

食品中真菌毒素检测 整体解决方案

序言一

真菌毒素 (Mycotoxin) 一词源于希腊语 “Mykes” 和拉丁语 “Toxicum”，它是由产毒真菌在适宜的环境条件下产生的有毒代谢产物。从古至今一直对人类、动物和植物具有巨大的潜在威胁。随着现在科学技术和分析仪器的的发展，科学家对真菌毒素的产生、毒理毒性、作用机理、超微量分析及真菌毒素在各种商品中的存在现状进行了深入的研究。目前检测真菌毒素的方法有：TLC 法、GC 法、CE-LIF 法、ELISA 法、HPLC 法以及 LC-MS/MS 法。其中 LC 和 LC-MS/MS 作为最为常用的测定真菌毒素的技术，被广泛应用到真菌毒素的检测中。

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 自推出以来，一直受广大用户的推崇。LC-30A 具有耐超高压能力，可以配合市售的任何一款色谱柱使用，达到超快速分离的目的；LCMS-8040 具有超快速的扫描速度 (15,000 u/sec)、超快速的正负极切换速度 (15 msec) 和超快速的 MRM (555 ch/sec) 的性能，能够进行正负离子及多组分同时检测。在日益追求高工作效率的当代，该仪器为广大实验室工作者提供了高效工作的可能。

浙江省疾病预防控制中心理化所在毒素检测方面研究了多年，具有国内外先进的学术力量，在国内外知名期刊上发表学术论文数篇，在国内外享有盛誉。2012 年，岛津公司和该单位签署了合作项目，意在开发使用岛津三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 检测常见真菌毒素的方法，为岛津的广大用户提供便利。当前该项目已经完成，现将该数据与岛津公司分析中心完成的真菌毒素的检测数据一并整理成册，汇编成《食品中真菌毒素检测整体检测方案》，供相关工作者参考。

岛津公司作为全球著名的分析仪器厂商，进入中国已经近 30 年，自 1875 年创业以来，始终继承创始人岛津源藏的创业宗旨“以科学技术向社会做贡献”，不断钻研领先时代、满足社会需求的科学技术。长期以来，岛津公司一直关注国内外食品和药品安全，积极应对，及时提供全面、快速有效的整体解决方案。

岛津企业管理（中国）有限公司

序言二

在过去的 30 年中，由于毒素造成的食品污染已经越来越受到人们的重视。农作物（大多数谷物）非常容易遭受真菌的污染，严重影响着食品安全。如果食用被污染的食品，则会产生极大的毒副作用。部分真菌毒素已被证实具有致癌、致畸、致细胞突变的“三致”作用，因此，欧盟（EU）、美国食品与药物监督管理局（FDA）、日本检验检疫等各国相关部门均颁布了食品中真菌毒素限量的相关规定。我国卫生部高度重视真菌毒素的食品安全问题，2011 年更新了食品安全国家标准《GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量》，对食品中的真菌毒素做了进一步的限定；并且卫生部每年都会进行食品安全风险评估，并对相应食品安全标准进行修订。

现有的检测真菌毒素方法分为快速筛选法和确证法两大类。快速筛选法主要是荧光光谱法和酶联免疫法；确证方法有薄层色谱法（TLC）、液相色谱法（LC）、气相色谱法（GC）、气质联用法和液质联用法等。TLC 法在确证新发现真菌毒素和检测方法学研究方面具有一定的优越性，但精度低、操作复杂，近些年来的应用受到限制；GC-FID 和 GC-MS 技术的应用因大多数真菌毒素对热不稳定而受限；LC 和 LCMS 的方法可用于大多数真菌毒素的分析，具有稳定可靠、灵敏度高以及可进行多组分同时检测等特点而受到广泛应用。特别是近些年超高效液相色谱和串联质谱的发展，为真菌毒素的快速、高灵敏、准确可靠的检测做出了巨大贡献。

本所与岛津公司具有良好的合作关系，LCMS-8040 仪器作为新一代的三重四极杆质谱仪，为本所的真菌毒素测试工作提供了高效、快速的测试手段。借《食品中真菌毒素检测整体检测方案》推出之际，将我们的工作提供更多的研究工作者参考，为真菌毒素的检测和研究做一份贡献。

浙江省疾病预防控制中心理化所

相关法规及化合物索引

真菌毒素对农业、畜牧业及人们身体健康的严重危害，促使世界各国对真菌毒素的污染问题日益关注和重视。目前至少有 100 个国家已经对粮食/饲料中真菌毒素的限量进行了规定。随着人们对真菌毒素危害的认识，相关的限量标准不断地更新。

欧盟于 2006 年颁布了《Regulation (EC) No 1881/2006》，对食品中污染物的限量进行规定，规定花生、谷类、坚果等人类直接食用的食品中，黄曲霉毒素含量（指 G2+G1+B2+B1 的总量）不能超过 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。2010 年，颁布《Regulation (EC) No 165/2010》，规定婴幼儿配方奶粉中 AFM1 的限量为 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；鲜乳中 AFM1 含量不能超过 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。2012 年又颁布了《Regulation (EC) No 594/2012》，对《Regulation (EC) No 1881/2006》进行了修订，对干果等食品中的赭曲霉毒素 A 的最高限量作了规定。

美国在 FDA 对黄曲霉毒素的限量作出规定：食品中黄曲霉毒素（B1+B2+G1+G2）的最大残留限量为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，牛奶中 AFM1 的最大残留限量为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；

日本检验检疫措施规定，黄曲霉毒素 B1 在进口食品中的残留限量为“不得检出”；乳及乳制品中 AFM1 含量不得超过 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；日本在肯定列表制度中规定：食品中黄曲霉毒素的限量是 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

我国在 2005 年公布了强制性粮食卫生标准（GB 2715-2005），首次增加了真菌毒素限量的标准，其中包括了四种真菌毒素（黄曲霉毒素 B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）、玉米赤霉烯酮（ZON）和赭曲霉毒素 A（OTA））。2011 年，我国又颁布了最新的《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》（GB/T 2761-2011），相比 GB/T 2761-2005 增加了赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮的指标；修改了黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 M1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇及展青霉素限量指标及检测方法。可见我国对真菌毒素在食品中的限量要求越来越高，限制的食品种类也越来越细。

现将美国、欧盟和中国主要食品中真菌毒素的限量汇总于下：

毒素名称	美国 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			欧盟 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	所有食品	婴幼儿食品	牛奶 乳制品	农产品	婴幼儿食品	牛奶 乳制品
总黄曲霉毒素	20			4	2	
黄曲霉毒素 B1				2	0.1	
黄曲霉毒素 M1			0.5		0.025	0.05
赭曲霉毒素 A				3	0.5	
DON	1000			1000	200	
ZON	100			50		
伏马毒素	2					

毒素名称	中国 (µg/kg)				
	玉米、花生 及其制品	大米、植物油(除玉 米油、花生油)	其他粮食、豆类、 发酵食品	婴幼儿食品	鲜乳
					乳制品
总黄曲霉毒素					
黄曲霉毒素 B1	20	10	5	0.5	
黄曲霉毒素 M1				0.5	0.5
赭曲霉毒素 A	5				
DON	1000				
ZON	60				
伏马毒素					

注：空白代表没有规定

本方案中涉及的真菌毒素的化合物信息及索引如下：

种类	中文名称	英文名称	CAS No.	分子式	分子量	页码
黄曲霉毒素	黄曲霉毒素-B1	Aflatoxins B1 (AFT-B1)	1162-65-8	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312.27	P1, 21, 24, 28, 46, 50, 55
	黄曲霉毒素-B2	Aflatoxins B2 (AFT-B2)	7220-81-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314.29	
	黄曲霉毒素-G1	Aflatoxins G1 (AFT-G1)	1165-39-5	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.27	
	黄曲霉毒素-G2	Aflatoxins G2 (AFT-G2)	7241-98-7	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.29	
	黄曲霉毒素-M1	Aflatoxins M1(AFT-M1)	6795-23-9	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328.27	P1, 32
	黄曲霉毒素-M2	Aflatoxins M2 (AFT-M2)	6885-57-0	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.29	P1
赭曲霉毒素	赭曲霉毒素 A	Ochratoxins A (OTA)	303-47-9	C ₂₀ H ₁₈ ClNO ₆	403.81	P6, 36
	赭曲霉毒素 B	Ochratoxins B (OTB)	4825-86-9	C ₂₀ H ₁₉ NO ₆	369.37	P6
伏马毒素	伏马毒素 B1	Fumonisin B1 (FB1)	116355-83-0	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₅	721.83	P9, 39
	伏马毒素 B2	Fumonisin B2 (FB2)	116355-84-1	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83	P9, 39
	伏马毒素 B3	Fumonisin B3 (FB3)	136379-59-4	C ₃₄ H ₅₉ NO ₁₄	705.83	P9
雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物	雪腐镰刀菌烯醇	Nivalenol (NIV)	23282-20-4	C ₁₅ H ₂₀ O ₇	312.32	P13
	镰刀菌烯酮 X	Fusarenon-X (Fus X)	23255-69-8	C ₁₇ H ₂₂ O ₈	354.35	P13
	隐蔽型脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deep-DON	-	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	278.31	P13
	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol (DON)	51481-10-8	C ₁₅ H ₂₀ O ₆	296.32	P17, 43
	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)	50722-38-8	C ₁₇ H ₂₂ O ₆	322.35	P17
	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON)	88337-96-6	C ₁₇ H ₂₂ O ₇	338.35	P17
玉米赤霉烯酮	玉米赤霉烯酮	Zearalmon (ZON)	17924-92-4	C ₁₈ H ₂₂ O ₅	318.36	P17

目 录

第一部分 LC-MS/MS 检测方法

1. LC-MS/MS 测定奶粉中的 6 种黄曲霉毒素.....	1
2. LC-MS/MS 测定玉米中的赭曲霉毒素.....	6
3. LC-MS/MS 定量测定玉米中的伏马毒素含量.....	9
4. LC-MS/MS 测定小麦中的雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物.....	13
5. LC-MS/MS 同时测定谷物中的呕吐毒素和玉米赤霉烯酮.....	17

第二部分 LC 检测方法

6. LC-30A 电化学衍生法高灵敏度快速检测黄曲霉毒素	21
7. LC-30A 柱前衍生法测定粮食中黄曲霉毒素的含量	24
8. LC-30A 无需衍生快速测定粮食中黄曲霉毒素的含量	28
9. LC-30A 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 的含量.....	32
10. LC-30A 测定粮食中赭曲霉毒素 A 的含量.....	36
11. LC-30A 柱前衍生法测定粮食中伏马毒素的含量.....	39
12. LC-30A 快速测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量.....	43
13. 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	46
14. 高效液相色谱碘柱后衍生法测定中药材酸枣仁中的黄曲霉毒素 G2,G1,B2,B1 的含量..	50
15. 高效液相色谱碘柱后衍生法和光柱后衍生法检测中药材中的黄曲霉毒素	55

LC-MS/MS 测定奶粉中的 6 种黄曲霉毒素

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定奶粉中 6 种黄曲霉毒素的方法。样品经乙腈/水提取、SPE 净化后,液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。6 种黄曲霉毒素在 0.5 ~ 10 ng/mL 浓度范围内线性良好;对 1 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 4 次进样,3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差分别在 89.6 ~ 113.2%和 1.59 ~ 9.99%之间,仪器精密度良好;同时考察了空白奶粉基质加标结果,结果显示 6 种黄曲霉毒素的加标回收率在 90.2 ~ 112.2%之间;在某奶粉样品中检出黄曲霉毒素 AFT-B1 和 AFT-B2,浓度分别为 5.54 和 0.29 ng/mL。

关键词: 黄曲霉毒素 奶粉 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

黄曲霉毒素(Aflatoxins AFT) 是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物。其毒性远远高于氰化物、砷化物和有机农药的毒性,可发生急性中毒,出现急性肝炎、出血性坏死、肝细胞脂肪变性和胆管增生。AFT 的致癌力也居首位,是目前已知最强致癌物之一。鉴于各种黄曲霉毒素的易引入和比较强烈的毒性,各国已经对黄曲霉毒素的含量水平做了严格的规定。欧盟(EU) No 165/2010 规定婴幼儿配方奶粉中 M1 的限量为 0.025 $\mu\text{g/kg}$; 日本检验检疫措施规定,黄曲霉毒素 B1 在进口食品中的残留限量为“不得检出”;美国食品与药物监督管理局(FDA)规定,食品中黄曲霉毒素(B1+B2+G1+G2)的最大残留限量为 20 $\mu\text{g/kg}$,牛奶中黄曲霉毒素 M1 的最大残留限量为 0.5 $\mu\text{g/kg}$; 我国 GB 2761-2011 食品安全国家标准《食品中真菌毒素限量》规定,乳制品中黄曲霉毒素 M1 的限量为 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。目前黄曲霉毒素常用方法为液相色谱-荧光检测法,我国还没有使用 LC-MS/MS 检测黄曲霉毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了快速准确测定奶粉中 6 种黄曲霉毒素的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

流动相: A—0.1%甲酸水溶液;

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III

B—乙腈/甲醇 (v/v = 1/1)

2.0 mm I.D. $\times$ 75 mm L., 1.6 μm

流速: 0.3 mL/min

进样体积：10 μ L

柱温：40 $^{\circ}$ C

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250 $^{\circ}$ C

加热模块温度：400 $^{\circ}$ C

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：30 ms

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 32%，
时间程序见表 1。

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	32
4.50	45
4.80	100
5.80	100
6.00	32
8.00	Stop

表 2 MRM 参数

编号	中文名称	英文名称 (简称)	CAS No.	前体 离子	产物 离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	黄曲霉毒素 -M2	Aflatoxins M2 (AFT-M2)	6885-57-0	331	259*	-12	-26	-28
					273	-12	-25	-30
2	黄曲霉毒素 -M1	Aflatoxins M1 (AFT-M1)	6795-23-9	329	273*	-12	-25	-30
					229	-12	-43	-25
3	黄曲霉毒素 -G2	Aflatoxins G2 (AFT-G2)	7241-98-7	331	245*	-12	-31	-26
					257	-12	-31	-30
4	黄曲霉毒素 -G1	Aflatoxins G1 (AFT-G1)	1165-39-5	329	243*	-12	-29	-27
					283	-12	-25	-21
5	黄曲霉毒素 -B2	Aflatoxins B2 (AFT-B2)	7220-81-7	315	259*	-12	-30	-28
					287	-12	-27	-30
6	黄曲霉毒素 -B1	Aflatoxins B1 (AFT-B1)	1162-65-8	313	241*	-22	-38	-26
					285	-22	-24	-30
7	G1 同位素 内标	^{13}C -AFT-G1	-	346.00	257.00	-12.0	-29.0	-27.0
8	B1 同位素 内标	^{13}C -AFT-B1	-	329.90	254.90	-22.0	-38.0	-26.0
9	B2 同位素 内标	^{13}C -AFT-B2	-	332.00	272.90	-12.0	-30.0	-28.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

取适量单标储备液，用乙腈配制成 10 mg/L 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 10、7.5、5、2、1、0.75 和 0.5 ng/mL 的标准工作液。内标物 ^{13}C -AFT-G1、 ^{13}C -AFT-B1 和 ^{13}C -AFT-B2 的浓度为 2 ng/mL。

样品前处理方法：

提取：取 5.0 g 样品，加入乙腈/水（84/16，v/v） 20 mL，涡旋 1 min，超声 40 min，离心 5 min（8000 rpm），取 2 mL 上层清液，加 1%吐温-20 PBS 稀释至 25 mL，液体备用。

净化：先将免疫亲和柱内液体排光，在免疫亲和柱上接一个 30 mL 的注射器，将提取的液体上黄曲霉毒素（B1、B2、G1、G2、M1 和 M2）免疫亲和柱，上样完后，用 10 mL PBS 淋洗柱子，吹干，再用 5 mL 的甲醇洗脱，吹干，收集洗脱液，并氮气吹干，用 1.0 mL 乙腈/水（20/80，v/v）溶液溶解残留物，过 0.22 μm 滤膜并收集滤液，进 LC-MS/MS 分析。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

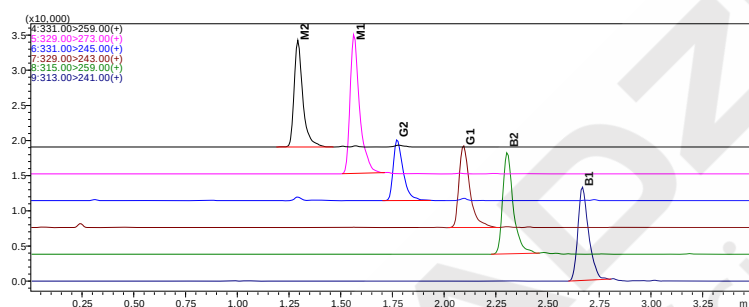


图 1 10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 0.5、0.75、1、2、5、7.5、10 ng/mL 的混合标准工作液，其中内标浓度为 2 ng/mL，按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2~7 所示。6 种黄曲霉毒素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

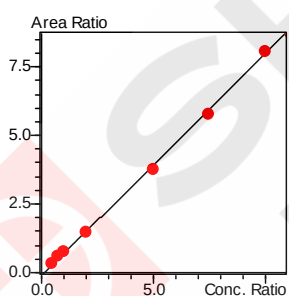


图 2 AFT-B1 的标准工作曲线

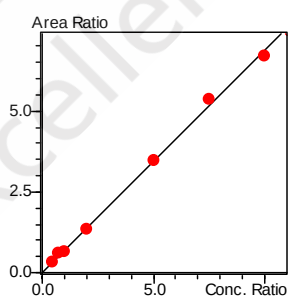


图 3 AFT-B2 的标准工作曲线

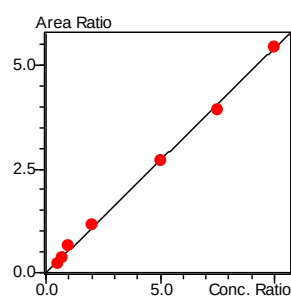


图 4 AFT-G1 的标准工作曲线

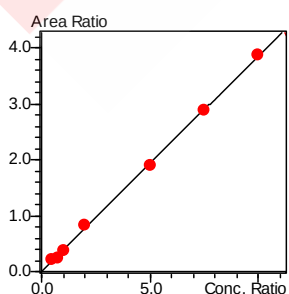


图 5 AFT-G2 的标准工作曲线

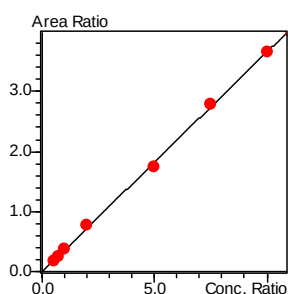


图 6 AFT-M1 的标准工作曲线

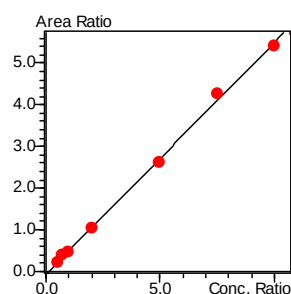


图 7 AFT-M2 的标准工作曲线

表 3 6 种黄曲霉毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	AFT-B1	$Y = 0.8144X + 0.0945$	0.9993	0.15	0.50
2	AFT-B2	$Y = 0.6750X + 0.0498$	0.9992	0.15	0.50
3	AFT-G1	$Y = 0.5317X + 0.0081$	0.9980	0.15	0.50
4	AFT-G2	$Y = 3028.33X + 377.835$	0.9974	0.15	0.50
5	AFT-M1	$Y = 2902.20X + 68.4405$	0.9986	0.15	0.50
6	AFT-M2	$Y = 4152.96X + 230.694$	0.9993	0.15	0.50

2.3 精密度实验

对 1 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 4 次进样，3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差分别在 89.6 ~ 113.2%和 1.59 ~ 9.99%之间，仪器精密度良好。

表 4 3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差 (n=4)

名称	1 ng/mL		5 ng/mL		10 ng/mL	
	Accuracy (%)	Conc. RSD%	Accuracy (%)	Conc. RSD%	Accuracy (%)	Conc. RSD%
AFT-B1	97.5	9.55	89.8	5.55	102.3	4.30
AFT-B2	101.6	5.76	96.1	3.26	94.9	4.21
AFT-G1	108.2	9.85	104.3	3.82	103.2	4.85
AFT-G2	108.8	9.99	104.2	3.53	95.5	3.77
AFT-M1	89.6	1.59	94.8	5.36	105.0	2.03
AFT-M2	113.2	9.84	101.5	5.20	102.0	2.42

2.4 回收率考察

以空白奶粉样配制加标溶液，加标浓度 5 ng/mL，得到色谱图如图 8 所示。6 种黄曲霉毒素加标回收率见表 5。

2.5 奶粉样品分析

在某奶粉样品中检出 AFT-B1 和 AFT-B2，浓度分别为 5.54 和 0.29 ng/mL，色谱图见图 9。

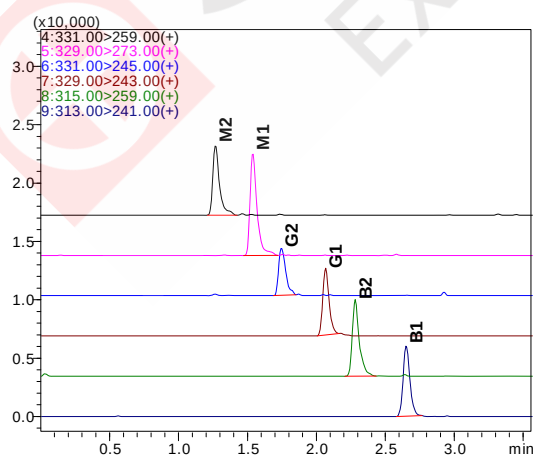


图 8 基质加标样品 (5 ng/mL) 的色谱图

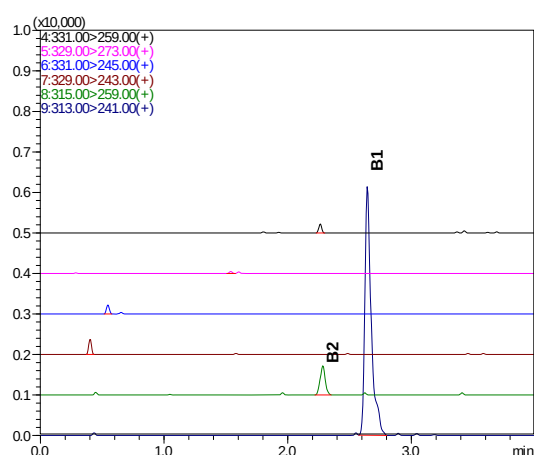


图 9 奶粉样品的色谱图

表 5 空白基质加标样品 (5 ng/mL) 回收率

名称	1	2	3	平均	回收率(%)
AFT-B1	6.19	5.24	5.33	5.59	111.7
AFT-B2	4.36	4.87	4.31	4.51	90.2
AFT-G1	4.98	4.76	5.42	5.05	101.1
AFT-G2	5.44	5.91	5.48	5.61	112.2
AFT-M1	5.32	5.54	5.39	5.41	108.3
AFT-M2	5.54	4.79	5.37	5.23	104.7

3. 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定奶粉中 6 种黄曲霉毒素的方法。6 种黄曲霉毒素在 0.5 ~ 10 ng/mL 浓度范围内线性良好, 基质加标回收率良好; 低、中、高 3 个浓度标准品的精确度和浓度的相对标准偏差分别在 89.6 ~ 113.2% 和 1.59 ~ 9.99% 之间, 仪器精确度良好; 在某奶粉样品中检出黄曲霉毒素 AFT-B1 和 AFT-B2, 浓度分别为 5.54 和 0.29 ng/mL。

LC-MS/MS 测定玉米中的赭曲霉毒素

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中赭曲霉毒素的方法。样品经超声提取、SPE 净化后,液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。2 种毒素在 0.1 ~ 20 ng/mL 浓度范围内线性良好;对 0.5 ng/mL、2 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样,3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.52% 和 1.19 ~ 4.85% 之间,仪器精密度良好;同时考察了空白玉米基质加标结果,结果显示 1 ng/mL 的 OTA 和 OTB 的加标回收率分别为 116.3 和 117.9%;某市场上购买的玉米样品,未检出赭曲霉毒素。

关键词: 赭曲霉毒素 玉米 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

赭曲霉毒素 (Ochratoxins) 是赭色曲霉属和几种青霉属真菌产生的一种毒素。研究表明该毒素可损害动物的肾脏和肝脏,有致畸和致癌作用,被国际癌症研究机构定位 2B 类致癌物。欧盟将其在谷物产品中的最大残留限量修订为 3.0 $\mu\text{g/kg}$ 。2011 年,我国颁布了《食品中真菌毒素限量》国家标准,规定谷

物及其制品限量指标为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。目前为止,我国还没有使用 LC-MS/MS 检测赭曲霉毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了快速准确测定玉米中赭曲霉毒素的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。具体配置为 LC-30AD $\times$ 2 输液泵, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: Shimadzu Shim-pack XR-ODS III
2.0 mm I.D. $\times$ 75 mm L., 1.6 μm

流动相: A—0.1% 甲酸水溶液;
B—乙腈

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 10 μL

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 45%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time (min)	B.Conc.
0.50	45
2.50	90
3.50	90
3.70	45
5.00	Stop

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压：4.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：40 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	中文名称	英文名称 (简称)	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	赭曲霉毒素 A	Ochratoxins A (OTA)	303-47-9	404.1	239*	-12	-23	-18
					358	-12	-16	-26
2	赭曲霉毒素 B	Ochratoxins B (OTB)	4825-86-9	370.1	205*	-26	-22	-22
					187	-26	-36	-21
3	¹³ C-OTA（内标）	¹³ C-OTA	-	424.1	250	-12	-24	-26

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

取适量单标储备液，用乙腈配制成 1000 ng/mL 的混合标准溶液，用乙腈/水（50/50，v/v）逐级稀释成浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的混合标准工作液。内标物 ¹³C-OTA 的浓度均为 2 ng/mL。

样品前处理方法：

提取：称取 25 g 研磨好的固体样品加入 100 mL 乙腈/去离子水（84/16，v/v）中；250 rpm 转速下振荡 1 h，或高速均质 3 min；

净化：将 3 mL 样品萃取液与 35 mL 1%的吐温-PBS 缓冲液混合均匀，通过 OchraStarR 免疫亲和柱，流速控制在 1~3 mL/min；用 10 mL PBS 缓冲液淋洗免疫亲和柱；用 3 x 1 mL 甲醇/醋酸（98/2，v/v）洗脱免疫亲和柱，收集洗脱液；55℃下氮吹至干，乙腈/水溶液（20/80，v/v）定容至 1 mL。涡旋 30 s，过 0.22 μm 微孔滤膜后供进样。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

1 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

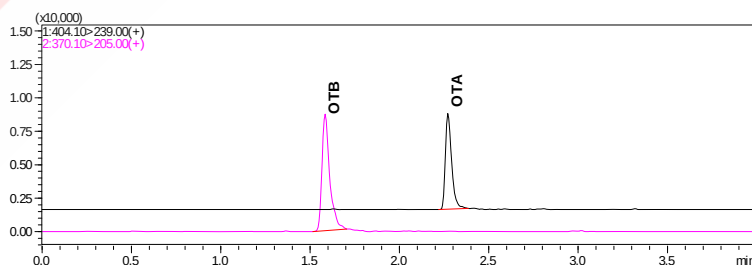


图 1 1 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 0.1、0.5、1、2、5、10、20 ng/mL 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2、3 所示。2 种赭曲霉毒

素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

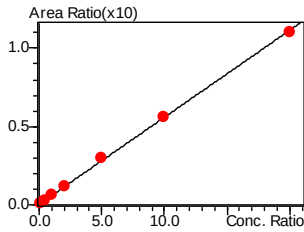


图 2 OTA 的标准工作曲线

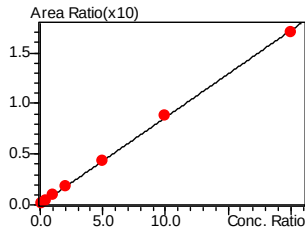


图 3 OTB 的标准工作曲线

表 3 赭曲霉毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	定量限(ng/mL)	检出限 (ng/mL)
1	OTA	$Y=0.555X+0.040$	0.9996	0.043	0.014
4	OTB	$Y=0.857X+0.036$	0.9996	0.033	0.011

2.3 精密度实验

对 0.5 ng/mL、2 ng/mL 和 10 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样，3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.52% 和 1.19 ~ 4.85% 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=3)

名称	RSD% (0.5 ng/mL)		RSD% (2 ng/mL)		RSD% (10 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
OTA	0.20	4.85	0.14	3.05	0.16	1.62
OTB	0.45	1.48	0.51	2.02	0.52	1.19

2.4 回收率考察

以空白玉米样配制加标溶液，加标浓度为 1 ng/mL，得到色谱图如图 4 所示。OTA 和 OTB 加标回收率在分别为：116.3 和 117.9%。

2.5 玉米样品分析

测试了某市场上购买的玉米样品，未检出赭曲霉毒素，色谱图见图 5。

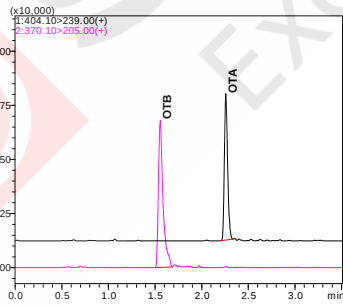


图 4 基质加标 1 ng/mL 样品的色谱图

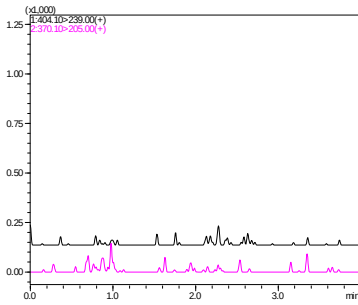


图 5 玉米样品的色谱图

3. 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中赭曲霉毒素的方法。2 种毒素在 0.1 ~ 20 ng/mL 浓度范围内线性良好，1 ng/mL 基质加标样品的回收率良好；低、中、高 3 浓度的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.14 ~ 0.52% 和 1.19 ~ 4.85% 之间，仪器精密度良好；某市场上购买的玉米样品，未检出赭曲霉毒素。

LC-MS/MS 定量测定玉米中的伏马毒素含量

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定玉米中 3 种伏马毒素的方法。样品经乙腈/水提取、SPE 净化后,液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。3 种伏马毒素在 5 ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好;对 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样,3 个浓度标准品的准确度和峰面积的相对标准偏差分别在 87.6 ~ 104.8%和 0.97 ~ 10.30%之间;同时考察了空白玉米基质加标结果,结果显示 3 种伏马毒素的加标回收率分别为 99.01、104.17 和 97.23%;在某玉米样品中检出伏马毒素 FB1、FB2 和 FB3,浓度分别为 42.76、6.30 和 4.89 ng/mL。

关键词: 伏马毒素 玉米 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

伏马毒素 (Fumonisin FB) 是一种霉菌毒素,是由串珠镰刀菌 (*Fusarium Moniliforme* Shield) 产生的水溶性代谢产物,对热稳定,不易被蒸煮破坏,在多数粮食加工处理过程均比较稳定。动物试验和流行病学资料已表明,伏马毒素主要损害肝肾功能,能引起马脑白质软化症和猪肺水肿等。美国食品与药物管理局(FDA)规定人类食用玉米中伏马毒素最高限量为 2 mg/kg;我国食品安全国家标准《GB

2761-2011 食品中真菌毒素限量》中还没有规定粮食中伏马毒素的限量。目前检测伏马毒素常用方法为免疫亲和柱净化后的荧光仪检测法和 HPLC 法,我国还没有使用 LC-MS/MS 检测伏马毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了快速准确测定玉米中 3 种伏马毒素的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。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-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: UHPLC C18 2.0 mmI.D.×100 mmL.

流动相: A—0.1%甲酸水溶液;

B—乙腈/甲醇 (v/v = 1/1)

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 10 μL

柱温: 40℃

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 50%,

时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	50
3.20	75
3.50	100
4.00	100
4.20	505
6.00	Stop

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 正离子扫描

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 15 L/min

碰撞气: 氩气

脱溶剂管温度: 250℃

加热模块温度: 400℃

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 50 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

编号	中文名称	英文名称 (简称)	CAS No.	前体 离子	产物 离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	伏马毒素 B1	Fumonisin B1 (FB1)	116355-83-0	722.40	352.30*	-26	-41	-25
					334.15	-26	-43	-25
2	伏马毒素 B2	Fumonisin B2 (FB2)	116355-84-1	706.40	336.25*	-26	-42	-26
					318.25	-26	-41	-23
3	伏马毒素 B3	Fumonisin B3 (FB3)	136379-59-4	706.40	336.20*	-26	-39	-24
					318.35	-26	-39	-25
4	¹³ C-伏马毒素 B1	¹³ C-FB1 (内标)	-	756.45	356.35	-22	-47	-26

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制:

取适量单标储备液, 用乙腈/水 (50/50, v/v) 配制为混合标准溶液, 然后逐级稀释成低浓度的标准工作液。FB1 浓度为 100、50、20、10、5 ng/mL; FB2 和 FB3 浓度为 50、25、10、5、2.5 ng/mL。

内标物 ¹³C-FA1 的浓度为 10 ng/mL。

样品前处理方法:

提取: 准确称取 2 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入同位素内标 10 ng (100 ng/mL, 100 微升), 加入 10 mL 乙腈/水 (50/50, v/v), 均质提取 3 min, 以 10000 r/min 于 4℃ 下离心 10 min, 将上清液转移至另一离心管中, 用 NaOH (0.1 mol/L) 溶液调 pH 值到 6~9。

净化: 取 1.5 mL 提取液, 加入 35 mL 0.1% 吐温-20/PBS 缓冲溶液, 混合均匀后过免疫亲和柱, 流速控制在 1~3 mL/min, 用 10 mL PBS 缓冲液淋洗免疫亲和柱, 用 3×1 mL 甲醇/乙酸 (98/2, v/v) 洗脱免疫亲和柱, 收集洗脱液, 55℃ 下氮吹至干, 乙腈/水溶液 (20/80, v/v) 定容至 1 mL。涡旋 30 s, 过 0.22 μm 微孔滤膜后供进样。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 的 FB1、5 ng/mL 的 FB2 和 5 ng/mL 的 FB3 的混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

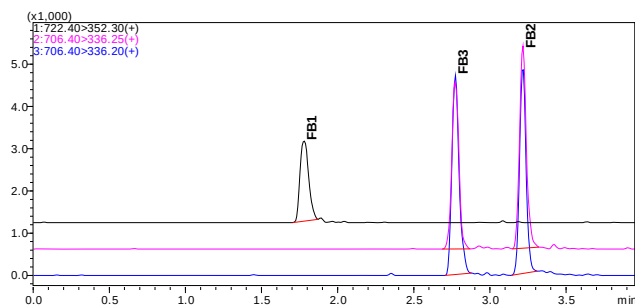


图 1 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将 1.3 所示的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2~5 所示。3 种伏马毒素在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

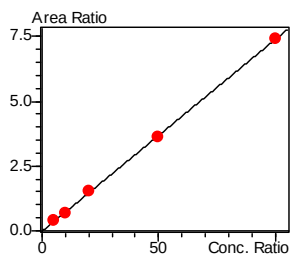


图 2 FB1 的标准工作曲线

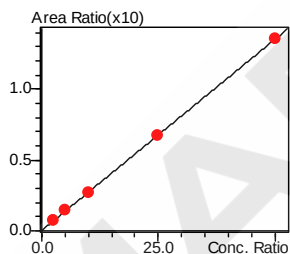


图 3 FB2 的标准工作曲线

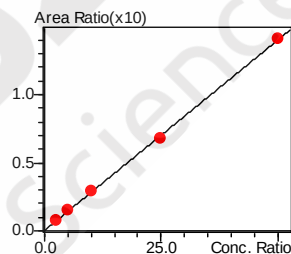


图 4 FB3 的标准工作曲线

表 3 3 种伏马毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限(ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	FB1	$Y=0.074X-0.0173$	0.9998	0.14	0.48
2	FB2	$Y=0.270X+0.0297$	0.9999	0.09	0.28
3	FB3	$Y=0.279X+0.0388$	0.9996	0.09	0.28

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、20 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的准确度和峰面积的相对标准偏差分别在 87.6~104.8%和 0.97~10.30%之间。

表 4 3 种伏马毒素的准确度及峰面积相对标准偏差 (RSD%)

Compound	5 ng/ml (n=6)		20 ng/ml (n=6)		100 ng/ml (n=6)	
	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)	Accuracy (%)	RSD (%)
Fumonisin FB1	104.8	10.30	101.4	1.88	100.0	1.47
Fumonisin FB2	87.6	1.78	101.6	1.96	100.3	2.35
Fumonisin FB3	98.5	4.90	104.6	2.36	101.3	0.97

2.4 回收率考察

以空白玉米样配制加标溶液，FB1、FB2 和 FB3 的加标浓度分为 20、10 和 10 ng/mL，得到色谱图如图 5 所示。3 种伏马毒素 FB1、FB2 和 FB3 加标回收率在分别为：99.01、104.17 和 97.23%。

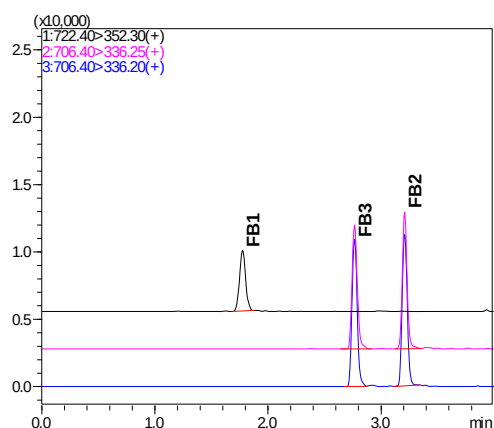


图 5 基质加标样品的色谱图

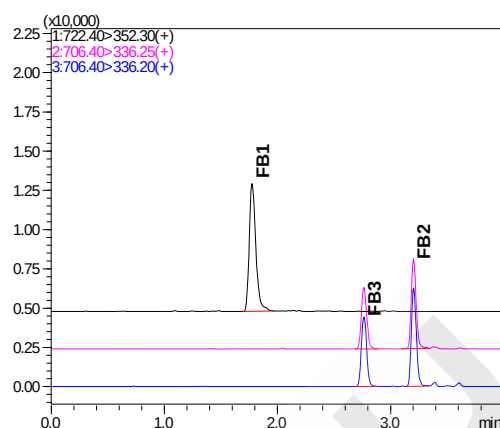


图 6 阳性玉米样品的色谱图

2.5 玉米样品分析

考察了市售的玉米样品，在某市场出售的玉米样品中检出了 3 种毒素，浓度见表 5，色谱图见图 6。

表 5 阳性样品的检出浓度

阳性样品	FB1	FB2	FB3
浓度 (ng/mL)	42.76	6.30	4.89

3. 结论

本文建立了一种快速准确测定玉米中 3 种伏马毒素的方法，该方法使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用进行测试。该方法测试时间仅有 6 min；低、中、高 3 个浓度标准品的准确度和峰面积的相对标准偏差分别在 87.6 ~ 104.8% 和 0.97 ~ 10.30% 之间；3 种伏马毒素 FB1、FB2 和 FB3 加标回收率在分别为：99.01、104.17 和 97.23%，方法准确度高。

LC-MS/MS 测定小麦中的雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小麦中的雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的方法。样品经乙腈/水提取、SPE 净化后,液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。3 种雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物在 2 ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好;对 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样,3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.90 ~ 1.97%和 1.42 ~ 4.16%之间,仪器精密度良好;同时考察了空白小麦基质加标结果,结果显示 3 种雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物加标回收率在 74.35 ~ 93.11%之间,方法可靠;在市售小麦样品中检出 NIV,浓度为 15.56 µg/kg。

关键词: 雪腐镰刀菌烯醇 衍生物 小麦 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

镰刀菌是食物中最常见的污染性霉菌,镰刀菌素是镰刀菌生长过程中产生的各种有毒代谢产物,常见的有伏马菌素(Fumonisin)、T-2 毒素、镰刀菌烯酮-X(Fusarenon-X, FX)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)等。饮食中污染的镰刀菌素可以通过诱导细胞凋亡对机体造成多种病理损伤。我国还没有使用 LC-MS/MS 检测雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了快速准确测定小麦中的雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。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-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: UHPLC C18 2.0 mmI.D.×100 mmL.

流动相: A—0.01%氨水;

B—乙腈

流速: 0.4 mL/min

进样体积: 10 µL

柱温: 40℃

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 4%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Conc.
0.50	4
1.20	16
4.00	16
4.50	100
5.50	100
5.70	4
7.00	Stop

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

离子源: ESI, 负离子扫描

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：30 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

编号	中文名称	英文名称 (简称)	CAS No.	前体 离子	产物 离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	雪腐镰刀菌烯醇	Nivalenol (NIV)	23282-20-4	311	281.15*	21	9	30
					191.1	21	18	18
2	镰刀菌烯酮 X	Fusarenon-X (Fus X)	23255-69-8	353	263.05*	12	12	27
					187.1	12	25	17
3	隐蔽型脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deep-DON	-	279	249.15*	19	9	24
					231.1	19	15	22
4	¹³ C-NIV	¹³ C-NIV	-	326	295.25	11	11	30

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

取适量单标储备液，用乙腈配制成 10 mg/L 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 2、5、10、20、50、75、100 ng/mL 的标准工作液。内标物 ¹³C-NIV 的浓度为 50 ng/mL。

样品前处理方法：

准确称取 5.0 g 经粉碎均匀的样品至 50 mL 的离心管中，加入乙腈/水（84/16，v/v）40 mL，涡旋 1 min，超声 60 min，离心 5 min（10000 rpm）。移取 5 mL 上清液至 Mycosep™226 多功能净化柱的玻璃管内，加入 100 μL 内标及 5 mL 乙腈溶液混匀，将多功能净化柱的填料管插入玻璃管中并缓慢推动填料管，弃去 2 mL 初滤液，取续滤液 4 mL 至氮吹瓶中。在 40 ~ 50℃ 下氮气吹干，用乙腈/水（10/90，v/v）溶液定容至 1 mL，超声涡旋 30 s，用 0.22 μm 滤膜过滤至进样瓶中备用。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

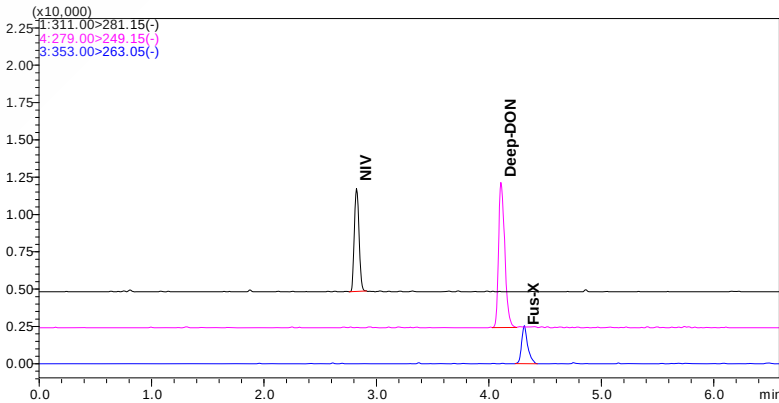


图 1 10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 2、5、10、20、50、75、100 ng/mL 的混合标准工作液, 其中内含内标 ¹³C-NIV 浓度为 50 ng/mL, 按 1.2 中的分析条件进行测定, 以浓度比为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 内标法制作校准曲线, 如图 2 ~ 4 所示。雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物在检测浓度范围内线性良好。线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

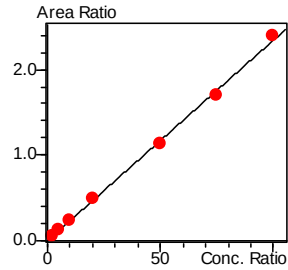


图 2 NIV 的标准工作曲线

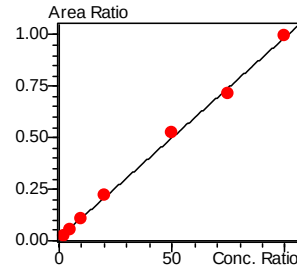


图 3 FUS X 的标准工作曲线

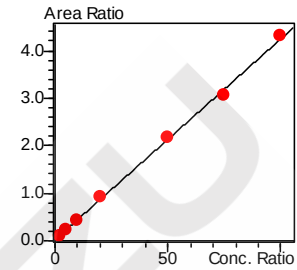


图 4 Deep-DON 的标准工作曲线

表 3 雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	定量限(ng/mL)	检出限(ng/mL)
1	NIV	$Y = 0.0239X - 0.0276$	0.9987	0.10	0.03
2	FUS X	$Y = 803.240X - 55.1315$	0.9984	0.09	0.03
3	Deep-DON	$Y = 3518.34X - 221.455$	0.9997	0.22	0.07

2.3 精密度实验

对 10 ng/mL、50 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 6 次进样, 3 个浓度标准品的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.90 ~ 1.97% 和 1.42 ~ 4.16% 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)

名称	RSD% (10 ng/mL)		RSD% (50 ng/mL)		RSD% (100 ng/mL)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
NIV	1.77	2.61	1.97	2.51	1.76	2.02
FUS X	1.02	4.16	1.53	1.50	1.47	2.99
Deep-DON	0.90	2.08	0.96	1.61	1.55	1.42

2.4 回收率考察

以空白小麦样配制加标溶液, 加标浓度 5 ng/mL, 得到色谱图如图 5 所示。雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物加标回收率在 74.35 ~ 93.11% 之间 (见表 5)。

2.5 小麦样品分析

在市售小麦样品中检出 NIV, 浓度分别为 15.56 μg/kg, 色谱图见图 6。

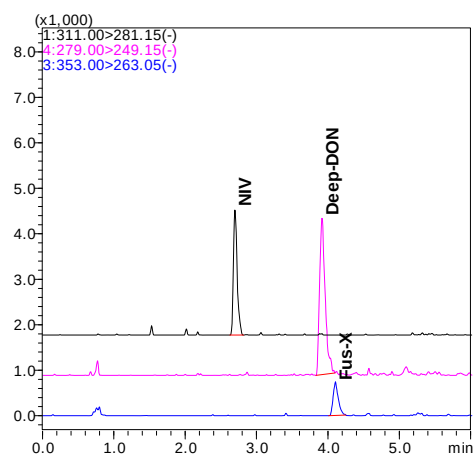


图 5 基质加标样品（5 ng/mL）的色谱图

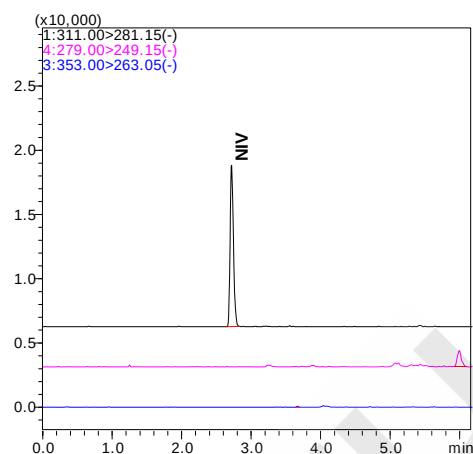


图 6 小麦样品的色谱图

表 5 空白基质加标样品（5 ng/mL）回收率

名称	1	2	3	平均	回收率(%)
NIV	3.94	3.65	3.56	3.72	74.35
FUS X	4.59	4.13	4.49	4.40	88.08
Deep-DON	4.79	4.71	4.47	4.66	93.11

3. 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小麦中的雪腐镰刀菌烯醇及其衍生物的方法。所有分析物在 2 ~ 100 ng/mL 浓度范围内线性良好，相关系数均大于 0.998；低、中、高 3 浓度的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.90 ~ 1.97% 和 1.42 ~ 4.16% 之间，仪器精密度良好；5 ng/mL 空白小麦加标回收率在 74.35 ~ 93.11 之间，方法可靠；在市售小麦样品中检出 NIV，浓度分别为 15.56 $\mu\text{g/kg}$ 。

LC-MS/MS 同时测定谷物中的呕吐毒素和玉米赤霉烯酮

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小麦中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法。样品经超声提取、SPE 净化后,液相分离、三重四极杆质谱仪内标法进行定量分析。4 种毒素在 5 ~ 150 ng/mL 浓度范围内线性良好;对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样,3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差分别在 95.8 ~ 112.4%和 0.93 ~ 4.90%之间,仪器精密度良好;同时考察了空白小麦基质加标结果,结果显示 4 种毒素 10 ng/mL 的加标回收率在 98.9 ~ 112.0%之间;在某小麦样品中检出呕吐毒素 DON、ZON 和 3-ADON,浓度分别为 130.85、198.04 和 6.40 ng/mL。

关键词: 呕吐毒素 玉米赤霉烯酮 小麦 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

呕吐毒素 (Vomitoxin), 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON), 属单端孢霉烯族化合物,可引起猪的呕吐,故得名。当人摄入了被 DON 污染的食物后,会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状,严重时损害造血系统造成死亡。国际癌症研究机构将呕吐毒素被列为 3 类致癌物。欧盟食品限量要求呕吐毒素要小于 1.0 mg/kg;我国食品安全国家标准《GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定玉米等谷物及其制品中呕吐毒素限量为 1.0 mg/kg。玉米赤霉烯酮

(Zearalenone, ZON) 又称 F-2 毒素,具有雌激素样作用,能造成动物急慢性中毒,引起动物繁殖机能异常甚至死亡。我国《食品中真菌毒素限量》国家标准规定谷物及其制品限量指标为 60 mg/kg。目前为止,我国还没有使用 LC-MS/MS 检测上述毒素的国家标准。本文使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用,建立了快速准确测定小麦中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法,供相关检测人员参考。

1. 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用系统。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-30A 柱温箱, CBM-20A 系统控制器, LCMS-8040 三重四极杆质谱仪, LabSolutions Ver. 5.50 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器: LC-30A 系统

色谱柱: UHPLC C18 2.0 mmI.D.×75 mmL.

流动相: A—0.01%氨水;

B—乙腈

流速: 0.3 mL/min

进样体积: 10 μ L

柱温: 40℃

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 10%, 时间程序见表 1。

质谱条件

分析仪器：LCMS-8040

离子源：ESI，负离子扫描

离子源接口电压：-3.5 kV

雾化气：氮气 3.0 L/min

干燥气：氮气 15 L/min

碰撞气：氩气

脱溶剂管温度：250℃

加热模块温度：400℃

扫描模式：多反应监测（MRM）

驻留时间：20 ms

延迟时间：3 ms

MRM 参数：见表 2

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	B.Con.
2.00	60
4.00	95
4.50	100
5.50	100
5.70	10
8.00	Stop

表 2 MRM 参数

编号	英文名称 (简称)	中文名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
1	Zearalmonone (ZON)	玉米赤霉烯酮	17924-92-4	317.05	131.20*	15	30	22
					175.25	15	24	17
2	Deoxynivalenol (DON)	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	51481-10-8	295.05	265.05*	20	12	26
					138.00	20	17	23
3	3-Acetyldeoxynivalenol (3-ADON)	3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	50722-38-8	337.05	307.20*	23	11	30
					173.20	23	11	16
4	15-Acetyldeoxynivalenol (15-ADON)	15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	88337-96-6	337.05	150.15*	24	18	26
					219.15	24	11	22
5	¹³ C-DON (内标)	¹³ C-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	-	310.10	279.15	14	11	29
6	¹³ C-ZON (内标)	¹³ C-玉米赤霉烯酮	-	335.10	140.15	23	31	24
7	¹³ C-3-ADON (内标)	¹³ C-3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇	-	354.10	323.10	17	11	20

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准溶液配制：

取适量单标储备液，用乙腈配制成 1000 ng/mL 的混合标准溶液，用水逐级稀释成浓度为 150、100、75、50、25、10、5 ng/mL 的标准工作液。内标物 ¹³C-DON、¹³C-ZON 和 ¹³C-3-ADON 的浓度均为 50 ng/mL。

样品前处理方法：

准确称取 5.0 g 经粉碎均匀的样品至 50 mL 的离心管中，加入乙腈/水（84/16，v/v）40 mL，涡旋 1 min，超声 60 min，离心 5 min（10000 转/min）。移取 5 mL 上清液至 MycoSep™226 多功能净化柱的玻璃管内，加入 100 μL 内标及 5 mL 乙腈溶液混匀，将多功能净化柱的填料

管插入玻璃管中并缓慢推动填料管，弃去 2 mL 初滤液，取续滤液 4 mL 至氮吹瓶中。在 40 ~ 50℃ 下氮气吹干，用乙腈/水（10/90，v/v）溶液定容至 1 mL，超声涡旋 30 s，用 0.22 μm 滤膜过滤至进样瓶中备用。

2. 结果讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱如图 1 所示。

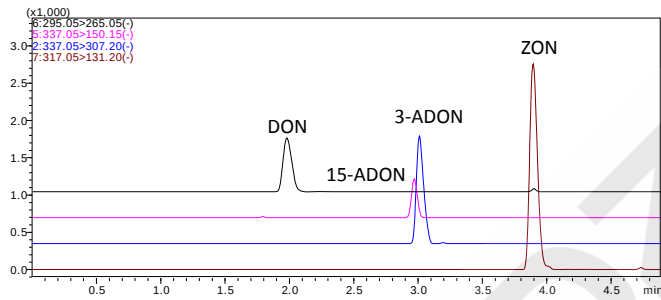


图 1 10 ng/mL 混合标准样品的 MRM 色谱图

2.2 线性关系

将浓度为 5、10、25、50、75、100、150 ng/mL 的混合标准工作液按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线，如图 2 ~ 5 所示。4 种毒素的线性方程、相关系数及由软件计算得检出限和定量限见表 3。

表 3 4 种毒素的校准曲线参数

No.	名称	校准曲线	相关系数 r	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
1	DON	$Y = (0.0202)X + (-0.0208)$	0.9994	0.31	0.94
2	15-ADON	$Y = (0.0071)X + (0.0003)$	0.9999	0.51	1.53
3	3-ADON	$Y = (0.0229)X + (-0.0086)$	0.9992	0.02	0.06
4	ZON	$Y = (0.0143)X + (-0.0191)$	0.9995	0.29	0.88

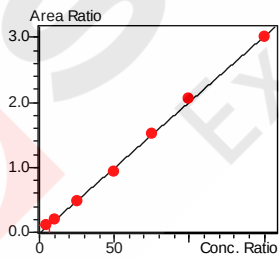


图 2 DON 的标准工作曲线

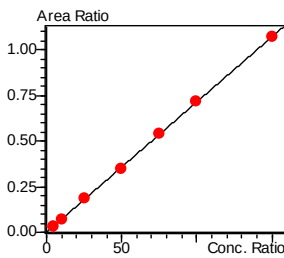


图 3 15-ADON 的标准工作曲线

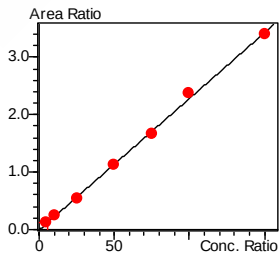


图 4 3-ADON 的标准工作曲线

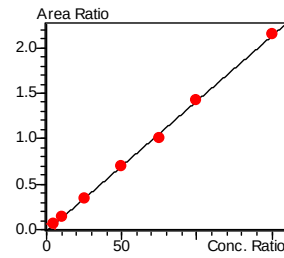


图 5 ZON 的标准工作曲线

2.3 精密度实验

对 5 ng/mL、10 ng/mL 和 100 ng/mL 混合标准溶液连续 3 次进样，3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差分别在 95.8 ~ 112.4%和 0.93 ~ 4.90%之间，仪器精密度良好。

表 4 3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差（n=3）

名称	5 ng/mL		10 ng/mL		100 ng/mL	
	Accuracy%	Conc. RSD%	Accuracy%	Conc. RSD%	Accuracy%	Conc. RSD%
DON	112.4	1.97	98.0	3.35	99.9	4.90
15-ADON	101.3	4.74	101.1	2.65	98.1	2.94
3-ADON	99.3	1.83	104.2	1.27	95.8	2.71
ZON	101.6	1.19	102.0	3.84	96.3	0.93

2.4 回收率考察

以空白小麦样配制加标溶液，加标浓度为 10 ng/mL，得到色谱图如图 6 所示。4 种毒素 DON、15-ADON、3-ADON 和 ZON 加标回收率在分别为：98.9、105.9、104.7 和 112.0%。

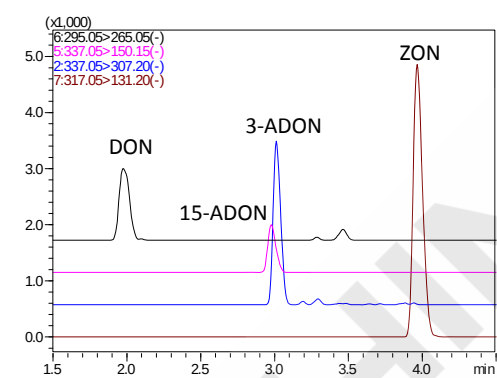


图 6 基质加标 10 ng/mL 样品的色谱图

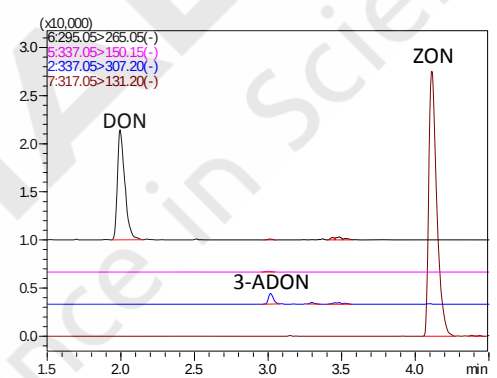


图 7 小麦样品的色谱图

2.5 小麦样品分析

在某小麦样品中检出 DON、ZON 和 3-ADON，浓度分别为 130.85、198.04 和 6.40 ng/mL，色谱图见图 7。

3. 结论

建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8040 联用测定小麦中 3 种呕吐毒素和玉米赤霉烯酮的方法。4 种毒素在 5 ~ 150 ng/mL 浓度范围内线性良好，10 ng/mL 基质加标样品的回收率良好；低、中、高 3 个浓度标准品的准确度和浓度的相对标准偏差分别在 95.8 ~ 112.4%和 0.93 ~ 4.90%之间，仪器精密度良好；在某小麦样品中检出呕吐毒素 DON、ZON 和 3-ADON，浓度分别为 130.85、198.04 和 6.40 ng/mL。

LC-30A 电化学衍生法高灵敏度快速检测黄曲霉毒素

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。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。

1. 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。

2. 结果讨论

2.1 标准样品色谱图

黄曲霉素 B₁、B₂、G₁、G₂ 标准样品分析结果如图 1 所示。其中，黄曲霉素 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。

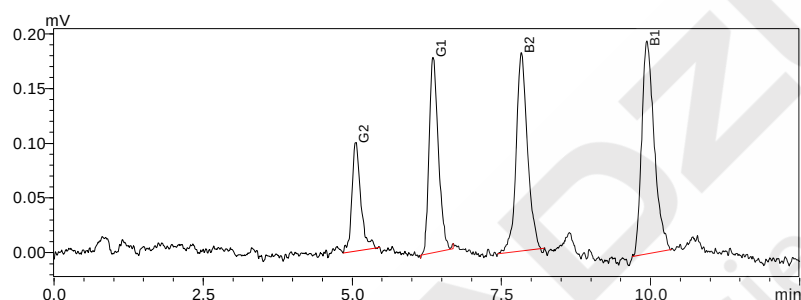


图1 黄曲霉素B₁、B₂、G₁、G₂标准样品的色谱图（总浓度0.208 ng/mL）

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。

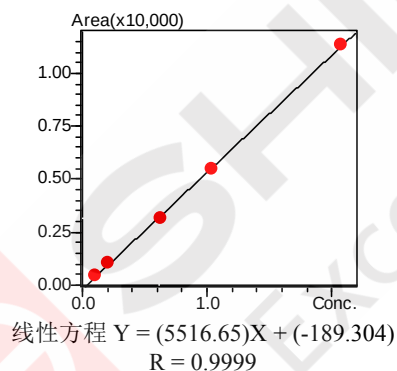


图2 黄曲霉素 G₂ 的标准曲线

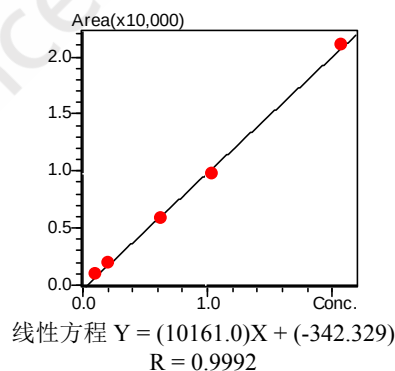


图3 黄曲霉素 G₁ 的标准曲线

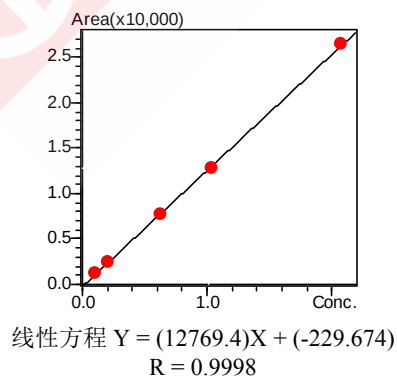


图4 黄曲霉素 B₂ 的标准曲线

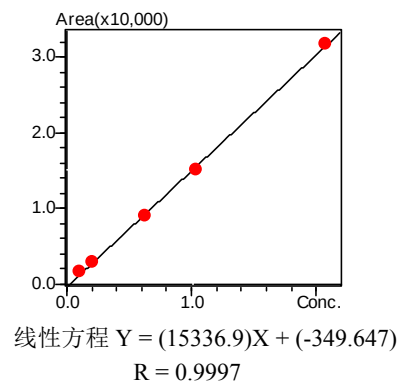


图5 黄曲霉素 B₁ 的标准曲线

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，考察方法的重复性，保留时间和峰面积的重复性结果如表 1 所示，重复性良好。

表 1 保留时间和峰面积重复性结果(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。

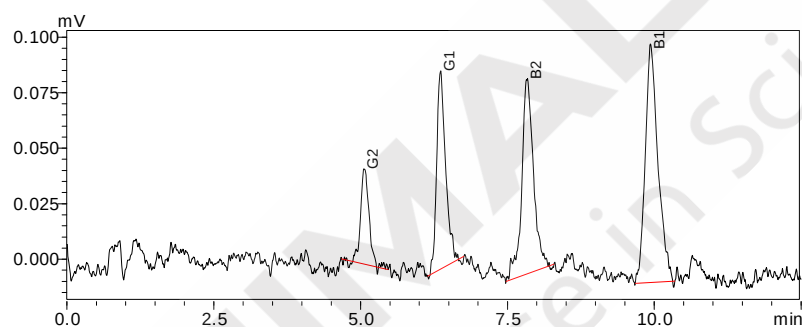


图6 黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂标准样品的色谱图（总浓度0.104 ng/mL）

3. 结论

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 0.313%和 3.288%以下，仪器精密度良好。

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 μL ，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% ~ 103.0%。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。其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《GB 2761-2011 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/T 5009.23-2006 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-20A Lite 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. $\times$ 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 $^{\circ}\text{C}$

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)	B.Conc
2.00	45
3.00	60
5.00	60
5.10	22
8.00	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/T 5009.23-2006 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，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。

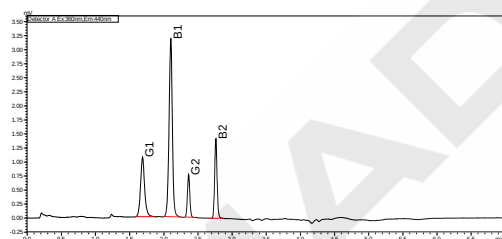


图1 黄曲霉毒素 G₁、B₁、G₂、B₂ 标准样品色谱图

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 ~ 5 所示。标准曲线方程和相关系数结果见表 2。

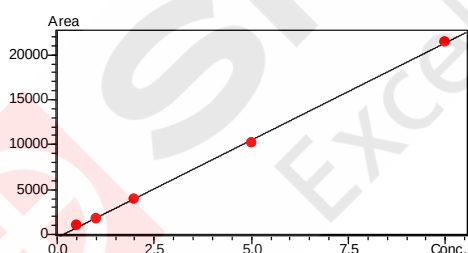


图2 黄曲霉毒素 G₁ 的标准工作曲线

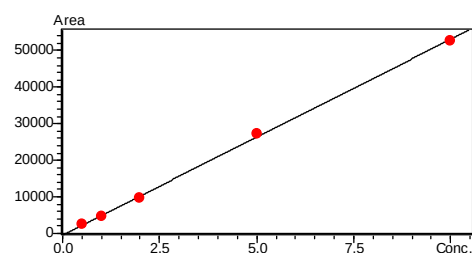


图3 黄曲霉毒素 B₁ 的标准工作曲线

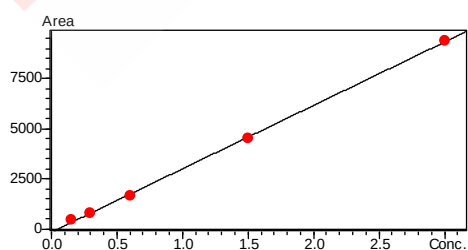


图4 黄曲霉毒素 G₂ 的标准工作曲线

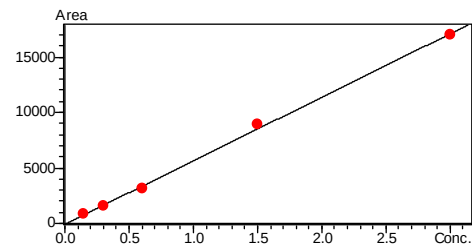


图5 黄曲霉毒素 B₂ 的标准工作曲线

表 2 标准曲线方程、检出限和定量限

组分	Y= aX+b	R	检出限 (μg/L)	定量限 (μg/L)
G1	Y=2164.99X-352.090	0.9996	0.011	0.038
B1	Y=5352.15X-439.673	0.9994	0.003	0.011
G2	Y=3159.62X-142.456	0.9997	0.005	0.016
B2	Y=5733.56X-94.928	0.9992	0.002	0.007

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 2。色谱图如图 6 所示。

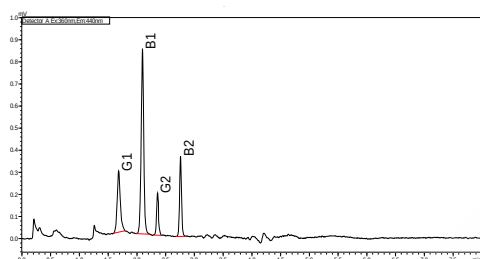


图 6 标准溶液的色谱图

表 3 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

2.4 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。

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。玉米样品色谱图见图 7, 加标样品色谱图见图 8, 基质加标回收结果见表 4。

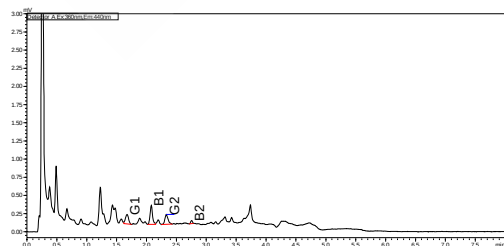


图 7 玉米空白样品的色谱图

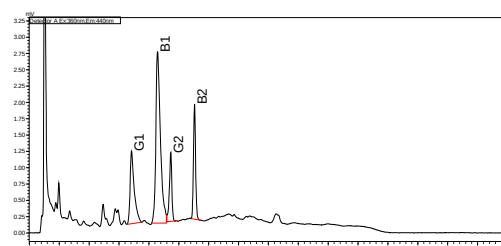


图 8 玉米加标样品的色谱图

表 4 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 $0.04 \sim 0.20\%$ 和 $0.15 \sim 0.80\%$ 之间；玉米样品平均加标回收率为 $89.4\% \sim 103.0\%$ 。

LC-30A 无需衍生快速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 无需衍生快速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 0.2 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$, G2、B2 线性范围 0.06 $\mu\text{g/L}$ ~ 15 $\mu\text{g/L}$, 相关系数均大于 0.9999; 进样量 2 μL , 仪器检出限为 0.002 ~ 0.019 $\mu\text{g/L}$, 仪器定量限为 0.007 ~ 0.065 $\mu\text{g/L}$; 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 0.111 ~ 0.390% 和 0.116 ~ 1.344% 之间; 玉米样品三个浓度加标回收率为 88.8% ~ 108.0%。

关键词: 粮食 黄曲霉毒素 无需衍生 超高效液相色谱 免疫亲和柱

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 $\mu\text{g/kg}$ 。

由于反相洗脱会使黄曲霉毒素 B1 和 G1 的荧光效应发生猝灭, 通常需要进行衍生化以增强其荧光强度。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。这些方法耗时较长, 且柱前衍生法前处理操作较复杂, 柱后衍生法所需的柱后反应器或电化学单元价格昂贵。免疫亲和柱能特效性地、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。吸附后的黄曲霉毒素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, 操作简便, 净化效果好, 提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

本文参考《粮油检验粮食中黄曲霉毒素的测定超高效液相色谱法》标准征求意见稿中的要求, 采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A, 免疫亲和柱净化, 无需衍生快速测定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 仪器和材料

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-20A Lite 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.42 SP3 色谱工作站, Romer AflaStar R 黄曲霉毒素免疫亲和柱。

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. $\times$ 50 mm L., 1.6 μm

流动相: 甲醇/水 (45/55, v/v)

流速: 0.2 mL/min

进样体积: 2 μL

柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$

检测波长: Ex = 360 nm, Em = 440 nm

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），经流动相逐级稀释成 B1、G1：0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ ；B2、G2：0.06、0.15、0.30、0.60、1.5、3.0、6.0、15 $\mu\text{g/L}$ 等 8 个标准溶液浓度系列。

②样品前处理方法：取 $25\text{ g} \pm 0.1\text{ g}$ 经 20 目筛筛分的玉米样品于 250 mL 锥形瓶中，加入 100 mL 甲醇/水（80/20，v/v），高速均质 2 min，用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清。取 2 mL 滤液与 12 mL 超纯水混合均匀，以 1~2 滴/s 的速度全部通过免疫亲和柱。再以 $2 \times 5\text{ mL}$ 水以 1~2 滴/s 的速度洗柱，抽干小柱。用 $2 \times 0.5\text{ mL}$ 甲醇， $2 \times 0.5\text{ mL}$ 水依次洗脱，收集洗脱液，定容至 2 mL，经 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 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，G1、B1浓度为 $0.5\text{ }\mu\text{g/L}$ ，G2、B2浓度为 $0.15\text{ }\mu\text{g/L}$ 。保留时间分别为2.110、2.584、3.288、4.105 min。

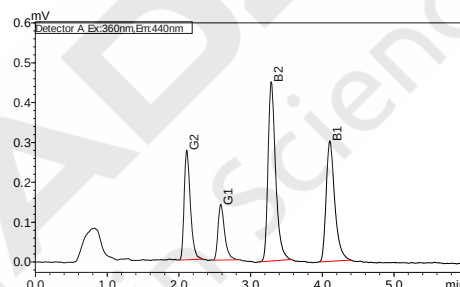


图1 黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 标准样品色谱图

2.2 线性关系

将 8 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 1。

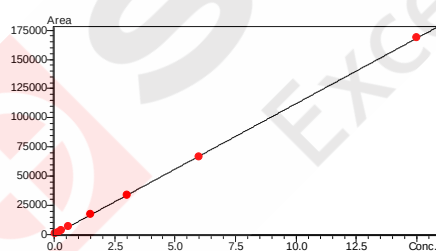


图2 黄曲霉毒素 G2 的标准工作曲线

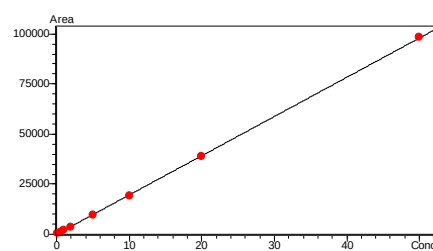


图3 黄曲霉毒素 G1 的标准工作曲线

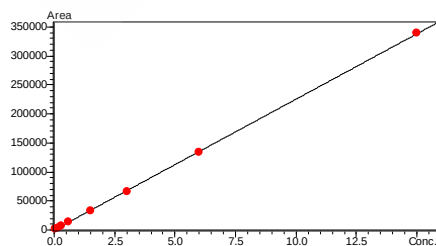


图4 黄曲霉毒素 B2 的标准工作曲线

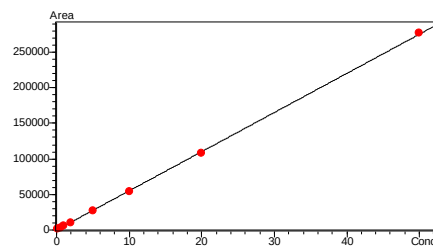


图5 黄曲霉毒素 B1 的标准工作曲线

表 1 标准曲线方程、检出限和定量限

组分	$Y = aX + b$	R	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)
G2	$Y = 11213.00X$	0.9999	0.003	0.011
G1	$Y = 1958.68X$	0.9999	0.019	0.065
B2	$Y = 22545.30X$	0.9999	0.002	0.007
B1	$Y = 5506.77X$	0.9999	0.009	0.030

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: $0.2 \mu\text{g/L}$; G2、B2: $0.06 \mu\text{g/L}$), 通过 LabSolutions 软件, 按照 ASTM 规则, 选取基线为 $4.75 \sim 5.75 \text{ min}$ 计算信噪比, 结果见表 1, 色谱图如图 6 所示。

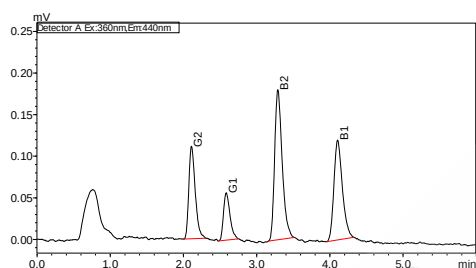


图 6 标准溶液的色谱图

表 2 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

组分	浓度	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
G1	0.5	0.128	1.344
	2.0	0.390	0.687
	10	0.122	0.219
B1	0.5	0.140	1.333
	2.0	0.374	0.274
	10	0.111	0.472
G2	0.15	0.126	1.034
	0.60	0.379	0.147
	3.0	0.116	0.116
B2	0.15	0.140	0.562
	0.60	0.370	0.296
	3.0	0.116	0.130

2.4 精密度实验

取低、中、高三个不同浓度标准溶液, 分别进样 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 $0.111 \sim 0.390\%$ 和 $0.116 \sim 1.344\%$ 之间, 仪器精密度良好, 结果见表 2。

2.5 基质加标实验

按照 1.3 所述方法处理全程序空白样品 (除不加玉米外, 其他步骤和实际样品的处理相同) 和玉米样品, 上机测试, 均未检出黄曲霉毒素。全程序空白样品色谱图如图 7 所示。玉米样品色谱图如图 8 所示。玉米样品加标色谱图如图 9、图 10、图 11 所示。基质加标回收结果如表 3 所示。

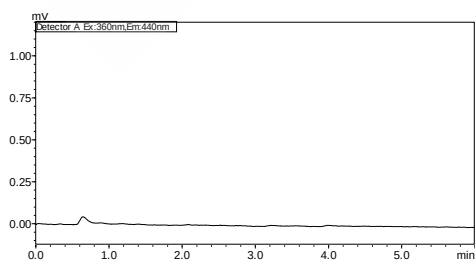


图 7 全程序空白样品的色谱图

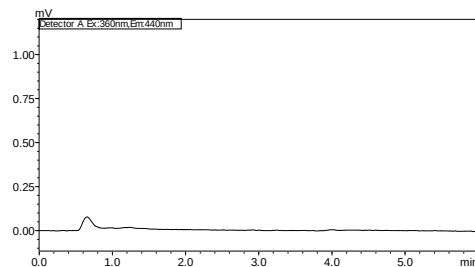


图 8 玉米样品的色谱图

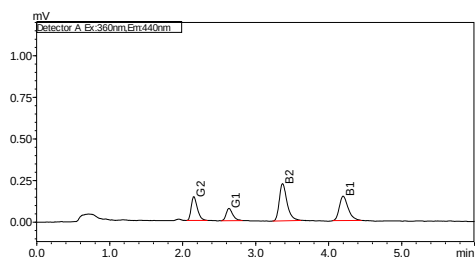


图 9 玉米加标样品的色谱图
(G1、B1: 1 $\mu\text{g/kg}$; G2、B2: 0.3 $\mu\text{g/kg}$)

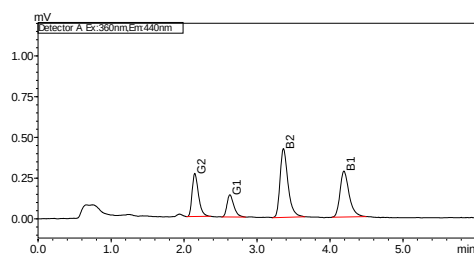


图 10 玉米加标样品的色谱图
(G1、B1: 2 $\mu\text{g/kg}$; G2、B2: 0.6 $\mu\text{g/kg}$)

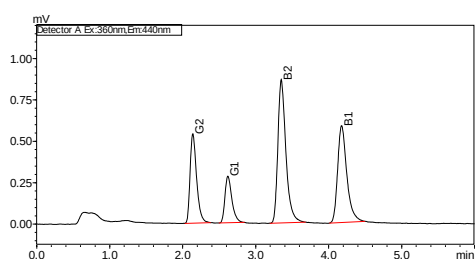


图 11 玉米加标样品的色谱图
(G1、B1: 4 $\mu\text{g/kg}$; G2、B2: 1.2 $\mu\text{g/kg}$)

表 3 基质加标回收结果

组分	加标量 ($\mu\text{g/kg}$)	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)
G1	1.0	0.948	94.8
	2.0	1.820	91.0
	4.0	4.132	103.0
B1	1.0	0.896	89.6
	2.0	1.776	88.8
	4.0	4.300	108.0
G2	0.3	0.296	98.7
	0.6	0.572	95.3
	1.2	1.212	101.0
B2	0.3	0.292	94.3
	0.6	0.568	94.7
	1.2	1.248	104.0

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 0.2 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$, G2、B2 线性范围 0.06 $\mu\text{g/L}$ ~ 15 $\mu\text{g/L}$, 相关系数均大于 0.9999; 进样量 2 μL , 仪器检出限为 0.002 ~ 0.019 $\mu\text{g/L}$, 仪器定量限为 0.007 ~ 0.065 $\mu\text{g/L}$; 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 0.111 ~ 0.390% 和 0.116 ~ 1.344% 之间; 玉米样品三个浓度的加标回收率在 88.8% ~ 108.0% 之间。本方法无需衍生, 操作简单, 免疫亲和柱净化效果良好, 准确度和灵敏度高, 适用于粮食中黄曲霉毒素的快速、准确检测。

LC-30A 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 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 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 的方法。实验结果表明: 该法线性范围宽, 在 0.05 ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数大于 0.9999; 进样 3 μL , 仪器检出限为 0.01 $\mu\text{g/L}$, 定量限为 0.03 $\mu\text{g/L}$ 。0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 和 5 $\mu\text{g/L}$ 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 0.03 ~ 0.12% 和 0.18 ~ 1.14% 之间; 牛奶样品和婴幼儿奶粉样品加标回收率分别为 83.8% 和 84.6%。

关键词: 牛奶 婴幼儿奶粉 黄曲霉毒素 M1 超高效液相色谱 免疫亲和柱

黄曲霉毒素 M1 (AFM1) 是由常见的黄曲霉和寄生曲霉产生的代谢产物。哺乳类动物摄入被黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 污染的饲料和食物后, 部分 AFB1 在体内转化成 AFM1, 存在于动物分泌的乳汁和产生的尿液中, 为强致癌剂。美国和日本规定乳及乳制品中 AFM1 含量不得超过 0.5 $\mu\text{g/kg}$; 欧盟规定鲜乳中 AFM1 含量不能超过 0.05 $\mu\text{g/kg}$; 我国规定婴幼儿乳品中 AFM1 不得检出, 牛乳中含量不得超过 0.5 $\mu\text{g/kg}$ 。

免疫亲和柱能特效性地、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。吸附后的黄曲霉毒素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, 操作简便, 净化效果好, 提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

本文参考《GB 5413.37-2010 食品安全国家标准 乳和乳制品中黄曲霉毒素M1的测定》标准的要求, 采用岛津超高效液相色谱仪LC-30A, 免疫亲和柱净化, 测定了牛奶和婴幼儿奶粉中的黄曲霉毒素M1, 供相关检测人员参考。

1. 实验条件

1.1 仪器和材料

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, Romer AflaStar M1 R 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱。

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.×75 mm L., 1.6 μm

流动相: 乙腈/水 (25/75, v/v)

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$

流速: 0.5 mL/min

检测波长: $E_x = 365 \text{ nm}$, $E_m = 435 \text{ nm}$

进样体积: 3 μL

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

用流动相将标准储备液（10 mg/L）逐级稀释成 0.05、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 等 9 个标准溶液浓度系列。

1.3.2 样品前处理方法

① 试样的制备

参照《GB 5413.37-2010 食品安全国家标准 乳和乳制品中黄曲霉毒素 M1 的测定》标准中试样制备方法进行。

② 试样的提取和净化

收集试样制备得到的乳液至少 50 mL，过黄曲霉毒素 M1 免疫亲和小柱。用 10 mL 水洗柱，并重复一次。抽干小柱。用 0.5 mL 甲醇洗柱，并重复一次。精确移取 0.5 mL 洗脱液和 0.5 mL 超纯水混匀，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。AFM1保留时间为1.501 min。

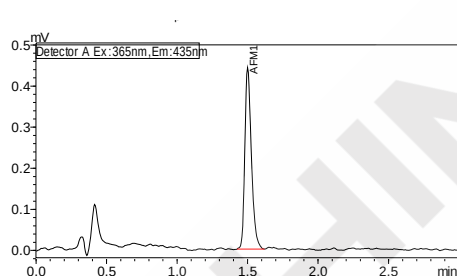


图1 黄曲霉毒素M1标准样品色谱图（1 $\mu\text{g/L}$ ）

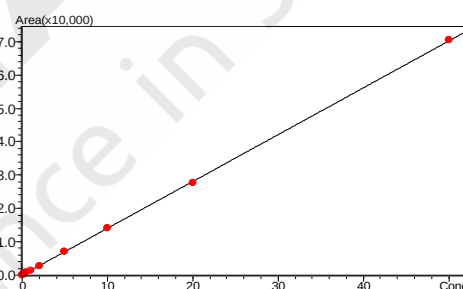


图2 黄曲霉毒素 M1 的标准工作曲线

2.2 线性关系

将 9 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 所示。线性方程为 $Y = (1403.47)X + (10.066)$ 、线性范围 0.05 ~ 50 $\mu\text{g/mL}$ ，相关系数大于 0.9999，线性良好。

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 0.05 $\mu\text{g/L}$ 计算仪器的灵敏度，通过 LabSolutions 软件，按照 RMS 方式，选取基线为 1.75 ~ 3.00 min 计算信噪比，仪器检测限(3 倍噪声计算)为 0.01 $\mu\text{g/L}$ 、定量限（10 倍噪声计算）为 0.03 $\mu\text{g/L}$ 。0.05 $\mu\text{g/L}$ 标样色谱图如图 3 所示。

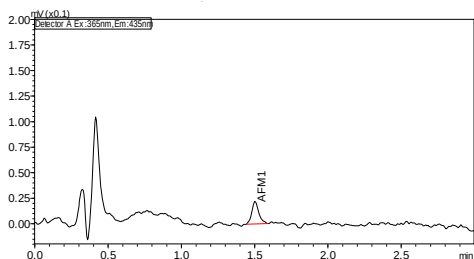


图 3 0.05 µg/L 标准溶液的色谱图

表 1 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度(µg/L)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
0.2	0.12%	1.14%
1	0.03%	0.90%
5	0.06%	0.18%

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 0.03 ~ 0.12% 和 0.18 ~ 1.14% 之间，仪器精密度良好。

2.5 加标回收实验

按照 1.3 所述方法处理全程序空白样品（除不加样品外，其他步骤和实际样品的处理相同）、市售纯牛奶和婴幼儿奶粉样品，上机测试。全程序空白样品色谱图如图 4 所示。纯牛奶样品色谱图如图 5 所示。纯牛奶样品加标色谱图如图 6 所示。婴幼儿奶粉样品色谱图如图 7 所示。婴幼儿奶粉样品加标色谱图如图 8 所示。加标回收结果见表 2。

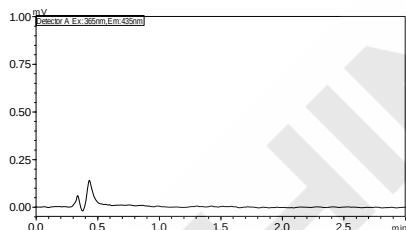


图 4 全程序空白样品的色谱图

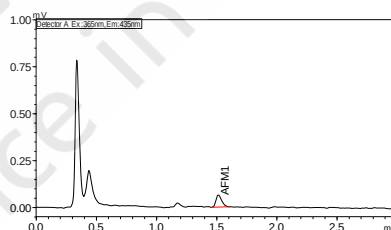


图 5 纯牛奶样品的色谱图

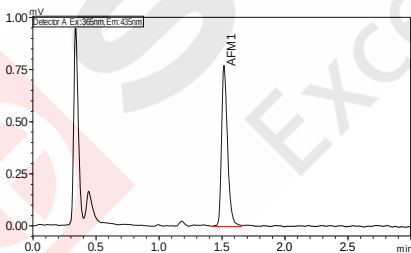


图 6 纯牛奶加标样品的色谱图(加标量: 0.078 µg/kg)

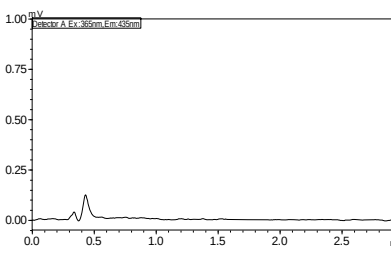


图 7 婴幼儿奶粉样品的色谱图

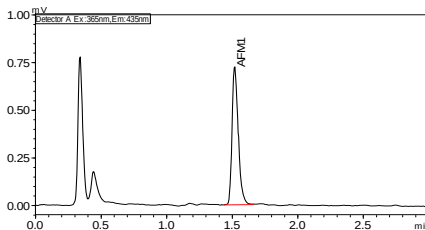


图 8 婴幼儿奶粉加标样品的色谱图(加标量: 0.800 µg/kg)

表 2 加标回收结果

基质	样品 ($\mu\text{g/kg}$)	加标量 ($\mu\text{g/kg}$)	实测值 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)
牛奶	0.006	0.078	0.071	83.3
婴幼儿奶粉	N.D.	0.800	0.677	84.6

注: N.D.表示未检出

3. 结论

本文建立了一种使用超高效液相色谱仪 LC-30A 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 的方法。实验结果表明: 该法线性范围宽, 在 $0.05 \mu\text{g/L} \sim 50 \mu\text{g/L}$ 浓度范围内线性良好, 相关系数大于 0.9999; 仪器检出限为 $0.01 \mu\text{g/L}$, 定量限为 $0.03 \mu\text{g/L}$ 。0.2 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 和 5 $\mu\text{g/L}$ 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 0.03 ~ 0.12% 和 0.18 ~ 1.14% 之间, 仪器精密度良好; 牛奶样品和婴幼儿奶粉样品加标回收率分别为 83.8% 和 84.6%。本方法适合作为乳及乳制品中黄曲霉毒素 M1 的快速分析方法。

LC-30A 测定粮食中赭曲霉毒素 A 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 测定粮食中赭曲霉毒素 A 的方法。实验结果表明：在浓度范围 0.5 $\mu\text{g/L}$ ~ 50 $\mu\text{g/L}$ 内，校准曲线相关系数大于 0.9999；进样量 2 μL ，仪器检出限为 0.15 $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。三个浓度下标准品的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03 ~ 0.31%和 0.41 ~ 1.91%之间；玉米样品平均加标回收率为 88.3% ~ 96.7%。该方法简便快速，且易操作。

关键词：赭曲霉毒素 A 粮食 超高效液相色谱

赭曲霉毒素（Ochratoxins）是一组结构类似的真菌毒素，有 A、B、C、D 4 种化合物，主要危及人和动物肾脏，其中毒性最大、与人类健康关系最密切、产毒量最高、对农作物的污染最重、分布最广的是赭曲霉毒素 A（Ochratoxin A，OTA，CAS No.303-47-9）。赭曲霉毒素 A 是被国际癌症研究机构确定为 II B 类致癌物的一种真菌毒素，它能致癌、致畸、破坏免疫系统，对肝、肾脏造成损害，还可导致神经中毒。赭曲霉毒素 A 首先在玉米中发现以后又相继从谷物和大豆中检出。我国食品安全国家标准《GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定谷物及豆类制品中赭曲霉毒素 A 限量为 5 $\mu\text{g/kg}$ 。

目前报道用于检测赭曲霉毒素 A 的分析方法有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附法和荧光比色法等。

本文参照 GB/T 5009.96-2003，采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A，分析了玉米中的赭曲霉毒素 A，得到了令人满意的分析结果。

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-20A 系统控制器，LabSolutions Ver. 5.42 SP3 色谱工作站。

1.2 试剂

1.2.2 磷酸盐缓冲液（PBS）：将 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾溶解于 990 mL 水中，用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.0，最后定容为 1 L。

装于具塞棕色瓶中，室温避光处可以储藏 1 周。

1.3 分析条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODS II 3.0 mmI.D.×75 mmL., 2.2 μm

流动相：A—2%乙酸水溶液；B—乙腈（60:40，v/v）

流速：1.0 mL/min

进样体积：2 μL 柱温：40℃

检测波长：Ex = 333 nm，Em = 460 nm

洗脱方式：等度洗脱

1.4 样品制备

1.4.1 标准溶液配制: 用甲醇配置赭曲霉毒素 A 标准工作溶液, 浓度为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、2 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 。

1.4.2 样品前处理方法:

①提取: 准确称取试样 50.0 g 于搅拌杯中, 加入 5.0 g 氯化钠, 100 mL 甲醇/水 (80/20, v/v)。将搅拌杯置于均质器上, 于 22000 r/min 高速搅拌提取 2 min。提取液经折叠快速定性滤纸过滤于干净的烧杯中。准确移取 10.0 mL 滤液并加入 40.0 mL PBS 缓冲液稀释, 混合均匀, 经玻璃纤维滤纸过滤得到样品提取液。

②净化: 将免疫亲和柱连接于 10 mL 玻璃注射器下。准确移取 10.0 mL 样品提取液于玻璃注射器中, 将空气压力泵与玻璃注射器相连接, 调节压力使溶液以约 1~2 滴/秒流速缓慢通过免疫亲和柱, 直至 2 mL~3 mL 空气通过免疫亲和柱。以 10 mL PBS 缓冲液、10 mL 水先后淋洗免疫亲和柱, 弃去全部流出液, 并使 2 mL~3 mL 空气通过免疫亲和柱。准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱, 流速为 1 mL/min~2 mL/min。收集全部洗脱液于玻璃试管中, 过 0.22 μm 滤膜, 供液相色谱测定。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

5 $\mu\text{g/L}$ 的标准样品色谱图如图1所示。保留时间为 4.656 min。

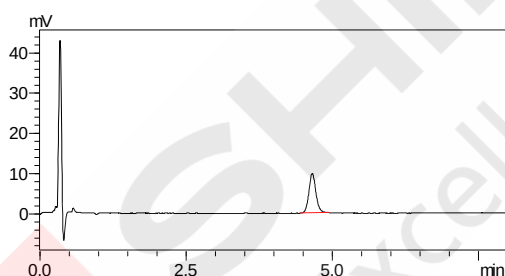


图1 赭曲霉毒素 A 标准样品色谱图

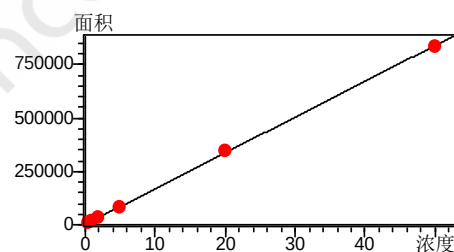


图2 赭曲霉毒素A的标准工作曲线

2.2 线性关系

将 6 个不同浓度的赭曲霉毒素 A 标准工作溶液, 按前述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, 得线性方程为: $Y=16794.1X+224.25$, 相关系数可达 0.9999。

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 (0.5 $\mu\text{g/L}$) 计算仪器的灵敏度, 仪器检测限 (3 倍噪声计算)、定量限 (10 倍噪声计算) 分别为 0.15 $\mu\text{g/L}$ 和 0.5 $\mu\text{g/L}$ 。色谱图如图 3 所示。

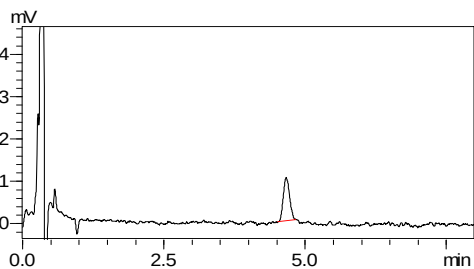


图 3 标准溶液的色谱图

表 1 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度 (μg/L)	R.T. (RSD%)	Area (RSD%)
0.5	0.31	1.91
5	0.04	1.01
20	0.03	0.41

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 0.03 ~ 0.31% 和 0.41 ~ 1.91% 之间，仪器精密度良好，结果见表 1。

2.5 基质加标实验

按照上述方法处理玉米样品，上机测试，检出赭曲霉毒素 A。在玉米样品中添加标样，平行 5 次。玉米样品色谱图如图 4 所示。玉米样品加标色谱图如图 5 所示。基质加标回收结果如表 2 所示。

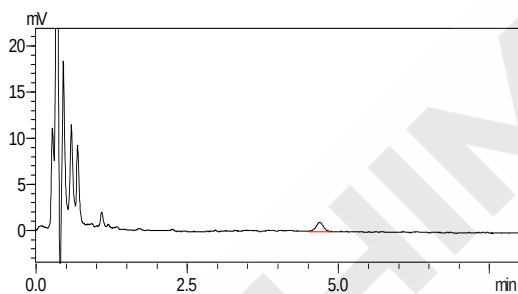


图 4 玉米空白样品的色谱图

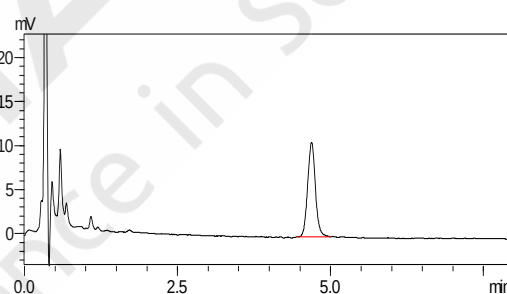


图 5 玉米加标样品的色谱图 (添加浓度为 5 μg/kg)

表 2 基质加标回收结果

添加浓度 级别	加标量 (μg/kg)	玉米空白含量 (μg/kg)	平均回收率 (%)
1	2	0.5	96.7
2	5	0.5	88.3
3	10	0.5	92.4

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中赭曲霉毒素 A 的方法。实验结果表明：方法的灵敏度、重复性及线性均良好，可以满足对此种毒素的分析要求。

LC-30A 柱前衍生法测定粮食中伏马毒素的含量

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中伏马毒素的方法。实验结果表明: B1、B2 在浓度范围 0.125 $\mu\text{g/mL}$ ~ 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 之间时, 曲线相关系数均大于 0.999; 进样量 2 μL , 仪器检出限分别为 0.02 和 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 仪器定量限为 0.06 和 0.03 $\mu\text{g/mL}$; 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 0.048 ~ 0.085% 和 1.332 ~ 1.798% 之间; 玉米样品平均加标回收率为 78.4% ~ 87.5%。该方法简便快速, 且易操作。

关键词: 伏马毒素 粮食 超高效液相色谱 柱前衍生

伏马毒素 (Fumonisin, FB) 是一种霉菌毒素, 是由串珠镰刀菌产生的水溶性代谢产物, 对热稳定, 不易被蒸煮破坏, 在多数粮食加工处理过程均比较稳定。粮食在加工、贮存、运输过程中均易产生此种毒素。有报道指出, 伏马毒素对人、畜不仅是一种促癌物, 而且完全是一种致癌物。动物试验和流行病学资料已表明, 伏马毒素主要损害肝肾功能, 能引起马脑白质软化症和猪肺水肿等, 并与我国和南非部分地区高发的食道癌有关, 现已引起世界范围的广泛注意。我国食品安全国家标准《GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量》中还没有规定粮食中伏马毒素的限量。但美国 FDA 规定的人类食用玉米中伏马毒素最高限量为 2mg/kg 可以作为粮食安全标准的参考。

伏马毒素的检测先后使用过薄层色谱法、气相色谱法、酶联免疫法、高效液相色谱法等, 目前研究和应用得最多的是利用免疫亲和柱净化后衍生并用荧光检测器检测的高效液相色谱法。

本文采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A, 柱前衍生法分析了玉米中的伏马毒素 B1 和 B2, 得到了令人满意的分析结果。

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-20A 系统控制器, LabSolutions Ver. 5.42 SP3 色谱工作站。

1.2 试剂

1.2.1 提取剂: 取 25 mL 甲醇加入 25 mL 乙腈和 50 mL 水。

1.2.2 磷酸盐缓冲液 (PBS): 将 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾溶解于 990 mL 水中, 用 2 mol/L 盐酸溶液调节 pH 值为 7.0, 最后定容为 1 L。

1.2.3 OPA 衍生液: 将 40 mg OPA 溶解在 1 mL 甲醇中, 用 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 溶液 5 mL 稀释。加 2-巯基乙醇 (MCE) 50 μL , 混匀。装于具塞棕色瓶中, 室温避光处可以储藏 1 周。

1.3 分析条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS II 3.0 mm I.D. $\times$ 75 mm L., 2.2 μm

流动相: A—0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液; B—甲醇; A/B = 72/28 (v/v) (pH = 3.5)

流速：1.0 mL/min

进样体积：2 μ L 柱温：40 $^{\circ}$ C

检测波长：Ex = 335 nm, Em = 440 nm

洗脱方式：等度洗脱

1.4 样品制备

1.4.1 标准溶液配制：B1、B2 经乙腈/水（1/1，v/v）稀释成 0.125、0.25、0.5、1.0、2.5 μ g/mL 标准溶液浓度系列。

1.4.2 样品前处理方法：

①提取：称取 20 g 粉碎试样，置于 250 mL 的离心管中，加 50 mL 提取液，在振荡器上水平振荡 20 min。在离心力为 2500 g 条件下离心 10 min，用滤纸过滤上清液，在离心管的残渣中再加 50 mL 提取液，以上述方式提取离心后，仍用上次的滤纸过滤，合并两次滤液。混合均匀后，量取 10 mL 滤液置于 100 mL 的烧杯中，加 40 mL PBS 缓冲液，混匀。用玻璃微纤维滤纸过滤，取 10 mL 滤液用于免疫亲和柱净化。

②净化：将免疫亲和柱与 10 mL 玻璃注射器下端连接。准确移取 10 mL 上述滤液于玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器上端连接，调节压力使滤液以约 1~2 滴/秒的流速通过亲和柱，弃掉流出液。用上述方式，再以 10 mL PBS 缓冲液清洗亲和柱，直至液体完全流出，空气通过，弃掉全部流出液。最后加入 1.5 mL 甲醇将亲和柱中的伏马毒素洗脱，控制流速为 1 mL/min ~ 2 mL/min，收集全部洗脱液于玻璃试管中，在 60 $^{\circ}$ C 下用氮吹仪以氮气吹干，残留物置于 4 $^{\circ}$ C 下存放，备用。测定前用 400 μ L 乙腈/水（1/1，v/v）溶解残留物，过 0.22 μ m 滤膜，此为供高效液相色谱测定用样品净化液。

③衍生：分别取上述净化液和标准工作溶液各 50 μ L，分别置于 1 mL 的各个试管中，各加入 50 μ L OPA 衍生液，涡流混合器上混合 30 s，静置 3 min 后，立即取 2 μ L 衍生液进超高效液相色谱仪分析。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

浓度为 2.5 μ g/mL 标准样品色谱图如图1所示。B1和B2的保留时间分别为 2.456 min 和 6.927 min。

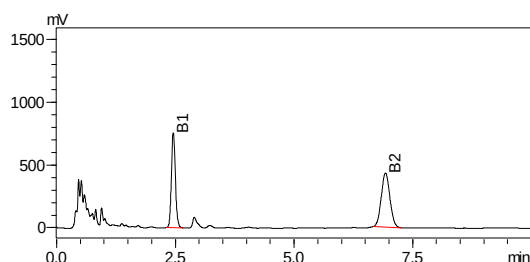


图 1 伏马毒素 B₁、B₂ 标准样品色谱图

2.2 线性关系

将 5 个不同浓度的伏马毒素标准工作溶液，按前述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 所示。标准曲线方程和相关系数结果见表 1。

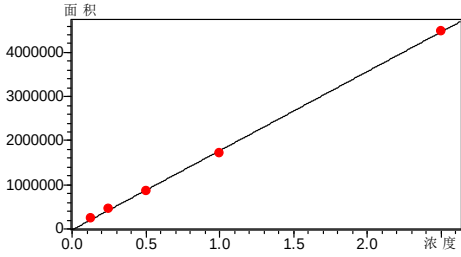


图 2 伏马毒素 B1 的标准工作曲线

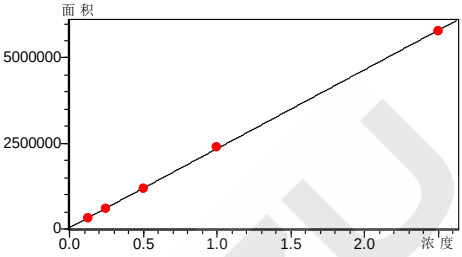


图 3 伏马毒素 B2 的标准工作曲线

表 1 标准曲线方程、检出限和定量限

组分	$Y=aX+b$	R	检出限 (μg/mL)	定量限 (μg/mL)
B1	$Y=182437X-3393$	0.9995	0.02	0.06
B2	$Y=232351X-2991$	0.9999	0.01	0.03

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 (0.125 μg/mL) 计算仪器的灵敏度，仪器检测限 (3 倍噪声计算)、定量限 (10 倍噪声计算)，结果见表 1。色谱图如图 4 所示。

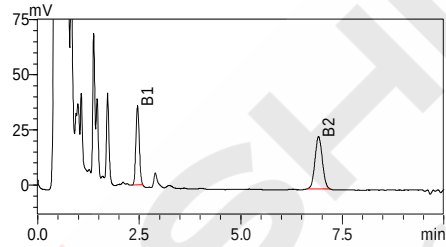


图 4 标准溶液的色谱图

表 2 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度 (μg/mL)	组分	R.T (RSD%)	Area (RSD%)
0.2	B1	0.079	1.765
	B2	0.064	1.337
1.0	B1	0.085	1.558
	B2	0.072	1.332
2.0	B1	0.048	1.652
	B2	0.064	1.798

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 0.048 ~ 0.085% 和 1.332 ~ 1.798% 之间，仪器精密度良好，见表 2。

2.5 基质加标实验

按照上述方法处理玉米样品，上机测试，检出了伏马毒素 B1，浓度为 0.04 mg/kg。在玉米样品中添加标样，平行 5 次。玉米样品色谱图如图 5 所示。玉米样品加标色谱图如图 6 所示。基质加标回收结果如表 3 所示。

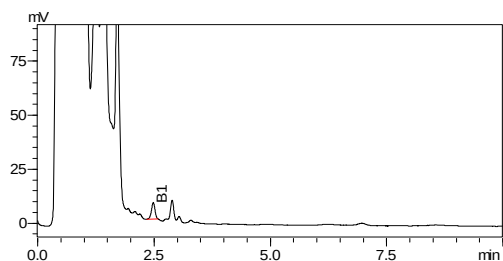


图 5 玉米空白样品的色谱图

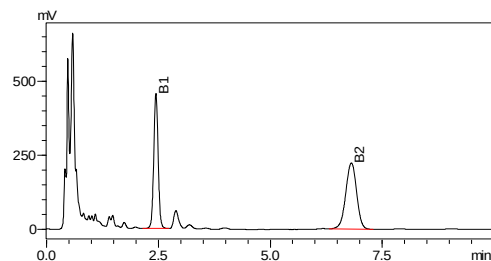


图6 玉米加标样品的色谱图（添加浓度为2.0 mg/kg）

表 3 基质加标回收结果

添加浓度级别	组分	加标量 (mg/kg)	平均回收率 (%)
1	B1	0.2	87.0
	B2	0.2	82.7
2	B1	1.0	84.6
	B2	1.0	78.4
3	B1	2.0	87.5
	B2	2.0	81.7

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定粮食中伏马毒素的方法。实验结果表明：方法的灵敏度、重复性及线性均良好，可以满足对此种毒素的分析要求。

LC-30A 快速测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量

摘要: 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 快速测定粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的方法。玉米样品磨碎、过筛后用水匀浆提取,提取液经过免疫亲和柱净化,超高效液相色谱 LC-30A 紫外检测器检测。实验结果表明:线性范围 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~ 10 $\mu\text{g/mL}$,相关系数为 0.9999;标准样品的仪器检出限为 0.016 $\mu\text{g/mL}$,仪器定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$; 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 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 0.041 ~ 0.043% 和 0.11 ~ 1.57% 之间;玉米样品三个浓度加标回收率在 81.2 ~ 90.0% 之间。该方法简便快速,且易操作。

关键词: 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 粮食 超高效液相色谱 免疫亲和层析净化

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(呕吐毒素, DON, CAS 号 51481-10-8),可引起猪的呕吐,故得名。呕吐毒素是食品中常见的真菌毒素,主要由镰刀菌产生,在自然界中广泛存在,主要污染玉米、小麦等谷类作物。人摄入了被 DON 污染的食物后,会导致厌食、呕吐、腹泻、发烧、站立不稳、反应迟钝等急性中毒症状,严重时损害造血系统造成死亡。欧盟分类标准为三级致癌物。欧盟要求呕吐毒素含量应小于 1.0 mg/kg。我国食品安全国家标准《GB 2761-2011 食品中真菌毒素限量》中规定玉米等谷物及其制品中呕吐毒素限量为 1.0

mg/kg。

免疫亲和柱能特效性地、高选择性地吸附呕吐毒素,而让其它杂质通过柱子,使样品得以纯化。吸附后的呕吐毒素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。

本文参考《粮油检验粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定超高效液相色谱法》标准征求意见稿中的要求,采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A,免疫亲和柱净化法分析了玉米中的呕吐毒素,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-20A5 在线脱气机, SIL-30AC 自动进样器, CTO-30A 柱温箱, SPD-20A 紫外检测器, CBM-20A lite 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. $\times$ 50 mm L., 1.6 μm
流动相: 乙腈/水 (10/90, v/v)
流速: 0.2 mL/min

进样体积: 2 μL
柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$
检测波长: 218 nm

1.3 样品制备

①标准溶液配制：用甲醇配制 100 $\mu\text{g/mL}$ 的呕吐毒素标准储备液。以流动相将标准储备液稀释成 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 等 8 个不同浓度的标准工作溶液。

②样品前处理方法：将玉米样品研磨并过筛（1 mm 孔径），称取 25 g 于锥形瓶中，加入 5 g 聚乙二醇，加入 100 mL 超纯水，高速匀浆 2 min。玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清。将免疫亲和柱连接于注射器下，准确移取 2 mL 滤液至注射器中，以 1 滴每秒的流速过柱，至空气进入柱中。用 5 mL 水以 1 滴每秒的流速淋洗免疫亲和柱，使约 2~3 mL 空气进入柱中。准确加入 1 mL 的甲醇，以 1 滴每秒的流速洗脱，洗脱液氮吹至干，用 0.5 mL 流动相涡旋溶解，经 0.22 μm 针式滤器过滤后进样。

2. 实验结果

2.1 标准样品的色谱图

标准样品的色谱如图 1 所示。

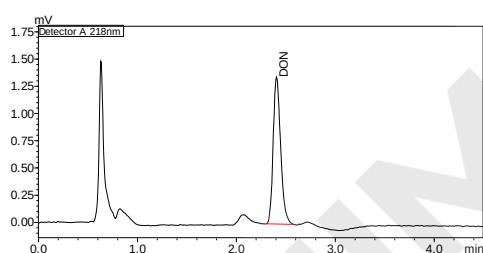


图 1 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的色谱图

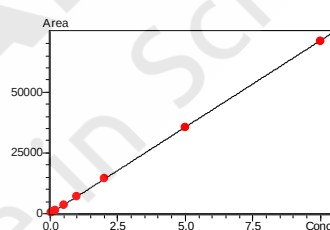


图 2 呕吐毒素的标准工作曲线

2.2 线性关系

将 8 个不同浓度的呕吐毒素标准工作溶液，按 1.2 中的分析条件测定。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，外标法制作校准曲线，结果见图 2。线性方程为 $Y = (7120.0)X + (-11.402)$ 、线性范围 0.05 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ ，相关系数大于 0.9999，线性关系良好。

2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 计算仪器的灵敏度，通过 LabSolutions 软件按照 ASTM 规则，选取基线为 1.45 ~ 1.95 min 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）。则仪器信噪比为 10.87、检出限为 0.016 $\mu\text{g/mL}$ ，定量限为 0.050 $\mu\text{g/mL}$ 。0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的标样色谱图如下。

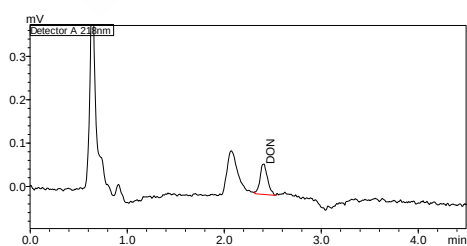


图 3 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的色谱图

表 1 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度 (mg/L)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
0.2	0.043	1.57
1.0	0.042	0.50
5.0	0.041	0.11

2.4 精密度实验

取标准工作液中 0.2 mg/L、1 mg/L 和 5 mg/L 三个浓度，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 0.041 ~ 0.043%和 0.11 ~ 1.57%之间，仪器精密度良好。

2.5 加标回收实验

按照 1.3 所述方法处理空白样品（除不加玉米外，其他步骤和实际样品的处理相同）和玉米样品，上机测试，玉米样品检出呕吐毒素。空白样品色谱图如图 4 所示。玉米样品色谱图如图 5 所示。玉米加标样品色谱图如图 6、图 7、图 8 所示。加标回收实验结果如表 2 所示。

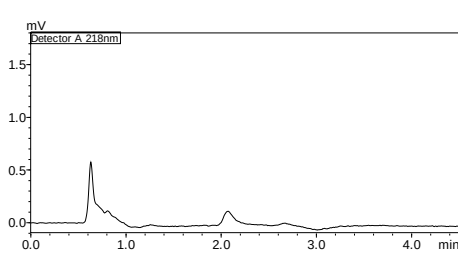


图 4 全程序空白色谱图

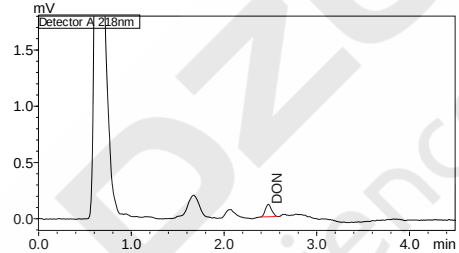


图 5 玉米样品色谱图

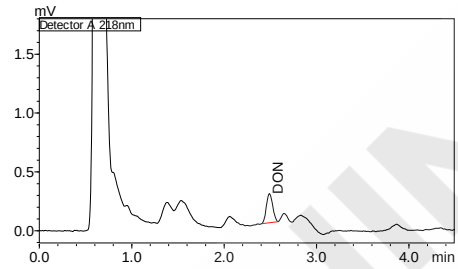


图 6 玉米加标样品色谱图（0.1 mg/kg）

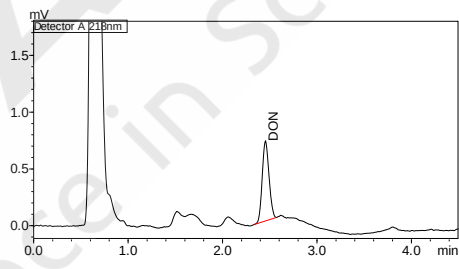


图 7 玉米加标样品色谱图（0.5 mg/kg）

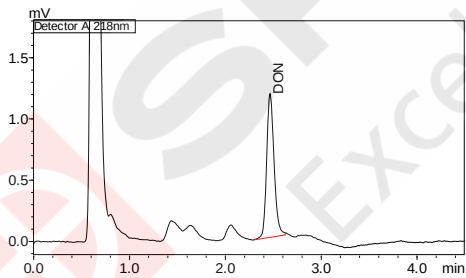


图 8 玉米加标样品的色谱图（1 mg/kg）

表 2 加标回收结果

样品含量 (mg/kg)	加标量 (mg/kg)	实测值 (mg/kg)	回收率 (%)
0.075	0.1	0.165	90.0
	0.5	0.499	84.8
	1.0	0.887	81.2

3. 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 快速测定粮食中呕吐毒素的方法。实验结果表明：该法线性范围宽，在 0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内线性良好，相关系数为 0.9999；标准样品的仪器检出限为 0.016 $\mu\text{g/mL}$ ，仪器定量限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 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 0.041 ~ 0.043%和 0.11 ~ 1.57%之间，仪器精密度良好；玉米样品三个浓度加标回收率在 81.2 ~ 90.0%之间。本方法适合作为粮食及粮食制品中呕吐毒素的快速分析方法。

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 μ m 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.×250 mmL., 5 μ m

柱温：40℃

进样体积：20 μ L

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℃

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。

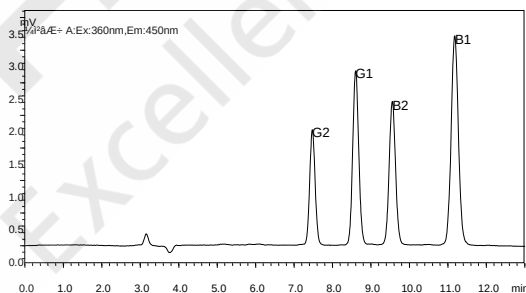


图 1. 混标溶液色谱图 (G2: 0.006 μ g/mL; G1: 0.020 μ g/mL; B2: 0.006 μ g/mL; B1: 0.020 μ g/mL)

以 B1、G1 浓度分别为 0.010、0.020、0.030、0.040、0.050 μ g/mL; B2、G2 浓度分别为 0.003、0.006、0.009、0.012、0.015 μ 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。

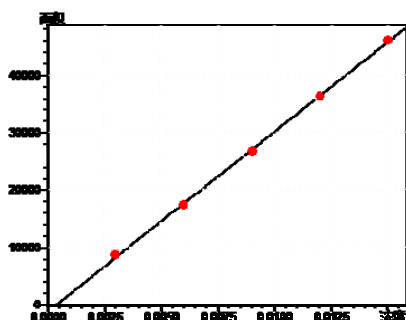


图 2. 黄曲霉毒素 G2 的校准曲线

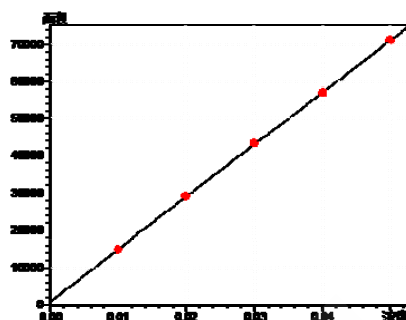


图 3. 黄曲霉毒素 G1 的校准曲线

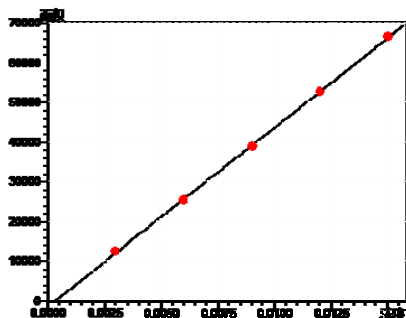


图 4. 黄曲霉毒素 B2 的校准曲线

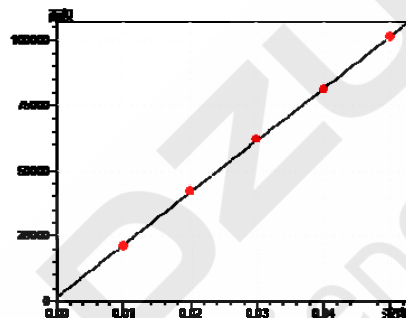


图 5. 黄曲霉毒素 B1 的校准曲线

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。

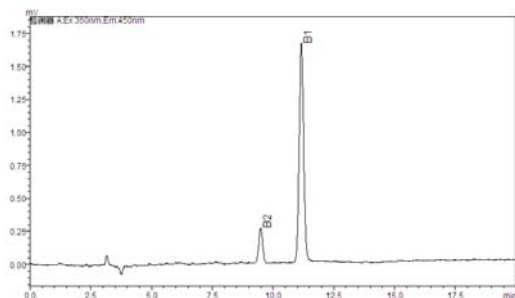


图 6. 市售果仁样品的色谱图

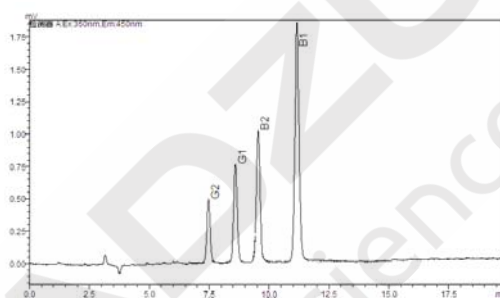


图 7. 碘衍生样品加标色谱图

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。

高效液相色谱碘柱后衍生法测定中药材酸枣仁中的黄曲霉毒素 G2,G1,B2,B1 的含量

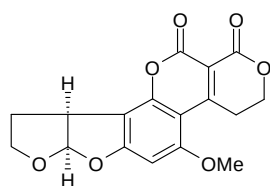
摘要: 本文使用岛津 LC-20A 液相色谱仪柱后衍生系统建立了碘柱后衍生荧光检测法测定中药材酸枣仁中黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 的方法。本方法采用 C18 色谱柱, 水/甲醇=47/53 (v/v) 为流动相, 0.05%碘溶液为碘柱后衍生试剂, 荧光检测器的检测波长为激发波长: 360 nm, 发射波长: 450 nm。G2、B2 在 0.006 ~ 1.50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内标准曲线的线性相关系数 $r=0.9999$, 线性关系良好。G1、B1 在 0.20 ~ 5.00 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内标准曲线的线性相关系数 $r=0.9999$, 线性关系良好。对 G2, B2 浓度为 0.3 $\mu\text{g/L}$, G1,B1 浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 的六个平行标准品进行分析, 重复性结果 (RSD%表示): G2 的保留时间 RSD 为 0.02%, 峰面积 RSD 为 0.60%; G1 的保留时间 RSD 为 0.02%, 峰面积 RSD 为 0.60%; B2 的保留时间 RSD 为 0.04%, 峰面积 RSD 为 0.60; B1 的保留时间 RSD 为 0.03%, 峰面积 RSD 为 0.60%, 结果的重复性良好。仪器检出限为 G2: 0.002 $\mu\text{g/kg}$; G1: 0.001 $\mu\text{g/kg}$; B2: 0.002 $\mu\text{g/kg}$; B1: 0.001 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 G2: 0.008 $\mu\text{g/kg}$; G1: 0.004 $\mu\text{g/kg}$; B2: 0.006 $\mu\text{g/kg}$; B1: 0.003 $\mu\text{g/kg}$, 具有较高的检测灵敏度。

关键词: 酸枣仁 黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 碘柱后衍生

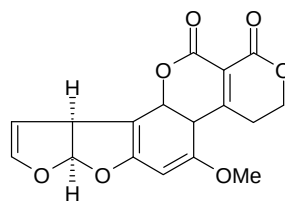
黄曲霉毒素被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 1 类致癌物, 是一种毒性极强的剧毒物质。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用, 严重时可导致肝癌甚至死亡。在天然污染的食品和中药材中以黄曲霉毒素 B1 最为多见, 其毒性和致癌性也最强。B1 是最危险的致癌物。它们在紫外线照射下能产生荧光, 根据荧光颜色不同, 将其分为 B 族和 G 族两大类及其衍生物, 黄曲霉毒素的主要分子型式含 G2, G1, B2, B1 等。B1 为毒性及致癌性最强的物质。

美国在 FDA “遵守政策指南 (Compliance Policy Guide)” 委员会决定 2007/563/EC 中对黄曲霉毒素在食品、牛奶、花生及其制品、坚果 (包括巴西坚果、阿月浑子果仁) 中的限量作出规定: 人类消费食品和奶牛饲料中的黄曲霉毒素含量 (指 G2+G1+B2+B1 的总量) 不能超过 20 $\mu\text{g/kg}$ 。日本在肯定列表制度中规定: 食品中黄曲霉毒素的限量是 10 $\mu\text{g/kg}$ 。欧盟在委员会条例 (EC) No 629/2008、(EC) No 1881/2006 中, 对黄曲霉毒素在花生、谷类、坚果等食品中的限量作出明确规定: 黄曲霉毒素含量 (指 G2+G1+B2+B1 的总量) 不能超过 4 $\mu\text{g/kg}$ 。我国 2010 版中国药典质量标准中规定每 1000 g 含黄曲霉毒素 B1 不得过 5 μg , 含黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 B2 和黄曲霉毒素 B1 的总量不得过 10 μg 。

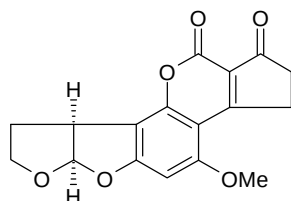
本实验应用岛津高效液相色谱 LC-20A 柱后衍生系统建立了一种对黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 的碘柱后衍生荧光检测方法, 并应用于酸枣仁样品的分析。



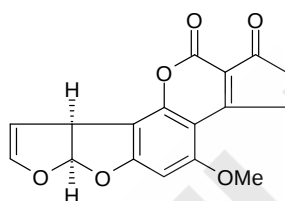
黄曲霉毒素 G2 的化学结构式



黄曲霉毒素 G1 的化学结构式



黄曲霉毒素 B2 的化学结构式



黄曲霉毒素 B1 的化学结构式

1. 实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂:

甲醇: HPLC 级

水: 超纯水。

黄曲霉毒素混标储备液: 精密量取黄曲霉毒素混合标准品 (黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 标示浓度分别为 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 作为储备液。

1.1.2 仪器: LC-20A, 包括 CBM-20A 系统控制器, LC-20AD 高精度溶液输送泵 $\times 3$, DGU-20A5 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CRB-6A 柱后衍生反应箱, RF-20A 荧光检测器。

1.2 分析条件

色谱柱:

Intersil ODS-3 4.6 mm I.D. $\times$ 250 mm L., 5 μm

流动相: A—水, B—甲醇, A/B=47/53 (v/v);

流速: 1.0 mL/min;

洗脱方式: 等度洗脱

柱后衍生条件:

衍生试剂: 0.05%碘溶液 (取0.5 g, 加入100 mL甲醇, 超纯水定容至1000 mL)

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;

荧光检测波长: 激发波长Ex = 350 nm,

发射波长Em = 450 nm;

进样量: 25 μL 。

流速: 0.3 mL/min

衍生化温度: 70 $^{\circ}\text{C}$

1.3 样品处理

1.3.1 黄曲霉毒素混合标准品的配制

取不同量的黄曲霉毒素储备液, 用甲醇稀释, 配制成浓度为 G2, B2 浓度为 0.006, 0.012, 0.30, 0.60 及 1.50 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列; G1, B1 浓度为 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准系

列，储存在棕色小瓶中，于 4℃冰箱中存放。

1.3.2 试样的制备

取供试品粉末约 10 g，精密称定，加入氯化钠 2 g，精密加入 70%甲醇溶液 100 mL，超声处理 20 分钟，离心 5 分钟（离心速度 8000 转/分），精密量取上清液 10 mL，置 50 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀。精密量取 25 mL，通过免疫亲和柱，流速每分钟 2~3 mL，用水 5 mL 淋洗，洗液弃去，使空气进入柱子，再用甲醇 1.4 mL 分 2 次洗脱，收集洗脱液，用水定容至 2 mL，即得。

2. 结果与讨论

2.1 黄曲霉毒素标准谱图及标准曲线

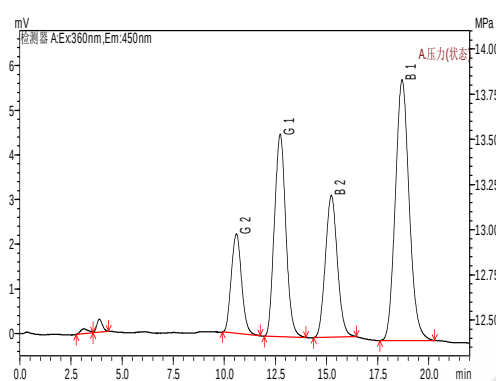


图1 黄曲霉毒素混合标准品 10.0 µg/L 的色谱图

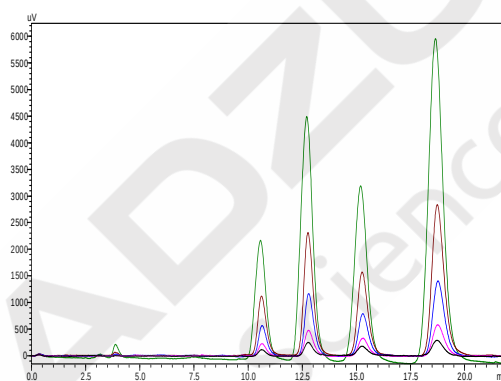


图2 五个不同浓度的黄曲霉毒素混标的色谱图

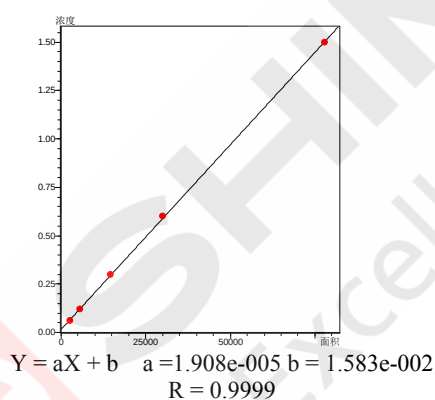


图3 G2标准校准曲线

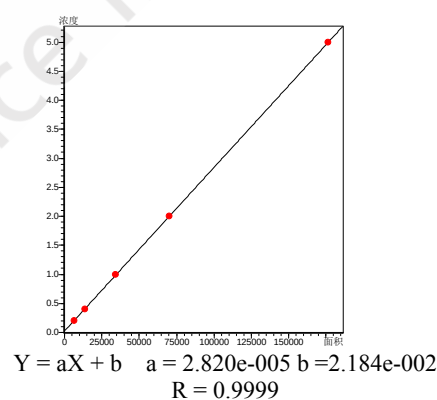


图4 G1标准校准曲线

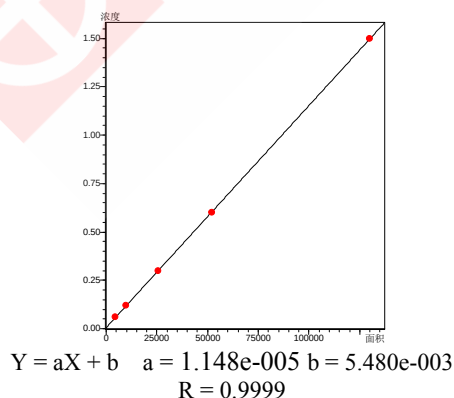


图5 B2标准校准曲线

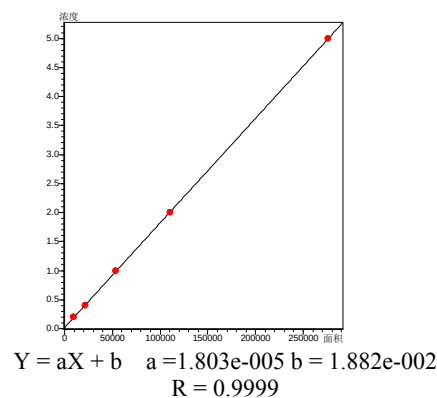


图6 B1标准校准曲线

2.2 方法的重复性

为了进一步考察该方法的重复性,本文分别对G2、B2浓度为0.60 $\mu\text{g/L}$, G1、B1浓度为2.0 $\mu\text{g/L}$ 的黄曲霉毒素混合标准样品进行了6次重复实验,重复性结果(RSD%表示): G2的保留时间RSD为0.02%,峰面积RSD为0.60%, G1的保留时间RSD为0.02%,峰面积RSD为0.60%, B2的保留时间RSD为0.04%,峰面积RSD为0.60%, B1的保留时间RSD为0.03%,峰面积RSD为0.60%,结果汇总如下表。

表1 黄曲霉毒素标准溶液的保留时间和峰面积的重复性结果
(G2: 0.6 $\mu\text{g/L}$; G1: 2.0 $\mu\text{g/L}$; B2: 0.6 $\mu\text{g/L}$; B1: 2.0 $\mu\text{g/L}$)

No.	保留时间 (min)				峰面积			
化合物	G2	G1	B2	B1	G2	G1	B2	B1
数据 1	10.614	12.761	15.255	18.732	30284	70179	51895	113102
数据 2	10.619	12.764	15.266	18.737	29966	70407	52588	111836
数据 3	10.619	12.765	15.268	18.737	30108	70796	52671	112187
数据 4	10.614	12.759	15.255	18.724	30457	70247	52853	111267
数据 5	10.615	12.762	15.261	18.735	30333	70772	52684	112924
数据 6	10.615	12.761	15.251	18.723	30361	71544	52936	112004
平均	10.616	12.762	15.259	18.731	30252	70658	52605	112220
RSD%	0.02	0.02	0.04	0.03	0.60	0.60	0.60	0.60

2.3 基质加标实验

按照1.3.2所述步骤处理酸枣仁样品,检测出黄曲霉毒素G1、G2、B1和B2。

图7为酸枣仁样品色谱图。图8为G1、B1加标0.75 $\mu\text{g/L}$, G2、B2加标2.5 $\mu\text{g/L}$ 色谱图。得出结果见表2。

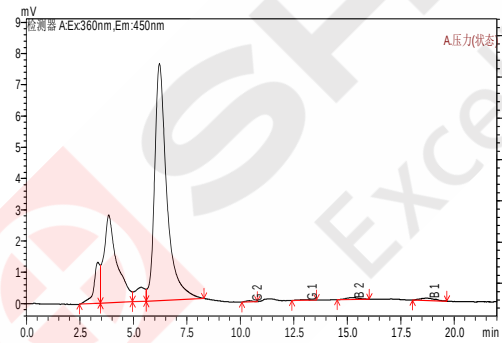


图7 酸枣仁样品色谱图

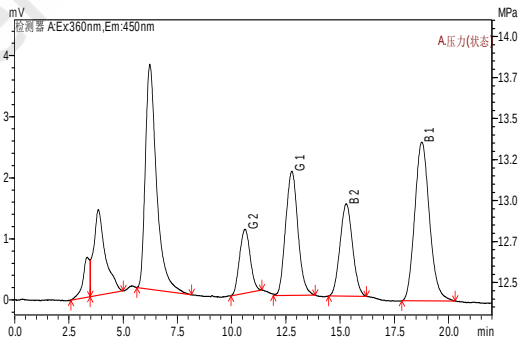


图8 酸枣仁样品加标图

表2 酸枣仁样品加标回收率表

化合物	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加标量 ($\mu\text{g/L}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 (%)
G2	0.032	0.75	0.747	95.33
G1	0.043	2.5	2.435	95.68
B2	0.046	0.75	0.714	89.07
B1	0.084	2.5	2.430	93.84

为考察方法的灵敏度,对浓度为0.06 $\mu\text{g/L}$ 的标准品进行分析,得到色谱图如图9所示,此时信噪比为G2: 15.852, G1: 33.062, B2: 21.457, B1: 38.481。经计算得到此分析方法的检出限,定量限见表3。

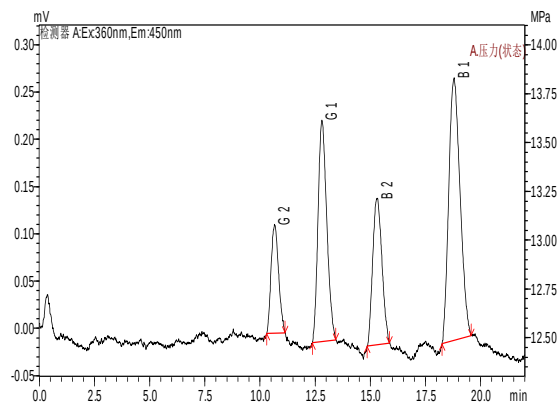


图9 浓度为0.06 $\mu\text{g/L}$ 标准品的色谱图

表 3 黄曲霉毒素仪器检出限和定量限

化合物	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
G2	0.011	0.038	0.002	0.008
G1	0.005	0.018	0.001	0.004
B2	0.008	0.028	0.002	0.006
B1	0.004	0.015	0.001	0.003

4. 结论

本实验中使用 LC-20A 柱后衍生系统, 开发了中药材酸枣仁中黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 的碘柱后衍生检测方法。本法具有快速, 线性、重复性好和灵敏度高等优点。

高效液相色谱碘柱后衍生法和光柱后衍生法检测中药材中的黄曲霉毒素

摘要: 采用液相色谱碘柱后衍生法和光柱后衍生法检测中药材中的黄曲霉毒素, 比较两者的线性、重复性、检测限、回收率, 并应用于实际样品柏子仁的分析。两者的线性、重复性、检测限、回收率均良好且相似, 均可用于中药材中黄曲霉毒素的检测。

关键词: 碘柱后衍生法 光柱后衍生法 黄曲霉毒素 中药材

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。我国对中药材霉菌的限量标准没有强制要求, 仅制定了黄曲霉毒素含量的非强制性限制标准, 我国外经贸部药用植物及制品进出口绿色通道标准 (WM/T 2-2004) 中黄曲霉毒素 B1 限量为 $\leq 5 \mu\text{g/kg}$ 。韩国中药材中黄曲霉毒素 B1 限量标准和试验方法中黄曲霉毒素 B1 限量为 $\leq 10 \mu\text{g/kg}$ 。

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。我国药典 2010 版一部附录 IX V 黄曲霉毒素测定法中采用碘柱后衍生法对中药材中的黄曲霉毒素进行检测。

本文同时采用碘衍生法和光衍生法检测中药材中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2, 并对分析结果进行比较。

1. 实验部分

1.1 仪器与试剂

1.1.1 液相色谱系统

LC-10ADvp (输液泵), DGU-14A (在线脱气机), FCV-10Avp (低压梯度单元), SIL-HTC (自动进样器), CTO-10Avp (柱温), RF-10AXL (荧光检测器), SCL-10Avp (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-10ADvp (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 0.5 mm I.D. $\times$ 1000 cm L.)

光化学柱后衍生装置, AURA 公司, 内置反应管 (PTFE 0.5 mm I.D. $\times$ 1500 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, Supelco 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: 取中药材粉末约 5 g (过二号筛, 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/v)

流速：0.8 mL/min

色谱柱：Intersil ODS-3 4.6mm I.D. $\times$ 250 mmL., 5 μm

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：50 μL

1.3.2 光衍生分析条件

流动相：乙腈/甲醇/水=25/25/50 (v/v/v)

流速：0.8 mL/min

色谱柱：Intersil ODS-3 4.6mm I.D. $\times$ 250 mmL., 5 μm

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，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 $^{\circ}\text{C}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

进样体积：50 μL

检测波长：Ex = 360 nm, Em = 440 nm

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，碘衍生和光衍生法所得图谱如下图 1、2 所示。

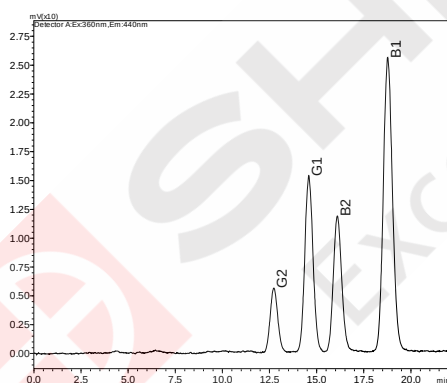


图 1. 碘衍生法混标溶液色谱图 (G2 : 1.5 ng/mL; G1 : 5.0 ng/mL; B2 : 1.5 ng/mL; B1 : 5.0 ng/mL)

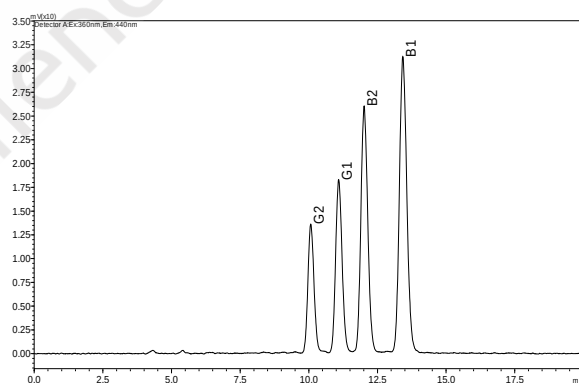


图 2. 光衍生法混标溶液色谱图 (G2 : 1.5 ng/mL; G1 : 5.0 ng/mL; B2 : 1.5 ng/mL; B1 : 5.0 ng/mL)

以 B1、G1 浓度分别为 0.20、0.50、1.0、2.0、5.0 ng/mL; B2、G2 浓度分别为 0.06、0.15、0.30、0.60、1.5 ng/mL 混标溶液，分别采用碘衍生和光衍生方法制作校准曲线，并进行比较，标准曲线图如图 3-图 6，标准曲线方程见表 1。

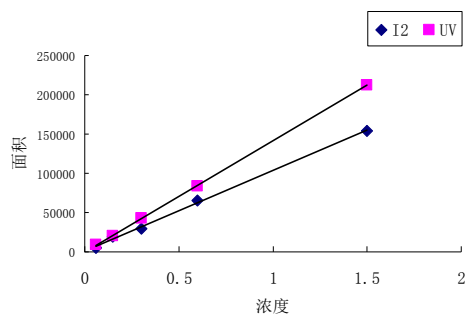


图 3. 黄曲霉素 G2 的校准曲线

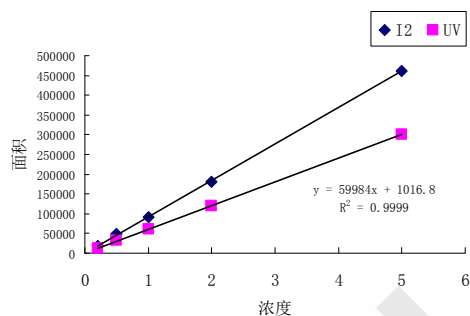


图 4. 黄曲霉素 G1 的校准曲线

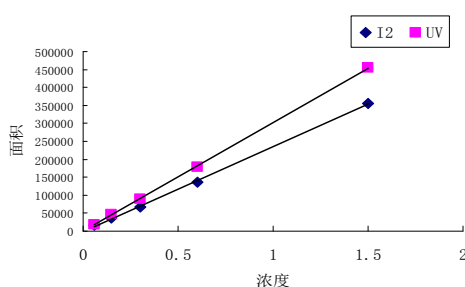


图 5. 黄曲霉素 B2 的校准曲线

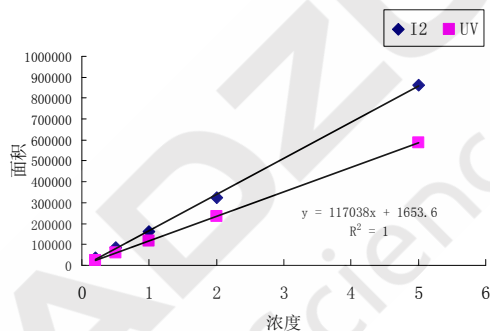


图 6. 黄曲霉素 B1 的校准曲线

表 1. 标准曲线方程

碘衍生法		
组分	$Y=AX+ B$	R
G2	$Y=98842X+405$	0.999
G1	$Y=90366X+728$	0.999
B2	$Y=215544X+2432$	0.999
B1	$Y=158510X+5598$	0.999
光衍生法		
组分	$Y=AX+ B$	R
G2	$Y=137928X+631$	0.999
G1	$Y=59694X+1251$	0.999
B2	$Y=299943X+318$	0.999
B1	$Y=116411X+2161$	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

光衍生法四种 AF 的检出限		
组分	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
G2	0.028	0.09
G1	0.065	0.21
B2	0.015	0.05
B1	0.041	0.14

碘衍生法四种 AF 的检出限		
G2	0.070	0.23
G1	0.093	0.31
B2	0.032	0.11
B1	0.052	0.17

2.2 重复性试验

连续进样（混合标样，G2：1.5 ng/mL；G1：5.0 ng/mL； B2：1.5 ng/mL；B1：5.0 ng/mL），分别采用碘衍生法和光衍生法进行分析，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 RSD% < 0.1%，峰面积 RSD% < 1.0%。

表 3. 重复性实验结果（n=3）

组分	碘衍生法		光衍生法	
	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
G2	0.04	0.66	0.04	0.51
G1	0.04	0.62	0.06	0.57
B2	0.07	0.39	0.06	0.20
B1	0.05	0.84	0.07	0.22

2.3 样品分析

按照 1.2 所述方法处理柏子仁样品，检出 B2、B1，样品色谱图见图 7、8，检测结果见表 4。

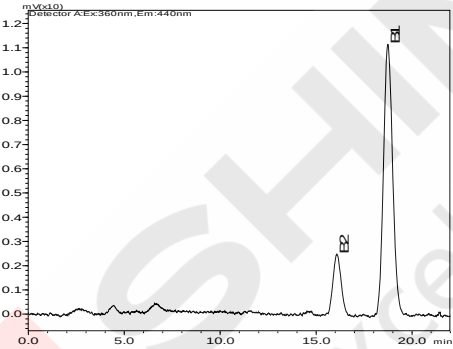


图 7. 碘衍生法样品色谱图

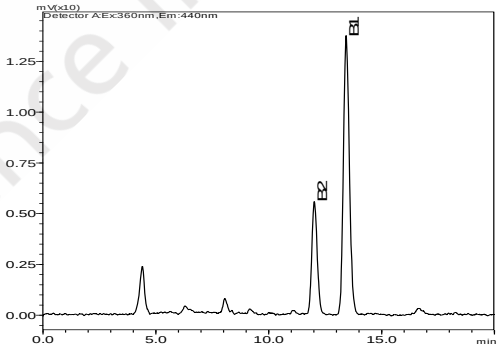


图 8. 光衍生法样品色谱图

表 4. 样品分析结果

组分	碘衍生		光衍生	
	浓度 (ng/mL)	含量 (μg/kg)	浓度 (ng/mL)	含量 (μg/kg)
G2	-	-	-	-
G1	-	-	-	-
B2	0.32	2.53	0.31	2.49
B1	2.21	17.67	2.15	17.18

2.4 回收率试验

按照上述方法处理空白黄芪样品，样品加标色谱图见图 9、10。样品加标回收率在 80.0% ~ 104.6%之间，回收率结果见表 5 和表 6。

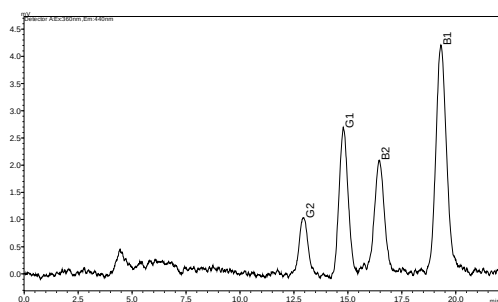


图 9. 碘衍生样品加标色谱图

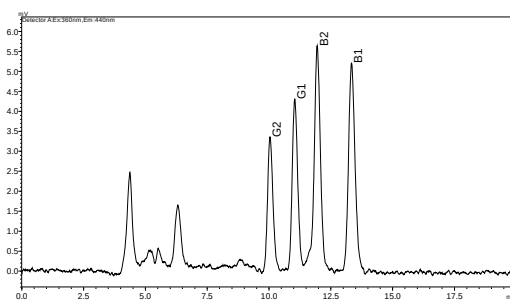


图 10. 光衍生样品加标色谱图

表 5. 碘衍生回收率结果

组分	加标量 (μg/kg)	回收率%
G2	3	104.6
G1	10	103.9
B2	3	90.0
B1	10	86.5

表 6. 光衍生回收率结果

组分	加标量 (μg/kg)	回收率%
G2	3	97.4
G1	10	93.2
B2	3	91.4
B1	10	80.0

3. 结论

本文分别采用液相色谱柱后碘衍生法和柱后光衍生法对中药材中的黄曲霉毒素进行检测。两者线性相关系数 R 为 0.999 以上，保留时间和峰面积重复性均良好，回收率在 80% ~ 104% 之间，且两者对阳性样品分析的结果一致。碘衍生法和光衍生法均可用于中药材中黄曲霉毒素的检测。



本公司三条工厂获得 ISO 认证

岛津企业管理（中国）有限公司 / 岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

北京

北京市朝阳区朝外大街 16 号中国人寿大厦 14F
 邮政编码：100020
 电话：(010) 8525-2310/2312
 传真：(010) 8525-2326/2329

上海

上海市淮海西路 570 号红坊 E 楼
 邮政编码：200052
 电话：(021) 2201-3888
 传真：(021) 2201-3555

沈阳

沈阳市和平区南京北街 161 号嘉润·东方香榭里大厦 C 座 14 层
 邮政编码：110001
 电话：(024) 2383-6735
 传真：(024) 2383-6378

四川

成都市锦江区创意产业商务区三色路 38 号博瑞创意成都 B 座 12 层
 邮政编码：610015
 电话：(028) 8619-8421/8422
 传真：(028) 8619-8420

武汉

武汉市汉口建设大道 568 号新世界国贸大厦 1 座 41 层 4116 室
 邮政编码：430022
 电话：(027) 8555-7910
 传真：(027) 8555-7920

广州

广州市流花路 109 号之 9 达宝广场 7 楼
 邮政编码：510010
 电话：(020) 8710-8603
 传真：(020) 8710-8698

西安

西安市南二环西段 88 号老三届世纪星大厦 24 层 G 座
 邮政编码：710065
 电话：(029) 8838-6016
 传真：(029) 8838-6497

乌鲁木齐

乌鲁木齐市中山路 339 号中泉广场 14 层 H 座
 邮政编码：830000
 电话：(0991) 230-6271/6272
 传真：(0991) 230-6273

昆明

昆明市青年路 432 号天恒大酒店 908 室
 邮政编码：650021
 电话：(0871) 315-2987
 传真：(0871) 315-2991

南京

南京市中山南路 49 号商茂世纪广场 23 层 A1 座
 邮政编码：210005
 电话：(025) 8689-0278
 传真：(025) 8689-0237

重庆

重庆市渝中区青年路 38 号重庆国贸中心 1702 室
 邮政编码：400010
 电话：(023) 6380-6057/6058
 传真：(023) 6380-6551

深圳

深圳市福田区福华一路 98 号卓越大厦 15 楼 1 号
 邮政编码：518040
 电话：(0755) 8340-2852
 传真：(0755) 8389-3100

河南

郑州市郑东新区金水东路 21 号永和国际广场 A 区 14 层 1405、1406 室
 邮政编码：450046
 电话：(0371) 8663-2981/2983
 传真：(0371) 8663-2982

香港

Suite 1028, Ocean Centre, Harbour City.
 Tsim Sha tsui, Kowloon, Hong-Kong
 电话：(00852) 2375-4979
 传真：(00852) 2199-7438

用户服务热线电话：800-8100439
 400-6500439

本产品样本所宣传的内容，以本版本为准
 样本中的试验数据除注明外为本公司的试验数据

日本总公司工厂已通过 ISO 质量·环境管理体系的认证

注：此样本所有信息仅供参考，如有变动恕不另行通知