

柱后碘衍生法测定食用油中黄曲霉毒素 B1 的含量

LC-127

摘要: 本文使用岛津 LC-20A 柱后衍生系统, 建立了柱后碘衍生法测定食用油中黄曲霉毒素 B1 含量的方法。本方法采用 C18 柱进行分离, 碘溶液柱后衍生, 荧光检测器进行检测。黄曲霉毒素 B1 在 0.4~51.2 ng/mL 的浓度范围内具有良好的线性相关性, 相关系数为 0.9998。对黄曲霉毒素 B1 浓度 0.4 ng/mL、2 ng/mL、20 ng/mL 的标准品进行六次平行分析, 重复性结果 (RSD % 表示): 黄曲霉毒素 B1 在三个不同浓度下的保留时间 RSD % 范围为 0.04 %~0.42 %, 峰面积 RSD % 范围为 1.22%~2.63 %, 仪器精密度高。实际样品加标浓度 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率范围为 85.8 %~106.2 %, 方法检出限为 0.045 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限为 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 结果表明方法灵敏度高。

关键词: 食用油黄曲霉毒素 B1 柱后碘衍生荧光检测

黄曲霉毒素 (AF) 是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物, 具有极强的毒性和致癌性, 可引发动物的肝癌、肾癌、胃癌等, 其中以黄曲霉毒素 B1 最为多见, 其毒性和致癌性也最强。目前生产食用油的不合格企业多为小规模的小工厂, 均采用半精炼工艺, 生产量较小, 主要以散装形式零售供应附近居民。造成不合格的原因, 主要是这些企业没有严格按照规定进行原料进货把关, 食品安全主体责任不落实。花生在生长、储存过程中由于天气湿热发霉, 黄曲霉菌生长繁殖产生黄曲霉毒素。一些企业对购进的花生原料没有严格筛选和检测, 部分霉变花生

被用于食用油生产, 导致黄曲霉毒素超标。由于黄曲霉毒素在水溶液中会发生荧光猝灭, 反相色谱中 B1 和 G1 两种异构体荧光强度很弱, 需进行衍生化。

本文结合国家标准 GB/T 18979-2003《食品中黄曲霉毒素的测定 - 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法》, 采用免疫亲和柱进行净化样品, 建立一种柱后碘衍生法测定花生油中黄曲霉毒素 B1 的分析方法, 该方法具有灵敏度高, 适合食用油中黄曲霉毒素 B1 含量的日常检测。

实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂:

甲醇, HPLC 级别; 乙腈, HPLC 级别; 苯, HPLC 级别; 纯水, Millipore 纯水制得。

黄曲霉毒素 B1 储备液 1.02 mg/L, Supelco 公司; Alfatest 免疫亲和柱, Vicam 公司;

1.1.2 仪器:

岛津 LC-20A 柱后衍生系统: 包括 CBM-20A (系统控制器), LC-20AT \times 3 (高压输液泵和衍生泵), SIL-20A (自动进样器), CRB-6A (化学反应箱), CTO-10ASvp (柱温箱), DGU-20A5 (在线脱气机), RF-20A (荧光检测器), 碘衍生柱后反应管套件 (包括三通接头, 衍生管 PTFE 0.5 mm I.D. \times 1500 cm L.), LabSolutions Version 5.42 SP4 色谱工作站;

1.2 分析条件

流动相: A- 水, B- 甲醇, A/B=53/47 (v/v);

流速: 1.0 mL/min;

色谱柱: Inertsil ODS - 3 (4.6 \times 150 mm, 5 μm);

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;

衍生溶液: 0.05% 碘溶液 (取 0.5 g 碘单质, 加入 100 mL 甲醇, 用纯水稀释至 1000 mL);

衍生流速: 0.3 mL/min;

衍生温度: 70 $^{\circ}\text{C}$;

检测波长: $E_x=350\text{ nm}$, $E_m=450\text{ nm}$;

进样体积: 20 μL

1.3 样品处理

1.3.1 黄曲霉毒素 B1 标准溶液的配制

取不同体积的黄曲霉毒素 B1 储备液, 用乙腈和苯 (v/v, 2:98) 稀释, 配制成浓度为 0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.8、25.6 及 51.2 ng/mL 的标准系列溶液, 储存于棕色小瓶中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放。

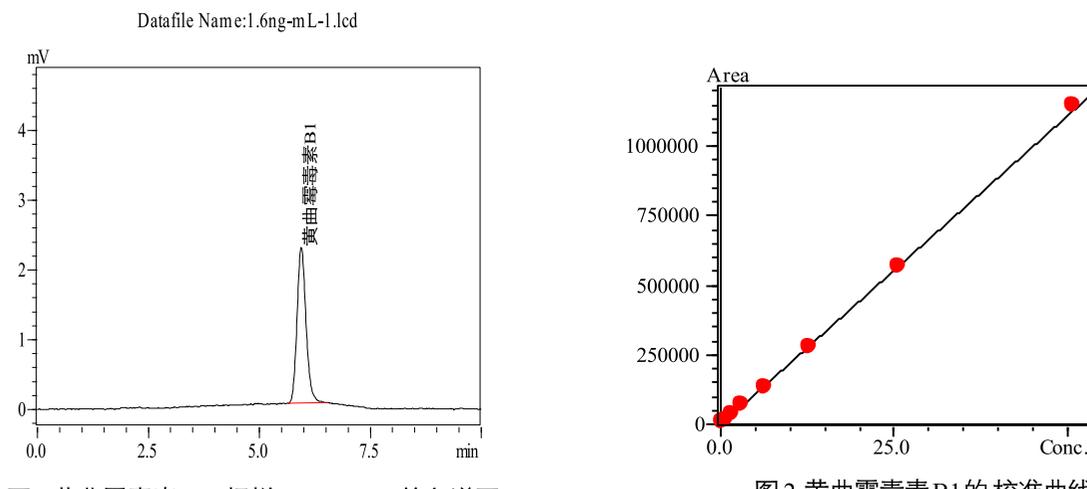
1.3.2 试样的制备

参考国家标准 GB/T 18979-2003《食品中黄曲霉毒素的测定 - 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法》中植物油样品前处理净化方法进行。

结果讨论

2.1 黄曲霉毒素 B1 标准谱图及标准曲线

黄曲霉毒素 B1 标样色谱图如图 1 所示，由图 2 可以看出在 0.4~51.2 ng/mL 的浓度范围内，黄曲霉毒素 B1 线性相关性良好，相关系数为 0.9998，线性方程为 $Y = (22249.9)X + (-2335.31)$ ，加权准确度范围在 95.1%~115.5%。



2.2 精密度实验

为了进一步考察仪器的重复性，本文分别对黄曲霉毒素 B1 浓度为 0.4、2、20 ng/mL 标准样品进行了六次重复实验，重复性结果用 RSD % 表示。实验结果表明黄曲霉毒素 B1 在不同浓度下保留时间 RSD % 范围为 0.04 %~0.42 %，峰面积 RSD % 范围为 1.22 %~2.63 %，实验结果如表 1 所示。

表 1 黄曲霉毒素 B1 在不同浓度下保留时间和峰面积的重复性

NO.	0.4 ng/mL		2 ng/mL		20 ng/mL	
	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	5.946	7,947	5.975	41,341	5.939	391,281
2	5.946	7,425	5.975	41,543	5.934	399,942
3	6.003	7,620	5.972	40,903	5.934	400,410
4	5.985	7,440	5.978	40,781	5.933	396,590
5	5.991	7,449	6.026	39,032	5.932	395,556
6	5.994	7,547	5.971	41,170	5.934	405,420
RSD (%)	0.42	2.63	0.36	2.22	0.04	1.22

2.3 基质加标实验

按照 1.3.2 所述步骤处理花生油，检测某品牌花生油中的黄曲霉毒素 B1 含量。图 3 为某品牌花生油样品空白色谱图，可以看出该样品并未检出黄曲霉毒素 B1；图 4 为空白样品加标 2 μg/kg 的色谱图，基质并未干扰到目标峰，目标物具有较好的信号响应。实际样品加标不同浓度标样计算样品回收率结果见表 2。由三倍信噪比和十倍信噪比分别计算方法检出限和定量限，检出限为 0.045 μg/kg，定量限为 0.15 μg/kg。

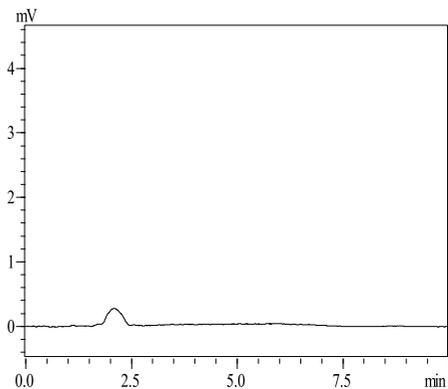


图3 空白样品色谱图

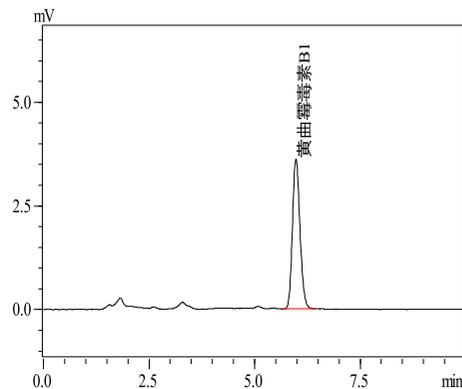


图4 空白样品加标 2 µg/kg 色谱图

表2 实际样品加标不同浓度回收率结果 (n=3)

样品编号	检出浓度	回收率 (%)	
	µg/kg	0.2 µg/kg	2.0 µg/kg
1	N.D.	87.2	98.6
2	N.D.	85.8	106.2
3	N.D.	92.0	97.8

(N.D.: Not Detected)

2.4 实际样品分析

将本方法应用于实际食用油中黄曲霉毒素 B1 检测，检出一份食用油中含有黄曲霉毒素 B1，含量为 32 µg/kg (见图 5)。

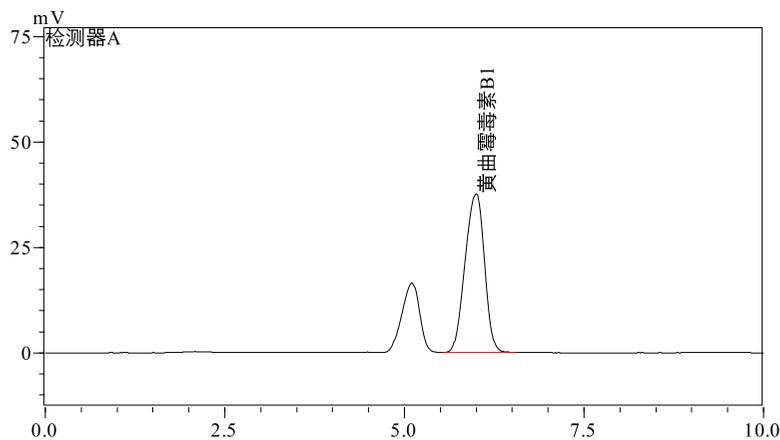


图5 实际样品检测色谱图结果

结论

本实验中使用岛津高效液相色谱仪 LC-20A，建立了柱后碘衍生测定食用油中黄曲霉毒素 B1 含量测定的方法。黄曲霉毒素 B1 在 0.4~51.2 ng/mL 的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数为 0.9998，方法检出限为 0.045 µg/kg，定量限为 0.15 µg/kg。实际样品加标浓度 0.2 µg/kg 和 2.0 µg/kg，回收率范围为 85.8%~106.2%。本方法具有灵敏度高和重复性好等优点，方法检出限低于国家标准 GB/T 18979-2003《食品中黄曲霉毒素的测定 - 免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法》。