

科诺美 Leaps 超高效液相色谱-荧光检测器检测食品中的黄曲霉毒素

前言

黄曲霉毒素 (Aflatoxins) 是由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*A. parasiticus*) 产生的 I 类致癌物, 其中以黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 的毒性最强, 具有强肝毒性和致畸性。我国现行标准 GB 5009.22-2016 规定了食品中黄曲霉毒素的检测方法体系, 其中色谱质谱方法包括同位素稀释液相色谱-串联质谱法 (第一法) 和高效液相色谱-荧光检测法 (HPLC-FLD) (第二法为柱前衍生、第三法为柱后衍生)。



相较于柱前衍生和柱后化学试剂衍生, 柱后光化学衍生无需手动衍生的前处理过程, 避免了衍生试剂对色谱系统的污染, 同时光化学衍生还具有系统配置简单、装置成本低的优势。本方案依据 GB 5009.22-2016 第三法, 使用科诺美 Leaps 超高效液相色谱-荧光检测系统, 开发了用于分析黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的柱后光化学衍生检测方法。该方法的定量限和检测限完全满足现行国标的要求, 是一种简便高效、特异性强、灵敏度高、低成本的黄曲霉毒素分析方案。

实验部分

试剂和样品

甲醇和乙腈为 HPLC 级, 购于上海星可高纯溶剂有限公司; 黄曲霉毒素标准溶液 (B1、B2、G1、G2 混标溶解于乙腈中, 其中 B1 和 G1 的浓度为 1.0 mg/L, B2 和 G2 浓度为 0.3 mg/L) 购于上海安谱实验科技股份有限公司; 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱 (规格为 3 mL, 货号 SBEQ-CC15008) 购于上海安谱实验科技股份有限公司; 样品为农村自制的小磨香油。



仪器和设备



液相色谱条件

色谱柱: Chromai AFT C18 Column, 4.6 x 150 mm, 5 μ m

流速: 1 mL/min

柱温: 30 $^{\circ}$ C

等度洗脱: 水/甲醇=55/45 (v/v)

进样量: 50 μ L

荧光检测波长: 激发波长: 360 nm 发射波长: 440 nm

采样频率: 5 Hz

柱后衍生装置: 色谱柱出口管线连接至衍生装置入口, 衍生装置出口管线连接至荧光检测器入口
(管线内径均为 0.18 mm), 并保持衍生装置电源开启

样品制备

提取: 准确称取 4.00 g 植物油样品, 加入 0.8 g 氯化钠, 再准确加入 20.0 mL 70% 甲醇水, 震荡 30 min, 静置 10 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 10.0 mL 加入 20.0 mL 水, 混匀, 过 K49 型玻璃纤维滤纸, 取 15.0 mL 上清液注入免疫亲和柱。

净化:

上样: 上清液上样至黄曲霉毒素总量免疫亲和柱, 流速 1-2 滴/秒;

淋洗: 用 20 mL 水冲洗, 注射器抽干水分;



洗脱：1 mL 甲醇溶液洗脱，流速 2-3 滴/秒，压干；

氮吹复溶：收集洗脱液，50℃下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干，用 1.0 mL 45%甲醇水溶液复溶，取部分该溶液过 0.45μm 滤膜后进样。

结果与讨论

色谱分离情况

如图 1 所示，四种黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 分离良好，分离度均大于 2，且空白进样中未发现干扰峰，表明该方法可用于对这四种黄曲霉毒素进行定量分析。

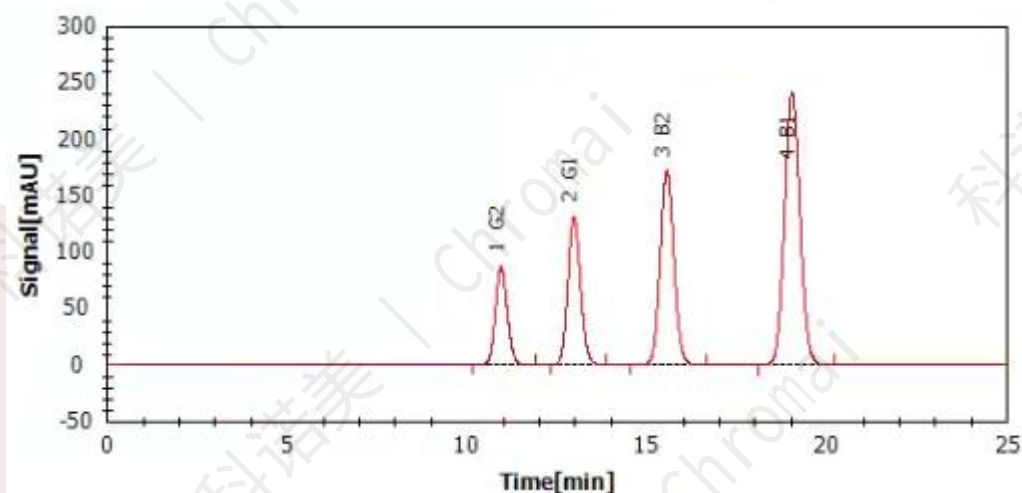


图 1 黄曲霉毒素的液相色谱-柱后光化学衍生-荧光检测方法分离结果

灵敏度与线性关系

在进样量 50 μL 条件下，进样 B1/B2/G1/G2 标准混标溶液，测试仪器的 LOD 与 LOQ（以混标中响应较低的 G2 为例给出其 LOD 与 LOQ，其他三种标识各自浓度下对应的 S/N），结果如表 1 所示，四种黄曲霉毒素的检测限和定量限完全满足国标中规定的液相色谱-柱后光化学衍生法的要求（B1，G1 要求定量限 0.1 μg/kg，B2，G2 要求定量限 0.03 μg/kg）。

目标物	检出限 LOD				定量限 LOQ			
	G2	G1	B2	B1	G2	G1	B2	B1
浓度 (ng/mL)	0.015	0.05	0.015	0.05	0.03	0.1	0.03	0.1
S/N(p-p)	3.069	4.853	5.917	8.799	10.188	12.723	18.779	26.197

表 1 灵敏度测试结果



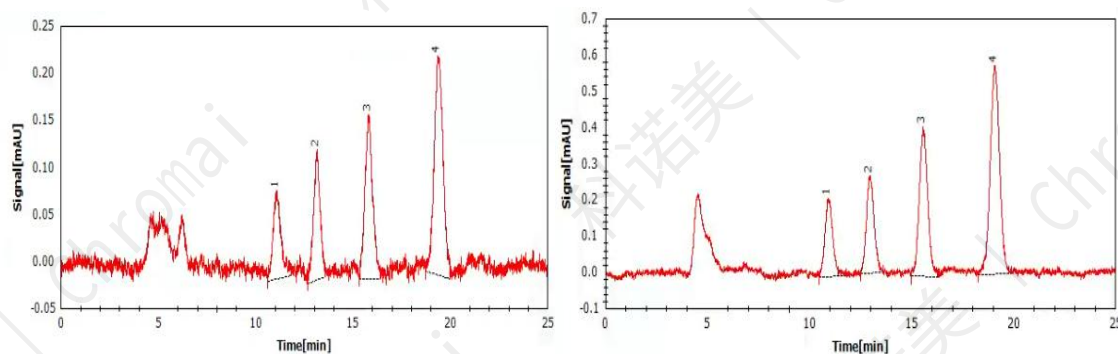


图2 标准溶液 A 色谱图 G2: 0.015 ng/mL、G1: 0.05 ng/mL、B2: 0.015 ng/mL、B1: 0.05 ng/mL (左图); 标准溶液 B 色谱图 G2: 0.03 ng/mL、G1: 0.1 ng/mL、B2: 0.03 ng/mL、B1: 0.1 ng/mL (右图)

配制六个浓度的系列标准溶液 (表 2), 按浓度由低到高进样, 以峰面积平均值为纵坐标、浓度为横坐标作图, 考查各化合物的在此浓度范围内的线性关系。由结果可知, 黄曲霉毒素 B1 和 G1 在 0.1~50.0 ng/mL 的浓度范围内, B2 和 G2 在 0.03~15 ng/mL 的浓度范围线性关系良好, 相关系数 R^2 均大于 0.9999。

水平	浓度 (ng/mL)			
	G2	G1	B2	B1
L1	0.03	0.10	0.03	0.10
L2	0.15	0.50	0.15	0.50
L3	0.30	1.00	0.30	1.00
L4	1.50	5.00	1.50	5.00
L5	3.00	10.00	3.00	10.00
L6	15.00	50.00	15.00	50.00

表 2 系列标准溶液的浓度

目标物	保留时间/min	线性方程	R^2
G2	11.08	$Y = 132.206 X - 3.029$	0.99998
G1	13.16	$Y = 77.232 X - 5.981$	0.99998
B2	15.81	$Y = 280.047 X - 6.301$	0.99998
B1	19.42	$Y = 147.073 X - 10.999$	0.99998

表 3 黄曲霉毒素的线性回归方程和相关系数



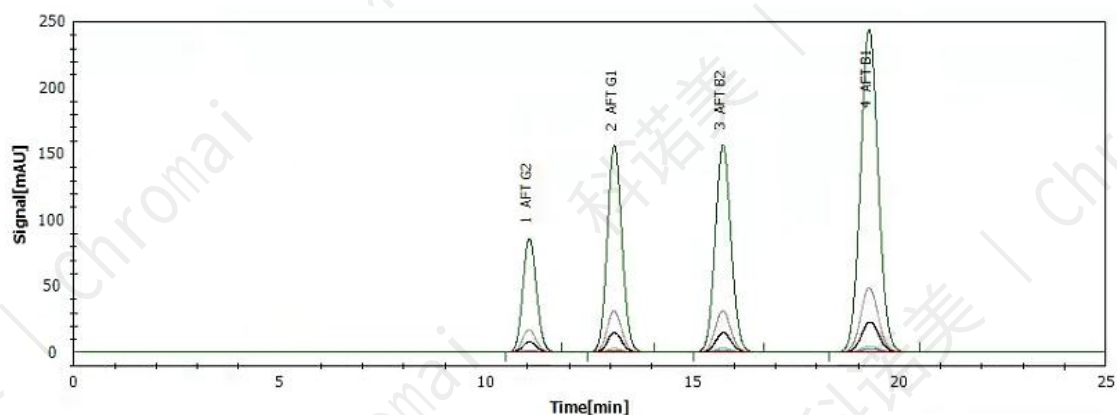


图 3 L1~L6 重叠色谱图

灵敏度对比

在同一实验环境下，比较科诺美 Leaps 超高效液相色谱-荧光检测系统与进口 T 品牌的灵敏度差异，为了确保对比实验的客观公正，将本实验用到的流动相、色谱柱和标准溶液完全平移至进口 T 品牌的液相系统上，在相同的测试方法下，比较两套系统的灵敏度差异。由结果可知（图 4），标曲最低点的 L1 在进口 T 品牌的荧光检测器上并未出峰，同等浓度下（L3 和 L5），科诺美的荧光检测器的灵敏度显著高于进口 T 品牌。

重复性

选择标曲上 L1、L3、L6 三个浓度水平各重复进样 6 针，计算各化合物峰面积和保留时间的 RSD，结果如表 4 所示，三个浓度水平下的各化合物保留时间 $RSD \leq 0.2\%$ ，峰面积 $RSD < 5\%$ 。

浓度水平	保留时间 RSD				峰面积 RSD			
	G2	G1	B2	B1	G2	G1	B2	B1
L1	0.2%	0.2%	0.2%	0.2%	4.7%	4.6%	3.9%	3.4%
L3	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	1.6%	1.5%	1.2%	0.9%
L6	0.1%	0.1%	0.1%	0.2%	0.6%	0.7%	0.7%	0.9%

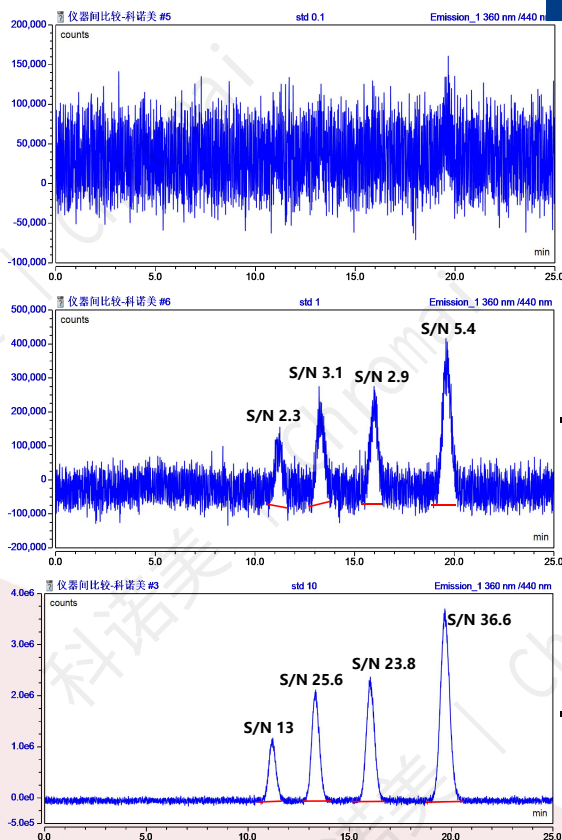
表 4 重复性考查



进口 T 品牌



Chromai D50



— L1 —

— L3 —

— L5 —

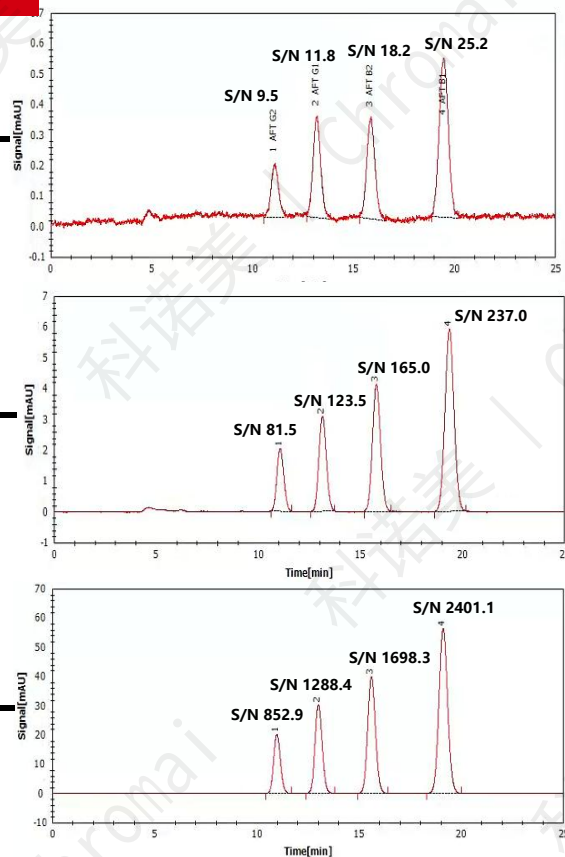


图 4 Chromai D50 与进口 T 品牌灵敏度比较 (L1、L3、L5 三个浓度水平)

回收率

参照前述前处理方法, 在空白基质中添加三个含量级别的分析物 (以 B1 记使样品含量分别为 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 、1.0 $\mu\text{g/kg}$ 、10.0 $\mu\text{g/kg}$), 每个级别重复处理三个样品, 测试回收率及相对标准偏差, 测试结果如表 5 所示, 三个加标水平的回收率在 80~105%之间, 基质加标各化合物峰面积 RSD 为 1~8%。

加标水平	平均回收率				峰面积 RSD			
	G2	G1	B2	B1	G2	G1	B2	B1
0.1 $\mu\text{g/kg}$	92%	95%	105%	101%	8%	6%	7%	6%
1.0 $\mu\text{g/kg}$	81%	80%	87%	82%	1%	2%	2%	2%



10.0 $\mu\text{g/kg}$	83%	89%	95%	94%	7%	8%	8%	8%
-----------------------	-----	-----	-----	-----	----	----	----	----

表 5 回收率及重复性

样品测试

取油脂样品按前述前处理和仪器方法测试，其色谱图（绿色）如下所示。由结果可知，在农村自制的小磨香油中 B1 和 B2 有痕量检出，但低于本方法的定量限，估测 B1、B2 含量分别为 0.015、0.004 $\mu\text{g/kg}$ 。

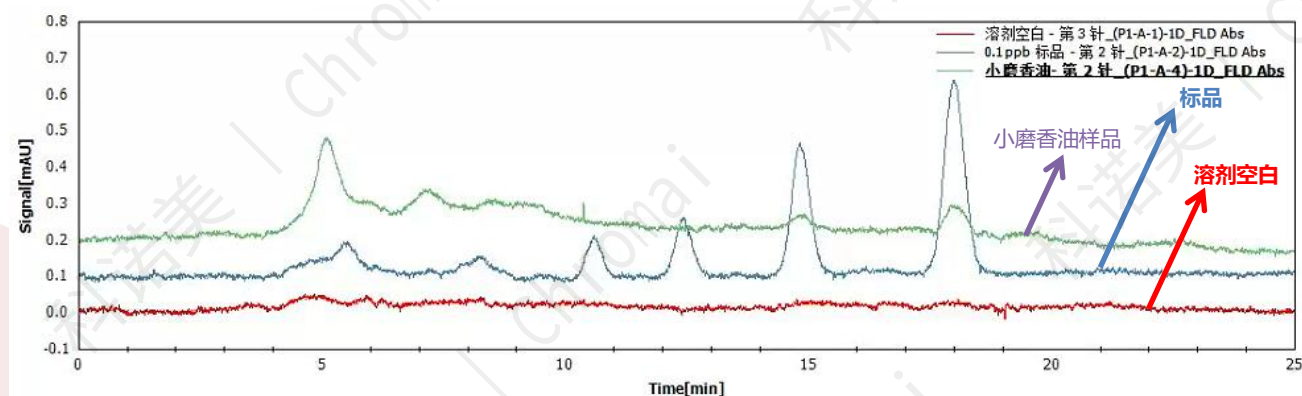


图 5 样品、溶剂空白及标品重叠色谱图

结论

本应用介绍了使用科诺美超高效液相色谱-荧光检测器，结合柱后光化学衍生装置同时测定食品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2 的方法。该方法具有良好的线性、重现性及灵敏度，检测限和定量限完全满足现行国标方法的要求。与其他衍生方法相比，本方案所用的光化学衍生方法所需的设备简单、成本低，避免使用化学衍生法中对仪器有严重损害的流动相添加剂，或碘/溴衍生中难以配制长期保存的衍生试剂；与柱前衍生方法相比，可以避免手动衍生操作，并极大地提升操作安全性。

