

# 黄曲霉毒素的检测方案—HPLC 法

天美（中国）科学仪器有限公司 甄蕊

黄曲霉毒素(aflatoxin, 简称为 AF)是到目前为止所发现的毒性最大的真菌毒素, 它们具有很强的致癌性, 主要存在于谷物、坚果、棉籽以及一些和人类血液, 动物饲料相关的产品中。黄曲霉毒素的基本结构为二呋喃环和香豆素, B1 是二氢呋喃氧杂萘邻酮的衍生物, 目前已分离鉴定出 12 种, 其中 M1 和 M2 主要存在于牛奶中, B1 为毒性及致癌性最强的物质。近年来, 国家制定了多个检测黄曲霉毒素的方法标准, 并同时出台食品及饲料中黄曲霉毒素的限量要求。

HPLC 是近几年发展起来的检测黄曲霉毒素的方法, 主要是采用反相分析系统, 使用荧光检测器检测, 同时分离多种黄曲霉毒素。HPLC 方法具有同时分离、分析样品中多种黄曲霉毒素的功能和快速、高效、灵敏、定量准确的优点, 而且不受样品的沸点、热稳定性和分子量等的限制; 同时荧光检测器具有灵敏度高、选择性好和干扰峰少的优点, 因此, 使用 HPLC 法配荧光检测器已经成为检测黄曲霉毒素的主要测定方法。

## 1、HPLC 柱后过溴化溴化吡啶衍生方案

根据 GB/T23212-2008《牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2 的测定液相色谱-荧光检测法》, 使用过溴化溴化吡啶作为衍生试剂, 采用日立液相色谱仪配柱后衍生单元和荧光检测器, 同时检测牛奶中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1。检测结果优于国家标准要求, 充分体现了日立荧光检测器的高灵敏度, 满足了超低黄曲霉毒素的含量的同时分析测定, 适用与常规监督检测。

### 1.1 色谱条件

柱: Hitachi LaChrom C18(5 $\mu$ m) 4.6mmI.D.x250mmL

柱温: 35 $^{\circ}$ C

流动相流速: 1.0 mL/min

衍生试剂: 0.05g/L 过溴化溴化吡啶

衍生液流速: 0.45 mL/min

衍生温度: 35 $^{\circ}$ C

检测波长：Ex=355nm；Em=430nm

进样量：20 μL

流动相：CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O =20:20:60

## 1.2 样品前处理

称取 10g 样品于 25mL 离心管中，10000 转/分钟离心 15min，将上清液全部移入黄曲霉毒素亲和柱，用 10mL 水清洗柱，等空气进入 2-3mL，用 2mL 乙腈将样品洗脱下来，收集所有的洗脱液，氮吹仪或水浴加热催干，加入流动相 1mL，涡旋，溶解样品，过 0.45μm 滤膜过滤，待机测定。

## 1.3 实验结果

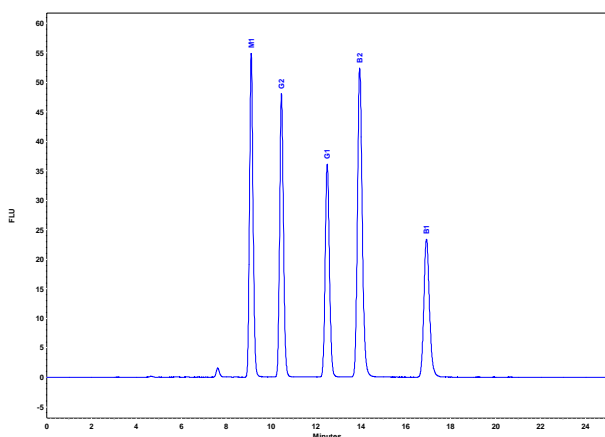


图 1 黄曲霉毒素混合标样色谱图  
( B1=20ng/mL;B2=15ng/mL;G1=64ng/mL  
;G2=20ng/mL;M1=20ng/mL; )

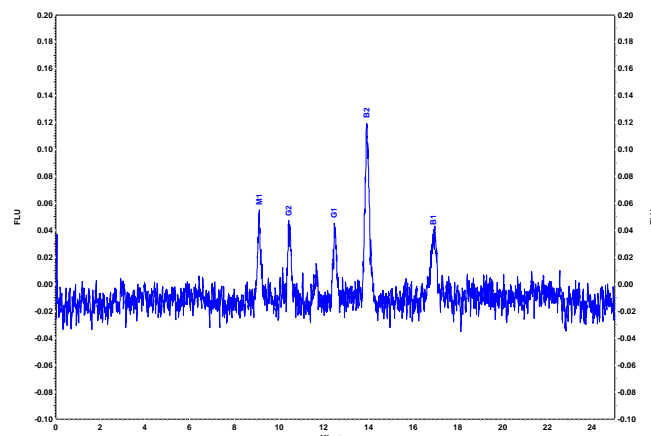


图 2 黄曲霉毒素混标检出限色谱图  
( B1=0.02ng/mL;B2=0.015ng/mL;G1=0.06  
4ng/mL;G2=0.02ng/mL;M1=0.02ng/mL; )

## 2、HPLC 柱后碘衍生方案

依据 2010 新版药典中黄曲霉毒素测定方法规定，以 0.05%的碘溶液为衍生试剂，采用日立液相色谱仪四元梯度系统配荧光检测器，柱后衍生测定黄曲霉毒素。五种黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1 得到很好地分离和优异的重现性，符合药典规定要求，满足需要遵循药典要求进行测定的样品常规分析。

### 2.1 色谱条件

柱：Hitachi LaChrom C18(5μm) 4.6mmI.D.x250mmL

衍生温度：70℃

衍生试剂：0.05%碘溶液

天美（中国）科学仪器有限公司  
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层  
TEL:010-64010651  
FAX:010-64060202  
E-MAIL :techcomp@techcomp.cn

衍生液流速：0.3 mL/min

检测波长：Ex=360nm，Em=450nm

流速：0.8 mL/min

进样量：20  $\mu$ L

流动相：CH<sub>3</sub>OH：CH<sub>3</sub>CN：H<sub>2</sub>O=35:13:52

## 2.2 实验结果

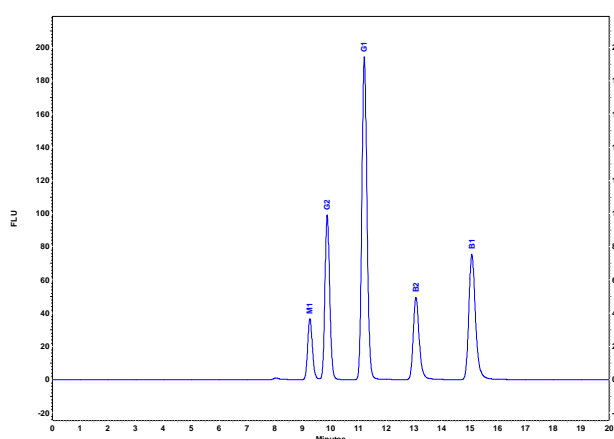


图 3 黄曲霉毒素标样色谱图

( B1=20ng/mL;B2=15ng/mL;G1=64ng/mL  
;G2=20ng/mL;M1=20ng/mL )

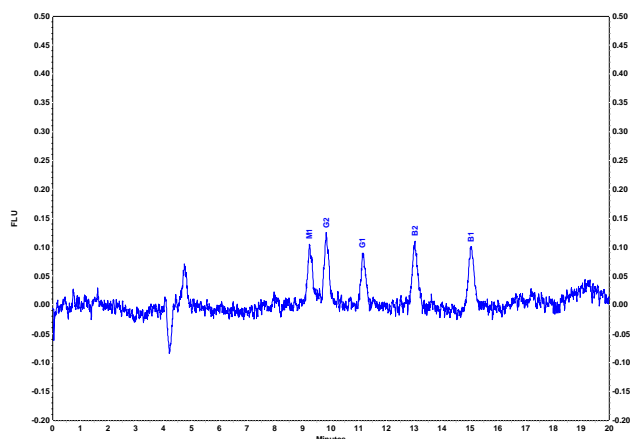


图 4 黄曲霉毒素最低检出限色谱图

( B1=25pg/mL;B2=30pg/mL;G1=25pg/mL  
;G2=20pg/mL;M1=50pg/mL; )

## 3、HPLC 柱后光照衍生方案

采用日立高效液相色谱仪四元梯度，配柱后光照衍生单元荧光检测器测定，根据国标 GB/T23212-2008《牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2 的测定液相色谱-荧光检测法》中的前处理方法，仅将标准中的柱后试剂衍生法换成柱后光照衍生法，同时测定牛奶中 5 种黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1，获得非常低的检测限，远远优于国家标准要求。仪器配置简单，仅增加一个柱后光照单元，操作简便，衍生利用光照完成，不需额外试剂，降低成本，特别适合于大量样品超低含量的常规分析测定。

### 3.1 色谱条件

柱：Hitachi LaChrom C18(5 $\mu$ m) 4.6mmI.D.x250mmL

柱温：35 $^{\circ}$ C

流动相流速：1.0 mL/min

天美（中国）科学仪器有限公司  
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层  
TEL:010-64010651  
FAX:010-64060202  
E-MAIL :techcomp@techcomp.cn

柱后衍生液：0.45 mL/min

衍生温度：35℃

检测波长：Ex=355nm；Em=430nm

进样量：20 μL

流动相：CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O = 20:20:60

### 3.2 实验结果

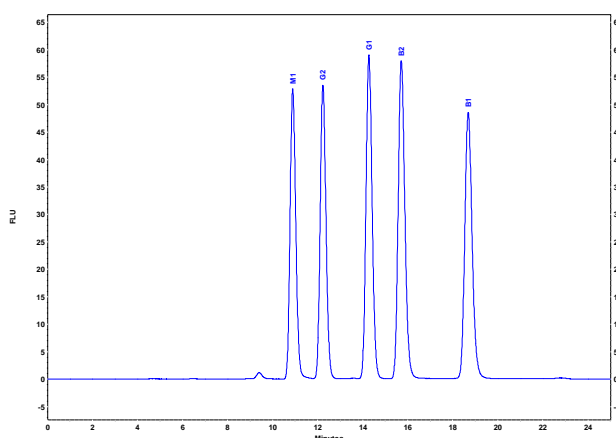


图 5 黄曲霉毒素混合标样色谱图

( B1=20ng/mL;B2=15ng/mL;G1=64ng/mL  
;G2=20ng/mL;M1=20ng/mL; )

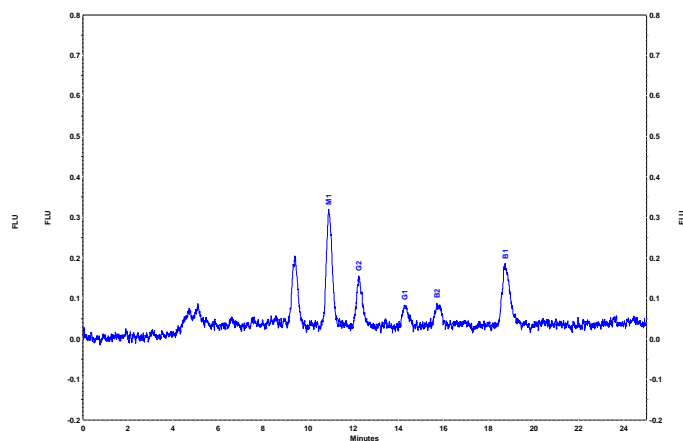


图 6 黄曲霉毒素混标检出限色谱图

( B1=2pg/mL;B2=6pg/mL;G1=8pg/mL;G2  
=20pg/mL;M1=0.05ng/mL )

## 4、HPLC-FL 直接测定方案

采用日立 L-2000 液相色谱仪，配荧光检测器直接测定黄曲霉毒素。此方法试剂配制及样品前处理均与柱后衍生法相同，只是在测定时不采用柱后衍生，直接采用荧光检测器检测，由于日立荧光检测器的高灵敏度，对于样品含量在最低检测限之上的样品可以采用该法，其仪器成本及使用成本均相对较低，非常适用于自行样品监督。

### 4.1 色谱条件

柱：Hitachi LaChrom C18(5μm) 4.6mmI.D.x250mmL

柱温：35℃

流动相流速：1.0 mL/min

检测波长：Ex=355nm；Em=430nm

进样量：20 μL

天美（中国）科学仪器有限公司  
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层  
TEL:010-64010651  
FAX:010-64060202  
E-MAIL:techcomp@techcomp.cn

流动相：CH<sub>3</sub>CN:CH<sub>3</sub>OH:H<sub>2</sub>O = 20:20:60

## 4.2 实验结果

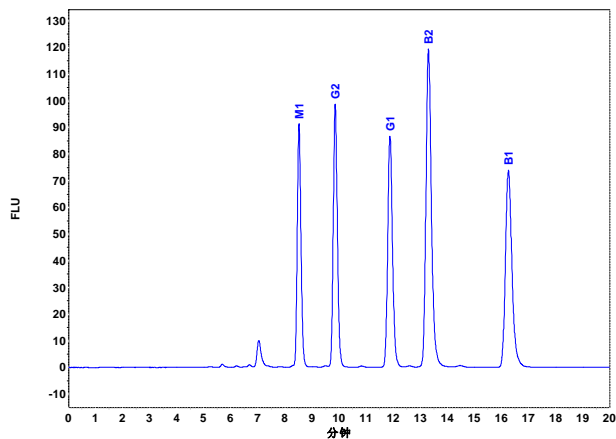


图 7 黄曲霉毒素混合标样色谱图  
( B1=0.4μg/mL;B2=15ng/mL;G1=1.6μg/mL;G2=20ng/mL;M1=25ng/mL; )

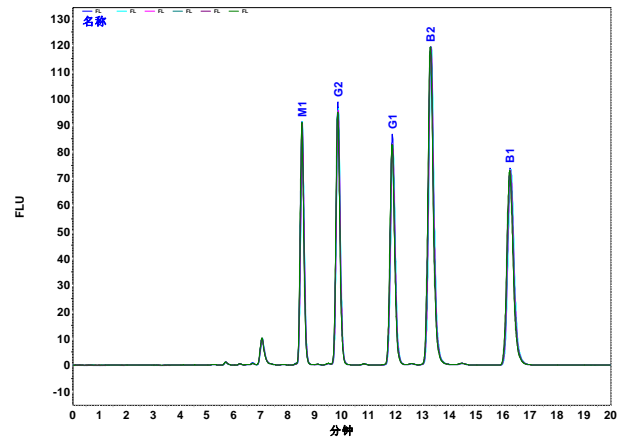


图 8 黄曲霉毒素混标重叠色谱图（6 针）  
( 保留时间的 RSD 均小于 0.1%，面积的 RSD 小于 0.13%，重现性好 )

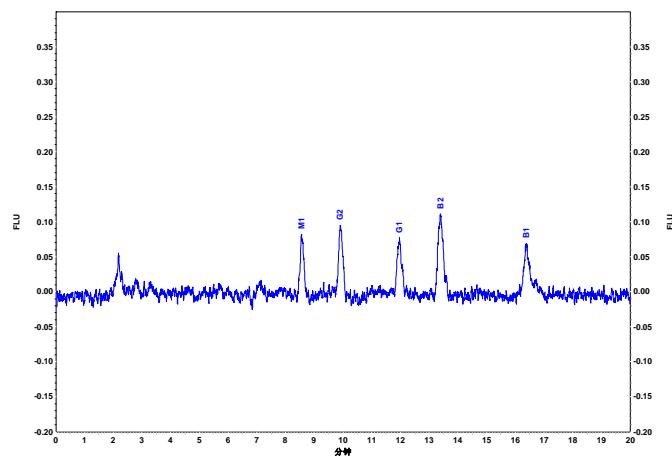


图 9 黄曲霉毒素混标检出限色谱图  
( B1=0.4ng/mL;B2=15pg/mL;G1=1.6ng/mL;G2=20pg/mL;M1=25pg/mL; )

天美（中国）科学仪器有限公司  
TECHCOMP (CHINA) LTD.

中国北京朝阳区天畅园 7 号楼 1、3 层  
TEL:010-64010651  
FAX:010-64060202  
E-MAIL :techcomp@techcomp.cn

## 附：黄曲霉毒素测定方法比较

方法名	酶联免疫吸附法	液相色谱法			
		柱后过溴化溴化吡啶衍生法	柱后碘衍生法	柱后光照衍生法	荧光检测器直接测定法
适用标准号	GB/T 17480-2008	GB/T 23212-2008	2010 中国药典第一部	参考方法	GB/T 18980-2003
标准名称	饲料中黄曲霉毒素 B1 的测定酶联免疫吸附法	牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2、M1、M2 的测定 液相色谱-荧光检测法	中华人民共和国药典 2010 年版一部 附录 IX V 黄曲霉毒素测定法		乳和乳粉中黄曲霉毒素 M1 的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法
使用仪器	酶标仪	HPLC-柱后衍生-荧光检测器	HPLC-柱后衍生-荧光检测器	HPLC-柱后光照单元-荧光检测器	HPLC-荧光检测器
优点	一次测定样品量大，一般情况下 42 个样	1、准确定量，高灵敏度， 2、后期使用成本低 3、仪器操作简单 4、B <sub>1</sub> 、B <sub>2</sub> 、G <sub>1</sub> 、G <sub>2</sub> 、M <sub>1</sub> 、M <sub>2</sub> 同时检测			1、准确定量，灵敏度较高 2、后期使用成本低 3、仪器操作简单 4、仪器购买成本较低 5、几种同时检测
缺点	1、仅能检测 B1 或者 M1，且不能同时检测 2、酶标物、终止剂加入的时间不同定量结果不一样，定量准确性差 3、使用试剂盒，大量样品测定成本高	相对前期购买仪器成本稍高			测定黄曲霉毒素 B1、G1 灵敏度比柱后衍生稍低
适宜客户	快速初级筛查定性	需要遵循国标，准确定量	需要遵循药典，准确定量	可使用参考方法，准确定量	可使用参考方法，准确定量