

OASIS® HLB 固相萃取-高效液相色谱柱后衍生荧光检测 花生中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂

于彦彬¹, 万述伟¹, 谭培功², 王孝钢¹, 苗在京¹

(1. 青岛市农产品质量监督检测中心, 山东 青岛 266071; 2. 青岛市环境保护监测站, 山东 青岛 266003)

关键词: 高效液相色谱法; OASIS® HLB 固相萃取柱; 荧光检测; 柱后衍生; 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂; 花生

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2004)06-0658-01

测定黄曲霉毒素主要有薄层色谱法、柱前衍生液相色谱法^[1]和柱后衍生液相色谱法^[2]等。样品净化主要有液-液分配、C₁₈键合柱^[3]、免疫亲和柱^[4]等方法。OASIS® HLB 是 Waters 公司近几年开发的亲水亲脂固相萃取柱, 已用于腐败生物组织中吗啡的检测^[5], 它与传统的 C₁₈ 柱相比具有选择范围广、吸附能力强、重现性好、回收率高等特点, 但尚未见应用于花生中黄曲霉毒素测定的报道。本文采用 OASIS® HLB 固相小柱, 建立了以碘作为柱后衍生试剂, 反相液相色谱荧光检测花生中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的分析方法。该方法简单、快速、分离能力强、基体干扰少、准确度高。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Waters Alliance 液相色谱系统, 包括 Waters 2695 分离单元、Waters 2475 多波长荧光检测器、Millennium³² 色谱信息管理系统、120 位自动进样器; 柱后衍生单元 Waters Post Column Reaction Module, 温度控制单元 Waters Temperature Control Module, 衍生试剂泵 Waters Reagent Manager。液相色谱柱 Symmetry Shield™ RP₁₈, 150 mm × 3.9 mm i. d., 5 μm; OASIS® HLB(30 g/L) 固相萃取柱(Waters 公司); B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 标准溶液: B₁、G₁ 为 5.0 mg/L; B₂、G₂ 为 1.5 mg/L; 溶剂为乙腈, 使用时, 用甲醇稀释成适宜的浓度, 稀溶液现用现配。碘(分析纯)称取 200 mg 碘于 100 mL 烧杯中, 加约 10 mL 甲醇, 待碘完全溶解后, 转移于 1.0 L 容量瓶中。用超纯水稀释至刻度, 摇匀, 有沉淀。使用前, 以 0.45 μm 水相滤膜过滤。甲醇、乙腈均为色谱纯; 正己烷为分析纯, 使用前用全玻璃蒸馏器重蒸。

1.2 色谱分离条件及柱后衍生条件

流动相为甲醇-水, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 衍生反应温度 80 °C, 碘的流速 0.20 mL/min, 激发波长 365 nm、发射波长 455 nm, 进样 10 μL。

1.3 实验方法

(1) 样品的提取: 称取粉碎过筛(10 目)样品 20.00 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中, 加入 5 g 氯化钠、30 mL 正己烷, 准确加入 100 mL 60% (体积分数) 甲醇水溶液, 摇匀, 放在超声波清洗器中超声提取 30 min。提取后, 用直径 15 cm 快速定性滤纸过滤, 待静止分层后, 取 1.00 mL 甲醇水溶液净化。

(2) 样品的净化: 将 OASIS® HLB 小柱置于 5 mL 刻度试管中, 加 1 mL 甲醇活化小柱, 待甲醇至 OASIS® 小柱吸附剂上层时, 再加 1 mL 纯水平衡小柱, 然后加 1 mL 样品, 用 1 mL 水清洗 OASIS® 小柱以除去杂质。最后以 1.0 mL 甲醇洗脱, 洗脱液用甲醇定容 2.00 mL, 待分析。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的建立

采用液相色谱分离柱 Waters Symmetry Shield™ RP₁₈, 优化确定流动相甲醇-超纯水的体积比为 35:65, 等度洗脱 20 min, 4 种黄曲霉毒素标准溶液均能达到基线分离。样品通过 OASIS® 小柱净化后, 基体的干扰比直接进样大大减少。

2.2 碘流速对衍生反应的影响

黄曲霉毒素 B₂ 和 G₂ 本身有很强的荧光, 不需要衍生。而 B₁ 和 G₁ 如果不衍生, 荧光强度弱、重现性差。黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 的衍生主要采用碘氧化法^[2]和三氟乙酸法^[1], 前法比后法简单, 衍生物的荧光强度与 B₂ 相同。但因碘原子是重原子, 碘的流速对荧光强度影响较大, 而目前各文献报道碘的最佳流速差别很大。实验表明, 随着碘流速的增大, B₂ 和 G₂ 荧光强度(峰面积)会不断减小; B₁ 和 G₁ 荧光强度在碘的流速达到一定值以后亦随着碘的流速增大而减小。综合考虑两方面的因素, 选用碘的流速为 0.20 mL/min。

2.3 检测限、线性范围及线性关系

在仪器最佳测定条件下, 测定了 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 保留时间的重现性(n=6), 其相对标准偏差(RSD)为 0.1%~0.2%。B₂ 和 G₂ 的线性范围为 3~150 pg, B₁ 和 G₁ 的线性范围为 10~500 pg; 相关系数大于 0.999; 最小检出量(S/N=3)为 0.111~0.240 pg。

2.4 实际样品的测定结果

按照样品的测定步骤, 测定了花生中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的实际含量, 并向实际样品中加入 5.0 mg/L B₁ 和 G₁、1.5 mg/L B₂ 和 G₂ 各 0.20 mL, 结果 B₂ 的 RSD(n=5)为 1.2%, B₁、G₁、B₂ 和 G₂ 的平均加标回收率(n=5)为 68.8%~101%, 回收率的 RSD 为 5.0%~7.1%。同时对未净化的样品进行分析, 由于有干扰物质存在, B₂ 的 RSD(n=5)为 26.4%。因此, 样品测定前采用 OASIS® HLB 固相萃取小柱净化样品, 有利于样品中待测物质的痕量分析。

参考文献:

- [1] Mariam Shenasi, Alan A G Candlish, Kofi E Aidoo. J Sci Food Agric, 2002, 82: 848
- [2] Tuinstra L G M Th, Haasnoot M. J Chromatogr, 1983, 282: 457
- [3] Geng-Sun Qian, George C Yang. J Agric Food Chem, 1984, 32(5): 1071
- [4] 李佐卿, 谢东华, 孙大为, 康继韬, 俞雪钧. 光谱实验室, 2001, 18(1): 28
- [5] 刘克林, 沈伟峰, 张春水, 周淑光, 白燕平, 邹洪, 朱玉军, 李文君, 王学琳. 分析试验室, 2003, 22(2): 12