

柱前衍生高效液相色谱法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁

冯民贤, 赖春华 (柳州市产品质量监督检验所, 广西柳州 545006)

摘要 [目的]建立柱前衍生高效液相色谱法测定植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量的方法。[方法]样品甲醇水溶液(45+55)、三氯甲烷提取浓缩之后,用苯乙腈(2+98)溶解,三氟乙酸衍生,反相 C₁₈ 柱分离,荧光检测器检测,所用激发及发射波长依次为 365、440 nm。[结果]试验表明,黄曲霉毒素 B₁ 线性关系良好,对添加黄曲霉毒素 B₁ 的样品进行加标回收试验,回收率在 89.5%,重复性试验相对标准偏差($n=6$)为 2.34%。[结论]该法操作简单、线性范围广、效果良好,可用于测定植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

关键词 黄曲霉毒素 B₁; 高效液相色谱; 柱前衍生; 植物油

中图分类号 S609.9 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)26-09180-01

Determination of Aflatoxin B₁ in Vegetable Oil by HPLC with Pre-column Derivatization

FENG Min-xian et al (Liuzhou Product Quality Supervision and Inspection Institute, Liuzhou, Guangxi 545006)

Abstract [Objective] To establish the method for determining aflatoxin B₁ in vegetable oil by pre-column derivatization with HPLC. [Method] Aqueous methanol (45+55) and chloroform after extraction and concentration, were dissolved in benzene acetonitrile (2+98), derived from trifluoroacetic acid, separated by reversed phase C₁₈ column and detected by fluorescence detector, excitation and emission wavelengths were 365 and 440 nm. [Result] The results showed that aflatoxin B₁ has a good linear relationship, spiked recovery test was conducted on samples with aflatoxin B₁, recovery rate was 89.5%, repeatability relative standard deviation ($n=6$) is 2.34%. [Conclusion] The method is simple, and has wide linear range and good effect, which can be used for determination of aflatoxin B₁ in vegetable oil.

Key words Aflatoxin B₁; HPLC; Pre-column derivatization; Vegetable oil

黄曲霉毒素是黄曲霉和寄生虫产生的一组结构类似的代谢产物,具有极强的毒性,被世界卫生组织定为 1 类致癌物质^[1]。黄曲霉毒素广泛存在于粮油制品中,尤其以黄曲霉毒素 B₁ 为多。为了控制食品中黄曲霉毒素的含量,目前世界各国都规定了其在植物油中的最大限量,国家标准 GB2761-2011 规定了花生油黄曲霉毒素 B₁ 的含量不大于 20 μg/kg,其他植物油为 10~20 μg/kg。

目前国际上测定黄曲霉毒素 B₁ 常见的方法有薄层层析法(TLC)^[2]、酶联免疫分析法(ELIAS)^[3]、高效液相色谱法配柱后衍生系统^[4]。薄层层析法,其步骤多,测定时间长,干扰因素多,试剂耗费大,灵敏度低,荧光强度的目测精确性较差,特异性不强且安全性较差,主要用于半定量测定。酶联免疫分析法其灵敏度高,特异性强,分析速度较快,其缺点主要在于影响因素较多,容易出现假阳性造成误判。高效液相色谱法分离能力强,灵敏度高,特异性好,其检测结果可靠。

国家标准采用 TLC 和 HPLC(配柱后衍生系统)测定植物油黄曲霉毒素 B₁ 的含量,TLC 中采用紫外点样分析方法,在荧光检测下观察蓝色的荧光点,此法检出限高,且偏差较大。因此,建立一种快速检测植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的方法是十分必要的。

1 材料与方

1.1 材料 供试 6 种植物油分别为大豆油 1、大豆油 2、花生调和油 1、花生油 1、花生调和油 2、花生油 2。岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪,配有荧光检测器,氮吹仪,恒温培养箱,漩涡混合器。主要试剂:黄曲霉毒素 B₁ 标准品(国家标准物质中心),甲醇(色谱级),乙腈(色谱级),三氟乙酸(分析纯),水(三级用水),石油醚(分析纯),三氯甲烷(分析纯)。

1.2 方法

1.2.1 提取。称取 10 g(0.01 kg)样品,加 30 ml 石油醚(60~90 °C 沸程)溶解,转入分液漏斗中,加 30 ml 甲醇水(45+55)分数次洗涤烧杯,一并倒入分液漏斗中,摇匀,静置数分钟;把下层液体转入另一个分液漏斗中,加 30 ml 三氯甲烷,摇匀,静置分层,收集下层溶液,挥发近干,加 1.5 ml 苯-乙腈溶解定容,待衍生。

1.2.2 衍生。取上述溶液 200 μl 加 200 μl 三氟乙酸衍生,漩涡后,放入 50 °C 恒温干燥箱中衍生 5 min,氮吹仪吹干,用流动相定容 1 ml,经 0.45 μm 滤膜过滤,待上机。

1.2.3 色谱条件。色谱柱:C₁₈(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:乙腈水(13+75):甲醇=75:25;检测波长:激发波长 365 nm,发射波长 440 nm;进样量 10 μl;流速 1.0 ml/min。

1.2.4 标准溶液配制。标准品浓度为 1 μg/ml,体积 1 ml,用苯乙腈定容至 5 ml,得 0.2 μg/ml 标准使用液。分别取 50、100、200、400、800 μl 衍生,氮吹仪吹干,定容 1 ml,得进样浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.08、0.16 μg/ml。

2 结果与分析

2.1 流动相的选择 在研究选用不同比例的流动相,采用 NY/T1286-2007 标准第 8.3.2 条为甲醇:水:乙腈=13:75:12,色谱峰在 18 min 出峰,且峰形宽大、不对称。经多次研究发现,采用乙腈水比例固定,甲醇比例高,能缩短出峰时间,且色谱峰形尖锐、对称,图 1~3 为标准品和样品的色谱图。由图 1、3 可看出,甲醇:(乙腈+水)比例为 20:(78+12)时,标准品和样品在 9.6 min 出峰。

2.2 衍生方式的选择 由于黄曲霉毒素 B₁ 具有荧光强度特性,在 TLC 方法中浓度较高的标准品具有较强的荧光强度,可以在紫外点样分析仪看出,微弱的荧光强度则无法判断且容易被杂质造成干扰。但可以用液相色谱仪检出,需要

生选学和学生自学)、具体教学方法(讨论式、案例分析式、启发互动式、情景模拟式、设计式等)。第三,构建专业网络实践教学平台。运用现代信息技术构建专业网络实践教学平台,在专业网络实践教学平台中设置仿真模拟实验、实践教学视频、实践教学效果评价、实践教学基地简介、实践教学基地评估、视频会议、互动交流、资源共享等多个板块,鼓励学生、教师、实践教学基地在线交流,实现双向交互。通过构建与运用专业网络实践教学平台,力争实现实践教学的多元化、信息化、自动化、数据化与标准化评价,真正意义上实现学生、教师和实践单位的互动^[8]。

参考文献

[1] 张立新,檀根甲,吴冬梅,等.植物保护专业“双创型”人才培养新模式

探索与实践[J].高等农业教育,2013,267(9):46-49.

- [2] 王敬国,毛达如,张玉龙,等.中国土壤科学教育的现状及发展趋势[J].土壤学报,2008,45(5):865-874.
- [3] 郭世田.当代中国创新型人才发展问题研究[D].济南:山东大学,2012.
- [4] 黄巧云,刘凡,刘震,等.高校“教研一体化”创新型人才培养模式的探索——以华中农业大学农业资源与环境专业为例[J].华中农业大学学报:社会科学版,2012,101(5):122-126.
- [5] 刘震,黄巧云,刘凡,等.寓教于研 培养创新人才的探索与实践——以华中农业大学资源与环境类专业为例[J].华中农业大学学报:社会科学版,2013,102(4):136-140.
- [6] 李旭霖,崔德杰,史衍玺.农业资源与环境专业学科群建设及课程体系设置[J].高等农业教育,2008,208(10):56-58.
- [7] 黄仁术,凌明亮.皖西学院动物科学专业创业型人才培养情况的调查研究[J].皖西学院学报,2014,30(2):83-85.
- [8] 黄运湘,廖超林,尹力初.土壤学教学内容与教学方法的改革与实践[J].农业教育研究,2009,61(4):22-24.

(上接第9180页)

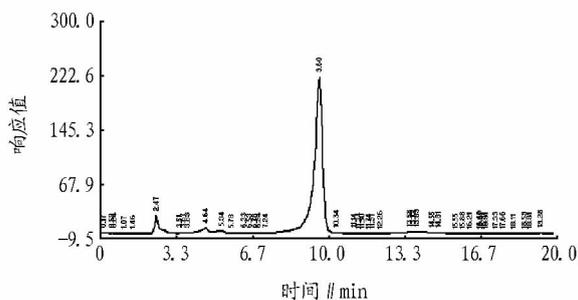


图1 黄曲霉素 B₁ 标准色谱

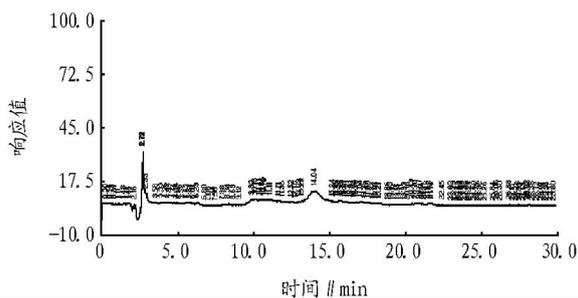


图2 植物油未检出色谱

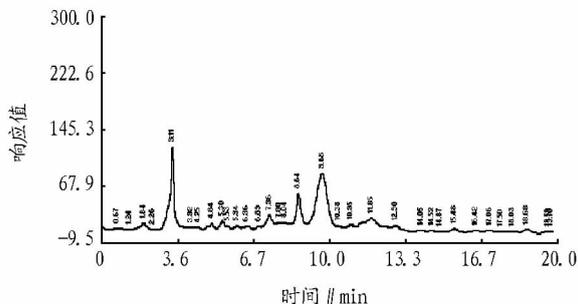


图3 植物油检出色谱

对样品进行衍生,用于加强黄曲霉素 B₁ 的荧光强度。目前衍生的方法有柱前衍生和柱后衍生,柱前衍生法主要有三氟乙酸衍生法和盐酸衍生法。该试验中采用的是柱前衍生方法,对衍生剂的用量,衍生时间、衍生温度做了考察,结果在衍生剂 200 μl,50 °C,衍生 5 min 条件下,可取得较好的重

现性和准确度。

2.3 重复性试验 准确称取植物油样品 1(大豆油 1),分别按照“1.2”试验方法进行提取衍生,再进行液相色谱分析。对黄曲霉素 B₁ 峰面积的重现性进行分析,结果峰面积的 RSD(n=6)为 2.34%,表明该方法的重复性较好。

2.4 精密性试验 精密吸取标准品溶液 10 μl,重复进样 6 次,在相同色谱条件下分析其峰面积。结果峰面积的 RSD 为 1.38%,表明该方法的精密性良好。

2.5 回收率试验 对未检出的植物油加入标准品后,测定黄曲霉素 B₁ 含量并计算加标回收率,结果见表 1。

表1 黄曲霉素 B₁ 的加标回收率

检测项目	加标量	加标后	回收率	平均回收率
	μg	μg	%	%
黄曲霉素 B ₁	1.0	0.883	88.3	89.5
	1.0	0.904	90.4	
	1.0	0.898	89.8	

2.6 6种植物油中黄曲霉素 B₁ 含量的检测 供试 6 种植物油经提取、浓缩、衍生之后,检测结果如下:大豆油 1、大豆油 2、花生调和油 1、花生油 1、花生调和油 2、花生油 2 中的黄曲霉素 B₁ 含量依次为 0.02、0.34、1.46、5.49、2.34、4.89 μg/kg。

3 结论

该试验建立了一种测定植物油中黄曲霉素 B₁ 的分析方法,样品经提取、浓缩、衍生,结果可靠,干扰因素小,减少了薄层层析法中用肉眼来判断而带来的误差,方法准确度较高、专属性较强,可为植物油中黄曲霉素的监管提供技术支持。

参考文献

- [1] IARC-WHO. Some naturally occurring substances; Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines, and mycotoxins. IARC monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans [J]. Lyon France, 1993, 56:245-362.
- [2] 柳洁,何壁英.高效液相色谱法测定食品中黄曲霉素的方法研究[J].现代预防医学,2002,29(2):137-140.
- [3] 刘冬儿.酶联免疫吸附分析法测定食品中的黄曲霉素 B₁ [J].包装与机械,2002,23(10):78-89.
- [4] 祝伟霞,杨冀州,袁萍,等.高效液相色谱法测定 3 种植物油中 4 种黄曲霉素含量[J].理化检验-化学分册,2013,49(8):981-984.
- [5] 柳其芳.酶联免疫吸附法和薄层色谱法联合分析黄曲霉素 B₁ 的研究[J].中国热带医学,2006,6(2):246-248.