

doi:10.16104/j.issn.1673-1891.2021.04.002

苦荞籽中黄曲霉毒素 B1 质量分数检测方法的研究

刘 恒,王安虎,刘晓燕*

(西昌学院农业科学学院,四川 西昌 615013)

摘要:利用 AFB1 免疫亲和柱对苦荞籽进行前处理,使用高效液相色谱仪测定 AFB1 的质量浓度,建立了一种检测苦荞籽中 AFB1 质量分数的检测方法。采用该方法测定了凉山州不同区域苦荞籽中 AFB1 的质量分数。结果表明:新建方法的检测限为 0.2 ng/mL,精密度良好,添加回收率平均为 85.87%。利用此法测定了凉山州不同区域的苦荞籽,在凉山州不同地区收集的苦荞籽中均未检出 AFB1。

关键词:苦荞种子;黄曲霉毒素 B1;高效液相色谱法;免疫亲和柱

中图分类号:S517;TS210.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1673-1891(2021)04-0006-04

Study on the Monitoring Method of Aflatoxin B1 Content in Tartary Buckwheat Weeds

LIU Heng, WANG Anhu, LIU Xiaoyan*

(School of Agricultural Science, Xichang University, Xichang, Sichuan 615013, China)

Abstract: In order to establish a feasible method for monitoring aflatoxin B1 in Tartary buckwheat seeds, aflatoxin B1 immunoaffinity column combined with high performance liquid chromatography is used to determine the content of aflatoxin B1 in Tartary buckwheat seeds. The standard curve was drawn. The detection limit, and added recovery of the method were determined. The results show that the detection limits of the new method is 0.20 ng/mL, the precision is good, and the average recovery rate was 85.87%. The aflatoxin B1 contents of Tartary buckwheat seeds in different areas of Liangshan Prefecture are detected. The results show that the seeds of Tartary buckwheat collected from different areas of Liangshan Prefecture do not contain aflatoxin B1.

Keywords: Tartary buckwheat seed; Aflatoxin B1; high performance liquid chromatography; immunoaffinity column

0 引言

苦荞是双子叶蓼科荞麦属植物,学名鞑靼荞麦(*Fagopyrum tataricum*),是食药两用的粮食作物,富含多种营养元素,含有大量谷物不具有的芦丁等抗氧化物质,具有降糖、降脂、抗癌等多种作用^[1]。苦荞种植及栽培的起源地是中国,凉山彝族自治州更是全球苦荞起源和遗传多样性的中心^[2]。黄曲霉毒素(aflatoxins, AFTs)是黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等曲霉属真菌的次级代谢产物,是一种具有高毒性和致癌性,极易污染各种食品和农产品的真菌毒素。粮食被 AFTs 污染的概率很高,严重威胁到人们的身体健康^[3-4]。

目前已经鉴定出黄曲霉毒素的 18 种结构,以黄曲霉毒素 B1(aflatoxin B1, AFB1)污染最广,污染水平最高,其毒性和致癌性最强,因此世界各国对 AFB1 的污染极为重视^[5]。目前我国常用的检测黄曲霉毒素 B1 的方法有薄层层析法,高效液相色谱法、酶联免疫吸附法、金标免疫层析检测技术等^[6-8]。我们拟建立一个免疫亲和柱前处理和高效液相色谱仪测定相结合的方法,测定苦荞籽中 AFB1 的质量分数。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

苦荞籽,采集于凉山州不同县份。

收稿日期:2021-07-25

基金项目:四川省科技厅项目(2018JY0397)。

作者简介:刘恒(1996—),男,四川盐源人,学士,研究方向:食品质量与安全。*通信作者:刘晓燕(1983—),女,河北张家口人,讲师,博士,研究方向:食品安全研究。

2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄曲霉毒素 B1 标准溶液(上海保藏生物技术中心);Deoxynivalenol-IAC 黄曲霉毒素 B1 免疫亲和柱(北京华安麦科)。

高效液相色谱仪 1260(安捷伦科技公司);HAA-0380919011 型光化学衍生器(北京华安麦科)。

1.2 试验方法

1.2.1 样品的预处理方法

将苦荞籽粉碎后过直径为 0.147 mm 孔的筛子,得到苦荞粉末。准确称量苦荞粉末 5.000 0 g,然后加入 1.0 g NaCl 和 25 mL 70% 甲醇,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温振荡水浴锅中提取 20 min。用定性滤纸过滤提取液,取 10 mL 滤液与 20 mL 纯水混合,混合液出现浑浊,采用玻璃纤维滤纸过滤。量取上清液 15 mL 到黄曲霉毒素 B1 免疫亲和柱上,上完样后用 10 mL 纯水清洗免疫亲和柱 2 次,将空气压入免疫亲和柱,吹出所有液体,最后用 1 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液至样品瓶,待测。

1.2.2 高效液相色谱检测条件

由黄曲霉毒素 B1 免疫亲和柱得到的洗脱液经高效液相色谱仪进行检测,检测条件为:Agilent Eclipse XDB-C18(4.6 \times 250 mm, 5 μm) 色谱柱,V(甲醇):V(纯水)=1:1 的流动相,流速为 1.0 mL/min,连接有光化学衍生器的荧光检测器,荧光激发波长为 365 nm,发射波长为 450 nm,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 100 μL 。

1.3 建立的 AFB1 测定方法的可行性评价

1.3.1 标准曲线的绘制和检测限的测定。

将 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 黄曲霉毒素 B1 标准溶液稀释至 100 ng/mL,然后再逐步稀释,配制质量浓度分别为 1.00, 2.00, 5.00, 10.00, 20.00 ng/mL 的 AFB1 系列标准溶液,按照 1.2.2 的检测条件经高效液相色谱仪测定各个标准液的峰面积。然后以峰面积为纵坐标,浓度为横坐标,绘制 AFB1 标准曲线。当样品色谱峰高是噪音色谱峰高的 3 倍时,样品对应的浓度即为检测限^[7],利用高效液相色谱仪测噪音峰高 N,以及质量浓度为 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的 AFB1 标样溶液,测定 AFB1 的检测限。

1.3.2 AFB1 回收率的测定。

称取 5.000 0 g 苦荞粉 3 份,添加 100 μL 质量浓度为 5.00, 10.00, 20.00 ng/mL 的 AFB1 标准溶液,按 1.2 的方法测定 AFB1 的含量,计算 AFB1 的添加回收率。重复测量 3 次。

1.3.3 精密度的测定

分别取 100 μL 质量浓度为 0.00, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 和 20.00 ng/mL 的 AFB1 标准溶液,每个

溶液按 1.2 的方法重复测定 3 次,计算测定结果相对标准偏差,评价 AFB1 检测方法的精密度。

1.4 样品检测

利用 1.2.1 样品前处理方法和 1.2.2 检测方法,检测不同苦荞种子中 AFB1 的含量。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法的可行性评价结果

2.1.1 标准曲线的绘制

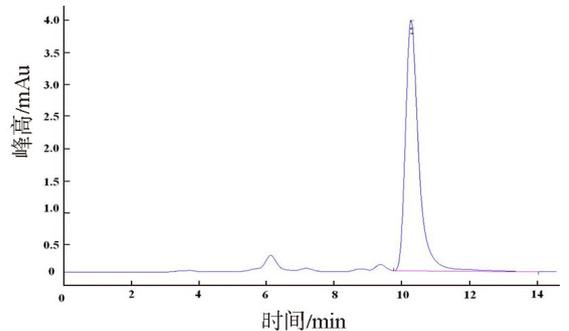


图1 黄曲霉毒素 B1 标准液相色谱

图 1 为 AFB1 标准溶液的色谱图,从图 1 可以看出色谱峰峰型较好,保留时间为 10.28 min。AFB1 的标准曲线对应的回归方程为 $Y = 0.3809X - 0.271$,回归系数 $r^2 = 0.9986$,说明在 0.20~20.00 ng/mL 范围内,线性相关性较好。

2.1.2 检测限的测定结果

AFB1 标准溶液检测限测定结果如表 1 所示。从表 1 可以看出,质量浓度为 0.20 ng/mL 的色谱峰高是噪音峰高的 3 倍,因此,高效液相色谱法检测 AFB1 的检测限为 0.20 ng/mL。

表 1 AFB1 标准溶液的检测限测定结果

测量参数	测量值			
质量浓度/ (ng · mL ⁻¹)	0.10	0.15	0.20	0.25
峰高 S/mAU	0.002 5	0.003 5	0.004 5	0.005 5
信噪比(S/N)	1.6	2.3	3.0	3.6

2.1.3 AFB1 的加标回收率测定结果

图 2 为 AFB1 添加回收测定的 HPLC 色谱图,图 2a 为添加了 AFB1 的样品,箭头所示的 10 min 的色谱峰即为 AFB1 的吸收峰,图 2b 为未添加 AFB1 的样品在 10 min 处并没有对应的 AFB1 色谱峰。

加 AFB1 的加标回收率测定结果如表 2 所示。由表 2 可知,AFB1 质量浓度为 5.00~20.00 ng/mL 时,加标回收率分别为 81.52%, 86.35%, 89.75%, 满足 GB/T 27404—2008 实验室质量控制规范食品理化检测中附录 F.1 对回收率的要求^[9]。

2.1.4 精确度的测定结果

不同质量浓度的 AFB1 溶液的峰面积测定结果如表 3 所示。由表 3 可以看出,相对误差 $RSD \leq 8\%$,说明精密度较好。

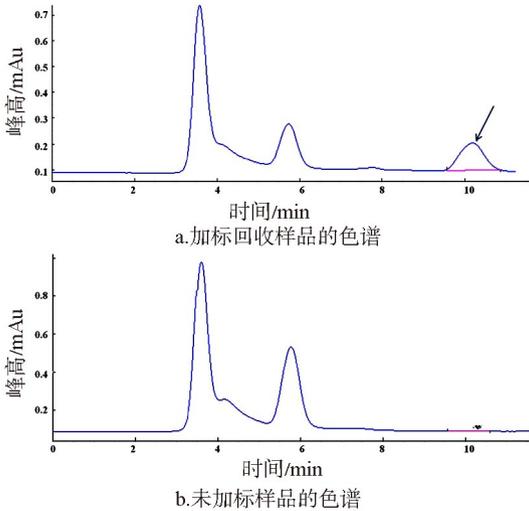


图 2 加标回收样品和未加标样品的色谱

表 2 AFB1 的加标回收率测定结果

序号	样品中 AFB1 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	添加 AFB1 质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测质量浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/ %
1	0.00	5.00	4.08	81.52
2	0.00	10.00	8.64	86.35
3	0.00	20.00	17.95	89.75

表 3 高效液相色谱法检测不同质量浓度 AFB1 的结果

序号	AFB1 质量浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	平均峰面积/ ($\text{mAu} \cdot \text{s}$)	相对误差/%
1	1.00	0.24	8.00
2	2.00	0.43	8.00
3	5.00	1.59	2.40
4	10.00	3.63	2.40
5	20.00	7.34	1.00

2.2 凉山州不同地区苦荞种子检测结果统计

表 4 为凉山州不同地区 and 不同天气情况下采收的 42 个苦荞籽样品的统计结果,42 个苦荞籽样品中均未检测到 AFB1。

3 结论

随着人们生活水平的提高,饮食理念的改变,苦荞以独特的营养成分和丰富的活性物质,受到很多人的青睐。在其他作物,如花生、玉米中有很多黄曲霉的报道^[10-11],但关于荞麦方面的报道还很少。

表 4 采收苦荞籽时的地点及天气情况

苦荞种子编号	苦荞麦种子收集地	收集苦荞时当地天气情况
1	拖乌乡罗坝村	4 d 连续降雨
2	冕宁县 拖乌乡罗坝村	晴
3	彝海乡盐井村	晴
4	烂坝村	7 d 连续降雨
5	烂坝村	6 d 连续降雨
6	烂坝村	晴
7	地莫乡	晴
8	昭觉县 碗厂乡	晴
9	特罗布乡	晴
10	解放沟	晴
11	普诗乡	晴
12	特里木镇	晴
13	拖觉镇	晴
14	布拖县 拉布乡	晴
15	县城边	晴
16	新市坝镇则沟村马家坪组	晴
17	甘洛县 玉田镇罗马村	晴
18	玉田镇永久村尔苦组	晴
19	南箐镇秀山村 3 组	晴
20	乃托镇乃托村	晴
21	白果乡白果村	晴
22	越西县 中所镇五新村	晴
23	小山乡小山村	晴
24	新民镇新建村 3 组	晴
25	南箐镇河坎村	晴
26	棉桠乡木邦营村	晴
27	白乌镇新农村	晴
28	棉桠乡狐狸洞村	晴
29	棉桠乡九村 9 组	晴
30	盐源县 棉桠乡中心村 1 组	晴
31	棉桠乡狐狸洞村	3 d 连续降雨
32	白乌镇十四村 8 组	晴
33	盐井镇太平村	晴
34	棉桠乡核桃村	晴
35	卫城镇东关村 10 组	晴
36	大箐村	晴
37	安哈镇 大箐村	1 d 降雨
38	大箐村	晴
39	西昌市 西昌佑君镇站沟 7 组	晴
40	大箐梁子	7 d 连续降雨
41	喜德县 光明镇小山村 2 组	晴
42	冕山镇洛发村	晴

本研究建立了黄曲霉毒素B1免疫亲和柱与高效液相色谱检测结合的方法,测定了苦荞籽中黄曲霉毒素B1的质量分数,检测了凉山州不同地点苦荞籽中黄曲霉毒素B1的质量分数。试验结果表明,该方法的检测限为0.2 ng/mL,精密度良好,平均添加回收率为85.87%。基于黄曲霉毒素B1免疫亲和柱与高效液相色谱检测结合的方法,不仅简化了分析

步骤,同时保证了分析方法的灵敏性及精密度,能够有效地用于苦荞籽中黄曲霉毒素B1的检测,也可为其他基质中黄曲霉毒素B1的检测提供参考。本研究测定了凉山州不同区域苦荞籽中黄曲霉毒素B1的质量分数,结果均未检出,但苦荞作为凉山州当地不少人民的主食,其安全性还需要引起高度的重视。

参考文献:

- [1] 宋盼盼,曹亚楠,刘颖翔,等.苦荞复合代餐粉的研制[J].保鲜与加工,2021,21(9):43-51.
- [2] 闫文杰,段昊,吕燕妮,等.苦荞在我国保健食品中的应用进展[J].食品科技,2021,46(6):55-61.
- [3] 杨建伟.黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J].中国城乡企业卫生,2021,7(7):16-19.
- [4] 汪文花,张奇,马飞,等.免疫磁固相萃取高效液相色谱测定粮油作物产品中黄曲霉毒素B1的含量[J].化学试剂,2021,43(11):1536-1540.
- [5] 刘震营,张永清.中药材黄曲霉毒素污染与防控[J].山东中医药大学学报,2021,45(4):547-553.
- [6] 林巧,卢朝婷,肖诗明,等.苦荞茶中黄曲霉毒素B1的风险评估研究[J].现代食品,2018(9):85-88.
- [7] 林巧,巩发永,肖诗明.HPLC检测苦荞制品中黄曲霉毒素B1的可行性探讨[J].食品研究与开发,2016,37(23):146-149.
- [8] 邓娟.黄曲霉毒素B1酶联免疫检测方法研究[D].天津:天津科技大学,2016.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.实验室质量控制规范:GB/T 27404—2008[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [10] 刘肖,邢福国,王利敏,等.种植至储藏期花生黄曲霉毒素B1污染研究[J].核农学报,2017,31(5):899-905.
- [11] 刘增然,张光一,王南南,等.储存玉米中黄曲霉毒素主要产生菌的检测及污染预防研究[J].植物保护,2017,43(6):46-52+61.