

高效液相色谱-柱后衍生法测定植物油脂中 4种黄曲霉毒素

付骋宇*, 李莹, 孔祥虹, 李建华, 何强, 邹阳, 张璐

(陕西出入境检验检疫局, 西安 710068)

摘要: **目的** 建立一种可同时测定植物油脂中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 残留量的分析方法。**方法** 将待测样品经前期溶剂提取、免疫亲和柱净化处理后, 通过高效液相色谱-柱后衍生-荧光检测器进行测定。**结果** 黄曲霉毒素 G₂、B₂ 在 0.1~2 ng/mL 范围内表现出良好的线性关系, 而黄曲霉毒素 G₁、B₁ 在 1~20 ng/mL 范围内 $r > 0.9995$, 其线性关系良好。在添加浓度为 0.1~20 μg/kg 的范围内, 平均回收率在 75.0%~125.7% 之间。**结论** 该方法快速简便准确, 可作为植物油脂中黄曲霉毒素的残留量测定方法。

关键词: 高效液相色谱; 黄曲霉毒素; 免疫亲和柱; 植物油脂

Determination of four kinds of aflatoxins in vegetable oil by high performance liquid chromatography with post column derivation

FU Cheng-Yu*, LI Ying, KONG Xiang-Hong, LI Jiang-Hua, HE Qiang, ZOU Yang, ZHANG Lu

(Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xi'an 710068, China)

ABSTRACT: Objective To establish a simultaneous detection method for the determination of aflatoxin G₂, G₁, B₂ and B₁ residue in vegetable oil. **Methods** After solvent extraction and purification with immunoaffinity column, the oil samples were analyzed by high performance liquid chromatography-post column derivation-fluorescence detector (HPLC-PCD-FLD). **Results** The linear relationship of aflatoxin G₂ and B₂ ranged from 0.1~2 ng/mL, and of aflatoxin G₁ and B₁ ranged from 1~20 ng/mL was excellent, and r was larger than 0.9995. The average recovery rate was from 75.0% to 125.7% when the addition concentration ranging from 0.1 μg/kg to 20 μg/kg. **Conclusion** This method is simple and quick, and can be used for the determination of aflatoxins residue in vegetable oil.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography, aflatoxins, immunoaffinity column, vegetable oil

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是一组主要由黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪溜曲霉等4种真菌产生的次级代谢产物,属于二呋喃香豆素的衍生化合物,彼此结构类似,目前已证实其衍生物已达17种^[1-4]。黄曲

霉毒素具有强毒性和致癌性,其中黄曲霉毒素 B₁ 急性毒性是氰化钾的10倍,慢性中毒可诱发肝癌^[5-7],是黄曲霉毒素中毒性最强的一种。而黄曲霉毒素对食品和饲料的污染途径多样难以监控,一旦其直接或间接进入人类食物链,将严重威胁人类健康和生命安全^[8-10],黄曲霉毒素污染问题已经成为世界各国密

*通讯作者: 付骋宇, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: fucy@snciq.gov.cn

*Corresponding author: FU Cheng-Yu, Ph.D, Senior Engineer, Shaanxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, 10 Hanguang North Road, Xi'an 710068 China. E-mail: fucy@snciq.gov.cn

切关注的问题之一^[11-13]。鉴于黄曲霉毒素对人类的健康造成的危害, 世界上许多国家已建立了黄曲霉毒素限量标准。依据国际食品法典委员会(CAC)规定, 在食品中黄曲霉毒素总量($B_1+B_2+G_1+G_2$)的最大残留限量标准为 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。日本检验检疫措施规定, 黄曲霉毒素 B_1 在进口食品中的残留限量为“不得检出”。美国食品与药物监督管理局(FDA)规定, 食品中黄曲霉毒素的最大残留限量为 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。欧盟分别就 17 类食品中黄曲霉毒素 B_1 的限量值进行了规定, 范围为 $0\sim 12.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, 其中直接食用花生中的限量值为 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$; 而黄曲霉毒素总量限量值范围为 $0\sim 15.0 \mu\text{g}/\text{kg}$, 其中直接食用花生中的限量值为 $4.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国规定油脂及其制品中花生油、玉米油黄曲霉毒素 B_1 含量小于 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$, 除花生油玉米油外的油脂中黄曲霉毒素 B_1 含量小于 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[14,15]。因此, 对各类油脂中黄曲霉毒素含量的检测不可缺少, 而目前油脂中黄曲霉毒素常用检测方法包括薄层色谱法、酶联免疫化学分析法、液质联用法、微柱筛选法和高效液相色谱法。在本研究中, 将尝试采用免疫亲和柱净化-高效液相色谱-柱后衍生法对植物油脂中的黄曲霉毒素进行检测, 以探索对黄曲霉毒素检测更为有效的分析方法。

2 材料与方法

2.1 仪器、试剂与样品

高效液相色谱仪型号为 Waters 2695, 配 Waters

2475 荧光检测器, Waters 柱后衍生装置(美国 Waters 公司); AE-240 电子天平(瑞士 Mettler); 黄曲霉毒素标准品溶液购于美国 Supelco 公司。AflaTest-p 免疫亲和层析柱购于美国 Vicam 公司; 玻璃纤维滤纸购于北京中检维康科技有限公司。甲醇、乙腈均采用色谱纯(德国默克), 水为超纯水。试验所用油脂为市售鲁花花生油、八鱼菜籽油和多力玉米油。

2.2 样品前处理

准确称取供试油脂 25 g, 加入氯化钠 5 g, 置具塞锥形瓶中, 加入提取溶液至 125 mL, 均质器高速搅拌提取 2 min, 定量滤纸过滤, 取 10 mL 滤液, 加入 20 mL 超纯水稀释后经玻璃纤维滤纸进行过滤; 准确吸取滤液 10 mL 加入免疫亲和柱中, 流速控制为 $3 \text{ mL}/\text{min}$, 用 20 mL 水淋洗, 抽干, 准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱, 流速为 $1\sim 2 \text{ mL}/\text{min}$, 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 洗脱液经 $0.2 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤后供检测用。

2.3 色谱条件

色谱柱 Inertsil ODS-3V 柱($250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$), 甲醇-乙腈-水($30:15:55$, $V:V:V$)为流动相, 流速 $1.0 \text{ mL}/\text{min}$; 检测方法为柱后衍生法, 衍生溶液采用 0.05% 碘溶液。衍生泵流速控制为 $0.50 \text{ mL}/\text{min}$, 衍生温度为 $80 \text{ }^\circ\text{C}$; 采用荧光检测器进行检测, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 为 $360 \text{ nm}/450 \text{ nm}$; 进样量 $20 \mu\text{L}$ 。标准样品色谱图见图 1。

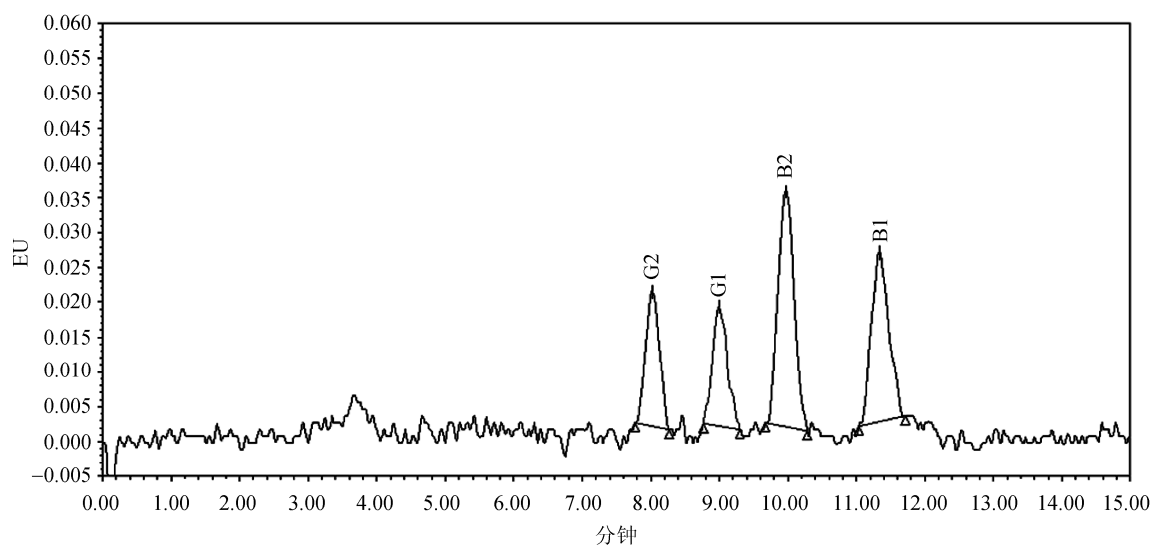


图 1 4 种黄曲霉毒素标准品的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of four aflatoxin standard samples

3 结果与讨论

3.1 样品处理条件

本方法的样品处理是用不同浓度的甲醇和乙腈的水溶液提取,经免疫亲和柱净化,HPLC 确认,甲醇水溶液的提取效率显著高于乙腈水溶液的提取效率,最终确定为 70% 甲醇水溶液提取。在本方法中对采用甲醇和乙腈进行提取的洗脱效果进行了对比。因黄曲霉毒素易溶于如甲醇等中等极性的溶剂,可观测到甲醇洗脱回收率明显大于乙腈洗脱。因此样品处理确定采用甲醇进行洗脱。

同时对甲醇提取液的用量进行了考察,分别采用甲醇 1.0、1.5、2 mL 对免疫亲和柱进行洗脱并收集各洗脱液进样分析。回收率计算结果显示,1.0 mL 甲醇即可实现从免疫亲和柱上将黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 完全洗脱的目的。因此,最终甲醇洗脱体积确定为 1.0 mL。

3.2 检测条件的选择

由文献可知,360 nm/440 nm、365 nm/450 nm、355 nm/430 nm 可作为黄曲霉毒素的主要检测波长 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 。以流动相作为背景溶液,采用荧光检测器,分别对黄曲霉毒素标准液在 250 ~ 380 nm 和 400 ~ 500 nm 处的 λ_{ex} 和 λ_{em} 进行波长扫描,实验结果表

明,黄曲霉毒素 B₁ 在 $\lambda_{ex}=360$ nm, $\lambda_{em}=450$ nm 处的相对吸收最大,且基本无杂峰和基线噪音干扰,因此确定选择 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ 为 360 nm/450 nm。在流动相的选择上,分别比较了水-甲醇-乙腈三元混合体系与水-甲醇体系,前者能实现所测目标物的较好分离,所得结果峰形较好;其中当三元体系水、甲醇和乙腈比例为 55:30:15(V:V:V)时,四种目标物分离时间和分离度结果均达到预期。实际油样品添加 4 种黄曲霉毒素测试结果如图 2。

3.3 线性关系

精密量取黄曲霉毒素标准品溶液,用甲醇配制成 G₂、B₂: 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 ng/mL, G₁、B₁: 1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 ng/mL 各 5 个浓度的混合标准溶液。采用标准品浓度(ng/mL)为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),将实验结果绘制标准曲线并回归,回归方程和相关系数见表 1。

3.4 回收率试验

对本文方法进行添加回收试验,添加浓度为 3 个浓度,其中黄曲霉毒素 G₁、B₁ 分别为 20、10、1 μ g/kg,黄曲霉毒素 G₂、B₂ 分别为 2.0、1.0、0.1 μ g/kg,做 3 个水平加标回收率试验。按前述方法进行样品的处理净化,HPLC 检测,测定添加回收率,结果见表 2。

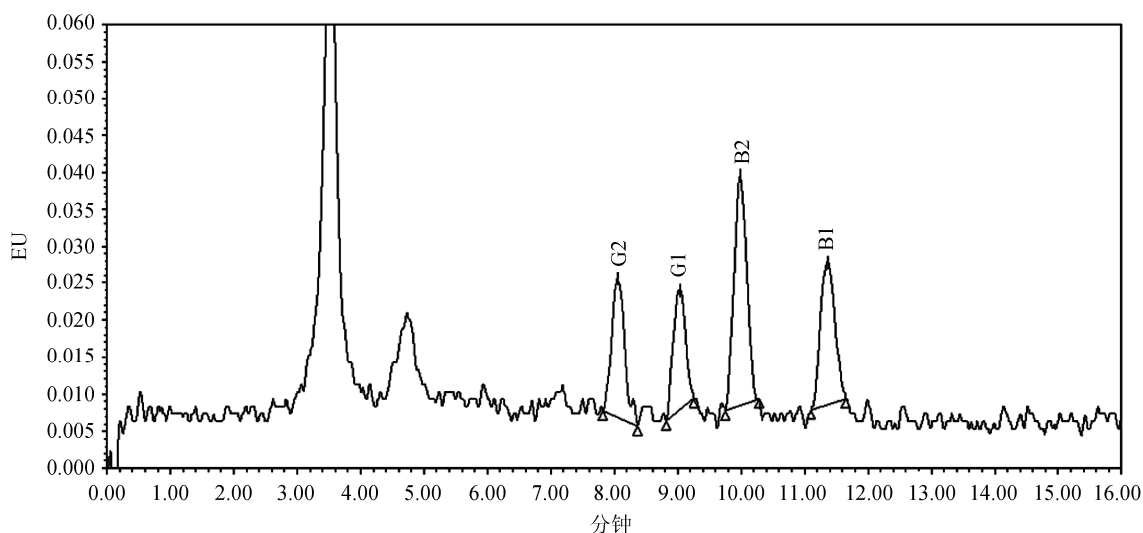


图2 实际菜籽油样品添加4种黄曲霉毒素的HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of raw rapeseed oil samples after adding four aflatoxin standards

表 1 回归方程和相关系数
Table 1 Regression equation and correlation coefficient

名称	线性范围(ng/mL)	回归方程	<i>r</i>
AFG ₂	0.1 ~ 2	$Y=167555X+1343$	0.9996
AFG ₁	1 ~ 20	$Y=26625X+4526$	0.9995
AFB ₂	0.1 ~ 2	$Y=269995X+2602$	1.0000
AFB ₁	1 ~ 20	$Y=46886X+1573$	0.9998

表 2 花生油、玉米油和菜籽油中黄曲霉毒素的加标回收率结果(*n*=6)
Table 2 Recovery rate results of aflatoxins in peanut oil, corn oil and rapeseed oil (*n*=6)

名称	添加量(μg/kg)	平均回收率(%)		
		花生油	玉米油	菜籽油
AFG ₂	2.0	77.1	85.7	86.7
	1.0	111.7	80.5	78.3
	0.1	76.2	79.6	75.2
AFG ₁	20	100.2	95.5	93.7
	10	95.3	94.2	97.8
	1	88.1	90.3	73.5
AFB ₂	2.0	95.8	95.2	97.4
	1.0	85.3	88.4	89.6
	0.1	91.7	94.1	75.0
AFB ₁	20	113.5	99.7	105.6
	10	125.7	117.1	112.8
	1	89.4	95.0	82.3

4 结 论

研究结果证实, 甲醇-水体系能对植物油脂样品中的黄曲霉毒素进行有效提取, 经免疫亲和萃取净化和 HPLC-柱后衍生-荧光检测器检测, 可有效分析植物油脂样品中 4 种黄曲霉毒素含量。采用该方法处理油脂样品, 不受样品中其他组分干扰, 检测方法简便快速、灵敏度高、选择性和稳定性好、回收率较高、重现性好, 适合植物油脂中黄曲霉毒素的定量分析。

参考文献

- [1] Barros G, Magnoli C, Reynoso MM, *et al.* Fungal and mycotoxin contamination in Bt maize and non-Bt maize grown in Argentina [J]. *World Mycotoxin J*, 2009, 2(1): 53-60
- [2] 刘作新, 高军侠. 黄曲霉毒素的检测方法研究进展(综述)[J]. *安徽农业大学学报*, 2004, 31(2): 223-226.
- [3] 李书国, 陈辉, 李雪梅, 等. 粮油食品中黄曲霉毒素检测方法综述[J]. *粮油食品科技*, 2009, 17(2): 62-65.
Li SG, Chen H, Li XM, *et al.* Summary of the methods detecting aflatoxin in cereal and oil food [J]. *Sci Technol Cereals Oils Foods*, 2009, 17(2): 62-65.
- [4] 熊江林, 周华林, 丁斌鹰, 等. 黄曲霉毒素生物合成及代谢转换的研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2015, 36(4): 85-89.
Xiong JL, Zhou HL, Ding BY, *et al.* Review of biosynthesis and metabolic turnover of aflatoxins [J]. *Acta Ecologiae Anim Domast*, 2015, 36(4): 85-89.
- [5] 方宁焯, 刘丹丹, 肖德强, 等. 黄曲霉毒素 B₁-1 致体外人胚肝细胞损伤的研究[J]. *广西医学*, 2015, 37(3): 300-301,316.
Fang NY, Liu DD, Xiao DQ, *et al.* Study of aflatoxin B₁-induced damages to human embryo hepatocytes *in vitro* [J]. *Guangxi Med J*, 2015, 37(3): 300-301,316.
- Liu ZX, Gao JX. Recent progress in aflatoxin determining approach research [J]. *J Anhui Agric Univ*, 2004, 31(2): 223-226.

- [6] 刘洋, 杜明, 张根义. 黄曲霉毒素 B₁ 与杂色曲霉毒素对 HepG2 细胞的联合毒性[J]. 食品与生物技术学报, 2014, 33(12): 1300-1306.
Liu Y, Du M, Zhang GY. Multi-index detection of toxicological interaction between the aflatoxin B₁ and sterigmatocystin in HepG2 cells [J]. J Food Sci Biotechnol, 2014, 33(12): 1300-1306.
- [7] 王雯, 李岗, 魏云潇. 我国食品中黄曲霉毒素污染现状的研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(18): 308-309.
Wang W, Li G, Wei YX. Research status of aflatoxin contamination in china [J]. J Anhui Agric Sci, 2015, 43(18): 308-309.
- [8] 余丹, 邹成义. 黄曲霉毒素对蛋品质影响及机理研究[J]. 饲料工业, 2009, 30(4): 59-60.
Yu D, Zhou CY. Study on effects and mechanism of aflatoxin on egg quality [J]. Feed Ind, 2009, 30(4): 59-60.
- [9] 吕飞, 朱事康, 余优军, 等. LC-MS/MS 测定植物油中黄曲霉毒素 B₁[J]. 惠州学院学报, 2012, 32(6): 14-16.
Lv F, Zhu SK, Yu YJ, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in oil plants by LC-MS/MS [J]. J Huizhou Univ, 2012, 32(6): 14-16.
- [10] 蔡梅, 吉文亮, 刘华良, 等. 免疫亲和柱-高效液相荧光检测牛奶和奶粉中的黄曲霉毒素 M₁[J]. 江苏预防医学, 2013, 24(5): 61-62.
Cai M, Ji WL, Lliu HL, *et al.* Detection of aflatoxin M₁ in milk and milk powder by immune affinity column and high performance liquid chromatography [J]. Jiangsu J Pre Med, 2013, 24(5): 61-62.
- [11] 薛健, 刘东静, 陈士林, 等. 中药外源污染物研究现状与分析[J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2008, 10(1): 91-96.
Xue J, Liu DJ, Chen SL, *et al.* A study of external contamination sources of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol-Mod Tradit Chin Med, 2008, 10(1): 91-96.
- [12] 王君, 刘秀梅. 食品中黄曲霉毒素限量标准中的成本-效益分析[J]. 卫生研究, 2011, 40(2): 150-153, 157.
Wang J, Liu XM. Cost-benefit analysis in setting up limitation standards of aflatoxins in foods [J]. J Hyg Res, 2011, 40(2): 150-153, 157.
- [13] 王秀斌, 李培武, 杨扬, 等. 液相色谱-三重串联四极杆质谱测定粮油中的黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2011, 29(6): 517-522.
Wang XP, Li PW, Yang Y, *et al.* Determination of aflatoxins in cereals and oils by liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(6): 517-522.
- [14] 丁小霞, 李培武, 用海燕, 等. 黄曲霉毒素限量标准对我国居民消费安全和花生产业的影响[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(2): 180-184.
Ding XX, Li PW, Zhou HY, *et al.* Effect of aflatoxin maximum limit standards on consumer dietary risk and peanut industry in China [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2011, 33(2): 180-184.
- [15] GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
GB 2761-2011 Food safety national standards Mycotoxins in food Limited [S].

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



付骋宇, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测。

E-mail: fucy@snciq.gov.cn