

# 双向薄层色谱法测定粮食中的杂色曲霉素

胡文娟 田长清 罗雪云 王玉华

(中国医科院卫生研究所, 北京)

杂色曲霉素是一种致癌物质,多采用薄层色谱法测定,其灵敏度为  $30-50 \mu\text{g}/\text{kg}^{1-4}$ 。为开展食品中杂色曲霉素的检验工作,我们于1980年建立了双向薄层色谱法测定大米、玉米、小麦中的杂色曲霉素,此法不仅灵敏度可达  $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,而且省去了层析柱净化的操作步骤,排除了样品中的假阳性结果。双向薄层色谱法也可应用于黄豆、花生样品的测定。

## 一、原理

样品中的杂色曲霉素经提取净化、浓缩、点样展开后,用三氯化铝显色,再经加热产生一种在紫外光下显示黄色荧光的物质,根据在薄层上显示的荧光最低检出量来测定样品中杂色曲霉素的含量。

## 二、杂色曲霉素标准液的配制

用苯将杂色曲霉素标准品配制成每毫升含杂色曲霉素1和  $0.4 \mu\text{g}$  的标准液。杂色曲霉素标准品的测定是用紫外分光光度计标定其浓度(最高吸收峰波长为  $325\text{nm}$ ,分子量324,克分子消光系数15200),并作硅胶薄层色谱纯度鉴定。

## 三、双向薄层色谱测定方法

### (一) 杂色曲霉素的提取

称取过20目筛的大米、玉米、小麦样品20g(花生样品过10目筛),置锥形瓶中,加体积比为90:10的甲醇:4%氯化钠水溶液80ml,振荡30分钟,过滤,收集样液40ml(黄豆、花生样品取20ml,加入20ml,空白提取剂),移入分液漏斗中,再加入4%氯化钠水溶液25ml(使甲醇与水之体积比为55:45)和石油醚25ml(沸程  $30-60^\circ\text{C}$ ),振摇2分钟,静置分层。上层石油醚溶液置锥形瓶中,下层溶液仍移入原分

液漏斗中。下层溶液再用25ml石油醚重复提取一次。最后将两次上层的石油醚溶液合并,加入体积比为55:45的甲醇:4%氯化钠水溶液25ml,振摇半分钟(花生、黄豆样品则加入体积比为70:30甲醇:4%氯化钠水溶液25ml,振摇15秒钟),再用体积比为55:45的甲醇:4%氯化钠水溶液提取两次(黄豆、花生样品重复用体积比70:30的甲醇:4%氯化钠水溶液提取一次),以回收该层中的杂色曲霉素。下层溶液合并后加氯仿30ml(黄豆、花生样品中除加氯仿外,再加4%氯化钠水溶液13ml,使甲醇与水的体积比为55:45),振摇2分钟,静置,待上层混浊液有部分澄清时,即可将下层溶液放有无水硫酸钠(10g)的慢速滤纸过滤于蒸发皿中。漏斗中再加氯仿10ml,重复提取一次,将该下层溶液和用少量氯仿洗滤器的氯仿液一并放入蒸发皿中,将蒸发皿放于  $65^\circ\text{C}$  水浴中挥干,然后再冰浴2—3分钟,加苯1ml将干物质溶解混匀,置小试管,供色谱测定。

### (二) 双向薄层色谱测定和计算

1. 点样: 在距两块硅胶G薄层板( $100 \times 100 \times 0.3\text{mm}$ ,经  $105^\circ\text{C}$  活化2—3小时,青岛海洋化工厂生产)下端0.8—1cm基线上滴加样液,如距左边缘0.8—1cm处各滴加标准液( $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ )  $10 \mu\text{l}$ ,在距左边缘4cm处各滴加样液  $80 \mu\text{l}$ (黄豆、花生样品为  $40 \mu\text{l}$ ),然后在第二块板的样液点上加滴标准液( $0.4 \mu\text{g}/\text{ml}$ )  $10 \mu\text{l}$ 。

2. 展开: ①横向展开: 展开剂为乙醚:正己烷:苯:氯仿:甲酸(3:9:1.5:1.5:0.6V/V) 15.6ml,展至9cm左右取出挥干。

②纵向展开: 展开剂为苯:甲醇:冰醋酸(90:8:2 或 92.5:6:1.5V/V) 15ml,展至9cm

左右取出挥干。

③显荧光：在薄层板上喷 20% 三氯化铝 ( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) 乙醇溶液，置  $80^\circ\text{C}$ ，加热 10 分钟，立即在紫外光 (波长 365nm) 下观察结果，待薄层板冷却后再薄层的喷第二次 (不需加热)，可直接观察结果。

④评定结果：<sup>1</sup>在紫外光下观察，若第二板的第二点在标准点的相应处出现最低检出量，而在第一板的相同位置上未出现荧光点，则样品中杂色曲霉毒素含量在  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  以下 (黄豆、花生样品为  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  以下)，若出现荧光点的强度与标准点的最低检出量的荧光强度相等，而且此荧光点又同第二板样液的标准点相重叠，则样品中杂色曲霉毒素含量为  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  (黄豆、花生样品为  $20\mu\text{g}/\text{kg}$ )，若出现荧光点强度比标准点的最低检出量强，则根据其荧光强度估计减少滴加微升数，或将样液稀释后再滴加不同微升数，直至样液点的荧光强度与最低检出量的荧光强度一致为止，在喷三氯化铝第一、二次后分别进行观察评定，两次结果应一致。若不一致时需分析原因或重复测定，若结果为阳性，则将薄层板放暗处 10 分钟后，再观察一次，以进一步核实结果。两次喷三氯化铝的目的是第一次喷后杂色曲霉毒素荧光点较易消退，喷第二次可增加其荧光强度，而且对消除底色干扰有一定作用。

⑤ 计算公式\*：杂色曲霉毒素 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) =  $0.004 \times \frac{V_1 \times D}{V_2} \times \frac{1000}{W}$

3. 该法的回收率：在大米、玉米或小麦粉中加入杂色曲霉毒素  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  时 (黄豆、花生样品中加入水平为  $20\mu\text{g}/\text{kg}$ )，用双向展开法测定，杂色曲霉毒素的回收率可达 75% 以上，故认为用本法测定大米、玉米及小麦的灵敏度为  $5\mu\text{g}/\text{kg}$  (黄豆、花生则为  $20\mu\text{g}/\text{kg}$ )。

4. 确证试验：按 Stack 方法<sup>[5]</sup>的原理，建立了样品中杂色曲霉毒素含量的确证方法。即在薄层板 ( $10 \times 20\text{cm}$ ) 上滴加一个点标准液 ( $0.4$

$\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $10\mu\text{l}$  与三个点样液，每点  $16\mu\text{l}$ 。在样液的一个点上再加滴标准液 ( $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $10\mu\text{l}$ ，另一点上则加滴标准液 ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )  $10\mu\text{l}$ 。于各点上再加一小滴三氟醋酸，放暗处反应 10 分钟，热风吹 5 分钟，使薄层板上的温度不高于  $40^\circ\text{C}$ ，用冰醋酸：苯 ( $10:90\text{V}/\text{V}$ ) 展开 1—2 次，直至杂色曲霉毒素衍生物与杂质分开为止，展开时要避光，以后显荧光等步骤同于上法。确证法的灵敏度大米、玉米、小麦为  $25\mu\text{g}/\text{kg}$  (黄豆、花生为  $50\mu\text{g}/\text{kg}$ )。

#### 四、讨论

1. 苯-甲醇-冰醋酸展开系统在国外应用较广，其体积比以  $90:8:2$  较为合适，但此系统使一些样液在薄层色谱上仍有类似杂色曲霉毒素的荧光点干扰测定。在此情况下我们摸索研究出本文的横向展开剂，再以苯-甲醇-冰醋酸作为纵向展开剂，建立了双向薄层色谱法。于 1980—1981 年我们应用此法普查了广西隆安县 213 份样品及其他样品共 278 份，发现其中只有 1 份黄绿豆混合样品有类似杂色曲霉毒素的荧光点干扰，但放置 10 分钟后荧光点随即消失，不影响测定结果。

2. 横向展开剂使用时，由于各种试剂不易相混，所以每次要按展开槽的大小配制用量，用时要充分摇匀。

#### 参 考 文 献

- [1] Stack, M. et al.: J. A. O. A. C. 54: 86—90, 1971.
- [2] Shannon, G. M. et al.: J. A. O. A. C. 59: 963, 1976.
- [3] Athnastos, A. K. et al., J. A. O. A., C. 60: 104—106, 1977.
- [4] Horwitz, W. et al.: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 12th ed. p. 469, Washington, 1975.
- [5] Stack, M. E. et al.: J. A. O. A. C. 59: 966—970, 1976.

\* 式中  $V_1$  示加入苯的体积 (ml);  $V_2$  示出现最低荧光时滴加样液的体积 (ml);  $D$  示样液的总稀释倍数;  $W$  示苯溶解时相当样品的重量 (g);  $0.004$  示杂色曲霉毒素的最低检出量 ( $\mu\text{g}$ )。