

文章编号:1009-038X(2001)02-0164-05

TLC 及 HPLC 测定红曲产品中的桔霉素

陈蕴¹, 许赣荣¹, 顾玉梅¹, Philippe BLANC²

(1. 无锡轻工大学生物工程学院, 江苏无锡 214036; 2. Laboratoire Biotechnologie-Bioprocesses, CNRS, INSA, Toulouse, France)

摘要: 阐述了定性及定量测定红曲产品中桔霉素含量的几种方法, 采用板层析(TLC), 在点样量为 1 mL、点样长度 5 cm 条件下通过目视法, 标准桔霉素溶液的最低检测质量浓度可达 0.2 mg/L, 板层析可作为定性检验红曲产品中桔霉素的简便方法, 根据红曲样品预处理方法及 HPLC 检测器的不同, 确定了两套准确可靠的定量检测方法, 高效液相色谱结合荧光检测的最低检测限为 0.60 ng, HPLC 上样液最低可检测的质量浓度为 0.1 mg/L, 在 0.1~10 mg/L 的质量浓度范围内, 标准桔霉素溶液的质量浓度与峰面积的线性关系良好, $R^2=0.998$, 红曲样品桔霉素的测定结果重复性较好。

关键词: 薄板层析; 高效液相色谱; 红曲; 桔霉素

中图分类号: Q949.32

文献标识码: A

Analysis of Citrinin in *Monascus* Products by TLC and HPLC

CHEN Yun¹, XU Gan-rong¹, GU Yu-mei¹, Philippe BLANC²

(1. School of Biotechnology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036, China; 2. Laboratoire Biotechnologie-Bioprocesses, CNRS, INSA, Toulouse, France)

Abstract: The methods for the determination of citrinin contents in *Monascus* products were described in this paper. The detecting limit for the standard citrinin solution is 0.2 mg/L when spotting 1ml of standard citrinin onto TLC with the length of 1cm by observing under UV (365 nm) with naked eye. Three types of methods were employed by using different HPLC detectors and the pretreatment of the samples, and two of them were found satisfied in recovery rate, repeatability test and accuracy. The lowest detecting limit of the citrinin by HPLC with fluorescence detector is 0.6 ng. The lowest detecting concentration of the citrinin solution by using HPLC is 0.1 mg/L. The linear relationship between the contents of the standard citrinin and the peak area is satisfied with the value of R^2 being 0.998.

Key words: TLC; HPLC; *Monascus*; citrinin

红曲产品是我国的传统发酵产品, 常用于食品着色、酿酒以及药用, 自从发现红曲产品中存在真菌毒素——桔霉素后, 桔霉素的问题引起了广泛的

关注. 在国外, 早已将桔霉素作为食品污染的严格控制指标, 为此国外科学家已摸索出一些定性、定量测定桔霉素的方法, 如薄板层析法、反相高效液

收稿日期: 2000-12-22; 修订日期: 2000-03-05.

基金项目: 中国食品添加剂生产与应用工业协会资助课题.

作者简介: 陈蕴(1972-), 女, 江苏无锡人, 工学学士, 助教.

万方数据

相色谱法结合荧光检测法、高效液相色谱法(紫外检测)及酶免疫法等。据 Blanc 等报道^[1,2],红曲液态发酵液经酸化、萃取后,有机相用硅胶 60 制备性薄板层析,在紫外灯($\lambda = 350 \text{ nm}$)下定性检测出桔霉素,将含桔霉素的硅胶取下,用溶剂溶出,再进行高效液相色谱的定量测定,采用的色谱柱为 C_{18} Nu- cleosil column,以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱。日本的红曲色素样品经离子树脂吸附法处理后进行 HPLC 的测定,此法以 $V_{\text{乙腈}}:V_{\text{水}}:V_{\text{三氯乙酸}} = 100:100:0.1$ 为流动相,色谱柱为化学键合的 ODS ($5 \mu\text{m}$) (个人通信资料)。荷兰研究者 Monica Sabater 报道的方法^[3],是用氯仿-甲醇溶液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{甲醇}} = 50:50$)萃取红曲米粉,萃取相经浓缩蒸发,无需采用板层析,而用流动相溶解后,直接用 HPLC 定量,流动相为 $V_{\text{磷酸}}:V_{\text{乙腈}}:V_{\text{异丙醇}} = 75:25:5$ (混合液 pH 为 2.5),色谱柱是 Deactivated ChromSpher B。酶免疫法测定桔霉素的含量,灵敏度高,但所需试剂价格昂贵,测试费用较高。

在我国,红曲中桔霉素的测定是一个新的课题。而且我国的红曲产品中色素含量高,相对桔霉素的含量较低,测定难度较大,因而建立红曲产品中桔霉素检测的标准方法非常有必要。

1 材料与方 法

1.1 红曲样品

实验室自制及中、法等国收集得到。

1.2 桔霉素的测定方法

1.2.1 红曲米预处理方法

先后采用了 3 种不同的预处理方法。方法 1 和 2 在中国采用,方法 3 在法国采用。方法 1 与方法 2 都采用了板层析初步分离色素,但两者的主要区别是前者采用了 2 次 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴浓缩,后者未经浓缩;方法 3 采用真空低温($40 \text{ }^\circ\text{C}$)浓缩,未进行板层析。

方法 1 在 50 mL 离心管中,称取红曲米粉 3.0 g,加入 $V_{\text{乙腈(或甲醇)}}:V_{\text{磷酸(20\%)}} = 99:1$ 的混合溶液 20~30 mL,超声波处理 15 min 后,离心取上清液(3 000 r/min, 20 min),重复共 3 次,萃取液合并, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴浓缩至干,加甲醇溶解,取 1.0~2.0 mL 点样进行板层析。红曲米粉质量计为 w ,水浴后蒸干物的甲醇溶解液的体积计为 V_1 ,点样量计为 V_2 。

方法 2 离心前的方法同方法 1,但离心前后需称重,离心后用乙腈(或甲醇)补足原质量,搅匀,离心(3 000 r/min, 20 min),用移液管精密量取 1.0~

2.0 mL 上清液,用于板层析。红曲米粉质量计为 w ,萃取液体积计为 V_1 。

方法 3 在 50 mL 三角瓶中,称入红曲米粉 0.1~0.5 g (视色素及桔霉素含量而定),用甲醇-氯仿溶液($V_{\text{甲醇}}:V_{\text{氯仿}} = 1:1$)分 3 次萃取,每次萃取时,在磁搅拌下持续 1 h。萃取液合并,用旋转式真空蒸发器(Buchi Rotavapor R-134)在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 蒸发至干,用甲醇溶解,稀释后,直接用 HPLC 测定。

1.2.2 薄板层析(TLC)

制板: H-60 硅胶(青岛海洋化工集团产)与 0.5% 羧甲基纤维素溶液混合,铺板后置于 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 活化 30 min。将活化的硅胶板放入 0.5 mol/L 的草酸甲醇溶液中浸渍 1 min,自然晾干,再 $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 活化 1 h,置于干燥器内备用。

点样:将样品点成一直线,点上标准桔霉素(质量浓度约 20 mg/L),以确定展开后桔霉素的位置。记录点样体积 V_2 ,一般为 1 mL。

展开:用展开剂 $V_{\text{甲苯}}:V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{甲酸}} = 7:3:1$ 展开,紫外灯下($\lambda = 350 \sim 365 \text{ nm}$)观察,桔霉素的 $R_f = 0.7 \sim 0.8$,显示淡黄色荧光,将含桔霉素的硅胶刮下,直接放在离心管中,分 3 次加入乙腈,过滤, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴浓缩至干(与预处理方法 1 相同),或采用预处理方法 2,在板层析的硅胶中,加一定体积色谱纯甲醇,用超声波处理 5 min 后恢复原体积,密封静置 1 h,吸取上清液,微滤后用 HPLC 测定。

在法国,还使用了一种商品化的带荧光显色指示,层析板即使点样量很少($100 \mu\text{L}$ 以下),也能在紫外灯下观察到桔霉素的斑点。

1.2.3 高效液相色谱仪及色谱条件 HP 1100 液相色谱仪。色谱柱 1: Eclipse XDB Reversed-phase C_{18} , $5 \mu\text{m}$, $D 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$;流动相 1: $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}} = 55:45$,用磷酸调 pH 4.0;检测器:紫外检测器, $\lambda = 254 \text{ nm}$;荧光检测器, $\lambda_{\text{ex}} = 331 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 500 \text{ nm}$;流速: 1.0 ml/min ;柱温: $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2 结果与讨论

2.1 薄板层析最低检测浓度

用自制薄板层析可进行桔霉素的定性检测,虽方便简单,但影响因素很多。红曲样品中色素的多少是最主要的影响因素,点样量的多少往往由桔霉素含量的高低而定。如果将样品集中点在一个点上,若点样量太少,则无法观察到桔霉素的存在,而点样量太多又不易分离,所以将样品点在一直线上。在 $20 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 的板上(硅胶浆 60 mL),点样

量为 1 mL, 点样长度为 5 cm 左右, 用标准桔霉素溶液作最低检测浓度的实验时, 作者发现, 当其质量浓度为 0.2 mg/L 时, 展开后, 在紫外灯下仍能看到桔霉素的条纹。

2.2 高效液相色谱测定标准桔霉素溶液与峰面积的线性关系

2.2.1 采用紫外检测器时标准桔霉素溶液与峰面积的线性关系 采用紫外检测器, 将桔霉素标准样进行 HPLC 测定, 标样质量浓度分别为 2.5, 5, 12.5, 25, 50, 100 mg/L。以峰面积为纵坐标, 桔霉素质量浓度为横坐标, 结果见图 1。在此范围内线性关系良好, $R_2 = 0.9983$ 。当桔霉素质量浓度为 1 mg/L 时, 用紫外检测器也能够检出。

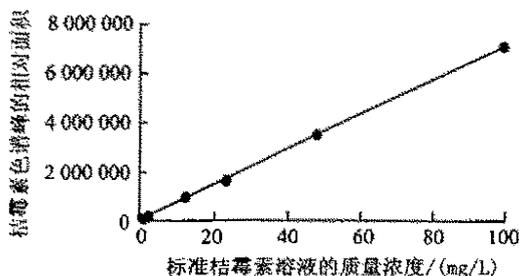


图1 紫外检测时标准桔霉素溶液的质量浓度与色谱峰面积的线性关系

Fig.1 The linear relationship between peak area and the contents of standard citrinin by using UV detector

2.2.2 采用荧光检测器时标准桔霉素溶液与峰面积的线性关系

由于荧光检测器的灵敏度高, 将桔霉素标样质量浓度分别稀释为 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L。以峰面积为纵坐标, 桔霉素质量浓度为横坐标, 结果见图 2。在这一范围内线性关系良好, $R_2 = 0.9980$ 。

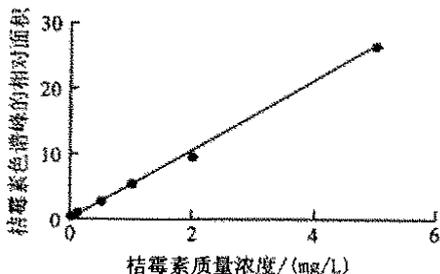


图2 荧光检测时标准桔霉素溶液的浓度与色谱峰面积的线性关系

Fig.2 The linear relationship between peak area and the contents of standard citrinin by using a fluorescent detector

当桔霉素质量浓度为 0.1 mg/L 时, 用荧光检

测器能够检出。与紫外检测器相比, 荧光检测器的灵敏度提高了 10 倍, 与国外报导基本相同。

紫外检测器适合于测定桔霉素浓度稍高的样品, 但色素对其有一定的干扰作用, 若色素分离不好, 较难判断桔霉素的出峰。而采用荧光检测, 基本上不存在色素干扰, 灵敏度高。

2.3 高效液相色谱法测定标准桔霉素的最低检测限

在上述高效液相色谱条件下(采用荧光检测器), 以两倍信噪比计, 标准桔霉素的最低检测限为 0.60 ng。

2.4 标准桔霉素的回收率

实验中发现, 当采用预处理方法 1 处理同一样品的多个平行样时, HPLC 分析所得到的结果往往相差很大。而采用方法 2 的结果则较为统一。其原因是因为样品经多次加热和转移, 造成桔霉素损失较大。为此作者采用了两种方法测定标准桔霉素溶液的回收率。一种是加热处理法, 一种是不加热处理法, 均采用荧光检测器检测。

2.4.1 加热处理法 将标准桔霉素溶液点板, 经板层析后, 刮下硅胶, 用甲醇分 3 次萃取硅胶中的桔霉素, 3 次萃取液合并后, 在水浴 60 °C 蒸发, 浓缩至一定体积后, 用甲醇定容, 微滤后用 HPLC 测定。回收率如表 1 所示。此法与样品预处理法 1 相似, 由此证明加热法处理时桔霉素的损失较大, 试样多次转移也造成损失。

表1 加热处理法标准桔霉素溶液的回收率

Tab.1 The recovery rate of the standard citrinin concentrated by evaporation at 60 °C

编号	标准桔霉素溶液的质量浓度/(mg/L)	测得桔霉素的质量浓度/(mg/L)	回收率/%
ZK1-17-6	1	0.4248	42.48
ZK1-17-7	5	2.576	51.48
ZK1-17-8	10	5.578	55.78
ZK1-17-9	20	11.768	58.84
ZK1-17-10	50	35.135	70.27

2.4.2 不加热处理法

将标准桔霉素溶液点板, 经板层析后, 刮下硅胶, 加入 5 mL 甲醇后用超声波处理, 然后用甲醇恢复到原体积, 静置, 取上清液, 微滤后进行高效液相色谱的定量测定。回收率如表 2 所示。

此法与样品预处理法 2 相似。样品 ZK1-17-20 的回收率为 282.5%, 可能是由于含量太低, HPLC 检测时基线不稳, 造成峰面积计算有误。部分样品

回收率超过 100% 可能是因为误差所致. 不加热处理的回收率有明显提高. 因此, 采用荧光检测时, 待测试样中桔霉素质量浓度一般应控制在 1.5~10 mg/L 之间.

表 2 不加热处理法 2 标准桔霉素溶液的回收率

Tab.2 The recovery rate of the standard citrinin without heating treatment

编号	标准桔霉素溶液的质量浓度/(mg/L)	测得桔霉素的质量浓度/(mg/L)	回收率/%
ZK1-17-20	0.4	1.130	282.5
ZK1-17-21	2	2.073	103.65
ZK1-17-23	8	8.616	107.70
ZK1-17-24	10	9.290	92.86

2.5 高效液相色谱测定的精密度试验

对标准桔霉素进样精密度试验. 用质量浓度为 12.5 mg/L 的标样重复进样 5 次, RSD = 0.001 (采用紫外检测器检测).

对低桔霉素含量及高桔霉素含量的样品测定进行重复性试验(预处理方法 2, 荧光检测).

WM-971 是一株低产桔霉素的菌种, 用此菌株生产的红曲米经萃取、薄板层析后用 HPLC 测定, 重复 5 次, 结果见表 3. 低桔霉素含量的样品定量测定的重复性较好.

表 3 低桔霉素含量样品的测定结果

Tab.3 Analysis of citrinin at lower concentration

编号	桔霉素质量浓度/(mg/L)
WM-971-1	3.233
WM-971-2	3.568
WM-971-3	3.648
WM-971-4	3.874
WM-971-5	3.852

ZH-12 是一株高产桔霉素的菌种, 用此菌种生产的红曲米经萃取、薄板层析后用 HPLC 测定, 重复 5 次, 结果见表 4.

表 4 高桔霉素含量样品的测定结果

Tab.4 Analysis of citrinin at higher concentration

编号	桔霉素质量浓度/(mg/L)
ZH-12-1	1858.68
ZH-12-2	2105.90
ZH-12-3	2161.13
ZH-12-4	1936.55
ZH-12-5	1887.13

太好, 这可能与色素的存在有关. 色价较高的红曲产品往往桔霉素的含量也较高, 有的样品经萃取、薄板层析以后仍然带色素, 这对 HPLC 的测定有一定的干扰. 因此萃取时样品质量可适当减少, 试样适当稀释是必要的.

2.6 样品分析

2.6.1 高效液相色谱结合紫外检测

将自制的红曲米粉经预处理和板层析后, 再进行高效液相色谱分析, 采用紫外检测器, 色谱图见图 3.

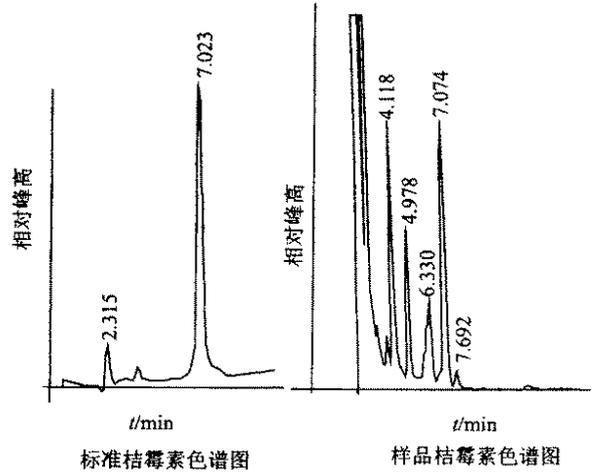


图 3 紫外检测桔霉素色谱图

Fig.3 The chromatogram of citrinin using UV detector

标准桔霉素样品的保留时间为 7.023 min, 样品中桔霉素的保留时间为 7.074 min. (流动相中甲醇比例高于材料与方法中所述的条件); 由于样品经过预处理和板层析的初步分离, 注入 HPLC 的样品中杂质含量大为减少, 对桔霉素检测几乎没有干扰. 但如果采用紫外检测器, 且不对样品进行板层析, 则红曲样品中的色素对桔霉素的干扰很大.

2.6.2 高效液相色谱法结合荧光检测

将自制的红曲米粉经预处理和板层析后, 用 HPLC 检测, 色谱图见图 4.

标准桔霉素样品的保留时间为 12.190 min, 样品中桔霉素的保留时间为 12.306 min.

采用荧光检测器, 由于桔霉素本身具有在激发态下产生荧光的特性($\lambda_{ex} = 331 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$), 而其它色素在这一波长范围内不具备激发荧光的条件, 因而即使不对样品进行板层析处理, 直接进样, 桔霉素的测定也不受干扰. 而且荧光检测的灵敏度较高, 样品只需经过简单的萃取, 稀释倍数较大也可观察到出峰, 可进一步减少色素可能引起的干扰.

高桔霉素含量的样品的定量测定的重复性不

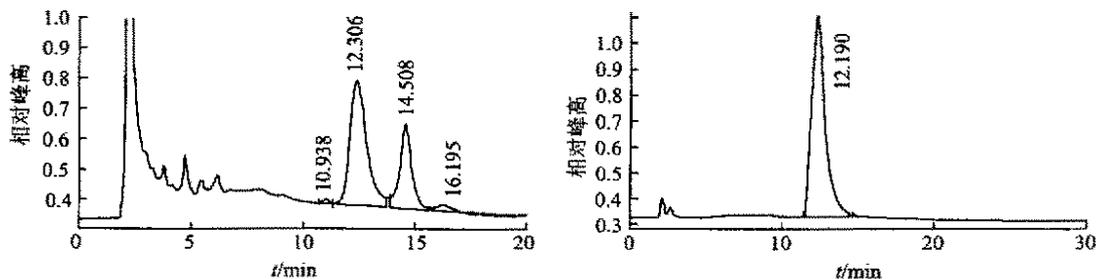


图4 荧光检测桔霉素色谱图

Fig.4 The chromatogram of citrinin using fluorescent detector

3 结论

用板层析法可初步判断红曲产品中是否含有桔霉素,作为一种定性方法是可行的.定量分析桔霉素的几种预处理方法中,方法1由于加热处理及样品多次转移所造成的损失较大,因而回收率低,

而且紫外检测的最低检测浓度为1 mg/L,此法结果重现性差,因而不宜采用.而方法2一般是在桔霉素含量较低的情况下采用,HPLC检测时要用荧光检测器,回收率可达100%,检测结果的重现性好.方法3既简单,结果又相当准确可靠,重现性好.

参考文献:

- [1] BLANC P J, LAUSSAC J P, LE BARS J, *et al.* Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin[J]. **International Journal of Food Microbiology**, 1995, 27:201~213.
- [2] BLANC P J, LORET M O, GOMAM G. Production of Citrinin by Various Species of *Monascus*[J]. **Biotechnology Letters**, 1995, 17(3):291~294.
- [3] SABATAR-VILA M, MAAS RFM. Mutagenicity of commercial *Monascus* fermentation products and the role of citrinin contamination[J]. **Mutation Research**, 1999, 444:7~16.