

中图分类号 :R15 ;TS218 文献标识码 :B 文章编号 :1004 - 8456(2003)02 - 0125 - 04

## 反相高效液相色谱法分析米曲霉发酵液中的圆弧偶氮酸

赵珊<sup>1</sup> 李业鹏<sup>2</sup> 计融<sup>2</sup> 贺玉梅<sup>1</sup> 李玉伟<sup>2</sup>

(1. 北京市疾病预防控制中心 ,北京 100013 ;2. 中国疾控中心营养与食品安全所 ,北京 100021)

**摘要 :**为建立米曲霉培养液中圆弧偶氮酸的检测方法 ,采用 4 % 乙酸水溶液 (三氟乙酸调至 pH 2.2) 与乙腈配比做流动相 (55 + 45) ,选择 280 nm 紫外吸收波长 ,测定米曲霉发酵液中的圆弧偶氮酸 ,圆弧偶氮酸在 C18 色谱柱上获得良好的分离 ,检出限为 0.002 μg/mL ;麦芽汁 - 蛋白胨培养液、麦芽汁 - 酵母膏培养液、马铃薯 - 酵母膏培养液中的圆弧偶氮酸回收率分别为 93.4 %、95.2 %、96.7 % ;RSD 分别为 4.3 %、3.4 %、3.2 %。该方法适宜米曲霉发酵液中圆弧偶氮酸的检测。

**关键词 :**色谱法 ,高压液相 ;曲霉 ,米 ;真菌毒素类

### Analysis of cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae* liquid media by reversed-phase high-performance liquid chromatography

Zhao Shan , et al.

(Beijing Center for Disease Prevention and Control ,China , Beijing 100013)

**Abstract :** A new and efficient method for analyzing cyclopiazonic acid in *Aspergillus oryzae* liquid media by reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was developed. The cyclopiazonic acid was well separated on a C18 column using acetonitrile-4 % acetic acid (pH 2.2 adjusted with trifluoacetic acid) (45 + 55) as the mobile phase , followed by an UN detection at 280 nm. The detection limit was 0.002 μg/mL. The spiked recoveries in wort-yeast culture , wort-peptone culture and potato-yeast-sugar culture were 93.4 % , 95.2 % and 96.7 % , respectively. The RSD values were 4.3 % , 3.4 % and 3.2 % respectively.

**Key Words :** Chromatography ,High Pressure Liquid ; *Aspergillus oryzae* ; Mycotoxins

圆弧偶氮酸 (Cyclopiazonic acid , CPA) 是由曲霉属和青霉属的真菌产生的有毒代谢产物。其分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> , 分子量为 336.15。1985 年 Rao 和 Husain 首次报道了由 *Aspergillus flavus* 和 *Aspergillus tamaris* 产生的 CPA 引起的人类真菌毒素中毒。<sup>[1]</sup> CPA 可引起大鼠的肝、肾组织及免疫系统的损伤,<sup>[2]</sup> 往往与黄曲霉毒素同时存在,因此 CPA 的中毒往往被黄曲霉毒素中毒所掩盖。<sup>[3]</sup> 目前,国内尚无 CPA 的检测方法,本文建立了米曲霉培养液中 CPA 的反相高效液相色谱法。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌种来源 VE - 328、UE - 336、3042、3811 购自北京市食品发酵研究所。

1.1.2 马铃薯 - 葡萄糖琼脂培养基 马铃薯 100 g ,葡萄糖 20 g ,琼脂 20 g ,蒸馏水 1 000 mL , 115 ℃ , 15 min。<sup>[5]</sup>

1.1.3 麦芽汁 购自北京市啤酒厂。

1.1.4 马铃薯汁 取去皮马铃薯 200 g ,切成小块,加入 1 000 mL 蒸馏水,煮沸 20 min ,纱布过滤。<sup>[4]</sup>

1.1.5 麦芽汁 - 酵母膏培养液 (简称麦 - 酵) 1 %

基金项目 :卫生部保健食品专项基金课题 (BJ - 01 - 20)  
作者简介 :赵珊 女 副主任技师 硕士

This work was supported by the Special Funds for Health Food of Ministry of Health ,China (BJ - 01 - 20).

酵母膏的麦芽汁溶液,115 ,15 min。<sup>[4]</sup>

### 1.1.6 麦芽汁 - 蛋白胨培养液(简称麦 - 蛋)

0.1%蛋白胨的麦芽汁溶液,115 ,15 min。<sup>[4]</sup>

1.1.7 马铃薯 - 酵母膏 - 蔗糖培养液(简称马 - 酵) 1%酵母膏和 10%蔗糖的马铃薯汁溶液,115 ,15 min。<sup>[4]</sup>

1.1.8 培养液的制备 将各菌种分别转种于马铃薯 - 葡萄糖琼脂培养基斜面(28 ±1) ,培养 5 d,确证为纯培养物后,分别接种于麦芽汁 - 酵母膏、麦芽汁 - 蛋白胨及马铃薯 - 酵母膏 - 蔗糖培养液中,置(28 ±1) 培养 14 d。培养液经流动蒸汽 1 h 后过滤,所得滤液用于高效液相色谱法检测。<sup>[4]</sup>

1.1.9 试剂 冰乙酸,分析纯。三氟乙酸,Merck 公司。乙腈,色谱纯,Fisher 公司。圆弧偶氮酸标准品,Sigma 公司。

圆弧偶氮酸标准储备液 精确称取圆弧偶氮酸标准品 1.00 mg,用甲醇溶解,定容至 10.0 mL,即配成 0.10 mg/mL 的标准溶液。

## 1.2 仪器设备

Waters2690 型高效液相色谱仪。996 型二级管阵列紫外检测器,美国 Waters 公司产品。Milli-Q2150 型超纯水器,美国 Millipore 公司产品。KQ-500 型超声波清洗器,昆山市超声波仪器厂产品。

### 1.3 试样溶液预处理

分别取 10.0 mL 麦芽汁 - 酵母膏培养液、麦芽汁 - 蛋白胨培养液和马铃薯 - 酵母膏 - 蔗糖培养液,超声震荡 10 min,用 0.45 μm 微孔过滤膜过滤,滤液用做 HPLC 分析。

### 1.4 色谱条件

色谱柱,Waters XTerra™ RP18 3.9 mm ×150 mm 5 μ; 流动相,4%乙酸水溶液(三氟乙酸调至 pH 2.2) + 乙腈 = 55 + 45; 检测波长,280 nm; 流速,1.0 mL/min; 进样量,30.0 μL。

## 2 结果与讨论

### 2.1 色谱条件的选择

2.1.1 流动相的选择 参照有关霉菌毒素及霉菌二次代谢产物文献报道,并根据圆弧偶氮酸化合物的性质,选择在弱酸性条件下分离该化合物,经过系列条件实验,当 4%乙酸水溶液与乙腈配比为 55 + 45 时,圆弧偶氮酸在色谱柱上即可获得分离,只是色谱峰拖尾,进一步采用三氟乙酸调 pH,当 pH 为 2.2 时圆弧偶氮酸在色谱柱上获得良好峰型。色谱图如图 1 所示,光谱图如图 2 所示。

### 2.1.2 检测波长的选择

从图 2 所示 200 ~ 400 nm 范围内的圆弧偶氮酸

光谱图来看,圆弧偶氮酸在 280 nm 紫外吸收最强,在此波长下测定圆弧偶氮酸灵敏度最高。

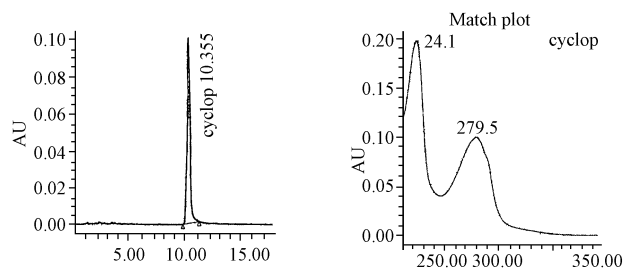


图 1 反相条件下  
圆弧偶氮酸色谱图

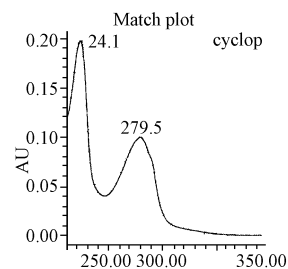


图 2 圆弧偶氮酸  
200 ~ 400 nm 光谱图

### 2.2 检测浓度的线性范围

分别配制浓度为 0.1、0.5、1、5、10、50 μg/mL 的圆弧偶氮酸标准溶液,在给定仪器条件下进行 HPLC 分析,以峰面积对浓度做校正曲线,得线性回归方程和相关系数分别为  $y = 9.26 \times 10^4 x - 2.00 \times 10^4$ ,  $r = 0.9999$ 。

检出限为 0.002 μg/mL。

### 2.3 回收率及精密度的测定

分别取 6 份 5 mL 麦芽汁 - 酵母膏、麦芽汁 - 蛋白胨、马铃薯 - 酵母膏本底培养液(未产生圆弧偶氮酸的培养液),各加入 0.5 mL 圆弧偶氮酸标准储备液,再加入 40%甲醇水溶液定容至 10.0 mL,相当于每毫升溶液含有 5 μg 的圆弧偶氮酸,超声萃取 10.0 min,过 0.45 μm 微孔滤膜,进样。麦芽汁 - 酵母膏、麦芽汁 - 蛋白胨、马铃薯 - 酵母膏培养液中圆弧偶氮酸的回收率分别为 93.4%、95.2%、96.7%; RSD 分别为 4.3%、3.4%、3.2%。

### 2.4 麦 - 蛋、麦 - 酵、马 - 酵培养液的测定

根据上述试样测定步骤,对不同条件下的麦芽汁 - 酵母膏、麦芽汁 - 蛋白胨、马铃薯 - 酵母膏培养液中圆弧偶氮酸含量进行 HPLC 测定,色谱图如图 3、4、5 所示,检测结果见表 1。12 份培养液中均检出了圆弧偶氮酸。

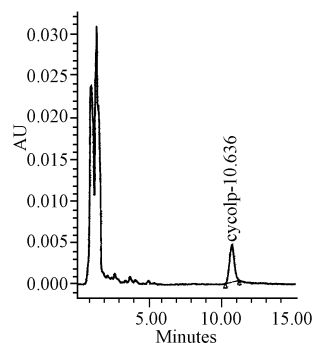


图 3 麦 - 蛋试样色谱图

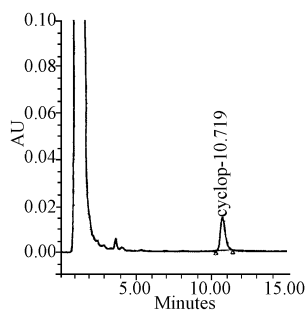


图4 麦-酵试样色谱图

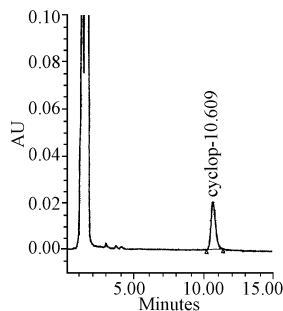


图5 马-酵试样色谱图

表1 麦-蛋、麦-酵、马-酵培养液中

培养液	圆弧偶氮酸的含量			μg/mL
	VE-328	UE-336	3042	
麦-蛋	1.26	0.23	0.12	0.38
麦-酵	0.15	0.15	0.17	0.12
马-酵	0.17	0.38	0.22	0.11

## 2.5 结论

本文建立了反相高效液相色谱法测定米曲霉发酵液中的圆弧偶氮酸,采用4%乙酸水溶液(三氟乙酸调pH=2.2)与乙腈配比做流动相,选择280nm紫外吸收波长,测定米曲霉发酵液中的圆弧偶氮酸,

中图分类号:R15;TS218

文献标识码:B

文章编号:1004-8456(2003)02-0128-03

圆弧偶氮酸在C18色谱柱上获得良好的分离,本方法简便、快速、灵敏度高并具有较宽的线性范围。

## 参考文献:

- [1] Lalitha Rao B, Husain A. Presence of cyclopiazonic acid in kodo millet (*Paspalum scrobiculatum*) causing 'kodu' poisoning in man and its production by associated fungi[J]. *Mycopathologia*, 1985, 89(3):177-180.
- [2] Hill JE, Lomax LG, Gble RJ, et al. Toxicologic and immunologic effects of sublethal doses of cyclopiazonic acid in rat[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1986, 47(5):1174-1177.
- [3] Widiastuti R, Maryam R, Blaney BJ, et al. Cyclopiazonic acid in combination with aflatoxins, zearalenone and ochratoxinA in Indonesian corn[J]. *Mycopathologia*, 1988, 104(3):153-156.
- [4] 罗雪云,刘兴,李玉伟,等. 变质甘蔗中毒的病因研究[J]. *卫生研究*, 1986, 15(3):25-27.
- [5] 罗雪云,主编. 食品卫生微生物检验标准手册[M]. 北京:中国标准出版社, 1995, 270.

[收稿日期:2002-11-06]

## 卫生部文件

卫法监发[2002]285号

### 卫生部关于同意延长对上海南希庆丰食品有限公司行政处罚时限的批复

上海市卫生局:

你局《关于申请延长对上海南希庆丰食品有限公司作出行政处罚决定期限的请示》(沪卫卫监[2002]78号)收悉。经研究,同意你局对上海南希庆丰食品有限公司生产经营禁止生产经营的食品一案的行政处罚时限延长三个月。

此复。

中华人民共和国卫生部  
二〇〇二年十一月二十日