

法[S].北京:中国标准出版社,2008.

化管理委员会.GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范 食品理化检验[S].北京:中国标准出版社,2008.

[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准

实验技术与方法

柱前衍生-超高效液相色谱荧光法同时测定
啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂赵舰,程莉,胡黎黎,何健,周春艳,甘源
(重庆市疾病预防控制中心,重庆 400042)

摘要:目的 建立柱前衍生-UPLC-FLD法测定啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂的方法。方法 样品直接经过乙腈稀释提取,提取液经过离心后,取上清液用多功能柱净化,净化液经氮气吹干、用三氟乙酸衍生后,经定容、微孔滤膜过滤、进液相色谱分析,以 ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm)分离,荧光检测器检测,外标法定量。结果 4种黄曲霉毒素线性范围较宽,相关系数 r 在 0.999 2 ~ 0.999 6 之间,黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 检出限分别为 0.05、0.02、0.08、0.02 μg/kg。加标回收率 90.47% ~ 108.17% 之间,回收率的 RSD 在 0.97% ~ 8.13% 之间。结论 本法操作简便、准确度高、精密度高,干扰性小,能满足啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的同时测定。

关键词:柱前衍生;超高效液相色谱荧光法;啤酒;黄曲霉毒素;食品污染物;霉菌毒素;食品安全

中图分类号:R155.5;TS262.5; 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2015)05-0534-04

DOI:10.13590/j.cjfh.2015.05.011

Simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in beer by pre-column derivatization ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detector

ZHAO Jian, CHENG Li, HU Li-li, HE Jian, ZHOU Chun-yan, GAN Yuan

(Chongqing Center of Disease Control and Prevention, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective A method of pre-column derivatization ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detector was developed for simultaneous determination of aflatoxins (AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂) in beers. **Methods**

The aflatoxins were extracted from beer samples by acetonitrile and cleaned up with multifunctional purification column to remove the matrix interference. The purified solution was concentrated and dried with nitrogen. After derivatized by trifluoroacetic acid, the aflatoxins were separated by reverse liquid chromatography (T3) with gradient elution and detected by fluorescence detector (FLD). **Results** The linear ranges of each compound were wide, and relative coefficients were between 0.999 2 and 0.999 6. The recoveries were within 90.47%-108.17%, and the relative standard deviations (RSDs) were between 0.97%-8.13%. The limits of detected (LODs) of 4 aflatoxins were 0.05, 0.02, 0.08 and 0.02 μg/kg in beers, respectively. **Conclusion** The established method was sensitive, selective, accurate and simple for the simultaneous determination of aflatoxins in beers.

Key words: Pre-column derivatization; ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detector; beer; aflatoxin; food contaminant; mycotoxin; food safety

收稿日期:2015-02-09

基金项目:国家食品安全风险评估中心委托项目:啤酒中黄曲霉毒素监测工作

作者简介:赵舰 男 副主任技师 研究方向为食品理化检验

E-mail:zhaojian2000@sina.com

通讯作者:甘源 女 副主任技师 研究方向为食品理化检验

E-mail:463058983@qq.com

黄曲霉毒素是一种强致癌物质,其危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用。在天然污染的食品如花生、玉米、小麦及其制品中易产生黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂(AFG₂)等^[1],也有报道在一些中药材中易产生黄曲霉毒素^[2-3]。目前测定黄曲霉毒素方法较多,有液相色谱质谱法^[4-5]、液

相色谱法^[6-8]、薄层层析法^[8]、酶联免疫法^[6]等。液相色谱质谱法由于仪器配置较贵,不易推广,薄层层析法为半定量,酶联免疫法选择性较差,多为总量测定,现使用较多的液相色谱法又分柱前衍生和柱后衍生^[9-12],也有无需衍生液相色谱法,但此法需要大体积流通池的荧光检测器^[13]。目前测定对象多为玉米、花生、大米、小麦等^[1,4,5],其次是中药材^[2,3],也有对啤酒原材料中黄曲霉毒素的检测^[14-15],啤酒原材料中真菌毒素的污染是造成啤酒安全问题的来源^[16],现未见对啤酒中黄曲霉毒素的测定方法的研究,所以建立该方法是必要的。本法采用多功能柱净化-柱前衍生-超高效液相色谱荧光法同时测定啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂,操作简便、灵敏度高、准确度高、精密度好、干扰小。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

Waters Acquity UPLC 液相色谱仪(带荧光检测器,美国 Waters)、离心机、氮吹浓缩器、电热恒温干燥箱、涡旋混匀器。

黄曲霉毒素标准储备液(CDAB-46323-U、CDAB-46324-U、CDAB-46325-U、CDAB-46326-U,美国 Supelco):均为 3 μg/ml(介质为苯-乙腈, V/V = 98:2), -20 ℃下避光保存。黄曲霉毒素混合标准工作液:准确吸取适量的黄曲霉毒素标准储备液,用乙腈溶液稀释成混合标准工作液, AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的浓度分别为 30、15、120、30 ng/ml, -20 ℃下避光保存。三氟乙酸(分析纯),乙腈(色谱纯),多功能净化柱(Mycosep™ 228,美国 Romer)或等效柱,0.22 μm 聚四氟乙烯滤膜,所有实验室用水均为超纯水。

1.2 方法

1.2.1 样品处理

提取:将啤酒倒入烧杯中超声 10 min 除尽二氧化碳,取约 2.0 g(精确至 0.01 g)于 15 ml 离心管中,加入乙腈至 10.0 ml(以使啤酒与乙腈混合液的体积比约为 20:80),涡旋混匀。4 500 r/min 离心 5 min,取上清液备用。

净化:移取约 8 ml 提取液至多功能净化柱的玻璃管内,将多功能净化柱的填料管插入玻璃管中并缓慢推动填料管,净化液就被收集到净化柱的收集池中。

衍生:取 2.00 ml 净化液在 30 ℃下用氮气缓缓地将洗脱液吹至干,分别加入 200 μl 正己烷和 100 μl 三氟乙酸溶液,涡旋 30 s,在(40 ± 1)℃的恒

温箱中衍生 15 min,衍生结束后,在氮气下吹干,准确加入 1.00 ml 乙腈-水(20:80, V/V),涡旋混匀,过 0.22 μm 滤膜,滤液供上机分析。

1.2.2 标准溶液的配制

根据检测仪器的灵敏度,准确吸取混合标准工作液 0、10、20、40、100、200、300、400、600 μl,在 30 ℃下用氮气缓缓吹干,分别加入 200 μl 正己烷和 100 μl 三氟乙酸溶液,涡旋 30 s,在(40 ± 1)℃的恒温箱中衍生 15 min,衍生结束后,在氮气下吹干,准确加入 1.00 ml 乙腈-水(20:80, V/V),涡旋 30 s,过 0.22 μm 滤膜,滤液供上机分析。各组分系列浓度见表 1。

表 1 AFB₁、AFB₂、AFG₁ 和 AFG₂ 标准系列的浓度(ng/ml)

Table 1 Concentration of AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ and AFG ₂		标准系列的浓度								
化合物										
AFB ₁	0	0.3	0.6	1.2	3.0	6.0	9.0	12.0	18.0	
AFB ₂	0	0.15	0.3	0.6	1.5	3.0	4.5	6.0	9.0	
AFG ₁	0	1.2	2.4	4.8	12.0	24.0	36.0	48.0	72.0	
AFG ₂	0	0.3	0.6	1.2	3.0	6.0	9.0	12.0	18.0	

注:标准液应临用前现配制、现衍生

1.2.3 仪器条件

色谱柱:ACQUITY UPLC HSS T3 柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), ACQUITY UPLC HSS T3 预柱(2.1 mm × 5 mm, 1.8 μm);柱温 40 ℃;荧光检测器:激发波长 360 nm,发射波长 440 nm;流动相:A 为水,B 为乙腈;梯度洗脱程序:0 ~ 3.40 min 25% B、3.40 ~ 3.90 min 25% ~ 35% B、3.90 ~ 9min 35% B、9 ~ 9.10 min 35% ~ 25% B、9.10 ~ 12min 25% B;进样量 5 μl;流速 0.3 ml/min。

2 结果与分析

2.1 样品提取液中乙腈浓度的选择及乙醇的干扰

当乙腈浓度高于 80% 时,各组分回收较好,低于 80% 时,影响多功能净化柱的柱效,且水分较多,样品不易吹干,影响衍生化反应;如选择 90%,就会减少取样量,降低方法灵敏度。本法最终选择样品 2 g 加乙腈至 10 ml,此时乙腈浓度约 80%,见图 1。该样品中含有乙醇,通过试验发现,少量乙醇不干扰测定。

2.2 色谱条件的优化

本试验采用推荐方法^[6-8],使用乙腈和水为流动相洗脱黄曲霉毒素,该法在试验中发现乙腈的浓度对黄曲霉毒素的分离有重要的影响,故研究了 4 种不同的洗脱程序的分离效果,见表 2。结果发现:洗脱程序 1, AFG₁、AFB₁ 峰前展,4 个目标峰都不够尖锐,且分析时间较长;按照程序 2 洗脱时,仍然未改变 AFG₁、AFB₁ 峰前展,分析时间有所缩短;

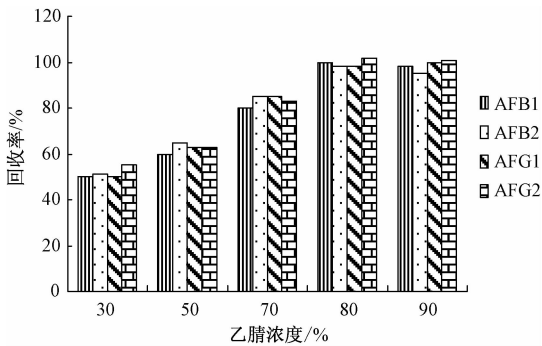


图1 乙腈的浓度对啤酒中4种黄曲霉毒素提取效率的影响

Figure 1 Influence of acetonitrile concentration to the aflatoxins extraction efficiency

当按照程序3洗脱时, AFG₁、AFB₁峰仍然前展, 分析时间缩短至6 min; 按照程序4洗脱时, 4个目标峰分离良好, 峰型尖锐, 基线平稳, 噪声低, 对比图见图2。故选用洗脱程序4作为最佳的洗脱梯度, 在此条件下, 空白基质样品及加标色谱图见图3。

表2 4种不同的洗脱程序

Table 2 Program list of elution

时间/min	洗脱程序1		洗脱程序2		洗脱程序3		洗脱程序4	
	乙腈/%	纯水/%	乙腈/%	纯水/%	乙腈/%	纯水/%	乙腈/%	纯水/%
0	23	77	23	77	24	76	25	75
3.8	23	77	23	77	24	76	25	75
3.9	23	77	30	70	33	67	35	65
9.0	23	77	30	70	33	67	35	65
9.10	23	77	23	77	24	76	25	75
12.0	23	77	23	77	24	76	25	75

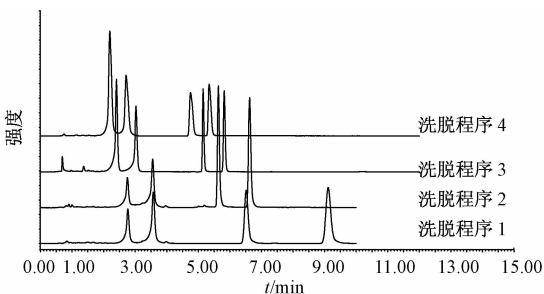


图2 4种洗脱程序的标准色谱图

Figure 2 Chromatograms of 4 elution programs

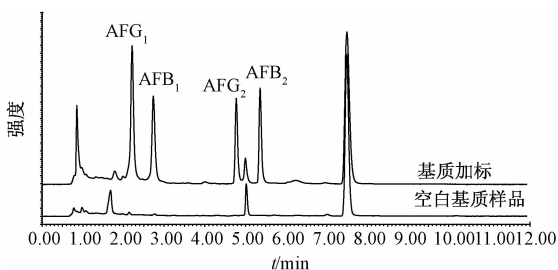


图3 最佳流动相条件下的空白样品和加标色谱图

Figure 3 Chromatogram of beer sample and spiked sample

2.3 方法的线性范围、检出限及定量限

标准曲线线性: 按照1.2.3仪器条件, 绘制4种黄曲霉毒素的标准曲线, 线性范围宽, 相关性良好, 相关系数均在0.999以上;

方法检出限和定量限: 用空白基质样品进行低水平加标, 以3倍信噪比计算检出限(LOD), 以10倍信噪比计算定量限(LOQ), 该方法的检出限低, 满足啤酒中黄曲霉毒素的测定, 结果见表3。

表3 4种黄曲霉毒素的线性、检出限和定量限

Table 3 Linearity, LODs and LOQs of 4 aflatoxins

化合物	线性范围/(ng/ml)	线性方程	相关系数 r	LOD/(μg/kg)	LOQ/(μg/kg)
AFB ₁	0.30~18.0	$y = 275369x - 7448.6$	0.9993	0.05	0.15
AFB ₂	0.15~9.0	$y = 351084x + 10190$	0.9992	0.02	0.06
AFG ₁	1.20~72.0	$y = 105319x - 6493.3$	0.9996	0.08	0.24
AFG ₂	0.30~18.0	$y = 167821x + 19793$	0.9995	0.02	0.06

2.4 方法的精密度和准确度

向啤酒样品中加入混标液进行加标回收试验, 加标水平见表4。以基质加标的回收率表示方法的准确度, 加标回收率的相对标准偏差(RSD)表示方法的精密度, 结果见表5。从加标回收试验结果可以看出, 各水平基质加标的回收率在90.47%~108.17%之间, 回收率的相对标准偏差在0.97%~8.13%之间, 说明方法的精密度和准确度良好。

表4 加标水平

Table 4 Levels of standard addition

混标应用液*	加入量/μl	AFB ₁ /(μg/kg)	AFB ₂ /(μg/kg)	AFG ₁ /(μg/kg)	AFG ₂ /(μg/kg)
低水平	20	0.6	0.3	2.4	0.6
中水平	150	4.5	2.25	18.0	4.5
高水平	600	18.0	9.0	72.0	18.0

注: *表示混标浓度分别为 AFB₁ 30 ng/ml、AFB₂ 15 ng/ml、AFG₁ 120 ng/ml、AFG₂ 30 ng/ml

表5 黄曲霉毒素的加标回收试验(n=6, %)

Table 5 Recoveries of 4 aflatoxins

化合物	低加标水平/(μg/kg)		中加标水平/(μg/kg)		高加标水平/(μg/kg)	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
AFB ₁	103.50	5.12	96.77	8.13	92.09	0.97
AFB ₂	94.72	3.12	105.12	4.33	102.69	4.22
AFG ₁	97.00	1.53	94.51	2.56	90.47	5.13
AFG ₂	106.75	7.21	102.33	4.15	108.17	7.01

2.5 实际样品测定结果

运用本研究方法, 对重庆市市售13个品牌30份啤酒样品进行检测, 均未检出 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂, 结果见表6。

表6 重庆市市售不同品牌啤酒中4种黄曲霉毒素测定结果(μg/kg)
Table 6 Concentration of 4 aflatoxins in beer samples in Chongqing market

品牌	品种	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
雪花	勇闯天涯型、华润原汁麦、纯生(听装、瓶装)、精制型、丛林迷彩型、干爽型、清爽型	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
山城	清爽型、国宾1958(听装、瓶装)、1958(听装、瓶装)	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
重庆	纯生精品	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
青岛	清爽型、青岛啤酒	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
百威	纯生、百威(听装、瓶装)	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
嘉士伯	嘉士伯啤酒、冰纯型	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
哈尔滨	小麦王、冰爽型	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
蓝带	蓝狮特制、蓝色激情超纯	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
万奈仕	万奈仕比尔森啤酒	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
黑啤	黑啤	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
乐堡	乐堡啤酒	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
佰斯德利	佰斯德利黑啤	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02
劲黑	劲黑啤酒	<0.05	<0.02	<0.08	<0.02

3 小结

本文建立了啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 同时测定的方法,采用柱前衍生方式,操作简便,与柱后衍生方式相比,节省仪器成本,易于推广。该法各项技术参数满足化学检测技术要求,加标回收率在 90.47% ~ 108.17% 之间,相对标准偏差在 0.97% ~ 8.13% 之间,相关系数 r 在 0.999 2 ~ 0.999 6,线性关系良好,黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的检出限分别达到 0.05、0.02、0.08、0.02 μg/kg。如果用于衍生的样品净化液增加到 4 ml,进样量增加到 10 μl,其灵敏度还可提高 4 倍。与国标 GB/T 5009.23—2006^[6] 以及标准操作程序^[7] 相比,其灵敏度更好,前处理更方便,能满足啤酒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定。

参考文献

- [1] 邱文倩,傅武胜. 福建省市售花生及花生制品中4种黄曲霉毒素污染调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(10): 2446-2448.
- [2] 郑荣,毛丹,王少敏,等. 11种中药材中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(5): 368-372.
- [3] 郭巧技,高咏莉. HPLC 法测定 150 种中药材中黄曲霉毒素 G₁、G₂、B₁、B₂ 的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(12): 1696-1698.
- [4] 贾玉珠,贾沁一,周娜,等. 三重四极杆液质联用法测定花生中4种黄曲霉毒素的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(10): 2224-2226.
- [5] 高何刚,陈理,王若燕,等. UHPLC-MS/MS 同时测定绍兴腐乳

中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 4(5): 627-629.

- [6] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.23—2006 食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [7] 杨大进,李宁. 2014 年国家食品污染和有害因素风险监测工作手册[M]. 北京: 中国标准出版社、中国质检出版社, 2014.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.22—2003 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [9] 沙东旭,孙苓苓,张满来,等. 2种 HPLC-柱后衍生化-荧光检测法测定陈皮中黄曲霉毒素的比较[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1367-1371.
- [10] 邱文倩,傅武胜. 柱后光化学衍生-高效液相色谱法测定食品中4种黄曲霉毒素方法研究[J]. 海峡预防医学杂志, 2012, 18(5): 44-45.
- [11] 李永波,陈艳,何丰瑞,等. 免疫亲和柱净化-柱前衍生-HPLC 荧光法测定粮油食品中的黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(17): 2477-2480.
- [12] 王阳,曹忠波. 柱前衍生高效液相色谱法测定食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(2): 344-345.
- [13] 蔡志斌,张英,郑志伟,等. 无需衍生-超高效液相色谱法快速测定食品中黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(2): 312-315.
- [14] 杜元正,蔡国林. 固相萃取-高效液相色谱法测定啤酒原料中黄曲霉毒素 B₁ [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(2): 168-173.
- [15] Pietri A, Bertuzzi T, Agosti B, et al. Transfer of aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ from naturally contaminated raw materials to beer during an industrial brewing process [J]. Food Additives and Contaminants, 2010, 27(10): 1431-1439.
- [16] 陈胜祥. 危害分析及关键控制点在啤酒生产中的应用[J]. 公共卫生与预防医学, 2007, 18(4): 109-110.