

综述

展青霉素检测方法的研究进展

杨晓强 李家奎 郭定宗 张艳红 李 阳
(华中农业大学动物医学院,湖北 武汉 430070)

摘 要:展青霉素是由部分曲霉、青霉产生的有毒的代谢产物,主要污染水果及其制品。对目前常见的展青霉素的检测方法薄层色谱法、气-质相联机色谱法、液相色谱法、免疫学检测方法进行了综述,讨论了4种方法的优缺点,指出免疫检测方法是检测展青霉素的发展方向。
关键词:棒曲霉素;水果;微生物学技术;研究

Research Progress on Determination of Patulin

YANG Xiao-qiang, LI Jia-kui, GUO Ding-zong, ZHANG Yan-hong, LI Yang
(College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Hubei Wuhan 430070, China)

Abstract: Patulin is a metabolite of some *Penicillia* and *Aspergilli*, which mainly pollutes fruits and fruit products. Patulin has become an important index of the quality of the apple juice. In this paper the commonly used methods for determination of patulin were reviewed and their merits and demerits were discussed. The paper also suggested, the immunodetection is the developing trend to detect patulin.
Key word: Patulin; Fruit; Microbiological Techniques; Research

展青霉素(Patulin, PTL)是一种多聚乙酰内酯,化学名称为4-羟基-4H-呋[3,2C]吡喃2(6H)-酮,分子式为 $C_7H_6O_4$,无色结晶,酸性条件下较为稳定^[1]。很多食品如苹果汁、变质的苹果和梨、面粉及麦芽饲料中都发现有展青霉素。展青霉素是一种有毒内酯,具有强烈的抗菌活性,对动物的细胞和组织具有很强的毒性,并具有潜在的致癌性和诱变性^[2],经皮下注射展青霉素对小鼠具有致癌性^[3],腹腔注射的LD₅₀是5 mg/kg BW^[4]。英国食品、消费品和环境化学物质致突变委员会已将展青霉素划为致突变物质^[5]。FAO/WHO食品添加剂委员会(JECFA)的研究报告表明,展青霉素没有致畸作用,但具有胚胎毒性,同时伴随有母本毒性。虽然对大鼠的研究尚不能说明它具有免疫毒性,但是高剂量的展青霉素有免疫抑制作用^[7]。鉴于展青霉素的潜

在毒性,国际上建议人类食用的苹果产品中的展青霉素残留量小于50 μg/kg,而很多国家将果汁中的展青霉素残留量调整在20~50 μg/L之间^[6]。
由于展青霉素的毒性作用,建立快速而灵敏的检测手段十分必要。目前国内外关于展青霉素检测方法的研究也取得了一些进展。

1 薄层色谱法(TLC)

薄层色谱法(TLC)是最初检测展青霉素的方法,最初是AOAC根据Scott等的^[8]一项合作研究进行改进制定的。其方法包括乙酸乙酯萃取和在硅胶柱上净化,并通过向硅胶板喷3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒水合盐酸盐(3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone, MBTH)显色剂,在紫外灯下显示出黄色荧光来达到检测目的。该方法最小检测限为20 μg/L。

[7] LEON G M GORRIS. Food safety objective an integral part of food chain management[J]. Food Control, 2005, 16: 801-809.
[8] 杨邦英. 罐头工业手册[M]. 北京:中国轻工业出版, 2002.
[9] 骆承庠. 乳与乳制品工艺学[M]. 北京:中国农业出版社, 1992.
[收稿日期:2006-01-08]

中图分类号:R15 文献标识码:E 文章编号:1004-8456(2007)02-0162-04

基金项目:湖北省科技攻关项目(2004AA203B02)
作者简介:杨晓强 男 硕士研究生
通讯作者:李家奎 男 副教授 博士后



到目前为止,仍在对净化方法、检测手段及 TLC 板进行改进,如双向滤膜层析萃取方法^[11]。该方法通过一个滤膜将溶于有机萃取溶剂中的小分子量的分析物与大分子的杂质分开,杂质留在萃取溶剂中。通过向硅胶板上喷 MBTH 试剂和密度测量来代替净化的方法。其回收率为 65%,最小检测限为 50 $\mu\text{g/L}$ 。Abramson 等^[12]用反相 TLC 板和用不同的展开剂为检测其他霉菌毒素提供了标准方法,其中包括对展青霉素的检测。这一技术虽然能将展青霉素在 TLC 板上很好地检测出来,但不能用来检测水果及其制品中的展青霉素的残留。Silvana 等^[9]建立了一种新的快速 TLC 扫描法检测苹果制品中的展青霉素,用乙酸乙酯提取苹果中的展青霉素,用两种方法定量分析。一种为直接法,即以甲苯 + 乙酸乙酯 + 甲酸(6 + 3 + 1)为流动相,在波长 275nm 处直接用紫外 - 可见光检测器检测;另一种为间接法,流动相不变,在薄层板上喷 MBTH 显色剂,在波长 412 nm 处检测。每个试样点以相同浓度重复测 3 次,直接法仪器的相对标准差为 4.4%,间接法为 5.1%。直接法检测限为 50 ng,间接法为 30 ng,相当于 20 $\mu\text{g/L}$ 和 12 $\mu\text{g/L}$ 。回收率为 78%,一块薄层板上可同时最多检测 10 个试样。

我国 GB 14974—1994《苹果和山楂制品中展青霉素限量卫生标准》规定展青霉素的检测采用 TLC 方法^[10]。该法虽然检测速度较快,但当对 5 - 羟甲基糠醛(HMF)存在时分离效果不好,只能半定量,且灵敏度不高(20 $\mu\text{g/L}$)^[11]。

2 气-质相联机色谱法(GC-MS)

大多数气相色谱法是将展青霉素用三甲基硅烷衍生,再用电子捕获检测(ECD)和质谱(MS)检测。最近的研究包括采用相应的咪唑类物质进行七氟丁酸盐衍生物的制备。色谱分离采用非极性硅蜡毛细管色谱柱和 ECD 检测器。检测线性范围为 0.05 ~ 0.5 ng, RSD 为 1.9% ~ 4.0%。该法对自然污染的果汁饮料进行乙酸乙酯提取和硅胶柱纯化后,检测限为 10 $\mu\text{g/L}$ ^[13]。直接酰基化法优于对试样的浸提,该法利用原液酰基化的方法,多相透析将展青霉素分离到透析管中,以氯化甲烷为溶剂,醋酸酐作为衍生介质,4 - N,N - 二甲基氨基嘧啶作为衍生促进剂,硝基苯作为内标^[14],透析管在 25 条件下搅拌 24 h,取出管中的有机相,用 GC-MS 分析。尽管试样处理时间很长,但是处理后的试样分析很快,检测限为 10 $\mu\text{g/L}$,平均回收率可达 79%。现在有一种无需衍生的方法,利用电子压力把要分析的展青霉素射到分析柱上^[15],用 MS 检测,苹果汁的检测限为

4 $\mu\text{g/L}$ 。目前的研究主要关注是否能找到一个更好的、更稳定的展青霉素类似物作内标物,以提高展青霉素与内标物峰面积比的重现性和灵敏性。

3 液相色谱法(HPLC)

展青霉素是小分子量的极性化合物,有较强的紫外吸收光谱,因此适合于用 HPLC 检测。最初的正相色谱法正逐渐被反相所代替。乙酸乙酯被广泛地作为萃取用溶剂,而净化系统也得到了不断发展^[16]。由于展青霉素只能通过使用高水溶性的固定相才能被留在反相 HPLC 的柱子上,所以固定相的选择大部分采用乙腈 + 水(10 + 90)和四氢呋喃 + 水(5 + 95)。

1976 年 Tanner 和 Zanier^[17]发表的展青霉素检测方法包括乙酸乙酯提取、碳酸钠溶液分离提纯,以除去酚类物质。该方法经稍微修改后成了现在的 HPLC。Moller 和 Josefsson 加强了对微尺度(micor-dimension)的净化^[18],与此同时,Forbito 和 Babsky 还提出了对 HPLC 的固定相进行修饰,以提高展青霉素的分辨率^[19]。

固相萃取(SPE)技术最近被用于苹果汁中展青霉素的提取和纯化。Rovira 等用改进的硅胶 SPE 柱,对乙酸乙酯提取液纯化后进行反相 HPLC 分析^[20]。以前在 TLC 半定量分析时用多相透析膜分离技术纯化试样,后发展为用硅胶 SPE 柱纯化,用反相 HPLC 分析和紫外检测器检测^[21]。一种商业多功能纯化柱(Mycosep column, Romer Labs., Union, MO, USA)现已用于果汁和乙腈混合物中的展青霉素的分离^[22],回收率在 82% ~ 96% 之间。此外通用的反相 SPE 柱纯化展青霉素,将未稀释的苹果汁直接通过预处理好的该柱,洗脱,然后进行 HPLC 分析,试样回收率为 93% ~ 104%^[23]。

研究表明,反相 HPLC 法可同时对展青霉素和羟甲基糠醛(HMF)进行定量^[24],其回收率分别为 103% 和 94%。展青霉素和 5 - 羟甲基糠醛(HMF)的最小检测限分别为 5 $\mu\text{g/L}$ 和 10 $\mu\text{g/L}$ 。

4 免疫学检测方法

展青霉素的免疫学检测技术在快速净化和分析方法上都有长足的发展。McElroy 等^[25]将展青霉素与半戊二酸连接得到二者的衍生物,再与牛血清白蛋白(BSA)连接构成完全抗原 PTL - 半戊二酸 - BSA,制备出抗 PTL - 半戊二酸 - BSA 的 PcAb(多克隆抗体),建立了间接/间接竞争 ELISA 方法,并检测了此 PcAb 的滴度及特异性。认为使用免疫学方法检测 PTL 非常简便。

与霉菌毒素分析的其他领域一样,以免疫化学技术为基础的展青霉素分析方法正在发展。如 ELISA 抗体或配合免疫吸附(IA)清洗柱等产品是目前的发展方向。但目前市场上还没有商业化的产品。虽然 McElroy 等报道了抗 PTL-半戊二酸-BSA 多抗产品,并且通过间接 ELISA 测试表明该多抗与 PTL-半戊二酸-BSA 结合具有特异性,但该多抗是否能与展青霉素特异性结合作者并没有报道,也没有说明该多抗经过纯化后能提高检测 PTL-半戊二酸-BSA 间接 ELISA 方法的敏感性和特异性。

目前,展青霉素检测的研究主要有仪器分析和免疫法,并且正不断发展。仪器分析侧重于结构、灵敏、可靠,但设备昂贵。免疫法侧重于快速检测,但是 PTL 分子量小,本身不具有免疫源性,抗体制备比较难,所以 PTL 的检测方法还是以仪器分析方法为主。

建立快速、简便、灵敏、特异性好、廉价的免疫方法具有十分重要的意义。目前,已有通过制备抗 PTL 衍生物的 PcAb,建立间接/间接竞争 ELISA 检测方法的报道^[25]。但尚未见有关制备抗 PTL 的单克隆抗体(McAb)及组建快速免疫学检测试剂盒的报道。国内有关单位正在进行免疫学检测展青霉素的方法攻关,通过改造展青霉素与球蛋白的分子结构,成功地构建了展青霉素完全抗原,通过免疫小鼠制备出抗 PTL 衍生物的多克隆抗体,相信不久将有相关产品问世。

参考文献

- [1] ROBERT C. Patulin-induced cellular toxicity: a vital fluorescence study[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,1992,112(4):235-244.
- [2] CRISEO R. Patulin[J]. *Ann Ig*, 1990,(3):343-352.
- [3] POHLAND A E, ALLEN R. Stability studies with patulin[J]. *J AOAC*, 1970,53(4):688-691.
- [4] COLE R J, COX R H. Handbook of toxic fungal metabolites, Academic Press[M]. New York,1981.256-257.
- [5] UNITED KINGDOM COMMITTEE ON TOXICITY. Mutagenic and carcinogenicity of chemicals in food, consumer products and the environment, annual report, HMSO[R]. London,1992.
- [6] Food and Agricultural Organization. Worldwide regulations for mycotoxins, a compendium[R]. FAO Food and Nutrition Paper,1996,No.64.
- [7] Food and Agricultural Organization, World Health Organization. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Tech[R]. Report Series, WHO, Geneva,1995. 859: 44.
- [8] SCOTT P M, TARTER E J, HANCHAY J P. Improved liquid chromatographic method for determination of aflatoxins in peanut butter and other commodities[J]. *Assoc Off Anal Chem*,1984,67(3):597-600.
- [9] SILVANA V, ALVARO V, CERDEIRAS P, et al. A rapid TLC-scanning method for the determination of patulin in apple products[J]. *Journal of Planar Chromatography*, 1999,12(4):172-175.
- [10] GB/T 5009.185-2003. 苹果和山楂制品中展青霉素限量卫生标准[S].
- [11] KUBACKI S J. The analysis and occurrence of patulin in apple juice [M]//P S Steyn and R. Vleffaar. *Mycotoxins and phycotoxins-a collection of invited papers presented at the sixth international IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins*, Pretoria, South Africa, 1985,293-304.
- [12] ABRAMSON D, THORSTEINSON T, FOREST D. Chromatography of mycotoxins on precoated reverse-phase thin-layer plates[J]. *Arch Environ Toxicol*, 1989, 18(3):327.
- [13] TARTER E J, SCOTT P M. Determination of patulin by capillary gas chromatography of the heptafluorobutyrate derivative [J]. *J Chromatogr*,1991,53(2):441-446.
- [14] SHEU F, SHYU Y T. Analysis of patulin in apple juice by diphasic dialysis extraction with in situ acylation and mass spectrometric determination[J]. *J Agric Food Chem*, 1999,47(7):2711-2714.
- [15] LLOVERA M, VILADRICH R, TORRES M, et al. Analysis of underivatized patulin by a GC-MS technique[J]. *Journal of Food Protection*, 1999,62(2):202-205.
- [16] WARE G M, THORPE C W, POHLAND A E. Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice [J]. *J Assoc Off Anal Chem*,1974,57(5):1111-1113.
- [17] WHEELER J L, HARRISON M A, KOEHLER P E. Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider[J]. *Journal of Food Science*, 1987, 52(2):479-480.
- [18] MOLLER T, JOSEFSSON E. Rapid high pressure liquid chromatography of patulin in apple juice[J]. *J Assoc of Anal Chem*, 1980, 63(5):1055-1056.
- [19] FORBITO P R, BABSKY N E. Rapid liquid chromatographic determination of patulin in apple juice[J]. *J Assoc of Anal Chem*, 1985, 68(5):950-951.
- [20] ROVIRA R, RIBERA F, SANCHIS V, et al. Improvements in the quantitation of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography[J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(5):214-216.
- [21] DIAZ S, SUAREZ G, DOMINGUEZ L, et al. Determination of patulin by reversed-phase high-performance liquid chromatography with extraction by diphasic dialysis[J]. *Analyst*, 1993,118(2):171-173.
- [22] MALONE B R, HUMPHREY C W, HEETWOOD K D, et al. Rapid low-solvent method for patulin in apple juice and apple juice concentrate [R]. *Mycotoxins in food chain; processing and toxicological aspects*. in: proceedings of mycotox '98 International Symposium, Toulouse, 1998, 509.
- [23] TRUCKSESS M W, TANG Y. Solid-phase extraction method for patulin in apple juice and unfiltered apple juice[J]. *J AOAC Int*, 1999, 82(5):1109-1113.
- [24] GOKMEN V, ACAR J. Incidence of patulin in apple juice concentrates produced in Turkey[J]. *J Chromatogr A*, 1998,815(1):99-102.
- [25] McELROY L J, WEISS C M. The production of polyclonal antibodies against the mycotoxin derivative patulin hemiglutarate [J]. *Can J Microbiol*,1993,39(9):861-863.

[收稿日期:2006-12-17]