

# 低温法检测菜籽油黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的研究

姜学涯, 高荣航, 梁景文, 苑婷婷

(深圳凯吉星农产品检测认证有限公司, 广东 深圳 518000)

**摘要:**按照 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》第二法检测菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 时存在杂峰较多、无法准确定性及定量等问题, 本法在 GB 5009.22—2016 第二法的基础上优化了萃取溶剂, 并通过降低萃取溶剂温度来降低菜籽油中杂质溶解度的方法, 达到了理想的净化效果。在样品中加入已放入 4℃ 冰箱冷藏 30 min 的甲醇-乙腈(体积比 70:30), 振荡后取上清液氮吹至近干并衍生, 衍生液氮吹至近干后利用初始流动相溶解并注入高效液相色谱仪检测。采用 Waters XBridge BEH C18 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm), 以蒸馏水和乙腈为流动相进行梯度洗脱, 在流速 0.8 mL/min、柱温 40℃、进样量 10 μL 条件下, 进行定性和定量分析。结果表明: 方法线性范围为 0.1~4.0 ng/mL, 定量限为 0.1 μg/kg, 回收率为 78.0%~90.4%, 相对标准偏差为 1.61%~4.15%。与国标方法相比, 本方法可有效去除菜籽油中杂质, 能准确地进行定性和定量, 回收率和准确度均较好, 可应用于菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的日常检测。

**关键词:**菜籽油; 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>; 低温; 检测; 高效液相色谱

中图分类号: TS225.1; TS201.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-7969(2020)01-0047-04

## Determination of aflatoxin B<sub>1</sub> in rapeseed oil by low temperature method

JIANG Xueya, GAO Ronghang, LIANG Jingwen, YUAN Tingting

(Shenzhen Kaijixing Food Quality Testing Techcenter Co., Ltd., Shenzhen 518000, Guangdong, China)

**Abstract:** According to the GB 5009.22—2016 *National Food Safety Standard for the Determination of Aflatoxin B and G in Foods*, the second method for detecting aflatoxin B<sub>1</sub> in rapeseed oil has many problems in getting miscellaneous peaks, uncertainty and quantification. The method optimized the extraction reagent based on the second method of GB 5009.22—2016, and reduced the solubility of the impurities in the rapeseed oil by reducing the temperature of the extractant to achieve an ideal purification effect. Methanol-acetonitrile (volume ratio 70:30) placed in a refrigerator at 4℃ for 30 min was added to the sample. After shaking, the supernate was blown to near dryness and then derivatized, and then dissolved with initial mobile phase and injected to high performance liquid chromatography for detection. A Waters XBridge BEH C18 column (4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm) was used with a gradient elution of distilled water and acetonitrile as the mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min, the column temperature was 40℃, and the injection volume was 10 μL for qualitative and quantitative analysis. Under the optimal conditions, the quantitative linear range, the limit of quantification, the recovery rate and the precision of the method were 0.1–4.0 ng/mL, 0.1 μg/kg, 78.0%–90.4% and 1.61%–4.15% respectively. Compared with the national standard, the method could effectively remove impurities from the rapeseed oil, accurately conduct qualitative and quantitative analysis, and had good recovery rate and accuracy, and could be applied to the daily detection of aflatoxin B<sub>1</sub> in rapeseed oil.

**Key words:** rapeseed oil; aflatoxin B<sub>1</sub>; low temperature; detection; HPLC

收稿日期: 2019-04-16; 修回日期: 2019-09-21

作者简介: 姜学涯(1986), 男, 工程师, 研究方向为食品检测 (E-mail) jiangxy@f-q-t.com。

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 作为世界公认的三大强致癌物质之一<sup>[1-2]</sup>, 一般以热带和亚热带等南方高温、高湿地区受污染最为严重<sup>[3]</sup>, 在食品中的检出率较

高<sup>[4-6]</sup>。因为黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 耐高温, 280 °C 才发生裂解, 因此一般烹调加工温度下难以破坏其结构, 降低其危害。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 毒性作用主要是对肝脏的损害<sup>[7-9]</sup>, 大量摄入时, 可发生急性中毒, 出现急性肝炎、出血性坏死、肝细胞脂肪变性和胆管增生。

为保障食品供应安全, 按照《国家食品安全监督抽检实施细则(2019 版)》的要求, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 是食用植物油常规检验项目, 结合 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中 4.1.1 的要求, 植物油(花生油、玉米油除外)中限量值为 10 μg/kg, 其推荐检测方法为 GB 5009.22—2016。按照 GB 5009.22—2016 第二法检测植物油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 时, 花生油、大豆油等多种植物油均能达到良好的去杂效果, 但是检测菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 时出现了除杂不干净, 从而导致色谱图中杂峰较多干扰目标峰定性及定量的情况<sup>[10-16]</sup>。考虑到菜籽油中杂质主要为大分子有机物, 本方法采取优化萃取溶剂并降低萃取溶剂温度的方式对前处理过程进行优化, 从而降低杂质在菜籽油中的溶解度, 达到良好的去杂效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

菜籽油、玉米油, 购于大型超市。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准储备液(2 μg/mL), 北京坛墨质检科技有限公司, 用甲醇稀释为 0.1 μg/mL 储备溶液。甲醇、乙腈、正己烷, 色谱纯, 美国 J. T. Baker 公司; 三氟乙酸, 分析纯。

LC-30A 高效液相色谱仪、SIL-20AC 自动进样器、CTO-20A 柱温箱, 日本岛津公司; Milli-Q 纯水仪, 美国 Millipore 公司; Multi Reax 振荡器, 德国 Heidolph 公司; Supelco 固相萃取仪; N-EVAP-45 氮吹仪, 美国 Organomation; HWS-26 水浴锅; MS3 旋涡混匀器, 德国 IKA。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 样品前处理

取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇-乙腈萃取溶剂(体积比 70:30, 此萃取溶剂用之前放在 4 °C 的冰箱中放置 30 min), 置于涡旋振荡器中振荡 20 min, 在 8 000 r/min 下离心 2 min, 取上清液。用移液管准确吸取 4.0 mL 上清液于 10 mL 离心管后, 在 45 °C 下用氮气吹至近干, 分别加入 200 μL 正己烷和 100 μL 三氟乙酸, 涡旋 30 s, 在(40 ± 1) °C 的恒温水浴中衍生 15 min, 衍生结束后, 在 45 °C 下用氮气将衍生液吹至近干, 用初始流

动相定容至 1.0 mL, 涡旋 30 s 溶解残留物, 过 0.22 μm 滤膜, 收集滤液于进样瓶中以备进样。

#### 1.2.2 标准工作溶液的配制

用甲醇作为溶剂, 将黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 配制成质量浓度分别为 0.1、0.4、1.0、2.0、4.0 ng/mL 的标准工作溶液。

#### 1.2.3 高效液相色谱(HPLC)条件

Waters XBridge BEH C18 色谱柱(4.6 mm × 100 mm, 2.5 μm); 流速 0.8 mL/min; 柱温 40 °C; 进样量 10 μL; 激发波长 360 nm, 发射波长 440 nm; 流动相 A 为蒸馏水, B 为乙腈, 梯度洗脱, 洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	蒸馏水/%	乙腈/%
0	76	24
6	65	35
8	54	46
13	76	24
15	76	24

## 2 结果与分析

### 2.1 加标菜籽油的 HPLC 谱图

取同一份空白基质菜籽油样品, 加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液, 使菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量为 1.0 ng/mL, 分别按照本方法(按 1.2.1 对样品进行前处理, 检测条件按照 1.2.3)及 GB 5009.22—2016 第二法检测菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 结果分别见图 1、图 2。

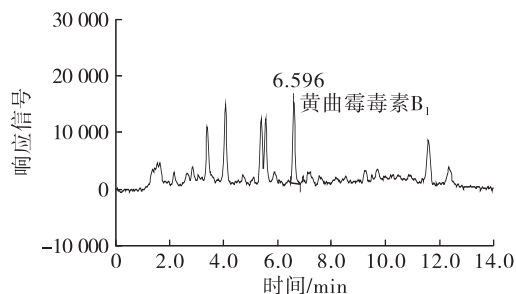


图 1 本方法检测的加标菜籽油的 HPLC 谱图

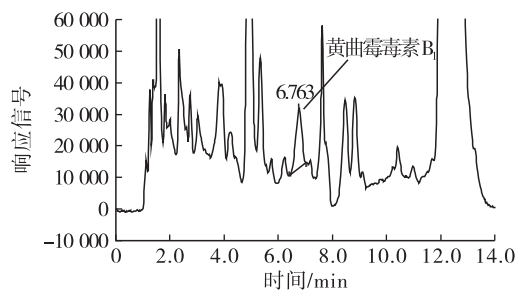


图 2 国标方法检测的加标菜籽油的 HPLC 谱图

从图 1 可以看出, 按照本方法检测菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 时, HPLC 谱图峰形尖锐, 峰型对称, 黄

曲霉毒素 B<sub>1</sub> 在 6.596 min 出峰,且有较好的分离效果,能准确性及定量。从图 2 可以看出,国标方法检测菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 时,HPLC 谱图峰形较宽,由于杂峰掩盖了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的目标峰,导致假峰的出峰时间为 6.763 min,无法准确性,且基线较高,导致无法准确定量。因此,按照 1.2.1 对菜籽油进行前处理,采用 HPLC 检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 时,能很好地检测菜籽油中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>。

## 2.2 样品前处理条件优化

### 2.2.1 萃取溶剂对回收率的影响

在空白菜籽油样品中分别添加 0.1、0.2、0.3 ng/mL 3 个水平的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,分别采用乙腈-水(体积比 84:16)、甲醇-水(体积比 70:30)、甲醇-乙腈(体积比 70:30)作为萃取溶剂,按照 1.2.1 前处理方法提取加标样品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,然后用 HPLC 测定,每个添加水平做两个平行。计算黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的平均回收率,结果见表 2。

表 2 萃取溶剂对回收率的影响

萃取溶剂	不同加标量的平均回收率/%		
	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL	0.3 ng/mL
乙腈-水(84:16)	70	70	71
甲醇-水(70:30)	52	53	56
甲醇-乙腈(70:30)	82	82	84

由表 2 可知,采用甲醇-乙腈(体积比 70:30)提取菜籽油加标样品时,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 回收率最高,提取效果最好。因此,选择甲醇-乙腈(体积比 70:30)作为萃取溶剂。

### 2.2.2 萃取溶剂温度对回收率的影响

在空白菜籽油样品中分别添加 0.1、0.2、0.3 ng/mL 3 个水平的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,萃取溶剂分别在常温、4℃、-18℃放置 30 min,按照 1.2.1 前处理方法提取加标样品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,然后采用 HPLC 测定,每个添加水平做 2 个平行。计算黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的平均回收率,结果见表 3。

表 3 萃取溶剂温度对回收率的影响

萃取溶剂 温度	不同加标量的平均回收率/%		
	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL	0.3 ng/mL
常温	66	69	71
4℃	77	78	82
-18℃	80	79	78

由表 3 可知,萃取溶剂温度为 4℃ 和 -18℃ 时,提取效果较好,且二者的回收率差别不大。考虑到检测成本,萃取溶剂温度建议为 4℃。

### 2.2.3 冷藏样品及冷藏萃取溶剂对回收率的影响

在空白菜籽油样品中分别添加 0.1、0.2、0.3 ng/mL 3 个水平的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,分别采用 4℃ 冷藏样品 30 min、4℃ 冷藏萃取溶剂 30 min 的方式,按 1.2.1 前处理方法提取加标样品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,采用 HPLC 测定,每个添加水平做两个平行。计算黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的平均回收率,结果见表 4。

表 4 冷藏样品及冷藏萃取溶剂对回收率的影响

项目	不同加标量的平均回收率/%		
	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL	0.3 ng/mL
4℃ 冷藏 样品	62	65	66
4℃ 冷藏 萃取溶剂	82	83	80

由表 4 可知,冷藏萃取溶剂较冷藏样品平均回收率更高,因此选择冷藏萃取溶剂。

### 2.2.4 萃取溶剂冷藏时间对回收率的影响

在空白菜籽油样品中分别添加 0.1、0.2、0.3 ng/mL 3 个水平的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,萃取溶剂分别 4℃ 冷藏 10、30、60、120 min,按照 1.2.1 前处理方法提取加标样品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,采用 HPLC 测定,每个添加水平做 2 个平行。计算黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的平均回收率,结果见表 5。

表 5 萃取溶剂冷藏时间对回收率的影响

冷藏时间/ min	不同加标量的平均回收率/%		
	0.1 ng/mL	0.2 ng/mL	0.3 ng/mL
10	75	78	82
30	80	84	86
60	65	62	63
120	45	46	47

由表 5 可知,萃取溶剂冷藏 30 min 时,回收率最高,提取效果最好。因此,选择 4℃ 冷藏萃取溶剂 30 min。

## 2.3 方法的定量限和线性范围

利用空白基质中加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液,按照 1.2.1 进行前处理,然后进行 HPLC 测试并绘制标准曲线,依据信噪比(S/N)大于 10 得出定量限为 0.1 μg/kg,符合 GB 5009.22—2016 中规定的定量限(方法定量限为 0.1 μg/kg)。本方法的线性方程为  $y = 731.01 - 18.112x$  ( $r = 0.9996$ ),线性范围为 0.1 ~ 4.0 ng/mL。

## 2.4 方法的回收率与精密度

空白菜籽油样品中分别添加 0.1、0.2、0.5 ng/mL 3 个水平的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,按照 1.2.1 前处

理方法提取加标样品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 然后用 HPLC 测定。计算黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的回收率和相对标准偏差 (RSD), 结果见表 6。

表 6 方法的回收率和精密度

加标量/ (ng/mL)	回收率/%						RSD/%
	1	2	3	4	5	6	
0.1	78.0	84.0	87.0	85.0	88.0	85.0	4.15
0.2	82.5	85.0	85.5	84.5	84.0	86.5	1.61
0.5	87.2	88.0	86.0	88.4	90.4	87.6	1.66

由表 6 可知:空白菜籽油中加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液,回收率在 78.0% ~ 90.4% 之间,说明该方法回收率良好;RSD 在 1.61% ~ 4.15% 之间,说明该方法精密度良好。

### 2.5 GB 5009.22—2016 第二法与本方法对比

选取一个空白菜籽油样品,加入黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液,按 GB 5009.22—2016 第二法与本方法(1.2.1 方法进行前处理后进行 HPLC 测定)测定并绘制标准曲线,依据信噪比大于 10 得出两个方法的定量限。称取 14 个空白菜籽油样品并分成两批,分别添加 0.15 ng/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 于两批样品中,按照 GB 5009.22—2016 第二法及本方法测定,计算两个方法的精密度。称取 4 个空白菜籽油样品并分成两批,添加 0.1 ng/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 于 2 个样品中,添加 0.2 ng/mL 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 于另外 2 个样品中,按照 GB 5009.22—2016 第二法及本方法测定,计算两个方法的回收率,结果见表 7。

表 7 两个方法的定量限、回收率及 RSD 对比

方法	定量限/ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	RSD/ %	不同加标量的回收率/%	
			0.1 ng/mL	0.2 ng/mL
本方法	0.1	1.95	85.4	88.6
国标方法	0.1	3.28	83.1	84.5

由表 7 可知,国标方法与本方法均可达到定量限 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的要求,精密度分别为 3.28% 和 1.95%,回收率分别为 83.1% ~ 84.5% 和 85.4% ~ 88.6%。本方法精密度与回收率稍优于国标方法,因此本方法稍优于 GB 5009.22—2016 第二法。

### 3 结论

菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 按照 GB 5009.22—2016 第二法检测时杂质较难去除,影响黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 定性及定量的准确性。本文研究确定以甲醇-乙腈(体积比 70:30)作为萃取溶剂,萃取溶剂在 4 $^{\circ}\text{C}$  预先放置 30 min,对菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的净化效果最好。本方法定量限为 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,线性范围 0.1 ~ 4.0 ng/mL,回收率为 78.0% ~ 90.4%,

相对标准偏差为 1.61% ~ 4.15%。本方法简单、快速,能准确地定性和定量菜籽油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>。

### 参考文献:

- [1] 张宸. 我国主要食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 调查与风险评估 [D]. 陕西 杨凌:西北农林科技大学, 2008.
- [2] 马健, 林清. 黄曲霉毒素及其致病机理简述 [J]. 中国牛业科学, 2012, 38(1): 43-45.
- [3] WU L, LI J, LI Y, et al. Aflatoxin B<sub>1</sub>, zearalenone and deoxynivalenol in feed ingredients and complete feed from different province in China [J]. J Animal Sci Biotechnol, 2016(7): 63 [2019-04-16]. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0122-8>.
- [4] 周子焱, 邢家溧, 应璐, 等. 食用植物油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 调查分析 [J]. 中国油脂, 2017, 42(12): 66-69.
- [5] 殷国英, 刘思超, 廖灵灵. 植物油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的污染状况调查分析 [J]. 预防医学情报杂志, 2017, 33(6): 593-596.
- [6] 游杰, 岳亚军, 夏伟, 等. 深圳市罗湖区居民食用油黄曲霉毒素风险评估 [J]. 现代预防医学, 2014, 41(20): 3688-3689, 3707.
- [7] 师文文, 姜凯, 徐庆强, 等. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 致肝脏损伤作用机制的研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5832-5836.
- [8] 徐明辉, 秦雪. 黄曲霉毒素致肝癌机制研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(6): 574-578.
- [9] 吴丹. 黄曲霉毒素在粮食和食品中的危害及防治 [J]. 粮食加工, 2007(3): 91-94.
- [10] 田尔诺, 杜馨, 蔡俊. 有机溶剂萃取-高效液相色谱法检测玉米浆中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> [J]. 食品工业科技, 2018, 39(23): 267-271.
- [11] 侯磊磊, 柴梅梅, 米林锋, 等. 高效液相色谱-柱后光化学衍生法测定油茶中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的方法研究 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2631-2635.
- [12] 陈瑞莲. 高效液相色谱-柱前衍生法测定食用油中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 的方法研究 [J]. 现代食品, 2019(1): 110-113.
- [13] 张文玲, 袁涛, 李书国. 近 10 年粮油食品中黄曲霉毒素检测技术的研究进展 [J]. 粮食加工, 2012, 37(1): 77-81.
- [14] 彭西甜, 童园, 夏虹, 等. 固相萃取-高效液相色谱荧光法快速检测食用油中的黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> [J]. 分析仪器, 2016(S1): 32-36.
- [15] 徐飞, 刘峰, 高贵桃, 等. 超快速液相色谱-串联质谱法测定粮食及食用油中的黄曲霉毒素 [J]. 粮食与油脂, 2015, 28(3): 66-68.
- [16] 张惠贤, 童园, 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 B<sub>1</sub> [J]. 分析科学学报, 2018, 34(5): 669-672.