

高效液相色谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 结果不确定度的评定

Uncertainty evaluation of the determination of Aflatoxin B₁ in peanut butter by high performance liquid chromatography

肖利龙¹ 花锦²

XIAO Li-long¹ HUA Jin²

(1. 太原学院, 山西 太原 030032; 2. 山西出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 山西 太原 030032)

(1. Taiyuan College, Taiyuan, Shanxi 030032, China;

2. Taiyuan Institute of Quality Inspection Standards and Metrology, Taiyuan, Shanxi 030032, China)

摘要:结合 CNAS—GL06:2006《化学分析中不确定度的评估指南》和 JJF 1059.1—2012《测量不确定度评定与表示》中规定的基本程序,分析测量不确定性的来源,计算测量结果的相对扩展不确定度。结果显示花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 的含量为 25.12 μg/kg, 相对扩展不确定度为 2.1%, 测定结果可表示为 $X = (25.12 \pm 0.528) \mu\text{g}/\text{kg}$, $k = 2$ 。在影响检测结果的 6 个不确定度分量中,样品前处理过程和标准工作液配制引入的不确定度对结果影响较大。可通过减少这些不确定度分量以提高测量结果的质量和准确度。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 花生酱; 高效液相色谱法; 不确定度

Abstract: In order to evaluate the uncertainty of determination of Aflatoxin B₁ in peanut butter by high performance liquid chromatography. According to the uncertainty assessment described in CNAS—GL06-2006 Guidance on evaluation the uncertainty in chemical analysis and JJF 1059.1—2012 Evaluation and expression of uncertainty in measurement, the components of uncertainty in the measuring process were studied and analyzed, and the related expanded uncertainty was calculated and evaluated. The results of method showed the content of Aflatoxin B₁ in peanut butter was 25.12 μg/kg, the related expanded uncertainty was 2.1%, and the determination result was $X = (25.12 \pm 0.528) \mu\text{g}/\text{kg}$, $k = 2$. Among the 6 factors of uncertainty, the content of targeted ions from liners fitting and sample preparation was the main factors which influenced the results mostly. Through reducing the amounts of these factors, the quality of the determination results can be increased. It could improve the accuracy of measurements in routine tests.

Keywords: Aflatoxin B₁; peanut butter; high performance liquid chromatography; uncertainty

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)是一类具有类似化学结构,由黄曲霉(*aspergillus flavus*)寄生曲霉(*A.parasiticus*)产生的强毒性和强致癌性的次生代谢产物组成^[1],主要成分有 B₁、B₂、G₁和 G₂。环境潮湿的地区存放食品和饲料中容易滋生黄曲霉毒素,其中黄曲霉毒素 B₁,被世界卫生组织划定为 1 类致癌物,其毒性是砒霜的 68 倍,对肝脏组织的破坏性极强,经常会在花生、玉米及其制品中检出^[2]。黄曲霉毒素对人及动物肝脏组织有很严重的破坏作用会导致肝癌或死亡。黄曲霉毒素 B₁ 经常被报道污染食品,其他 3 类物质少见报道^[3]。因此,许多国家规定黄曲霉毒素在食品中的限量值。中国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》明确规定花生中黄曲霉毒素 B₁ 不得高于 20 μg/kg。

目前研究各类食品检测方法的不确定度评定报道很多^[4-6],黄曲霉毒素 B₁ 的不确定度评估也有相关研究^[7-8],但在花生酱中的黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法不确定度评估尚未见,在日常检测过程中,发现花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 检出不合格率较高。

为了评估方法的不确定度,保证检验结果评定的准确性、可靠性,提供真实、有效的依据。根据 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》的试验方法,对本实验室测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 结果的测量不确定进行评定。评定从两个方面进行:方法重复性的不确定度和方法数学模型中涉及的各个分量的不确定度。以为测量结果提供科学、准确的理论依据,同时为其他农产品中黄曲霉毒素 B₁ 不确定度的评定提供参考。

作者简介:肖利龙(1986—),男,太原学院助教,硕士。

E-mail:475645219@qq.com

收稿日期:2017-12-01

1 材料与方

1.1 仪器与试剂

花生酱:山西省食品药品监督管理局监督抽检样品;
 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液:1 mg/L,中国计量科学研究院;
 乙腈、甲醇:色谱纯,美国 Fisher 公司;
 氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钠、盐酸、吐温-20:分析纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;
 高效液相色谱仪:Waters2695 型,配有 FLD 检测器,美国 Waters 公司;
 电子分析天平:ME204E 型,瑞士 Mettler 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 标准溶液配制 准确移取黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成 100 μg/L 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备溶液。吸取 1 mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准储备溶液于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容制成标准中间溶液。再分别移取 1,2,5,8,10 mL 黄曲霉毒素 B₁ 标准中间溶液于 10 mL 容量瓶中,用水定容制成标准工作溶液。

1.2.2 样品制备 准确称取 10 g 花生酱样品于 250 mL 三角瓶中,加甲醇-水(体积比 70:30)100 mL,均质提取 5 min,提取液取 15 mL 再加入 15 mL 水稀释,待净化。

取 1.2.2 中获得的待净化液 10 mL 过免疫亲和柱,再用 20 mL 水进行淋洗,最后用 1 mL 甲醇洗脱,洗脱液经 0.45 μm 有机系滤膜过滤上机。

1.2.3 色谱条件 色谱柱:Agela C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm);柱温:35 °C;流动相:甲醇:水=50:50(体积比);流速:1 mL/min;激发波长:365 nm;检测波长:436 nm;进样体积:20 μL。

1.3 被测量的数学模型

$$X = \frac{\rho \times V_1 \times V_2 \times V_3 \times 1\ 000}{V_2 \times m \times 1\ 000} \quad (1)$$

式中:

X——试样中 AFB₁ 的含量,μg/kg;

ρ——进样溶液中 AFB₁ 按照外标法在标准曲线中对应的浓度,ng/mL;

V₁——试样提取液体积(植物油脂、固体、半固体按加入的提取液体积;酱油、醋按定容总体积),mL;

V₃——样品经免疫亲和柱净化洗脱后的最终定容体积,mL;

V₂——用于免疫亲和柱的分取样品体积,mL;

1 000——换算系数;

m——试样的称样量,g。

2 分析和量化不确定度分量

高效液相色谱法测定花生酱中 AFB₁ 需经过提取、净化、等步骤,每个步骤都可能引入不确定度(图 1)。要对每个步骤都确定其不确定度的量是相对困难的,最常见的方法是选择检测方法评价中的数据进行评价,对各分量进行统一评定。

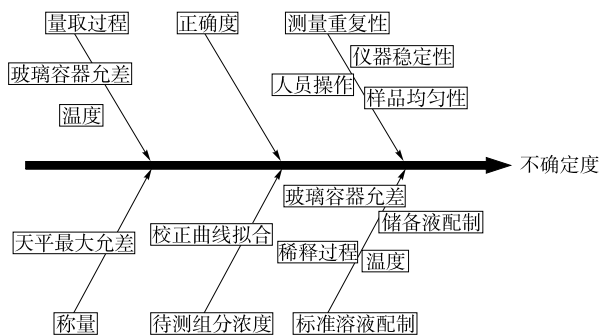


图 1 花生酱中 AFB₁ 测定不确定度来源因果图
 Figure 1 Uncertainty source of determination for AFB₁ in peanut butter

不确定有多种不同来源,其中有部分随机性误差可以通过重复测量排除,用统计方式评定,是为 A 类评定;但是也有许多其他不确定度的来源,例如仪器本身的不确定度,不能用重复测量和统计方式评定,要用 B 类评定方法,本方法中除标准物质纯度引入的不确定度为 B 类评定,其余分量的不确定度均采用 A 类评定。

2.1 质量的不确定度

由检定证书查得,该电子天平在 0 ≤ m ≤ 100 g 范围示值误差为 ±0.000 1 g,实际称取样品 10.068 5 g,按照均匀分布,称量引入的相对标准不确定度为:

$$u_{rel}(m) = \frac{0.000\ 1}{10.068\ 5 \times \sqrt{3}} \times 100\% = 0.000\ 57\%$$

2.2 体积的不确定度

本方法体积的不确定度主要来源于校准和温度。

2.2.1 校准 本方法实际定容体积为 1.0 mL,定容体积的准确与否直接影响着最终的结果。用移液枪获得该体积,按照 JJG 646—2006《移液器检定规程》,A 级 1 mL 的移液枪最大允许差为 0.01 mL,按三角分布处理,由此引入的标准不确定度为:

$$u_{1rel}(V) = \frac{0.01}{\sqrt{3} \times 1} \times 100\% = 0.000\ 058\%$$

2.2.2 温度 实验室的温度在 (20 ± 2) °C 变化,水的膨胀系数是 2.1 × 10⁻⁴,按照均匀分布,温度差异引入的相对标准不确定度为:

$$u_{2rel}(V) = \frac{5.0 \times 2 \times 2.1 \times 10^{-4}}{\sqrt{3}} \times 100\% = 0.024\ 3\%$$

2.2.3 体积不确定度的合成

$$u_{rel}(V) = \sqrt{u_{1rel}(V)^2 + u_{2rel}(V)^2} \quad (2)$$

计算得到:u_{rel}(V) = 0.000 59%。

2.3 标准工作溶液引入的不确定度

2.3.1 标准物质纯度引入的不确定度 本检测方法所购买的标准物质来自德国 Dr. Ehrenstorfer 公司,纯度为 (99.0 ± 1.0)%,从标准物质证书上查得其标准不确定度为:u_{rel}(P) = 0.025%。

2.3.2 标准工作液配制过程引入的不确定度 使用经过计量校准的分量为 0.1 mg 的天平上称取标准品,使用 A 级

100 mL 的容量瓶进行配制,在稀释过程中,100 mL 的容量瓶、1 mL 量程的移液枪分别使用 2 次。

根据 JJG 196—2006《常用玻璃量器检定规程》,查得所使用的 A 级 100 mL 容量瓶和 1 mL 量程移液枪的最大允许差分别为 ±0.10 mL 和 ±0.008 mL,因此由容量瓶和移液枪引入的不确定度分别为:

$$urel(V_{100}) = \frac{0.1}{\sqrt{3}} \times 100\% = 0.000\ 58\%,$$

$$urel(V_1) = \frac{0.01}{\sqrt{3}} \times 100\% = 0.000\ 058\%。$$

稀释操作时,在相同的温度下使用移液枪和容量瓶,因此可忽略温度对不确定度的影响。

2.3.3 标准曲线拟合引入的不确定度 配制质量浓度为 1,

2,5,8,10 ng/mL 的 5 个校准标准溶液,通过高效液相色谱仪计算得出该标准曲线方程为 $y = 0.103\ 8x + 0.012\ 5$,计算得到标准曲线的不确定度仅与仪器的响应值高度有关。黄曲霉毒素校准溶液测定结果见表 1。

黄曲霉毒素 B₁ 校准曲线引入的不确定度:

$$s_A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [(A_i - (a + bc_i))^2]}{N - 2}} = 0.015\ 2,$$

$$u(C) = \frac{s_A}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{N} + \frac{c_0 - c_{均}}{\sum_{i=1}^N (c_j - c_{均})^2}} = 0.053\ 6,$$

$$urel(C) = \frac{0.053\ 6}{25.12} = 0.002\ 1\%。$$

表 1 黄曲霉毒素校准溶液测定结果[†]

Table 1 Result of determination for AFB₁ calibration solution

$c_i / (\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$	A_i	c_j	$a + bc_i$	$[A_i - (a + bc_i)]^2$	$(c_j - c_{均})^2$
1	0.103 5	0.876 0	0.101 2	0.000 005	17.007 4
2	0.211 0	1.990 0	0.208 9	0.000 004	9.060 1
5	0.506 0	4.859 0	0.505 1	0.000 001	0.019 9
8	0.901 2	8.042 0	0.900 1	0.000 001	9.253 8
10	1.135 0	10.005 0	1.126 0	0.000 081	25.050 0

[†] $p = 5, N = 6, c_{均} = 5 \text{ ng/mL}, c_0 = 0, b = 0.103\ 8。$

2.3.4 标准工作液浓度不确定度的合成

$$urel(c_s) = \sqrt{urel(p)^2 + 2 \times urel(V_{100})^2 + 2 \times urel(V_1)^2 + urel(C)^2}。 \quad (3)$$

经计算标准工作液浓度合成不确定度 $urel(c_s) = 0.033\%$ 。

2.4 进样体积引入的不确定度

数学模型中虽然并没有涉及进样量,但在计算结果中使用了进样量。进样量的变动可以包含在重复性考虑中。在实际的检测过程中采用同一进样器采样定量环等体积进样,进入仪器的标准工作溶液和样品时温度是固定的,因此温度带入的不确定度影响可以忽略,进样体积引入的不确定度也可以忽略。

2.5 样品前处理过程引入的不确定度

对本方法进行正确度试验,选择 1 个空白样品进行 6 次加标回收试验,回收率测定结果分别为 88.1%, 89.2%, 87.8%, 94.3%, 92.7%, 89.9%, 得到平均回收率 f_{rec} 为 90.3%,则由样品前处理过程引入的相对标准不确定度为:

$$S_{f_{rec}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (f_{reci} - \overline{f_{rec}})^2}{n - 1}}, \quad (4)$$

$$urel(f_{rec}) = \frac{S_{f_{rec}} / \sqrt{n}}{\overline{f_{rec}}} \times 100\%。 \quad (5)$$

计算得出 $S_{f_{rec}} = 0.038\ 6, urel(f_{rec}) = 1.05\%$ 。

2.6 测量重复性的不确定度

在上述试验条件下,对某阳性样品进行了 6 次重复测

定,测得黄曲霉毒素含量分别是 24.35, 25.46, 25.63, 25.78, 24.37, 25.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均值为 25.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 则由样品重复性引入的相对标准不确定度为:

$$S_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n - 1}}, \quad (6)$$

$$urel(X) = \frac{S_x / \sqrt{n}}{\bar{X}} \times 100\%。 \quad (7)$$

计算得出: $S_x = 0.001\ 1, urel(X) = 0.001\ 8\%$ 。

2.7 合成不确定度

方法重复性引入的不确定度、数学模型中各分量引入的合成不确定度:

$$Urel(X) = \sqrt{urel(m)^2 + urel(V)^2 + urel(c_s)^2 + urel(f_{rec})^2 + urel(X)^2}。 \quad (8)$$

通过计算得出: $Urel(X) = 1.051\%$ 。

2.8 扩展不确定度

按照包含因子 $k = 2$ (置信水平 95%), 计算得出花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 液相色谱检测法的相对扩展不确定度: $Urel = k \times Urel(X) = 2 \times 1.051\% = 2.102\%$ 。

扩展不确定度: $U = 25.12 \times 2.102\% = 0.528 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3 测量结果及其不确定度的报告

用高效液相色谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 含量, 测定结果可表示为: $X = (25.12 \pm 0.528) \mu\text{g}/\text{kg}, k = 2。$

4 结论

方法的重复性或再现性只能评价 n 次试验结果, 不确定 (下转第 150 页)

表 4 草莓分级测试结果[†]
Table 4 Strawberry grading results

项目	一等品	二等品	三等品	劣次品		
				成熟度不达标	质量不达标	形状不合格
人工分选结果	26	32	13	2	3	4
系统测试结果	28	29	15	2	3	3
不一致个数	2	3	2	0	0	1
不一致率/%	7.7	9.4	15.4	0	0	25

[†] 测试耗时 3.52 s。

6 结论

本研究在计算机图像信息基础上,从成熟度、质量大小和形状特征三方面分别对草莓进行相应评级处理,利用逻辑运算关系串联 3 个工作流程,建立了一套草莓自动分级系统。该分级系统分级速度快、不需要样本训练,避免了人工选择存在的主观偶然性。利用该系统对 80 个草莓进行分级测试试验,分级准确率达到 90% 以上(分类错误的草莓只出现在相邻等级,没有越级果),共耗时 3.52 s。该系统可以满足草莓实时分级需要。

参考文献

- [1] 乔勇进,王海宏,方强,等. 草莓采后处理及贮藏保鲜的研究进展[J]. 上海农业学报, 2007, 23(1): 109-113.
- [2] 刘禾,汪懋华. 水果果形判别人工神经网络专家系统的研究[J]. 农业工程学报, 1996, 12(1): 172-176.
- [3] 曹其新,吕恬生,永田雅辉,等. 草莓拣选机器人的开发[J]. 上海交通大学学报, 1997, 7(7): 881-884.
- [4] NAGATA M, KINOSHITA O, ASANO K, et al. Studies on automatic sorting system for strawberry(Part 1): Extraction of Geometric Feature Using Image Processing[J]. Journal of Jasm, 1996, 58: 57-63.
- [5] VOI N. Tomato maturity evaluation using colour image analysis[J]. Transaction of the ASAE, 1995, 38(1): 171-176.
- [6] NAKANO K. Application of neural networks to the colour grading of apples[J]. Computers and Electronics in Agriculture, 1997, 18(2): 105-116.

- [7] MASATERA N, OSAMU K. Studies on automatic sorting system for strawberry(Part 3): Development of Sorting System Using Image Processing[J]. Journal of Japanese Society of Agriculture Machinery, 1997, 59(1): 43-48.
- [8] BATO P M, NAGATA M, CAO Xin-qi. Study on the sorting system for strawberry using machine vision (Part 2): Development of sorting system with direction and judgment functions for strawberry[J]. Journal of the Japanese Society of Agriculture, 2000, 62: 101-110.
- [9] 冯斌,汪懋华. 基于颜色分形的水果计算机视觉分级技术[J]. 农业工程学报, 2002, 18(2): 141-144.
- [10] 钟小华,曹玉华,张永清,等. 基于机器视觉技术的红枣全表面信息无损分拣系统研究与实现[J]. 食品与机械, 2017, 33(5): 114-118.
- [11] 毕智健,张若宇,齐妍杰,等. 基于机器视觉的番茄成熟度颜色判别[J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 133-136.
- [12] 徐黎明,吕继东. 基于同态滤波和 K 均值聚类算法的杨梅图像分割[J]. 农业工程学报, 2015, 31(14): 202-208.
- [13] 王辉,毛文华,刘刚,等. 基于视觉组合的苹果作业机器人识别与定位[J]. 农业机械学报, 2012, 43(12): 165-170.
- [14] 谢志勇,张铁中,赵金英. 基于 Hough 变换的成熟草莓识别技术[J]. 农业机械学报, 2007, 38(3): 106-109.
- [15] XU Li-ming, ZHAO Yang-chao. Automated strawberry grading system based on image processing[J]. Computers & Electronics in Agriculture, 2010, 71(1): S32-S39.

(上接第 81 页)

度包含着与测试相关的各个因素(方法、设备、环境等等)的广泛信息,说明检测质量和检测过程,再现性属于不确定度评估的一部分。本文对花生酱中黄曲霉 B₁ 的检测过程进行了不确定度分析,发现影响检测结果的不确定因素(天平称量、前处理的过程、标准溶液的配制过程及浓度、样品溶液定容体积、重复性)。对于这些不确定度的影响,可以通过调整仪器的性能、增加标准溶液的浓度点、优化前处理净化过程等方法,降低以上不确定度分量在实际检测样品中的不确定度占比,提高测量结果的可信度。

参考文献

- [1] 杨希,温建荣,高功敏,等. UPLC 法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂[J]. 山东化工, 2016(17): 75-78.
- [2] YOGENDRARAJAH P, DEVLIEGHERE F, NJUMBE E E, et al. Toxicogenic potentiality of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains isolated from black pepper assessed by an LC-

MS/MS based multi-mycotoxin method[J]. Food Microbiology, 2015, 52: 185-196.

- [3] BRIEUDES V, LARDYFONTAN S, LALERE B, et al. Validation and uncertainties evaluation of an isotope dilution-SPE-LC-MS/MS for the quantification of drug residues in surface waters[J]. Talanta, 2016, 146: 138-147.
- [4] 程家丽,刘婷婷,马彦宁,等. 液相色谱法测定保健食品中番茄红素的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016(11): 4 653-4 658.
- [5] 刘长姣,王磊,刘长龙,等. ICP-MS 法测定人参中 Cd 和 Cu 含量的不确定度评定[J]. 中国食品添加剂, 2017(2): 179-183.
- [6] 莫启进,卓梅芳,朱海军. 分光光度法测定龟苓膏中总黄酮含量不确定度评定[J]. 食品工业科技, 2017(4): 77-80.
- [7] 郭金喜,远辉. 超高效液相色谱法测定新疆巴旦木中黄曲霉毒素 B₁ 不确定度评定[J]. 酿酒科技, 2017(5): 107-110.
- [8] 李静娜,伍雅婷,革丽亚,等. 高效液相色谱法测定玉米粉中黄曲霉毒素 B₁ 含量的不确定度评定[J]. 公共卫生与预防医学, 2015(3): 22-25.