

# 猪组织中赭曲霉毒素A的薄层色谱测定方法

卫生部食品卫生监督检验所 魏润蕴 李文艳

**摘要** 赭曲霉毒素A(OA)对人畜的毒性是肾脏毒,主要污染谷物。动物食用了被OA污染的谷物,OA蓄积在其肾、肌肉、肝等组织中,但肉眼看不出病变。人不仅从谷物中摄入OA,也从动物组织中摄入OA,因此我们建立了猪组织中赭曲霉毒素A的薄层色谱测定方法。该方法的检出限度为1ppb。在动物组织中加入OA作回收试验,在浓度为1、3、10ppb时回收率范围分别为猪肾80—100%,猪瘦肉90—120%,猪肝75—83%。

由纯绿青霉和圆弧青霉产生的赭曲霉毒素A(OA)主要污染谷物,人畜食用被赭曲霉毒素A污染的谷物后会发生中毒,赭曲霉毒素A对人畜的毒性主要是肾脏毒,并有致畸作用。丹麦猪的肾炎是由于动物食用了被OA污染的谷物而引起的;在捷克、南斯拉夫等地区流行的人的巴尔干肾病,由该病引起的肾结构与肾功能的变化与猪的霉菌毒素肾病相似,它们可能有着共同的病因关系。有文献报导在动物的肾、肝、肌肉中均可检出OA。因此人不仅从谷物中而且还可从动物组织中摄入OA。我们建立了猪组织中OA的薄层色谱测定方法。目前文献报导的猪组织中OA的测定方法有放射免疫法<sup>[1]</sup>,检出限度为0.2ppb。酶联免疫测定法<sup>[2]</sup><sup>[3]</sup>,检出限度为0.5—1ppb。放射免疫法灵敏度高,但需特殊仪器设备,酶联免疫法需制备抗体,在作以上两种免疫测定方法的条件都不具备的情况下,可用本方法。本法不需要特殊的仪器设备,操作简单,适合我国国情,能在基层实验室推广使用。本方法的检出限度为1ppb,可与酶联免疫测定方法相比较。

## 1 原理

用甲醇—水—碳酸氢钠提取猪组织中的OA,甲醇水提取液经酸化后,用液—液分配和酸碱处理净化,用薄层色谱法测定,在365nm紫外光灯下与标准OA比较定性和概

略定量。

## 2 仪器

所有玻璃仪器均需用稀盐酸浸泡,用自来水、蒸馏水冲洗。

电动振烫器、乳钵,薄层涂布器,玻璃板5×20cm,展开槽内长25cm、宽6cm、高4cm,365nm紫外光灯,具0.2ml尾管的10ml浓缩小瓶,微量注射器:10μl、50μl。

## 3 试剂

以下试剂均为分析纯。

石油醚(30—60℃或60—90℃)、甲醇、三氯甲烷、甲苯、乙酸乙酯、甲酸、乙醚、苯、冰乙酸、盐酸、碳酸氢钠、氯化钠、硅胶G(Emerck硅胶G),赭曲霉毒素A标准溶液,用苯—冰乙酸(99+1)配成40μg/ml赭曲霉毒素A的贮备液,并用紫外分光光度计检定其浓度(赭曲霉毒素A的最大吸收峰波长333nm,分子量403,克分子消光系数值为5550)。精密吸取贮备液用苯稀释成

上接20

## 参 考 文 献

- [1] 中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所编·食物营养成分测定法(下册)。1987, 6—8。
- [2] 翟永信,等现代食品分析手册·第一版。北京,北京大学出版社,1988, 17—25。
- [3] 北京大学生物系编·生物化学实验指导·第二版·北京,人民教育出版社,1979, 175—177。

1μgO<sub>A</sub>/ml。标准溶液应置冰箱中避光保存。

#### 4 操作步骤

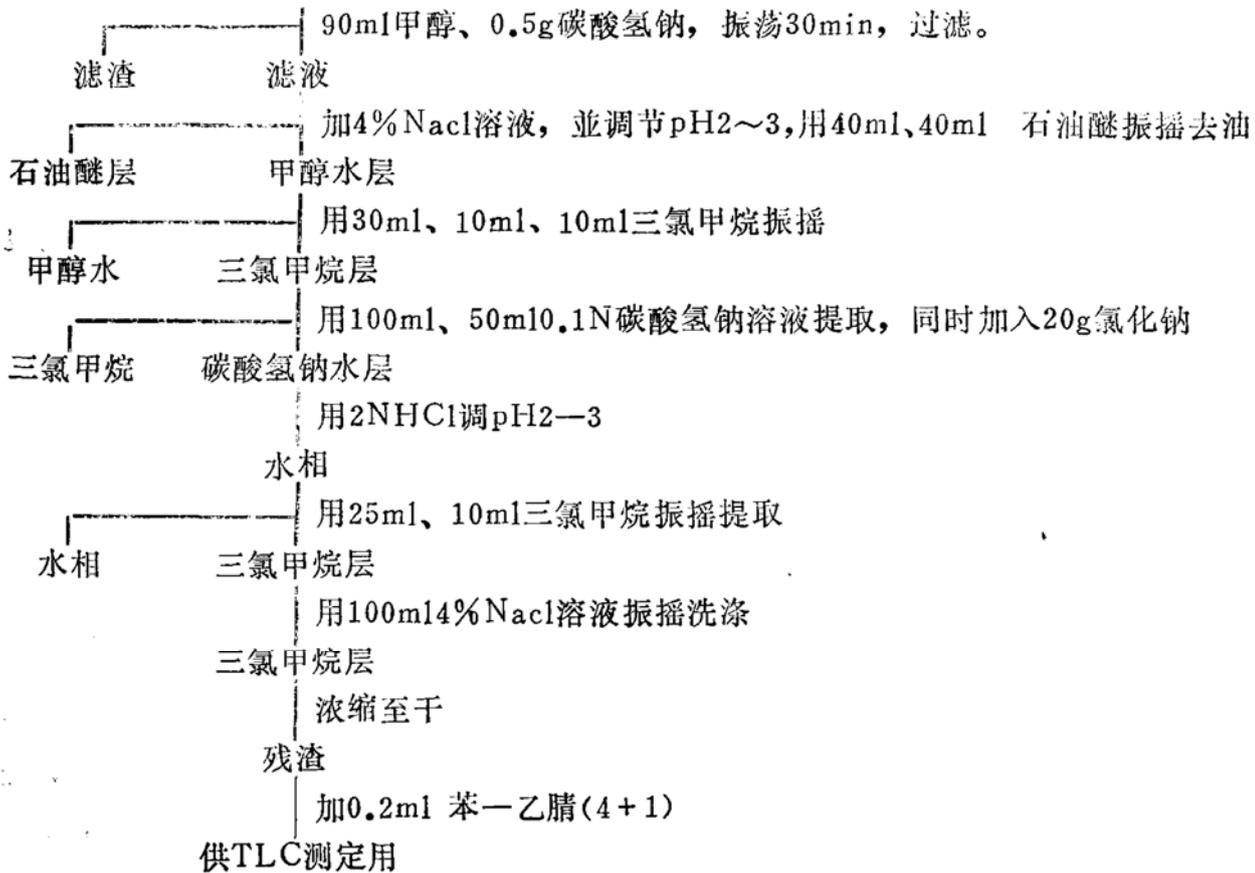
表 1 猪肾、肝、瘦肉中赭曲霉毒素A提取液的制备

样品名称	取样量 g	加甲醇量 ml	取提取 液量ml	加4%NaCl 溶液量ml	浓缩体积 ml
猪 肝	30	90	59	28	0.2
猪 肾	30	90	61	26	0.2
猪瘦肉	30	90	58	29	0.2

提取液量可由下式计算:

$$X = \frac{90 + A}{30} \times 16$$

30g样品(猪肾、肝、肌肉)



X——提取液量(ml)。

A——30g样品中的水分量(ml)。样品中的水分量参考中国医学科学院卫生研究所编的《食物成分表》。

3Q——取样量(g)。

16——进行测定时所取的提取液量相当于16g样品(g)

因各提取液中含48ml甲醇, 需39ml水才能调到甲醇与水之体积比为55:45, 因此加入4%NaCl溶液量等于87ml 减去提取液量。

#### 4.1 样品提取净化操作步骤

#### 4.2 薄层色谱

##### 4.2.1 薄层板的制备

称取4g硅胶G置于乳钵中, 加约8ml蒸馏水研磨至糊状, 立即倒入涂布器内制成5×20cm、厚度0.3mm的薄层板三块, 在空气中干燥后在105-110℃活化1h取出放干燥器中保存。

##### 4.2.2 点样

取两块薄层板, 在距薄层板下端2.5cm的基线上用微量注射器滴加两个点: 在距板左边缘1.7cm处滴加O<sub>A</sub>标准液4μl(浓度1μg/ml), 在距板左边缘2.5cm处滴加样液50μl, 然后在第二块板的样液点上加滴O<sub>A</sub>标准液4μl(浓度1μg/ml)。

4.2.3 双向展开

横展剂 乙醚—甲醇—水(94+5+1)

纵展剂 a. 甲苯—乙酸乙酯—甲酸—水  
(60+30+12+0.7)

6. 苯—冰乙酸 (9+1)

横向展开: 在展开槽内倒入 15ml 横展剂, 先将薄层板纵展至离原点 2—3cm, 取出后通风挥发溶剂 1—2min, 再将该薄层板靠标准点的长边置于同一展开槽内的溶剂中横展, 展至板端过 1min, 取出通风挥发溶剂 1min 后放回原展开槽中再横展一次至板端, 取出通风挥发溶剂 2—3min (在作阳性样品稀释定量时, 可只横展一次)。

纵向展开 在另一展开槽内倒入 10ml 纵展剂, 将经横展后的薄层板纵展至前沿距原点 13—15cm。取出通风挥干至板面无酸味(约 5—10min)。

4.2.4 观察与评定

将薄层色谱板置 365nm 波长紫外光灯下观察。

a. 在紫外光灯下将两板相互比较, 若第二块板的样液点在 OA 标准点的相应处出现最低检出量, 而在第一块板相同位置上未出现荧光点, 则样品中 OA 的含量在测定方法的灵敏度 1ppb 以下。

b. 如果第一板样液点在与第二板样液点相同位置上出现荧光点, 则看第二板样液的荧光点是否与滴加的标准重叠, 再进行以

下的定量与确证试验。

4.2.5 稀释定量

比较样液中 OA 与标准 OA 点的荧光强度, 估计稀释倍数。

4.2.6 确证试验

用碳酸氢钠乙醇溶液 (在 100ml 水中溶解 6.0g 碳酸氢钠, 加 20ml 乙醇) 喷洒色谱板, 在室温下干燥, 于长波紫外光灯下观察, 这时 OA 荧光点由黄绿色变为蓝色, 而且荧光强度有所增加, 再估计样品中 OA, 如果与喷洒前情况不一致, 要利用喷洒前所作的估计。

4.2.7 计算

按以下公式计算样品中 OA 的含量

$$X = A \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1000}{m}$$

式中。

X——样品中赭曲霉毒素 A 的含量,  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ppb)。

A——薄层板上测得样液点上 OA 的量,  $\mu\text{g}$

D——样液的总稀释倍数

$V_1$ ——苯—乙腈混合液的体积, ml。

$V_2$ ——滴加样液的体积, ml。

m——苯—乙腈溶解时相当样品的质量, g。

5 结果与讨论。

5.1 回收率试验。

表 2 猪组织中 OA 的回收率 (%)

加入 OA 的量 (ppb)	猪		肾		猪		肝		瘦		猪		肉
1	90	90	90	90	80	80	80	80	90	100	100	100	100
5	100	80	100	100	75	80	80	80	90	90	90	100	100
10	100	100			83	83	76	77	77	100	90	100	120

5.2 样品测定

测定市售猪肾及猪瘦肉共六份。一份阳性猪肾中含 OA 1.5ppb, 一份阳性猪瘦肉中含 OA 14ppb。

5.3 讨论:

本法用甲醇—水—碳酸氢钠提取猪组织中 OA, 其中“水”为猪组织本身的含水量。由于测定时采用薄层色谱双向展开, 只须用