

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2023.06.014

张艳, 吴乾坤, 韩逸陶, 等. 分级制备法评估粉碎粒径对玉米中黄曲霉毒素 B₁ 测定的影响[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(6): 107-112.ZHANG Y, WU Q K, HAN Y T, et al. Effect of grinded particle size on the determination of aflatoxin B₁ in maize was evaluated by fractional preparation method[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(6): 107-112.

分级制备法评估粉碎粒径对玉米中黄曲霉毒素 B₁ 测定的影响

张艳¹, 吴乾坤¹, 韩逸陶¹✉, 江葵², 谢刚¹(1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮油质量检验测试中心, 北京 10037;
2. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100083)

摘要: 评估粉碎粒径对黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 测定的影响, 改进样品制备方法, 提高现行国标检测方法对玉米原粮样品 AFB₁ 测定结果的重复性。以天然 AFB₁ 阳性玉米为实验材料, 采用分级制备方式得到不同粒径范围的四个级别样品, 使各级样品的粒径分布差异最大化, 通过各级别样品中 AFB₁ 测定值及变异系数评估样品制备对 AFB₁ 测定值的影响, 得到最佳样品制备要求和称样量, 进行验证。样品粉碎后的不同粒径样品与该部分的 AFB₁ 含量成反比; 当称样量为 5 g 时, 应将样品粉碎至全部通过 0.6 mm 网筛; 当称样量为 10 g 时, 应将样品粉碎至全部通过 0.9 mm 网筛, 以使检测结果重复性符合 GB/T 32465—2015《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》的要求。研究结果兼顾 AFB₁ 测定准确性与操作效率, 可扩大应用于其他真菌毒素的检测, 对完善食品中真菌毒素检测方法具有参考意义。

关键词: 分级制备; 黄曲霉毒素 B₁; 玉米; 粒径

中图分类号: TS207.3; S-3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2023)06-0107-06

Effect of Grinded Particle Size on the Determination of Aflatoxin B₁ in Maize Evaluated by Fractional Preparation Method

ZHANG Yan¹, WU Qian-kun¹, HAN Yi-tao¹✉, JIANG Yan², XIE Gang¹(1. Inspection and Testing Center for Grain and Oil Quality, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China;
2. School of Biomedicine, Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: To evaluate the influence of grinded particle size on the determination of aflatoxin B₁ (AFB₁), improve the sample preparation method and the repeatability of the current national standard detection method for the determination of AFB₁ of corn raw grain samples, this study uses natural AFB₁-positive corn as experimental material, and four grades of samples with different particle size ranges were obtained by means of graded preparation, so as to maximize the differences of particle size distribution of samples at all levels. The influence of sample preparation on AFB₁ determination values was evaluated by AFB₁

收稿日期: 2023-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32102066)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No.32102066)

作者简介: 张艳, 女, 1982 年出生, 硕士, 工程师, 研究方向为粮油质量安全检测技术。E-mail: zy@ags.ac.cn

通讯作者: 韩逸陶, 女, 1988 年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为食品检测。E-mail: hyt@ags.ac.cn

determination values and coefficient of variation in samples of all levels, and the optimal sample preparation requirements and sample size were obtained and verified. The AFB₁ content of different particle size samples was inversely proportional to that of the sample after grinding. When the sample weight is 5 g, it should be crushed until all through the 0.6 mm sieve. When the sample weight is 10 g, it should be crushed until all through the 0.9 mm sieve, so that the test results meet the requirements of GB/T 32465—2015《Requirements for verification & validation of detection methods and internal quality control on chemical analysis》. The results give consideration to the determination accuracy and operation efficiency of AFB₁, which can be applied to the detection of other mycotoxins and has important significance for improving the detection methods of mycotoxins in foodstuff.

Key words: fractional preparation; Aflatoxins B₁; maize; partical size

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, 简称 AFs) 是一类由黄曲霉、寄生曲霉等菌株产生的双呋喃环类毒素。已知结构类似化合物 20 余种, 其中, AFB₁ 的毒性最强, 被国际癌症研究机构归为 I 类致癌物^[1]。玉米作为世界上三大主粮之一, 是粮食、油料、饲料的重要来源, 受 AFB₁ 污染也最为严重, 这对全球粮食与饲料安全, 对人类和禽畜的生命健康造成极大风险。

目前国内外关于 AFs 的检测方法可按应用场景分为两类: 适用于日常监测和仲裁的确证方法, 包括液相色谱、液相色谱-质谱联用法^[2-3]; 适用于加工生产、粮食收储等大批量样品集中筛查的快速检测法, 包括酶联免疫吸附法、胶体金免疫层析法^[4-5], 此外, 近年还出现了高光谱成像、电化学生物传感等新技术的应用^[6-7]。大量相关研究主要关注于样品提取、净化和仪器分析过程, 伴随分析仪器性能和前处理材料的发展应用, 各类分析检测方法的灵敏度和精密度不断提高。然而 AFs 的产生具有很大的随机性和不确定性, 导致其在一批样品中分布不均, 有报道单粒玉米的 AFs 含量高达 400 000 μg/kg^[8]。就检测实验室收到的一份样品而言, 样品制备是准确分析的重要保障, 从研磨后的样品中取出一小部分进行分析检测, 应能够代表整个样品的 AFs 含量, 但此方面的研究较少。AOAC 977.16、AOAC 972.26 要求谷物应粉碎至过 20 目筛或者过 1 mm 孔径网筛, AOAC 990.33、AOAC 990.34、AOAC 993.17^[9]要求称样量均为 50 g, ISO 16050^[10]要求称样量 25 g。我国也建立了较为完善的黄曲霉毒

素检测标准体系, 其中 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》广泛应用于各级检测实验室, 要求样品制备粒径小于 2 mm, 称样量 5 g。在实际执行标准过程中发现该样品制备要求下样品测定重复性较差。

在条件允许情况下, 尽可能小的制备粒径和尽可能大的称样量可提高检测结果重复性。而真菌毒素的产生机理决定了实验样品量必然较大, 因此样品制备应考虑在测定准确性与操作效率之间找到合适的平衡点。本研究针对上述问题, 以天然黄曲霉毒素阳性玉米原粮为实验材料, 采用分级制备方式, 即按照样品粉碎后的粒径分布范围划分为四个级别, 使各级样品的粒径分布差异最大化, 通过测定不同粒径范围以及各级粒径样品中的 AFB₁ 含量, 评估了样品制备对 AFB₁ 测定值的影响, 优化了称样量, 并对以上内容进行验证。研究结果兼顾 AFB₁ 测定准确性与操作效率, 为检测实验室的不同设备条件和预期目的提供了样品制备方面的数据参考, 该结果也可扩大应用于其他真菌毒素的检测方法, 对优化和完善食品中真菌毒素检测方法具有重要意义。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

1260 型液相色谱仪(配有荧光检测器 FLD 及柱后光化学衍生器); 美国安捷伦公司; 3610 型盘式粉碎磨、3100 型锤式粉碎磨(配有 0.5 mm 网筛); 瑞典波通公司; SR300 型高通量旋转敲击

研磨仪(配有 1.0 mm 孔径网筛): 德国莱驰公司; ML4002 型电子天平(感量 0.01 g): 瑞士梅特勒-托利多公司; 实验筛: 绍兴市上虞纱筛厂; HGG-I 型横格式分样器: 浙江托普云农公司; N-EVAPTM112 型氮吹仪: 美国 Organomation Associates 公司; 免疫亲和柱: 德国拜发公司; 有机相微孔滤膜(0.22 μm): 上海安谱公司; 黄曲霉毒素阳性玉米样品: 本实验室保存样品; 乙腈中黄曲霉毒素 B₁ 标准品(10.0 μg/mL): 天津阿尔塔公司; 乙腈、甲醇(色谱纯): 美国赛默飞公司。

1.2 分级样品的制备

取 1 kg 黄曲霉毒素阳性玉米作为分级制备样品, 将粉碎磨的磨盘间距调至较大档位, 所有样品粉碎后, 过 2 mm 孔径网筛, 筛上物再次粉碎, 直到全部样品通过 2 mm 孔径网筛, 混合均匀, 此为 a 级样品。用横格式分样器分取 7 份平行样, 每份约为 5 g, 记录样品质量。适当调小磨盘间距, 混合剩余 a 级样品, 依次制备 b、c、d 级样品, 使其全部通过 1.6、0.9、0.6 mm 孔径网筛, 并分取 7 份平行样。测定以上四个级别试样的黄曲霉毒素 B₁ 含量。分级制备流程见图 1。

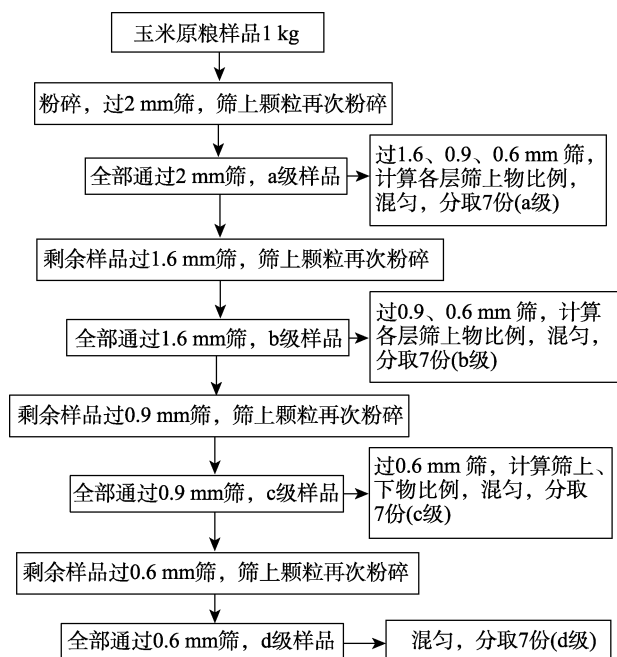


图 1 分级样品制备流程图

Fig.1 Preparation of graded samples

1.3 c 级样品称样量的优化

使用分级制备方式制备 1.0 kg 黄曲霉毒素阳

性玉米样品为 c 级, 比较称样量为 10、15、20 g 时的 AFB₁ 测定值。

1.4 最佳制备要求的验证

使用高通量旋转敲击研磨仪(配有 1.0 mm 网筛)将 2 份黄曲霉毒素阳性玉米样品粉碎, 各 1.0 kg。用横格式分样器分取 7 份, 称样量 10 g, 测定 AFB₁ 含量并计算变异系数。

1.5 黄曲霉毒素 B₁ 的测定方法

1.5.1 样品前处理

参照 GB 5009.22—2016 第三法高效液相色谱-柱后衍生法(柱后光化学衍生法)进行。称取样品约 5 g(精确到 0.01 g), 加入 20 mL 甲醇-水提取液(v/v: 70:30)并混匀, 置于涡旋振荡器上提取 20 min, 以 7 000 r/min 离心 5 min, 准确移取上清液 2.0 mL, 按免疫亲和柱操作说明进行稀释、净化、富集、洗脱后, 用氮吹仪浓缩至干, 流动相定容 1.0 mL, 混匀, 过 0.22 μm 有机相滤膜, 高效液相色谱仪分析测定, 外标法定量。

1.5.2 色谱分析条件

色谱柱: C18 柱(150 mm×0.46 mm×4 μm); 柱温 30 °C; 流动相: A 相: 水, B 相: 甲醇, C 相: 乙腈, A:B:C=68:16:16, 等梯度洗脱; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 10 μL; 激发波长: 365 nm, 发射波长: 440 nm。

1.6 样品制备效果的评价

制备后的样品进行 7 次独立平行测定, 测定结果按照 GB/T 32465—2015《化学分析方法验证确认和内部质量控制要求》中对精密度的要求进行评价。使用 Horwitz 方程: $CV=2^{(1-0.5lg\omega)}$, ω 为待测物的质量分数, 用 10 的幂次指数表示(例如: $10 \mu\text{g}/\text{kg}=10^{-8}$), 在重复性条件下, 变异系数不超过 Horwitz 方程计算结果的 1/2~2/3。即目标物含量在 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 样品变异系数应小于 21%。样品重复性变异系数为 7 次独立平行测定值的相对标准偏差。

2 结果与分析

2.1 玉米原粮中 AFB₁ 的测定结果

按 GB 5009.22—2016 要求, 将 1 kg 玉米样品

(编号 YM-01) 制备为 a 级样品 (粒径 < 2 mm, 编号 YM-01-a), 对 AFB₁ 进行 7 次平行测定, 平均值为 11.1 μg/kg, 变异系数为 46.8%, 不符合 1.6 中重复性评价要求, 因此, 该标准中样品制备的要求不适用于原粮样品中 AFB₁ 的测定。

2.2 玉米样品中 AFB₁ 不均匀性分析

针对玉米原粮中 AFB₁ 的测定结果变异系数过高问题, 对 YM-01-a 样品做了进一步研究分析。将其过 1.6、0.9、0.6 mm 孔径网筛, 即按不同粒径范围将 YM-01-a 分为 4 部分, 分别为 <0.6 mm、0.6~0.9 mm、0.9~1.6 mm、1.6~2 mm, 按 1.5 中方法测定 AFB₁ 含量。为了避免粒径对提取效率的影响, 本实验首先使用锤式旋风磨将 4 部分粉碎至粒径小于 0.5 mm, 再进行样品测定。样品 YM-01-a 的粒径分布及各部分 AFB₁ 含量见图 2。

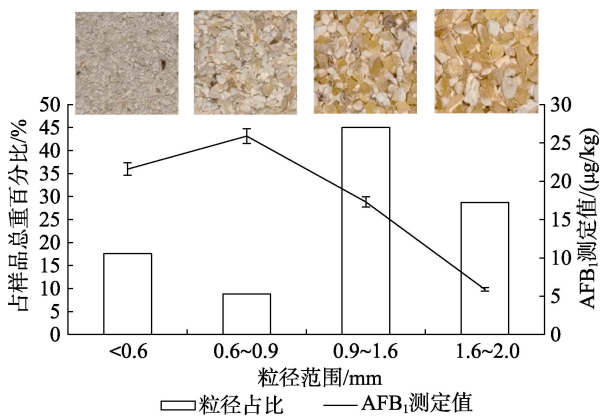


图 2 a 级样品 (粒径 ≤ 2 mm) 的粒径分布及 AFB₁ 测定值 (n=7)

Fig.2 Particle size distribution and AFB₁ values (n=7) of Grade a sample (particle size ≤ 2 mm)

结果显示, 玉米样品粉碎后的粒径差异极大, 0.9~1.6 mm 颗粒占比最大为 45%, 其次为 1.6~2 mm 颗粒占比 29%, 小于 0.9 mm 的颗粒占比约 25%。观察各部分图片可发现, 大于 0.9 mm 的颗粒主要为黄色, 而玉米籽粒中只有角质胚乳呈现明显黄色, 且为籽粒最坚硬的部分, 不易粉碎; 小于 0.9 mm 的颗粒为淡黄色至灰白色, 主要为玉米籽粒的粉质胚乳和胚。

图 2 显示, 不同粒径颗粒的 AFB₁ 含量与粒径成反比, 即粒径越大 AFB₁ 含量越低, 其中粒径 0.6~0.9 mm 部分和 1.6~2.0 mm 部分的 AFB₁ 含量

分别为 25.9 μg/kg 和 5.9 μg/kg, 前者是后者的 4 倍。

玉米籽粒组成结构主要分为种皮、胚和胚乳, 其中胚乳占籽粒重量的 80%~85%, 分为角质胚乳和粉质胚乳, 不同品种玉米所含角质和粉质比例不同^[11]。胚因富含脂肪, 极易滋生霉菌, 且与质地疏松的粉质胚乳紧密相连, 相比坚硬的种皮和角质胚乳, 这两部分更易被霉菌污染侵入, 进而产生黄曲霉毒素。因此, 玉米单个籽粒的组织结构及质地的不均匀性造成了样品粉碎后粒径的分散性, 同时导致毒素在不同粒径颗粒中分布的不均匀性, 加之不同粒径颗粒提取效率的差异^[12], 这些因素共同作用, 导致了毒素在粉碎后样品中的不均匀性。

2.3 分级制备样品中 AFB₁ 含量的差异

玉米原粮分级制备方式, 即将样品中未通过网筛的较大颗粒再次研磨, 避免了较小颗粒的重复研磨, 使样品的粒径分布差异呈现最大化, 避免了高性能粉碎磨制备样品粒径过小导致的样品均匀性假象, 更充分地体现了不同粒径分布对样品测定值的影响。

将 1 kg 玉米原粮样品 (编号 YM-02) 制备为 a、b、c、d 级别, 测定各级样品的粒径分布, 并按 GB 5009.22—2016 要求的 5 g 称样量, 对 AFB₁ 进行 7 次独立测定, 结果见图 3。

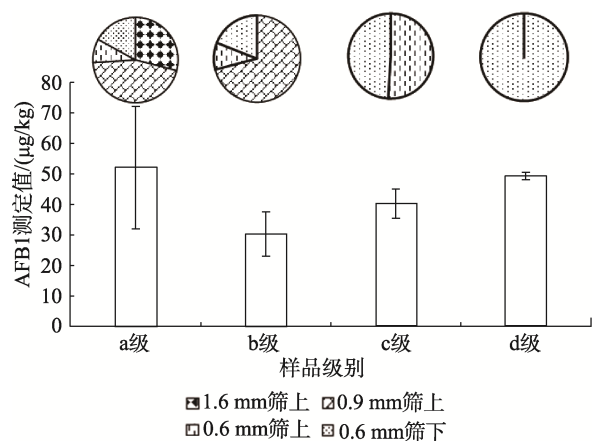


图 3 分级制备样品的粒径分布及 AFB₁ 含量 (n=7)

Fig.3 Particle size distribution and AFB₁ values of graded prepared samples (n=7)

结果显示, a、b、c、d 级样品的粒径分别为全部通过 2.0、1.6、0.9、0.6 mm 孔径网筛, AFB₁

测定值分别为 52.2、30.3、40.2、49.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，变异系数 CV 分别为 77.3%、48.3%、23.8%、4.5%。在称样量 5 g 时，只有 d 级样品（粒径 <0.6 mm）CV 值符合 1.6 中重复性要求。

普通玉米和高油玉米含油量约为 5% 和 8%，按 d 级粒径要求制备 1 kg 样品，对粉碎设备性能要求较高，且极易造成磨盘发热、筛孔堵塞，需要不时停机使磨盘降温，制备过程耗时约 30 min，严重限制了实验室日常大批量样品的检测工作效率。因此，本研究通过优化称样量来提升样品测定值的变异系数。由于 a 级和 b 级样品 CV 值过大，且大粒径可降低提取效率，优化空间不大，因此仅对 c 级粒径的样品进行称样量的优化。

2.4 称样量的优化

将 1 kg 玉米原粮样品（编号 YM-03）制备为 c 级粒径，考察在 5、10、15、20 g 称样量时的 AFB₁ 的 7 次独立测定值及 CV 值，见图 4。

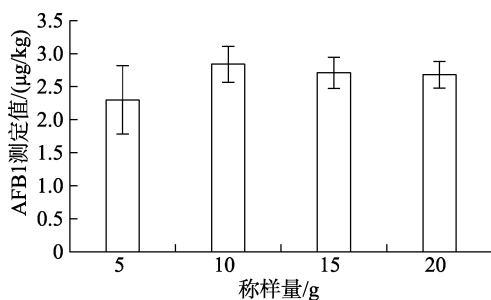


图 4 称样量的优化 (n=7)

Fig.4 Optimization of sample weight (n=7)

结果显示，称样量为 10、15、20 g 时 AFB₁ 测定值的变异系数均小于 20%，符合 1.6 中重复性要求。称样量 15 g 和 20 g 时，提取液的体积也相应增加，提取容器需要 80 mL 或更大容积离心管，或使用均质器，导致前处理过程效率不高，因此确定最佳称样量为 10 g。

2.5 最佳制备要求的验证

按照 1.4 要求制备原粮玉米样品，编号为 YM-04、YM-05，粉碎后样品在 0.9 mm 孔径网筛的通过率均大于 99%，称样量为 10 g，7 次独立测定的 AFB₁ 平均值及变异系数见表 1。

表 1 结果显示，在低含量和高含量水平的玉米样品中，AFB₁ 测定值的变异系数均小于 15%，

符合重复性条件下精密度的要求。可以确定，实验室常规制备条件下，测定玉米原粮中黄曲霉毒素 B₁ 的最适制备要求为：样品粉碎后全部通过 0.9 mm 孔径网筛，称样量为 10 g。

表 1 最佳制备要求的验证 (n=7)

Table 1 Verification of optimal preparation requirements

样品编号	样品 AFB ₁ 平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	变异系数/%
YM-04	1.86	11.8
YM-05	35.60	11.6

3 结论

本研究对 GB 5009.22—2016 中样品制备要求进行了分析与优化。以玉米原粮为实验样品，采取分级制备方式，使各级样品的粒径分布差异最大化，充分体现粉碎后不同粒径分布对样品测定值的影响。结果显示，将 1 kg 玉米原粮样品制备得到 a 级样品（粒径 <2 mm，样品重复性变异系数为 46.8%，按粒径划分为 4 部分，各部分 AFB₁ 含量与粒径成反比，其中粒径 0.6~0.9 mm 部分和 1.6~2.0 mm 部分的 AFB₁ 含量分别为 25.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 5.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。当粒径 <0.6 mm，称样量为 5 g 时，以及粒径 <0.9 mm，称样量为 10 g 时，AFB₁ 测定值变异系数符合 GB/T 32465—2015 中对重复性条件下精密度的要求，同时保证了大批量样品的高效率检测。

本研究在真菌毒素检测的样品测定准确性与制备操作效率之间找到合适的平衡点，实验室可根据自身设备条件及预期检测目的合理安排样品的制备要求，为优化和完善粮食中黄曲霉毒素的检测方法提供了重要数据基础，可扩大应用于其他类真菌毒素的测定方法，以更好地对食品安全进行全面、有效地监管。

参考文献：

- [1] SARA A, ALBERTO A, ANNA Z, et al. Occurrence of aflatoxin B₁ in conventional and organic flour in Italy and the role of sampling[J]. Food Control, 2015, 50: 858-863.
- [2] 谢刚, 王松雪, 张艳. 超高效液相色谱法快速检测粮食中黄曲霉毒素的含量[J]. 分析化学, 2013, 41(2): 223-228.
XIE G, WANG S X, ZHANG Y. Rapid analysis of aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂) in grain by immuno-affinity clear-up column and ultra

- performance liquid chromatography without derivation[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013, 41(2): 223-228.
- [3] 吴宇, 叶金, 张冰, 等. 稳定同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定植物油中 16 种真菌毒素[J]. 分析化学, 2018, 46(6): 975-984.
- WU Y, YE J, ZHANG B, et al. A fast analytical approach for determination of 16 kinds of mycotoxins in vegetable oils using stable isotope dilution and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2018, 46(6): 975-984.
- [4] 蔡雪, 周川, 杨淑芬, 等. 大米中黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫法与液相色谱-柱后衍生法的比对探讨[J]. 现代食品, 2019(11): 186-191.
- CAI X, ZHOU C, YANG S F, et al. Comparison of Aflatoxin B₁ ELISA and liquid chromatography-post-column derivatization in rice[J]. Modern Food, 2019(11): 186-191.
- [5] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 232-235.
- DENG S L, LAI W H, XU Y. Study on gold immunochromatography assay for rapid detection of aflatoxin B₁[J]. Food Science, 2007, 28(2): 232-235.
- [6] YAO H, HRUSKA Z, KINCAID R, et al. Correlation and classification of single kernel fluorescence hyperspectral data with aflatoxin concentration in corn kernels inoculated with aspergillus flavus spores[J]. Food Additives and Contaminants: Part A, 2010, 27(5): 701-709.
- [7] GOUD K Y, KAILASA S K, KUMAR V, et al. Progress on nanostructured electrochemical sensors and their recognition elements for detection of mycotoxins: A Review[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 121: 205-222.
- [8] 王松雪, 张喆. 样品扦样与制备-真菌毒素准确分析中的决定性因素[J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(5): 60-63.
- WANG S X, ZHANG Z. Sampling and sample preparation-decisive factors of reliable mycotoxin analysis[J]. Journal of Inspection and Quarantine, 2010, 20(5): 60-63.
- [9] AOAC Official Methods of Analysis[M]. 2023, 49: 2-20.
- [10] Foodstuffs-determination of aflatoxin B₁, and the total content of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in cereals, nuts and derived products-high-performance liquid chromatographic method (ISO 16050: 2003). EN ISO 16050:2011[S].
- [11] 沈健, 洪雁, 顾正彪, 等. 高直链淀粉玉米籽粒特性对淀粉提取的影响及工艺优化[J]. 中国粮油学报. <https://doi.org/10.20048/j.cnki.issn.1003-0174.000079>.
- SHEN J, HONG Y, GU Z B, et al. Influence of high-amylose maize kernel characteristics on starch extraction and process optimization[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association. <https://doi.org/10.20048/j.cnki.issn.1003-0174.000079>.
- [12] YLIMATTILA T, RÄMÖ S, HUSSIEN T, et al. Different grain grinding methods affect detection of Fusarium graminearum DNA and mycotoxins[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2017, 56(1): 167-174.
- 备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。