

# 使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统自动化柱前衍生功能实现伏马毒素 FB1 和 FB2 的高通量检测

## 作者

杨新磊、刘一颖  
安捷伦科技（中国）有限公司

## 摘要

本方法使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统开发出一种用于测定伏马毒素的自动化柱前衍生高通量液相色谱检测方法，并从灵敏度、重现性和线性范围三个方面对该方法的性能进行了考察。该方法利用自动进样器程序进样功能、自动吸取 OPA 衍生试剂和样品，避免了传统柱前衍生过程中人为量取、混合和等待等繁琐操作以及随之引入的误差，确保了批次间实验结果的重现性，有助于实现伏马毒素的高通量检测。通过该方法，FB1 和 FB2 的检测限可达 300 pg/mL 左右，定量限可达 1 ng/mL 左右，保留时间 RSD% 均小于 0.2%，10–2500 ng/mL 范围内有良好的线性相关性，相关系数均大于 0.9999。

## 简介

伏马毒素 (FUM) 是一种强毒性真菌毒素，普遍存在于玉米、小麦、大米等粮食作物中，对动物和人的健康有很大的潜在危害<sup>[1]</sup>。1993 年，伏马毒素被世界卫生组织的癌症研究机构划定为 2B 类致癌物（即人类可能致癌物）<sup>[2]</sup>。

目前发现的伏马毒素有 FA1、FA2、FB1、FB2、FB3、FB4、FC1、FC2、FC3、FC4 和 FP1 等 11 种，其中主要组分为 FB1，已成为继黄曲霉毒素之后的又一研究热点。目前，我国对伏马毒素尚无明确的限量规定，但许多组织、国家已对伏马毒素制订了限量标准。欧盟对伏马毒素（FB1 和 FB2）的总量规定玉米中限量为 4 mg/kg<sup>[3]</sup>；瑞士规定人类食物中伏马毒素限量为 1 mg/kg<sup>[4]</sup>；美国 FDA 规定以玉米为原料的食品中 FB 的最大限量为 2-4 mg/kg，动物食品为 5-100 mg/kg<sup>[5]</sup>。

我国颁布的食品安全国家标准中，伏马毒素的液相色谱检测方法包括柱后衍生和柱前衍生两种<sup>[6]</sup>。柱后衍生方法分析时间较长，且仪器配置除了一台液相色谱外，还需要一套柱后衍生系统。而柱前衍生方法步骤又非常繁琐，需要先用移液器分别移取 100 μL 样品和衍生试剂，再加入样品瓶涡旋约 30 秒，并在 2 分钟内进样分析，整个衍生时间需要人为控制。而且，为了保证衍生反应时间一致，必须完成一针进样后才能做下一个样品前处理，整个过程需要操作人员全程值守。

本方法在《GB5009.240-2016 食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定》<sup>[6]</sup>中规定的柱前衍生方案的基础上，运用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统的程序进样功能，开发出一种自动化柱前衍生的高通量快速分析方法。该方法无需额外配置设备，无需人员值守，具有良好的重现性，而且定量限和检测限指标完全满足各项主要法规的要求。

## 实验部分

### 仪器和设备

Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统，配备如下安捷伦组件：

- Agilent 1260 Infinity II 四元泵（部件号 G7111B）
- Agilent 1260 Infinity 标准自动进样器（部件号 G7129B）
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱（部件号 G7116A）
- Agilent 1260 Infinity 荧光检测器（部件号 G7121B），配备标准检测池（8 μL）

### 标样配制

将伏马毒素 FB1 和 FB2 标准混合储备液用乙腈/水（50%/50%）逐级稀释为 2500、500、250、125、75、25 和 10 ng/mL，分别对应于浓度级别 7、6、5、4、3、2、1。

表 1. 标样配制

级别	1	2	3	4	5	6	7
浓度 ng/mL	10	25	75	125	250	500	2500

### 自动衍生步骤

硼砂溶液和衍生试剂参照《食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定》中第三法的规定进行配制。

硼砂溶液 (0.1 mol/L)：称取硼砂 3.8 g，用水溶解并稀释至 100 mL，混合均匀。取该溶液 1 mL 置于 2 mL 样品瓶中，放在自动进样器的 P1-A1 位置。

衍生试剂：准确称取 40 mg 邻苯二甲醛，溶于 1 mL 甲醇中，用 5 mL 硼砂溶液进行稀释，并加入 50 μL 2-巯基乙醇，混合均匀。取该溶液 100 μL 置于 250 μL 内插管中，然后将内插管放入 2 mL 棕色样品瓶中，放在自动进样器的 P1-A2 位置。剩余衍生试剂放入 -20 °C 冰箱中冷藏，1 周内使用未发现异常。

表 2. 自动衍生方法设置

功能	参数
抽取	使用默认补偿值以 90 μL/min 从位置“P1-A1”上抽取 5.00 μL
抽取	使用默认补偿值以默认速度从位置“P1-A2”上抽取 3.00 μL
抽取	使用默认补偿值以 90 μL/min 从样品中抽取默认体积
清洗	在冲洗口清洗针 3 s
抽取	使用默认补偿值以 90 μL/min 从位置“P1-A2”上抽取 3.00 μL
混合	将来自空气中的 10.00 μL 以默认速度混合 20 次
等待	等待 0.5 min
清洗	在冲洗口清洗针 3 s
进样	进样

## 色谱条件

色谱柱	Zorbax RRHD Plus C18, 3.0 × 50 mm, 1.8 μm	
柱温	40 °C	
进样量	4 μL (自动进样器自动衍生)	
流动相	A 相: 10 mmol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2.3 (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 调节) B 相: MeOH/ACN (50%/50%)	
流速:	0.8 mL/min	
荧光检测器	激发波长: 335, 发射波长: 440, PMT 增益: 12, 采样频率: 9.26 Hz	
梯度时间表	时间 (min)	B%
	0	50
	3	70
	6	70
	6.1	50
	9	50

## 结果与讨论

使用上述方法对伏马毒素 FB1 和 FB2 标准样品进行分析, 第 5 级浓度的标准样品分析结果如图 1 所示。结果表明, 采用 Plus C18 超高效短色谱柱对衍生产物进行分离, 能够在 9 min 内获得良好的分离效果, 分离时间较国家标准方法所需的 16 min 缩短了近一半。

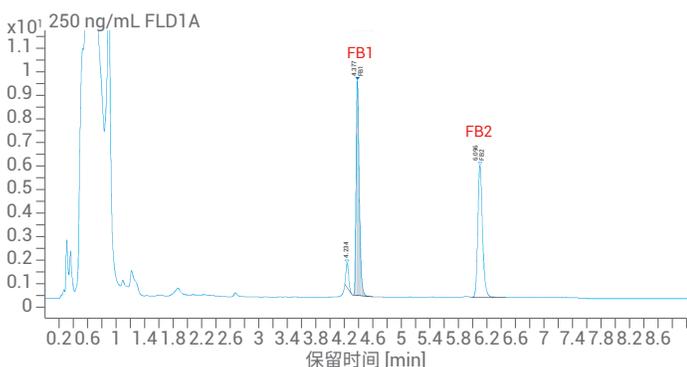


图 1. 250 ng/mL 伏马毒素标准样品中 FB1 和 FB2 的分离结果

## 峰面积和保留时间重现性考察

对第 3 级浓度 (75 ng/mL) 的伏马毒素标样进行 5 次重复分析, 以考察峰面积和保留时间的重现性。结果显示 FB1 和 FB2 的保留时间 RSD% 均小于 0.2%, 且峰面积 RSD% 均小于 1.1%, 满足国家标准中两次独立测定结果的差值不超过算数平均值 20% 的要求, 具体结果见表 3。之所以能够获得良好的峰面积重现性, 主要是由于自动化柱前衍生过程中涉及的样品和溶剂的量取均采用高精度计量泵来实施。而且, 整个衍生反应流程一致, 时间恒定, 从而使得衍生效果稳定, 定量结果可靠。

表 3. FB1 和 FB2 的保留时间和峰面积重现性 (n = 5)

化合物: FB1					信号: FLD1A			
行号	样品名称	位置	进样次数	类型	保留时间 [min]	含量	浓度 [ng/mL]	峰面积
24	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	4.315	73.6137	73.6137	8.587
25	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	4.324	74.2227	74.2227	8.662
26	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	4.332	75.1531	75.1531	8.776
27	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	4.322	73.8910	73.8910	8.621
28	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	4.332	75.1692	75.1692	8.778
				平均值	4.325	74.4099	74.4099	8.685
				标准偏差	0.007	0.7189	0.7189	0.088
				RSD	0.166	0.9661	0.9661	1.014

化合物: FB2					信号: FLD1A			
行号	样品名称	位置	进样次数	类型	保留时间 [min]	含量	浓度 [ng/mL]	峰面积
24	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	5.943	75.1060	75.1060	7.951
25	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	5.941	75.5827	75.5827	8.004
26	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	5.935	75.4930	75.4930	7.994
27	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	5.939	75.2154	75.2154	7.963
28	75 ng/mL	PI-C-04	1	BB	5.965	75.4065	75.4065	7.985
				平均值	5.945	75.3607	75.3607	7.980
				标准偏差	0.012	0.1968	0.1968	0.022
				RSD	0.199	0.2611	0.2611	0.274

## 线性范围考察

依次将不同浓度的标准样品按浓度从低到高进样, 每个浓度点进样三次, 以浓度为横坐标、每个浓度下 FB1 和 FB2 峰面积的平均值为纵坐标绘制标准曲线, 结果如图 2 所示。无论是在低浓度范围 (10–500 ng/mL) 还是在高浓度范围 (10–2500 ng/mL), FB1 和 FB2 均获得了良好的线性相关性, 相关系数均大于 0.9999。

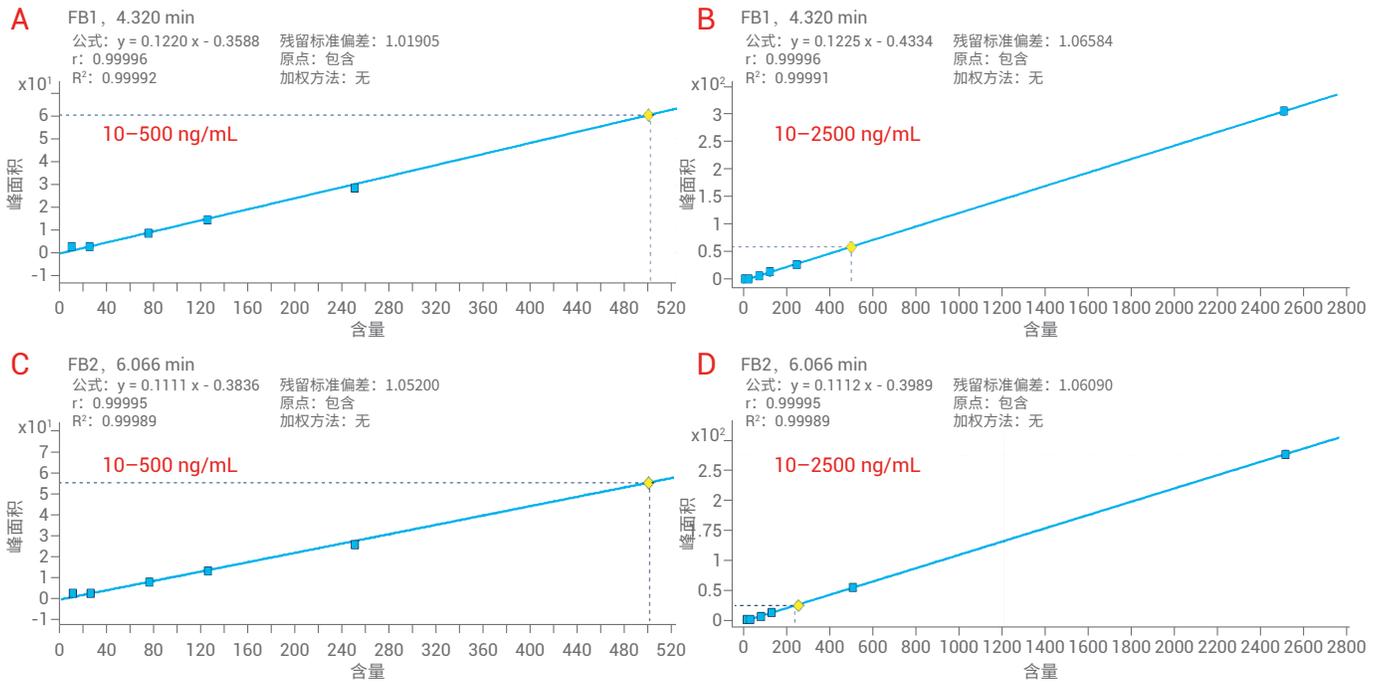


图 2. FB1 和 FB2 的低浓度范围 (10–500 ng/mL, A 和 C) 和高浓度范围 (10–2500 ng/mL, B 和 D) 标准曲线

### 灵敏度考察

对第 1 级浓度 (10 ng/mL) 的标样进样分析以考察方法的灵敏度。结果如图 3 所示。在该浓度下, FB1 的信噪比为 94, FB2 的信噪比为 143。由此推断, FB1 和 FB2 的检测限可达 300 pg/mL 左右, 定量限可达 1 ng/mL 左右; 而国家标准中指出, 当称样量为 5 g 时, FB1、FB2 的检测限分别为 17 μg/kg、8 μg/kg, 定量限分别为 50 μg/kg、25 μg/kg。因此, 本方法完全满足国家标准方法要求。

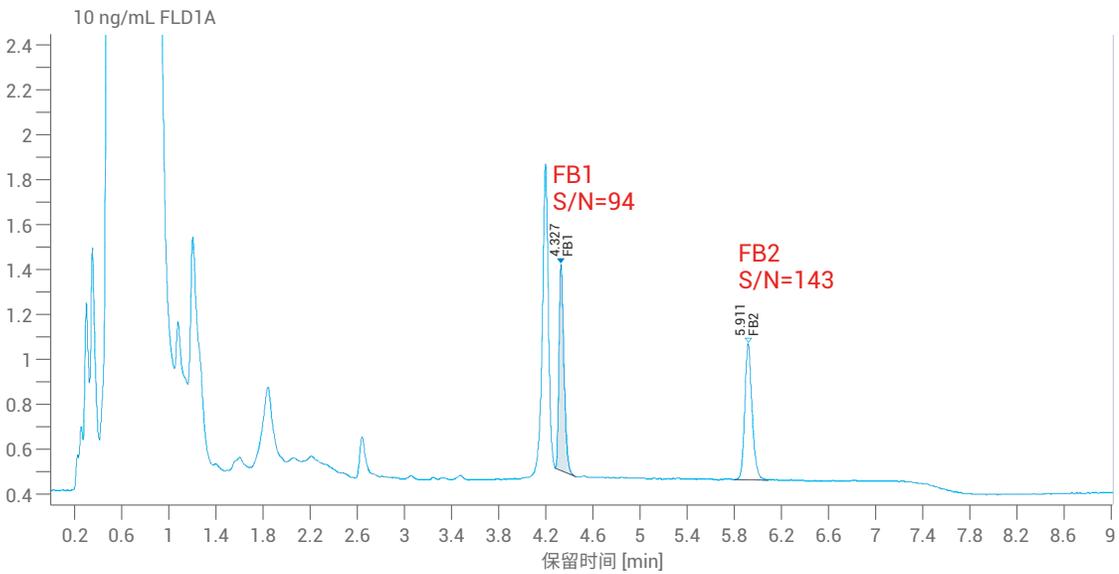


图 3. 10 ng/mL 伏马毒素标样中 FB1 和 FB2 的分离结果

## 结论

本研究使用 Agilent 1260 Infinity II 液相色谱系统的程序进样功能，对伏马毒素 FB1 和 FB2 进行自动衍生，可有效防止 FB1 和 FB2 衍生产物的降解。与国家标准方法相比，该方法可大幅提高检测效率，降低实验室人工成本。并且该方法具有非常良好的灵敏度、线性和重现性，检测结果可靠，是一种非常适合于大批量样品高通量分析的方法。

## 参考文献

1. W.J. Kong, et al. Analysis of fumonisins B1 and B2 in spices and aromatic and medicinal herbs by HPLC-FLD with on-line post-column derivatization and positive confirmation by LC-MS/MS. *Analyst*, 2012, 137: 3166-3174
2. K. C. Piancentini, et al. Mycotoxin analysis of industrial beers from Brazil: The influence of fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer quality. *Food Chem.* 2017, 218: 64-69
3. SENYUVA Hamide, et al. Determination of Fumonisins B1 and B2 in Corn by LC/MS with Immunoaffinity Column Cleanup: Interlaboratory Study. *JOURNAL OF AOAC INTERNATIONAL* 2010, 93, 611-621
4. Ildiko'Barna-Vetro', et al. Development of a sensitive ELISA for the determination of fumonisin B1 in cereals. *J Agric Food Chem.* 2000, 48, 2821- 2825
5. USFDA. Draft guidance for industry: fumonisin levels in human foods and animal feeds. 2006
6. GB5009. 240-2016 食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2018  
2018年12月25日，中国出版  
5994-0544ZHCN

