

分散固相萃取-高效液相色谱法 测定谷物中的桔霉素

黄晓东¹, 卢健², 谢飞飞²

(1.安徽省生物制品与食品检测检验及其标准化技术公共服务平台, 安徽芜湖 241000;

2.安徽工程大学生物与化学工程学院, 安徽芜湖 241000)

摘要:目的:建立谷物中桔霉素含量的测定方法。方法:以60%乙醇作提取剂, C₁₈吸附剂分散固相萃取净化样品中的桔霉素,应用高效液相色谱进行分析。结果:该方法标准曲线方程 $Y = 3.13 \times 10^{-7}X - 5.59 \times 10^{-2}$,线性相关系数 $R^2 = 0.9999$,检出限为0.005mg/L,重复性实验精密度(RSD)为4.51%,加标回收率范围为87.7%~96.4%,所测的三种谷物样品桔霉素含量为0.116~0.385 $\mu\text{g/g}$ 。结论:该方法简便、准确,可用于谷物中桔霉素含量的测定。

关键词:分散固相萃取,桔霉素,谷物,高效液相色谱法

Determination of citrinin in grain by dispersive solid-phase extraction and HPLC

HUANG Xiao-dong¹, LU Jian², XIE Fei-fei²

(1.Anhui Public Service for Biological Products and Food Inspection with

Standardization Technology Platform, Wuhu 241000, China;

2.College of Biochemistry Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China)

Abstract: Objective: To establish a method to determine the content of citrinin in grain. Method: The samples were extracted with 60% ethanol, and cleaned up by dispersive solid-phase extraction with C₁₈ dispersant sorbent and ready for HPLC determination. Results: A standard curve equation was built as follows: $Y = 3.13 \times 10^{-7}X - 5.59 \times 10^{-2}$ with linear correlation coefficient of 0.9999 and RSD was 4.51%. The average recovery range was 87.7%~96.4%. The citrinin content range of the samples was 0.116~0.385 $\mu\text{g/g}$. Conclusion: This method was sample and accurate, which could be used for detecting citrinin in grain.

Key words: dispersive SPE; citrinin; grain; HPLC

中图分类号: TS207.3

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)05-0263-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.05.047

桔霉素(citrinin)是一种真菌产生的次级代谢产物,具有肾毒性。通常在污染的大麦、燕麦、大米和玉米等谷物中可能含有桔霉素^[1],但我国还没有建立相关的国家标准检测方法。目前文献报道的桔霉素检测方法有高效液相色谱法^[2]、酶联免疫吸附法^[3]、液质联用分析法^[4]、薄层层析法^[5]、抑菌圈法^[6]等。薄层层析法、抑菌圈法是较早用于毒素检测的一种方法,方法简单,但灵敏度相对较差,已远远不能满足现代检测要求。酶联免疫法适合于大批量样本的检测,但重现性差,常常需要验证。目前国外相关报道中多为高效液相色谱法和酶联免疫吸附法, Dohnal等^[7]选用反相高效液相色谱法进行检测,以甲醇-磷酸盐(80:20)作为流动相,检测波长为321nm,最低检测限量可达100 μg 。高效液相色谱法、液质联用分析法、气质联用分析法等方法灵敏、

准确^[8],但在桔霉素样品前处理时有操作复杂、成本较高等缺陷。分散固相萃取法^[9-11]是近几年发展起来的前处理方法,将固相萃取吸附剂颗粒分散在样品的萃取液中,省去了固相萃取法的繁琐,方法更加快速、简便。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大米、小麦、大麦 产自安徽芜湖;桔霉素标准品 纯度 $\geq 99\%$,北京泰乐琪科技有限公司;乙醇(分析纯)和乙腈(色谱纯) 均购于国药集团化学试剂有限公司;甲醇 色谱纯,天津市大茂化学试剂厂;水为超纯水。

1.2 仪器和设备

Prominence LC-20A 高效液相色谱仪 日本岛津公司;KQ-250E 型超声波清洗仪 昆山市超声仪

收稿日期:2014-05-04

作者简介:黄晓东(1963-),男,硕士,副教授,研究方向:生物制品与食品检验。

器有限公司;RE-85Z 旋转蒸发器 上海青浦沪西仪器厂;TGL-16G 高速离心机 上海安亭仪器厂。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件 Shim-pack VP-ODS 色谱柱 (150mm×4.6mm, 5 μ m); 柱温: 28 $^{\circ}$ C; 流速: 1.0mL/min; 进样量: 10 μ L; 流动相: 乙腈: 甲醇: 水 = 70: 10: 20 (以磷酸调 pH 为 2.5); 检测器: 荧光检测器, 激发波长 331nm, 发射波长 500nm^[2]。

1.3.2 桔霉素标准曲线的绘制 准确称取 1.0mg 桔霉素固体标准品, 用甲醇配制成 100mg/L 桔霉素标准储备液。取一定量的储备液, 用甲醇逐级稀释成浓度分别为 10.0、5.0、1.0、0.25、0.1、0.05mg/L 的桔霉素标准溶液, 在选定色谱条件下进行 HPLC 检测, 并计算桔霉素标准曲线线性关系方程。

1.3.3 样品处理 将谷物粉碎后, 充分混匀。称取 1.0g 谷物样品于 15mL 离心管中, 加入 4.0mL 60% 乙醇, 震荡混匀后, 于 30 $^{\circ}$ C 超声提取 30min, 8000r/min 离心 10min。重复提取一次, 合并上清液并用 60% 乙醇定容至 10mL。

向上述提取液中加入 100.0mg C₁₈ 固相分散萃取净化剂, 震荡混匀, 8000r/min 离心 10min, 取上清液至旋转蒸发器中, 在 (39 \pm 2) $^{\circ}$ C 的水浴上旋转蒸发, 旋干后, 用 2.0mL 甲醇复溶。经 0.45 μ m 有机滤膜过滤后, 供 HPLC 分析^[9]。

1.3.4 超声提取条件的选择 提取温度: 取 1.0g 小麦样品, 加入 5.0mL 60% 乙醇, 分别于 20、30、40、50 $^{\circ}$ C 超声提取 20min, 进行样品处理, 通过 HPLC 测定, 选择最佳提取温度。

提取时间: 取 1.0g 小麦样品, 加入 5.0mL 60% 乙醇, 于 30 $^{\circ}$ C 超声提取 20、25、30、35、40min, 进行样品处理, 通过 HPLC 测定, 选择最佳提取时间。

固液比: 取 1.0g 同一小麦样品 4 份, 分别按提取剂与样品的固液比 (1:2、1:3、1:4、1:5) 加入 60% 乙醇, 于 30 $^{\circ}$ C 超声提取 30min, 进行样品处理, 通过 HPLC 测定, 选择最佳固液比。

1.3.5 提取剂浓度的选择 分别用浓度为 50%、60%、70% 和 80% 的乙醇溶液作为提取剂, 对添加了 1.0mL 10.0mg/L 的桔霉素标准液的小麦样品按 1.3.3 进行处理, HPLC 测定, 根据桔霉素的回收率选择最佳提取剂浓度。

1.3.6 分散吸附剂的选择 分别用 C₈ 吸附剂、C₁₈ 吸附剂、PSA (乙二胺-N-丙基) 吸附剂和石墨化碳作为分散吸附剂, 在添加了 1.0mL 10.0mg/L 桔霉素标准液的小麦样品中加入 60% 的乙醇溶液, 按 1.3.3 进行样品处理, 通过 HPLC 测定, 确定最佳的分散吸附剂。

1.3.7 方法的重复性实验 称取 1.0g 小麦样品, 添加 1.0mL 10.0mg/L 桔霉素标准液, 按 1.3.3 进行样品处理, 通过 HPLC 分析。连续五天平行测定同一种谷物样品, 计算其精密度。

1.3.8 方法的回收率实验 在 1.0g 小麦样品中添加 1.0mL 10.0mg/L 桔霉素标准液, 依法进行 HPLC 分析, 计算其加标回收率。

1.3.9 结果计算公式 $c_1 = c \times V/m$

式中: c_1 为样品中桔霉素含量, 单位为微克每克 (μ g/g); c 为仪器检测的质量浓度, 单位为毫克每升 (mg/L); V 为最终定容体积, 单位为毫升 (mL); m 为样品质量, 单位为克 (g)。

2 结果与讨论

2.1 样品前处理条件的选择

2.1.1 超声提取条件的选择 结果如图 1, 表明固液比为 1:4, 在 30 $^{\circ}$ C 时超声处理 30min, 样品的提取效果比较好。

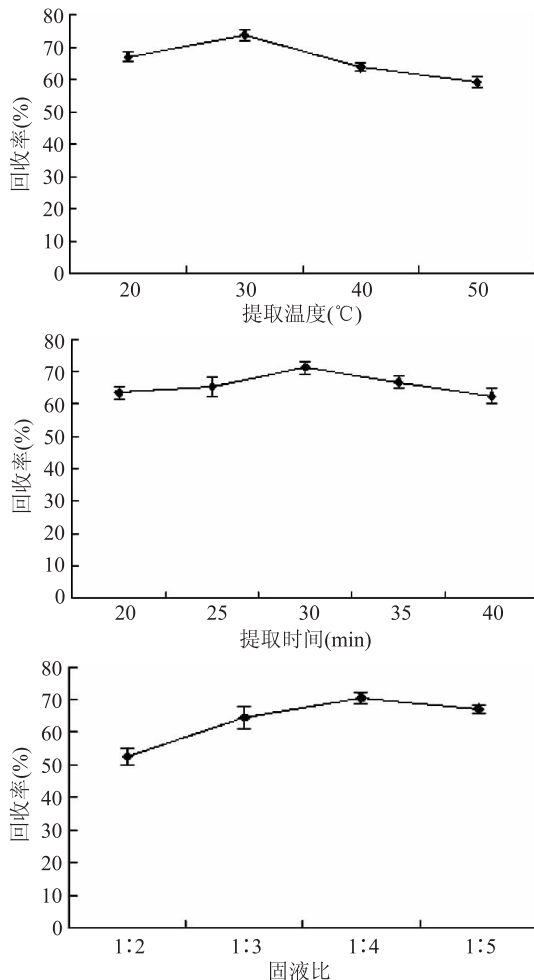


图 1 超声提取条件优化

Fig.1 Optimization of ultrasound extraction

2.1.2 提取剂浓度的选择 根据文献^[12]报道, 桔霉素易溶于甲醇、乙醇, 但甲醇具有低毒性, 因此本文采用乙醇作为提取剂。结果如图 2。可见随着乙醇浓度的升高, 桔霉素的回收率增加, 至 60% 乙醇时达到最高, 此后逐步下降, 故选用 60% 乙醇作为提取剂。

2.1.3 分散吸附剂的选择 结果如图 3, 可见用石墨化碳吸附剂和 C₈ 吸附剂作为分散吸附剂时, 桔霉素的回收率较低, 且 PSA 对样品中的杂质等干扰物吸附去除量不大, 而使用 C₁₈ 吸附剂时, 桔霉素的回收率能达到 87.88%, 同时, 考虑高效液相色谱所用色谱柱是反相 C₁₈ 柱, 在前处理过程中使用 C₁₈ 吸附剂, 有助于去除对色谱柱性能及分离分析有影响的杂质, 故本文选用 C₁₈ 作为分散吸附剂。

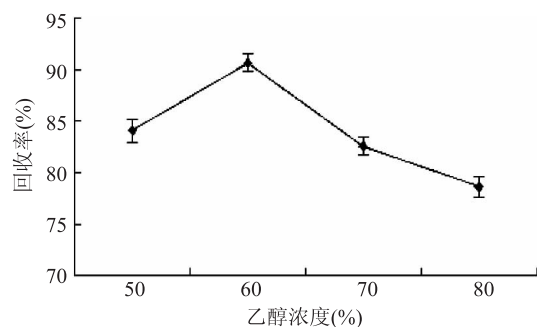


图2 提取剂对回收率的影响

Fig.2 Effect of different extraction agents on recovery

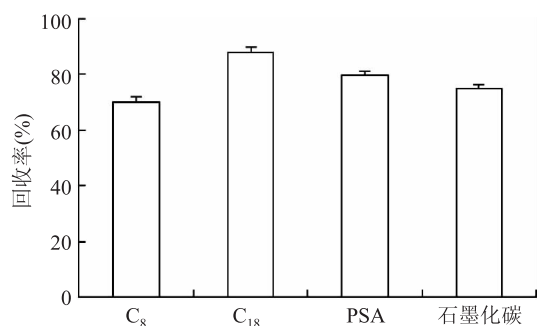


图3 分散吸附剂对回收率的影响

Fig.3 Effect of different Scattered adsorbent on recovery

2.2 桔霉素标准曲线的绘制

以峰面积为横坐标,桔霉素浓度为纵坐标绘制标准曲线,经计算其回归方程为: $Y = 3.13 \times 10^{-7}X - 5.59 \times 10^{-2}$, $R^2 = 0.9999$,表明在 0.05~5mg/L 的范围内,峰面积与桔霉素质量浓度之间线性关系良好,根据信噪比 $S/N = 3$ 得出最低检出限为 0.005mg/L。

图4为浓度为 1.0mg/L 的桔霉素标准液的色谱图,桔霉素的保留时间为 7.163min,理论塔板数为 3362,较大,表明柱效较好。

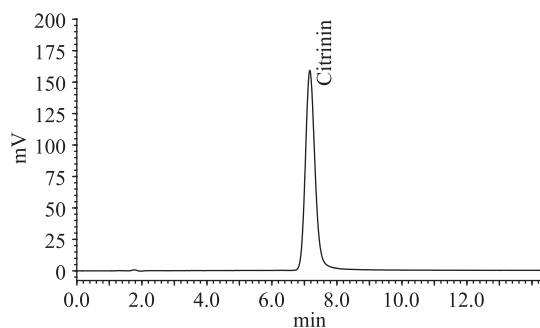


图4 1.0mg/L 桔霉素标准溶液色谱图

Fig.4 The chromatogram of standard citrinin(1.0mg/L)

2.3 方法的重复性实验

对小麦样品,在同样实验条件下从前处理步骤开始每天测定 1 次,连续 5d,测定结果见表 1。由表 1 可知,该方法具有良好的重复性和精密度。

2.4 方法的回收率实验

回收率结果见表 2。数据显示,实验获得的回收率范围为 87.7%~96.4%,平均回收率为 92.48%,RSD 为 3.68%,方法的准确度较高。

表1 方法重复性实验结果

Table 1 Result to method repeated experiments

实验号	桔霉素 (mg/L)	RSD (%)
1	6.80	4.51
2	6.91	
3	7.47	
4	6.77	
5	7.31	

表2 桔霉素加标回收率测定结果

Table 2 Recovery rates of citrinin

测定次数	加入量 (μg)	测出量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	10.0	9.64	96.4	92.48	3.68
2	10.0	8.96	89.6		
3	10.0	9.58	95.8		
4	10.0	8.77	87.7		
5	10.0	9.31	93.1		

2.5 谷物样品测定

分别对大米、小麦、大麦等三种谷物样品进行了测定,结果见表 3。由表 3 可知,在大米、小麦、大麦等三种谷物中均存在桔霉素,且大麦中桔霉素的含量较高,相对标准偏差在 3.77%~4.43% 之间。图 5 是大米样品的色谱图,可见检测时间在 10min 之内,较为快捷。

表3 样品桔霉素含量测定结果

Table 3 The contain of citrinin in grain

样品名称	测定结果 (μg/g)	相对标准偏差 (%)
大米	0.125	3.81
	0.116	
	0.119	
小麦	0.165	4.43
	0.151	
	0.158	
大麦	0.371	3.77
	0.357	
	0.385	

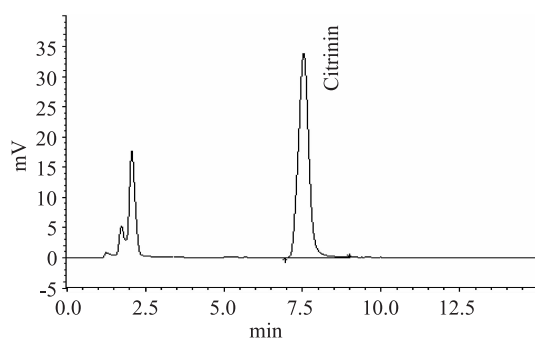


图5 大米样品色谱图

Fig.5 The chromatogram of rice

3 结论

本文建立的分散固相萃取高效液相色谱法测定谷物中的桔霉素,样品前处理操作快速简便,方法重

现性较好。加标回收率在 87.7%~96.4% 之间,重复性实验 RSD 为 4.51%,最低检出限为 0.005mg/L,实际样品检测中大米含桔霉素为 0.116~0.125 $\mu\text{g/g}$,小麦为 0.151~0.165 $\mu\text{g/g}$,大麦为 0.357~0.385 $\mu\text{g/g}$,检测效果较为满意,适用于谷物中桔霉素的快速检测。

参考文献

- [1] AM do Rosario Marinho. Dicitrinol, a Citrinin Dimer, Produced by *Penicillium janthinellum* [J]. *Helvetica Chimica Acta*, 2011 (94): 835-841.
- [2] 李志强,袁永俊,张晓龙. 高效液相色谱法测定桔霉素[J]. *中国调味品*, 2011(4): 72-75.
- [3] Kononenko G P, Burkin A A. Immunoenzyme method for the determination of citrinin [J]. *Zhurnal Analiticheskoi Khimii*, 2007, 62(7): 769-774.
- [4] 李燕,仇峰,杨美华,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定中药中桔青霉素[J]. *药物分析杂志*, 2011(9): 1726-1730.
- [5] 胡晓清,陈福生,邢淑婕,等. 红曲中桔霉素的薄层层析分析[J]. *食品科学*, 2003, 24(5): 126-129.
- [6] 陈奇,王伟平,张华山,等. 红曲米中桔霉素的快速检测方法研究[J]. *食品科技*, 2012(11): 297-299.
- [7] Dohnal V, Pavlikova L, Kuča K. Rapid and Sensitive Method

(上接第 254 页)

粗提取物中多酚含量较低,经大孔树脂富集后多酚含量大幅度提高。大孔树脂富集后各种溶剂的萃取物中,多酚含量略有下降,抗氧化活性表现不一,其中正丁醇萃取物对 DPPH 自由基清除的 IC_{50} 最低,为 18.28 $\mu\text{g/mL}$,表明抗氧化能力最强。实验数据也显示,正丁醇萃取物得率较高,其中的多酚含量也较高。综合考虑提取成本和安全因素等,可以确定以抗氧化活性为导向的蓝莓多酚提取工艺为:蓝莓果实以含 0.3% 三氟乙酸的 70% 乙醇提取,提取液经 LS-305 大孔树脂吸附,先用 0.3% 三氟乙酸水溶液冲洗去杂后,再用含 0.3% 三氟乙酸的甲醇溶液洗脱,洗脱液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩除去溶剂后用水溶解,以乙酸乙酯萃取去杂,再以正丁醇萃取,萃取液在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下减压浓缩,冷冻干燥。

参考文献

- [1] 李颖畅,宣景宏,孟宪军. 蓝莓果重花色苷的研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2007, 128(1): 178-181.
- [2] 李颖畅,孟宪军,张琦,等. 蓝莓果主要物质含量及处理方式对其花色苷的影响[J]. *食品工业科技*, 2008, 29(5): 163-164, 169.
- [3] 陈介甫,李亚东,徐哲. 蓝莓的主要化学成分及生理活性[J]. *药学报*, 2010, 45(4): 422-429.
- [4] 李颖畅,马春颖,孟宪军,等. 蓝莓花色苷提取物抗油脂氧化能力的研究[J]. *中国粮油学报*, 2010, 25(2): 92-95.
- [5] Giovanelli G, Buratti S. Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties [J]. *Food Chemistry*, 2009, 112: 903-908.
- [6] 刘翼翔,吴永沛,陈俊,等. 蓝莓不同多酚物质的分离与抑

for Citrinin Determination Using High - Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection [J]. *Analytical Letters*, 2010, 43(5): 786-792.

- [8] Zaied C, Zouaoui N, Bacha H, et al. Natural occurrence of Citrinin in Tunisian wheat grains [J]. *Food Control*, 2012.
- [9] 林海丹,邹志飞,秦燕,等. 分散固相萃取-高效液相色谱法快速测定果蔬中的 6 种保鲜剂残留量[J]. *色谱*, 2013(2): 170-173.
- [10] Gouri S, Yogesh K T, Rajinder K G. A novel optimised and validated method for analysis of multi-residues of pesticides in fruits and vegetables by microwave-assisted extraction (MAE) - dispersive solid-phase extraction (d-SPE) - retention time locked (RTL) - gas chromatography - mass spectrometry with Deconvolution reporting software (DRS) [J]. *Food Chemistry*, 2011 (3): 1300-1308.
- [11] Maristela B, Cerqueira S, et al. New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge [J]. *Journal of Chromatography A*, 2014(4): 10-22.
- [12] 虞慧玲,许贇荣,陈蕴. 红曲桔霉素样品预处理的探讨[J]. *食品与发酵工业*, 2003(6): 55-59.

制细胞氧化损伤功能的比较[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2013, 39(4): 428-434.

- [7] 吕叶春,刘翼翔,吴薇,等. 蓝莓多酚对油酸诱导 HepG2 细胞脂肪积累的干预作用[J]. *食品科学*, 2011, 32(17): 308-312.
- [8] 邹阳,张秀玲,石岳. 野生蓝莓果实中花色苷色素提取工艺的研究[J]. *现代食品科技*, 23(1): 60-62.
- [9] 杨雪飞,潘利华,罗建平. 蓝莓色素的超声提取工艺及稳定性[J]. *食品科学*, 2010, 31(20): 251-255.
- [10] 解利利,张慤,孙金才. 蓝莓冻果多酚粗提物体外抗氧化活性的研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2011, 30(6): 818-821.
- [11] 孙波, BEKHIT A E D, 王坤波, 等. 不同品种蓝莓提取物抗氧化作用的研究[J]. *食品科学*, 2007, 28(10): 61-63.
- [12] 杨松秀. 蓝莓汁生产热烫工艺对多酚氧化酶及多酚类化合物的影响[J]. *化学工程师*, 2012, (5): 54-56, 59.
- [13] Catalina S R, Karina A, Victoria R, et al. Synergistic antioxidant and antivacterial activity of rosemary plus butylated derivatives [J]. *Food chemistry*, 2009, 115: 456-461.
- [14] Sellappan S, Akoh C C, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia - grown blueberries and blackberries [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(8): 2432-2438.
- [15] Singleton V L, Rossi J A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagents [J]. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1965, 16: 144-158.
- [16] 李静,聂继云,李海飞,等. Folin-酚法测定水果及其制品中总多酚含量的条件[J]. *果树学报*, 2008, 25(1): 126-131.
- [17] 牛鹏飞,仇农学,杜寅. 苹果渣中不同极性多酚的分离及体外抗氧化活性研究[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(3): 238-242.