

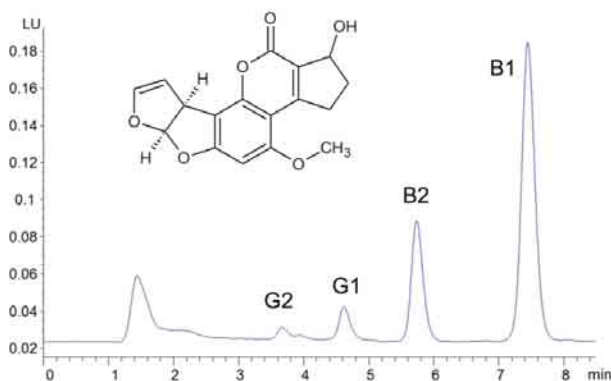
# 使用安捷伦 1260 Infinity 液相色谱和柱后光化学衍生方法同时测定四种黄曲霉毒素

## 应用报告 食品 & 农业

### 作者

肖尧 安蓉

液相色谱应用技术支持,  
生命科学和化学分析事业部  
安捷伦科技(中国)有限公司  
北京



### 摘要

在这篇应用报告中，我们开发了一个用于测定食品基质如谷物，芝麻酱等中黄曲霉毒素的方法，并对检出限 (LOD)，定量限 (LOQ)，重现性，回收率等方面进行了方法学考察。

分析谷物，坚果等食品基质中黄曲霉毒素是保证食品安全的重要工作。在这篇报告中，我们介绍了一种同时测定四种主要黄曲霉毒素的柱后光化学衍生液相色谱荧光检测方法：样品经过免疫亲和小柱净化，采用柱后光化学衍生方法和荧光检测进行测定，这种方法可以满足各个主要法规对于定量限的要求，并且比起常用的柱后电化学衍生方法更加容易操作。



Agilent Technologies

## 简介

黄曲霉毒素是一种由真菌产生的有毒的致癌物质。这种真菌在合适的温度湿度条件下会在土壤，谷物，坚果或腐烂的植物中生长。自然界中自然产生的黄曲霉毒素至少有 14 种之多，其中毒性最大的是黄曲霉毒素 B1。因此，很多国家和法规机构都对食物中黄曲霉毒素 B1 的含量做了严格规定，通常，对毒性比 B1 略小的其他三种黄曲霉毒素 B2, G1 和 G2 的含量也会做出相应规定。例如欧盟规定黄曲霉毒素 B1 的在食物如谷物，坚果中的含量最大允许范围在 2.0 到 8.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) 之间，上述四种黄曲霉毒素总含量允许值范围在 4.0 到 15.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb) 之间<sup>[1,2]</sup>。美国 FDA 规定食品含量限定值为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，饲料含量限值为 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[3]</sup>。中国国标 GB/T 18979-2003 规定四种黄曲霉毒素总量检出限应为 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[4]</sup>。

黄曲霉毒素测定通常使用液相色谱-荧光检测的方法完成。但是由于有些黄曲霉毒素在含水流动相中会发生荧光淬灭，所以需要采取一定的衍生技术将它们衍生为不会淬灭的型态<sup>[5]</sup>。目前应用比较普遍的衍生方法是在溴的作用下进行柱后电化学衍生<sup>[6,7]</sup>。这种方法有很好的灵敏度，但是也有很多缺点，比如需要使用到对仪器有强烈腐蚀作用的含溴流动相，并且衍生装置需要定期维护。

另一种衍生方法是使用紫外光使黄曲霉毒素与水进行衍生反应，由于水是反相色谱中的常用溶剂，所以这种方法操作十分简便，并且在灵敏度上与电化学衍生方法也有较好的可比性<sup>[8]</sup>。

在这篇应用报告中，我们在安捷伦 1260 Infinity 四元泵液相色谱系统上开发了一个灵敏快速的用于分析黄曲霉毒素 B1, B2, G1 和 G2 检测的柱后光化学衍生-荧光检测方法，这个方法在定量限和检出限上的表现完全可以满足各个主要法规的要求。

## 实验

### 仪器

安捷伦 1260 Infinity 液相色谱系统:

- Agilent 1260 Infinity 四元泵 (G1311B)
- Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器 (G1329B)

- Agilent 1260 Infinity 柱温箱 (G1316A)
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器 (G1312B)，配置标准检测池 (8  $\mu\text{L}$ )
- 柱后光化学衍生装置购买于中科汇仁科技公司，北京 (PHRED-HR 光化学衍生器) 柱后衍生装置串联于色谱柱出口与荧光检测器入口之间。

### 色谱柱

Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  (p/n 699975-302) 免疫亲和小柱 (RIDA<sup>®</sup> Aflatoxin column) 购买于德国 Biopharm 公司

### 软件

OpenLAB CDS ChemStation Edition for LC & LC MS Systems, Rev. C.01.03 [37]

### 溶剂和试剂

#### 溶剂

甲醇 (HPLC 级) 购买于迪马公司。超纯水由美国 Millipore 公司 MilliQ 超纯水制备系统制备

#### 标准品

黄曲霉毒素标准品 (99%+ B1: 1.055  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , B2: 0.327  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , G1: 1.082  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and G2: 0.309  $\mu\text{g}/\text{mL}$  溶解于甲苯/乙腈 (98:2)) 购买于 Supelco 公司

#### 样品

玉米粉样品购买于本地超市。加标玉米粉样品为在样品前处理前向上述玉米粉样品中加入相当于标准曲线级别 4 的标准品(浓度数值见表 1)。标准添加玉米粉样品 (含有 9.00 ppb B1 和 0.6 ppb B2) 购买于 Trilogy 公司。芝麻酱样品 (含有 4.57 ppb B1, 其他三种浓度未知) 来自于客户。酸枣仁样品 (2010 版中国药典规定进行黄曲霉毒素检测) 购买于本地药店。

### 样品和标准品制备

标准溶液配制: 取 10  $\mu\text{L}$  标准品溶液置于 10 mL 瓶中, 室温下氮气吹干, 用甲醇-水溶液 (50:50, v:v) 复溶, 之后稀释成如下浓度作为标准曲线不同浓度点:

表 1. 浓度级别

浓度级别	1	2	3	4	5	6
B1	0.1055	0.2638	0.5275	1.055	5.275	10.55
B2	0.0327	0.0818	0.1635	0.327	1.635	3.27
G1	0.1082	0.2705	0.541	1.082	5.41	10.82
G2	0.0309	0.0772	0.1545	0.309	1.545	3.09

样品处理：取 5g 样品（见表 2）和 0.5 g 氯化钠置于 50 mL 离心管中，加入 25 mL 甲醇-水溶液 (70:30, v:v)，高速匀浆 1 分钟，5000 转离心 5 分钟，取 5 mL 上清液，加入 15 mL 水，转移全部的 20 mL 溶液经过免疫亲和小柱净化：

表 2. 样品

样品	玉米粉	加标玉米粉	标准添加玉米粉	芝麻酱	酸枣仁
重量 (g)	5.03	5.00	4.99	4.96	4.98

免疫亲和小柱净化过程：

1. 用 2 mL 超纯水活化小柱
2. 将要净化的样品加入到小柱上，控制流速在 1 滴/秒，使样品溶液流过小柱
3. 用 10 mL 超纯水清洗小柱，弃去洗脱液
4. 用注射器打气排空小柱大概 10 秒以排干小柱内的残留液体
5. 使用 0.5 mL 甲醇以 1 滴/秒的速度洗脱小柱，确保洗脱全部黄曲霉毒素
6. 用注射器打气排空小柱收集全部洗脱液
7. 向洗脱液中加入 0.5 mL 超纯水，涡旋混匀
8. 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤

### 色谱条件

色谱柱: Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3.0 x 50 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  (p/n 699975-302)  
 流动相: 水/甲醇 65:35 (v:v), 等度  
 停止时间: 13.5 min  
 流速: 0.4 mL/min  
 进样量: 10  $\mu\text{L}$   
 柱温: 30  $^{\circ}\text{C}$   
 检测器参数: Ex.: 365 nm, Em.: 440 nm, 采样频率: 1.16 Hz, 增益: 10

## 结果和讨论

使用上述方法对四种黄曲霉毒素标准品（第4级浓度，蓝色图）进行了分析与空白进样（红色）进行了比较，结果见图1，根据色谱图可以看到四种黄曲霉毒素可以在13.5分钟内达到良好的基线分离。图中可以看到色谱峰有较大展宽，这主要是由于样品经过光衍生装置中的衍生管造成的，为了保证足够的反应时间，不能使用很高的流速，这导致了样品峰在管线中的扩散。

### 峰面积和保留时间重现性

对标准品（浓度级别4）进行了6次重复的分析考察峰面积及保留时间的重现性，结果显示保留时间RSD%均小于0.15%，峰面积RSD%均为0，峰面积重现性良好也表明衍生效果稳定，定量结果

可靠。具体结果见表3

表3. 保留时间和峰面积重现性 ( $n = 6$ )

RSD%	B1	B2	G1	G2
保留时间	0.14	0.14	0.14	0.13
峰面积	0	0	0	0

### 检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

用浓度级别1与浓度级别2的标准品分别进样分析以考察检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) (图2a和2b)，结果按照信噪比进行折算，LOD取S/N=3的浓度，LOQ取S/N=10的浓度，结果见表4。结果显示，此方法的检出限与定量限可以完全满足国标GBT 18979-2003的要求。

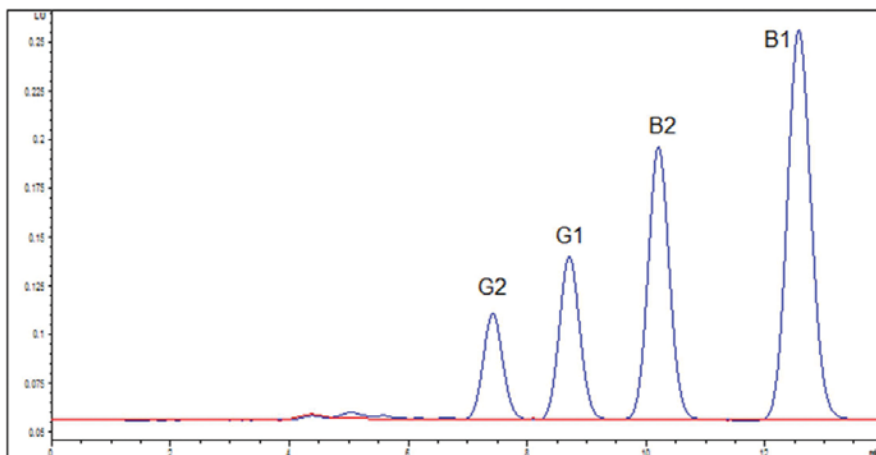


图1. 空白进样（红色）和黄曲霉毒素标准品色谱图（蓝色）

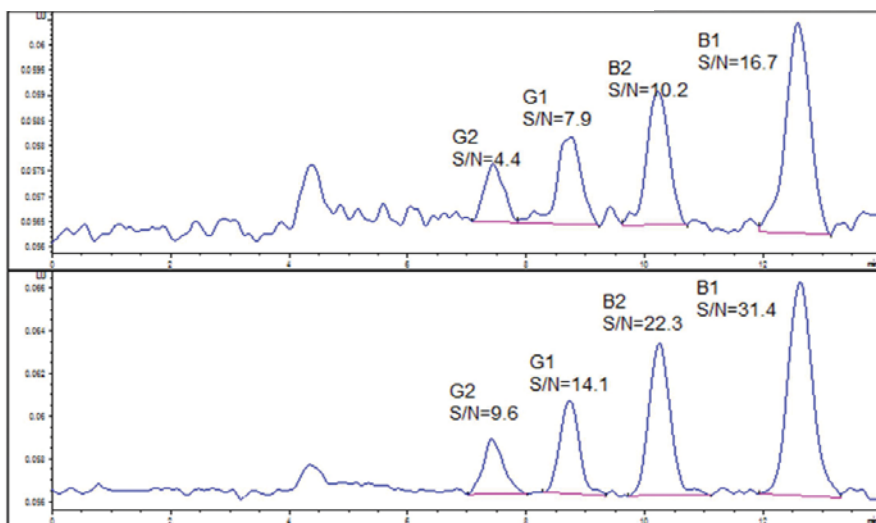


图2. 2a (上), 2b (下): 检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

表 4. 检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

	B1	B2	G1	G2
LOD (ppb)	0.019	0.010	0.041	0.018
LOQ (ppb)	0.084	0.037	0.192	0.080

### 线性

五个不同浓度的标准品 (浓度级别 2~6) 进样分析以考察线性 (图 3), 4 种黄曲霉毒素的线性相关因子 R 均 >0.999, 结果总结于表 5 中:

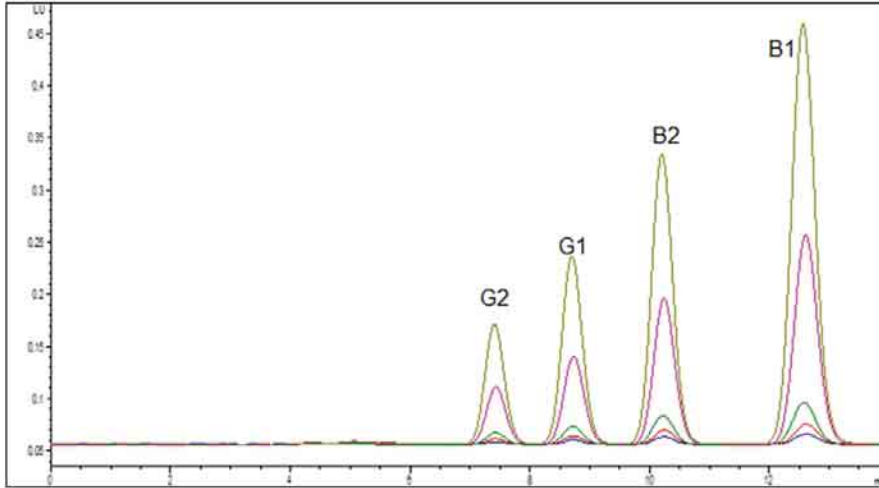


图 3. 5 个不同浓度标准品色谱图重叠 (浓度级别 2~6)

表 5. 线性

	B1	B2	G1	G2
相关因子 R	0.99999	0.99999	0.99955	0.99979

表 6. 标准品和加标样品回收率

	B1	B2	G1	G2
标准品	58.0%	69.2%	60.7%	62.1%
加标样品	52.8%	74.7%	63.6%	64.6%

## 样品分析

### 回收率

分别使用标准品和加标样品按照相同前处理步骤和测定方法进行处理和测定以考察前处理和方法回收率, 结果总结于表 6 中, 可以看到标准品和加标样品测得的回收率值有很好的 consistency, 证明基质不会影响回收率, 回收率数值在 55~75% 之间, 比免疫亲和小柱说明书中报告的值 (70~110%) 略低。

图 4 为玉米粉样品与加标的玉米粉样品（浓度级别 4）色谱图的比较，将标准品加在样品处理前加入玉米粉当中，按照本报告前面叙述的前处理步骤进行处理。结果显示，未加标的玉米粉样品中不含有黄曲霉毒素，在加标样品中，我们可以看到目标组分与基质干扰峰有良好的分离。

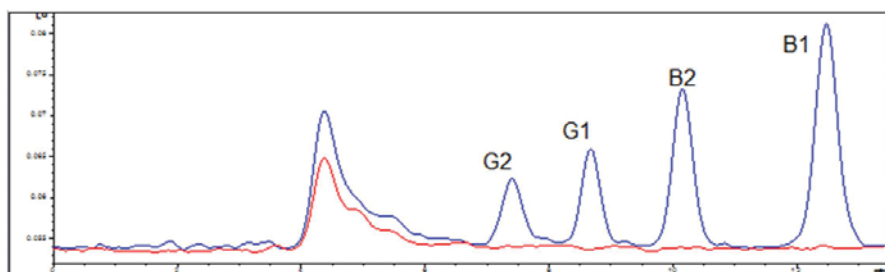


图 4. 玉米粉样品（红色）和加标玉米粉样品（蓝色）

图 5 为加标玉米粉样品（红色）和标准加入玉米粉样品（蓝色），标准加入玉米粉样品中含有 B1：9.00 ppb，B2：0.6 ppb。

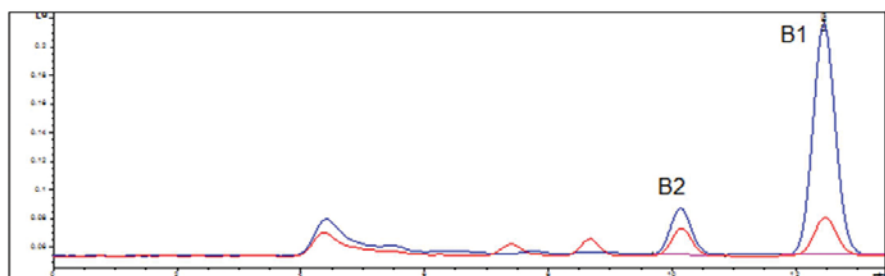


图 5. 加标玉米粉样品（红色）和标准加入玉米粉样品（蓝色）

图 6 为含有四种黄曲霉毒素的芝麻酱样品，可以看到，对于不同基质，此方法也可以保证目标化合物与基质干扰峰得到良好的分离。

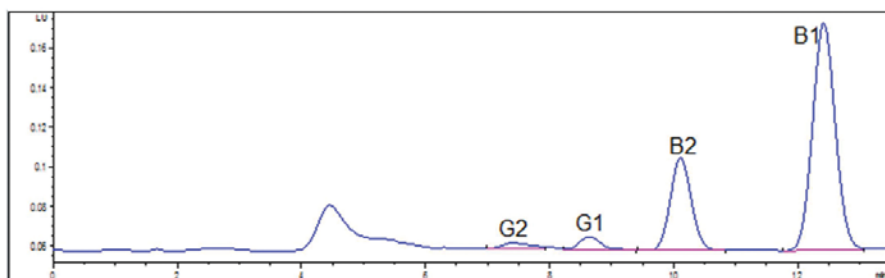


图 6. 芝麻酱样品

酸枣仁是一种常见中药，有镇静安神，镇痛，降低血压等作用，收载于中国药典 2010 版一部<sup>[9]</sup>当中，在“检查”项中要求对黄曲霉毒素进行测定。图 7 为酸枣仁样品（蓝色）和标准品（红色）的色谱图，可以看出，被分析的酸枣仁样品当中不含有黄曲霉毒素。

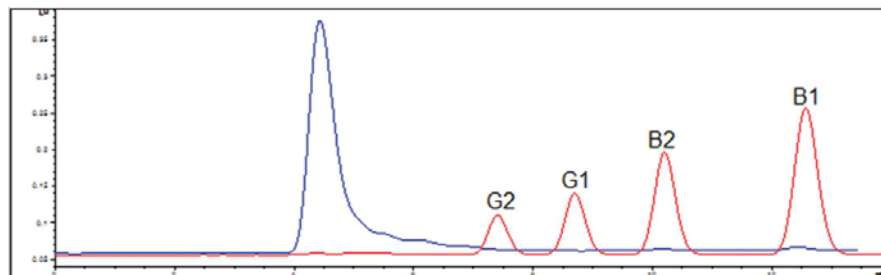


图 7. 酸枣仁样品（蓝色）和黄曲霉毒素标准品（红色）

不同样品的定量测定结果见表 7。

表 7. 样品定量结果

含量	玉米粉	加标玉米粉	标准加入玉米粉	芝麻酱	酸枣仁
B1	未检出	0.680	4.036	2.839	未检出
B2	未检出	0.227	0.381	0.538	未检出
G1	未检出	0.987	未检出	0.693	未检出
G2	未检出	0.271	未检出	0.100	未检出

考虑到回收率的影响，这些结果与确定含量的样品的真实含量相吻合，表明此方法定量结果可靠。

## 小结和讨论

在这篇应用报告中，我们开发了一个使用简单的柱后光衍生设备及荧光检测同时测定食品基质中黄曲霉毒素 B1, B2, G1, G2 的方

法。方法线性及重现性良好，在检出限和定量限上完全可以满足现行法规的要求，根据对实际样品的测试，此方法可以很好的将被测成分与基质干扰峰分离。比起电化学柱后衍生方法，所需要的设备简单，而且避免了使用对于仪器损害严重的流动相添加剂。虽然光化学衍生的方法比电化学衍生法的灵敏度略低，但是仍旧可以很好的满足现行法规和标准的要求。

## 参考文献

- [1] "Determination of Aflatoxins (B1, B2, G1 and G2) in Corn and Peanut Butter by HPLC-FLD Using Pre-column Immunoaffinity Cleanup and Post-Column Electrochemical Derivatization", Application Note, Publication number 5990-9125EN, **2011**
- [2] 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.
- [3] 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>
- [4] 食品中黄曲霉毒素的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法, 中华人民共和国国家标准 GB/T 18979-2003
- [5] Sydenham, E.W., & Shephard, G.S. (1996) in Progress in Food Contaminant Analysis, J. Gilbert (Ed.), Chapman and Hall, London, UK, pp 65–146
- [6] Coring System Diagnostix GmbH ([www.coring.de](http://www.coring.de))
- [7] "Determination of aflatoxins with Agilent 1290 Infinity LC, Agilent 1260 Infinity Binary LC and Agilent ZORBAX RRHT 1.8  $\mu$  m columns by FLD after electrochemical derivatization with a Coring Cell", Application Note, Publication number 5990-6167EN, 2010
- [8] Papadopoulou-Bouraoui et al.: Journal of AOAC International, Vol. 85, No. 2, 2002
- [9] 中华人民共和国药典 2010 版, 一部, 343 页

[www.agilent.com/chem](http://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, 2012  
2012 年 10 月 24 日中国印刷  
5991-1565CHCN