

## 使用免疫亲和色谱和Arc™ HPLC系统分析玉米和花生中的黄曲霉毒素

---

Ting Sun, Nicola Dreolin, Simon Hird, Nancy Collette

Waters Corporation

---

### 摘要

黄曲霉毒素是由真菌产生的致癌化合物，在世界范围内受到监管，包括食品和饲料中的最高限量。本应用纪要介绍了使用Waters Arc HPLC系统和荧光检测器对现有AOAC方法的改进。样品净化步骤使用AflaTest™ WB免疫亲和柱(IAC)高效完成。玉米或花生的回收率超过90%，因此符合欧盟标准。该方法已被证明适用于检查产品是否符合法规限值。

### 优势

- 沃特世新型Arc HPLC系统可用于成功分析黄曲霉毒素，达到或超过以前使用AOAC方法的条件
- Arc HPLC系统的运行流速可以更快，从而缩短运行时间，还可以选择不使用光化学反应器
- AflaTest免疫亲和柱净化的原始方案得到改进，样品制备时间缩短，黄曲霉毒素回收率符合监管验收标准
- 本研究中的Arc HPLC条件可用于分析其他类型食品或饲料（包括婴儿食品）中的黄曲霉毒素

---

### 简介

---

黄曲霉毒素是由多种曲霉菌株产生的一组真菌代谢产物，存在于许多食物中，例如谷物、香料、坚果和干果等<sup>1-3</sup>。真菌会在收获前和收获后污染未加工的农产品，也可能存在于成品食品中。黄曲霉毒素对人类和其他哺乳动物具有毒性和致癌性，称为黄曲霉毒素中毒(aflatoxicoses)。业界感兴趣的主要黄曲霉毒素是黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2<sup>1</sup>。黄曲霉毒素B1是其中含量最多、毒性最大的化合物，被世界卫生组织国际癌症研究机构列为1类致癌物。

由于担心食品和饲料中的黄曲霉毒素污染会对人类和动物健康造成影响，许多国家/地区已颁布法规来控制黄曲霉毒素的含量，包括黄曲霉毒素的最高允许含量<sup>4</sup>。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>5</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。

高效液相色谱(HPLC)搭配荧光检测(FLD)是一种重要的分析技术，用于在液-液萃取和IAC净化后测定食品和饲料中黄曲霉毒素的浓度。之前的研究中已经使用HPLC (Alliance)和UPLC (ACQUITY)平台搭配荧光检测，在柱后衍生化的支持下进行了HPLC分析<sup>6</sup>。Arc HPLC是一种四元LC系统，具有残留更低、反压限值更高以及自动灌注和系统准备的优势，可用于提高现有方法的性能<sup>7,8</sup>。得益于Arc HPLC系统的高压力上限，您可以使用高流速和更小粒径的色谱柱来提高柱效，并缩短分析运行时间。

本研究的目的是将黄曲霉毒素分析的现有AOAC方法转移到新的Arc HPLC系统，并在检查食品或饲料中黄曲霉毒素是否符合法规限值所需的极低浓度下确定改进后的方法的性能。

---

## 实验

### 样品描述和前处理

玉米和花生由商购获得，并在提取前磨碎。

本研究使用了官方AOAC方法991.31的修改版<sup>9</sup>。AflaTest WB (VICAM货号G1024)是一种IAC净化柱，用于加速黄曲霉毒素分析，符合AOAC官方方法991.31中黄曲霉毒素免疫亲和柱的要求。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。将磨碎的玉米或花生匀浆与氯化钠(NaCl)以及甲醇(MeOH)和水(H<sub>2</sub>O)的混合物混合。稀释后，将提取物上样到含有黄曲霉毒素特异性抗体的AflaTest WB IAC柱上，洗涤并洗脱黄曲霉毒素。随后的测定使用Arc HPLC搭配FLD进行。有关AflaTest WB柱的更多详细信息，请访问<https://www.vicam.com/products/aflatest-wb> <<https://www.vicam.com/products/aflatest-wb>>。



图1.样品前处理方案

黄曲霉毒素标准品（分别含有1、0.3、1、0.3 μg/mL黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2）购自Sigma-Aldrich（密苏里州圣路易斯）。每天用甲醇:水(50:50, v/v)配制不同浓度的黄曲霉毒素标准品。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	Arc HPLC
检测:	PhCR光化学反应器(VICAM P/N: 600001222)和2475荧光(FLR)检测器， 激发波长为360 nm，发射波长为440 nm
样品瓶:	12 × 32 mm去活棕色玻璃螺口瓶，2 mL (P/N: 186000846DV)
色谱柱:	XSelect HSS T3色谱柱, 100 Å, 3.5 μm, 4.6 x 150 mm (P/N: 186004786)
柱温:	40 °C
样品温度:	15 °C

进样体积：	50 $\mu$ L
流速：	1 mL/min
流动相：	等度（55:45水相（水）:有机相（甲醇）， v/v)
运行时间：	12 min

## 数据管理

色谱软件：Empower 3 (CDS)

使用Empower Personal System Suitability计算信噪比(S/N)。分别以S/N 3和S/N 10估计检测限和定量限。在玉米粉或花生匀浆中加入0.5、4、50  $\mu$ g/kg总黄曲霉毒素（黄曲霉毒素B1:B2:G1:G2的比例为1:0.3:1:0.3），每个浓度一式三份。使用与空白样相同的程序分析未加标黄曲霉毒素的玉米粉或花生匀浆中的黄曲霉毒素。黄曲霉毒素的回收率计算如下：（加标样品中的计算浓度 - 空白样品中的计算浓度）/加标浓度 \*100。使用由溶剂制作的标准曲线计算黄曲霉毒素的浓度。通过方差分析(ANOVA)检查每种黄曲霉毒素回收率的差异。使用 $\alpha = 0.05$ 的显著性水平，并使用SAS（版本9.4，SAS Institute Inc. Cary，美国北卡罗来纳州）执行统计检验。

---

## 结果与讨论

### 方法转移到Arc HPLC

将黄曲霉毒素分析的原始AOAC方法991.31转移到Arc HPLC中，该系统使用光化学反应器进行黄曲霉毒素的衍生化并更新了色谱柱选择。流速设为1 mL/min时，黄曲霉毒素实现了良好分离（分离度 $>1.5$ ），峰在6~11分钟之间洗脱（图2）。不过，由于Arc HPLC的压力限大于旧款HPLC系统（现在高达9500 psi<sup>7</sup>），因此可以在不达到压力限的情况下增加流速。如果流速增加到1.5 mL/min，黄曲霉毒素峰洗脱得更早，分离度没有明显损失（分离度 $>1.5$ ），运行时间得以缩短（图3）。

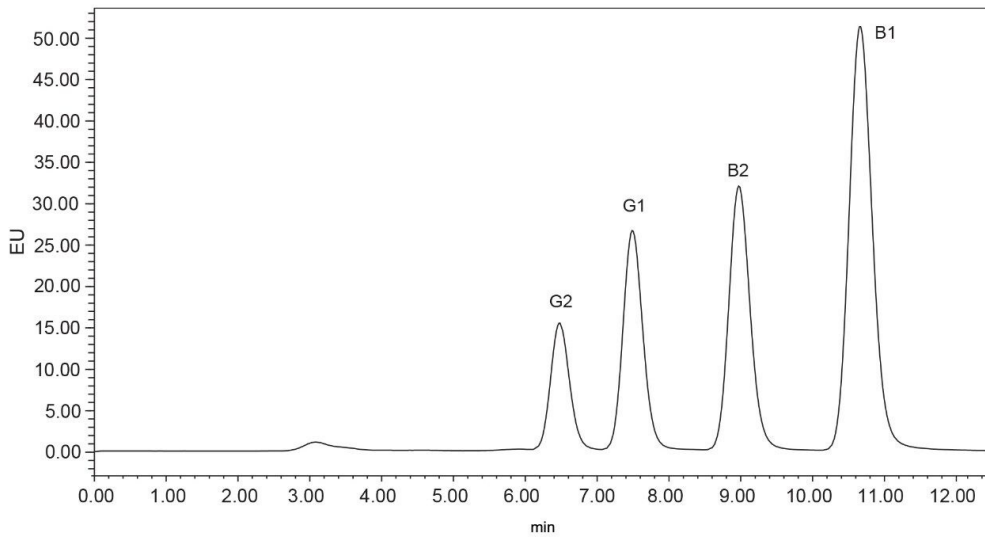


图2.使用光化学反应器，流速设为1 mL/min时，样品中黄曲霉毒素相当于60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的色谱图

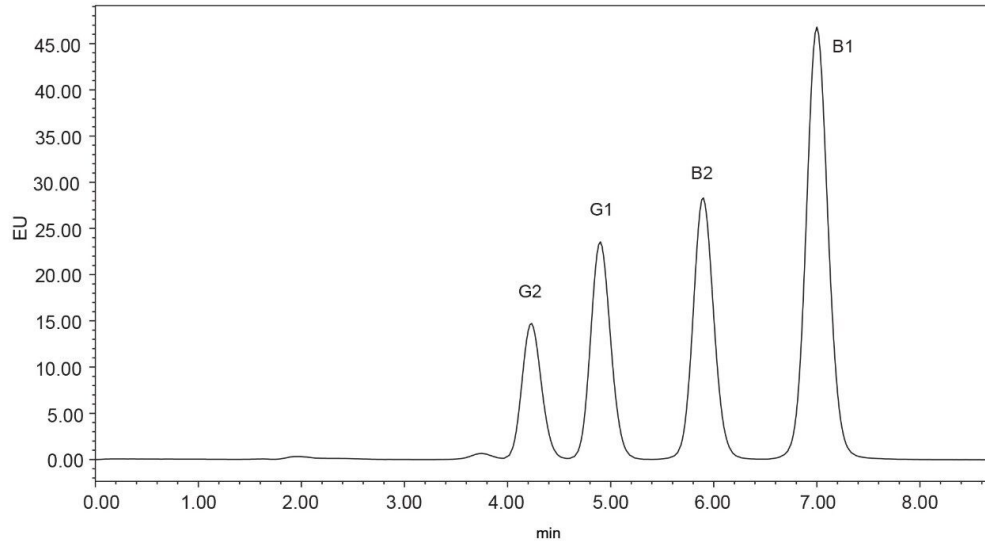


图3.使用光化学反应器，流速设为1.5 mL/min时，样品中黄曲霉毒素相当于60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的色谱图

## 检测限和定量限

由于食品中的法规限值较低且黄曲霉毒素B1和G1的固有荧光较低，因此可以使用光化学反应器(PhCR)系统来完成柱后衍生化，以此改进黄曲霉毒素的分析。利用此配置，流速设为1 mL/min时，样品中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的检测限分别相当于0.01、0.006、0.02、0.008  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；而样品中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的定量限分别相当于0.03、0.02、0.05、0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。或者，也可以在未安装光化学检测器的系统进行分析。图4显示了未经柱后衍生化处理的黄曲霉毒素的相对响应。在未使用PhCR，流速设为1 mL/min时，样品中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的检测限分别相当于0.10、0.005、0.12、0.005  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

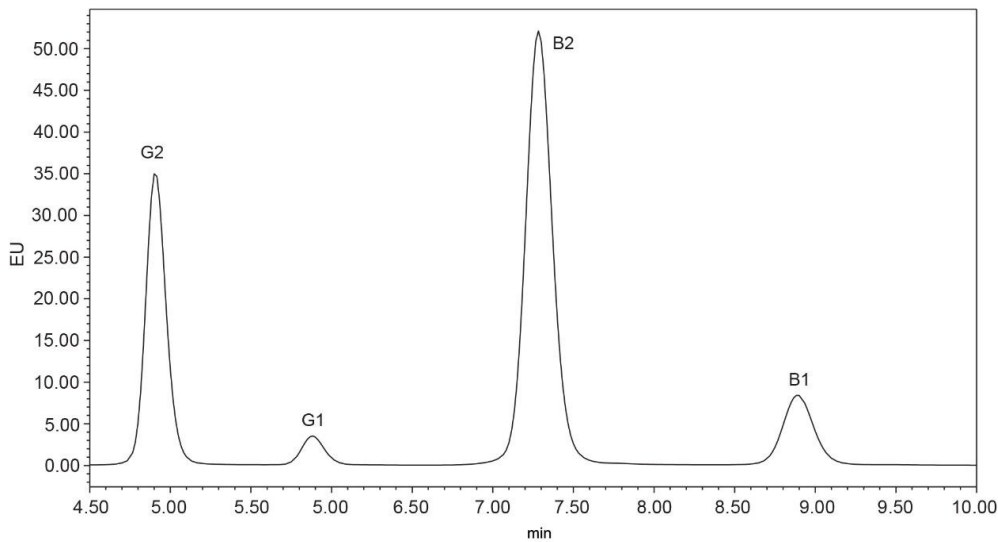


图4.未使用光化学反应器，流速设为1 mL/min时，样品中黄曲霉毒素相当于60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的色谱图

在使用免疫亲和柱和HPLC分析婴儿食品中黄曲霉毒素B1的AOAC官方方法2000.16中，婴儿食品中黄曲霉毒素B1的检测限为0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>10</sup>。此外，欧盟规定谷类加工食品和婴幼儿食品以及特殊医学用途的婴幼儿专用膳食食品中黄曲霉毒素B1的最高检出水平为0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>11</sup>。还规定了花生、坚果和其他一些油籽中B1、B2、G1和G2的总含量最高为4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本文描述的使用柱后衍生化的方法的定量限显著低于0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，满足婴儿食品中黄曲霉毒素的分析要求。

## 线性

该方法的线性范围在原始样品中为0.5–300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （总黄曲霉毒素）。标准曲线的线性由校准曲线回归拟合的决定

系数( $r^2$ )确定, 所有化合物均 $>0.99$ 。

各法规还规定了不同黄曲霉毒素的最高含量。例如, 欧盟规定受管制食品中黄曲霉毒素B1的最高含量范围为0.1~12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 总黄曲霉毒素的最高含量范围为4~15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>11</sup>。美国食品药品监督管理局(FDA)规定食品中总黄曲霉毒素的最高含量需低于20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 不同饲料中总黄曲霉毒素的最高含量为20、100、200或300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>12,13</sup>。这些黄曲霉毒素值均在该方法中黄曲霉毒素标准曲线的线性范围内。

## 黄曲霉毒素的回收率和方法重复性

表1以及图5和图6显示了玉米或花生分析中黄曲霉毒素的回收率值。空白玉米和空白花生中均未检出黄曲霉毒素。三种加标浓度下玉米或花生中黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2的平均回收率均大于90%。尽管玉米和花生之间或不同加标浓度之间的回收率存在一些差异, 但黄曲霉毒素B1、B2、G1或G2的回收率在这两种食品或三种加标浓度之间的差异并不显著(两因素方差分析,  $N=18$ ,  $P>0.05$ )。总体而言, 对于所有黄曲霉毒素和所有加标浓度, 黄曲霉毒素的回收率均超过90%, 回收率标准偏差( $n=9$ )小于或等于7% (表1)。本研究中黄曲霉毒素的回收率符合欧盟委员会推荐值(总黄曲霉毒素 $<1.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率为50%~120%, 总黄曲霉毒素1~10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率为70%~110%, 总黄曲霉毒素 $>10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率为80%~110%)<sup>14</sup>。

食品	黄曲霉毒素	平均回收率(%)	重复性 RSDr (%)
玉米	B1	92	5
	B2	102	5
	G1	102	4
	G2	102	6
花生	B1	96	7
	B2	97	5
	G1	96	5
	G2	98	6

表1. 玉米和花生中总黄曲霉毒素加标浓度为0.5、4、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 黄曲霉毒素在重复性条件下的平均回收率和相对标准偏差(RSDr %,  $n=9$ )

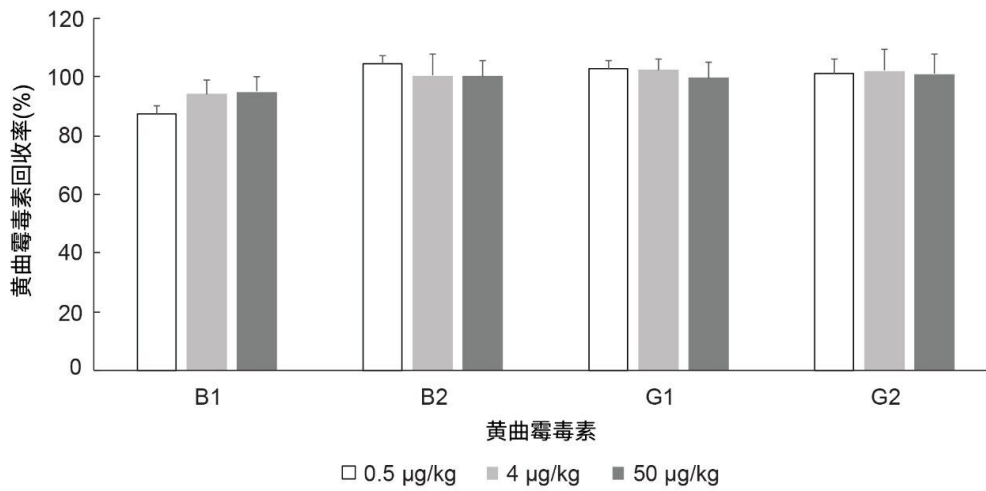


图5.玉米中总黄曲霉毒素加标浓度为0.5 µg/kg、4 µg/kg、50 µg/kg时黄曲霉毒素的回收率( $n=3$ )

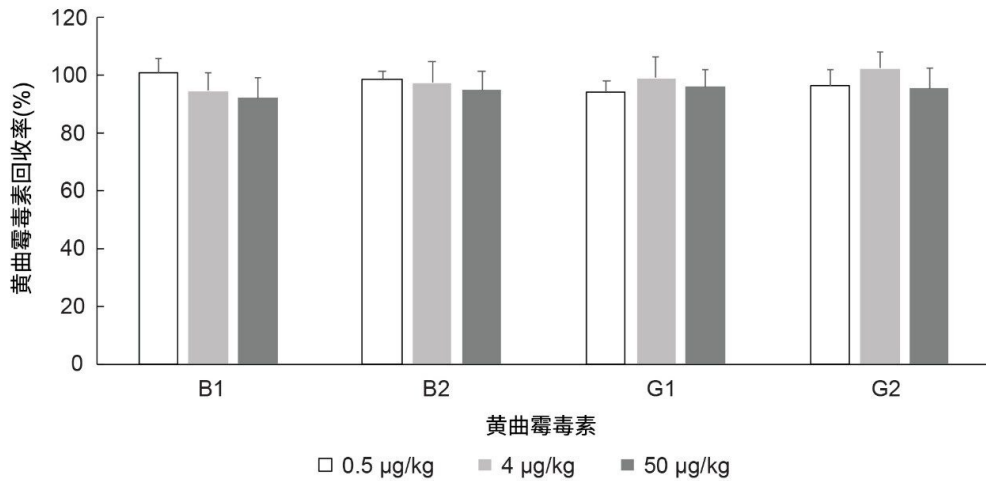


图6.花生中总黄曲霉毒素加标浓度为0.5 µg/kg、4 µg/kg、50 µg/kg时黄曲霉毒素的回收率( $n=3$ )



---

## 结论

黄曲霉毒素分析的AOAC方法被成功转移至Arc HPLC。该方法使用3.5 μm粒径的色谱柱进行了改进，提高了色谱效率并缩短了运行时间。Arc HPLC可以很好地应对来自小粒径色谱柱的高背压。此外，研究表明，免疫亲和柱(AflaTest WB)可以减少提取物体积，缩短净化时间，同时保持足够的灵敏度。新方法提供了良好的检测限和定量限、合适的线性范围、良好的回收率和较低的回收率标准偏差，完全满足食品或饲料（包括婴儿食品）中黄曲霉毒素分析的法规要求。

---

## 参考资料

1. Abrar M, Anjum FM, Butt MS, Pasha I, Randhawa MA, Saeed F, Waqas K. Aflatoxins: Biosynthesis, Occurrence, Toxicity, and Remedies. *Crit.Rev. Food Sci.Nutr.* 2013 53(8):862–874.
2. Mahato DK, Lee KE, Kamle M, Devi S, Dewangan KN, Kumar P, Kang SG. Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Front.Microbiol.* 2019 10:2266.
3. Singh J, Mehta A. Rapid and Sensitive Detection of Mycotoxins by Advanced and Emerging Analytical Methods: A Review. *Food Sci.Nutr.* 2020 8(5):2183-2204.
4. Eskola M, Kos G, Elliott CT, Hajšlová J, Mayar S, Krska R. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%. *Crit.Rev. Food Sci.Nutr.* 2020 60(16):2773–2789.
5. Kaale LD, Kimanya ME, Macha IJ, Mlalila N. Aflatoxin Contamination and Recommendations to Improve its Control: A Review. *World Mycotoxin J.* 2021 14(1):27–40.
6. Hird S, Martin K, Collette NZ, Toth D. 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. 沃特世应用纪要, 720007280ZH, 2021年6月.
7. Arc HPLC System Instrument Specifications. 720006861 <  
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006861en.pdf>> , 2021 Nov.
8. Waters Arc HPLC. 720006940ZH <  
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720006940en.pdf>> , 2021年2月.

9. AOAC, Aflatoxins in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter, Immunoaffinity Column (Aflatest) Method 991.31. AOAC INTERNATIONAL 2005.
10. AOAC, Aflatoxin B1 in Baby Food Immunoaffinity Column HPLC Method 2000.16. AOAC INTERNATIONAL 2005.
11. European Commission Regulation (EU) No 165/2010 Amending Regulation (EC) No 1881/2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs as Regards Aflatoxins. *OJ L 50*, 27.2.2010, p. 8–12.
12. Sec.555.400 Aflatoxins in Human Food. Food and Drug Administration: Rockville, MD. 2019.
13. Sec.683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Food. Food and Drug Administration: Rockville, MD. 2019.
14. European 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. *OJ L 70*, 9.3.2006, p. 12–34.

## 致谢

Ting Sun和Nancy Collette为沃特世人员 | VICAM

---

## 特色产品

Arc HPLC系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>

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

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

<<https://www.vicam.com/store/phcr->

photochemical-

reactor <<https://www.vicam.com/products/aflatest->

PhCR光化学反应器 > <[wb](#)>

AflaTest WB免疫亲和色谱柱 >

720007843ZH, 2023年1月



© 2024 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