

高效液相色谱-光化学柱后衍生法测定紫苏籽中 黄曲霉毒素 B₁

牛宏亮, 赵 亮*, 田 秀, 韦永仓, 袁 辉, 张永显

(甘肃省轻工研究院有限责任公司, 兰州 730000)

摘 要: **目的** 建立一种高效液相色谱-光化学柱后衍生法测定紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法。**方法** 样品经乙腈-水溶液(84:16, V:V)提取, 用免疫亲和柱净化后, 经光化学衍生器衍生, 在高效液相色谱仪荧光检测器上检测。**结果** 该方法对黄曲霉毒素 B₁ 的最低检测限为 0.05 µg/kg, 定量限为 0.20 µg/kg, 相关系数为 0.9990, 加标回收率为 86.0%~93.5%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.94%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合测定紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

关键词: 高效液相色谱; 黄曲霉毒素 B₁; 光化学柱后衍生; 紫苏籽

Determination the aflatoxin B₁ in *Perilla frutescens* seeds by high performance liquid chromatography-photochemical post-column derivatization

NIU Hong-Liang, ZHAO Liang*, TIAN Xiu, WEI Yong-Cang, YUAN Hui, ZHANG Yong-Xian

(Gansu Research Institute of Light Industry Co., Ltd, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of determination the aflatoxin B₁ in *Perilla frutescens* seeds by high performance liquid chromatography-photochemical post-column derivatization. **Methods** The samples were extracted by acetonitrile-water solution (84:16, V:V) and purified by immunoaffinity column, and then derivated by photochemical derivative. The samples were detected by high performance liquid chromatography-fluorescence detector. **Results** The detection limit of the aflatoxin B₁ was 0.05 µg/kg, and the quantitative limit was 0.20 µg/kg, the correlation coefficient was 0.9990, the recovery rate was 86.0%-93.5%, and the relative standard deviation (RSD) was 1.94%. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for detecting aflatoxin B₁ in the *Perilla frutescens* seeds.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; aflatoxin B₁; photochemical post-column derivatization; *Perilla Frutescens* seeds

1 引 言

黄曲霉毒素是一种有毒、致癌的次级代谢产物, 主要由黄曲霉和寄生曲霉 2 种真菌产生^[1]。它们存在于土壤、

动植物、各种坚果中, 特别是容易污染花生、玉米、稻米、大豆、小麦等粮油产品, 是霉菌毒素中毒性最大、对人类健康危害极为突出的一类霉菌毒素^[2]。黄曲霉毒素由大约 18 种化学结构相似的衍生物组成, 包括 B 和 G 两大类,

基金项目: 甘肃省重点研发项目(17YF1FA103) **Fund:** Supported by Gansu Key R&D Projects (17YF1FA103)

***通讯作者:** 赵亮, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。E-mail: 34251314@qq.com

***Corresponding author:** ZHAO Liang, Engineer, Gansu Research Institute of Light Industry Co.,Ltd, Lanzhou 730000, China. E-mail: 34251314@qq.com

植物性食物中产生 B₁、B₂、G₁ 和 G₂^[3]。黄曲霉毒素 B₁ 在植物性食物衍生组中毒性最强,其慢性毒性甚至可诱发肝癌^[4,5]。

紫苏籽为一类唇形科植物—紫苏的种子。可以用作调味料,具有去腥、增鲜、提味的作用。同时具有一定的药用价值,具有下气,清痰,润肺,宽肠的功效。紫苏籽中含大量油脂,出油率高达 45%左右。为了监测紫苏油在贮藏过程中产生黄曲霉毒素,本试验使用液相色谱仪对不同温度、湿度条件下的黄曲霉毒素 B₁ 进行测定。

目前,关于黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法主要采用薄层层析法^[6,7],另外还采用液相色谱法^[8-11]、酶联免疫法^[12-15]、液相色谱-质谱联用法^[16-18]。但是现在的方法涉及设备较多,转移过程多,容易造成组分损失和污染,鉴于此,本试验采用高效液相色谱-电化学柱后衍生法检测紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁,用乙腈-水溶液的混合溶液提取,柱后光化学衍生器衍生,用荧光检测器检测,外标法定量。

本研究的目的在于建立一种快速、简单的测定紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 的方法,确定紫苏籽的最佳贮藏时间和温度,以及为生产安全、可靠的紫苏籽油提供保障。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

黄曲霉毒素 B₁(标准物质 2.00 μg/mL)北京坛墨质检科技有限公司;实验所用样品是从甘肃庆阳一带所收集的紫苏籽;甲醇、乙腈(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);吐温-20(分析纯,天津市光复精细化工研究所);IAC-SEP 免疫亲和柱(北京中检维康生物技术有限公司)。

2.2 仪器与设备

1260 液相色谱仪(配有荧光检测器(FLD)及 ChemStation Edition C.01.07 数据处理系统)(美国 安捷伦科技有限公司);PHRED 光化学衍生器(美国奥拉 AURA 公司);AB204-N 电子分析天平(梅特勒-托利多公司);SHA-C 恒温振荡器(常州国华仪器有限公司);HSE-24B 固相萃取装置(天津市恒奥科技发展有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品预处理

称取 5.00 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20.0 mL 乙腈-水溶液(84:16, V/V)或甲醇-水溶液(70:30, V/V),涡旋混匀,置于涡旋振荡器振荡 20 min,在 6000 r/min 下离心 10 min,取上清液备用。

2.3.2 样品净化(免疫亲和柱净化)

1) 上样液的准备

准确移取 4 mL 上述上清液,加入 46 mL 1%吐温-20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)(使用甲醇-水溶液

提取时可减半加入),混匀。

2) 免疫亲和柱的准备

将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温。

3) 试样的净化

将免疫亲和柱内的液体放弃后,将上述样液移至 50 mL 注射器筒中,调节下滴速度,控制样液以 1~3 mL/min 的速度稳定下滴。待样液滴完后,往注射筒内加入 2×10 mL 水,以稳定流速淋洗免疫亲和柱。待水滴完后,用真空泵抽干亲和柱。脱离真空系统,在亲和柱下部放置 10 mL 刻度试管,取下 50 mL 的注射器,2×1 mL 甲醇洗脱亲和柱,控制 1~3 mL/min 的速度下滴,再用真空泵抽干亲和柱,收集全部洗脱液至试管中。在 50 °C 下用氮气缓缓地将洗脱液吹至近干,用初始流动相定容至 1.0 mL,涡旋 30 s 溶解残留物,0.22 μm 滤膜过滤,收集滤液于进样瓶中以备进样。

2.3.3 色谱条件

流动相: A 相, 水; B 相, 甲醇; 等梯度洗脱条件: A, 55%; B, 45%; 色谱柱: C₁₈ 柱 250 mm×4.6 mm, 5 μm;

流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40°C; 进样量: 10 μL; 激发波长: 360 nm; 发射波长: 440 nm。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的选择

分别使用乙腈-水溶液(84:16, V/V)或甲醇-水溶液(70:30, V/V)作为提取溶剂,通过添加回收试验,由表 1 可知,发现使用乙腈-水溶液(84:16, V/V)作为提取溶剂提取效果好,回收率高。

表 1 提取溶剂回收率
Table 1 Recoveries of extraction solvent

提取溶剂	加标量/(μg/L)	测出量/(μg/L)	回收率/%
乙腈-水溶液	0.5	0.48	96.0
	1.0	0.93	93.0
	5.0	4.82	96.4
甲醇-水溶液	0.5	0.40	80.0
	1.0	0.81	81.0
	5.0	4.23	84.6

3.2 柱后衍生方法的选择

分别使用光化学衍生器和溶剂柱后衍生装置对紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 进行测定,通过加标回收试验,结果如表 2 所示,2 种方法都能够满足对食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定。但是光化学衍生器在使用的时候具有使用方便、快速、不需要配置衍生液等优点,所以本实验使用光化学柱后衍生对紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 进行测定。

表 2 柱后衍生方法回收率
Table 2 Recoveries of post-column derivation method

衍生方法	加标量/(μg/L)	测出量/(μg/L)	回收率/%
光化学衍生	1	0.92	92.0
	5	4.78	95.6
	10	9.31	93.1
柱后衍生	1	0.92	92.0
	5	4.82	96.4
	10	9.47	94.7

3.3 免疫亲和柱流速的选择

样品在过柱、淋洗和洗脱的时候, 分别选择 1、2、3、4 mL/min 的流速对样品进行过柱、淋洗和洗脱, 通过回收率实验, 结果(表 3)发现流速控制在 2 mL/min 时, 样品的回收率最高, 所以本实验使用 2 mL/min 为样品过柱/淋洗和洗脱的流速。

表 3 洗脱流速回收率
Table 3 Recoveries of elution flow rate

流速/(mL/min)	加标量/(μg/L)	测出量/(μg/L)	回收率/%
1	1	0.71	71.0
	5	3.84	76.8
	10	7.28	72.8
2	1	0.98	98.0
	5	4.87	97.4
	10	9.67	96.7
3	1	0.78	78.0
	5	4.07	81.4
	10	8.06	80.6
4	1	6.24	62.4
	5	3.27	65.4
	10	6.67	66.7

3.4 不同温度下紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 的含量

将等量的紫苏籽装入密封袋中, 分别置于电热培养箱中, 温度分别控制在 10、15、20、25、30、35 °C, 对紫苏籽进行贮藏, 每隔 5 d 取样, 测定每个样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。不同温度下的紫苏籽在贮藏过程中黄曲霉毒素 B₁ 的含量见图 1。由图 1 数据分析可知, 紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 含量随贮藏时间的延长呈上升趋势, 在贮藏 30 d

后达到最高值, 30 d 以后逐渐下降。在贮藏时间相同时, 黄曲霉毒素 B₁ 随温度的升高呈上升趋势, 在 30 °C 时达到最高值, 然后逐渐下降。

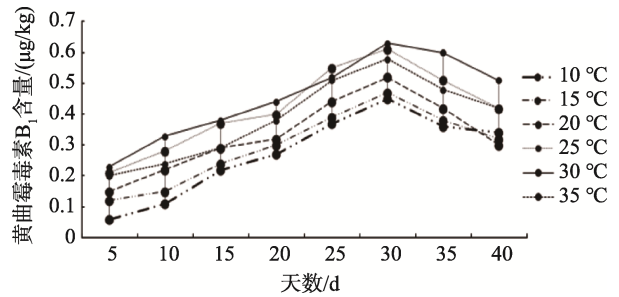


图 1 不同温度下的紫苏籽在贮藏过程中黄曲霉毒素 B₁ 的含量
Fig.1 Aflatoxin B₁ in *Perilla frutescens* seeds stored at different temperatures

3.5 不同湿度下紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 的含量

将等量的紫苏籽装入密封袋中, 分别置于恒温恒湿间中, 相对湿度分别控制在 30%、35%、40%、45%、50%、55%, 对紫苏籽进行贮藏, 每隔 5 d 取样, 测定每个样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。不同湿度下的紫苏籽在贮藏过程中黄曲霉毒素 B₁ 的含量见图 2。由图 2 数据分析可知, 紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁ 含量随着相对湿度和贮藏时间的延长呈上升趋势, 在贮藏相对湿度为 50% 时达到最高值。

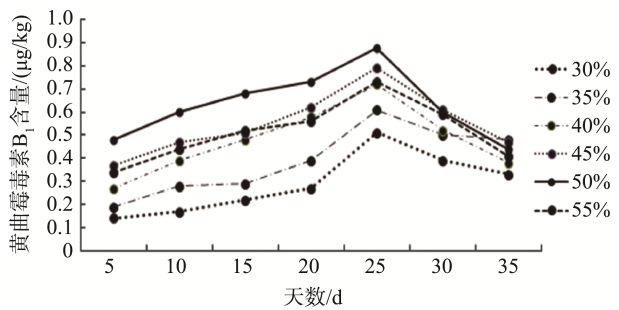


图 2 不同湿度下的紫苏籽在贮藏过程中黄曲霉毒素 B₁ 的含量
Fig.2 The content of aflatoxin B₁ in *Perilla frutescens* seeds stored in different humidity

3.6 标准曲线、线性范围、检出限和精密度

以黄曲霉毒素 B₁ 的标准溶液浓度为横坐标, 各自的峰面积为纵坐标绘制标准曲线, 所得到的线性方程及相关系数列于表 4 中。由表 4 可知, 黄曲霉毒素 B₁ 的相关系数为 0.9990。在本方法实验条件下, 以信噪比为 3(S/N=3) 时确定本方法的最低检出限。通过实验测得黄曲霉毒素 B₁ 的检出限(limit of detection, LOD)在 0.05 μg/kg, 定量限为 0.20 μg/kg, 方法精密度以一定浓度的标准溶液进行测定 (n=6), 结果为 1.94。

表 4 黄曲霉毒素 B₁ 标准曲线的线性方程、相关系数、检出限和精密度

Table 4 Standard equation, correlation coefficient, LOD and RSD of aflatoxin B ₁				
线性方程	相关系数(R)	检出限 /(μg/kg)	定量限 /(μg/kg)	精密度 /(n=6, %)
Y=2.39X-4.66	0.9990	0.05	0.20	1.94

3.7 方法回收率的测定

为了保证测定结果的准确性,称取 5.00 g 样品于 50.0 mL 的离心管中,添加浓度为 0.1、1.0 和 10.0 μg/L 3 个浓度水平的标准品,分别测定每个标准品的加标回收率。结果表明,回收率在 86.0%~93.5%之间。其回收率(均已扣除本底值)见表 5。

表 5 5 g 黄曲霉毒素 B ₁ 样品加标回收率 Table 5 Recoveries of 5 g aflatoxin B ₁ samples			
加标量/(μg/L)	测出量/(μg/L)	回收率/%	平均回收率/%
0.1	0.0847	84.7	86.0
0.1	0.0876	87.6	
0.1	0.0857	85.7	
1	0.934	93.4	93.5
1	0.928	92.8	
1	0.942	94.2	
10	9.02	90.2	90.5
10	9.14	91.4	
10	8.99	89.9	

3.8 实际样品测定

由庆阳企业提供 30 份紫苏籽样品,采用本方法进行检测,结果显示有 8 份紫苏籽检出黄曲霉毒素 B₁,检出率为 26.7%,检出值的含量分别为 0.21~7.07 μg/kg(图 3),各个样品的黄曲霉毒素 B₁ 含量检出值均未超过国家限量标准要求。

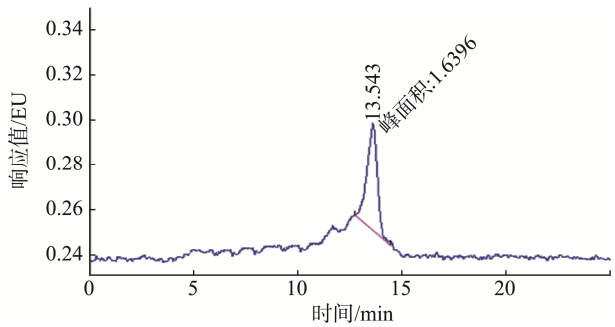


图 3 紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁(0.21 μg/kg)测定图谱
Fig.3 Chromatogram of determination of AFB₁(0.21 μg/kg) in Fructus Perillae

4 结 论

本方法采用高效液相色谱-光化学柱后衍生法测定紫苏籽中黄曲霉毒素 B₁,该方法具有快速、准确、灵敏等特点。在该方法检测过程中,样品在洗脱时,一定要控制好流速在 2 mL/min 左右,不能太快,否则会使检测结果偏低。黄曲霉毒素最适宜的生长温度是 30 ℃,相对湿度在 50%左右。这也是研究黄曲霉毒素的产生的前提基础,是寻找控制黄曲霉毒素方式的关键,可见降低贮藏温度和相对湿度是控制黄曲霉毒素 B₁ 的有效方法。

参考文献

[1] 林巧, 巩发永, 肖诗明. 苦荞中黄曲霉毒素 B₁ 含量的 3 种测定方法的比较[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(6): 57-61.
Lin Q, Gong FY, Xiao SM. Comparison of three methods for determination of aflatoxin B₁ in tartary buckwheat [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2016, 37(6): 57-61.

[2] 丁晓雯, 柳春红. 食品安全学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2011.
Ding XW, Liu CH. Food safetiology [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.

[3] 王瑞鑫, 张徽, 李书国. 免疫传感器在粮油中真菌毒素快速检测的应用研究进展[J]. 粮油食品科技, 2015, 23(4): 83-87.
Wang RX, Zhang H, Li SG. Research progress on application of immunosensor in determination of mycotoxins in cereals and oils [J]. Sci Technol Cere Oil Food, 2015, 23(4): 83-87.

[4] 马腾达, 王慧玲, 周凤霞, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 在食品检测中的研究新进展[J]. 食品安全, 2019, (1): 75.
Ma TD, Wang HL, Zhou FX, et al. New progress of aflatoxin B₁ in food detection [J]. Food Saf, 2019, (1): 75.

[5] Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, et al. Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology [J]. Toxicol Sci, 2011, 120(1): 28-48.

[6] 王雄, 林巧, 林路, 等. 薄层层析法测定苦荞中黄曲霉毒素 B₁ 影响因素的研究[J]. 农业与技术, 2015, 35(15): 24-26.
Wang X, Lin Q, Lin L, et al. Study on the influencing factors of aflatoxin B₁ in tartary buckwheat by TLC [J]. Agric Technol, 2015, 35(15): 24-26.

[7] 赵磊, 吴明宸, 于亚楠, 等. 酶联免疫和薄层层析法检测茶叶中黄曲霉毒素 B₁ 的评价[J]. 黑龙江医药, 2018, 31(6): 1190-1194.
Zhao L, Wu MH, Yu YN, et al. Evaluation of aflatoxin B₁ in tea was detected by ELISA and TLC [J]. Heilongjiang Med J, 2018, 31(6): 1190-1194.

[8] 王勇. 黄曲霉毒素 B₁ 柱前衍生-高效液相色谱法检测方法的建立[J]. 大众标准化, 2017, (6): 45-47.
Wang Y. Establishment of a pre-column derivatization-high performance liquid chromatography method for the determination of aflatoxin B₁ [J]. Mass Stand, 2017, (6): 45-47.

[9] 刘旭. 粮食和食用油中黄曲霉毒素 B₁ 高效低耗液相色谱检测方法的建立[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
Liu X. Study on the high efficiency and low-cost technology for determining aflatoxin B₁ in grain and edible oil [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2015.

[10] 陈强胜. 高效液相色谱-柱后衍生法检测大米中黄曲霉毒素 B₁ 方法分

- 析[J]. 分析检测, 2018, (1): 147–149.
- Chen QS. High performance liquid chromatography-post column derivative method for the detection of aflatoxin B₁ in rice [J]. Anal Detect, 2018, (1): 147–149.
- [11] 张慧贤, 童圆, 胡西洲, 等. 固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法测定谷物中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 分析科学学报, 2018, 34(5): 669–672.
- Zhang HX, Tong Y, Hu XZ, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in cereals by solid phase extraction-high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J Anal Sci, 2018, 34(5): 669–672.
- [12] 李江, 綦艳, 余之蕴, 等. 酶联免疫法对食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的检测[J]. 广东化工, 2017, 44(11): 73–74.
- Li J, Qi Y, She ZY, *et al.* Detection of aflatoxin B₁ in edible oil by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Guangdong Chem Ind, 2017, 44(11): 73–74.
- [13] 王重阳, 吴小慧, 张喆昌, 等. 酶联免疫法检测混合植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 881–885.
- Wang CY, Wu XH, Zhang JC, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in mixed vegetable oil by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(4): 881–885.
- [14] 刘菲, 王莉娜, 胡俊, 等. 酶联免疫吸附筛法测定大米和大麦中黄曲霉毒素 B₁ 的含量[J]. 啤酒科技, 2018, (69): 14–18.
- Liu F, Wang LN, Hu J, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in brewing grains by ELISA [J]. Beer Technol, 2018, (69): 14–18.
- [15] 李江, 李晓明, 綦艳, 等. 酶联免疫法检测酱油中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(12): 4735–4739.
- Li J, Li XM, Qi Y, *et al.* Detection of aflatoxin B₁ in soy sauce by enzyme linked immunosorbent assay [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(12): 4735–4739.
- [16] 赵艳霞, 田晨颖, 陈晓, 等. UPLC-MS/MS 法测定花生油和牛奶中黄曲霉毒素含量[J]. 食品与药品, 2018, 20(2): 120–122.
- Zhao YX, Tian CY, Chen X, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanut oil and milk by UPLC-MS/MS [J]. Food Drug, 2018, 20(2): 120–122.
- [17] 杨晓丽, 仇峰, 韦日伟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定地龙中 4 个黄曲霉毒素[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 627–630.
- Yang XL, Chou F, Wei RW, *et al.* HPLC-MS/MS simultaneous determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in pheretima [J]. Chin J Pharm Anal, 2012, 32(4): 627–630.
- [18] 王一晨, 刘奇, 吴学贵, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定花生种中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(7): 2058–2063.
- Wang YC, Liu Q, Wu XG, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in peanut by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 2058–2063.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



牛宏亮, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。
E-mail: 306222587@qq.com



赵亮, 工程师, 主要研究方向为食品分析与检测。
E-mail: 34251314@qq.com