

高压液相色谱法检测食品中棒曲霉素的研究

蒋雄图 虞左向

(食品科学与工程系)

摘要 用高压液相色谱法从果品加工食品中分离和测定了一种引起果品霉烂, 主要引起苹果霉烂的真菌代谢有毒产物棒曲霉素。样品经乙酸乙酯萃取后, 对果汁用碳酸钠溶液纯化, 对果酱用甲苯-水作洗脱剂, 硅胶柱层析处理, 分离出棒曲霉素。文章提出了分离棒曲霉素的^{最佳分离条件}。在 C₁₈ Micropak MC-H柱或 μ-Bondapak柱上, 用四氢呋喃-水溶液作流动相, 用276nm或254nm紫外吸收波长, 以反相液相色谱法测定棒曲霉素。棒曲霉素浓度与峰面积间具有良好的线性关系, 回收率达90%, 变异系数小于10%, 最小检测约1.5—2μg/l。

主题词 棒曲霉素; 展青霉素; 真菌毒素; 高压液相色谱

棒曲霉素(Patulin)又称展青霉素, 化学名称4-羟基-4H-呋喃(3,2C)吡喃-2(6H)酮, 是青霉属、曲霉属、裸囊菌属和丝衣霉属中某些真菌的内酯代谢产物。动物病理试验发现棒曲霉素对某些动物具有致畸、致癌与致突变性^[1-4]。

据资料介绍棒曲霉素污染果蔬等食品的情况相当广泛, 特别在霉烂苹果、梨、杏、甜樱桃、桃子、蕃茄、胡萝卜、山渣、葡萄中均都检测到棒曲霉素^[5-6], 污染程度也相当严重, 世界卫生组织(WHO)已规定在稀释后供饮料用的苹果汁中, 棒曲霉素的最高允许限量为50μg/l^[11]。

检测棒曲霉素的方法最早用微生物法^[12]、纸色谱法^[13-14]、1965年开始用薄层色谱法^[15-19], 目前, AOAC法^[20]仍然是薄层色谱法。近年, 刘勇等用双向展开薄层色谱法测定了苹果等样品中的棒曲霉素^[21]。但由于薄层色谱法本身存在的短处, 准确度、灵敏度和分析速度都不够理想, 70年代Pohland^[22]与Scott^[23]等相继用气相色谱法和色-质法检测棒曲霉素, Ware等^[10]与Ware^[24]提出用高压液相色谱法测定, 之后, 高压液相色谱法已有取代薄层色谱法的趋向^[25]。

本研究采用通用的反相高压液相色谱法, 在碳18键合型, 硅胶柱上用四氢呋喃/水溶液为流动相作等强度洗脱, 用276nm波长紫外光度检测器, 对果品加工食品中的棒曲霉素测定方法进行了探索, 工作中对样品的预处理作了比较深入的探讨。实验证明, 本方法的灵敏度、回收率与重复性都能达到令人满意的程度, 这一测定方法在国内尚属首次提出, 填补了霉菌毒素检测方法方面的一项空白。

本文1989年9月6日收到。

*现在瑞典农业科学大学食品卫生系学习

1 实验部分

1.1 试剂

乙酸乙酯 A.R

四氢呋喃 A.R

三氯甲烷 A.R

无水碳酸钠 A.R

无水硫酸钠 A.R

无水乙醇 A.R 0.5 μ m FH过滤脱气

甲 醇 A.R

超 纯 水 煮沸, 0.45 μ m HA过滤脱气

硅 胶 层析级(60—100目)110 $^{\circ}$ C活化 2 h

消毒 剂 铬酸洗液, 5%次氯酸钠溶液, 1%过硼酸钠溶液, 一般接触过棒曲霉素的器皿, 场所用5%次氯酸钠溶液浸泡或擦洗即可达到消毒目的, 对皮肤、手可用1%过硼酸钠溶液消毒, 用铬酸溶液洗涤的器皿, 可不再用其它消毒剂洗涤。

细 海 砂

棒曲霉素 色谱纯(美国(Sigma公司进口), 0 $^{\circ}$ C以下贮藏。

棒曲霉素标准溶液 称取色谱纯棒曲霉素约2mg, 用少量三氯甲烷溶解, 并定容于25m^l棕色容量瓶中, 配成约80 μ g/ml的棒曲霉素溶液, 取此溶液1.0ml于5ml容量瓶中, 在氮气流下, 40 $^{\circ}$ C水浴上蒸发至干, 立即往瓶中加入无水乙醇至刻度, 摇匀, 按下述方法测定其浓度。

取此溶液于1cm石英比色皿中, 同时以无水乙醇作参比溶液, 在276nm处测定其吸光度, 然后根据下式计算棒曲霉素溶液的浓度:

$$\text{棒曲霉素}(\mu\text{g}/\text{ml}) = A \times M \times 1000 \times C_f / \varepsilon \times \text{稀释倍数}(5/1)$$

式中

A——吸光度 M——棒曲霉素的分子量

C_f——仪器校正因子^[26]

ε ——摩尔吸光系数^[22]14600

经准确确定浓度的棒曲霉素标准溶液用铝箔包裹, 贮存于0 $^{\circ}$ C冰箱中, 使用前将溶液恢复至室温, 再解开铝箔。

C_f的测定溶解一定量的基准级重铬酸钾于0.009molH₂SO₄溶液中, 配成4 \times 10⁻⁴mol, 2 \times 10⁻⁴mol, 1 \times 10⁻⁴mol三种标准溶液, 在1cm石英比色皿中, 以350nm, 并以0.009molH₂SO₄液作参比液, 分别测定三种标准溶液的吸光度, 计算出重铬酸钾的摩尔消光系数。

由此计算校正因子C_f

$$C_f = 3160 / \varepsilon_{\text{平均}}$$

3160为重铬酸钾的摩尔消光系数, $\varepsilon_{\text{平均}}$ 为测得的重铬酸钾摩尔消光系数, 本方法用岛

UV-240紫外可见分光光度计,测得 C_f 值为:

$$C_f = 3160/3283 = 0.96$$

棒曲霉素工作溶液 准确移取一定体积的棒曲霉素标准溶液于棕色容量瓶中,在氮气流下40℃左右水浴上蒸发至干,用pH4的水溶液定容至刻度,由此再稀释成合适浓度的棒曲霉素工作溶液。

pH4水溶液 用醋酸调节超纯水的pH至4左右

1.2 主要仪器

高压液相色谱仪 Waters 510型、Varian 5000型 数据处理机 730型 SP4270积分器紫外光度检测器 M441型、UV-100可变紫外检测器

旋转蒸发器 2FQ-81型(上海医械专机厂)

超级恒温水浴 501型(上海实验仪器厂)

调速多用振荡器 HY-4型(江苏金坛国华仪器厂)

紫外可见分光光度计 UV-240型(日本、岛津)

酸度计 pH5-2型 (上海分析仪器厂)

样品过滤器

1.3 色谱操作条件

μ Bondapak C_{18} 3.9×300(8-10) μ m色谱柱或Micropak MCH-5 4×150 5 μ m色谱柱

流动相 0.6或0.8%四氢呋喃(THF)/水等强度洗脱

流量 1.0ml/min

检测器 紫外分光光度检测器

波长 276nm,在仪器条件限制时,可用254nm

柱温 25-35℃,进样量10 μ l,自动进样

1.4 实验方法

1.4.1 样品预处理

(1)果汁、果晶类 取适量样品加超纯水稀释成饮用果汁,取此果汁25ml,加入乙酸乙酯3×25ml,分别萃取3次,每次振荡3min,弃去水相,合并有机相,用10ml0.5%NaCO₃溶液迅速洗涤有机相,洗涤时间控制在1min内,待静置分层后,分离水相与有机相,水相再用少量乙酸乙酯洗涤一次。合并有机相,然后将有机相在38℃水浴上,用旋转蒸发浓缩器减压蒸发至干,并立即用少量乙酸乙酯淋洗瓶壁3-4次,所得溶液在38-40℃水浴上通氮挥去溶剂,再用pH4的水定容至1ml。溶液经样品过滤器过滤后,移取一定量作色谱测定。

(2)果酱类 称取5g果酱与5g左右无水Na₂CO₃及15g左右细海砂混合,搅拌成分散的团块状或颗粒状,然后加入3×25ml乙酸乙酯,分3次萃取,每次振荡5min,合并分出的有机相,于有机相中加入无水Na₂SO₄20g,干燥30min,分出有机相,用少量乙酸乙酯洗涤无水Na₂SO₄一次,合并有机相。

将此有机相在38℃水浴上用旋转蒸发浓缩器减压蒸发至约30ml，加入甲苯调整体积约100ml，备用。

在20×300mm带活塞的层析柱底部填进少许清洗干净的玻璃纤维，柱中加入10ml甲苯，称取15g活化处理的硅胶，用25ml甲苯调成糊状，注入柱中，于硅胶顶部复盖15g无水Na₂SO₄，然后开启活塞，流去甲苯直至到达Na₂SO₄层顶部为止。

将甲苯样品液缓缓注入柱中，流去多余的溶剂直至液面降至硫酸钠层顶部为止，然后用70：30甲苯：乙酸乙酯作洗脱剂，控制洗脱速度约10ml/min，弃去最初流出的25ml，收集馏分约250ml。

将收集的馏分在60℃左右水浴上，减压旋转蒸发至干，用少许乙酸乙酯洗涤瓶壁3—4次，然后在38—40℃水浴上通氮挥去溶剂，再用pH4的水溶液定容至1ml，此试液经样品过滤器过滤后，作高压液相色谱测定。

1.4.2 定量结果计算

(1)标准溶液 配制不同浓度的棒曲霉素工作溶液，依次10μl定量进样，绘制工作液浓度—峰面积曲线，得棒曲霉素标准曲线如图1。

标准曲线的浓度范围可根据要求规定。

(2)计算方法 样品中棒曲霉素的含量按下式计算(以饮用果汁计)

$$\text{棒曲霉素}(\mu\text{g}/\text{l}) = C \times 1/25 \times 1000$$

C为从标准曲线上查得的棒曲霉素浓度(μg/ml)，1/25为浓缩倍数。

1.5 实验条件选择

1.5.1 样品纯化处理条件

(1)碱洗法纯化条件的选择 按照文献[11]、[28]提出的碱洗纯化条件，回收率很不理想，为了确定最优纯化条件，采用五因素四水平正交试验考察了碱洗法纯化预处理过程中，若干主要操作对加标回收的影响。

设计的正交试验方案如下

水平 \ 因素	A 蒸发温度 (℃)	B 萃取时间 (min)	C 碳酸钠浓度 (%)	D 加标量 (μg/ml)	E 碱洗时间 (min)
1	35	1	0.5	5.98	1
2	40	3	1.5	11.42	2
3	45	5	2.5	20.73	3
4	50	7	3.5	41.47	4

通过试验，得出最优化条件为硫酸钠浓度0.5%，碱洗1min，蒸发温度35℃，加标适

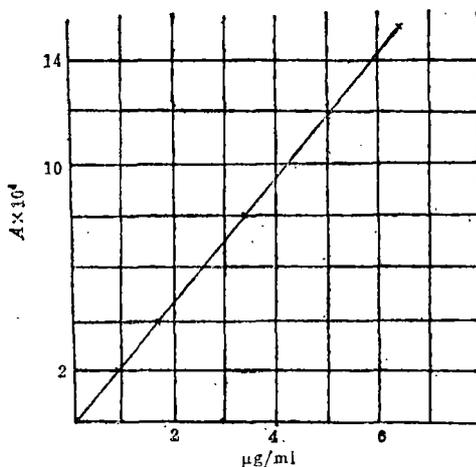


图1 棒曲霉素标准曲线

量, 萃取 1 min。为防止棒曲霉素在整个碱处理过程中发生降解, 增加方法的安全性, 适当缩短碱洗时间, 从 1min 减至 0.5min, 将蒸发温度从 35℃ 适当提高至 38℃, 以便缩短完成蒸发的加热时间, 萃取时间增至 3min, 以增加萃取的完全程度, 在此确定的优化条件下测得, 回收率基本稳定在 90%。

(2) 柱层析优化条件的选择 对于基质十分复杂的样品可采用柱层析纯化处理, 由于通过柱层析的溶剂总体积约有 300ml, 为了避免棒曲霉素的损失, 缩短收集和蒸发时间, 减小棒曲霉素在蒸发洗脱剂的较高温度下分解的可能, 需要确定收集棒曲霉素高含量的馏分区间。

实验证明, 棒曲霉素的最高含量集中在 50—250ml 的馏分区。

本实验在使用 20×300mm 层析柱时, 弃去首尾各 25ml 洗脱剂, 收集中间馏分约 250ml, 保证将棒曲霉素全部收集。

1.5.2 碳柱的选择 在反相高压液相色谱中常用键合型碳柱作分离柱。本实验对下列几种碳柱的柱效进行了评价, 列表于下。

碳柱名称	规格 (mm)	粒度 (μ)	板数/米 × 10 ²	分离度	保留时间 (min)	柱温 (°C)	流动相 (THF/H ₂ O)	新旧情况
μ. Bondapak C ₁₈	3.9×300	8—10	146	4.0	10.40 9.73	20—25	0.8% 0.6%	旧
Micropak MCH—5	4×300	5	230	5.4	14.73	25	0.8%	新
Micropak MCH—5	4×150	5	275	3.8	8.50	30—35	0.8%	新
Nucleosil C ₁₈ —7	4.6×250	7	340	7.0	13.70	28	0.6%	新

实验证明上述 4 支碳柱都可使用, 在本实验中选用保留时间较短的 μ. Bondapak 和 Micropak MCH-5 4×150 柱为分离柱。

1.5.3 流动相的选择 本实验中比较了水和四氢呋喃/水溶液两种流动相, 发现用水作流动相时, 棒曲霉素在一大杂质—5 羟基-2-糠醛 (HMF) [19,24,25,27] 之前流出。

微量组分若在大含量组分前流出, 则受到的干扰小, 从这方面考虑用水作流动相较好, 但其缺点是柱压较高, 分析时间较长, 若用四氢呋喃/水溶液作流动相则 HMF 峰在棒曲霉素峰之前, 分离时间缩短一倍多, 柱压也较低, 分离度也大有提高, 图 2 (1) 与 (2) 分别为用此两种流动相洗脱苹果汁样品的色谱图, 并将两种流动相对棒曲霉素的分离情况列表比较于下:

色谱柱	流动相	流量 (ml/min)	柱压 (atm)	分离度	保留时间 (min)	柱温 (°C)	附注
Micropak MCH—5	0.8% THF/ H ₂ O	1.0	80	3.4	8.49	35	图 2 (1)
4×150	H ₂ O	1.0	102	1.8	19.41	35	图 2 (2)

同时发现流动相中 THF 含量的多少会对棒曲霉素峰与前后两杂峰间的分离度产生明显影响, THF 量增加棒曲霉素峰后移, 与 HMF 峰的分度增大, 而与后小杂峰的分度变小, 当 THF 含量为 0.6—0.8% 时, 棒曲霉素峰与其前后杂峰的分度情况达到最佳。

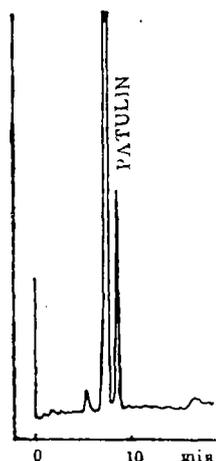


图2(1) 0.8%THF/H₂O作流动相的色谱图

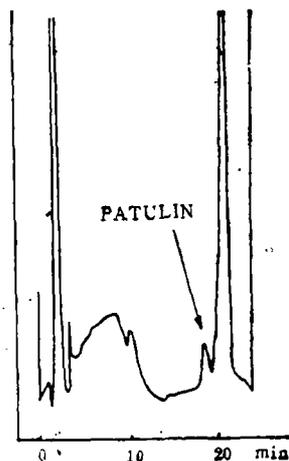
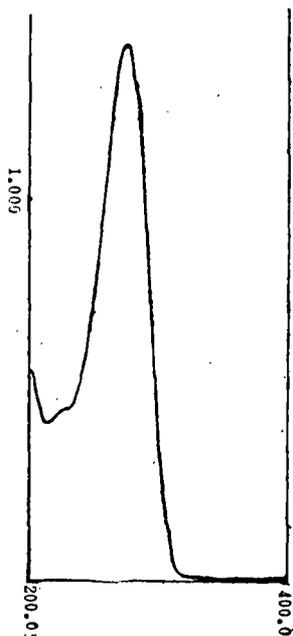


图2(2) 纯水作流动相的色谱图

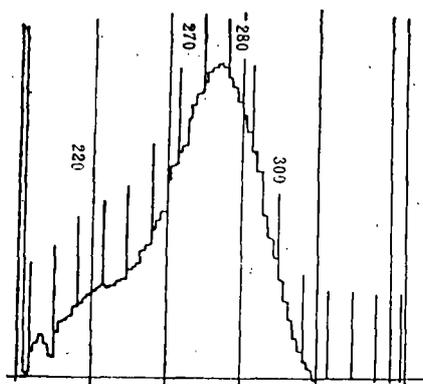
1.5.4 最大吸收波长的选择 用紫外光谱扫描测得棒曲霉素标样的最大吸收波长为275—276nm(图3)。测得的波长与文献值[20]完全一致。

用Waters高压液相色谱仪，对样品作紫外停流扫描(图4)其最大紫外吸收波长也为275—276nm。



UV-240 紫外分光光度计
溶剂：无水乙醇

图3 棒曲霉素标样的紫外光谱扫描图



色谱柱：μ. Bondapak
C₁₈3.9×300
流动相：0.8%THF/H₂O
流量：1.0ml/min
波阶：2nm

图4 样品中棒曲霉素紫外停流扫描图

1.6 测定结果

1.6.1 样品测定

(1) 苹果原汁

样品编号	样品来源	曲霉素含量 (稀汁: $\mu\text{g/l}$)	平均含量 ($\mu\text{g/l}$)	标准偏差 S、D	变异系数 (%)	附注
5	山东五莲食品厂	86.6, 90.0, 84.2 88.2, 91.1	88.0	2.7	3.1	
11	山东五莲食品厂	29.8, 27.2, 32.2 27.8, 31.1	29.6	2.1	7.2	
14	山东五莲食品厂	24.4, 27.4, 26.7 29.4, 24.3	26.4	2.1	8.0	
18	山东五莲食品厂	86.8, 92.0, 103.2, 106.4, 95.4	96.8	6.7	6.9	
22	山东乳山果汁厂	12.5, 13.8, 11.5 14.5, 13.7	13.2	1.2	9.4	
1-4 6-10 12-13 15-17 19-21	山东五莲食品厂 山东乳山果汁厂	未检出	—	—	—	
A	市售霉烂苹果自制	2720	—	—	—	单点校正值
B	霉烂苹果自制 经自然发酵	未检出	—	—	—	

(2) 其它样品

样品名称	样品来源	棒曲霉素含量 (稀汁, $\mu\text{g/l}$)	附注
菠萝晶 ¹ ²	广州市桥糖果厂	未检出	
山楂原汁 ¹ ²	河北兴隆茅山 果品加工厂	未检出	
山楂浓浆 ¹ ²	山东酒厂	未检出	柱层析纯化
鲜桃晶 ¹ ²	常熟天然饮料食品厂	未检出 痕量 < 2	
草莓晶 ¹ ²	常熟天然饮料食品厂	未检出	
刺梨原汁 ¹ ²	贵州雷山饮料厂	未检出	
红果酱 ¹ ²	北京果品食品厂	未检出	

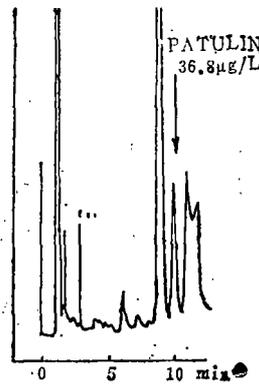
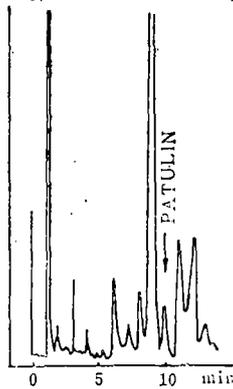
图5为14号苹果原汁样品的色谱图。

1.6.2 回收率

样品中棒曲霉素 ($\mu\text{g/l}$)	加标量 ($\mu\text{g/l}$)	测得量($\mu\text{g/l}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
未检出	192.3	178.3, 185.4 176.1, 180.4 185.4, 175.2	92.7, 96.4 91.6, 93.8 96.4, 91.1	93.7
未检出	113.3	89.8, 95.9 94.8, 91.9 99.8	79.3, 84.6 83.7, 81.1 88.1	83.4
未检出	67.2	62.8, 64.4 62.1, 54.2 56.0, 53.8	93.4, 95.8 92.4, 80.7 83.3, 80.0	87.6
未检出	36.8	33.4, 32.4 32.4, 36.1 33.6, 35.2	90.7, 88.0 88.0, 98.0 91.2, 95.6	91.9

回收总平均值89,2%。

图6(1)、(2)、(3)为不同水平加标回收的苹果汁色谱图。



测定条件：色柱谱 μ , Bondapak C_{18} 3,9 \times 300

流动相：0,6% THF/ H_2O

流 量：1,0% ml/min

λ 254nm

灵敏度：0.02AUFS AT=8

进样量：10 μ l

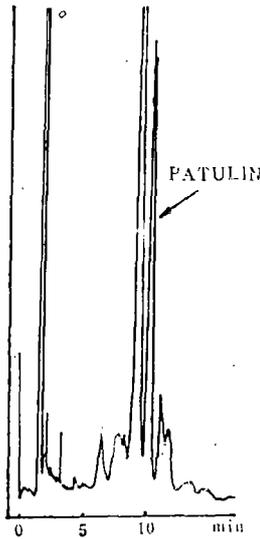
图5 苹果原汁14号样品的色谱图

图6(1)样品号17

测定条件同图5

原样品中未检出棒曲霉素

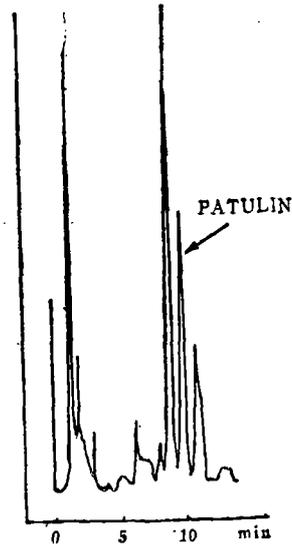
图6(1)加标36.8 $\mu\text{g/l}$ 棒曲霉素的苹果汁色谱图



样品号8未检出棒曲霉素

测定条件同图5 进样量5 $\mu\text{g}/\text{l}$

图6(2) 加标192.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ 苹果汁的色谱图



样品10未检出棒曲霉素

测定条件均同图5 进样量5 $\mu\text{g}/\text{l}$

图6(3) 加标113.3 $\mu\text{g}/\text{l}$ 苹果汁的色谱图

1.6.3 最小检测浓度 根据定义:

灵敏度 $S = A/W/F$, A 为峰面积*, W 为进样量, F 为流动相流速

检测限 $D_c = 2RN/S$, RN 为噪音强度. W_c 为最小检测量.

$W_c^0 = C_2 \cdot F \cdot Y_{1/2} \cdot D_c$. C_2 为流速倒数, $Y_{1/2}$ 为半峰宽

最小检测浓度 $C_c^0 = W_c^0/V$, V 为进样体积

测得 $S = 18325 \times 0.46 / 0.8 \times 10 \times 10^{-3} = 1.06 \times 10^6$

$D_c = 2 \times 44 / 1.06 \times 10^6 = 8.3 \times 10^{-5}$

$W_c^0 = 4 \times 0.46 \times 0.1 \times 8.3 \times 10^{-5} = 1.5 \times 10^{-5} \mu\text{g}$

$C_c^0 = \frac{1.5 \times 10^{-5}}{10} = 1.5 \mu\text{g}/\text{l}$

1.6.4 重复性 取标样的系列工作溶液定量进样, 测得重复性如下表:

*此值为积分仪打印数据, 灵敏度定义中的其它计算因子已由积分仪计算在内

测得浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	进样量 (ng)				
	15	30	60	90	120
测定次数 (n)					
1	0.58	1.20	2.45	3.70	5.40
2	0.58	1.20	2.54	3.55	5.42
3	0.60	1.20	2.54	3.70	5.42
4	0.60	1.25	2.54	3.56	5.42
5	0.62	1.25	2.48	3.50	5.56
6	0.62	1.30	2.52	3.56	5.45
7	0.58	1.22	2.44	3.75	5.50
8	0.65	1.32	2.55	3.80	5.60
9	0.60	1.25	2.46	3.86	5.48
10	0.64	1.25	2.55	—	—
\bar{x} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0.61	1.24	2.51	3.66	5.47
<i>S.D</i>	0.025	0.041	0.044	0.127	0.070
<i>C.V</i> (%)	4.10	3.31	1.75	3.47	1.28

*S. D*标准偏差*C. V*变异系数测定条件: Micropak MCH-5 4×150(5 μ)流动相 0.8% THF/H₂O 流量 1.0ml/min λ 276nm 灵敏度 0.01AUFS

2 讨 论

(1) 食品的基质组分很复杂, 定量采用内标法有困难, 故本方法采用标准曲线法定量, 由棒曲霉素工作溶液制得的标准曲线线性关系良好, 相关系数可达0.9995以上, 线性范围很宽, 从0.8—34.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 最小检测浓度达1.5 $\mu\text{g}/\text{l}$, 回收率可大于90%。

(2) 据文献介绍样品纯化处理有碱洗法^[10,11,24,28]和柱层析法^[20,21]两种, 本实验比较了这两种纯化方法发现用碱洗法处理的样品, 色谱图上杂峰少, 纯化效果好, 柱层析处理的样品色谱上杂峰较多碱法纯化步骤简单, 洗涤浓缩整个过程不超过半h, 柱层析法步骤多, 先后共需约3h, 碱法纯化、碱洗时间长短, 温度高低, 都会影响棒曲霉素的稳定性, 从而影响测定结果的准确性, 而柱层法对棒曲霉素的稳定性基本上无影响, 柱层法溶剂用量多, 甲苯有毒性, 碱法用碳酸钠溶液对人体无害, 但层析法中层析柱只能用一次, 重复使用时, 柱效下降, 纯化效果变差。

(3) 碱洗时间, 碱液浓度与蒸发温度对测定结果的影响 棒曲霉素结构中的 γ -内酯在OH作用下发生水解而开环, 碱洗时间长或碱液浓度大都有利于此水解反应的进行, 蒸发温度的升高可加快此水解反应速度, 所以适当降低碱浓度和碱接触时间, 降低蒸发温度都可增加棒曲霉素的稳定性, 提高其回收率。

(4) 本方法与AOAC法的比较 1984年14版AOAC分析棒曲霉素的标准法^[20]仍采用硅

胶柱层析纯化, 薄层色谱法, 今就AOAC推荐的薄层色谱法与本方法的优缺点大体比较如下表:

方 法	AOAC标准法(TLC法)	本方法(HPLC)
样品预处理步骤	萃取、脱水、柱层析纯化浓缩	(1)碱洗法: 萃取、碱洗、二次浓缩。 (2)柱层析法: 同AOAC法
测定方法	(1)点样展开, MBTH显色剂显色定性 (2)确证	(1)色谱分离 (2)根据峰面积, 标准曲线定量
分析时间	约5h	碱洗法<1h 柱层析法约3h
分离情况	杂质干扰较严重, 斑点有重叠或拖尾等现象。	与相邻杂质峰完全分开, 分离度>1.5
准确性	半定量, 有可能假阳性检出需作进一步确证	可准确定性, 定量 变异系数小于10%
线性范围	—	0.8—34.43 $\mu\text{g}/\text{ml}$
检测限	约20 $\mu\text{g}/\text{l}$	~1.5 $\mu\text{g}/\text{l}$
回收率	—	~90%

由表列内容可知, 本方法在分离情况、分析时间、准确性、检测限等方面都优于AOAC法。

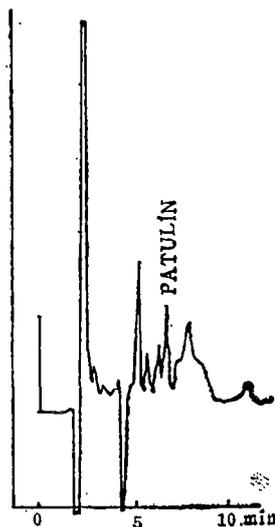
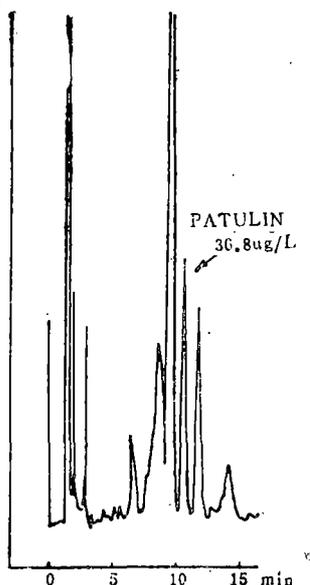
(5)本方法与国外文献介绍的方法比较 本方法在Forbito^[11]和Moller^[28]工作的基础上, 在碱浓度、碱洗时间、浓缩温度及流动相组成等方面作了改进, 经过如此改进后的方法在分离度、检测限与回收率等方面都有了明显提高, 今就分离度等三方面作比较于下:

分离度 采用本方法的分离条件, 并用与Forbito法相同的色谱柱和高压液相色谱仪, 得苹果汁的色谱图如图7, 与Forbito提供的色谱图(图8)比较, 本方法所得的色谱峰峰形尖锐又窄, 基线稳定, 棒曲霉素峰与相邻峰的分度大于2.8, 分离完全, 而在Forbito的色谱图上峰间分度小于1。

检测限

方 法	Moller法 ^[28]	Forbito法 ^[11]	本方法
检测限($\mu\text{g}/\text{l}$)	5	12.8	1.5

本方法的最低检出浓度低于文献报道值。



测定条件：μBondapak C₁₈(8—10μ)

3.9×300柱(Waters)

流动相：0.6% THF

λ：254nm

灵敏度：0.02 AuFS

积分仪：AT=4

图7 加入36.8μgPatulin/l的苹果汁色谱图

测定条件：μBondapak C₁₈柱(Waters)

流动相：0.8% THF水溶液(含0.02%

叠氮钠)

流量：1.0ml/min

λ：254nm

灵敏度：0.01 AuFS

图8 加入30μgPatulin/l的苹果汁色谱图

Forbito J. AOAC 68(5)1985^[11]

回收率

方 法	Stray*[27]	Moller法	Forbito 法	本·方法
加标量(μg/l)	10.4—24.00	10.4—51.8	10.4—41.6	36.8—192.3
平均回收率(%)	82.6	70—75	>75	89.2
变异系数(%)	2.8	—	14.0	4.6

*柱层析纯化

本方法所得的回收率高于相近条件测定的文献值、偏差小，回收稳定。

3 结 论

(1)本方法通过正交试验法及各项条件试验确定了样品处理与定量测定时的各项最优条件，达到了灵敏、快速、准确的要求。

(2)本方法具有满意的回收率(~90%)和重复性，变异系数小于10%，棒曲霉素浓度与峰面积间有良好的线性关系($\gamma = 0.9995$)，最小检测限约1.5—2.0μg/l。

(3)用本方法测定同类样品时，因果品种、产地、收获季节、堆放时间和条件、加工

情况、成品贮藏条件以及色谱柱与试剂性质等的差别,有可能在同一测定条件和同一分析仪器上,测得的色谱图形不完全相同。

(4)应用本方法测定了10类样品,其中国产苹果原汁样品22个,发现部分国产苹果汁中有棒曲霉素,也有一些样品其所含棒曲霉素量已超出世界卫生组织(WHO)规定的限量,这说明国产苹果原汁在加工时,原料中混进了霉烂次品,其它大多数果品加工食品尚未发现受棒曲霉素的污染。

(5)本方法流动相采用0.6—0.8%四氢呋喃(THF)水溶液,实验证明,用这种流动相在使5-羟基-2-糠醛(HMF)与棒曲霉素的分离问题上,比用纯水作流动相具有更多的优点,但流动相中,THF的含量应适当,THF量过小或过大都会引起棒曲霉素色谱峰的前后位移,棒曲霉素峰的前后位移会与其前后杂峰靠近,导致分离度降低。

(6)本实验中使用了Waters510 Varian5000两台高压液相色谱仪和 μ BondapakC₁₈、Micropak MCH-5两支色谱柱,并采用了276和254nm两种检测波长,这样有便于基层单位根据本单位条件选择应用,对于只具有定波长紫外光度检测器的高压液相色谱仪一般可选用254nm,选用254nm时的灵敏度约低于276nm测定时的32%,但与相邻杂峰的分离情况仍令人满意。

致 谢

在本课题实验过程中,得到化工系华东同志、粮食科学研究所施肖峰工程师、食工系肖刚同志的协助,实验所用的标准样在我院丁霄霖教授、陈锡贵教授、吴阳生老师和张灏老师的帮助下获得,轻工部食品发酵研究所胡正芝高工对本文提出了宝贵意见,在此一并表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Ciegler A A, Beekwith C et al. Appl and Envir Microbiol, 1976; 31(5): 664
- 2 Dickens F and Cook J. J Cancer, 1965; 19: 392
- 3 Dickens F and Jones J H E H. J Cancer 1961; 15: 85
- 4 Scott W T and Bullerman L B. J Milk Food Technol, 1975; 38: 695
- 5 Walker J R L. Phytochem, 1969; 8: 561
- 6 Harwig J, Chen Y K et al. Can Inst Food Sei Technol, 1973; 6: 22
- 7 Buchanan J R, Semmer N F et al. J Am Soc Hort Sci, 1974; 99: 262
- 8 Sommer N F, Buchanan J R. Appl Microbiol, 1974; 28: 589
- 9 Wilson D M and Nouvo G T. Appl Microbiol, 1973; 26: 124
- 10 Ware G M, Thorph C W et al. J AOAC 1974; 57: 1111
- 11 Forbite P R and Babsky N E. J AOAC 1985; 68(5): 950
- 12 Tanenbaun S W and Bassett E W. Biochim Biophys Acta 1958; 28: 21
- 13 Borner H. Phytopathol Z, 1963; 48: 370
- 14 Betina V. J Chromatog, 1964; 15: 379
- 15 Scott P M and Sommers E. J Agric Food Chem, 1968; 16(3): 483

- 16 Ough C S and Corison C A. J Food Sci. 1980; 45(3): 476
- 17 Gimeno A and Martins M L. J AOAC, 1983; 66(1): 85
- 18 Acar J and Klaushofer H. Ernahrung(Vienna), 1984; 8(1): 323
- 19 Scott P M. J AOAC, 1974; 57(3): 621
- 20 Official Methods of Analysis of AOAC 14th, 1984 "pauulin"
- 21 刘勇, 胡文娟. 卫生研究, 1988; 17(4): 42
- 22 Pohland A E, Samders K et al. J AOAC, 1970; 53(4): 692
- 23 Scott P M, Miles W F et al. J Agric Food Chem, 1972; 20: 450
- 24 Ware G M. J AOAC, 1975; 58(4): 754
- 25 Steyn P S and Vieggaar R. Mycotoxins and Phycotoxins, 293, 1986
- 26 中华人民共和国国家标准, 食品卫生检验方法理化部分, G.B. 5009 22-85, 80
- 27 Stray H. J AOAC, 1978; 61(5): 1359
- 28 Moller T E and Josefsson. J AOAC, 1980; 63(5): 1055

Studies on the Separation and Determination of Patulin in Food by High Performance Liquid Chromatography

Jiang Xiongtu Yu Zuoxiang

(Dept. of Food Sci. and Eng.)

Abstract A method was described for the separation and determination of Patulin, a kind of toxic mycotoxin metabolized in particular, by the apple-rotting fungus, *Penicilium expansum*, in fruit processing products, using high performance liquid chromatography. The sample was pretreated by extraction with ethyl acetate and cleaned up with Na_2CO_3 solution for fruit juice sample or chromatographed on activated silica column, eluted with toluene-water eluent for fruit jam sample. The optimum separation conditions were discussed. Patulin was determined using reverse phase liquid chromatography at U.V. 276nm. or 254nm. on C_{18} column of MICROPAK MC-H or μ -Bondapak, with tetrahydrofuran-water solution as mobile phase. A good linear relationship was obtained between patulin concentration and peak area. The recovery of patulin was about 90%. The variation coefficient was less than 10% and detecting limit was about 1.5—2 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Subject words Patulin; *Penicilium expansum*; mycotoxin; High performance liquid chromatography