

## 应用实例

## 高效液相色谱法同时测定酱油中 黄曲霉素 B<sub>1</sub>、棕曲霉毒素 A 和桔霉素

黄化成 赵尊行

李寅宾

(山东农业大学,泰安,271018) (山东进出口商品检验局,青岛,266001)

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、棕曲霉毒素 A、桔霉素是曲霉和青霉属的代谢产物,属于致癌物质,对人、畜、禽的肝、肾有毒害作用。酱油又是用曲霉和青霉发酵生产的,故开展对酱油中三毒素的检测研究很有意义,过去曾有微生物检测法<sup>[1]</sup>、薄层色谱法、紫外分光光度法<sup>[2]</sup>,但这些方法均不够理想,我们用高效液相色谱法检测,操作简便、快速、灵敏、准确。

### 实验方法

(一) 试剂 三毒素标样均为美国 Sigma 产品;乙腈为一级色谱纯,其它试剂均为分析纯;二次蒸馏水。

(二) 仪器 Waters 高效液相色谱仪,420 荧光检测器(Ex=340nm,Em=425nm),730 微处理器。

(三) 色谱条件 Micro Bondapak C<sub>18</sub> 径向加压柱(18mm×10cm,粒径 10μ),流动相流速为 1.5ml/min,检测器的 Gain 为 32。

(四) 毒素的提取和纯化 取 20.00ml 酱油,加 20ml 甲醇,用 6mol/L 盐酸酸化到 pH 为 1 后,用氯仿提取三次(用量为 25、25、20ml),合并氯仿提取液,用 0.1mol/L 盐酸洗涤氯仿两次(用量为 20、15ml)。将洗涤过的氯仿放入冰箱冰冻层(-6℃)冷冻后,快速过滤去冰,然后在旋转蒸发器中蒸发(温度 40℃)。残渣用 1ml 流动相溶解后供色谱测定用。

### 结果与讨论

(一) 由于酱油的含盐量高,用氯仿提取时易产生乳化现象,用甲醇稀释酱油,可减轻乳化。酸化酱油,可降低桔霉素与棕曲霉毒素 A 在酱油中的溶解度,提高在氯仿中的溶解度,用 0.1mol/L 盐酸洗涤

氯仿提取液可降低提取液中的盐分,从而避免了管道堵塞,还可保护色谱柱。

(二) 用 1% 醋酸、乙腈、异丙醇的混合液做流动相,只有乙腈与异丙醇的量相差不大时,三毒素才能很好分离。在乙腈与异丙醇体积比为 3:2 时,酸量增加,各毒素保留时间增加,但其增加速率不同,为此要很好分离三毒素应适当提高酸度,我们选用 1% 醋酸:乙腈:异丙醇=50:30:20 做流动相,对酱油(加有三毒素)做检测试验,获得了满意的色谱图,见图 1。

(三) 线性范围与最小检测量 用三种毒素的纯标准液从 5.0、10、20、40、60、80、100ng 进样做色谱测定,用其峰高与相应毒素的量求回归方程和相关系数,得黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的  $y_1 = -3.67 + 4.88x$ ,  $r = 0.998$ ,棕曲霉毒素 A 的  $y_2 = -0.98 + 1.8x$ ,  $r = 0.999$ ,桔霉素的  $y_3 = -0.088 + 6.8x$ ,  $r = 0.9988$ ,说明这些毒素在 1-100ng 范围内线性关系好,当信噪比(S/N)为 2:1 时的最小检测量,桔霉素为 0.2ng,棕曲霉毒素 A 为 0.05ng,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 为 0.08ng。

(四) 分析结果与方法的精密度和准确度 我们对泰安市售的散装酱油进行了 20 批、次的检测,但未检出三毒素。我们就用此酱油 20ml,加入桔霉素 3.5μg、棕曲霉毒素 A 3.5μg、黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 2.0μg,然后用本试验方法经提取、纯化、测定,所得结果见表 1。我们又用此市售散装酱油接种上桔青霉菌,经培养 15 天后测定,其色谱图见图 2。七次测定的桔霉素平均含量为 1.52ppm,标准偏差为 0.068,变异系数为 4.5%。由回收率与其分析结果的变异系数说明方法的准确度、精密度均较好。

表 1 市售不含毒素酱油添加三毒素后的测定结果

加入毒素	加入量(μg)	测 得 值 (μg)	标准偏差	变异系数(%)	平均回收率(%)
桔 霉 素	3.5	3.3, 3.1, 3.0, 2.9, 2.9	0.149	4.9	86.8
棕曲霉毒素 A	3.5	3.4, 3.3, 3.2, 3.3, 3.2	0.0748	2.3	93.7
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	2.0	1.90, 1.90, 1.75, 1.80, 1.75	0.0678	3.7	91.0

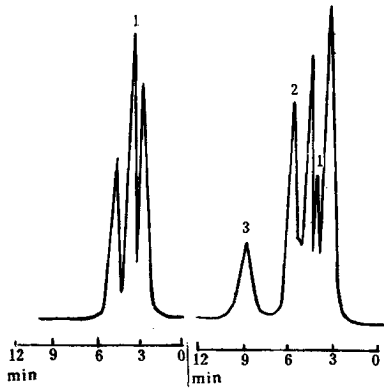


图 1(左) 加有三毒素的酱油色谱图

1. 桔霉素, 2. 棕曲霉毒素 A, 3. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>.

图 2(右) 接种桔青霉菌后的酱油色谱图

A, Aflatoxin B<sub>1</sub> in Soy Sauce by High Performance Liquid Chromatography Huang Huacheng, Zhao Zunxing, Agricultural University of Shandong, Taian, 271018; Li Yinbin, Shandong Imp. & Exp. Commodity Inspection Bureau, Qingdao, 266001

The paper describes condition of simultaneous determination of citrinin, ochratoxin A, aflatoxin B<sub>1</sub> in soy sauce by reversed-phase liquid chromatography method. The method was applied with Micro Bondapak C<sub>18</sub> column, 1% acetic acid-acetonitrile-isopropanol mobile phase and fluorescence detector at 340nm excitation wavelength and 425nm emission wavelength. The sample was acidified with 6 mol/L HCl, then extracted with chloroform. The chloroform was washed with 1 mol/L HCl and was evaporated in a rotary evaporator. The residue was dissolved in the mobile phase for analysis. The minimum amounts of detection were 0.2ng, 0.05ng and 0.08ng, and the recoveries were 86.8%, 93.7%, and 91.0%, for citrinin, ochratoxin A and aflatoxin B<sub>1</sub>, respectively.

致谢 本工作得到校中心实验室支持与协助,微生物组李素环协助接种培养,谨此致谢。

参考文献

- [1] 马龙宝,食品科学,(5),28(1984).
- [2] 屠传忠等,食品与发酵工业,(5),24(1984).

(收稿日期:1990年1月30日)

Simultaneous Determination of Citrinin, Ochratoxin

## 反相高效液相色谱法(荧光检测器)

### 检测鱼粉、食用油脂中乙氧基喹

陈家华

(上海进出口商品检验局,200002)

乙氧基喹(Ethoxyquin)是食品、饲料的抗氧化剂,目前已得到广泛的研究和应用<sup>[1]</sup>。鱼粉添加乙氧基喹以减低不饱和脂肪酸的氧化速度,避免贮存和运输过程中因脂肪氧化发热而燃烧。食用油脂中加入乙氧基喹同样能起到抗氧防止油酸败的作用。

乙氧基喹测定有荧光法<sup>[2,3]</sup>,薄层色谱法<sup>[4]</sup>和气

相色谱法<sup>[5]</sup>,这些方法前处理繁杂费时。本文采用荧光检测器反相高效液相色谱法测定鱼粉、食用油脂中的乙氧基喹,方法简便快速。

#### 实验部分

(一) 试剂 正己烷(优级纯),甲醇(紫外光谱