.80	0.041	0.80	0.03	0.54	0.043	0.92	0.026

3.4 加标回收率

在空白玉米粉样品和奶粉样品中添加 3 个不同浓度混标, 其中 AFT G₂ 和 AFT B₂ 的加标浓度分别为 0.03 μg/kg, 0.6 μg/kg, 3 μg/kg; AFT G₁ 和 AFT B₁ 的加标浓度分别为 0.1 μg/kg, 2 μg/kg, 10 μg/kg, 按照“2. 样品前处理”方法处理后制备供试品溶液, 上机分析, 考察加标回收率。黄曲霉毒素 AFT G₂、AFT B₂、AFT G₁、AFT B₁, 玉米粉中的加标回收率结果在 71.80~114.70% 之间; 奶粉中的加标回收率结果在 81.33~92.63%, 结果见表 3。

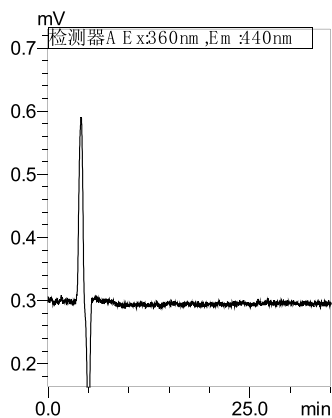


图 4 玉米粉样品色谱图

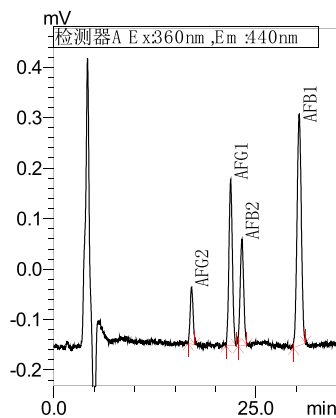
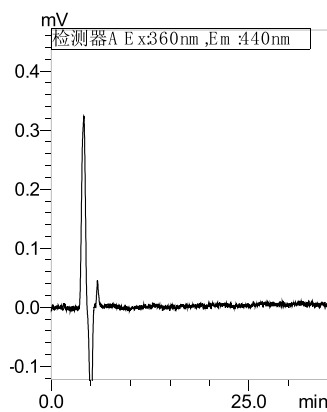

 图 5 玉米粉样品加标 (0.1 μg/kg, 以 AFT B₁ 计) 色谱图


图 6 奶粉样品色谱图

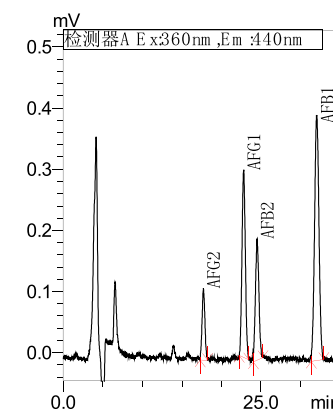

 图 7 奶粉样品加标 (0.1 μg/kg, 以 AFT B₁ 计) 色谱图

表 3 玉米粉和奶粉样品加标回收率结果

化合物	加标量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	玉米粉		奶粉	
		平均回收率 %	RSD%	平均回收率 %	RSD%
AFT G ₂	0.03	71.80	1.76	84.67	2.43
	0.6	80.70	2.46	82.00	8.34
	3	107.40	5.84	90.70	7.68
AFT G ₁	0.1	77.20	3.41	81.77	2.31
	2	82.20	2.56	82.10	8.79
	10	107.80	5.68	92.63	5.35
AFT B ₂	0.03	114.70	1.38	81.53	1.91
	0.6	88.1	2.73	81.33	0.28
	3	104.00	1.38	86.70	4.51
AFT B ₁	0.1	81.50	2.18	84.33	1.13
	2	91.30	3.02	84.30	1.50
	10	109.00	1.77	90.30	3.68

■ 结论

本文采用岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统，参考《GB 5009.22-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》中柱后碘衍生法对玉米粉和奶粉中黄曲霉毒素 AFT G₂、AFT G₁、AFT B₂、AFT B₁ 进行测定。建立了一种测定食品中黄曲霉毒素的方法。该方法检测灵敏度高、重复性好，系统精密度良好。实验表明，系统稳定性良好，结果准确度高，为食品安全检测行业检测工作提供参考依据。