

液相色谱碘柱后衍生法检测果仁类食品中的黄曲霉毒素

LC-064

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 之间，回收率在89%~102%之间。

关键词：碘柱后衍生法 黄曲霉毒素 果仁类食品

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。

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 0.5 mm 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

1.2.1 标准溶液配制

黄曲霉毒素混标原溶液(B1，G1：1.0mg/L；B2，G2：0.30 mg/L)，经流动相稀释，配制标准溶液浓度系列。

1.2.2 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 μm滤膜过滤, 待测。

1.3 碘衍生分析条件

1.3.1 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-SP, 4.6 mm I.D.×250 mm L., 5 μm

柱温: 40℃

进样体积: 20 μL

检测波长: Ex=360 nm, Em=440 nm

1.3.2 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℃

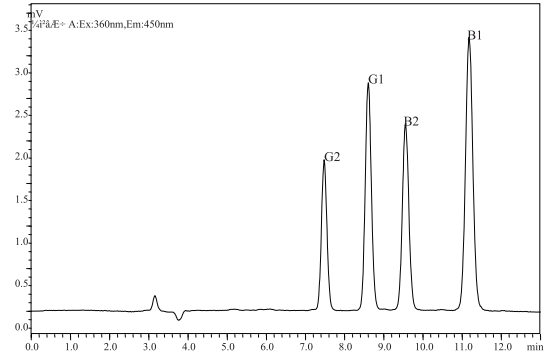


图1 混标溶液色谱图(G2: 0.006 μg/mL; G1: 0.020 μg/mL; B2: 0.006 μg/mL; B1: 0.020 μg/mL)

以B1、G1浓度分别为0.010、0.020、0.030、0.040、0.050 μg/mL; B2、G2浓度分别为0.003、0.006、0.009、0.012、0.015 μg/mL混标溶液, 分别制作工作曲线, 标准曲线图如图2~图5, 标准曲线方程见表1。

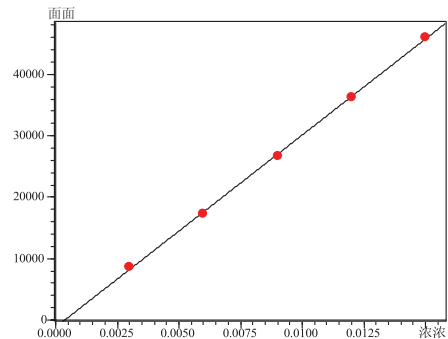


图2 黄曲霉毒素 G2 的校准曲线

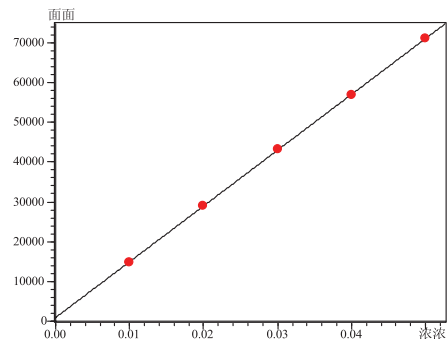


图3 黄曲霉毒素 G1 的校准曲线

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, 所得图谱如下图所示。

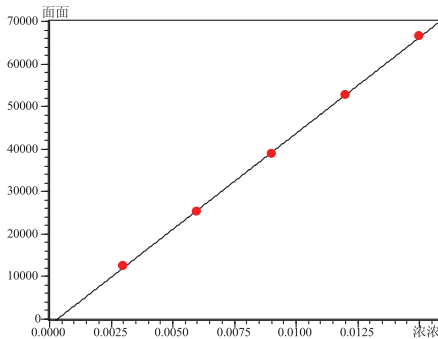


图4 黄曲霉素 B2 的校准曲线

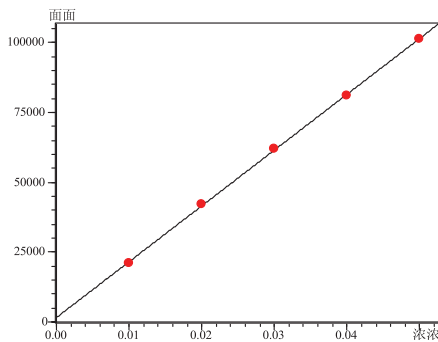


图5 黄曲霉素 B1 的校准曲线

表1 标准曲线方程

组分	Y=AX+B	R
G2	Y=3127978X-1147.2	0.999
G1	Y=1402621X+920.5	0.999
B2	Y=4512250X-1413.7	0.999
B1	Y=1998433X+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 重现性试验

连续进样(混合标样, G2: 0.006 μg/mL; G1: 0.020 μg/mL; B2: 0.006 μg/mL; B1: 0.020 μg/mL), 考察各个组分的保留时间和峰面积重现性, 分析结果如下表 3, 两者的保留时间RSD%<0.5%, 峰面积RSD%<1.3%。

表3 四种 AF 的保留时间和峰面积的重现性(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

按照1.2所述方法处理市售果仁样品, 检出B2、B1, 样品色谱图见图6, 检测结果见表4。

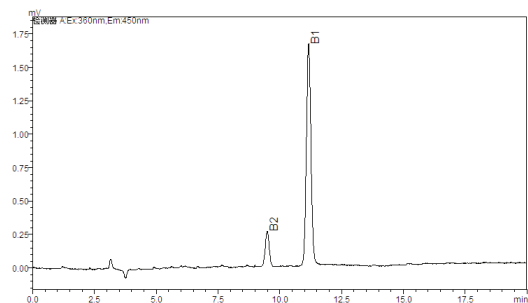


图6 市售果仁样品的色谱图

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%-102%之间，回收率结果见表5。

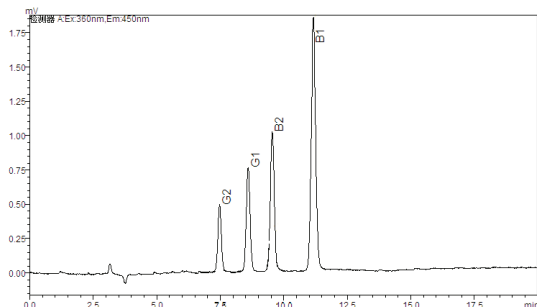


图7 碘衍生样品加标色谱图

表5 碘衍生回收率结果

组分	加标量($\mu\text{g/mL}$)	回收率%
G2	3	101.6
G1	10	100.8
B2	3	93.7
B1	10	89.5

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现性均良好，回收率在89%~102%之间，可用于果仁类食品中黄曲霉毒素的检测。