

# 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的高效液相色谱测定方法

王 君 刘秀梅

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘 要:**为建立同时测定食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的高效液相色谱测定方法,将碾磨后的试样经乙腈+水溶液提取、过滤后,以 MycoSep™ 净化柱净化,吹干净化液后,加入正己烷和三氟乙酸溶液衍生,反相色谱柱测定。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 能达到完全的基线分离,检出限分别为 0.012、0.008、0.036 和 0.024 μg/kg,不同水平的加标回收率均达 80% 以上, RSD 均小于 3.0%。该方法快速、准确、灵敏,有利于试验者安全,能同时分离食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>。

**关键词:**食品;黄曲霉毒素类;三氟乙酸;色谱法;高压液相

## High performance liquid chromatographic method for determination of Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in foods

WANG Jun, LIU Xiu-mei

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** To simultaneously determine Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in foods and be safe to the operator, a rapid method was established. The milled food sample was extracted with acetonitrile/water, and filtrated, then the filtrated liquid was purified with MycoSep™ columns and dried by blowing. Then n-hexane and Trifluoroacetic acid (TFA) were added to the dried purified liquid, and determination by reversed-phase HPLC. Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> could be completely separated at the same time, and the detection limits were 0.012, 0.008, 0.036 and 0.024 μg/kg respectively. The recovery rates of different spiked levels for Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> were more than 80%, and the relative standard deviation (RSD) were less than 3.0%. The method was rapid, accurate, sensitive and safe for determining Aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> at the same time.

**Key word:** Food; Aflatoxins; Trifluoroacetic Acid; Chromatography, High pressure Liquid

随着科学技术和研究的不断深入,人们发现仅以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (Aflatoxin B<sub>1</sub>, AFB<sub>1</sub>) 这一指标并不能真正反映食品中黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFs) 的污染水平,目前认为至少要同时了解黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> (Aflatoxin B<sub>2</sub>, AFB<sub>2</sub>)、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> (Aflatoxin G<sub>1</sub>, AFG<sub>1</sub>)、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> (Aflatoxin G<sub>2</sub>, AFG<sub>2</sub>) 的含量才能掌握食品中 AFs 的污染情况。因此,建立同时测定食品中 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的方法对于食品安全的监督管理十分必要。薄层色谱法 (thin-layer chromatography, TLC) 是检测黄曲霉毒素的常用方法,虽然所用仪器和操作简单,但灵敏度不高。20 世纪 90 年代, AOAC INTERNATIONAL 开始将酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent

assay, ELISA)、免疫亲和柱法、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 用于检测黄曲霉毒素。我国于 20 世纪 70 年代初开始建立检测各种食品中 AFB<sub>1</sub> 和 AFB<sub>2</sub> 的方法,目前主要有 TLC 法、ELISA 法、HPLC 法等。但传统的液-液分配法和近年来广泛应用的固相萃取柱和免疫亲和柱技术<sup>[1-4]</sup>对试样的前处理复杂费时,需要多种有机试剂,不利于试验者的身体健康。而 MycoSep™ 多功能净化柱仅需要一个简单的“推柱”步骤就可完成试样的前处理,大大减少了有机试剂的用量,已经开始用于各种谷物、淀粉、动物饲料、食品、坚果以及棉籽等试样的净化处理。

### 1 材料和方法

1.1 试剂 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 标准品 购自

作者简介:王君 女 博士生

Romer Labs, 纯度 > 99%。乙腈: Fisher, 色谱纯、分析纯。三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA): Sigma, 分析纯。正己烷: Fisher, 分析纯。水 电阻率为 18.2 M $\cdot$ cm。乙腈 + 水(84 + 16)提取液: 量取乙腈(分析纯)840 ml, 加水 160 ml, 混匀。水 + 乙腈(85 + 15)溶液: 量取乙腈(色谱纯) 150 ml, 加三蒸水 850 ml, 混匀。标准储备液: 分别称取 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 0.020、0.005、0.020、0.005 g(精确至 0.0001 g), 置 10 ml 量瓶中, 加乙腈溶解, 并稀释至刻度。标准工作液: 准确移取标准储备液 1 ml 至 10 ml 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度。标准系列溶液: 准确移取标准工作液适量至 10 ml 量瓶中, 加乙腈稀释至刻度(含 AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 的浓度为 0.000、0.500、1.000、3.000、5.000、10.000、25.000、50.000、100.000  $\mu$ g/L 的系列标准溶液; AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 的浓度为 0.000、0.125、0.250、0.750、1.250、2.500、6.250、12.500、25.000  $\mu$ g/L 的系列标准溶液)。

1.2 仪器 液相色谱系统 waters 公司, 配备荧光检测器; 色谱柱 Hypersil ODS (125 mm  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu$ m); 多功能净化柱: Romer Labs, Mycosep<sup>TM</sup> 228。

### 1.3 试样前处理

1.3.1 试样提取 称取 20 g 碾磨后的试样至 250 ml 的三角瓶中, 加入 80 ml 乙腈 + 水(84 + 16)溶液, 在电动振荡器上混匀 30 min 后, 定性滤纸过滤。

1.3.2 试样净化 移取 8 ml 提取液至净化柱的玻璃管内, 将净化柱的填料管插入玻璃管中并缓慢推动填料管, 收集净化液到净化柱的收集池中。

1.3.3 试样衍生化 从净化柱的收集池内转移 2 ml 净化液到衍生瓶中, 在真空吹干机下 60 $^{\circ}$  吹干(或在 60 $^{\circ}$  水浴下氮气吹干, 注意不要使液体鼓泡、飞溅)。加入 200  $\mu$ l 正己烷和 100  $\mu$ l TFA, 密闭混匀 30 s 后, 在 40 $^{\circ}$  烘干炉中衍生 15 min。室温真空吹干机吹干(或室温水浴下氮气吹干, 注意不要使液体鼓泡、飞溅), 以 200  $\mu$ l 水 + 乙腈(85 + 15)溶解, 混匀 30s, 1 000 r/min 离心 15 min, 取上清液至液相色谱仪的试样瓶中, 供测定用(试样的提取、净化、衍生需在通风橱内进行)<sup>[2]</sup>。

1.3.4 标准系列溶液的制备 吸取标准系列溶液各 200  $\mu$ l, 在真空吹干机下 60 $^{\circ}$  吹干(或在 60 $^{\circ}$  水浴下氮气吹干, 注意不要使液体鼓泡、飞溅), 衍生化方法相同(1.3.3)。

### 1.4 测定

1.4.1 色谱条件 色谱柱: 12.5 cm  $\times$  2.1 mm, 5  $\mu$ m, C<sub>18</sub>, 柱温: 30 $^{\circ}$ , 流动相: 乙腈(色谱纯), 水, 梯度洗脱的变化可参考表 1。调整洗脱梯度, 使 4 种黄曲霉毒素的保留时间在 4 ~ 25 min。流速: 0.5 ml/min。

进样量: 25  $\mu$ l。荧光检测器: 激发波长: 360 nm, 发射波长: 440 nm。

表 1 流动相的梯度变化

时间(min)	乙腈	水
0.00	15.0	85.0
6.00	17.0	83.0
8.00	25.0	75.0
14.00	15.0	85.0

## 2 结果

2.1 校正曲线和色谱图 按 1.3.4 制备标准系列溶液, 图 1 为 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 含量分别为 25、6.25、25、6.25 ng/ml 的标准品在上述色谱条件下产生的色谱图。校正曲线 AFB<sub>1</sub>:  $y = 16.036x - 5.0059$ ,  $R^2 = 0.9994$ ; AFB<sub>2</sub>:  $y = 19.14x + 0.0177$ ,  $R^2 = 0.9997$ ; AFG<sub>1</sub>:  $y = 4.8117x - 2.3521$ ,  $R^2 = 0.9992$ ; AFG<sub>2</sub>:  $y = 7.6655x - 0.1284$ ,  $R^2 = 0.9997$ 。

2.2 检出限 在信噪比为 3:1 时, 算得 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的检出限分别为 0.030、0.020、0.090、0.060  $\mu$ g/L。当试样的取样量为 20 g 时, AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的检出限分别为 0.012、0.008、0.036、0.024  $\mu$ g/kg。

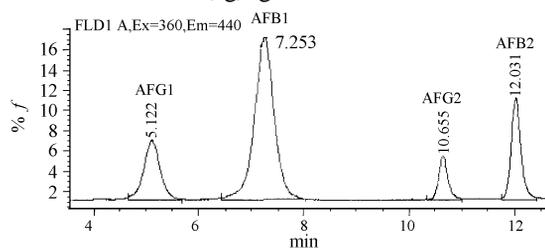


图 1 黄曲霉毒素的色谱图

2.3 加标回收率和精密度 选取黄曲霉毒素含量低于检出限的大米、花生试样, 分别平行称取 3 份, 每份 20 g, 按 AFB<sub>1</sub>、AFG<sub>1</sub> 的 3 次加标水平分别为 1.00、10.00、32.00 ng/g, AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>2</sub> 的 3 次加标水平分别为 0.25、2.50、8.00 ng/g 加入标准品, 充分混匀, 并按前述过程前处理试样, 进行高效液相色谱测定。结果见表 2(3 次加标水平由低到高分别记为: 、 、 )。

2.4 试样测定 利用本研究建立的方法, 分别检测了 74 份玉米、66 份花生和 84 份大米, 玉米中未发现 AFG<sub>2</sub> 的污染, AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 的阳性率分别为 62.16%、55.41%、12.16%; 花生中 AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub> 的阳性率分别为 15.15%、9.09%、7.58% 和 6.06%; 大米中未发现 AFG<sub>2</sub> 的污染, AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 的阳性率分别为 19.05%、3.57% 和 8.33%(见表 3)。

表2 黄曲霉毒素的加标回收率和精密度

试样名称	黄曲霉毒素	试验次数			加标回收率(%)			RSD %		
大米	AFB <sub>1</sub>	9	9	9	83.93	85.80	85.17	2.26	1.21	0.87
	AFB <sub>2</sub>	9	9	9	91.16	94.36	93.87	1.73	1.08	1.08
	AFG <sub>1</sub>	9	9	8	83.67	81.23	84.00	2.08	2.81	0.58
	AFG <sub>2</sub>	9	9	9	92.13	96.37	94.90	2.68	1.00	1.43
花生	AFB <sub>1</sub>	9	8	8	85.20	94.53	82.13	1.21	1.45	1.15
	AFB <sub>2</sub>	9	8	8	91.40	95.80	97.53	2.42	0.86	1.01
	AFG <sub>1</sub>	9	8	8	93.27	86.30	80.97	0.68	0.84	0.55
	AFG <sub>2</sub>	9	8	8	93.83	95.90	95.60	1.45	1.14	0.61

表3 玉米、花生、大米中黄曲霉毒素的污染情况

试样种类	试样数量	AFB <sub>1</sub>		AFB <sub>2</sub>		AFG <sub>1</sub>		AFG <sub>2</sub>		AFs	
		阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)	阳性数	阳性率(%)
玉米	74	46	62.16	41	55.41	9	12.16	0	0.00	52	70.27
花生	66	10	15.15	6	9.09	5	7.58	4	6.06	16	24.24
大米	84	16	19.05	3	3.57	7	8.33	0	0.00	23	27.38

### 3 讨论

本研究参考 AOAC 994.08<sup>[5]</sup> 方法,可以在 30 s 内去除试样中的干扰物质,方法的回收率和精密度均较好,同时简化了试样前处理过程中的净化步骤,大大减少了有机试剂的用量,更大程度地保护了试验者的健康。

利用本方法对大米、玉米、花生的测定发现,玉米受黄曲霉毒素的污染最严重,不仅污染率高(70.27%),而且含量也高,有 11 份玉米的含量超过 20.0 μg/kg,按照新颁国家标准(GB 2761—2005)中对 AFB<sub>1</sub> 的限量要求<sup>[6]</sup>,超标率为 14.86%。花生的污染情况仅次于玉米,有 2 份超出国家标准限量,超标率为 3.03%。大米的污染情况较轻,全部符合国家标准。以上结果提示今后应重点加强玉米和花生中黄曲霉毒素污染的监测和控制。

高效液相色谱柱后衍生荧光检测花生中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> [J]. 色谱, 2004, 22(6): 658.

- [2] 冯建蕾,许梓荣,史莹华. HPLC 法检测发酵玉米粉中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> [J]. 饲料工业, 2004, 25(7): 37-39.
- [3] 张鹏,张艺兵. 免疫亲和柱净化、在线电化学衍生化高效液相色谱法检测花生中的黄曲霉毒素 [J]. 色谱, 2000, 18(1): 82-84.
- [4] 李佐卿,谢东华. 免疫亲和柱 HPLC 荧光检测酒中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> [J]. 光谱实验室, 2001, 18(1): 28-31.
- [5] William Horwitz. In: AOAC Ed. AOAC Official Method 994.08: Aflatoxins in corn, almonds, brazil nuts, peanuts, and pistachio Nuts [M]. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th Edition Volume, Chapter 49, 26-27.
- [6] GB 2761—2005. 食品中真菌毒素限量[S].

[收稿日期: 2005-08-02]

### 参考文献

- [1] 于彦彬,万述伟,谭培功,等. OASIS-R HLB 固相萃取 -

中图分类号: R15; Q949.32; O657.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2005)06-0498-03