

黄曲霉毒素 B1B2G1G2 的 HPLC 分析解决方案

前言

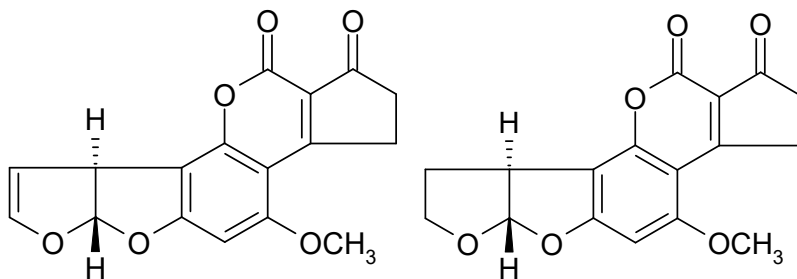
● 什么是黄曲霉毒素

黄曲霉毒素(Aflatoxins)是生长在食物及饲料中的黄曲霉和寄生曲霉代谢的一组化学结构类似的产物，目前已分离鉴定出的黄曲霉毒素有 17 种，主要是黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 以及由 B₁ 和 B₂ 在体内经过羟化而衍生出的代谢产物 M₁、M₂ 等。

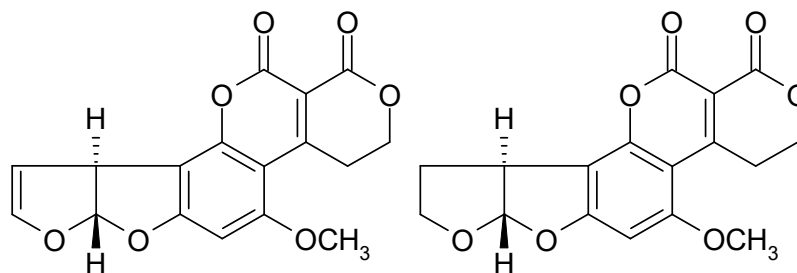
● 黄曲霉毒素性质

黄曲霉毒素是一种毒性极强的物质。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用，严重时可导致肝癌甚至死亡。在天然污染的食品中，以黄曲霉毒素 B₁ 最为多见，其毒性和致癌性也最强。生产企业如果使用劣质的原料，如发霉的花生、菜籽、玉米等生产食用油，则有可能造成黄曲霉毒素超标。

● 黄曲霉毒素结构



黄曲霉毒素 B₁ 黄曲霉毒素 B₂



黄曲霉毒素 G₁ 黄曲霉毒素 G₂

图 2-1 四种常见的黄曲霉毒素

● 对于粮食及粮食加工业的危害

粮食作物含营养物质丰富，主要为蛋白质、维生素、膳食纤维、脂肪等。民以食为天，如果粮食被污染，从而以粮食为主成分的各种相关的产品，包括油及其他食品等使用已经污染的粮食作为原料，产成品也会间接受到污染，将会严重影响人们的身体健康，甚至造成危害。因此，粮食系统的安全至关重要。

粮食在生产储存过程中，特别是在一些湿热环境中时，受到环境条件的影响而产生的各种真菌毒素类化合物，可能会产生对人体有危害的黄曲霉毒素。

● 检测方法

目前黄曲霉毒素的衍生检测方法较多，大多数为柱前三氟乙酸衍生或柱后碘化学衍生，但这些衍生方法由于衍生试剂配制繁琐，仪器操作复杂，越来越多的被光化学衍生所取代。与化学衍生法相比，光化学柱后衍生器具有使用操作方便，无需衍生试剂，避免有毒试剂的接触，环境友好等优点。

光化学衍生原理，是将原本荧光较弱的 B_1 及 G_1 装变为 B_{2a} 及 G_{2a} ，提高其荧光检测，继而提高检测灵敏度，其可能的反应式如图 2-2 及图 2-3 所示。

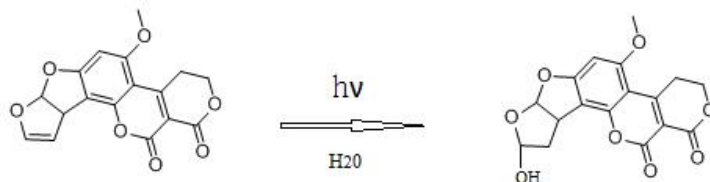


图 2-2 黄曲霉毒素 G_1 衍生前后结构式

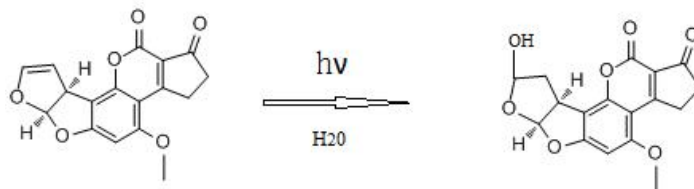


图 2-3 黄曲霉毒素 B_1 衍生前后结构式

上海舜宇恒平科学仪器有限公司，结合 GB/T 5009.23-2006《食品中黄曲霉毒素 B_1 、 B_2 、 G_1 、 G_2 的测定》，提出了粮食及粮食加工业中黄曲霉毒素分析的全套解决方案。为粮食及粮食加工业中黄曲霉毒素检测提供了包括从前处理设备、试剂、前处理方法直至到液相色谱方法的全套分析解决方案。相关人员可参考本实验中的方法，进行粮食及粮食加工业中黄曲霉毒素的检测。

仪器设备与试剂

表1-1(a) 高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量
1	紫外-可见检测器(选配)	1台
2	高压恒流泵	1台
3	色谱柱恒温箱(选配)	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	阀支架	1个
6	W5100色谱数据工作站	1套
7	梯度混合器(选配)	1个
8	溶剂托盘	1台
9	C18 5 μ m色谱柱	1支
10	荧光检测器	1台
11	AD适配器	1套
12	光化学柱后衍生器	1套
13	自动进样器(选配)	1台
14	在线脱气机(选配)	1台

表1-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	氯化钠	分析纯
4	去离子水	18.2M Ω
5	黄曲霉毒素混标标准溶液	百灵威

表1-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	

5	试验筛	二号筛	
6	精密电子天平	感量为万分之一	称量
7	高速均质器	转速大于10000r/min	
8	免疫亲和柱	黄曲霉毒素免疫亲和柱	
9	泵流操作架	配套免疫亲和柱	含空气泵

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、滤膜等若干。

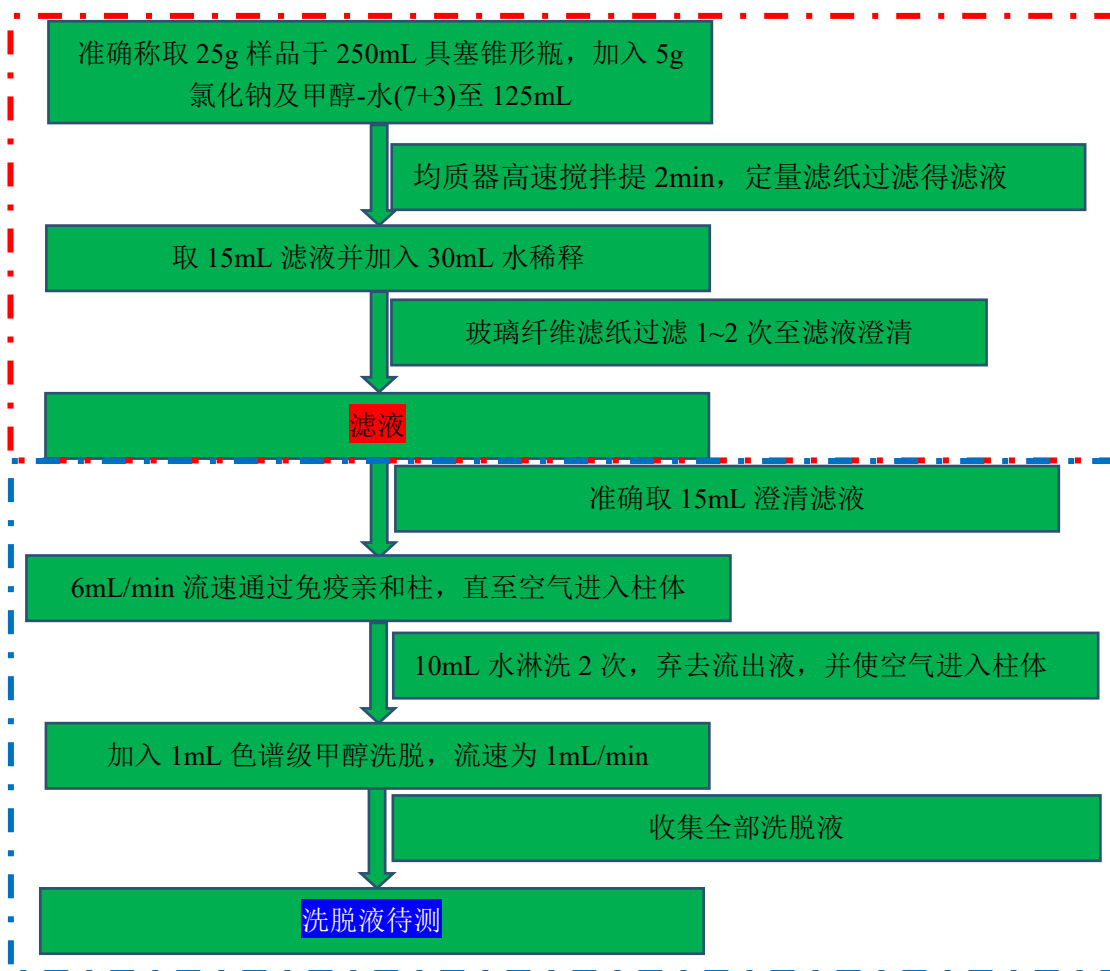
实验方法

● 标准溶液配制

黄曲霉毒素混标标准储备液(100 μ g/L): 黄曲霉毒素混标样品(约 5mL)置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇定容。

黄曲霉混标标准工作液: 用流动相稀释黄曲霉混标标准储备液分别配置的黄曲霉混标标准工作液。如其中 B₁、G₁ 浓度为 20.0 μ g/L, 10.0 μ g/L, 6.0 μ g/L, 2.0 μ g/L, 0.6 μ g/L, 0.2 μ g/L。而相对应 B₂、G₂ 浓度为 6.0 μ g/L, 3.0 μ g/L, 1.8 μ g/L, 0.6 μ g/L, 0.18 μ g/L, 0.06 μ g/L。

● 样品前处理



● 色谱条件

流动相：甲醇:乙腈:水=20:20:60(V:V:V)

色谱柱：SinoChrom ODS-BP5 μ m4.6 $\times$ 200mm

流速：0.8mL/min

检测波长：激发 360nm，发射 450nm

进样量：20 μ L

柱温：室温

实验结果

● 典型分离色谱图

进样分析浓度为20.0 μ g/L(B_1 、 G_1)的黄曲霉毒素标准工作液，使用2.3.3中的色谱条件，结果如下图所示。

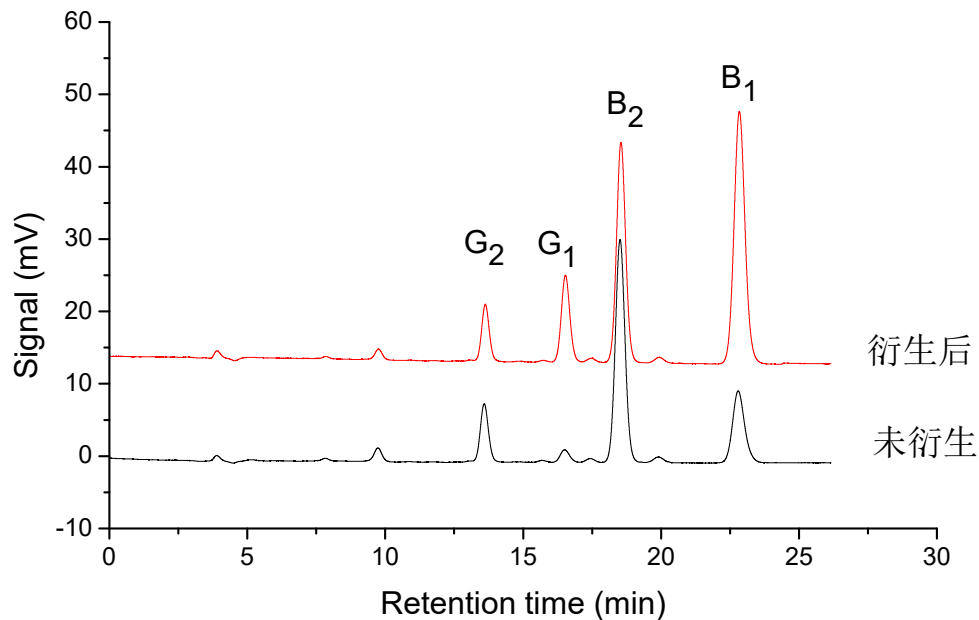


图2-4 黄曲霉毒素标准溶液衍生色谱图

表 2-4 衍生结果对比

	未衍生			衍生		
	峰面积(mV·sev)	峰高(mV)	噪声(mV)	峰面积(mV·sev)	峰高(mV)	噪声(mV)
G_2	160.22	7.98	0.025	149.77	7.82	0.025
G_1	39.49	1.72		256.92	11.92	
B_2	752.59	30.79		711.06	30.43	
B_1	295.13	9.87		982.48	34.92	

使用光化学衍生器后， B_1 及 G_1 的响应值较使用前明显增加。其中 G_1 峰面积和峰高增加约 7 倍， B_1 峰面积和峰高增加约 3.5 倍。但对 B_2 及 G_2 的响应值变化较小，基本可以忽略。

而对于噪声的影响，使用光化学衍生器前后，噪声基本保持不变，因此， B_1 及 G_1 灵敏度能够分别提高约 7 倍和 3.5 倍。

● 线性范围与检出限

将黄曲霉毒素标准工作溶液，按 2.3.3 中色谱条件进行光化学衍生后的分析，黄曲霉毒素的线性及检出限如下表所示。

表 2-5 线性方程

黄曲霉毒素	线性方程	线性相关系数 R
G ₂	$y = 22.185x - 0.3282$	0.99990
G ₁	$y = 23.547x + 1.0349$	0.99987
B ₂	$y = 33.410x + 1.6965$	0.99984
B ₁	$y = 41.875x + 3.3725$	0.99994

从上表可知，黄曲霉毒素光化学系统衍生效果良好，B₁、G₁浓度在0.2μg/L到20.0μg/L，B₂、G₂浓度在0.06μg/L到6.0μg/L线性范围内线性相关系数均大于0.999。

以 3 倍信噪比对应的浓度换算为仪器的检出限，以 10 倍信噪比对应的浓度为仪器的定量限。计算 4 种黄曲霉毒素的检出限及定量限，结果如下表所示。

表2-6 检出限对比

黄曲霉毒素	方法检出限(μg/kg)	GB/T 5009.23-2006 (μg/kg)
G ₂	0.03	0.05
G ₁	0.08	0.20
B ₂	0.01	0.05
B ₁	0.03	0.20

从以上结果可知，光化学系统衍生后的黄曲霉毒素检测的灵敏度明显低于国标中的要求，完全符合定量要求。

● 实际样品

市场购买相关粮食，按本文中提到的方法并进行了分析，结果如下所示。

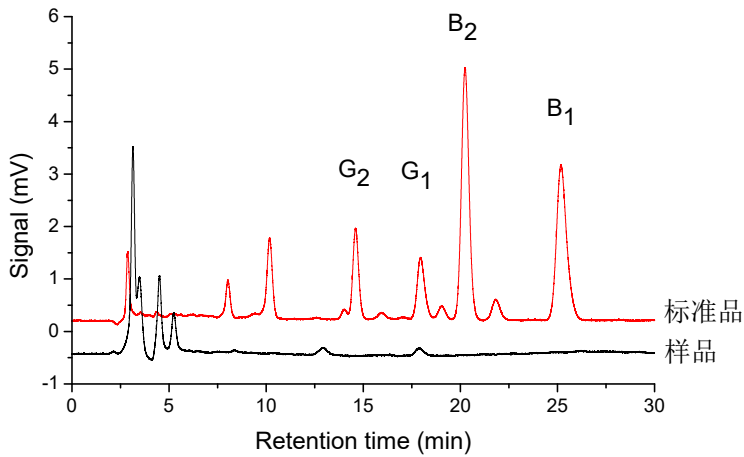


图 2-5 玉米样品

表 2-7 玉米样品

黄曲霉毒素	浓度(μg/L)	含量(μg/kg)
G ₂	未检出	未检出
G ₁	0.08	0.08

B ₂	未检出	未检出
B ₁	未检出	未检出

参考文献

[1]GBT 5009.23-2006 《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂的测定》。

第 1 章 黄曲霉毒素 B₁ 的 HPLC 分析解决方案

3.1 前言

3.1.1 标准溶液配制

黄曲霉毒素(Aflatoxins)是生长在食物及饲料中的黄曲霉和寄生曲霉代谢的一组化学结构类似的产物，目前已分离鉴定出的黄曲霉毒素有 17 种，主要是黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 以及由 B₁ 和 B₂ 在体内经过羟化而衍生出的代谢产物 M₁、M₂ 等。

3.1.2 黄曲霉毒素 B₁ 性质及危害

黄曲霉毒素 B₁ 是二氢呋喃氧杂萜邻酮的衍生物，是已知的化学物质中致癌性最强的一种。黄曲霉毒素 B₁ 的急性毒性是氰化钾的 10 倍，砒霜的 68 倍，慢性毒性可诱发癌变，致癌能力为二甲基亚硝胺的 75 倍，人的原发性肝癌也很可能与黄曲霉毒素有关，其毒性作用主要是对肝脏的损害。

粮食在生产储存过程中，一般以热带和亚热带等南方高温、高湿地区受污染最为严重，在天然食物中以黄曲霉毒素 B₁ 最为多见，危害性也最强，国家质检总局规定黄曲霉毒素 B₁ 是大部分食品的必检项目之一。生产企业如果使用劣质的原料，如发霉的花生、菜籽、玉米等生产食用油，则有可能造成黄曲霉毒素超标。

3.1.3 黄曲霉毒素 B₁ 结构

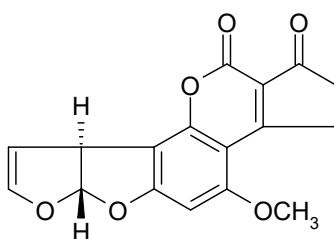


图 3-1 黄曲霉毒素 B₁

3.1.4 检测方法

目前黄曲霉毒素 B₁ 的衍生检测方法较多，大多数为柱前三氟乙酸衍生或柱后碘化学衍生，但这些衍生方法由于衍生试剂配制繁琐，仪器操作复杂，越来越多的被光化学衍生所取

代。与化学衍生法相比，光化学柱后衍生器具有使用操作方便，无需衍生试剂，避免有毒试剂的接触，环境友好等优点。

光化学衍生原理，是将原本荧光较弱的 B₁ 转变为 B_{2a}，提高其荧光检测，继而提高检测灵敏度，其可能的反应式如图 3-2 所示。

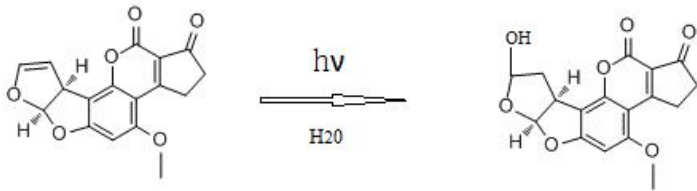


图 3-2 黄曲霉毒素 B₁ 衍生前后结构式

结合 GB/T 5009.23-2006《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定》及 GB/T 5009.22-2003《食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定》，提出了粮食及粮食加工业中黄曲霉毒素 B₁ 分析的全套解决方案。为粮食及粮食加工业中黄曲霉毒素 B₁ 检测提供了包括从前处理设备、试剂、前处理方法直至到液相色谱方法的全套分析解决方案。相关人员可参考本实验中的方法，进行粮食及粮食加工业中黄曲霉毒素 B₁ 的检测。

3.2 仪器设备与试剂

表3-1高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量
1	紫外-可见检测器(选配)	1台
2	高压恒流泵	1台
3	色谱柱恒温箱(选配)	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	阀支架	1个
6	W5100色谱数据工作站	1套
7	梯度混合器(选配)	1个
8	溶剂托盘	1台
9	C18 5μm色谱柱	1支
10	荧光检测器	1台
11	AD适配器	1套
12	光化学衍生器	1套
13	自动进样器(选配)	1台
14	在线脱气机(选配)	1台

表3-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	氯化钠	分析纯
4	去离子水	18.2MΩ
5	黄曲霉毒素B ₁ 标准溶液	百灵威

表3-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa, 160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	
5	试验筛	20目	
6	精密电子天平	感量为万分之一	称量
7	高速均质器	转速大于10000r/min	
8	免疫亲和柱	黄曲霉毒素B ₁ 免疫亲和柱	
9	泵流操作架		含空气泵

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL、2mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000μL, 0~5000μL)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、滤膜等若干。

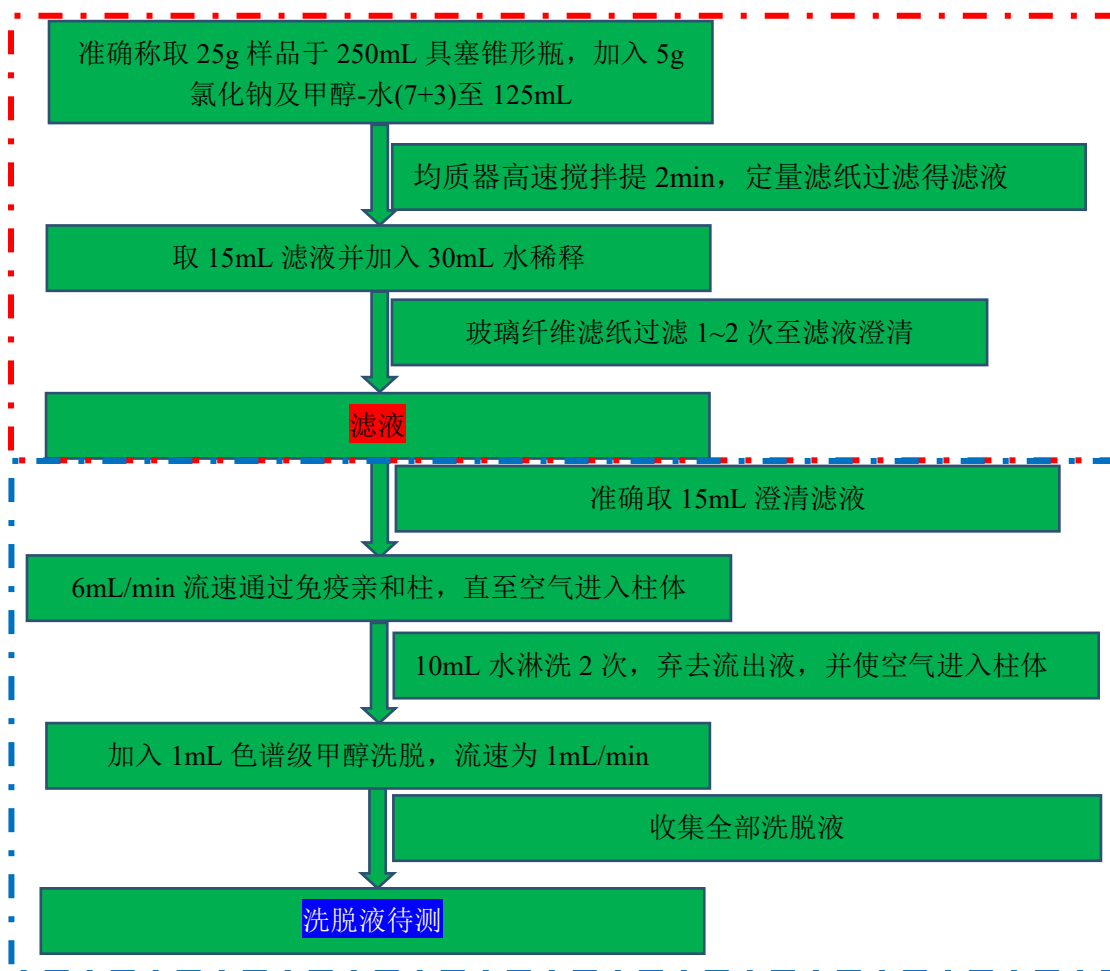
3.3 实验方法

3.3.1 标准溶液配制

黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液(100μg/L):黄曲霉毒素 B₁ 样品(约 5mL)置于 50mL 容量瓶中, 用甲醇定容。

黄曲霉毒素 B₁ 标准工作液:用流动相稀释黄曲霉混标标准储备液分别配置的黄曲霉混标标准工作液。如其中 B₁ 浓度为 20.0μg/L, 10.0μg/L, 4.0μg/L, 2.0μg/L, 1.0μg/L, 0.5μg/L, 0.2μg/L。

3.3.2 样品前处理



3.3.3 色谱条件

流动相：甲醇:乙腈:水=20:20:60(V:V:V)

色谱柱：SinoChrom ODS-BP5 μ m4.6 $\times$ 200mm

流速：0.8mL/min

检测波长：激发 360nm，发射 450nm

进样量：20 μ L

柱温：室温

3.4 实验结果

3.4.1 典型分离色谱图

进样分析浓度为20.0μg/L的黄曲霉毒素B₁标准工作液，使用3.3.3中的色谱条件，结果如下图所示。

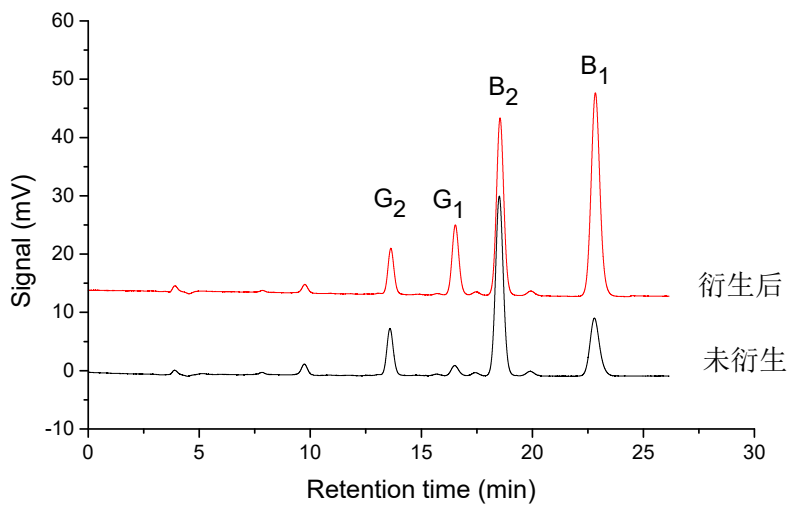


图3-3黄曲霉毒素B₁衍生色谱图

表 3-4 衍生结果对比

	未衍生		衍生	
	峰面积(mV·sev)	峰高(mV)	峰面积(mV·sev)	峰高(mV)
B ₁	295.13	9.87	982.48	34.92

使用光化学衍生器后，B₁峰面积和峰高增加约3.5倍。而对于噪声的影响，使用光化学衍生器前后，噪声基本保持不变，因此，B₁灵敏度能够分别提高约3.5倍。

3.4.2 线性与检出限

将黄曲霉毒素 B₁ 标准工作溶液，按 3.3.3 中色谱条件进行光化学衍生后的分析，黄曲霉毒素 B₁ 的线性及检出限如下表所示。

表 3-5 线性方程

物质	线性方程	线性相关系数 R
黄曲霉毒素 B ₁	$y = 62.4620x + 0.6365$	0.99992

从上表可知，黄曲霉毒素光化学系统衍生效果良好，B₁浓度在0.2μg/L到20.0μg/L线性范围内线性相关系数均大于0.999。

以 3 倍信噪比对应的浓度换算为仪器的检出限，以 10 倍信噪比对应的浓度为仪器的定量限。计算黄曲霉毒素 B₁ 的检出限及定量限，结果如下表所示。

表3-6 检出限对比

物质	方法检出限(μg/kg)	GB/T 5009.23-2006 检出限 (μg/kg)
黄曲霉毒素 B ₁	0.03	0.20

从以上结果可知，光化学系统衍生后的黄曲霉毒素检测的灵敏度明显低于国标中的要求，完全符合定量要求。

3.4.3 实际样品

市场购买相关粮食，按本文中提到的方法并进行了分析，结果如下所示。

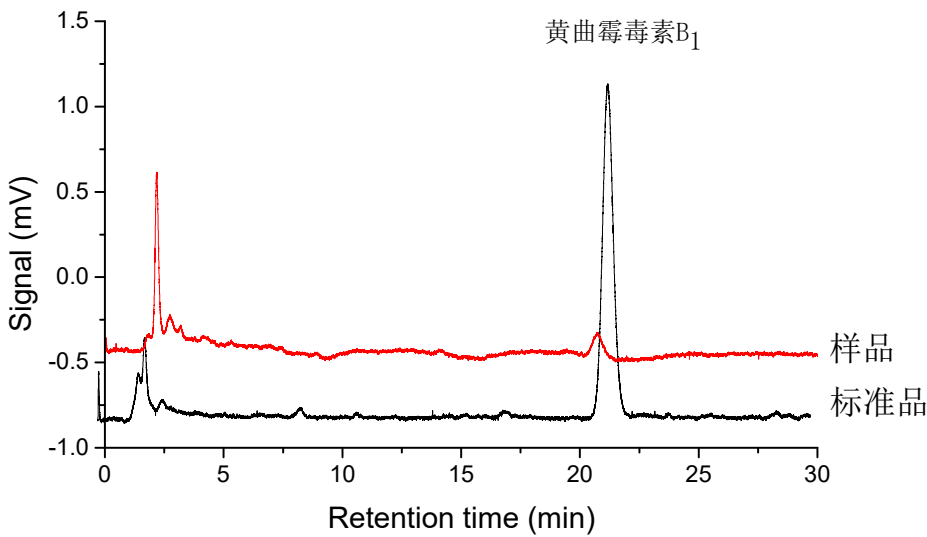


图 3-4 大米样品

表 2-7 大米样品

黄曲霉毒素	浓度(μg/L)	含量(μg/kg)
B ₁	0.06	0.06

3.5 参考文献

[1]GBT 5009.23-2006 《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定》。

第2章 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的 HPLC 分析解决方案

4.1 前言

4.1.1 脱氧雪腐镰刀菌烯醇性质及危害

脱氧雪腐镰刀菌烯醇是粮食中最常见的一类污染性霉菌毒素，可对人、畜产生广泛的毒性效应，如食欲降低、体重减轻、代谢紊乱等。是最常见的一种污染粮食、饲料和食品的霉菌毒素之一，会严重影响人和牲畜的健康。近年研究发现，脱氧雪腐镰刀菌烯醇对人和动物的免疫功能产生明显的影响。

4.1.2 检测方法

结合 GB/T 23503-2009《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱》，提出了粮食及粮食加工业中脱氧雪腐镰刀菌烯醇分析的全套解决方案。为粮食及粮食加工业中脱氧雪腐镰刀菌烯醇检测提供了包括从前处理设备、试剂、前处理方法直至到液相色谱方法的全套分析解决方案。相关人员可参考本实验中的方法，进行粮食及粮食加工业中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的检测。

4.2 仪器设备与试剂

表4-1高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量
1	紫外-可见检测器	1台
2	高压恒流泵	1台
3	色谱柱恒温箱	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	阀支架	1个
6	W5100色谱数据工作站	1套
7	梯度混合器(选配)	1个
8	溶剂托盘	1台
9	C18 5 μ m色谱柱	1支

10	自动进样器(选配)	1台
11	在线脱气机(选配)	1台

表4-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	氯化钠	分析纯
4	磷酸氢二钠	分析纯
5	磷酸二氢钾	分析纯
6	氯化钾	分析纯
7	盐酸	分析纯
8	去离子水	18.2MΩ
9	聚乙二醇	相对分子量8000
10	脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液	百灵威

表4-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	
5	试验筛	孔径1mm	
6	精密电子天平	感量为万分之一	称量
7	高速均质器	转速大于10000r/min	
8	免疫亲和柱	脱氧雪腐镰刀菌烯醇免疫亲和柱	
9	泵流操作架		含空气泵

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000μL, 0~5000μL)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、定量滤纸, 玻璃纤维滤纸、0.45μm滤膜等若干。

4.3 实验方法

4.3.1 样品前处理

● 提取

粮食及粮食制品, 首先将样品研磨, 硬质的粮食等用高速万能粉碎机磨细并通过试验筛, 不要磨成粉末。称取 25g(精确到 0.01g)磨碎的试样于 100mL 容量瓶中, 加入 5g 聚乙二醇, 用水定容至刻度, 混匀, 转移至均质杯中, 高速搅拌 2min, 首先以定量滤纸过滤,

然后再以玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清，收集滤液于干净的容器中。

● 净化

将免疫亲和柱连接于 10.0mL 玻璃注射器下，准确移取 2.0mL 滤液于玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器相连接，调节压力，使溶液以 1 滴/s 的流速通过免疫亲和柱，直至空气进入亲和柱。以 5mL PBS 缓冲液和 5mL 水先后淋洗免疫亲和柱，流速约以 1 滴/s~2 滴/s，直至空气进入亲和柱，弃去全部流出液，抽干小柱。

● 洗脱

准确加入 1.0mL 甲醇洗脱，流速约 1 滴/s，收集全部洗脱液于干净的玻璃试管中，HPLC 测定。

PBS 缓冲液：称取 8.0g 氯化钠、1.2g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、0.2g 氯化钾溶于 990mL 水中，用浓盐酸调节 pH 值至 7.0，用水稀释至 1L。

4.3.2 色谱条件

流动相：甲醇:水=20:80(V:V)

色谱柱：C₁₈ 色谱柱 5μm 4.6×150mm

流速：0.8mL/min

进样量：50μL

检测波长：218nm

柱温：35℃

4.4 参考文献

[1]GB/T 23503-2009《食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱》。

第3章 玉米赤霉烯酮 HPLC 分析解决方案

5.1 前言

5.1.1 玉米赤霉烯酮性质

玉米赤霉烯酮(Zearalenone)又称 F-2 毒素，具有雌激素样作用，对肝脏肾脏均有强烈毒害作用，引起动物繁殖机能异常甚至死亡，也是影响食品安全的重要因素之一。本身具有分布广、繁殖快、耐热、代谢产物多、毒性大、残留时间长、难处理等问题。

5.1.2 玉米赤霉烯酮结构

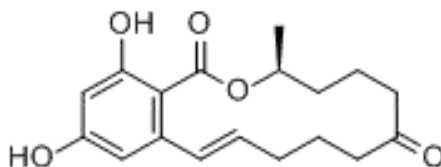


图 5-1 玉米赤霉烯酮

5.1.3 对于粮食及粮食加工业的危害

玉米赤霉烯酮作为世界上污染粮食最广泛的真菌毒素之一，在谷物以及农副产品中都可检测到其的存在。玉米赤霉烯酮不仅可直接污染谷类等作物，进而进入人或动物体内，还可以通过被污染的肉、奶等动物性食品进入人体，危害人和动物的健康。

5.1.4 检测方法

结合 SN/T 1745-2006《进出口大豆、油菜籽和食用植物油中玉米赤霉烯酮的检验方法》中的第一法和 GB/T 5009.209-2008《谷物中玉米赤霉烯酮的测定》，提出了粮食及粮食加工业中玉米赤霉烯酮分析的全套解决方案。为粮食及粮食加工业中玉米赤霉烯酮检测提供了包括从前处理设备、试剂、前处理方法直至到液相色谱方法的全套分析解决方案。相关人员可参考本实验中的方法，进行粮食及粮食加工业中玉米赤霉烯酮的检测。

5.2 仪器设备与试剂

表5-1高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量	订货号
1	紫外-可见检测器(选配)	1台	31020023
2	高压恒流泵	1台	31010047
3	色谱柱恒温箱(选配)	1台	31040010
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个	32027725i
5	阀支架	1个	18050004
6	W5100色谱数据工作站	1套	
7	梯度混合器(选配)	1个	31060001
8	溶剂托盘	1台	
9	C18 5 μ m色谱柱	1支	31110107
10	荧光检测器	1台	
11	AD适配器	1套	31030024
12	自动进样器(选配)	1台	31090005
13	在线脱气机(选配)	1台	31050006

表5-2主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	甲醇	色谱纯
3	氯化钠	分析纯
4	磷酸氢二钠	分析纯
5	磷酸二氢钾	分析纯
6	氯化钾	分析纯
7	吐温-20(Tween-20)	分析纯
8	盐酸	分析纯
9	去离子水	18.2M Ω
10	玉米赤霉烯酮标准溶液	Sigma-Aldrich

表5-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	
5	试验筛	二号筛	

6	精密电子天平	感量为万分之一	称量
7	高速均质器	转速大于10000r/min	
8	免疫亲和柱	玉米赤霉烯酮免疫亲和柱	
9	泵流操作架		含空气泵

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000 μ L, 0~5000 μ L)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、槽纹折叠滤纸、玻璃纤维滤纸、0.22 μ m滤膜等若干。

5.3 实验方法

5.3.1 标准溶液配制

玉米赤霉烯酮标准工作液: 玉米赤霉烯酮标准工作液: 分别配置浓度为 10 μ g/L、20 μ g/L、50 μ g/L、100 μ g/L、200 μ g/L、500 μ g/L 的玉米赤霉烯酮标准品工作液。

5.3.2 样品前处理

● 提取

准确称取试样 40.0g(准确到 0.1g)(大豆需要磨细且粒度 $\leq$ 2mm)于均质器配置的搅拌钵中, 加入 4.0g 氯化钠及 100mL 乙腈+水(9+1), 以均质器搅拌提取 1min。以槽纹折叠滤纸过滤, 准确称取 10.0mL 滤液并加入 40.0mL 水稀释, 用玻璃纤维滤纸过滤至澄清, 滤液备用。

● 净化

将免疫亲和柱连接于 10.0mL 玻璃注射器下, 准确移取 10.0mL 样品提取液于玻璃注射器中, 将空气压力泵与玻璃注射器相连接, 调节压力使溶液以 6mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱, 直至 2~3mL 空气通过免疫亲和柱。以 10mL PSB/吐温-20 缓冲液和 10.0mL 水先后淋洗免疫亲和柱, 弃去全部流出液, 并使 2~3mL 空气通过免疫亲和柱。准确加入 1.5mL 甲醇洗脱, 流速为 1~2mL/min。收集全部洗脱液于玻璃试管中, 供检测用。

PBS/吐温-20 缓冲液: 称取 8.0g 氯化钠、1.2g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、0.2g 氯化钾溶于 900mL 水中, 用浓盐酸调节 pH 值至 7.0, 加入 1mL 吐温-20, 用水稀释至 1L。

5.3.3 色谱条件

流动相: 乙腈:水:甲醇=46:46:8(V:V:V)

色谱柱: SinoPak SP5 μ mID 4.6 $\times$ 150mm

流速: 0.8mL/min

进样量：10μL
检测波长：激发 274nm，发射 440nm
柱温：室温

5.4 实验结果

5.4.1 典型分离色谱图

按照5.3.3中的色谱条件，进样分析浓度为200μg/L的玉米赤酶烯酮标准品工作液，结果如下所示。

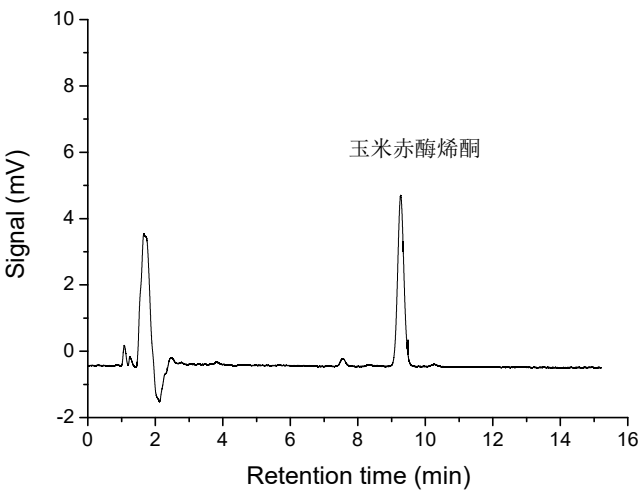


图5-2玉米赤酶烯酮标准溶液色谱图

表 5-4 色谱峰参数

	保留时间 (min)	峰高 (mV)	峰面积 (mV•sec)	不对称度	柱效 (N/m)
玉米赤酶烯酮	9.27	5.18	73.70	1.14	11600

从以上结果可知，在该色谱系统中，玉米赤酶烯酮保留时间短，不对称度好，柱效高，适合于分析玉米赤酶烯酮。

5.4.2 线性范围与检出限

使用 5.3.3 中的色谱条件，依次连续进样分析浓度为 10μg/L、20μg/L、50μg/L、100μg/L、200μg/L、500μg/L 的玉米赤酶烯酮标准品工作液，结果如下所示。

表 5-5 线性相关性

	线性方程	线性相关系数
浓度-峰面积曲线	y=0.33316x-0.55941	0.9999

从以上结果可知，玉米赤酶烯酮在浓度为 10~500μg/L 范围内，线性相关系数均大于

0.999，浓度-峰面积具有良好的线性相关性。

以 3 信噪比作为检出限，10 倍信噪比作为定量限，不断稀释并进样分析玉米赤霉烯酮标准品工作液，直至分别出现信噪比为 3 倍和 10 倍的浓度，结果如下所示。

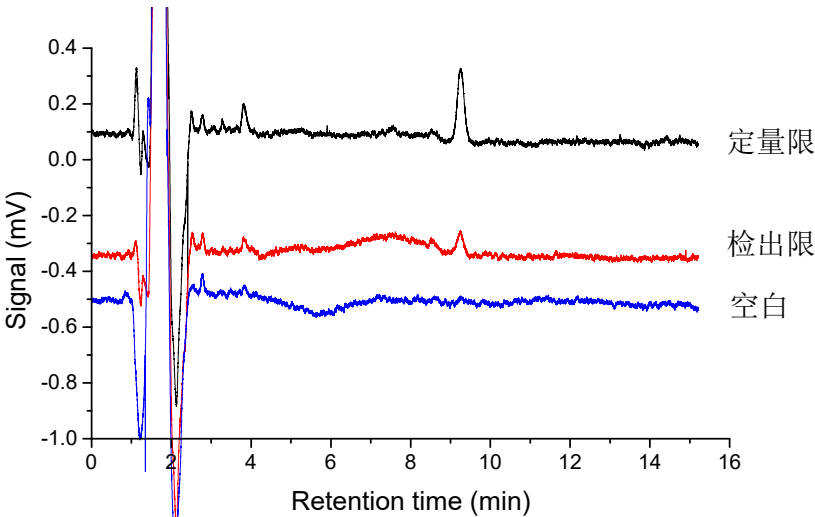


图 5-3 检出限及定量限

表 5-6 仪器及方法的检出限及定量限

	仪器检出限 (ug/L)	仪器定量限 (ug/L)	方法检出限 (ug/kg)	方法定量限 (ug/kg)
玉米赤霉烯酮	3	10	6	20

表 5-7 检出限对比及定量限

	仪器检出限(ug/kg)
本方法	6
SN/T 1745-2006	10
GB /T 5009.209-2008	5

5.4.3 实际样品

市场购买豆油，按本文中的方法并进行了分析，结果如下所示。

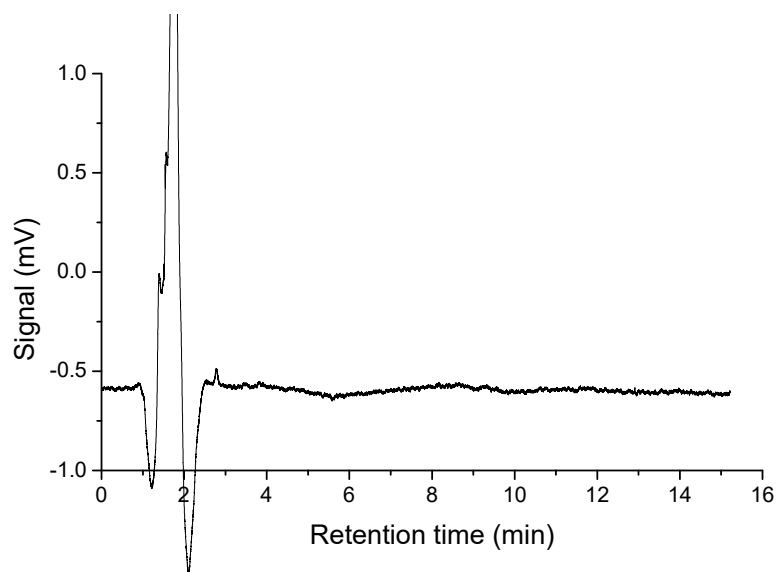


图 5-4 豆油样品

表 5-8 豆油样品

	浓度(μg/L)	含量(mg/kg)
玉米赤霉烯酮	未检出	未检出

5.5 参考文献

[1]SN/T 1745-2006 《进出口大豆、油菜籽和食用植物油中玉米赤霉烯酮的检验方法》。

[2]GB /T 5009.209-2008 《谷物中玉米赤霉烯酮的测定》。

第4章 赭曲霉毒素 A 的 HPLC 分析检测解决方案

6.1 前言

6.1.1 赭曲霉毒素 A 性质及危害

赭曲霉毒素 A 是毒性最大、分布最广、产毒量最高、对农产品的污染最重、与人类健康关系最密切的一种霉菌毒素。赭曲霉毒素 A 是由多种生长在粮食(小麦、玉米、大麦、燕麦、黑麦、大米和黍类等)、花生、蔬菜(豆类)等农作物上的曲霉和青霉产生的。产生赭曲霉毒素 A 的霉菌广泛分布于自然界，导致赭曲霉毒素 A 广泛分布于各种食品及粮食中。食用了含有赭曲霉毒素 A 的粮食及粮食加工的食物，在其内脏、组织及血液中含有大量的赭曲霉毒素 A。赭曲霉毒素 A 主要是引起肾脏损伤，大量的毒素也可能引起动物的肠黏膜炎症和坏死。

6.1.2 检测方法

结合 GB/T 25220-2010《粮油检验粮食中赭曲霉毒素 A 的测定高效液相色谱法和荧光光度法》，提出了粮食及粮食加工业中赭曲霉毒素 A 分析的全套解决方案。为粮食及粮食加工业中赭曲霉毒素 A 检测提供了包括从前处理设备、试剂、前处理方法直至到液相色谱方法的全套分析解决方案。相关人员可参考本实验中的方法，进行粮食及粮食加工业中赭曲霉毒素 A 的检测。

6.2 仪器设备与试剂

表6-1高效液相色谱系统设备标准配置清单

序号	名称	数量
1	紫外-可见检测器(选配)	1台
2	高压恒流泵	2台
3	色谱柱恒温箱(选配)	1台
4	Rheodyne 7725i高压六通进样阀	1个
5	阀支架	1个
6	W5100色谱数据工作站	1套
7	梯度混合器(选配)	1个
8	溶剂托盘	1台
9	C18 5 μ m色谱柱	1支
10	荧光检测器	1台
11	AD适配器	1套
12	自动进样器(选配)	1台

13	在线脱气机(选配)	1台
----	-----------	----

表6-2 主要化学试剂、标准品清单

序号	试剂	纯度
1	乙腈	色谱纯
2	冰醋酸	分析纯
3	氯化钠	分析纯
4	磷酸氢二钠	分析纯
5	磷酸二氢钾	分析纯
6	氯化钾	分析纯
7	吐温-20(Tween-20)	分析纯
8	盐酸	分析纯
9	碳酸氢钠	分析纯
10	去离子水	18.2MΩ
11	赭曲霉毒素A标准溶液	百灵威

表6-3 主要样品前处理设备

序号	名称	规格型号	备注
1	溶剂过滤器	1000mL	流动相过滤
2	隔膜真空泵	0.08MPa,160W	流动相过滤, GM-0.33A
3	超声清洗器	3L/6L, 40/60KHz, 120W	流动相脱气, AS3120
4	高速万能粉碎机	转速大于10000r/min	
5	精密电子天平	感量为万分之一	称量
6	高速均质器	转速大于22000r/min	
7	免疫亲和柱	赭曲霉毒素A免疫亲和柱	
8	泵流操作架		
9	氮吹仪		

实验过程中其它玻璃器皿还包括容量瓶(100mL、50mL、25mL、10mL、2mL)、具塞锥形瓶(250mL)、移液枪(0~1000μL, 0~5000μL)、移液枪枪头(1mL, 5mL)、一次性PVC手套、一次性口罩、进样针、槽纹折叠滤纸、玻璃纤维滤纸、0.22μm滤膜等若干。

6.3 实验方法

6.3.1 标准溶液配制

● 提取

准确称取试样 50g(准确到 0.001g)于均质器配置的搅拌钵中,加入 5.0g 氯化钠及 100mL 乙腈+水(6+4), 将搅拌杯装于均质器上, 于 22000r/min 高速搅拌提取 3min。提取液以槽纹折叠滤纸过滤于干净的烧杯中。准确称取 10.0mL 滤液并加入 50.0mL 容量瓶中, 加 PBS 缓冲液稀释至刻度, 混合均匀, 经玻璃纤维滤纸过滤至澄清, 滤液备用。

● 净化

将免疫亲和柱连接于 10mL 玻璃注射器下端，准确移取 10.0mL 样品提取液于玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器上端连接，调节压力使溶液以 1 滴/s~2 滴/s 流速缓慢通过免疫亲和柱，至有空气通过免疫亲和柱时停止加压。用上述方法，以 10mL 淋洗缓冲液和 10.0mL 水先后淋洗免疫亲和柱，弃去全部流出液，准确加入 1.5mL 甲醇以上述方式洗脱，收集全部洗脱液于玻璃试管中，在 45℃ 以氮吹仪用氮气吹干。用流动相溶解残渣并定容至 200μL，即为试样提取净化液，供液相色谱测定时使用。

PBS 缓冲液：称取 8.0g 氯化钠、1.2g 磷酸氢二钠、0.2g 磷酸二氢钾、0.2g 氯化钾溶于 990mL 水中，用浓盐酸调节 pH 值至 7.0，用水稀释至 1L。

淋洗缓冲液：称取 25g 氯化钠，5g 碳酸氢钠溶于水中，加入 0.1mL 吐温-20，用水稀释至 1L。

6.3.2 色谱条件

流动相：乙腈:水:冰醋酸=96:102:2(V:V:V)

色谱柱：C₁₈ 色谱柱 5μm 4.6×150mm

流速：1.0mL/min

检测波长：激发 333nm，发射 460nm

进样量：20μL

柱温：室温

6.4 参考文献

[1]GB/T 25220-2010 《粮油检验粮食中赈曲霉毒素A的测定高效液相色谱法和荧光光度法》。