

使用超高效液相色谱和荧光检测器无需衍生快速检测黄曲霉毒素

Mark E. Benvenuti, Alice J. Di Gioia
沃特世公司, 美国马萨诸塞州米尔福德

前言

黄曲霉毒素是由黄曲霉菌和寄生曲霉菌产生的一组真菌毒素代谢物。在多种食物中都有发现, 诸如谷物, 坚果, 香料, 和乳制品。有四种主要天然存在的黄曲霉毒素 B1, B2, G1, 和 G2。奶牛食用被污染的谷物后代谢产生第三亚类 M1 和 M2。这会导致乳制品污染。这些化合物的结构如图 1。本研究未涉及 M2。

黄曲霉毒素有毒, 且对人类和动物有致癌作用, B1 和 G1 毒性大于 B2 和 G2¹。由于这种毒性, 政府管理部门出台法规强制性严格限制它们在食物中的含量。出于这些原因, 食品行业需要灵敏、精确、可重复的方法来检测这些分析物。这些方法主要基于配有荧光检测器的反相高效液相色谱。然而, 因为反相洗脱液会淬灭黄曲霉毒素 B1 和 G1 的荧光效应, 通常需要衍生以增强这些分析物的反应。典型的选择是用三氟乙酸进行柱前衍生, 以及用碘液法, 电化学衍生溴法², 或光化学 UV 衍生法进行柱后衍生³。

本应用介绍了一种用于分析黄曲霉毒素的方法, 使用 Vicam® AflaTest® 免疫亲和柱和一个单独检测器, Waters® ACQUITY UPLC® 荧光 (FLR) 检测器含大体积流通池, 无需衍生即得到谷类食品、谷物、坚果和其他食物中黄曲霉毒素的含量。无需另购买一套柱后衍生系统。因此总体的安装、操作和维护都更加方便。

实验

UPLC 条件

LC 系统: 含 FLR 检测器的 ACQUITY UPLC 系统

流通池: FLR 大体积流通池 (部件号 205000609)

色谱柱: ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱

2.1 x 100 mm, 1.7 μm

(部件号 186002352)

柱温: 30 °C

流速: 400 μL/min

流动相: 64:18:18 水/甲醇/乙腈

进样量: 20 微升 (满环)

运行时间: 4.5 分钟

检测器: 荧光检测器

数据率/滤光片设置: 20 pts/sec, PMT: 10,

持续时间: 0.2 秒 (normal)

激发波长: 365 nm

发射波长: 429 nm, 黄曲霉毒素 M1, B2, B1

455 nm, 黄曲霉毒素 G2, G1

弱洗针液: 3:1:1 水/甲醇/乙腈

(1000 μL)

强洗针液: 5:1:1 乙腈/异丙醇/水 (500 μL)

软件: Empower™ 2

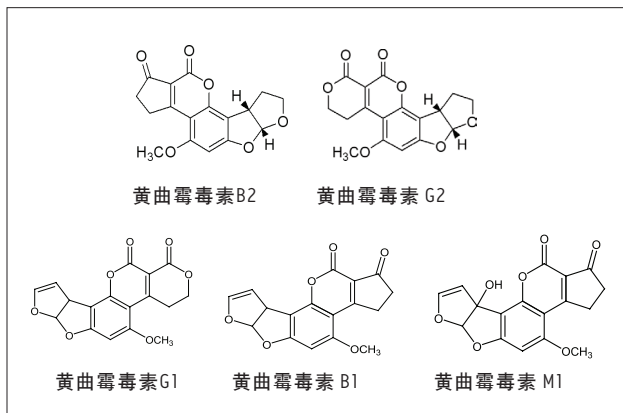


表 1 黄曲霉毒素结构。

标准品制备

溶于乙腈的两个标准品混合物购买自Supelco:黄曲霉毒素 M1 ~百万分之10.0(ppm) (46319- U),B1和G1~1.0 ppm, B2 和 G2~0.3 ppm (46304-U)。

实际认证值用于计算浓度。三种中间储备液制备: 1:100 和1:1000甲醇稀释B和G混合物, 1:1000甲醇稀释M。这些储备液用1%乙酸水溶液稀释, 制备5种标准品混合物, 浓度如表1所示。

#	M1	G2	G1	B2	B1
1	61.13	3.47	12.89	4.02	12.63
2	122.26	6.93	25.78	8.03	25.25
3	244.52	13.85	51.55	16.05	50.50
4	1222.26	69.25	257.75	80.25	252.50
5	2445.12	138.50	515.50	160.50	505.00

表1 标准品浓度万亿分之一 (ppt)。

样本制备: 4

一份谷物食品样本分为2份, 每份25 g。一份作为空白样本。另一份添加表2中列出浓度的黄曲霉毒素标准品。然后对两份样本进行下面的样本前处理过程。

使用搅拌器, 将25 g样本, 5 g 氯化钠和100 mL 80:20甲醇: 水 (HPLC级), 高速搅拌1分钟。

- 用有槽的Whatman滤纸过滤混合物(滤液1)。
- 用40mL水和10mL 滤液1混合
- 使用玻璃纤维滤纸过滤(滤液2)
- 10mL滤液2加入Vicam AflaTest WB 免疫亲和柱
- 10mLHPLC级水淋洗2次。
- 1mLHPLC级甲醇洗脱。
- 用1%乙酸水溶液1:1稀释, 待上机。

结果和讨论：

图2 表示5种标准品连续进样3次叠加色谱图。所有被分析物的线性系数(R2)都超过0.999。表3是未加标准品和添加标准品的谷类食品叠加色谱图。下方色谱图(未加标准品的谷类食品)显示没有污染。食品类检测限是黄曲霉毒素B和G总量< 20 ppb^{5、6和7}。表2是回收率。

分析物	标准品(ppt)	回收(ppt)	回收率(%)
M1	132.89	112.40	84.58
G2	6.93	4.33	62.48
G1	25.78	22.51	87.32
B2	8.03	6.89	85.80
B1	25.25	27.75	109.90

表2 谷类食品回收率(万亿分之一)。

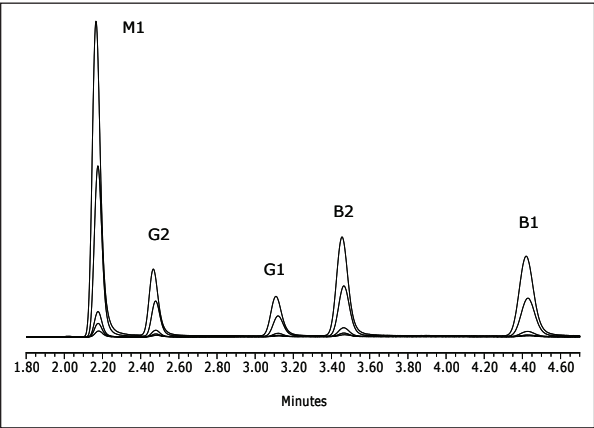


图2 标准品混合物1到5叠加色谱图。

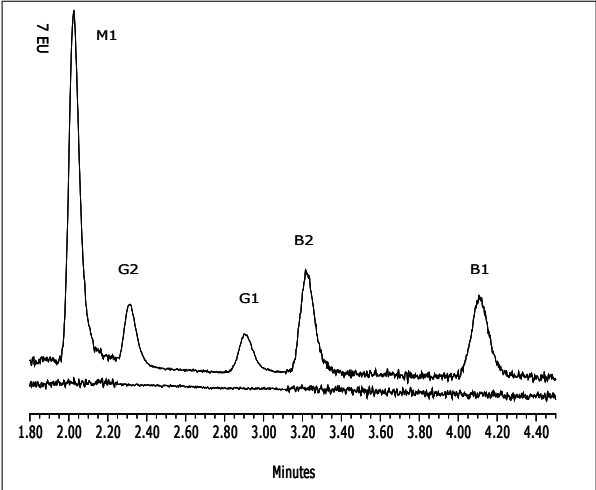


图3 添加标准品和未添加标准品的谷类食品叠加色谱图。

结论

使用ACQUITY UPLC FLR 检测器替代HPLC，最大的好处是：分析运行时间从12.0min降到4.5min⁷，同时仪器操作更简便。淘汰柱后衍生系统，和由柱后衍生系统带来的体积增加引起的谱带展宽现象，使得峰形更尖锐、信噪比更高，能够更精确地定量。仪器硬件更少，无需做过多的培训，故障维修和保养。

ACQUITY UPLC FLR检测器，带有大体积流通池，无需柱后衍生就可以使黄曲霉毒素B1、和G1达到满足定量限的分析灵敏度。由于该方法线性范围(R²> 0.999)大于2个数量级，而且五种黄曲霉毒素添加到谷类食品样本中的回收率也符合要求，分析实验室人员在样本前处理过程和分析方法学方面能够拥有较高可信度。这一套方法学能够同时应用于其他真菌毒素，诸如玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素-A。

除以上描述的优势之外，溶剂消耗量相比HPLC减少85%。当管理乙腈用量时，特别是在供应有限的情况下，这一点就特别重要。

致谢:

我们特此感谢Marjorie Radlo、Nancy Zabe和Waters Vicam的员工对此项研究工作的支持。

参考文献:

1. Fungal Toxins Economic Health and Techno – Commercial Implications, Frost and Sullivan, 2001 p. 29.
2. Kok, W Th. Derivatization Reactions for the Determination of Aflatoxins by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection, Journal of Chromatography B. 659: (1994) pp 127-137.
3. Joshua et al, The Simultaneous HPLC Determination of Six Aflatoxins, Zearalenone and Ochratoxin-A Using Gradient Elution. Post Column Photochemical Derivatization and Fluorescence Detection. Presented at the 110th AOAC International Meeting and Exposition, September 8-12, 1996, Orlando, FL.
4. Vicam AflaTest HPLC Instruction Manual p.11 (modified as described) #715001733 Rev. A 2007.
- 5 Council for Agricultural Science and Technology, Mycotoxins: Risks in Plants, Animals, and Human Systems. January, 2003 p. 127.
6. EU Commission Regulation 1881/2006/E.
- 7 M Benvenuti et al. A Unified Method for Mixed Mycotoxin Analysis Using UV and Fluorescence Detection Waters Poster #720000908EN, (2004)

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™



Waters, ACQUITY, ACQUITY UPLC, Vicam, 和 AflaTest 是沃特世公司的注册商标。所有其他商标属于各自的所有者。

©2011 沃特世公司
2011年8月 720002644ZH

沃特世科技(上海)有限公司
上海市浦东新区张东路1387号41栋
邮编: 201203
电话: 021-6156 2666
传真: 021-6879 4588
www.waters.com