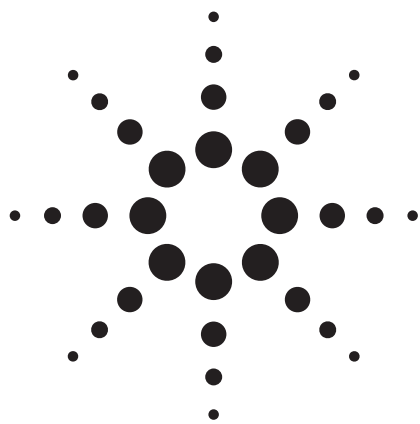




免疫亲和柱净化 — 柱后电化学衍生 — HPLC 法测定玉米及花生酱中的 4 种黄曲霉毒素 B1、 B2、G1 和 G2

应用

作者

杨新磊 安蓉
液相色谱产品工程师
生命科学与化学分析事业部
安捷伦科技
上海，中国

摘要

本文采用免疫亲和柱净化结合柱后电化学衍生-HPLC-荧光方法检测了玉米及花生酱中的 4 种黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2。样品提取后，先经免疫亲和柱净化、浓缩，再进入 HPLC 系统进行分离、定量。四种黄曲霉毒素在 0.1~10 $\mu\text{g/L}$ 内线性相关系数 $R^2 > 0.99998$ ，检出限（按 $S/N = 3$ 计算）为 0.004 ~ 0.007 $\mu\text{g/L}$ （相当于 0.008 ~ 0.014 $\mu\text{g/kg}$ 样品检出限）。以 10 $\mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素标准溶液为考察对象，连续 6 针进样，得出四种黄曲霉毒素的保留时间相对标准偏差 (RSD) $< 0.1\%$ ，峰面积 RSD $< 0.3\%$ 。实验证明，该方法可有效、准确地用于玉米及花生酱等样品中黄曲霉毒素的测定。

引言

黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物，广泛存在于自然界中。最常见的黄曲霉毒素有 B1、B2、G1、G2 等，其中 B1 毒性最强，G1 次之，B2、G2 较弱。由于黄曲霉毒素的强毒性和强致癌性，许多国家和组织机构均规定了食品中的黄曲霉毒素的限量值。其中，欧盟规定了坚果、玉米、果脯等农作物中黄曲霉毒素 B1 的含量不得超过 2.0~8.0 $\mu\text{g/kg}$ ，B1、B2、G1 和 G2 的总量不得高于 4.0 ~15.0 $\mu\text{g/kg}$ ^[1]。美国 FDA 分别规定了食物和动物饲料中的 4 种黄曲霉毒素的总量不得超过 20 和 300 $\mu\text{g/kg}$ ^[2]。因此，建立准确、有效的黄曲霉毒素的测定方法非常重要。



Agilent Technologies

由于农作物和食品中的黄曲霉毒素的含量都比较低且样品基质非常复杂,免疫亲和柱净化结合柱前(后)衍生、HPLC-FLD 检测的方法越来越多地应用于各种样品的分析。本文综合考虑色谱峰柱后扩散、分析速度、分离度及灵敏度,建立了免疫亲和柱净化-柱后电化学(Br₂)衍生快速测定黄曲霉毒素的 HPLC-FLD 方法成功并用于玉米和花生酱中的黄曲霉毒素的分析。

实验部分

仪器及装置

Agilent 1260 Infinity 液相色谱系统,包括溶剂架,四元泵(内置脱气机),标准自动进样器,柱温箱,荧光检测器。拜发公司 KOBRA 电化学衍生装置,包括电化学衍生池、可变控制电源、0.5 mm 内径 PEEK 管(至少 34 cm)等。

HPLC 方法

色谱柱: Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x 150 mm x 5 µm
柱温: 40 °C
流动相 A: 1L 水,加入 238 mg 溴化钾和 700 µL 4M 硝酸
流动相 B: 甲醇
等度: A: B = 50 : 50, 12 min
流速: 1.0 mL/min
检测: 荧光, Ex: 362 nm, Em: 455 nm, gain = 15
进样量: 20 µL
电化学衍生池电流: 100 µA
反应管: 0.5 mm i.d.*34 cm PEEK 管
(从衍生池出口到荧光检测器入口)

样品前处理方法

称取 25 g 待测样品于高速匀质器中,加入 2g 氯化钠和 125 mL 甲醇/水 (60/40, V/V), 高速搅拌均匀质 1 min 后,加入 125 mL 去离子水稀释提取液。手动混合均匀后,立即取 40-50 mL 该提取液过 Whatman No.4 滤纸,取续滤液 10 mL (相当于 1g 样品)上样于预先活化好的 AFLAPREP® 免疫亲和柱(活化程序参考亲和柱说明书) [3], 以 2-3 mL/min 流速流过免疫亲和柱,再用 10 mL 去离子水冲洗免疫亲和柱并抽至近干。精密移取 1 mL 甲醇于免疫亲和柱,以手动方式,用 2 mL 注射器将甲醇缓慢推过免疫亲和柱(必要时,可用甲醇反冲免疫亲和柱以保证黄曲霉毒素的完全洗脱),完全收集洗脱液,并用 1 mL 去离子水稀释洗脱液,混匀后过 0.22 µm 滤膜,待测。

方法线性范围、检出限和精密度

分别配制 0.1、0.25、0.5、1.0、5.0、10.0 µg/L 四种黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的混合标准溶液(稀释剂为 MeOH/H₂O = 50/50),按上述 HPLC 方法分析,以峰面积对浓度作图,得出四种黄曲霉毒素的线性拟合曲线相关系数 R²>0.99998,线性拟合方程见图 1。按信噪比 S/N = 3 计算,得出 B1、B2、G1 和 G2 的检出限分别为 0.007、0.004、0.006 和 0.005 µg/L,连续 6 次进 10 µg/L 标准混合溶液考察方法精密度,得出四种黄曲霉毒素峰面积 RSD<0.3%,保留时间 RSD<0.1%。6 针 10 µg/L 标准混合溶液叠加色谱图和 0.1 µg/L 混标色谱图如图 2 所示。表 1 比较了本文方法和常见标准方法检出限,通过比较可以发现本文方法可完全满足现行国内外标准的要求。

表 1. 本文黄曲霉毒素检出限和常见标准方法检出限比较

方法名称	黄曲霉毒素种类	所用方法简介	检出限 (μg/kg)
本文方法	B1、B2、G1、G2	柱后电化学衍生 (Br ₂)-HPLC-FLD	0.008 ~ 0.014
SN 0277-93	B1、B2、G1、G2	HPLC-FLD	0.12 ~ 0.50
GB/T 5009.22-2003	B1	薄层色谱法 (第一法)	5.0
		ELISA (第二法)	0.01
GB/T 18979-2003	B1、B2、G1、G2	柱后衍生 (I ₂)-HPLC-FLD	1 (总量)
GB/T 5009.23-2006	B1、B2、G1、G2	柱前衍生 (TFA)-HPLC-FLD (第三法)	0.05 ~ 0.5
GB/T 23212-2008	B1、B2、G1、G2、M1、M2	柱后衍生 (PBPB)-HPLC-FLD	0.001 ~ 0.003*
GB 5009.24-2010	B1、M1	薄层色谱法	0.1 ~ 0.5

*: 进样量为 100 μL

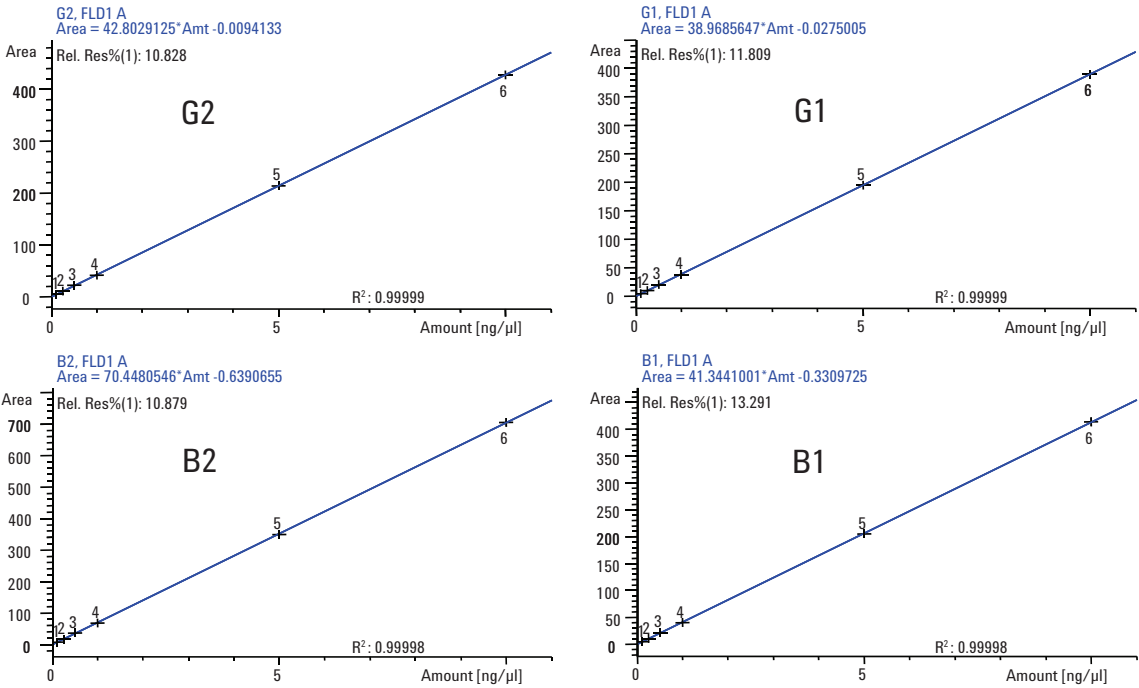


图 1. 四种黄曲霉毒素的线性方程及相关系数

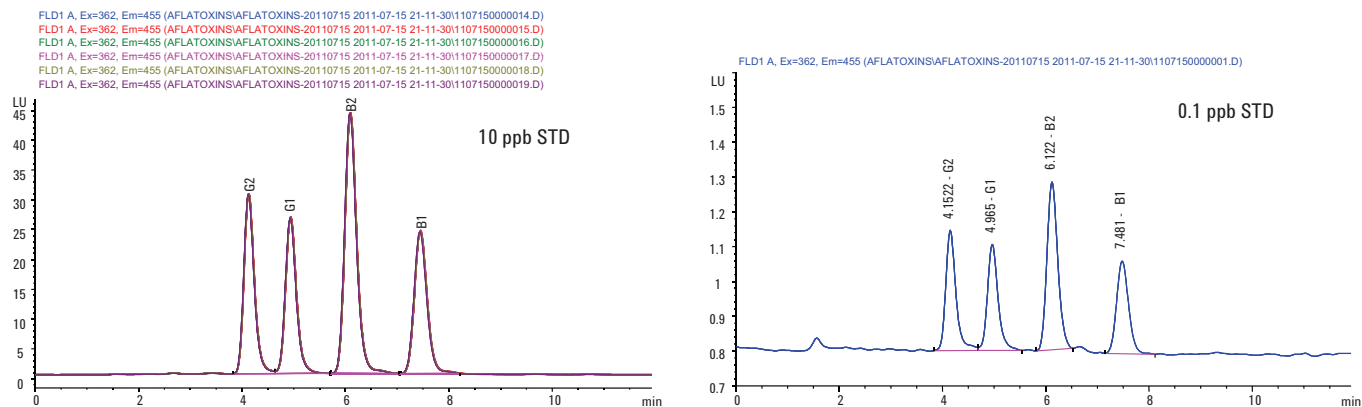


图 2. 6 针 10 $\mu\text{g/L}$ 黄曲霉毒素混标连续进样色谱图 (左) 和 0.1 $\mu\text{g/L}$ 混标色谱图 (右)

样品分析

按样品前处理方法分别测定玉米及花生酱中的黄曲霉毒素。样品色谱图如图 3 所示。

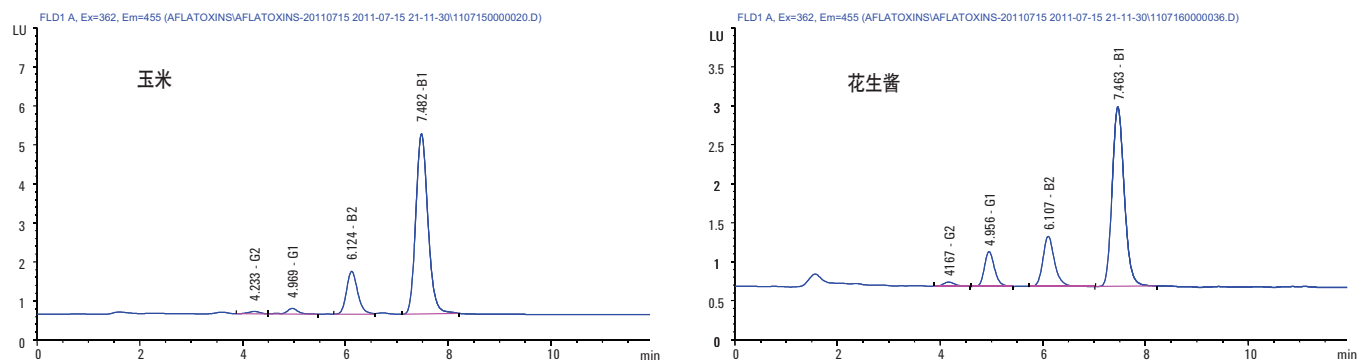


图 3. 玉米样品 (左) 和花生酱样品 (右) 色谱图

结论

本文通过柱后电化学衍生-荧光检测方法, 进一步提高了黄曲霉毒素 G1 和 B1 的检出限。在保证 4 种黄曲霉毒素分离度的前提下, 将黄曲霉毒素的保留时间缩短至 8 分钟之内 (为保证样品组分完全洗脱, 实际样品分析时间为 12 min)。同时为去除样品中干扰组分, 采用免疫亲和柱净化样品, 效果明显。实验证明, 该方法可用于实际样品中痕量黄曲霉毒素的准确测定。

参考文献

1. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Official Journal of the European Union 2006, 49, L364, 5-24.
2. Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. Industry Activities Staff Booklet. U.S. Food and Drug Administration, Washington, DC, 2000. <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/fdaact.html>
3. Application of Immunoaffinity Columns for Sample Clean-up Prior to the HPLC Analysis for Aflatoxins. Instruction of AFLAPREP[®] Immunoaffinity Columns provided by R-BIOPHARM RHÔNE LTD. <http://www.r-biopharm.com>.

www.agilent.com/chem

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的相关损失不承担责任。

本资料中涉及的信息、说明和性能指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技公司，2011
2011 年 8 月 22 日中国印刷
5990-9125CHCN



Agilent Technologies