

## 免疫亲和色谱柱净化联合UPLC或HPLC及荧光检测测定各种食品和农产品中的黄曲霉毒素

---

Simon Hird, Kimberly Martin, Nancy Zabe Collette, Danrey Toth

Waters Corporation, VICAM

---

### 摘要

黄曲霉毒素是致癌性真菌毒素，分别会对食用受污染食物的人以及食用受污染饲料的动物的健康带来不利影响。我们开发出一种高灵敏度、高选择性方法，可以测定多种商品中的管制品黄曲霉毒素。使用液液萃取法从感兴趣的代表性商品（肉豆蔻、红辣椒、黑胡椒、可可、烘焙咖啡、狗粮和传统中药）中提取黄曲霉毒素，然后在新型AflaTest WB SR+色谱柱上进行免疫亲和柱净化。在HPLC (Alliance)和UPLC (ACQUITY UPLC H-Class PLUS)平台上进行荧光检测，分别在柱后衍生化和大体积流通池的支持下实现了色谱分离。通过重复分析七种不同基质的加标测试部分，评价了该方法的性能。总体回收率令人满意（介于82%和119%之间），且相对标准偏差低于8%。该方法具有良好的专属性，因为在空白样品中未观察到干扰峰。已证明该方法适用于监测全球食品是否符合黄曲霉毒素法规限值的要求。

### 优势

- 高性能 - 方法满足AOAC方法性能要求
- 完善 - VICAM AflaTest WB SR+色谱柱可结合黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2

- 灵活 - 一种标准化方法适用于分析一系列不同的商品

---

## 简介

真菌毒素是霉菌的有毒次级代谢物，可通过许多途径（包括生产、收获、储存、加工和运输）污染食品和农产品。真菌生长和真菌毒素的产生取决于生物（易感作物）和环境因素，植物发育和作物收获期间的地区气候条件特别重要。众所周知，真菌毒素对人类和动物的健康有不利影响，而且会造成重大经济损失并有可能破坏品牌声誉。

真菌毒素一直属于欧洲食品和饲料快速预警系统(RASFF)中通报的最高风险类别，并且经常导致货物在边境管制/报关口岸遭拒。食品和动物饲料中常见的毒性和致癌性最强的一组真菌毒素是黄曲霉毒素，其通常存在于坚果、坚果制品、玉米和谷物中，但也有报道称其存在于更广泛的作物中，包括咖啡、可可和香料以及动物源性食品（例如牛奶）。世界上许多国家都对黄曲霉毒素实施管制。最近一篇对该领域当代发表论文的综述中指出，食品中大量黄曲霉毒素的污染水平超出美国和欧盟分别为人类消费食品设定的法规限值20 µg/kg和4 µg/kg<sup>1</sup>。由此凸显了增加分析检测用作预防、控制和定期监测从田野到消费者各阶段真菌毒素的有效策略的需求。

黄曲霉毒素检测可采用多种解决方案，其中包括简便易用的快速检测方法（可用于生产环节）以及基于实验室的参考方法（更耗时，但可以提供更全面的污染水平情况）<sup>2</sup>。黄曲霉毒素的测定是一项艰巨的任务。样品基质可能很复杂（通常具有高脂质含量），给实验室测定所需的极低浓度以验证是否符合法规限值带来了额外的压力。基于抗体的免疫亲和色谱(IAC)柱净化结合HPLC分析与荧光检测是实现所需灵敏度和选择性的先决步骤，多年来已成功用作一种经济高效的方法来检查黄曲霉毒素是否符合法规限值<sup>3</sup>。通常，有机提取物在上样至IAC柱之前需要经过水性溶剂稀释，由此降低了方法的灵敏度。VICAM最近推出了一款新的IAC产品：AflaTest WB SR+，它能够耐受高浓度有机溶剂，因此无需进行稀释。除黄曲霉毒素M1、M2和杂色曲霉毒素以外，AflaTest WB SR+ IAC柱还可以结合黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2。本研究的目的是根据标准化检测程序，使用两种独立的HPLC/UPLC平台评估VICAM AflaTest WB SR+色谱柱测定复杂食品基质（三种香料、可可、烘焙咖啡、狗粮和一种传统中药(TCM)）中黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的性能。

---

## 实验

## 样品描述

TCM何首乌(*Fallopia multiflora*)、香料（肉豆蔻、红辣椒、黑胡椒）、可可、烘焙咖啡和狗粮样品通过商购获得，除狗粮外，其他样品均研磨成均质粉末。

## 样品提取与净化

图1显示了黄曲霉毒素分析中的样品提取与净化细节概述。使用乙腈和水(90/10, v/v)进行液相萃取，从每个样品中提取检测部分，并在搅拌器中均质化。然后将过滤后的提取物用缓冲液稀释，上样至含有黄曲霉毒素特异性抗体的AflaTest WB SR+ IAC柱上。黄曲霉毒素与色谱柱上的抗体结合。然后用水清洗色谱柱以去除色谱柱上的共提取物，再用甲醇与乙腈的混合溶液洗脱黄曲霉毒素。随后使用配备荧光检测器的HPLC/UPLC测定提取物中的黄曲霉毒素（更多详细信息参见图1）。[此处 <https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus>](https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus) 包含有关AflaTest WB SR+使用的更多详细信息。

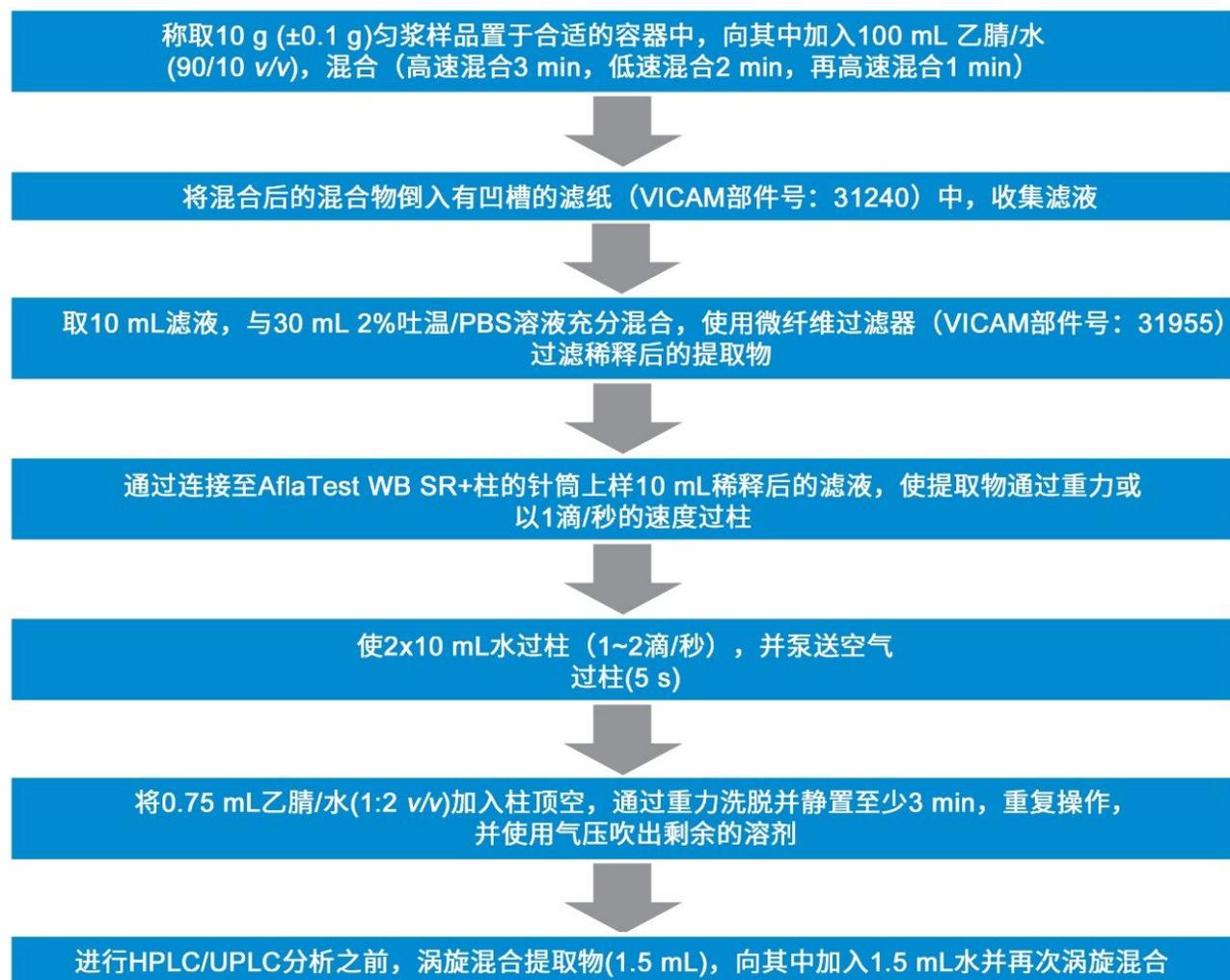


图1.各种食品中黄曲霉毒素分析的样品提取与净化细节概述

使用乙腈、甲醇和水(1:1:2 v/v)的混合溶液，由两种不同的工作标准品Sigma 48487-U和Supelco #CRM46304 (其中包含AFB1:AFB2:AFG1:AFG2分别为5:1:3:1和0.3:1:0.3:1的黄曲霉毒素混合物) 制备校准标准品。

## 方法条件

### HPLC条件

液相色谱系统:	Alliance e2695
检测条件:	多波长荧光检测器2475, 配备PhCR光化学反应器 (部件号: 600001222) ; 激发波长: 360 nm; 发射波长: 440 nm
样品瓶:	12 × 32 mm去活棕色玻璃螺纹颈口样品瓶 (部件 号: 186000846DV)
色谱柱:	Nova-Pak C <sub>18</sub> , 4 μm, 3.9 mm × 150 mm (部件 号: WAT086344)
柱温:	25 °C
样品温度:	25 °C
进样体积:	50 μL
流速:	0.8 mL/min
流动相A:	水(55%)
流动相B:	甲醇(45%)
运行时间:	12 min

## UPLC条件

液相色谱系统:	配备FTN样品管理器的ACQUITY UPLC H-Class PLUS
检测条件:	ACQUITY UPLC FLR检测器, 配备大体积流通池

(部件号: 205000609) ; 激发波长360 nm; 发射波长: 440 nm

样品瓶:	LCGC认证透明玻璃螺纹颈口样品瓶, 12 × 32 mm, 2 mL (部件号: 186000307C)
色谱柱:	ACQUITY UPLC HSS T3 1.8 μm, 2.1 × 100 mm (部件号: 186009468)
柱温:	25 °C
样品温度:	25 °C
进样体积:	3 μL
流速:	0.3 mL/min
流动相A:	水(55%)
流动相B:	甲醇(45%)
运行时间:	8 min

## 数据管理

色谱软件: Empower 3

## 方法验证

通过重复分析被视为空白样的样品加标测试部分进行方法验证。对于食品成分, 在3种总黄曲霉毒素加标浓度 (4 μg/kg、20 μg/kg和100 μg/kg) 下各制备5个重复样品; 而对于TCM, 则在总黄曲霉毒素加标浓度5 μg/kg和20 μg/kg下各制备3个重复样品。用于加标的标准溶液与上述相同。评估以下参数: 灵敏度、选择性、正确度和实验室内重复性(RSD<sub>r</sub>)。

---

## 结果与讨论

### 色谱分析

使用等度条件所得到的典型HPLC色谱图如图2所示。利用填充亚2  $\mu\text{m}$  多孔颗粒的ACQUITY UPLC色谱柱所带来的色谱效率提升来改善灵敏度、分离度和分析速度。图3显示，使用UPLC在7 min内实现了黄曲霉毒素的高效分离。两种色谱柱均为所有分析物提供了优异的保留和峰形，并实现了所有目标黄曲霉毒素的完全分离。

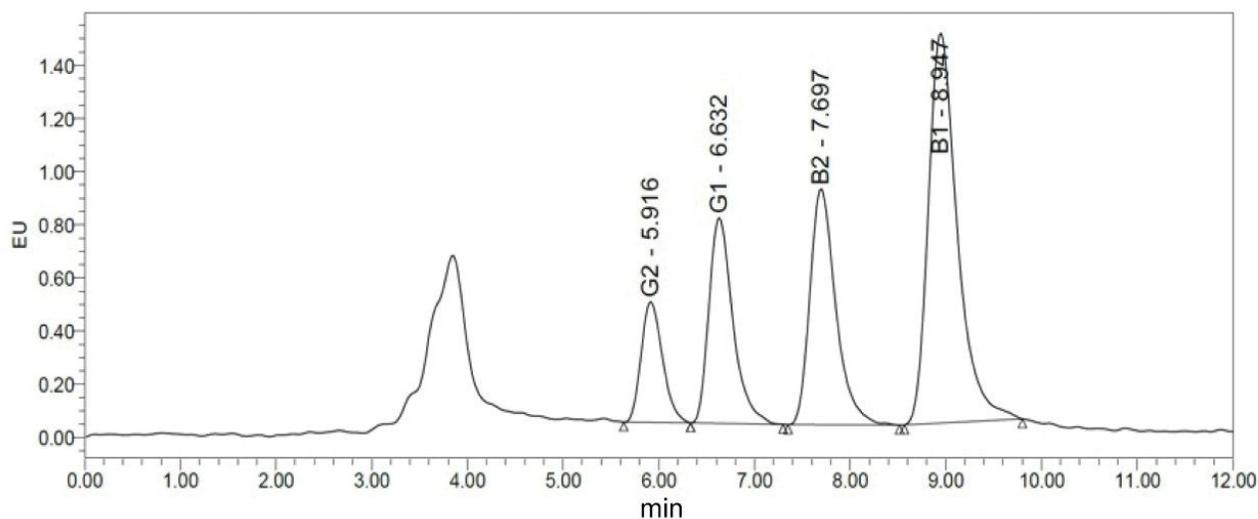


图2.分析总黄曲霉毒素加标浓度为4.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的黑胡椒所得到的HPLC色谱图

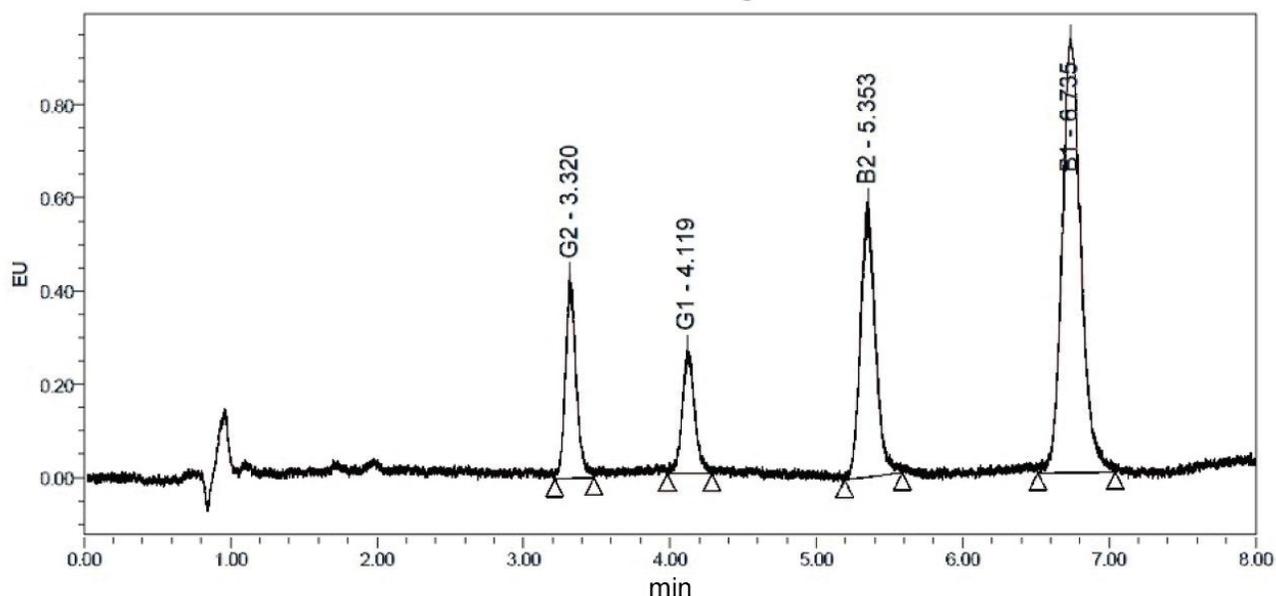


图3.分析总黄曲霉毒素加标浓度为5.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的TCM所得到的UPLC色谱图

## 灵敏度和选择性

使用等度条件的HPLC-FLD通常可以在衍生化后提高对AFB1和AFG1的灵敏度，多年来一直用于黄曲霉毒素检测<sup>4</sup>。与碘和Kobra池不同，在线柱后连续光解衍生化以光化学方式进行衍生化，无需在流动相中添加额外的化学物质。该方法经验证后，成为测定玉米和花生中黄曲霉毒素的AOAC方法<sup>5</sup>。在Waters ACQUITY UPLC FLR检测器中使用大体积流通池，无需进行任何柱后衍生化，并提供了极低的黄曲霉毒素定量限<sup>6</sup>。两种方法的灵敏度（如上述色谱图中峰的S/N所示）表明，它们适用于在世界各地检查黄曲霉毒素是否符合最大法规限值。

在大多数空白样品中未检测到可能导致误报不合规样品的信号。例如，可以比较图4中显示的黑胡椒分析所得到的色谱图。但肉豆蔻样品中黄曲霉毒素的检测结果显示。肉豆蔻中存在的黄曲霉毒素显著影响了加标浓度为4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的分析数据，因此未报告最低浓度下的完整结果。通过将加标浓度为10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (n=2)的样品结果添加至较高浓度下的完整数据集中来提供性能指标。利用空白校正计算加标测试部分的浓度。

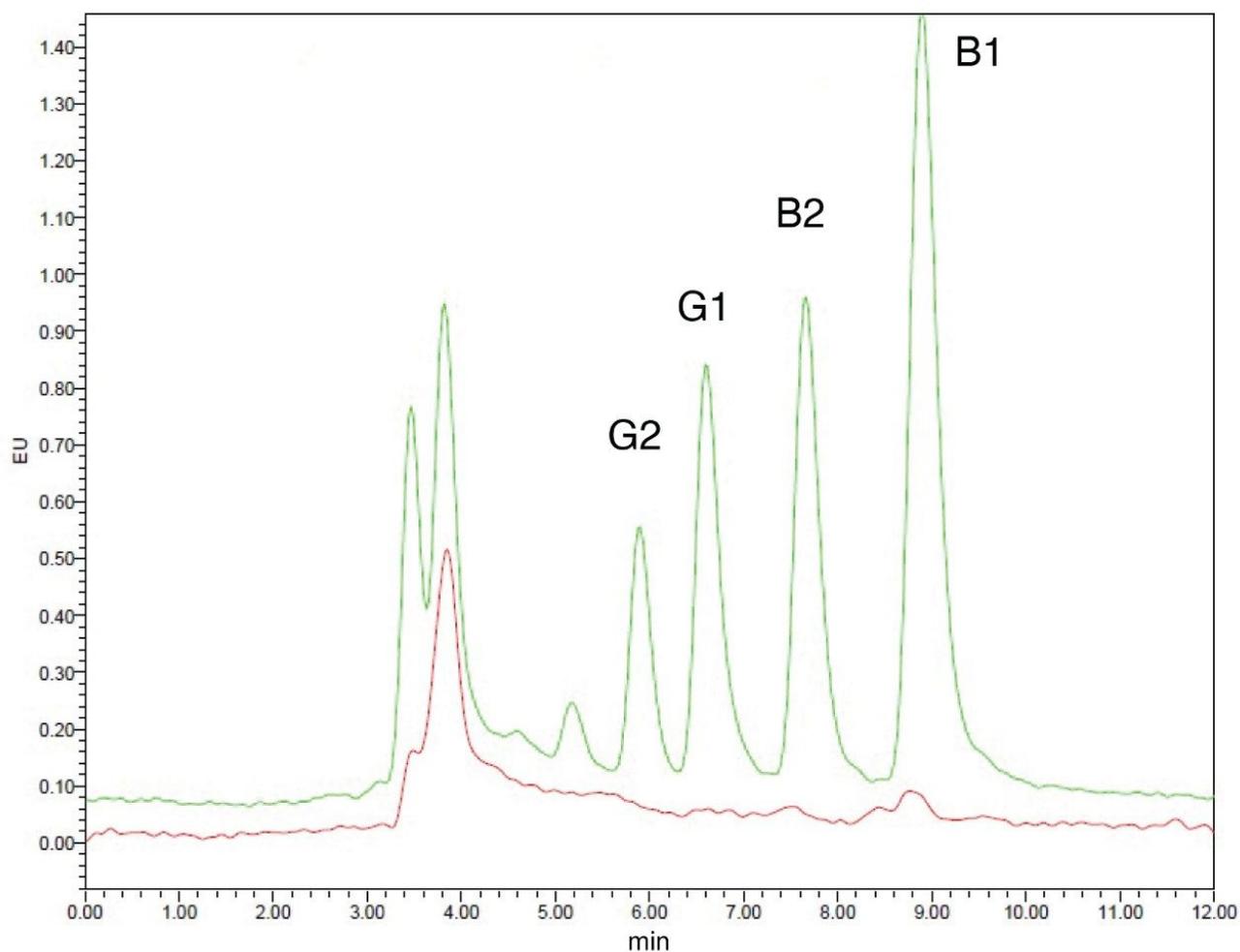


图4.在添加浓度为4.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的总黄曲霉毒素之前（红色）和之后（绿色）分析黑胡椒所得到的HPLC色谱图

## 正确度和重复性

使用分析加标样品得到HPLC数据评估正确度，结果以回收率表示。回收率平均值在82%~119%的范围内，其中三个值略高于CODEX<sup>7</sup>和欧盟委员会<sup>8</sup>的要求，但处于AOAC<sup>9</sup>所提供的范围内（参见表1和图5）。重复性(RSD<sub>r</sub>)出色，平均值介于0.8%~9.5%之间（参见表2和图6）。由于建议值通常由Horwitz方程得出，因此在这些非常低的浓度下，RSD<sub>r</sub>的建议值为14.5%。表3列出了使用有关膳食补充剂和植物性药物的AOAC标准分析TCM所得到的结果<sup>10</sup>。

黄曲霉毒素	加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	建议回收率 (%)		平均回收率 (%)					
		欧盟委员会 法规(EC) No 401/2006	AOAC	辣椒粉	黑胡椒	可可	烘焙咖啡	肉豆蔻	狗粮
G2	0.46	50-120	40-120	107	102	100	96	104#	87
	2.3	70-110	40-120	116	107	107	101	102	99
	11.5	80-110	60-115	108	104	103	98	101	86
G1	1.5	70-110	40-120	109	104	102	96	102#	84
	7.7	70-110	40-120	114	107	107	95	99	94
	38.5	80-110	60-115	107	101	108	95	99	84
B2	0.46	50-120	40-120	103	100	95	86	98#	82
	2.3	70-110	40-120	110	103	98	93	84	94
	11.5	80-110	60-115	102	100	96	92	94	82
B1	1.5	70-110	40-120	102	96	99	92	97#	88
	7.7	70-110	40-120	110	101	101	89	119	87
	38.5	80-110	60-115	101	100	99	91	91	82

表1.各加标浓度下的回收率平均值汇总(#10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n=2$ )。

黄曲霉毒素	加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	建议RSD <sub>r</sub> (%)		平均重复性 (% RSD <sub>r</sub> )					
		欧盟委员会 法规(EC) No 401/2006	AOAC	辣椒粉	黑胡椒	可可	烘焙咖啡	肉豆蔻	狗粮
G2	0.46	14.5	16	5.5	2.1	6.9	4.4	0.4#	5.0
	2.3		16	2.7	2.3	1.4	1.5	3.1	5.9
	11.5		22	3.9	1.8	4.1	1.9	4.7	4.3
G1	1.5		16	6.8	2.4	6.3	7.8	0.6#	4.5
	7.7		16	3.9	5.4	2.2	1.6	5.0	5.6
	38.5		22	2.9	1.8	6.8	1.8	4.9	4.5
B2	0.46		16	6.5	2.4	6.2	3.7	0.6#	4.1
	2.3		16	4.2	3.5	1.8	2.4	5.5	6.4
	11.5		22	3.3	1.7	5.0	1.7	4.9	4.0
B1	1.5		16	7.9	4.5	6.3	7.4	1.3#	6.1
	7.7		16	4.9	3.9	2.4	2.5	9.5	7.2
	38.5		22	3.6	2.0	7.1	1.6	5.0	4.2

表2.各加标浓度下的重复性平均值汇总(#10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $n=2$ )。

黄曲霉毒素	加标浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	AOAC建议		平均观测值	
		回收率 (%)	RSD <sub>r</sub> (%)	回收率 (%)	RSD <sub>r</sub> (%)
G2	5.0	75-120	8.0	99	3.1
	20	70-125	15	96	0.8
G1	5.0	75-120	8.0	105	3.1
	20	70-125	15	99	0.8
B2	5.0	75-120	8.0	96	4.1
	20	70-125	15	93	1.7
B1	5.0	75-120	8.0	103	3.3
	20	70-125	15	98	0.8

表3.TCM的回收率和重复性平均值汇总

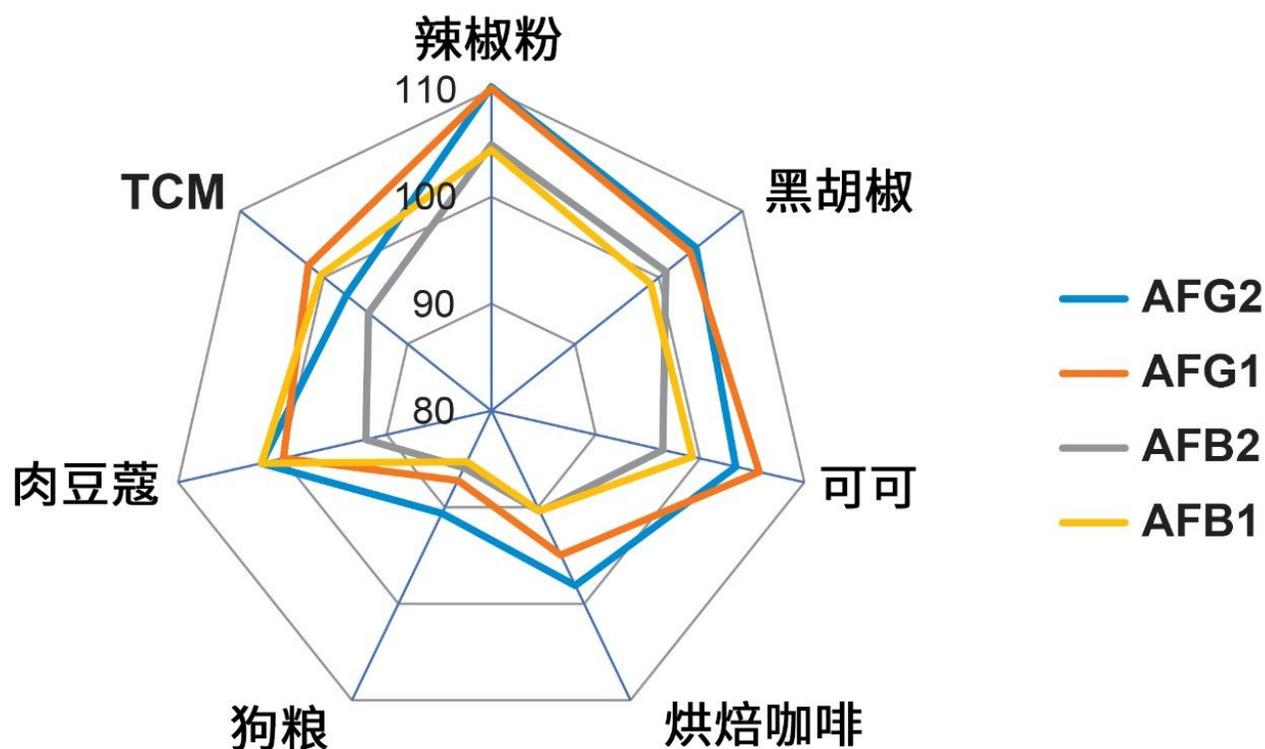


图5.食品类商品的回收率总体平均值(%)的雷达图

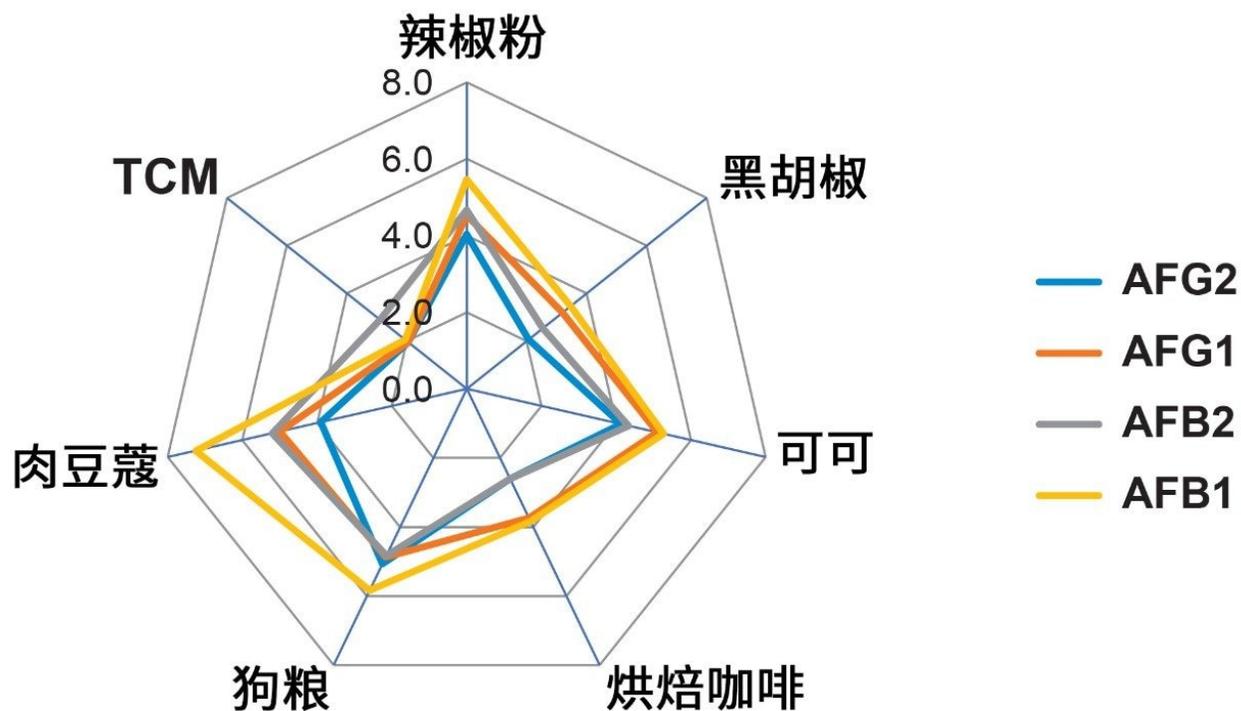


图6. 食品类商品的重复性平均值(%  $RSD_r$ )的雷达图

## 结论

使用90%乙腈萃取和AflaTest WB SR+ IAC净化柱可以去除基质共提取物，即使在复杂商品的分析中也能获得出色的回收率和精密度。UPLC选项提供了缩短分析运行时间的可能，并且在荧光检测器中使用大体积流通池后，无需进行柱后衍生化。该方法具有检查各种作物和食品中的黄曲霉毒素是否符合法规限值所需的灵敏度、选择性和整体性能。

## 参考资料

1. Kaale, L *et al.* Aflatoxin Contamination and Recommendations to Improve its Control: A Review. *World*

*Mycotoxin Journal* 2021 14(1):27–40.

2. Gabriella, M *et al.* Detection of Aflatoxins in Different Matrices and Food-chain Positions. *Front. Microbiol.* 2020 11:1916.
3. Zhang, K and Banerjee, K. A Review: Sample Preparation and Chromatographic Technologies for Detection of Aflatoxins in Foods. *Toxins* 2020 12(9):539.
4. Afsah-Hejri, L *et al.* Optimization of HPLC Conditions for Quantitative Analysis of Aflatoxins in Contaminated Peanut. *Food Control* 2011 22(3-4):381–388.
5. Waltking A and Wilson D. Liquid Chromatographic Analysis of Aflatoxin Using Post-column Photochemical Derivatization: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* 2006 89(3):678–92.
6. Oulkar, D *et al.* High-sensitivity Direct Analysis of Aflatoxins in Peanuts and Cereal Matrices by UltraPerformance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection Involving a Large Volume Flow Cell. *J. Environ. Sci. Health Part B* 2017 53:255–260.
7. *Codex Alimentarius*. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed. CXS 193-1995 revised 2019. FAO/WHO.
8. European Union. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006. Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* 2006, L 70:12–34.
9. AOAC. Official Methods of Analysis. Appendix F Guidelines for Standard Method Performance Requirements, 2016.
10. AOAC. Official Methods of Analysis. Appendix E Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, 2013.

---

## 特色产品

Alliance HPLC系统 <<https://www.waters.com/534293>>

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

---

[Empower 色谱数据系统 <https://www.waters.com/10190669>](https://www.waters.com/10190669)

[ACQUITY UPLC FLR 检测器 <https://www.waters.com/514222>](https://www.waters.com/514222)

[2475 荧光 \(FLR\) 检测器 <https://www.waters.com/514434>](https://www.waters.com/514434)

[AflaTest WB SR+ 免疫亲和柱 <https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus>](https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus)

720007280ZH, 2021年6月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号