

## 【论著】

## 多功能柱净化-光化学柱后衍生高效液相色谱测定食品中黄曲霉毒素

吴燕 朱怡平 汪国权

(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

**[摘要]** 目的: 研究建立了光化学柱后衍生-高效液相色谱-荧光检测器测定食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的方法。方法: 乙腈/水提取样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 经多功能柱净化、高效液相色谱分离、光化学柱后衍生、荧光检测器测定。结果: 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的检出限分别为 0.50 μg/kg、0.15 μg/kg、0.50 μg/kg 和 0.15 μg/kg, 回收率为 86.7%~97.2% 相对标准偏差(RSD) 0.41%~2.40%。结论: 该方法简便快速、灵敏度高、重现性好, 满足食品中黄曲霉毒素检测的需要。

**[关键词]** 多功能净化柱; 光化学衍生; 高效液相色谱; 黄曲霉毒素; 食品

**[中图分类号]** O657.7<sup>+</sup>2

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1004-8685(2011)08-1865-03

## Determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in food by multifunctional clean-up column, post-column photochemical derivatization and HPLC

WU Yan, ZHU Yi-ping, WANG Guo-quan

(Shanghai Municipal Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200336, China)

**[Abstract]** **Objective:** A method for determination of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> by using post-column photochemical derivatization-HPLC-fluorescence detector was developed. **Methods:** The Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in samples were extracted by acetonitrile/water and were cleaned up by multifunctional clean-up columns. The separation of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> was conducted by HPLC, the determination was carried out by fluorescence detector after photochemical derivatization. **Results:** The detection limits of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> were 0.50 μg/kg, 0.15 μg/kg, 0.50 μg/kg and 0.15 μg/kg respectively, the recoveries of analytes were from 86.7% to 97.2% and the relative standard deviations were 0.41%~2.40%. **Conclusion:** The method is simple, high sensitive and good repeatability, which is suitable for the determination of Aflatoxin in food.

**[Key words]** Multifunctional clean-up column; Photochemical derivatization; High performance liquid chromatography; Aflatoxin; food

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AF)是黄曲霉、寄生曲霉和特曲霉的某些产毒菌株产生的次级代谢产物,在植物来源的食物中主要存在形式为 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>,其中以 AFB<sub>1</sub> 的毒性和致癌性最强。为了防止黄曲霉毒素危害人类健康,世界各国都在采取措施,对黄曲霉毒素在食品中的残留限量作了严格的规定<sup>[1,2]</sup>。欧盟规定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 在食品中的残留限量为 2 μg/kg,黄曲霉毒素总限量(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>) 小于 4 μg/kg。近年来,由于高效液相色谱法(HPLC)具有灵敏度和准确度高、方法重现性好等优点,现已成为黄曲霉毒素分析的主要手段。但试样净化步骤和衍生过程仍然复杂、费时,需要多种试剂,不利于试验者的身体健康。本实验采用乙腈-水提取,经 MycoSep<sup>TM</sup>226 多功能柱净化,应用光化学衍生,高效液相色谱法结合荧光检测器测定食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub>,具有操作简便、快速、溶剂用量少、净化效果好、灵敏度高等特点,适用于一般实验室开展日常食品监测和检测。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

乙腈、甲醇均为色谱纯。黄曲霉毒素混合标准溶液(美国 SUPELCO 公司):黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 均为 1.0 μg/ml,黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 均为 0.3 μg/ml。

### 1.2 仪器及设备

Agilent1100 型高效液相色谱仪附荧光检测器;柱后光化学衍生器;Milli-Q 超纯水系统;超声波清洗器;漩涡混匀器;离心机;多功能净化柱: MycoSep<sup>TM</sup>226(美国 Romer Labs);0.45 μm 微孔滤膜。

### 1.3 测定方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相: 初始为水:乙腈:甲醇 = 60:20:20,20 min(待黄曲霉毒素峰出毕时)调整为水:乙腈:甲醇 = 10:45:45 进行冲洗,24 min 时恢复初始状态,平衡 4 min,整个分析时间为 28 min(视黄曲霉毒素的柱保留时间不同,设置时间有所不同);流速:1.0 ml/min;进样体积:30 μl;柱温:室温;荧光检测器:激发波长 360 nm,发射波长 440 nm。

1.3.2 标准测定 将黄曲霉毒素混合标准溶液稀释成含

【作者简介】 吴燕(1976),女,本科,主管技师,主要从事食品理化检验和研究工作。

AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 为 0.10 ng/ml、0.50 ng/ml、1.0 ng/ml、5.0 ng/ml、10.0 ng/ml, AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 为 0.03 ng/ml、0.15 ng/ml、0.30 ng/ml、1.5 ng/ml、3.0 ng/ml 的混合标准系列, 进样分析, 以标准系列的峰面积对浓度分别绘制每种黄曲霉毒素的标准曲线。标准谱图见图 1。

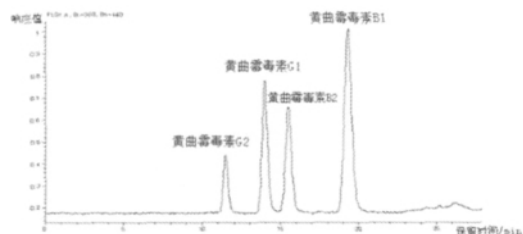


图 1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的标准色谱图

1.3.3 样品溶液的测定 称取碾磨后的样品 5.0 g 于 50 ml 具塞离心管中, 加入 25 ml 乙腈-水 (84:16) 溶液, 超声提取 30 min, 3000 rpm/min 离心 10 min, 收集上清液备用。

吸取 8 ml 滤液至多功能净化柱的玻璃管中, 将多功能净化柱的填料管插入玻璃管内, 并缓慢推动填料管压至玻璃管底部, 使滤液经填料管中固定相成为净化液, 并移取 1.0 ml 净化液至另一试管中, 60℃ 加热氮气吹干, 再加入 1.0 ml 流动相稀释, 混匀 30 s, 经 0.45 μm 滤膜过滤, 供 HPLC 分析用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 线性范围、检出限、精密度、准确度

在实验条件下, AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 在 0.10 ng/ml ~ 10.0 ng/ml, AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 在 0.03 ng/ml ~ 3.0 ng/ml 范围内均具有良好的线性关系, 其相关系数为 0.9995 ~ 0.9998。

若以取样 5.0 g 计算, 按上述方法处理样品, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的最低检出限分别为 0.50 μg/kg、0.15 μg/kg、0.50 μg/kg 和 0.15 μg/kg。

选取黄曲霉毒素含量低于检出限的空白大米和花生两种样品, 分别添加 AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 为 1.00 μg/kg、5.00 μg/kg、10.00 μg/kg, AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 为 0.30 μg/kg、1.50 μg/kg、3.00 μg/kg 的 3 个加标水平, 每份 5 g, 各平行称取 6 份, 充分混匀并按本实验方法制备样品并进行回收测定, 黄曲霉毒素回收率为 86.7% ~ 97.2%, 相对标准偏差为 0.41% ~ 2.40%, 见表 1。

表 1 黄曲霉毒素的加标回收率和精密度 (n=6)

| 试样名称 | 组分名              | 加标值 (μg/kg) |      |       | 实测值 (μg/kg) |      |      | 平均回收率 (%) |      |      | 相对标准偏差 (%) |      |      |
|------|------------------|-------------|------|-------|-------------|------|------|-----------|------|------|------------|------|------|
|      |                  | 1           | 2    | 3     | 1           | 2    | 3    | 1         | 2    | 3    | 1          | 2    | 3    |
| 大米   | AFB <sub>1</sub> | 1.00        | 5.00 | 10.00 | 0.91        | 4.86 | 8.99 | 91.0      | 97.2 | 89.9 | 1.70       | 0.84 | 1.52 |
|      | AFB <sub>2</sub> | 0.30        | 1.50 | 3.00  | 0.27        | 1.37 | 2.68 | 90.0      | 91.3 | 89.3 | 0.41       | 0.92 | 0.41 |
|      | AFG <sub>1</sub> | 1.00        | 5.00 | 10.00 | 0.88        | 4.60 | 9.13 | 88.0      | 92.0 | 91.3 | 2.07       | 0.69 | 1.26 |
|      | AFG <sub>2</sub> | 0.30        | 1.50 | 3.00  | 0.28        | 1.30 | 2.76 | 93.3      | 86.7 | 92.0 | 1.41       | 0.83 | 1.02 |
| 花生   | AFB <sub>1</sub> | 1.00        | 5.00 | 10.00 | 0.89        | 4.73 | 9.33 | 89.0      | 94.6 | 93.3 | 1.04       | 0.44 | 0.93 |
|      | AFB <sub>2</sub> | 0.30        | 1.50 | 3.00  | 0.28        | 1.36 | 2.81 | 93.3      | 90.7 | 93.7 | 0.87       | 2.04 | 1.27 |
|      | AFG <sub>1</sub> | 1.00        | 5.00 | 10.00 | 0.96        | 4.72 | 8.81 | 96.0      | 94.4 | 88.1 | 2.24       | 1.36 | 2.40 |
|      | AFG <sub>2</sub> | 0.30        | 1.50 | 3.00  | 0.27        | 1.39 | 2.90 | 90.0      | 92.7 | 96.7 | 1.96       | 1.23 | 0.66 |

### 2.2 净化方法的选择

样品净化的主要目的是除去干扰物质。传统的硅胶柱、C<sub>18</sub> 微柱和液-液分配方法因其操作烦琐、有机溶剂用量大、提取效率低、净化效果差等缺点, 正面临着诸多新技术的挑战。目前, 专用于黄曲霉毒素分离纯化的免疫亲和柱 (IAC) [3,4] 和多功能净化柱 (MFC) [5] 技术得到了广泛应用。免疫亲和柱 (IAC) 是将特异性的 AFT 抗体与适当的固定相结合填柱而成, 选择性强, 灵敏度较高, 但价格也较高; 多功能净化柱 (MFC) 是一种特殊的 SPE 柱, 以极性、非极性、离子交换等多类基团组成填充剂, 可选择性吸附液中的脂类、蛋白类等杂质, AFT 不被吸附而直接通过。MFC 的操作更为简便, 不需要进行活化、淋洗和洗脱操作, 只需直接上样, 缩短了样品前处理时间, 净化效果理想, 而且价格相对较低。黄曲霉毒素的 FAPAS 质控样 (T04104) 分别使用 IAC 和 MFC 两种萃取柱进行净化, 最后按光化学衍生条件分析, 结果见表 2。

表 2 两种净化方法的质控样 (黄曲霉毒素) 测定结果 (μg/kg, n=6)

| 名称               | 质控样范围       | 多功能净化柱 (MFC) | 免疫亲和柱 (IAC) |
|------------------|-------------|--------------|-------------|
| AFB <sub>1</sub> | 0.99 - 2.55 | 1.91 - 2.12  | 1.65 - 1.97 |
| AFB <sub>2</sub> | 0.40 - 1.03 | 0.71 - 0.82  | 0.56 - 0.70 |
| AFG <sub>1</sub> | 1.04 - 2.68 | 1.96 - 2.20  | 1.55 - 1.93 |
| AFG <sub>2</sub> | 0.24 - 0.62 | 0.45 - 0.61  | 0.57 - 0.66 |

表 2 结果表明, 两种净化方法的结果均在质控要求之内, 结合操作步骤及价格因素, 本文选择多功能净化柱 (MFC)。

### 2.3 衍生化方法的选择

高效液相色谱法结合荧光检测器检测黄曲霉毒素是国际上流行的方法, 但黄曲霉毒素需要经过衍生化以后才能进行测定, 常采用柱前三氟醋酸衍生 [6]、柱后碘衍生 [3]、溴衍生 [4] 等, 但操作繁琐、消耗的溶剂量比较大。本实验采用光化学衍生, 即在紫外光的照射下, 利用流动相中的水作为衍生剂, 达到衍生效果。我们将黄曲霉毒素的 FAPAS 质控样 (T04104) 经 MFC 柱净化后分别按光化学衍生和碘衍生条件 [3] 分析, 结果见表 3。

表 3 两种衍生方法的质控样 (黄曲霉毒素) 测定结果 (μg/kg, n=6)

| 名称               | 质控样范围       | 光化学衍生       | 碘衍生         |
|------------------|-------------|-------------|-------------|
| AFB <sub>1</sub> | 0.99 - 2.55 | 1.91 - 2.12 | 2.21 - 2.41 |
| AFB <sub>2</sub> | 0.40 - 1.03 | 0.71 - 0.82 | 0.65 - 0.79 |
| AFG <sub>1</sub> | 1.04 - 2.68 | 1.96 - 2.20 | 1.71 - 1.92 |
| AFG <sub>2</sub> | 0.24 - 0.62 | 0.45 - 0.61 | 0.54 - 0.70 |

表 3 结果表明, 两种衍生化方法的结果均在质控要求之内, 而光化学衍生相对碘衍生方法无需使用任何化学试剂、反应时间和过高反应温度即可提供稳定的衍生反应, 且 AFT 衍生物产生的色谱峰尖锐, 响应信号好, 灵敏度高。本文选择光化学衍生方法测定。

(下转第 1869 页)

用总平均回收率的置信限( R/d) 衡量方法的准确度,若  $0.95 \leq R/d \leq 1.05$  则表示合格,即平均回收率在 95% ~ 105%<sup>[4]</sup>。通过对上述 4 种溶液检测结果分析计算(表 1、表 2) 联苯菊酯的 R/d=0.98,甲氰菊酯的 R/d=1.01,故平均回收率均为 95% ~ 105%。

3 结论

通过对色谱分离条件、前处理条件的优选,使用 Pesti-Carb/NH<sub>2</sub>SPE 柱经 6 ml 乙腈: 甲苯 = 3: 1 混合洗脱液净化,用气相色谱 ECD 检测器,以 OV-1701 毛细管柱测定蔬菜中联苯菊酯、甲氰菊酯,能获得较高灵敏度,同时也得到理想的重复性和回收率,适用于该类样品的测定。

表 1 联苯菊酯准确度实验结果\* ( μg/L)

|           | 检测结果 |      |      |      |      | 平均值  |
|-----------|------|------|------|------|------|------|
| 模拟样品加标(1) | 78.2 | 81.5 | 76.4 | 75.9 | 82.6 | 79.5 |
| 模拟样品(2)   | 41.0 | 43.1 | 39.5 | 37.2 | 42.0 | 40.6 |
| (1) — (2) | 37.2 | 38.4 | 36.9 | 38.7 | 40.6 | 38.4 |

注: \* R=38.4, 为平均回收;  $d = V2(C2 - C1) / (V1 + V2) = 39.2$ , d 为预期回收值,根据样品中联苯菊酯的平均质量浓度 C1 = 40.6 μg/L、加标用标准溶液的质量浓度 C2 = 2000 μg/L、加标用样品溶液的体积 V1 = 9.8 ml、加标用标准溶液的体积 V2 = 0.2 ml 求得; R/d=0.98。

(上接第 1866 页)

3 小结

本实验采用 MycoSep™ 226 多功能净化柱净化样品、柱后光化学衍生,研究建立了用高效液相色谱-荧光检测器检测食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的新方法。实验结果表明,该法操作简便、快速、净化效果好、灵敏度和准确度高,4 种组分色谱分离较好,适用于一般实验室开展日常食品监测和检测。

[参考文献]

[1] GB2761-2005. 食品中真菌毒素限量[S].  
[2] GB2715-2005. 粮食卫生标准[S].

表 2 甲氰菊酯准确度实验结果\* ( μg/L)

|           | 检测结果 |      |      |      |      | 平均值  |
|-----------|------|------|------|------|------|------|
| 模拟样品加标(1) | 86.3 | 87.1 | 82.2 | 87.8 | 82.8 | 85.2 |
| 模拟样品(2)   | 42.0 | 45.4 | 45.0 | 48.5 | 48.2 | 45.8 |
| (1) — (2) | 44.3 | 41.7 | 37.2 | 39.3 | 34.6 | 39.4 |

注: \* R=39.4, 为平均回收;  $d = V2(C2 - C1) / (V1 + V2) = 39.1$ , d 为预期回收值,根据样品中甲氰菊酯的平均质量浓度 C1 = 45.8 μg/L、加标用标准溶液的质量浓度 C2 = 2000 μg/L、加标用样品溶液的体积 V1 = 9.8 ml、加标用标准溶液的体积 V2 = 0.2 ml 求得; R/d=1.01。

[参考文献]

[1] 陈小华,汪群杰. 固相萃取技术与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 147-293.  
[2] 蒋定国,方从容,杨大进,等. 测定茶叶中 27 种有机氯和拟除虫菊酯农药多组分残留气相色谱法[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, 17(5): 386.  
[3] 夏玉宇. 化验员使用手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2001: 266.  
[4] 陈守健,鄂学礼,张宏陶. 水质分析质量控制[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 133.

(收稿日期: 2011-05-12)

[3] GB/T 18979-2003. 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[S].  
[4] Stroka J, Houst C V, Anklam E *et al.* Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography Using Post-column Bromination for Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Cattle Feed: Collaborative Study [J]. of AOAC International 2003 86(6): 1179-1186.  
[5] 朱孟丽. 用 MycoSep™ 净化柱和高效液相色谱法对谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 的测定[J]. 饲料工业 2006 27(3): 36-38.  
[6] SN0339-1995. 出口茶叶中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检验方法[S].

(收稿日期: 2011-05-16)