

多功能净化柱 - 光化学衍生高效液相色谱法测定 成品植物油和花生原油中黄曲霉毒素 B₁

姜德铭¹, 刘晓萌¹, 邹球龙¹, 印 铁¹, 张晓琳¹, 张 刚², 刘配莲²

(1. 中粮营养健康研究院有限公司, 北京 102209; 2. 费县中粮油脂工业有限公司, 山东 临沂 273400)

摘要:为了快速、准确测定成品植物油和花生原油中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 的含量, 建立了采用多功能净化柱对油样进行前处理, 再结合光化学衍生高效液相色谱法测定植物油中 AFB₁ 含量的方法, 对前处理提取剂、高效液相色谱法的分析条件 (色谱柱、进样量) 进行优化, 再通过与国标中免疫亲和柱法进行比较, 对所建立的方法进行评价。结果表明: 优化的条件为以乙腈 - 水溶液 (84 + 16) 为提取剂, 采用 Zorbax Eclipse XDB - C18 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 进样量 10 μL; 建立的方法加标回收率和精密度良好, 定量限为 0.2 μg/kg, 低于 GB 2761—2017 规定的最低限量值要求, 可满足企业生产的监测需求; 将建立的方法用于测定浅色植物油中 AFB₁ 时, 检测结果与免疫亲和柱法相比相对误差为 0 ~ 18.0%, 符合国标要求, 但对于深色植物油测定的相对误差超出国标要求。综上, 建立的方法可用于快速、准确检测花生油 (成品油和原油) 及成品玉米油、亚麻籽油、葵花籽油、浅黄色菜籽油、黄色芝麻油中 AFB₁ 的含量。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 多功能净化柱; 植物油; 高效液相色谱

中图分类号: TS207.3; R155.5 + 1 文献标识码: A 文章编号: 1003 - 7969 (2023) 03 - 0102 - 04

Determination of aflatoxin B₁ in finished vegetable oil and crude peanut oil by multifunctional clean - up column - photochemical derivatization and high performance liquid chromatography

JIANG Deming¹, LIU Xiaomeng¹, ZOU Qiulong¹, YIN Tie¹,
ZHANG Xiaolin¹, ZHANG Gang², LIU Peilian²

(1. COFCO Nutrition & Health Research Institute, Beijing 102209, China;

2. COFCO Oil and Grains Industry (Feixian) Co., Ltd., Linyi 273400, Shandong, China)

Abstract: To determine aflatoxin B₁ (AFB₁) in finished vegetable oil and crude peanut oil quickly and accurately, a method was developed for the determination of AFB₁ content in vegetable oil using a multifunctional clean - up column for the pretreatment of oil samples combined with photochemical derivatization and high performance liquid chromatography (HPLC). The pretreatment extractant and the HPLC analysis conditions (chromatographic column and injection volume) were optimized, and the method was evaluated by comparing with the national standard of immune - affinity column. The results showed that the optimal conditions were with acetonitrile - water solution (84 + 16) as the extractant, Zorbax Eclipse XDB - C18 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) chromatographic column and injection volume

10 μL. The established method had good spiked recovery and precision, and the quantitation limit was 0.2 μg/kg, lower than the minimum limit specified in GB 2761 - 2017, which could meet the requirements of actual production. When the established method was used for the determination of AFB₁ in light - colored vegetable oils, the

收稿日期: 2021 - 12 - 10; 修回日期: 2022 - 10 - 27

基金项目: “十三五”国家重点研发计划项目 (2017YFC1600600)

作者简介: 姜德铭 (1981), 男, 高级工程师, 研究方向为真菌毒素检测及脱除 (E-mail) jiangdeming@cofco.com。

通信作者: 张晓琳, 研究员, 博士 (E-mail) zhangxiaolin1@cofco.com。

relative error of the detection results compared with the immune - affinity column method was 0 - 18.0% , which was in accordance with the national standard , but the relative error for the determination of dark - colored vegetable oils exceeded the national standard. In summary , the method can detect AFB₁ content in light vegetable oil such as peanut oil (finished oil and crude oil) and finished corn oil , flaxseed oil , sunflower seed oil , light yellow rapeseed oil and yellow sesame oil quickly and accurately.

Key words: aflatoxin B₁; multifunctional clean - up column; vegetable oil; high performance liquid chromatography

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT),主要是由黄曲霉、寄生曲霉、特异曲霉和假溜曲霉等产毒菌株产生的次生代谢产物,是自然界中已发现的理化性质最稳定的一类霉菌毒素。AFT对人类和动物均具有极强的致癌、致畸形和致突变作用^[1],1993年被世界卫生组织(WHO)的国际癌症研究机构(IARC)划定为I类致癌物^[2]。已知的AFT有20多种,其中黄曲霉毒素B₁(AFB₁)最为常见,污染水平最高,且毒性最大,其毒性为氰化钾的10倍、砒霜的68倍^[3]。目前多个国家和地区针对AFT制定了限量要求,如美国规定所有食品中除了牛奶外AFT总量(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂之和)不得超过20.0 μg/kg,日本规定所有食品中AFB₁不得超过10.0 μg/kg,澳大利亚和新西兰规定花生及树生坚果中AFT总量不得超过15.0 μg/kg^[1]。在我国,GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》对AFB₁也有明确的限量要求,如花生及其制品、花生油、玉米油中AFB₁的限量值为20 μg/kg^[4]。

目前检测AFT的方法主要为薄层层析(TLC)法^[2]、酶标(ELISA)法^[5]、胶体金(GICA)法^[6]、高效液相色谱(HPLC)法^[5]、超高压液相色谱(UPLC)法^[5]以及超高压液相色谱串联质谱法^[5]等,其中:TLC法因前处理烦琐且净化效果欠佳已很少使用;ELISA法和GICA法因检测时间短,是生产企业常用的检测方法,但这两种方法都属于快速筛查法,均存在检测结果假阳性的问题,GICA法还同时存在假阴性的问题;HPLC法具有准确度高、结果可靠的优点,是目前检验机构检测AFT的主要方法;UPLC法和超高压液相色谱串联质谱法由于购买设备投入大,相对于HPLC法使用较少。通过HPLC法检测AFT,需要对样品进行前处理净化,现行国标中净化方式主要有免疫亲和柱(IAC)法和固相萃取(SPE)柱法,这两种方法在操作上均需要经过上柱、淋洗、洗脱、吹干、复溶等步骤,处理烦琐。为了快速、准确测定成品植物油和花生原油中AFB₁含量,本文建立

了一种利用多功能净化柱净化样品提取液,通过光化学衍生,利用配备荧光检测器的高效液相色谱测定成品植物油和花生原油中AFB₁的检测方法。与快速筛查方法(ELISA法和GICA法)相比,具有准确性更高的特点,与国标中IAC法和SPE柱法相比又具有检测时限短、前处理简单的特点,可用于生产企业对成品植物油及花生原油中AFB₁的日常检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 原料与试剂

花生原油及成品花生油,某客户提供;大豆油、玉米油、亚麻籽油、葵花籽油、菜籽油(浅黄色)、菜籽油(褐色)、芝麻油(黄色)、芝麻油(红褐色),均从京东商城购买。为了使样品呈阳性并具有较高的测试值,取上述部分油样添加AFB₁标品混匀后放置2个月以上。

AFB₁标准溶液(溶剂为乙腈),质量浓度(100.3 ± 1.4) μg/mL,青岛普瑞邦生物工程有限公司;乙腈、甲醇,色谱纯,上海安谱公司。

1.1.2 仪器与设备

LC-20A高效液相色谱仪(配RF-20A荧光检测器),日本岛津公司;Zorbax Eclipse XDB-C18色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),美国Agilent公司;光化学衍生器(Romer Derivatization Unit)、Mycosep® 226 AflaZON+多功能净化柱,美国Romer Labs公司;微孔过滤膜(13 mm, 0.22 μm, PTFE),北京迪科马科技有限公司;KQ-500TDE高频数控超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Centrifuge 5810R离心机,德国Eppendorf公司;DLAB MX-S涡旋混合器,北京大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。

1.2 试验方法

1.2.1 液相色谱条件

流动相A相为水,B相为甲醇-乙腈(50+50);等度洗脱,洗脱条件为A相34%、B相66%,流

速 1.0 mL/min;柱温 40℃;进样量 10 μL;荧光检测器的发射波长 440 nm,激发波长 360 nm;单次运行时间 16 min。

1.2.2 标准曲线的绘制

对 AFB₁ 标准溶液用乙腈-水溶液(84+16)进行稀释,配制成质量浓度分别为 0.01、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 ng/mL AFB₁ 标准工作溶液。将 AFB₁ 标准工作溶液依照质量浓度由小到大的顺序上机测定峰面积,对峰面积(Y)和 AFB₁ 标准工作溶液质量浓度(X)通过最小二乘法进行线性拟合,得到的标准曲线方程为 $Y=21\,413.7X-2\,893.85$ ($R=0.999\,9$)。

1.2.3 样品前处理

称取 5 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 乙腈-水溶液(84+16),涡旋混匀,置于超声波清洗器中超声 30 min,在 10 000 r/min 下离心 5 min,取上清液备用。取适量上清液至多功能净化柱配套玻璃管中,匀速、缓慢推动净化柱使净化管中净化液体积大于 5 mL。

1.2.4 样品测定

移取适量 1.2.3 中净化液至高效液相色谱样品瓶,按 1.2.1 条件测定,带入标准曲线方程中计算样品中 AFB₁ 质量浓度。

1.2.5 加标回收试验

根据 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中对油脂及其制品中 AFB₁ 的规定:植物油脂(花生油、玉米油除外)限量为 10 μg/kg,花生油、玉米油限量为 20 μg/kg。试验设计了 3 水平的加标试验。具体为:向阴性植物油中添加适量的 AFB₁ 标准溶液,配制成 AFB₁ 污染水平分别为 10、20 μg/kg 和 40 μg/kg 的测试样品,然后按 1.2.3 方法进行前处理,按 1.2.4 方法测定加标样品中 AFB₁ 质量浓度,从而得到加标样品中 AFB₁ 含量,并计算加标回收率。

1.2.6 方法的适用性评价

为了验证方法对基质的适应性,在不同植物油样品中添加 AFB₁ 标准溶液,分别采用本方法和 GB 5009.22—2016 第三法免疫亲和柱净化光化学衍生的方法测定 AFB₁ 含量。按照公式(1)计算相对误差(r),以 GB 5009.22—2016 第三法规定的允许差 20% 为参考值,当 $r \leq 20\%$ 时则方法适用于该基质,否则视为不适用。

$$r = \frac{|X_1 - X|}{X} \times 100\% \quad (1)$$

式中: X_1 为本方法的测定值; X 为国标方法的

测定值。

2 结果与分析

2.1 提取剂的选择

目前常见的 AFT 的提取剂主要有甲醇-水溶液(70+30)、甲醇-水溶液(80+20)、乙腈-水溶液(80+20)和乙腈-水溶液(84+16)4种。试验发现,有机相比例的提高可以促进提取液中杂质的沉降,使提取液更澄清,杂质减少,但过多的有机相会导致检测成本增加,同时不利于环境保护,根据净化柱的使用说明书,确定选用乙腈-水溶液(84+16)作为样品提取剂。

2.2 色谱柱的筛选

Zorbax SB-Aq(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)和 Zorbax Eclipse XDB-C18(4.6 mm × 150 mm, 5 μm)是常见的测定 AFT 时所使用的色谱柱,这两款色谱柱都可以使 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 4 种 AFT 分离,得到峰形对称、尖锐且基线分离的色谱图,但用 Zorbax SB-Aq 测定时,流动相流速为 2.0 mL/min,而 Zorbax Eclipse XDB-C18 为 1.0 mL/min 即可,且后者在测定 4 种 AFT 时流动相使用量更少,测定时间更短且废液排放更少,因此本方法选择 Zorbax Eclipse XDB-C18 作为测定用色谱柱。

2.3 进样量的选择

由于上机样液的溶剂与流动相不一致,较大的进样量会使溶剂效应更为明显,表现为色谱峰的异常。因此,本文比较了 10、20、30、40、50 μL 5 种不同进样量对色谱峰的影响,结果见图 1。由图 1 可看出,进样量为 10 μL 时色谱峰左右对称,峰形尖锐,故本方法选择样品进样量为 10 μL。

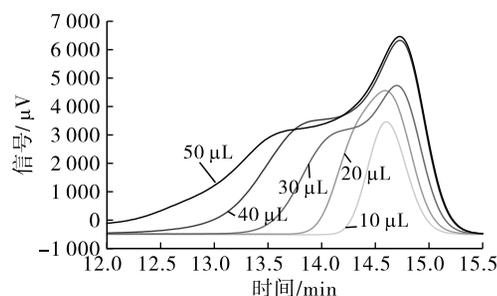


图 1 不同进样量对应的色谱图

2.4 方法的定量限

向阴性的大豆油中添加适量 AFB₁,按 1.2.3 方法进行前处理并上机测定,以 10 倍信噪比计算方法的定量限,得到本方法的定量限为 0.2 μg/kg,略高于 GB 5009.22—2016 第三法 0.1 μg/kg 的定量限,但低于 GB 2761—2017 中对于食品中 AFB₁ 的限量值最低值 5 μg/kg,故此方法可满足植物油生产过程

中对 AFB₁ 的监测需求。

2.5 加标回收率和精密度

3 水平加标回收试验测定结果如表 1 所示。由表 1 可看出,加标回收率范围为 98.6% ~ 107.8%,平行样相对误差为 3.6% ~ 4.9%,符合 GB 5009.22—2016 中精密度要求——在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

表 1 加标试验测定结果

加标水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	测定值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/ %	平均回收率/ %	相对误差/ %
10	10.78	107.8	105.2	4.9
	10.26	102.6		
20	21.19	106.0	104.2	3.6
	20.44	102.2		
40	40.96	102.4	100.5	3.8
	39.42	98.6		

2.6 方法的适用性

按 1.2.6 方法进行方法的适用性评价,结果见表 2。

表 2 不同基质中两种方法的测定结果比较

基质	$X/(\mu\text{g}/\text{kg})$	$X_1/(\mu\text{g}/\text{kg})$	$r/\%$	评价结果
花生油	5.38	5.05	6.1	适用
	13.70	14.45	5.5	
	21.33	20.75	2.7	
玉米油	4.55	5.13	12.7	适用
	10.71	12.02	12.2	
	18.82	20.16	7.1	
亚麻籽油	5.17	5.02	2.9	适用
	10.94	10.74	1.8	
	21.04	20.82	1.0	
葵花籽油	4.81	5.04	4.8	适用
	10.54	10.89	3.3	
	20.07	20.48	2.0	
花生原油	12.36	14.58	18.0	适用
	29.71	34.72	16.9	
	41.41	44.82	8.2	
菜籽油 (浅黄色)	5.13	5.29	3.1	适用
	10.18	10.37	1.9	
	20.16	20.58	2.1	
芝麻油(黄色)	4.45	4.45	0	适用
	9.75	9.50	2.6	
菜籽油(褐色)	19.98	19.07	4.6	不适用
	12.62	15.44	22.3	
芝麻油(红褐色)	10.82	31.83	194.2	不适用

由表 2 可以看出,本方法适用于花生油、玉米

油、亚麻籽油、葵花籽油以及花生原油中 AFB₁ 的测定,对于菜籽油和芝麻油,浅色的适用,深色的测定偏差较大。本研究中采用的多功能净化柱是一种特殊的固相萃取柱,其吸附剂主要由极性、非极性 & 离子交换等基团组成,包括硅酸镁盐、硫酸钠、硫酸铝等,能够吸附样品中的脂类、蛋白质、糖类等各类杂质,而待测组分 AFT 不被吸附直接通过^[7]。不同等级的植物油色泽不同,所含显色物质也不同,到底是何种物质或因素导致多功能净化柱净化后测定深色菜籽油和芝麻油的结果发生较大偏差,目前尚无相关研究和报道,有待于进一步研究。

3 结论

油脂中 AFB₁ 经乙腈 - 水溶液 (84 + 16) 提取后,直接使用多功能净化柱净化,由于不再需要经过上柱、淋洗、洗脱、吹干以及复溶等操作,极大地缩短了检测时间,也减少了试剂的使用。再采用 Zorbax Eclipse XDB - C18 色谱柱,在进样量 10 μL 条件下进行高效液相色谱分离,能够获得很好的分离效果。方法定量限为 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,低于 GB 2761—2017 中对于食品中 AFB₁ 的最低限量值 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$),可满足植物油生产过程中对 AFB₁ 的监测需求。用所建立的方法测定花生油 (成品油和原油) 及成品玉米油、亚麻籽油、葵花籽油、浅黄色菜籽油、黄色芝麻油中 AFB₁ 含量时,测定结果与现行国标中免疫亲和柱法相比,相对误差为 0 ~ 18.0%,小于国标中相对误差不超过 20% 的要求,因此该方法适用于上述油品中 AFB₁ 的检测。另外,所建立的方法对深色油品的测定偏差较大,其原因有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 张艺兵,鲍蕾,褚庆华.农产品中真菌毒素的检测分析[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 吴永宁.食品中真菌毒素检测方法标准操作程序[M].北京:中国标准出版社,2018.
- [3] 杜政,唐瑞明.食品中真菌毒素标准、法规与检验[M].长沙:湖南科学技术出版社,2013.
- [4] 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2017[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [5] 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定:GB 5009.22—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [6] 粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁ 测定 胶体金快速定量法:LS/T 6111—2015[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [7] 鲍蕾,刘心同,张艺兵,等.多功能净化高效液相色谱法检测花生中的黄曲霉毒素[J].检验检疫科学,2005(5): 23 - 25.