

同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法检测花生及其制品中黄曲霉毒素 B₁ 及其生物可给性研究

王韶颖, 吕波, 沈飞, 邢常瑞, 夏季, 李彭*, 方勇

(南京财经大学食品科学与工程学院, 南京 210023)

摘要: **目的** 建立一种基于同位素内标的超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 定量分析花生及其制品中的黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁), 并研究其在胃、肠两个阶段的生物可给性。**方法** 样品经乙腈-水-乙酸(84:15:1, V:V:V)提取, 高速冷冻离心净化后, 以 0.1%甲酸溶液与甲醇为流动相, 经 Waters Acquity BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 分离, 内标法定量。通过体外模拟消化实验, 研究样品中 AFB₁ 在胃、肠两个阶段的生物可给性。**结果** AFB₁ 在 0.01~30.00 μg/L 范围内线性关系良好, 相关系数(r^2)为 0.9998, 花生、花生油、花生酱、花生奶中 AFB₁ 的检出限为 0.07~0.36 μg/kg、定量限为 0.24~1.20 μg/kg, 3 种加标水平的平均回收率为 80.3%~103.4%、相对标准偏差均小于 5.8%; 市售样品中, 花生相对于其制品的 AFB₁ 污染更严重, 2 份超过国家限量标准(20 μg/kg); 花生类食品中 AFB₁ 在胃相中的生物可给性为 4.35%~33.88%、在胃肠相中为 12.81%~79.78%。**结论** 本研究所建立的检测方法简单快速、精密度高、准确性好, 可以满足对花生类食品中 AFB₁ 的快速准确分析的要求, 体外模拟消化表明不同花生类食品中 AFB₁ 生物可给性存在较大差异。

关键词: 花生; 同位素内标法; 超高效液相色谱-串联质谱法; 黄曲霉毒素 B₁; 生物可给性

Determination of aflatoxin B₁ in peanuts and its products by isotope internal standard-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and study on its bioaccessibility

WANG Shao-Ying, LV Bo, SHEN Fei, XING Chang-Rui, XIA Ji, LI Peng*, FANG Yong

(College of Food Science and Engineering, Nanjing University of Finance and Economics, Nanjing 210023, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the quantitative analysis of aflatoxin B₁ (AFB₁) in peanuts and its products by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) based on isotope internal standard method, and study its bioaccessibility in the gastric and the small intestinal phases. **Methods** The sample was extracted with acetonitrile-water-acetic acid (84:15:1, V:V:V), purified by high-speed refrigerated centrifugation, and separated on a Waters Acquity BEH C₁₈ column (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm) with 0.1% formic acid solution and methanol as mobile phases, the isotope internal standard method was used for quantitative analysis.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31701697)、江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(18)2023、CX(19)2005]

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (31701697), and the Jiangsu Provincial Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund [CX(18)2023, CX(19)2005]

*通信作者: 李彭, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境污染与食品安全。E-mail: lipengim@126.com

*Corresponding author: LI Peng, Ph.D, Associate Professor, College of Food Science & Engineering of NUFE, No.3, Wenyuan Road, Xianlin University Town, Nanjing 210023, China. E-mail: lipengim@126.com

On this basis, the bioaccessibility of AFB₁ in the gastric and the small intestinal phases was studied by simulated digestion experiment *in vitro*. **Results** The AFB₁ had good linear relationship in range of 0.01–30.00 µg/L with the correlation coefficient (r^2) of 0.9998, the limits of detection and the limits of quantification were from 0.07–0.36 µg/kg and from 0.24–1.20 µg/kg, respectively, the average recoveries of the 3 spiked levels ranged from 80.3% to 103.4% with the relative standard deviations all less than 5.8%; Among the commercial samples, the AFB₁ contamination of peanuts was more serious than that of its products, and 2 of them exceeded the national limit standard (20 µg/kg). The bioavailability of AFB₁ in peanut foods ranged from 4.35%–33.88% in the gastric phase and 12.81%–79.78% in the small intestinal phase. **Conclusion** The method established in this study is simple, rapid, with high precise and accurate, which can meet the requirements the rapid and accurate analysis of AFB₁ in peanut foods. *In vitro* simulated digestion shows that the bioaccessibility of AFB₁ in different peanut foods is quite different.

KEY WORDS: peanut; isotope internal standard method; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; aflatoxin B₁; bioaccessibility

0 引言

我国是花生种植大国,花生年产量已超过1700万t^[1],广泛用于榨油及生产各种花生类食品。但是由于原料污染、贮藏条件不佳、运输保护措施不够等多方面问题,花生类食品存在真菌毒素残留问题。在诸多真菌毒素中,黄曲霉毒素B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)是毒性最高和危害最大的一类,具有致畸性、致癌性、致突变性及免疫抑制特性,已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为人类第一类致癌物^[2-3]。因此,许多国家都对食品和饲料中 AFB₁ 的最大残留水平制定了严格标准,以保护人类和动物的健康安全。欧盟规定花生中 AFB₁ 的最大限量为2 µg/kg;日本规定所有食品中黄曲霉毒素的总量不得超过10 µg/kg;澳大利亚和新西兰规定花生中黄曲霉毒素的总量不得超过15 µg/kg;而我国花生及花生制品中 AFB₁ 的最大限量为20 µg/kg。

由于 AFB₁ 的高危害性及对花生污染的严重性,准确检测花生及其制品中 AFB₁ 的含量显得迫切而必要。花生的成分十分庞杂,除了多糖、蛋白质和色素等物质外,还包含丰富的油脂^[4],这些油脂可与脂溶性的 AFB₁ 互溶,难以分离,从而造成严重的基质干扰。此外,花生制品种类繁多,基质种类各不相同,给检测工作带来极大困难。目前,食品中真菌毒素的检测方法主要有免疫检测法^[5-6]、高效液相色谱法^[7-8]、液相色谱-质谱法^[9-10]等。其中,免疫检测法分析结果不够精确、灵敏度较差;高效液相色谱法在检测过程中容易受到样品基质干扰而导致检出假阳性结果,且操作烦琐,难以满足样品的痕量检测需求。液相色谱-质谱法^[11]具有抗干扰能力强、灵敏度高等优点,且二级质谱能够有效排除假阳性结果,实现快速准确定量分析,已日渐成为检测真菌毒素的首选方法。前处理方法是消除样品基质干扰,实现准确定量分析的关键。真菌毒素测定过程中常用的前处理方法主要有固相萃取法^[12]、免疫

亲和柱净化法^[13]、凝胶渗透色谱净化法^[14]及 QuEChERS 法^[15]。这些前处理方法各具优势,但均存在样品残留基质影响定量准确性的问题。鉴于花生及其制品基质种类的复杂多样,同位素内标物与目标物质质子数相同、中子数不同,有相同的色谱、质谱行为,采用同位素作内标可有效弥补基质效应对定量准确性的影响^[16],进而有望实现不同基质下花生类食品中 AFB₁ 的准确检测。

生物可给性指的是在模拟的人工肠胃系统中,可能被血液系统吸收的污染物或营养物的含量,是物质可能被生物吸收的最大值^[17]。相比于花生类食品中 AFB₁ 的总量,生物可给性通过检测胃肠道中生物可给态的 AFB₁ 进行风险评估,能更加准确地反映出其对人体的危害程度。目前, *in vitro* 法作为生物可给性研究的有效工具,由于其周期短、费用低、适合大批量检测等优点,在食品污染物风险评估领域受到广泛关注^[18-19]。但国内外关于食品中生物可给性的研究多集中在重金属领域^[20-21],在真菌毒素,尤其是毒性极强的黄曲霉毒素方面的研究却鲜有报道。花生及其制品作为人体摄入 AFB₁ 的重要来源^[22],其在人体内积累并产生的健康效应不容忽视,因此,研究花生及其制品中 AFB₁ 的生物可给性十分必要。

本研究建立同位素内标-超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定花生及其制品(花生油、花生酱、花生奶)中的 AFB₁,并在此基础上,通过 *in vitro* 实验研究 AFB₁ 在胃相与肠相中的生物可给性,以期为花生及其制品中 AFB₁ 的准确检测及健康风险的科学评估提供理论和技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇、乙腈、甲酸、乙酸(色谱纯)、盐酸(优级纯)、胃蛋白酶(≥ 250 units/mg)、胰蛋白酶(≥ 10000 BAEE

units/mg)、胆汁(≥98%)(德国 Merck 公司); AFB₁ 标准品及其稳定同位素标准品 (¹³C₁₇-AFB₁, 0.501 mg/L)(奥地利 ROMER 公司); AFB₁ 免疫亲和柱(北京华安麦科生物技术有限公司); 花生油中 AFB₁ 成分分析质控样品 (TOXIN-JTZK-002)、花生酱中 AFB₁ 成分分析质控样品 (TOXIN-JTZK-017)(国家粮食与物资储备局科学研究院); 氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠(分析纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 实验所用水均为超纯水(电阻率 ≥ 18.2 MΩ·cm); 实验所用花生及其制品样品购于本地超市及农贸市场。

1.2 仪器与设备

WatersH-Class/XevoTQ-S 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(美国 Waters 公司); Allegra64R 高速冷冻台式离心机(美国 Beckman 公司); MS200 多管混匀仪(杭州瑞诚仪器有限公司); SHA-B 水浴恒温振荡器(常州荣华仪器有限公司); HH-2 数显恒温水浴锅(常州国华电器有限公司); 0.22 μm 尼龙滤膜(美国 PALL 公司)。

1.3 方法

1.3.1 标准溶液配制

AFB₁ 标准储备液的配制: 将 AFB₁ 用乙腈稀释为 10 mg/L 的 AFB₁ 标准储备液, 在 -20 °C 以下避光保存; ¹³C₁₇-AFB₁ 标准工作液的配制: 准确移取适量的 ¹³C₁₇-AFB₁ 标准液, 用乙腈稀释为 0.01 mg/L 的 ¹³C₁₇-AFB₁ 标准工作液, 在 -20 °C 以下避光保存。

AFB₁ 标准工作液的配制: 准确移取适量的 AFB₁ 标准储备液, 采用乙腈-水-乙酸(42:57.5:0.5, V:V:V) 逐级稀释, 分别配制成质量浓度为 0.01、0.10、0.50、1.00、10.00、20.00、30.00 μg/L 的 AFB₁ 标准工作液, 取 400 μL 不同质量浓度的 AFB₁ 标准工作液于进样小瓶中, 加入 40 μL ¹³C₁₇-AFB₁ 标准工作液, 摇匀, 在 -20 °C 以下避光保存。

1.3.2 样品前处理

称取粉碎后的花生及花生制品(花生油、花生酱、花生奶)2.0 g(精确至 0.0001 g)于 50 mL 离心管中, 加入 8 mL 乙腈-水-乙酸提取液(84:15:1, V:V:V), 涡旋提取 20 min, 10000 r/min 离心 10 min, 吸取 1 mL 上清液加入 1 mL 超纯水, 振荡混匀后, 在 4 °C 15000 r/min 离心 15 min, 上清液过 0.22 μm 尼龙滤膜, 取 400 μL 样品滤液于进样小瓶中, 再加入 40 μL ¹³C₁₇-AFB₁ 标准工作液, 混匀, 待测。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: Waters Acquity BEH C₁₈ 柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 柱温: 40 °C; 流动相: A 相为含 0.1% (V:V) 的甲酸水溶液, B 相为甲醇; 梯度洗脱程序: 0~1.0 min, 10% B; 1.0~3.0 min, 10%~60% B; 3.0~3.5 min, 60%~90% B; 3.5~5.0 min, 90% B; 5.0~5.5 min, 90%~10% B; 5.5~7.0 min, 10% B。流速: 0.4 mL/min; 进样量: 2 μL。

1.3.4 质谱条件

离子源: 电喷雾正离子源(electrospray ionization, ESI+); 检测方式: 多反应离子监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 毛细管电压: 3 kV; 锥孔气流: 氮气, 流速为 150 L/h; 离子源温度: 150 °C; 去溶剂气温度: 500 °C, 流速为 1000 L/h。MRM 监测离子对及质谱相关参数见表 1。

表 1 AFB₁ 及 ¹³C₁₇-AFB₁ 的保留时间、监测离子对及质谱采集参数
Table 1 Retention times, monitoring ions and mass spectrum acquisition parameters of aflatoxin B₁ and ¹³C₁₇-aflatoxin B₁

真菌毒素名称	保留时间 /min	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /V
AFB ₁	4.33	313.2>241.1	40	36
		313.2>285.1*	40	24
¹³ C ₁₇ -AFB ₁	4.33	330.1>301.1	40	24

注: *为定量离子对。

1.3.5 生物可给性测定

参考许芳溢等^[23]的方法, 并略作修改。准确称取花生类样品(花生、花生油、花生酱、花生奶)6.0 g(精确至 0.0001 g)于 100 mL 烧杯中, 加入 30 mL 模拟胃液(0.32 g 胃蛋白酶溶于 100 mL 0.3 mol/L 的 NaCl, 盐酸调节溶液 pH=1.5), 置于 37 °C 水浴摇床中振荡 60 min, 吸取 10 mL 样液于 70 °C 水浴锅中灭酶 10 min。胃阶段结束的消化液用 0.1 mol/L 的 NaHCO₃ 调节至溶液 pH=6, 加入 30 mL 模拟肠液(0.05 g 胰蛋白酶和 0.3 g 胆汁溶于 35 mL 0.1 mol/L 的 NaHCO₃), 加入 5 mL 1 mol/L 的 NaCl 和 1 mol/L KCl, 调节 pH 使其稳定维持至 7, 置于 37 °C 水浴摇床中振荡 120 min, 于 70 °C 水浴锅中灭酶 10 min。取胃、胃肠阶段灭酶消化液以 12000 r/min 的速度离心 10 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜, 加入 ¹³C₁₇-AFB₁ 标准工作液, 混匀, 待测。每个样品中 AFB₁ 在胃和肠道生物可给性定义为胃/胃肠部分溶解出的 AFB₁ 含量与总含量的比值。

1.4 数据处理

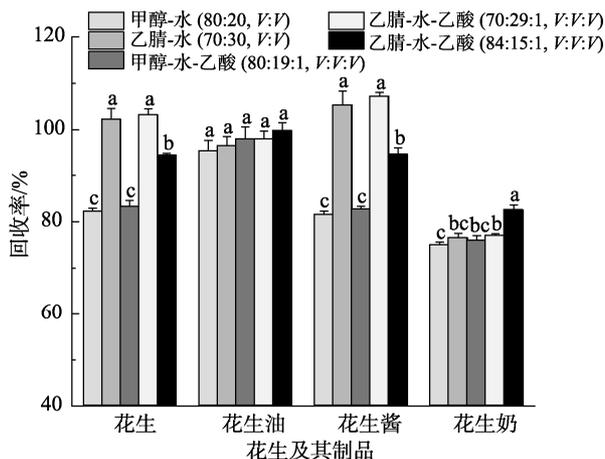
采用 Waters Masslynx 4.1 软件对 UPLC-MS/MS 所采集的数据进行积分处理, 并导出色谱图, 其他数据和图谱经 Origin 2018 绘图软件分析处理, 采用 SPSS 25.0 软件进行差异显著性分析($P < 0.05$ 表示差异显著)。所有实验至少重复 3 次, 数据以平均值表示。

2 结果与分析

2.1 样品提取溶剂的优化

提取溶剂的选择是影响花生及其制品中 AFB₁ 回收率的关键, 为了获得较高的回收率, 本研究比较了甲醇-水

(80:20, V:V)、乙腈-水(70:30, V:V)、甲醇-水-乙酸(80:19:1, V:V:V)、乙腈-水-乙酸(70:29:1, V:V:V)、乙腈-水-乙酸(84:15:1, V:V:V) 5种常用提取溶剂对4种花生类食品中 AFB₁ (10 μg/kg)的提取回收率。不同提取溶剂对花生及其制品中 AFB₁的回收率见图1, 相比于乙腈, 甲醇因同时提取了过多的色素、多糖等干扰物而使得 AFB₁的提取率较低。此外, 加入1%的乙酸使 AFB₁的回收率有所提高, 但影响较小, 无显著性差异($P>0.05$)。乙腈-水(70:30, V:V)、乙腈-水-乙酸(70:29:1, V:V:V)和乙腈-水-乙酸(84:15:1, V:V:V)对花生、花生油和花生酱的提取回收率均在合理范围内, 但前两种提取液对花生奶的提取效果不理想。花生奶中蛋白质含量较高, 而体系中高比例的乙腈具有促进对蛋白质沉淀作用, 进而减少干扰, 提高了对 AFB₁的回收率。综合考虑, 本研究最终选择乙腈-水-乙酸(84:15:1, V:V:V)为最优提取溶剂。



注: a~c: 相同类别样品中, 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下图2、4同。

图1 不同提取溶剂对花生及其制品中 AFB₁的回收率($n=6$)
Fig.1 Recoveries of AFB₁ in peanut and its products with different extraction solvents ($n=6$)

2.2 基质效应

采用超高效液相色谱-串联质谱法进行定量分析时, 与目标物一起流出喷雾针的内源性物质如脂肪酸、色素等会干扰目标物的离子化, 导致基质增强或基质抑制效应, 从而影响定量结果的准确性。本研究以不含 AFB₁的花生、花生油、花生酱、花生奶为空白基质, 用分析物峰面积对被测组分的质量浓度分别绘制净溶剂与基质匹配标准曲线。通过公式(1)评估基质效应(matrix effects, ME)^[24-25]:

$$ME (\%) = \frac{B - A}{A} \times 100\% \quad (1)$$

式中, A 和 B 分别为溶剂标准曲线的斜率和基质匹配标准曲线的斜率。比值一般在-20%~20%视为基质效应不明显, 比值大于20%视为基质增强效应, 比值小于-20%视为基质

抑制效应。AFB₁在花生、花生油、花生酱、花生奶中的基质效应分别为-24.0%、-22.1%、-62.1%、-66.0%, 其中, 花生奶制品基质抑制效应最为严重, 可能是由于其蛋白质含量较高造成^[26]。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》中采用免疫亲和柱、固相净化柱降低食品基质干扰, 但存在操作烦琐、成本高等问题。油料作物中脂肪含量较高, 因此, 可利用脂肪低温固化析出的特点降低基质干扰, 如吴宇等^[27-28]提出采用高速冷冻离心可降低植物油、玉米的基质干扰, 相比于国家标准, 其操作更加简单, 且避免了净化步骤对目标物的损失, 提高了方法的准确度。本研究根据花生及其制品高脂肪含量的成分特点, 探索低温高速冷冻离心净化其基质的可行性。

采用外标法定量时, 通常需要绘制基质匹配标准曲线以消除基质对定量分析的影响, 但采用基质加标后, 方法的检出限往往较高, 不适用于食品中痕量 AFB₁的检测。此外, 花生品种繁多, 基质复杂。以此为原料制成的各种花生制品, 成分含量间的差异往往更为巨大, 导致定量结果的准确性较差^[22]。在实际检测中, 往往难以找到具有代表性的空白样品基质, 对准确定量工作带来较大困难。¹³C₁₇-AFB₁与 AFB₁结构类似, 具有相同的物理化学性质, 在离子化的过程中受到的基质干扰相同, 因而可以有效弥补基质对定量分析的干扰。但同位素内标价格昂贵, 直接加入到样品中成本较高。因此, 本研究通过在所有标准溶液与样品液中加入相同含量的¹³C₁₇-AFB₁, 结合高速冷冻离心快速净化, 从而有效消除复杂样品基质对检测的干扰, 实现准确定量的目的。

2.3 方法学结果

2.3.1 方法线性关系、检出限及定量限

采用内标法对 1.3.1 配制的 AFB₁标准工作液进行测定, 以 AFB₁与¹³C₁₇-AFB₁的峰面积比为纵坐标(Y), AFB₁的质量浓度为横坐标(X), 绘制标准曲线。结果表明, AFB₁在质量浓度为 0.01~30.00 μg/L 范围内, 线性回归方程为 $Y=1.0536X+0.0005$, 线性相关系数(r^2)为 0.9998。根据色谱峰的信噪比($S/N=3$)计算标准溶液中待测物的检出限为 0.003 μg/kg, 信噪比($S/N=10$)计算标准溶液中待测物的定量限为 0.01 μg/kg。

按照样品前处理方法处理不含 AFB₁的4种花生类食品以获得空白基质液, 通过逐级稀释法获得4种花生类食品的检出限及定量限。结果表明, 4种花生类食品的检出限为 0.07~0.36 μg/kg, 定量限为 0.24~1.20 μg/kg, 远低于 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中花生及其制品中 AFB₁的限量指标(20 μg/kg)。

2.3.2 回收率及日内、日间精密度实验

选取花生、花生油、花生酱、花生奶4种花生类食品空白样品, 进行3个浓度水平(1、10、20 μg/kg)的 AFB₁加

标, 按照样品处理方法进行处理, 每个浓度水平重复 6 次实验测定回收率与日内精密度($n=6$), 重复 6 d 实验测定日间精密度($n=6$)。结果表明, 花生及其制品的加标回收率为 80.3%~103.4%、日内精密度的 0.4%~1.9%、日间精密度的 2.7%~5.8%, 该方法具有良好的准确性、重复性。

2.3.3 准确度实验

通过测定花生油及花生酱质控样品验证该方法的准确性, 重复测定 6 次, 计算平均值(\bar{X})及标准偏差(standard deviation, SD)。测定结果见表 2, 所有测定值均在标示值范围内, 方法具有良好的准确性。

表 2 同位素内标法对质控样品的测定结果($n=6$)
Table 2 Determination results of quality control samples by isotope internal standard method ($n=6$)

质控样品名称	编号	标示值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	同位素内标法(校正回收率)	
			$\bar{X}\pm\text{SD}$	相对标示值误差/%
花生油中 AFB ₁ 成分分析	TOXIN-JTZK-002	15.6 \pm 2.2	16.9 \pm 0.2	8.3
花生酱中 AFB ₁ 成分分析	TOXIN-JTZK-017	49.0 \pm 5.9	50.5 \pm 0.6	3.1

2.4 方法比较

比较该方法与免疫亲和柱-外标法对 4 种花生类食品(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的回收率差异, 免疫亲和柱净化法及同位素内标法对花生及其制品中 AFB₁ 的回收率结果见图 2, 该方法对 4 种花生类食品中 AFB₁ 的回收率范围为 82.5%~99.8%, 均高于免疫亲和柱-外标法(70.2%~90.6%)。免疫亲和柱虽然可以极大程度的净化花生基质, 但仍有少量干扰物质如脂肪、蛋白质等存在于洗脱液中, 从而会在检测过程中产生基质干扰, 导致目标物回收效果不理想, 尤其对于蛋白质含量较高的花生奶制品, 基质干扰较为严重, 回收率仅为 70.2%。此外, 该方法与 GB 5009.22—2016 相比, 采用高速冷冻离心代替免疫亲和柱净化样品, 同时, 通过稳定同位素内标校正基质干扰, 在准确检测的基础上降低了成本及操作复杂性, 适用于花生类食品中 AFB₁ 的大批量、快速筛查分析。

2.5 实际样品检测

基于本研究所建立的量分析方法, 对花生、花生油、花生酱、花生奶等食品中的 AFB₁ 进行了采样分析检测, 其中, 花生样品共 31 份, 花生油、花生酱、花生奶样品各 5 份。结果表明, 所调研的花生制品 AFB₁ 污染较低, 仅 1 份花生油有检出。而相比于花生制品, 花生样品中 AFB₁ 的污染相对较严重, 有两份超过我国国家限量标准(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。花生在种植过程中受气候条件温暖潮湿等多因素影响, 易滋生黄曲霉毒素。而花生在加工过程中会经过原料筛选、加工处理等步骤, 可以有效降低花生制品中的 AFB₁ 污染残留^[29]。花生样品中 ¹³C₁₇-AFB₁ 及 AFB₁ 的总离子流图(total ion chromatogram, TIC)如图 3 所示。

2.6 花生及其制品中 AFB₁ 的生物可给性

基于 2.5 实际样品筛查情况, 选取 AFB₁ 污染花生(10~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 此外, 采用添加的方式分别制备 AFB₁ 污染的花生油、花生酱、花生奶(10~30 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 进行体外模拟消化实验。花生及其制品中 AFB₁ 在胃相和胃肠相的生物可给

性结果见图 4。在胃消化阶段, 花生、花生油、花生酱、花生奶中 AFB₁ 的平均生物可给性分别为 4.47%、4.35%、33.88%、17.16%, 在胃肠消化阶段分别为 12.81%、20.03%、79.78%、23.60%, 表明 AFB₁ 在消化的过程中可能被人体吸收, 从而造成食用安全隐患, 且胃肠消化阶段的生物可给部分显著高于胃消化阶段($P<0.05$)。AFB₁ 通过疏水相互作用、 π - π 共轭等方式与生物大分子如蛋白质、多糖等结合。在 pH=1.5 时, 胃蛋白酶通过水解蛋白质, 释放与蛋白质结合的 AFB₁, 随后 pH 升高, 胰液中的酶催化多糖、脂肪、蛋白质水解为单糖、脂肪酸、氨基酸, 进一步破坏生物大分子的结构, 导致 AFB₁ 的大量释放^[30-31]。因此, 胃肠消化后 AFB₁ 的生物可给性更高。由于花生类食品组成成分(蛋白质、脂肪等)不同, 导致 AFB₁ 的生物可给性存在较大差异, 可以推测, 花生类食品中的某些膳食成分可能在摄入后与溶解的 AFB₁ 相互作用, 进而调节其生物可给性。

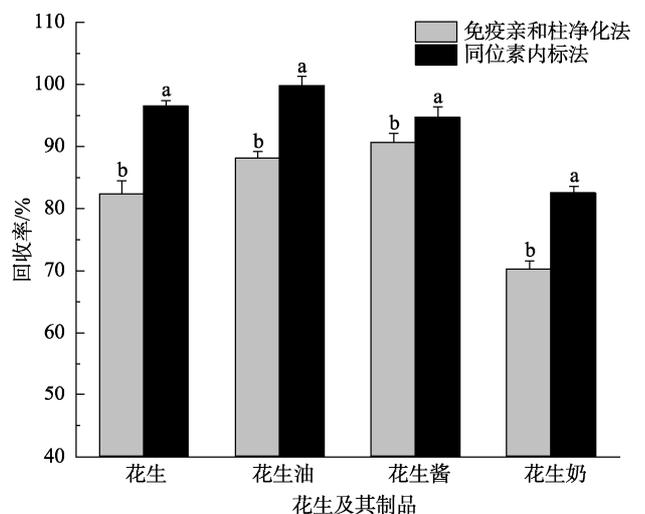


图 2 免疫亲和柱净化法及同位素内标法对花生及其制品中 AFB₁ 的回收率($n=6$)

Fig.2 Recoveries of AFB₁ in peanut and its products by immune affinity column purification method and internal standard method ($n=6$)

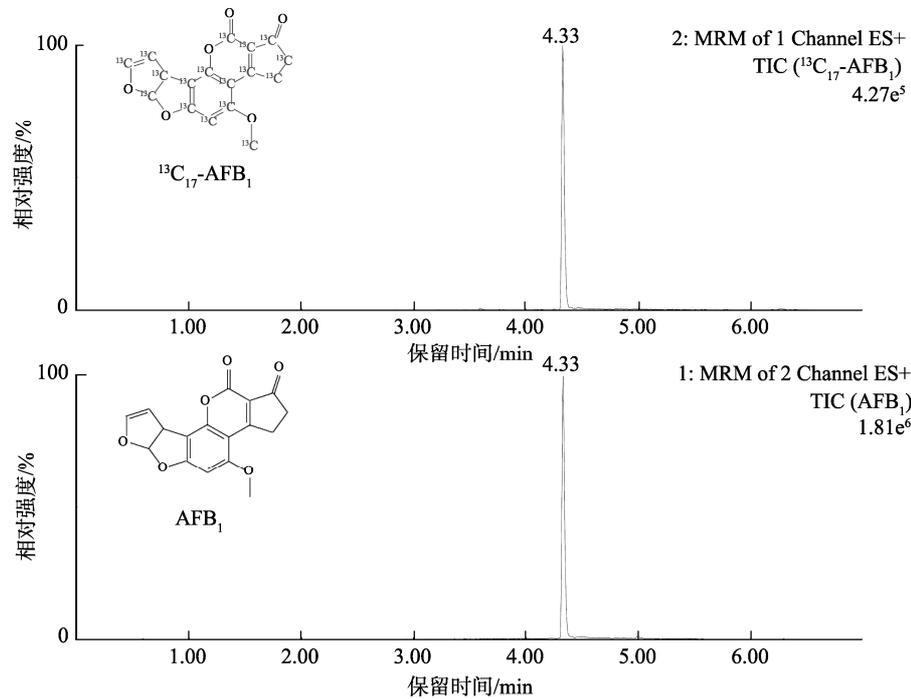


图3 花生样品中 $^{13}\text{C}_{17}$ -AFB₁(上)及AFB₁(下)的总离子流图

Fig.3 Total ion chromatograms of $^{13}\text{C}_{17}$ -AFB₁ (top) and AFB₁ (bottom) in peanut samples

目前,我国GB 2761—2017规定花生及其制品中AFB₁的限量均为20 μg/kg,相对于AFB₁的含量值,结合AFB₁对人体的可给性更能准确反映人体对食品中AFB₁的吸收及AFB₁对人体的毒性,此外,通过使用膳食成分来降低危害物对人体的健康风险被认为是一种有效策略^[32],关于食物成分是否会与可给部分的AFB₁结合,从而降低其在消化过程中的生物可给性及生物有效性,值得后续进一步研究。

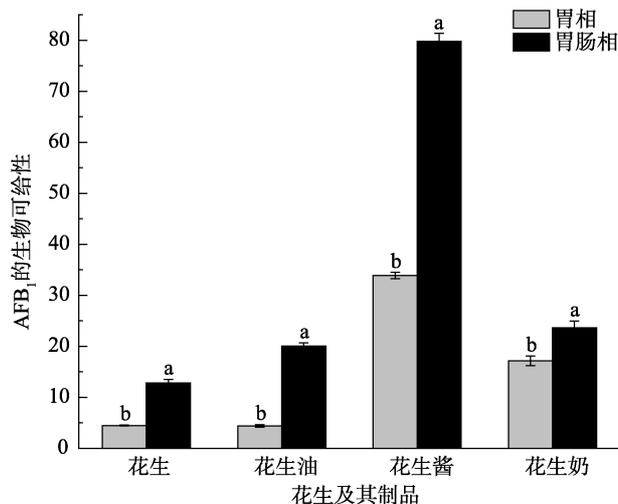


图4 花生及其制品中AFB₁在胃相和胃肠相的生物可给性(n=6)

Fig.4 Bioaccessibility of AFB₁ in peanut and its products in the gastric and the small intestinal phases (n=6)

3 结论

本研究建立了一种适用于花生及花生制品中痕量AFB₁检测的超高效液相色谱-串联质谱法。利用脂肪低温固化析出的特点,采用高速冷冻离心降低样品基质干扰,同时,结合稳定同位素内标校正基质效应,避免了传统的免疫亲和、固相萃取等净化方法对目标物的损失,简化了操作流程、降低了实验成本。该方法的检出限、定量限和回收率等各项性能符合相关检测标准的要求,可以满足对花生类食品中AFB₁的快速准确检测分析。在该定量方法的基础上,通过体外模拟胃肠道消化研究AFB₁的生物可给性,结果表明,不同花生类食品中AFB₁的生物可给性存在一定差异,其中,花生酱中AFB₁的生物可给性最高,因此,后续相关限量标准的制修订及降低AFB₁暴露风险的膳食建议可结合不同花生制品生物可给性、生物有效性的差异加以细化和完善。

参考文献

- [1] 张群. 花生肽制备关键技术研究[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(2): 224.
ZHANG Q. Research on the key technology of peanut peptide preparation [J]. J Food Sci Biotechnol, 2017, 36(2): 224.
- [2] GOURAMA H, BULLERMAN LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: Aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: A review [J]. J Food Protect, 1995, 58(12): 1395-1404.
- [3] HUSSEIN HS, BRASEL JM. Toxicity, metabolism, and impact of

- mycotoxins on humans and animals [J]. *Toxicology*, 2001, 167(2): 101–134.
- [4] KAZEMIAN-BAZKIAEE F, EBRAHIMI A, HOSSEINI SM, *et al.* Evaluating the protective effect of edible coatings on lipid oxidation, fatty acid composition, aflatoxins levels of roasted peanut kernels [J]. *J Food Meas Charact*, 2020, 14(1): 1025–1038.
- [5] 张宁, 李敏, 李培武, 等. 酶联免疫吸附法(ELISA)测定黄曲霉毒素 B₁ 的样品基质效应研究[J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(3): 404–408.
- ZHANG N, LI M, LI PW, *et al.* Effect of sample matrix on determination of aflatoxin B₁ by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2014, 36(3): 404–408.
- [6] FANG BL, XU SL, HUANG YJ, *et al.* Gold nanorods etching-based plasmonic immunoassay for qualitative and quantitative detection of aflatoxin M₁ in milk [J]. *Food Chem*, 2020, 329: 127160.
- [7] 徐洪文, 朱瑜, 徐华, 等. 高效液相色谱法测定食用植物油中 6 种真菌毒素[J]. *中国油脂*, 2020, 45(11): 77–83.
- XV HW, ZHU Y, XV H, *et al.* Detection of six mycotoxins in edible vegetable oil by high performance liquid chromatography [J]. *China Oils Fats*, 2020, 45(11): 77–83.
- [8] 李丽, 叶金, 辛媛媛, 等. 高效液相色谱法测定粮食及其制品中赭曲霉毒素 A 提取条件的优化[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(21): 5602–5607.
- LI L, YE J, XIN YY, *et al.* Optimization of extraction conditions for the determination of ochratoxin A in grain and its products by different extraction methods [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(21): 5602–5607.
- [9] 邵亮亮, 黄珊, 邢嘉琪, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定小麦中的 4 种限量真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(2): 505–513.
- SHAO LL, HUANG S, XING JQ, *et al.* Simultaneous determination of 4 limited mycotoxins in wheat by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(2): 505–513.
- [10] JIANG KQ, HUANG QW, FAN K, *et al.* Reduced graphene oxide and gold nanoparticle composite-based solid-phase extraction coupled with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 9 mycotoxins in milk [J]. *Food Chem*, 2018, 264: 218–225.
- [11] KUNZ BM, WANKO F, KEMMLEIN S, *et al.* Development of a rapid multi-mycotoxin LC-MS/MS stable isotope dilution analysis for grain legumes and its application on 66 market samples [J]. *Food Control*, 2020, 109: 106949.
- [12] YU L, MA F, DING XX, *et al.* Silica/graphene oxide nanocomposites: Potential adsorbents for solid phase extraction of trace aflatoxins in cereal crops coupled with high performance liquid chromatography [J]. *Food Chem*, 2018, 245: 1018–1024.
- [13] 李丽, 吴宇, 王海波, 等. 全自动免疫亲和固相萃取超高效液相色谱法测定粮油中黄曲霉毒素[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(7): 157–164.
- LI L, WU Y, WANG HB, *et al.* High throughput method for analysis of aflatoxins in cereals and oils using automated immunoaffinity cleaning up and ultra-high performance liquid chromatography [J]. *J Chin Cere Oils Ass*, 2020, 35(7): 157–164.
- [14] QIAN MR, ZHANG H, WU LQ, *et al.* Simultaneous determination of zearalenone and its derivatives in edible vegetable oil by gel permeation chromatography and gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2015, 166: 23–28.
- [15] 吴基任, 潘望, 谭高好, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定花生及土榨花生油中 9 种真菌毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(10): 3927–3935.
- WU JR, PAN W, TAN GH, *et al.* Determination of 9 kinds of mycotoxins in peanuts and flavor peanut oil by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(10): 3927–3935.
- [16] 吴宇, 叶金, 李丽, 等. 免疫亲和柱全自动净化-超高效液相色谱-串联质谱-全碳标记内标法精确测定粮油中玉米赤霉烯酮[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 267–272.
- WU Y, YE J, LI L, *et al.* Fully ¹³C isotope labeled internal standard for the accurate quantification of zearalenone in cereals and oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometry after automated purification with immunoaffinity column [J]. *Food Sci*, 2020, 41(24): 267–272.
- [17] RUBY MV, SCHOOF R, BRATTIN W, *et al.* Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33(21): 3697–3705.
- [18] CHAI MW, LI RL, GONG Y, *et al.* Bioaccessibility-corrected health risk of heavy metal exposure via shellfish consumption in coastal region of China [J]. *Environ Pollut*, 2021, 273: 116529.
- [19] HU L, WANG XL, WU DS, *et al.* Effects of organic selenium on absorption and bioaccessibility of arsenic in radish under arsenic stress [J]. *Food Chem*, 2021, 344: 128614.
- [20] 耿紫琪, 王鹏飞, 付雅祺, 等. 稻米中铬的生物可给性及其对人体的健康风险评估[J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(6): 205–211.
- GENG ZQ, WANG PF, FU YQ, *et al.* Bioaccessibility of chromium in rice and its human health risk assessment [J]. *Asian J Ecotoxicol*, 2020, 15(6): 205–211.
- [21] LUO Y, DUAN ZB, WU YG. Risk assessment for oral bioaccessibility of Lead and Cadmium in the potato growing in smelter-impacted soil [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2021, 106(2): 363–369.
- [22] 王龔, 管乐, 韩紫怡, 等. 我国花生黄曲霉毒素污染影响因素分析[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(19): 7818–7825.
- WANG Y, GUAN Y, HAN ZY, *et al.* Analysis on the influencing factors of aflatoxin contamination in peanut in China [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(19): 7818–7825.
- [23] 许芳溢, 李五霞, 吕曼曼, 等. 苦荞芽粉馒头体外消化后抗氧化能力研究[J]. *中国粮油学报*, 2014, 29(12): 16–22.
- XV FY, LI WX, LV MM, *et al.* The effect of simulated digestion *in vitro* on antioxidant activity of tartary buckwheat sprouts enriched steamed bread [J]. *J Chin Cere Oils Ass*, 2014, 29(12): 16–22.
- [24] MARCHI I, VIETTE V, BADOUD F, *et al.* Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses [J]. *J*

- Chromatogr A, 2010, 1217(25): 4071–4078.
- [25] CAPPIELLO A, FAMIGLINI G, PALMA P, *et al.* Direct-EI in LC-MS: Towards a universal detector for small-molecule applications [J]. *Mass Spectrom Rev*, 2011, 30(6): 1242–1255.
- [26] WANG XP, LI PW. Rapid screening of mycotoxins in liquid milk and milk powder by automated size-exclusion SPE-UPLC-MS/MS and quantification of matrix effects over the whole chromatographic run [J]. *Food Chem*, 2015, 173: 897–904.
- [27] 吴宇, 叶金, 张冰, 等. 稳定同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定植物油中16种真菌毒素[J]. *分析化学*, 2018, 46(6): 975–984.
WU Y, YE J, ZHANG B, *et al.* A fast analytical approach for determination of 16 kinds of mycotoxins in vegetable oils using stable isotope dilution and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2018, 46(6): 975–984.
- [28] 谢刚, 叶金, 吴宇, 等. UPLC-Quadrupole/Orbitrap HRMS 同时测定玉米中多种真菌毒素和农药残留[J]. *中国粮油学报*, 2018, 33(3): 126–133.
XIE G, YE J, WU Y, *et al.* Fast determination of mycotoxins and pesticide residues in maize by UPLC-Quadrupole /Orbitrap HRMS [J]. *J Chin Cere Oils Ass*, 2018, 33(3): 126–133.
- [29] 刘玉兰, 陈金定, 裴娅晓, 等. 碱炼法脱除玉米油中黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. *中国油脂*, 2016, 41(6): 48–51.
LIU YL, CHEN JD, PEI YX, *et al.* Removal of AFB₁ from maize oil by alkali refining [J]. *China Oils Fats*, 2016, 41(6): 48–51.
- [30] JI JM, XIE WL. Detoxification of aflatoxin B₁ by magnetic graphene composite adsorbents from contaminated oils [J]. *J Hazard Mater*, 2020, 381: 120915.
- [31] MA F, CAI XF, MAO J, *et al.* Adsorptive removal of aflatoxin B₁ from vegetable oils via novel adsorbents derived from a metal-organic framework [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 412: 125170.
- [32] CLEMENTE MJ, CIMBALO A, CHIOCCETTI G, *et al.* Dietary compounds to reduce *in vivo* inorganic arsenic bioavailability [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(32): 9032–9038.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

作者简介



王韶颖, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: 15582365599@163.com



李彭, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境污染与食品安全。

E-mail: lipengim@126.com