

# 高效液相色谱法同时测定\* 饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>与杂色曲霉毒素

黄化成 赵尊行

(山东农业大学 泰安 271018)

李寅宾

(山东省进出口商品检验局 青岛 266002)

## 1 前 言

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(Aflatoxin B<sub>1</sub>, 简写 AF)是最毒的肝毒素之一,杂色曲霉毒素(Sterigmatocystin, 简写 ST)也是肝毒素,虽然它的毒性不如黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>大,但它可通过生物合成得到黄曲霉毒素 B<sub>1</sub><sup>[1]</sup>,因此开展黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>与杂色曲霉毒素的检测研究很有意义。我们选用高效液相色谱法可同时测定这两种毒素,方法简便、快速、灵敏、准确。

## 2 实验材料和方法

### 2.1 试剂

AF 与 ST 标准品为美国 Sigma 公司产品,其它试剂均为分析纯,二次蒸馏水。

### 2.2 仪器

高效液相色谱仪(日立655 A 型),荧光分光光度计(日立 650-10 S 型),微处理机(日立 655-61 A 型)。

### 2.3 色谱条件

Micro Bondapak C<sub>18</sub>柱(3.9mm×30cm),流动相为四氢呋喃:甲醇:水=5:1:4混合液,流速为1.0mL/min,荧光检测,λ<sub>ex</sub>=365nm,λ<sub>em</sub>=435nm,狭缝宽度10nm。

### 2.4 毒素的提取与纯化

准确称取5.00g 样品,加45mL 乙腈,5mL 含有4%KCl 的40%硫酸溶液后,在振荡机上振荡30min 倾出清液,再用10mL 乙腈分两次洗残渣,收集乙腈液并与上述提取液合并,合并的提取液用石油醚脱脂三次(石油醚用量为20,15,10mL),脱脂后的提取液加水25mL,用氯仿萃取三次(氯仿用量为20,15,15mL),收集的氯仿层在低温(-6℃)下冷冻,然后过滤去冰,去脂,用旋转蒸发器蒸干(温度40℃以下),残渣用2mL 流动相溶解后供色谱测定用。

## 3 结果与讨论

### 3.1 流动相配比的选择

根据 AF 与 ST 的性质<sup>[1,2]</sup>,我们选用四氢呋喃、甲醇、水的混合液做流动相。试验表明,四氢呋喃在混合液中的量对容量因子有影响(见表1)。四氢呋喃量在10%时,AF 与 ST 不出峰;增加四氢呋喃的量,AF 与 ST 能出现很好的分离峰,ST 的容量因子变小,它们与干扰成分的分离变坏。据此我们选用四氢呋喃:甲醇:水=50:10:40的混合液做流动相进行饲料样品分析,从而获得了满意的结果(见图1,2)。

表1 四氢呋喃、甲醇、水对 AF 与 ST 的容量因子的影响

溶 剂			容量因子	
四氢呋喃	甲醇	水	AF	ST
10	40	50	—	—
20	30	50	2.9	25.7
30	30	40	3.1	14.6
40	20	40	2.9	8.9
50	20	30	2.7	6.6
50	10	40	2.7	7.1
60	10	30	2.65	5.0

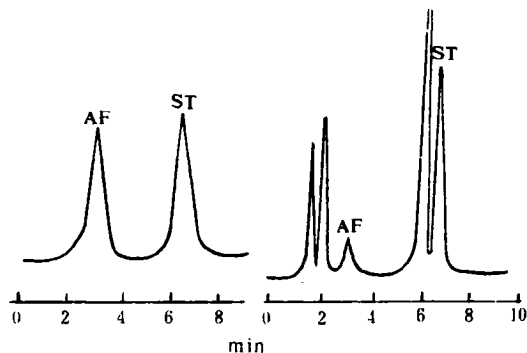


图1(左) AF,ST 标准色谱图

图2(右) 混合饲料色谱图

### 3.2 线性范围与最小检测量

用 AF 与 ST 的标准液在1~200ng 范围内进样,

\* 本文收稿日期:1993年3月6日,修回日期:1993年6月11日

将所得两毒素的色谱峰面积与相应的进样量做回归分析,其回归方程和相关系数:AF为  $Y_1 = -2.22 + 1.07X$ ,  $r_1 = 0.9969$ , ST为  $Y_2 = -1.23 + 1.39X$ ,  $r_2 = 0.9958$ ,说明两毒素在此范围内线性关系好。当信噪比(S/N)为2:1时的最小检测量:AF为0.05ng, ST为0.2ng。

表2 饲料样品的分析结果

样品	测定值 (µg/g)							$\bar{X}$	SD	CV%
花生粕	AF	0.3572	0.3624	0.3322	0.3450	0.3624	0.3432	0.3507	0.0126	3.6
	ST	2.468	2.385	2.424	2.402	2.443	2.456	2.429	0.032	1.3
混合饲料	AF	0.056	0.053	0.060	0.051	0.062	0.058	0.057	0.0038	6.7
	ST	9.86	10.50	10.41	9.93	10.20	9.75	10.10	0.308	3.1

表3 AF与ST的回收率测定

样品	加入量(µg)	测得量 (µg)							平均回收率(%)	CV%
花生粕	AF 1.0	0.92	0.98	0.96	0.92	0.90	0.91	93.0	3.4	
	ST 2.0	1.78	1.75	1.84	1.85	1.80	1.73	89.6	2.7	
混合饲料	AF 0.2	0.175	0.182	0.178	0.172	0.178	0.173	88.0	2.2	
	ST 5.0	4.65	4.80	4.70	4.68	4.72	4.75	94.3	1.1	

3.3 样品分析回收率的测定

用上述方法测定从市场上采集的花生粕与混合饲料,使用外标定量法计算结果(见表2)。在一定量的花生粕与混合饲料中加入一定量的AF与ST标准液,用上述方法进行测定,所得回收率见表3。由表2,3可见,本实验的精密度、准确度均较好。

关键词 高效液相色谱,饲料,黄曲霉毒素,杂色曲霉素

参 考 文 献

- 1 居乃虎编.黄曲霉毒素.北京:轻工业出版社,1980:235
- 2 孟昭赫,张国柱,宋圃菊主编.真菌毒素研究进展.北京:人民卫生出版社,1979:174

## Studies on Simultaneous Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> and Sterigmatocystin in Feed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Huang Huacheng and Zhao Zunxing

(Agricultural University of Shandong, Tai'an, 271018)

Li Yinbin

(Shandong Imp. & Exp. Commodity Inspection Bureau, Qingdao, 266002)

This paper describes a method for simultaneous determination of aflatoxin B<sub>1</sub> and sterigmatocystin in feed by HPLC. The method used µ Bondapak C<sub>18</sub> column, tetrahydrofuran:methanol:water(5:1:4) mobile phase and fluorescence detector at λ<sub>ex</sub> = 365nm and λ<sub>em</sub> = 435nm. The sample was extracted with acetonitrile and 40% sulfuric acid containing 4% potassium chloride(9:1). After filtration and defatting, water was added. It was further extracted with chloroform and then evaporated in a rotary evaporator. The residue was dissolved in the mobile phase for analysis. The minimum detectable amounts were 0.05ng and 0.2ng, and the recoveries were 90.6% and 92.0% for aflatoxin B<sub>1</sub> and sterigmatocystin respectively.

Key words high performance liquid chromatography, feed, aflatoxin, sterigmatocystin