

杂色曲霉素的制备及其在稻米中含量的测定

魏云路 殷蔚申 庄桂*

(郑州粮食学院, 河南郑州)

杂色曲霉素是致肝癌的霉菌毒素, 能产生它的杂色曲霉 (*Aspergillus versicolor*)、构巢曲霉 (*A. nidulans*) 等是粮食上常见的霉菌。因此, 对粮食中杂色曲霉素的测定对保健事业有重要意义。我们制备了杂色曲霉素标准品并研究了稻米中杂色曲霉素的测定方法。现将方法介绍如下。

杂色曲霉素的制备

一、微生物的产毒培养

在 250 毫升带玻塞的三角瓶中装入 10 克全玉米粉和 0.2 克大豆粉, 将玻塞换成棉塞, 15 磅 20 分钟灭菌。接种 4 毫升构巢曲霉 5 号菌株的孢子悬液, 混匀。28℃ 培养 24 小时后, 再混匀一次, 继续培养 15 天。

二、杂色曲霉素的抽提^[1]

在上述培养物中, 每瓶加入 45 毫升乙腈和 5 毫升 5% NaCl 溶液, 塞紧玻璃瓶塞, 振荡 30 分钟。静置 1 小时后, 用布氏漏斗抽滤。将 5 瓶培养物的抽提残渣合并, 再加 135 毫升乙腈和 15 毫升 5% NaCl 溶液, 振荡抽提 30 分钟, 抽滤。合并两次抽提液。

抽提液的纯化采用液-液分配法、柱层析法和薄层层析法。具体方法是:

1. 液-液分配法: 取 400 毫升上述抽提液加入 1000 毫升分液漏斗中, 加入 200 毫升正己烷, 摇动分液漏斗后静置。待分层后将下层乙腈-水放入另一个 1000 毫升分液漏斗中, 加入 5% NaCl 溶液 100 毫升和氯仿 200 毫升, 振摇 5

分钟后静置, 分层后将氯仿层放入干燥的 500 毫升三角瓶中, 再加入 100 毫升氯仿振摇一次。合并氯仿提取液, 用 20 克无水硫酸钠干燥, 用脱脂棉过滤, 滤液在 K. D 浓缩器中浓缩至近于干燥。

2. 柱层析法: 100 克层析硅胶(60—100 目, 105℃ 活化 1 小时)干法装入玻璃层析柱(30×600 毫米)。用 200 毫升苯-丙酮(体积比 99:1)洗柱。加入相当于由 25 瓶培养物所得之经上述液-液分配纯化的干固物(溶于少量苯-丙酮液中)。用 400 毫升苯-丙酮液淋洗, 再用 400 毫升甲醇-无水乙醚(体积比 5:95)洗脱, 收集全部洗脱液, 在 K. D 浓缩器中浓缩至近于干燥。

3. 薄层层析: 制备厚 0.5 毫米的硅胶 H 薄层板(150×200 毫米), 100℃ 活化 2 小时。将少量氯仿溶解的柱层析纯化物, 点在薄层板上呈一横带。以环己烷-苯-氯仿-丙酮(体积比 20:40:35:5)为展开剂, 在连续展开槽中使样品展开到薄层板前沿。待溶剂挥发后在长波紫外光下画出砖红色荧光谱带, 用不锈钢刀刮下硅胶备用。

三、杂色曲霉素结晶的制备

将上述刮下的硅胶装入玻璃层析柱中(10×300 毫米)。用 50 毫升重蒸丙酮洗脱, 收集全部洗脱液。溶剂全部挥发后, 在容器壁上

* 有关光谱测定承中国医学科学院卫生研究所胡文娟同志、中国科学院河南化学研究所一室和本院郝福新、周展明等协助; 微生物诱变试验由河南医学院微生物学教研室协助、特此致谢。

出现一圈细密的淡黄色针状结晶。用重蒸无水乙醚冲脱结晶,收集在烧杯中,在等体积混合的丙酮-无水乙醚中重结晶一次,将结晶置恒温干燥器中用丙酮恒温减压干燥1小时,在恒温干燥器中通入氮气解除负压,密封样品,低温避光保存。

四、制备物的鉴定

淡黄色针状结晶的杂色曲霉素,熔点为243.5—244.5℃(文献值246℃);气相色谱测定为单一尖峰;质谱、紫外光谱、红外光谱和核磁共振波谱鉴定,均与文献报道的杂色曲霉素相同。

用五日龄莱亨鸡胚卵黄囊试验,半数致死量为4.5微克/只(文献值5.0—7.0微克/只),置信限9.55—2.09微克/只($P=0.05$)。存活鸡胚发育迟缓、个体小,爪扭曲,与文献报道一致^[2]。噬菌体诱导试验呈强阳性。

稻米中杂色曲霉素的测定

三氯化铝能与杂色曲霉素形成复合物。该复合物在365毫微米波长的紫外光激发下能产生持久的亮黄色荧光。杂色曲霉素的含量可根据薄板层析时的最低检出量计算。

一、试剂

乙酸乙酯、甲醇、氯仿、石油醚(30—60℃)、苯、无水乙醇、氯化钠、无水硫酸钠、环己烷、冰乙酸、三氯化铝、硅胶G。

杂色曲霉素标准溶液:准确称取杂色曲霉素结晶10毫克,用苯定容于100毫升棕色容量瓶中。将此浓度为100微克/毫升的溶液用苯稀释为10微克/毫升和0.5微克/毫升的溶液。

二、测定步骤

1. 杂色曲霉素的抽提^[3]:称取40克糙米粉,置于200毫升具塞三角瓶中,加蒸馏水20毫升,乙酸乙酯100毫升,振摇半小时,静置片刻,过滤,取滤液50毫升加入K. D浓缩器中浓

缩近干,或用瓷蒸发皿自然蒸发至干,亦可在70℃恒温水浴中蒸发至干。

2. 抽提液的净化:上述残渣用30毫升甲醇-5%氯化钠水溶液(体积比4:1)分数次反复洗入125毫升分液漏斗(1号)中,振荡后静置分层,下层放入另一个同样大小的分液漏斗(2号)中。在1号分液漏斗中加入20毫升甲醇-5%氯化钠水溶液,振荡分层后,下层并入2号分液漏斗中,加入10毫升5%氯化钠水溶液,使溶液中甲醇与氯化钠溶液比例由4:1变为2:1。依次各用20毫升氯仿分配提取2次。氯仿层放入100毫升具塞三角瓶中,加入15克无水硫酸钠,快速振荡5分钟,用脱脂棉过滤到150毫升瓷蒸发皿中,自然蒸发干,或在60℃恒温水浴上蒸发干,或转入K. D. 浓缩器中浓缩近干。用苯数次洗涤残渣,移入1毫升具塞小瓶中。点样前定容到1毫升。若使用K. D. 浓缩器,则加1毫升苯于浓缩瓶中,加塞振荡2分钟,上层清液转入1毫升具塞小瓶中备用。

3. 双向薄层层析:用硅胶G制备厚约0.20毫米的薄层板,板面应致密、坚固。在110℃活化1小时,放入干燥器中备用。

第一块薄层板上点两个点:距板端20毫米中心点加样液20微升,左侧约20毫米处点加浓度为0.5微克/毫升的杂色曲霉素标准液10微升。

第二块薄板同法点样,但在样液点上再点加杂色曲霉素标准溶液(浓度10微克/毫升)10微升。

点样后,先在环己烷-乙酸乙酯(体积比80:20)横展(杂色曲霉素标准点在下),展至薄板上沿时立即取出。蒸发去溶剂后再用苯-冰醋酸-甲醇(体积比88:3:9)展开100毫米。趁溶剂未干时即喷20%三氯化铝乙醇溶液,在80℃烘箱中活化10分钟,取出再喷一次显色。

4. 观察与计算:显色后的薄板在365毫微米波长紫外光下观察,若样品中含有杂色曲霉素,它在薄板上的位置如图1所示, R_f 值约为0.6。如果第一块薄板上发现样品有亮黄色荧光

点, 第二块薄板上样品与标准点为一重合的亮

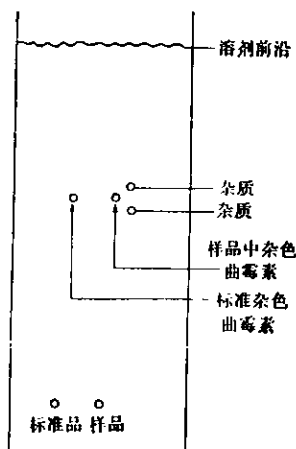


图1 杂色曲霉素在薄板上的位置

黄色荧光点, 则证明样品中确实含有杂色曲霉素。如果其荧光强弱与标准点相当, 则样品中杂色曲霉素含量为 12.5ppb; 若样品斑点荧光比标准点的强, 可减少点样量或稀释样品, 直至与标准点荧光强度相当。按下式计算样品中杂色曲霉素含量:

杂色曲霉素含量(微克/公斤)

$$= \text{最低检出量} \times \frac{1 \times D}{V} \times \frac{1000}{W}$$

式中: D 为样品稀释倍数; V 为与最低检出量荧光强度相当的点样毫升数; W 为样品重量。

本实验室杂色曲霉素最低检出量为 0.005

微克。0.002 微克时尚可见, 但荧光斑点发暗。此方法的回收率在 90% 以上。

5. 样品中杂色曲霉素的确证方法^[1]: 将全部提取液点在薄层板上, 展开后刮取紫外光下呈砖红色荧光带的部分, 用丙酮洗下毒素, 分成两份装瓶。蒸发干后, 一瓶加入 0.5 毫升 0.1 NHCl, 另一瓶加入 0.5 毫升吡啶和 0.1 毫升醋酸酐。振荡后, 将两瓶置蒸汽浴上加热半小时, 再在氮气流中蒸发干。同时同样处理两份杂色曲霉素标准品溶液 (10 微克/毫升), 每份 5 微升。

加尽量少的氯仿溶解残渣后, 薄板层析, 用丙酮-氯仿(体积比 5:95)展开。同时用标准杂色曲霉素溶液 (100 微克/毫升) 10 微升点一标准点。在紫外光下, 杂色曲霉素乙酰化物斑点位置在标准品斑点之下 1/2 处呈蓝色荧光。用 20% 三氯化铝乙醇溶液喷雾, 在紫外光下观察, 经 HCl 处理的杂色曲霉素斑点在标准品斑点位置下 1/4 处呈黄色荧光斑点。

参 考 文 献

- [1] Stack, M. and J. V. Radricks: *Jour. A.O.A.C.*, 54(1): 86—90, 1971.
- [2] Schroeder, H. W. and W. H. Belten: *Appl. Environ. Microbiol.*, 30(4): 589—591, 1975.
- [3] 鶴田 理, 真鍋 勝: 日本農林食品綜合研究所研究報告, 32: 281—287, 1977.
- [4] Patterson, D. S. P. and B. A. Roberts: *Jour. A.O.A.C.*, 62: 1265—1267, 1979.