

LC-30A 柱前衍生法测定粮食中黄曲霉毒素的含量

LC-096

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 μg/L ~ 10 μg/L, G2、B2 线性范围 0.15 μg/L ~ 3 μg/L, 相关系数均大于 0.999; 进样量 2 μL, 仪器检出限为 0.002 ~ 0.011 μg/L, 仪器定量限为 0.007 ~ 0.038 μg/L; 三个浓度 (G1、B1 为 0.5、2、10 μg/L, G2、B2 为 0.15、0.6、3 μg/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 (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 μg/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。

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. 5.42 SP3 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 mm I.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°C

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,v/v) 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。

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，G1、B1 浓度为 2 μg/L，G2、B2 浓度为 0.6 μg/L。保留时间分别为 1.689、2.102、2.363、2.762 min。

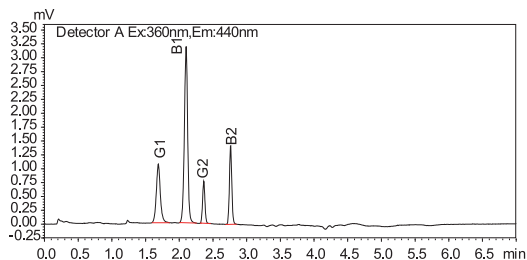


图 1 黄曲霉毒素 G₁、B₁、G₂、B₂ 标准样品色谱图

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。

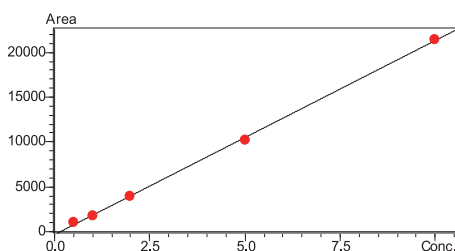


图 2 黄曲霉毒素 G₁ 的标准工作曲线

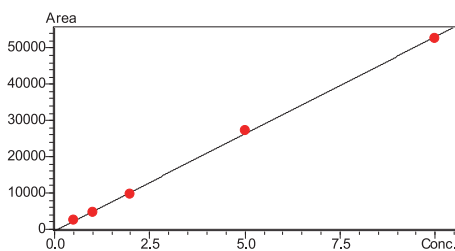


图 3 黄曲霉毒素 B₁ 的标准工作曲线

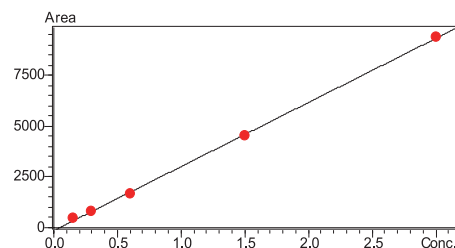


图 4 黄曲霉毒素 G₂ 的标准工作曲线

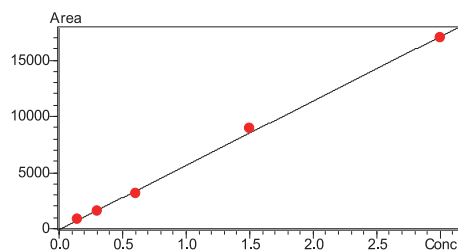


图 5 黄曲霉毒素 B₂ 的标准工作曲线

表 2 标准曲线方程

组分	Y=aX+b	R
G1	Y=2164.99X-352.090	0.9996
B1	Y=5352.15X-439.673	0.9994
G2	Y=3159.62X-142.456	0.9997
B2	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 μg/L; G2、B2:0.15 μg/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。

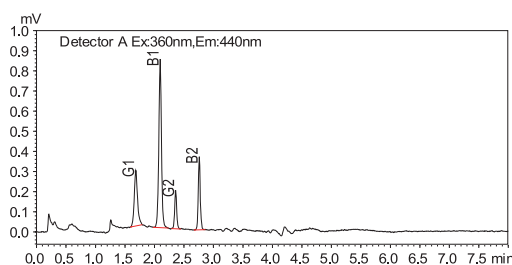


图 6 标准溶液的色谱图

表 3 仪器检出限和定量限(μg/L)

组分名称	CAS号	检出限	定量限
G1(Aflatoxin G1)	1165-39-5	0.011	0.038
B1(Aflatoxin B1)	1162-65-8	0.003	0.011
G2(Aflatoxin G2)	7241-98-7	0.005	0.016
B2(Aflatoxin B2)	7220-81-7	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%

表 5 基质加标回收结果

组分	样品含量 (μg/kg)	加标量 (μg/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

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 μg/L ~ 10 μg/L, G2、B2 线性范围 0.15 μg/L ~ 3 μg/L, 相关系数均大于 0.999; 进样量 2 μL, 仪器检出限为 0.002 ~ 0.011 μg/L, 仪器定量限为 0.007 ~ 0.038 μg/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%。

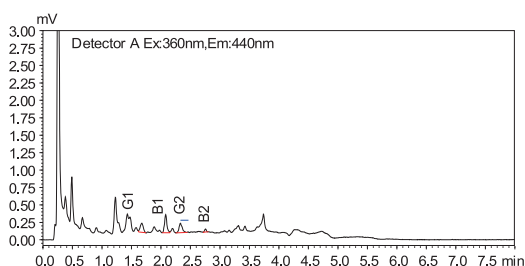


图 7 玉米空白样品的色谱图

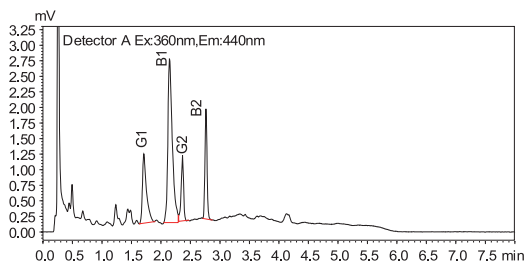


图 8 玉米加标样品的色谱图