

高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定油茶中黄曲霉毒素 B₁ 的方法研究

侯磊磊*, 柴梅梅, 米林锋, 加力, 安全, 张东东

(榆林市食品检验检测中心, 榆林 719000)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定油茶中黄曲霉毒素 B₁ 含量的方法。**方法** 市售油茶样品粉碎, 经 80% 甲醇-水溶液涡旋提取、离心, 吸取上清液稀释, 专用免疫亲和柱净化后, 采用高效液相色谱荧光检测器串联光化学衍生器测定黄曲霉毒素 B₁。同时, 对样品提取条件的选择、样品净化过程、流动性比例选择等进行优化实验研究。**结果** 黄曲霉毒素 B₁ 在 0.5~20 ng/mL 范围内线性关系良好, 相关系数 $r=0.9996$, 在 5、10、20 μg/kg 添加水平下的回收率为 84.0%~91.6%, 相对标准偏差 0.1%~1.7%。**结论** 该方法简单、快速、准确、重现性好, 适用于油茶中黄曲霉毒素 B₁ 的定量分析。

关键词: 高效液相色谱; 柱后光化学衍生; 黄曲霉毒素 B₁; 油茶

Determination of aflatoxin B₁ in youcha by post-column photochemical derivatization-high performance liquid chromatography

HOU Lei-Lei*, CHAI Mei-Mei, MI Lin-Feng, JIA Li, AN Quan, ZHANG Dong-Dong

(Yulin Food Inspection and Testing Center, Yulin 719000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of aflatoxin B₁ in youcha by post-column photochemical derivatization-high performance liquid chromatography. **Methods** Commercially available samples of youcha were crushed, extracted and centrifuged by vortex extraction with 80% methanol-water. The supernatant was diluted, dedicated by immunoaffinity column, and aflatoxin B₁ in youcha was determined by post-column photochemical derivatization-high performance liquid chromatography. At the same time, the optimization of the extraction conditions of the sample selection, sample purification process, and the choice of liquidity ratio were optimized. **Results** Aflatoxin B₁ had a good linear relationship in the range of 0.5-20 ng/mL ($r=0.9996$), the recoveries at the levels of 5, 10, and 20 were between 84.0% and 91.6% with the relative standard deviations of 0.1%-1.7%. **Conclusion** This method is simple, rapid, accurate and reproducible, which is suitable for the quantitative analysis of aflatoxin B₁ in youcha.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; post-column photomchemical derivatization; aflatoxin B₁; youcha

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程项目(2014FWPT-01)

Fund: Supported by the Shaanxi Science and Technology Co-ordination Innovation Project(2014FWPT-01)

*通讯作者: 侯磊磊, 硕士, 主要研究方向为食品检验检测技术。E-mail: hl8622268@126.com

*Corresponding author: HOU Lei-Lei, Master, Yulin Food Inspection and Testing Center, Yulin 719000, China. E-mail: hl8622268@126.com

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)是一类主要由寄生曲霉菌和黄曲霉菌产生的具有致癌、致畸和致突变的次级代谢产物,在黄曲霉毒素所有类型中,以黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)毒性最强,已经被世界卫生组织划定为 I 类致癌物^[1-3]。受黄曲霉毒素污染的农产品严重威胁消费者身体健康与生命安全。为了保障我国食品安全,国家标准 GB2761-2017《食品国家安全标准食品中真菌毒素限量》^[4]中规定黄曲霉毒素 B₁ 最高限量为 20 μg/kg。

目前所研究的黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法主要有酶联免疫法、高效液相色谱法和高效液相色谱-质谱联用法,其多数涉及到的的是对酱油^[5]、植物油^[6]、玉米^[7]、大米^[8]、小麦粉^[9]、花生^[10]等粮食及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定,而对油茶中黄曲霉毒素 B₁ 测定,目前文献有王建树等^[11]采用碘溶液衍生化-高效液相色谱法进行测定的报道。

黄曲霉毒素 B₁ 污染谷物及其加工产品非常多见,所以涉及到的谷物及其加工产品标准中黄曲霉毒素 B₁ 几乎是必检项目。本实验室 2017 年抽检了市场上 5 批次 15 个在售样品进行了黄曲霉毒素 B₁ 的测定,主要包括大豆油、大米、小米、小麦粉、酱油、面条、南瓜子、辣椒酱、食醋、油茶等,其中除油茶外均未检出黄曲霉毒素 B₁,油茶中检出但未超标。说明涉及到检验黄曲霉毒素 B₁ 指标的产品中,油茶中出现黄曲霉毒素 B₁ 污染的风险较大,是日后风险监测的重点。陕西省食品安全地方标准 DBS61/0013-2016《食品安全地方标准油茶》^[12]中对油茶的各项理化指标做了明确要求,按照国标要求测定黄曲霉毒素 B₁ 时,如果采用国家标准 GB 5009.22-2016《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》^[13]第三法(高效液相色谱-柱后衍生法),样品前处理相对较复杂,回收率较低,不能较好满足实验室检测要求。

本研究建立了一种前处理简单、回收率高、灵敏度好的油茶中黄曲霉毒素 B₁ 测定方法,以期对相关检测提供参考借鉴。

2 材料与方法

2.1 样品与试剂

油茶样品 10 份(购于市场某些厂家,主要成分小麦粉、黑芝麻、大豆油、花生仁、葵花仁、核桃仁、杏仁等,营养组成有能量、蛋白质、脂肪、碳水化合物、钠等);黄曲霉毒素 B₁ 标准品(3 mg/L, 美国 O2Si 公司); 甲醇(色谱纯, DiKMA 公司); 超纯水。

2.2 仪器与设备

LC-20AT 高效液相色谱仪(配荧光检测器, 日本岛津

公司); PR86000168 光化学衍生器(普瑞邦公司); FW200 高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司); MS 3 basic 涡旋仪(德国 IKA 公司); Avanti JXN-26 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); Milli-Q 超纯水仪(法国 Millipore 公司); AflastarTMR 免疫亲和柱(美国 Romer 公司); Diamonsil Plus C₁₈ 色谱柱(DiKMA 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 试剂配制

甲醇-水溶液(80:20, V:V): 取 800 mL 色谱纯甲醇加入 200 mL 超纯水, 混匀。

2.3.2 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液的配制

移取一定体积的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液, 用乙腈稀释成 100 ng/mL, 作为黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液, 临用前用流动相稀释成合适浓度的标准工作溶液。

2.3.3 色谱条件色谱柱

Diamonsil Plus C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 柱温: 40 °C; 流速: 1.0 mL/min; 流动相: 甲醇:水=45:55(V:V); 检测器: 荧光检测器串联光化学衍生器; A 通道: λ_{ex}=360 nm、λ_{em}=430 nm; 进样量: 20 μL。

2.3.4 样品前处理样品制备

市场购买袋装样品, 拆封后混匀, 用高速粉碎机将其粉碎, 过筛, 使其粒径小于 2 mm 孔径实验筛, 混合均匀后储存于样品瓶中, 密封保持, 待测。

样品提取: 准确称取上述样品 5.00 g 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇-水溶液(80:20, V:V), 涡旋 4 min 混合均匀, 在 10000 r/min 下离心 5 min。准确吸取 2 mL 上清液, 加入 12 mL 超纯水, 混合均匀, 备用。

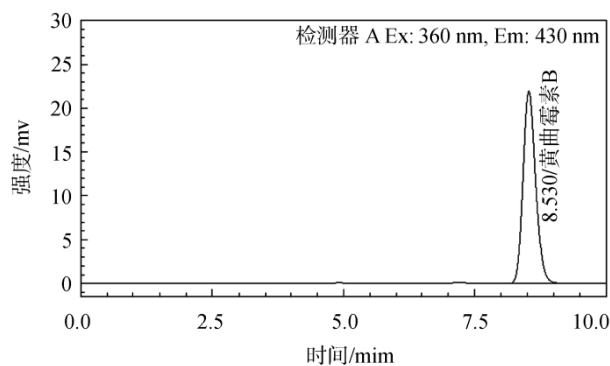
样品净化: 将免疫亲和柱连接于上样器下, 将上述液体全部转移至上样器中, 控制流速, 使液滴以 1 滴/2 s 的速度往下滴, 滴完后用 10 mL 超纯水淋洗免疫亲和柱, 弃去全部流出液, 抽干免疫亲和柱, 依次用 2×0.5 mL 甲醇、2×0.5 mL 超纯水洗脱, 收集全部洗脱液, 过 0.22 μm 滤膜, 待测。

2.3.5 方法的线性范围和检出限

分别吸取适量的黄曲霉毒素 B₁ 标准储备液, 用流动相配制成系列浓度的标准工作溶液, 分别为 0.5、1.0、2.0、5.0、10、20 ng/mL, 用 2.3.3 色谱条件进行测定, 以黄曲霉毒素 B₁ 的浓度为横坐标(X)和对应峰面积为纵坐标(Y)作标准曲线。线性关系与检出限见表 1, 标准溶液色谱图见图 1。

表 1 黄曲霉毒素 B₁ 标准曲线和检出限

Table 1 Standard curve and limit of detection of aflatoxin B ₁			
标准曲线	相关系数 <i>r</i>	线性范围 (ng/mL)	检出限 (μg/kg)
$Y=71483.9X+3051.21$	0.9996	0.5~20	0.04

图 1 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液(5 ng/mL)色谱图Fig. 1 Chromatogram of aflatoxin B₁ standard solution (5 ng/mL)

3 结果与分析

3.1 流动相的优化选择

本实验通过荧光检测器串联柱后光化学衍生器测定黄曲霉毒素 B₁, 采用水和甲醇作为流动相, 在黄曲霉毒素 B₁ 标准浓度为 1 ng/mL 时, 比较水与甲醇在不同比例(55:45、60:40、70:30, V:V)条件下的分离效果, 结果表明水与甲醇为 70:30(V:V)时黄曲霉毒素 B₁ 出峰较晚, 保留时间接近 16 min, 见图 2; 水与甲醇为 60:40(V:V)时黄曲霉毒素 B₁ 低浓度时不分离, 且响应较低, 见图 3; 所以, 本实验最终选择最佳流动相为水:甲醇=55:45(V:V), 分离效果好, 响应也较好, 且保留时间适中, 见图 4。

3.2 样品提取条件的优化选择

黄曲霉毒素 B₁ 具有较大的极性, 本实验采用甲醇:水=80:20(V:V)的提取体系。为了节约时间、简便操作、减少损失, 提取设备未采用摇床震荡或均质器均质, 而是采用涡旋器涡旋提取, 研究在 3000 r/min 涡旋条件下不同的涡旋时间(3、4、5、6 min)的提取效果, 结果表明采用 3000 r/min 涡旋提取 4 min 的提取率最高, 可将测定的黄曲霉毒素 B₁ 提取完全, 见图 5。

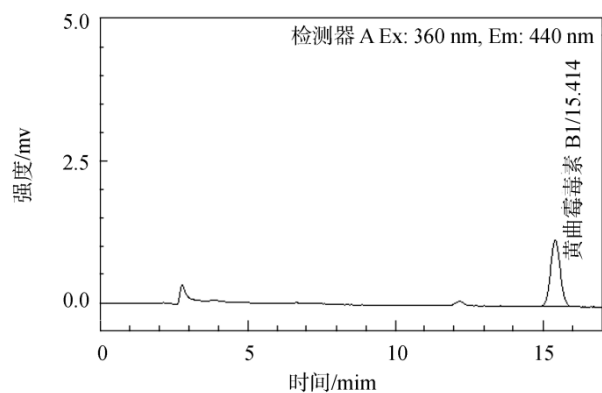


图 2 水与甲醇比例为 70:30(V:V)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of water and methanol with ratio of 70:30 (V:V)

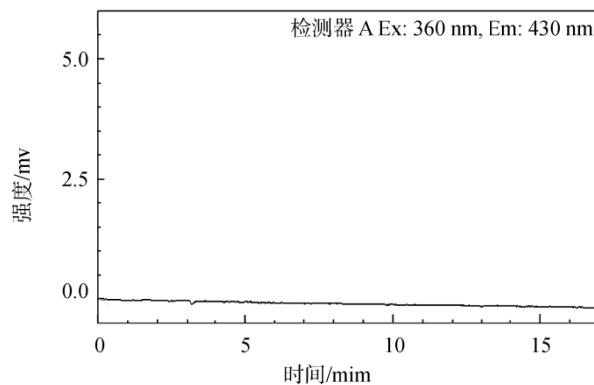


图 3 水与甲醇比例为 60:40(V:V)色谱图

Fig. 3 Chromatogram of water and methanol with ratio of 60:40 (V:V)

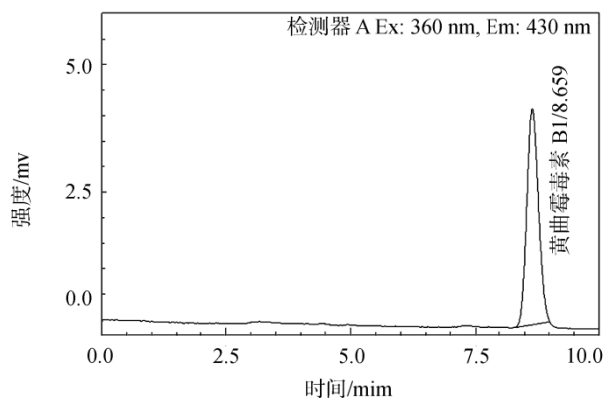


图 4 水与甲醇为 55:45(V:V)色谱图

Fig. 4 Chromatogram of water and methanol with ratio of 55:45(V:V)

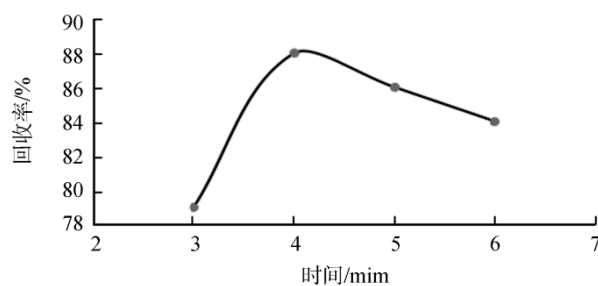


图 5 涡旋时间对回收率的影响

Fig. 5 Effect of vortex time on recovery rate

3.3 光化学衍生反应

反相液相色谱方法测定黄曲霉毒素 B₁ 时, 反相洗脱中存在荧光猝灭效应, 使黄曲霉毒素 B₁ 的检测灵敏度低, 目前, 采用光化学衍生器提高黄曲霉毒素 B₁ 的检测灵敏度较多^[14-16], 本实验采用柱后光化学衍生器提高黄曲霉毒素 B₁ 的检测灵敏度, 解决了黄曲霉毒素 B₁ 荧光猝灭的现象。

光化学衍生技术是利用紫外光的照射, 使流动相光

解出具有荧光特性的基团与黄曲霉毒素 B₁ 反应, 可生成荧光特性更强更稳定的物质。光化学衍生器的衍生效果在检测灵敏度、操作过程、检测时间及耗材等方面都有着较大的优势。

3.4 方法回收率和精密度

在空白油茶样品中添加黄曲霉毒素 B₁ 的 3 个浓度水平的标准溶液进行加标回收实验, 每个添加浓度 6 次操作实验, 结果见表 2。其中, 试剂空白、空白油茶样品、空白油茶样品加标色谱图见图 6~8。由表 2 可见黄曲霉毒素 B₁ 的回收率为 84.0%~91.6%, 相对标准偏差为 0.1%~1.7% 之间。

3.5 油茶样品的检测

通过市场购买不同产地油茶样品 10 份进行检验, 10 份样品中有 3 份检出黄曲霉毒素 B₁, 但均未超标, 分别是 2.02、2.33、4.69 $\mu\text{g}/\text{kg}$, DBS61/0013-2016《食品安全地方

表 2 空白样品加标回收率结果($n=6$)

Table 2 Spiked recovery results of blank samples ($n=6$)

真菌毒素	添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	相对标准偏差/%
	5	91.6	1.7
黄曲霉毒素 B ₁	10	88.7	0.3
	20	84.0	0.1

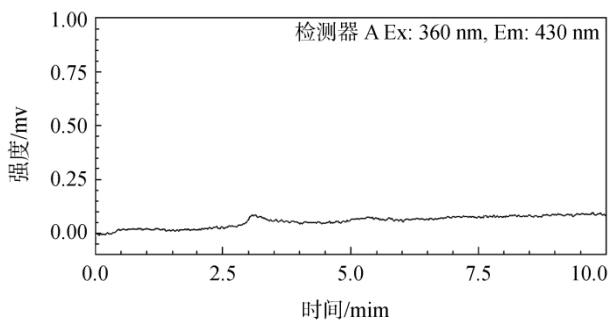


图 6 试剂空白色谱图

Fig. 6 Chromatogram of blank reagent

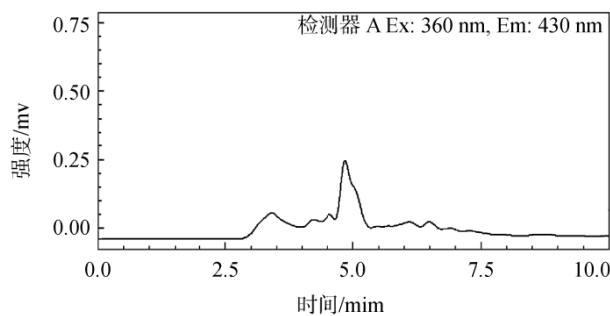


图 7 空白油茶样品色谱图

Fig. 7 Chromatogram of blank youcha samples

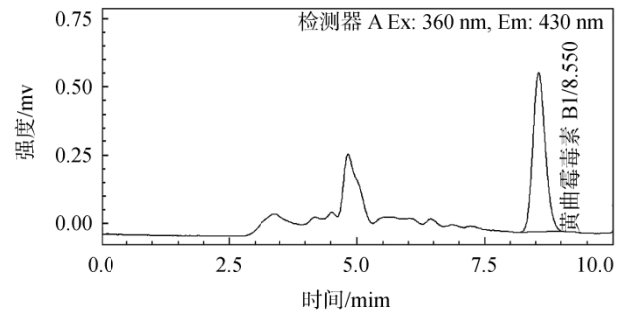


图 8 空白油茶样品加标($5 \mu\text{g}/\text{kg}$)色谱图

Fig. 8 Spiked ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) chromatogram of blank youcha samples

标准油茶》中规定黄曲霉毒素 B₁ 含量应小于等于 $5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。可见, 油茶中检出黄曲霉毒素 B₁ 是较易见到的, 超标的风险也较大, 其主要原因同它的原材料及储存、加工过程控制得当与否有关。DBS61/0013-2016《食品安全地方标准油茶》中规定, 黄曲霉毒素 B₁ 按照 GB/T 18979 规定的方法检验, 已被现行 GB 5009.22-2016《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》代替。本实验方法的检出限、线性范围和加标回收率均满足最新国家标准的要求。

4 结论

采用高效液相色谱荧光检测器串联光化学衍生器测定黄曲霉毒素 B₁。线性范围为 $0.5\sim 20 \text{ ng}/\text{mL}$, 线性相关, 相关系数 $r=0.9996$, 分别在 $5、10、20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 水平下进行加标回收实验, 平均加标回收率为 $84.0\%\sim 91.6\%$, 相对标准偏差 $0.1\%\sim 1.7\%$ 。实验表明本方法具有较高的灵敏度、精密度, 能满足对油茶样品的高通量检测及安全限量的要求, 前处理简单、快速、准确, 便于实验室开展油茶中黄曲霉毒素 B₁ 的监测工作。

参考文献

- [1] Shyu RH, Shyu HF, Liu HW, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin [J]. *Toxicol*, 2002, 40(3): 255-258.
- [2] Egner PA, Wang JB, Zhu YR, *et al.* Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98(25): 14601-10606.
- [3] Ren Y, Zhang Y, Shao S, *et al.* Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1143(1-2): 48-64.
- [4] GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. GB 2761-2011 National food safety standard-Maximum levels of mycotoxins in foods [S].
- [5] 谢芳, 赖卫华, 史爱武, 等. 免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素 B₁ [J]. *食品科学*, 2013, (18): 165-169.

Xie F, Lai WH, Shi AW, *et al.* Immunomagnetic bead enrichment and

- ELISA for detection of aflatoxin B₁ in Sauce [J]. *Food Sci*, 2013, (18): 165–169.
- [6] 尚瑛达, 曹素芳. 薄层色谱法测定黄曲霉毒素 B₁ 探讨[J]. *粮食与油脂*, 1993, (4): 50–51.
- Shang YD, Cao SF. Discussion of the detection by thin layer chromatography of aflatoxin B₁ [J]. *J Cere Oils*, 1993, (4): 50–51.
- [7] 罗小虎, 王韧, 王莉, 等. 高效液相色谱快速测定玉米中黄曲霉毒素的研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, (6): 99–103.
- Luo XH, Wang R, Wang L, *et al.* Rapid detection of aflatoxins in corns by high performance liquid chromatography [J]. *J Cere Oils Ass*, 2014, (6): 99–103.
- [8] 李可, 丘汾. 免疫亲和层析-超高效液相色谱法测定大米中 4 种黄曲霉毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, (16): 2328–2330.
- Li K, Qiu F. Determination of four kinds of aflatoxins in rice by immunoaffinity chromatography-UPLC [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, (16): 2328–2330.
- [9] 孙娟, 李为喜, 张妍, 等. 用超高效液相色谱串联质谱法同时测定谷物中 12 种真菌毒素[J]. *作物学报*, 2014, (4): 691–701.
- Sun J, Li WX, Zhang Y, *et al.* Simultaneous determination of twelve mycotoxins in cereals by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Crop Sci*, 2014, (4): 691–701.
- [10] 陈彤, 王常青, 李小凡, 等. 间接 ELISA 检测不同贮存条件下花生中黄曲霉毒素 B₁[J]. *中国油脂*, 2014, (9): 88–91.
- Chen T, Wang CQ, Li XF, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanut under different storage conditions by indirect ELISA [J]. *China Oil Fat*, 2014, (9): 88–91.
- [11] 王建树, 时雪峰, 许彬. 高效液相色谱法测定武陟油茶中的黄曲霉毒素[J]. *河南预防医学杂志*, 2017, 28(5): 345–347.
- Wang JS, Shi XF, Xu B. Determination of aflatoxins in Wuzhi Youcha by HPLC [J]. *Henan J Prev Med*, 2017, 28(5): 345–347.
- [12] DBS 61/0013-2016 食品安全地方标准油茶[S].
- DBS 61/0013-2016 Local food safety standard Youcha [S].
- [13] GB 5009.22-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定[S].
- GB 5009.22-2016 National food safety standard-Determination of aflatoxin B and G in the food[S].
- [14] 赵浩军, 王坤, 杨卫花, 等. 高效液相色谱柱后光化学反应-荧光检测茶叶中黄曲霉毒素 B₁[J]. *茶叶科学*, 2013, 33(3): 237–241.
- Zhao HJ, Wang K, Yang WH, *et al.* Determination of aflatoxins B₁ in tea by high performance liquid chromatography-fluorescence detector with post-column photochemical reaction [J]. *J Tea Sci*, 2013, 33(3): 237–241.
- [15] 周贻兵, 刘利亚, 李磊, 等. 免疫亲和柱净化-光化学衍生高效液相色谱荧光法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的含量[J]. *中国油脂*, 2014, (6): 92–94.
- Zhou YB, Liu LY, Li L, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in vegetable oil by HPLC-FLD with photochemical derivatization after immunoaffinity column purification [J]. *China Oils Fats*, 2014, (6): 92–94.
- [16] 韩青, 钱珍珠, 张瑞雪, 等. 免疫亲和柱-液相色谱法快速测定面粉中黄曲霉毒素 B₁ 的条件优化[J]. *食品科技*, 2017, 42(1): 267–271.
- Han Q, Qian ZZ, Zhang RX, *et al.* Rapid determination of aflatoxin B₁ in wheat flour by immunoaffinity column-high liquid chromatography [J]. *Food Sci Technol*, 2017, 42(1): 267–271.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



侯磊磊, 硕士, 主要研究方向为食品检验检测技术。

E-mail: hl8622268@126.com