

# 腐乳中桔霉素提取条件优化及检测方法研究

## Study on method of detection and optiminzation of extracted conditions for citrinin in sufu

徐渊金<sup>1</sup> 王向阳<sup>2</sup>

XU Yuan-jin<sup>1</sup> WANG Xiang-yang<sup>2</sup>

(1. 建德市质量计量监测中心, 浙江 杭州 311600; 2. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江 杭州 310018)

(1. Jiande City Center of Supervision & Inspection on Quality and Measurement, Hangzhou, Zhejiang 311600, China; 2. College of Food Science and Biotechnology Engineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou, Zhejiang 310018, China)

**摘要:**对腐乳中桔霉素提取条件进行优化, 确定最佳提取条件为甲苯—乙酸乙酯—甲酸(7:3:1, V/V) 超声处理 10 min, 提取温度 50 ℃, 提取 3 次, 提取液经浓缩后甲醇定容。建立高效液相色谱荧光检测器法测定腐乳中桔霉素, 采用 Hypersil ODS 2(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为分析柱, 水(pH 2.5)—乙腈(70:30, V/V) 为流动相, 流速 0.8 mL/min, 采用荧光检测器分析, 外标法定量。结果表明: 桔霉素在 0.01~100.00 μg/mL 范围内线性良好( $R^2=0.999\ 99$ ), 检出限 0.005 mg/kg, 样品加标回收率为 90.4%~107.9%, 相对标准偏差(RSD<sub>s</sub>) 小于 6%, 该方法操作简便、结果可靠。

**关键词:**桔霉素; 检测; 高效液相色谱; 腐乳

**Abstract:** Extracted conditions for citrinin were optimized in sufu. Citrinin was extracted completely by toluene-ethyl acetate-formic acid (7:3:1, V/V) at 50 ℃, with 10 min ultrasonic processing. A method for determining citrinin in sufu was established by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Citrinin was separated by mobile phase of water(pH 2.5)-acetonitrile (70:30) on Hypersil ODS 2 column. The results were showed that there was good linear relationship between the fluorescence detection values and citrinin concentration in the range of 0.01~100.00 μg/mL ( $R^2=0.999\ 99$ ). The limit of detection was 0.005 mg/kg and the recovery of citrinin were between 90.4% and 107.9% and relative standard deviation(RSD,  $n=6$ ) value were less than 6%.

**Keywords:** citrinin; detection; HPLC; sufu

腐乳(sufu)又称豆腐乳, 是中国传统的具有民族特色的发酵食品之一, 已有 1 500 多年历史。腐乳种类繁多, 风味各

异。按产品的颜色和风味大体上可分为红腐乳、白腐乳、青腐乳、酱腐乳及各种花色腐乳; 按生产中所用微生物类型可分为细菌型和霉菌型腐乳; 按产品的规格又可分为太方腐乳、中方腐乳、丁方腐乳和棋方腐乳<sup>[1]</sup>。桔霉素(citrinin)是霉菌[如青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)、红曲霉(*Monascus*)等]代谢产生的一种真菌毒素, 由 Wang H 等<sup>[2]</sup>从红曲霉菌中分离出, 并由法国学者 Blance 等<sup>[3]</sup>用吸收光谱、MS、NMR 方法进行了结构特征分析证实。桔霉素是一种对人畜有害的真菌毒素, 具有明显的肾毒性, 可引起试验动物的肾脏肿大、尿量增多、肾小管扩张和上皮细胞变性坏死等症状。桔霉素还具有致癌致畸作用<sup>[4,5]</sup>。现代研究<sup>[6-9]</sup>发现桔霉素广泛存在于利用霉菌作用的传统食品及受霉菌污染的食品, 目前中国对桔霉素的检测研究<sup>[10-13]</sup>主要集中在红曲米及红曲色素等方面。腐乳是利用霉菌发酵的产品, 存在桔霉素风险。孙伟伟等<sup>[14]</sup>分析了腐乳中存在的安全隐患, 但对于腐乳中桔霉素的研究还未见报道。目前有行业标准涉及食品中桔霉素的检测, 分别是 SN/T 2916—2011《出口食品中桔霉素的测定方法 免疫亲和柱净化—高效液相色谱法》<sup>[15]</sup> 和 SN/T 2426—2010《进出口粮谷中桔霉素含量检测方法 液相色谱法(中英文版)》<sup>[16]</sup>。前者采用甲醇—水提取样品中桔霉素, 提取液再经免疫亲和柱净化, 桔霉素的纯化主要靠免疫亲和柱。后者采用乙腈—异丙醇—水提取样品中桔霉素, 提取液再 C18 固相萃取柱净化, 谷类中桔霉素干扰物质较少, 可以不需要免疫亲和柱纯化。标准采用极性较大的甲醇、乙腈和水作为提取剂, 提取物杂质较多, 需采用净化柱净化, 操作较为繁琐, 且操作步骤增加容易造成目标物流失, 回收率降低。桔霉素具有荧光特性<sup>[17]</sup>, 使用 HPLC—FLD 法可以避免其他非荧光物质的干扰, 提高检测

**基金项目:** 建德市科技项目(编号: 2011C17)

**作者简介:** 徐渊金(1980—), 男, 建德市质量计量监测中心工程师, 硕士。E-mail: hzic2001@163.com

**收稿日期:** 2014-12-25

准确性,黄志兵等<sup>[18]</sup>采用该技术检测橙色红曲菌 As3. 4384 及其诱变体发酵产物中的桔霉素,但目前没有采用该技术检测腐乳中桔霉素的报道。本试验拟对腐乳中桔霉素提取条件进行优化,减少所提取的桔霉素中的干扰杂质,并通过建立高效液相色谱荧光检测器法(HPLC—FLD)进一步减少杂质对桔霉素检测的干扰,来检测腐乳中桔霉素含量,为监测腐乳产品桔霉素风险提供检测依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

- 腐乳:市售;
- 桔霉素:北京泰乐琪科技有限公司;
- 甲醇:色谱纯,临海市浙东特种试剂厂;
- 乙腈:色谱纯,天津赛孚科技有限公司;
- 乙酸乙酯:分析纯,浙江杭州双林化工试剂厂;
- 甲苯:分析纯,杭州化学试剂有限公司;
- 甲酸:分析纯,杭州高晶精细化工有限公司。

### 1.2 仪器与设备

- 高效液相色谱仪:LC-20A 型,日本岛津管理(中国)有限公司;
- 荧光检测器:RF-20A 型,日本岛津管理(中国)有限公司;
- 旋转蒸发仪:R-220 型,瑞士步琦有限公司;
- 真空泵:V-710 型,瑞士步琦有限公司;
- 低温冷却循环泵:DLSB-20/30 型,郑州长城科工贸有限公司;
- 超声波清洗器:SK 5200 LH 型,上海科导超声仪器有限公司。

### 1.3 方法

- 1.3.1 色谱条件选择 采用 Hypersil ODS 2 色谱柱(250 mm×4. 6 mm, 5 μm),柱温 25 ℃,检测波长  $E_x=331$ ,  $E_m=500$ ,分别以水(pH 2. 5)—甲醇、水(pH 2. 5)—乙腈为流动相,比较不同流动相比对桔霉素的分离效果,并考察流动相流速的影响。
- 1.3.2 标准溶液配制 准确称取桔霉素标准品 5. 00 mg,用甲醇溶解并稀释定容,配置成 100 μg/mL 的储备溶液,4 ℃冰箱保存备用。临用时,用甲醇稀释上述标准储备溶液,用甲醇稀释为 100. 00,10. 00,1. 00,0. 10,0. 01 μg/mL 的桔霉素标准溶液,上机测定。

#### 1.3.3 样品处理

(1) 提取剂对桔霉素提取效果的影响:称取 5 份经均质的加标腐乳样品,每份 5 g,置于锥形瓶中,分别采用 15 mL 甲醇、乙酸乙酯、甲醇—乙酸乙酯(1 : 1,V/V)、甲醇—氯仿(1 : 1,V/V)和甲醇—乙酸乙酯—甲酸(7 : 3 : 1,V/V)5 种萃取剂提取样品中桔霉素,提取温度为室温,超声提取时间 10 min,提取 3 次,合并提取液。提取液经减压旋转蒸发浓

缩至干后,用甲醇复溶并定容到 5 mL,然后用孔径为 0. 45 μm 的有机膜过滤,滤液备用。

(2) 提取时间对桔霉素提取效果的影响:称取 6 份经均质的加标腐乳样品,每份 5 g,置于锥形瓶中,分别加入 15 mL 甲醇—乙酸乙酯—甲酸(7 : 3 : 1,V/V)萃取剂,提取温度为室温,超声提取时间分别为 5,10,15,20,25,30 min,提取 3 次,合并提取液。提取液经减压旋转蒸发浓缩至干后,用甲醇复溶并定容到 5 mL,然后用孔径为 0. 45 μm 的有机膜过滤,滤液备用。

(3) 提取温度对桔霉素提取效果的影响:称取 6 份经均质的加标腐乳样品,每份 5 g,置于锥形瓶中,分别加入 15 mL 甲醇—乙酸乙酯—甲酸(7 : 3 : 1,V/V)萃取剂,超声提取时间 10 min,提取温度分别为 20,30,40,50,60,70 ℃,提取 3 次,合并提取液。提取液经减压旋转蒸发浓缩至干后,用甲醇复溶并定容到 5 mL,然后用孔径为 0. 45 μm 的有机膜过滤,滤液备用。

1. 3. 4 定性定量方法 采用标准物质的保留时间对样品峰进行定性,另外收集样品峰进行 GC—MS 定性验证。外标法以峰面积计算定量,依次配制不同浓度的桔霉素标准溶液进样分析,以质量浓度(μg/mL)为横坐标,以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件试验结果

选用水(pH 2. 5)—甲醇、水(pH 2. 5)—乙腈作为流动相,并调节流动相中水的比例,结果表明,水(pH 2. 5)—乙腈(70 : 30,V/V)作为流动相,流速 0. 8 mL/min 条件下,目标物出峰时间较合适,并且与杂质完全分离。GC—MS 证实该出峰物质是桔霉素。

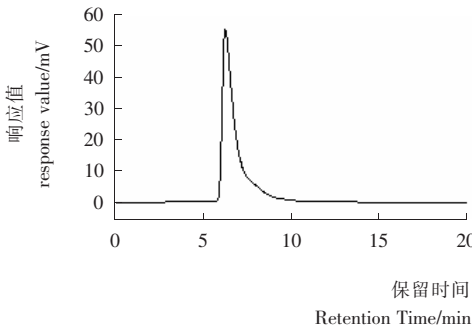


图 1 桔霉素标准溶液色谱图  
Figure 1 HPLC—FLD chromatogram of citrinin

### 2.2 桔霉素提取条件试验结果

2.2.1 桔霉素提取剂试验结果 采用甲醇—乙酸乙酯—甲酸(7 : 3 : 1,V/V)的萃取效果最好,提取率达 85% 以上,乙酸乙酯、甲醇—乙酸乙酯(1 : 1,V/V)和甲醇—氯仿(1 : 1,V/V)3 种萃取剂对桔霉素的提取率均低于 60%,甲醇提取剂则含有较多的干扰物质,影响 HPLC 检测结果,各提取剂

的提取效果见表 1。本试验萃取剂试验结果与陈蕴等<sup>[19,20]</sup>的选择一致,故采用甲醇—乙酸乙酯—甲酸(7 : 3 : 1,V/V)作为萃取剂。

表 1 萃取剂对桔霉素的提取效果

| Table 1 Extracting effect of different solvent for citrinin in sufu |          |
|---------------------------------------------------------------------|----------|
| 萃取剂                                                                 | 桔霉素提取率/% |
| 甲醇—乙酸乙酯—甲酸(7 : 3 : 1,V/V)                                           | 88.6     |
| 乙酸乙酯                                                                | 46.9     |
| 甲醇—乙酸乙酯(1 : 1,V/V)                                                  | 56.8     |
| 甲醇—氯仿(1 : 1,V/V)                                                    | 45.4     |
| 甲醇                                                                  | 95.6     |

2.2.2 桔霉素提取时间试验结果 在 10 min 内,随着超声提取时间的延长,桔霉素的提取率会增加,在 10 min 时达到最高值,此后再延长超声时间对提取效果影响很小,超声提处理时间对桔霉素提取效果见表 2。这表明超声提取 10 min 即可完全有效提取样品中桔霉素。

表 2 超声处理时间对桔霉素的提取效果

| Table 2 Extracting effect with ultrasonic processing for citrinin in sufu |          |
|---------------------------------------------------------------------------|----------|
| 超声处理时间/min                                                                | 桔霉素提取率/% |
| 5                                                                         | 65.8     |
| 10                                                                        | 88.6     |
| 15                                                                        | 88.6     |
| 20                                                                        | 88.8     |
| 25                                                                        | 88.9     |
| 30                                                                        | 88.9     |

2.2.3 桔霉素提取温度试验结果 在 50 ℃内,随着提取温度的提高,桔霉素的提取率随之增加,在 50 ℃时达到最高值,超过 50 ℃之后提取率反而下降(表 3)。这可能是因为桔霉素的荧光生色团对温度敏感<sup>[17]</sup>,温度太高使得桔霉素的荧光生色团失效,从而影响提取液的荧光强度,最终表征为含量下降。靳赛等<sup>[21]</sup>研究发现随着烘干温度的增加,同一红曲米测出的桔霉素的量在减少。这一研究结果与本试验结果一致,表明高温处理影响样品桔霉素检出水平。

2.3 线性方程及检出限

在试验条件下,测定 1.3.2 配置的桔霉素标准溶液,以峰面积响应值对桔霉素标准液浓度作标准曲线,见图 2。图 2 表明在试验条件下,桔霉素浓度与峰面积呈良好的线性关系, $y=1\ 604\ 491x+4\ 043$ , $R^2=0.999\ 99$ 。检测结果中色谱峰高为噪声高 3 倍( $S/N=3$ )相对应的浓度为检出限,本方法检出限为 0.005 mg/kg。

表 3 提取温度对桔霉素的提取效果

Table 3 Extracting effect in different temperature for citrinin in sufu

| 提取温度/℃ | 桔霉素提取率/% |
|--------|----------|
| 20     | 81.4     |
| 30     | 89.5     |
| 40     | 94.6     |
| 50     | 98.2     |
| 60     | 93.5     |
| 70     | 85.7     |

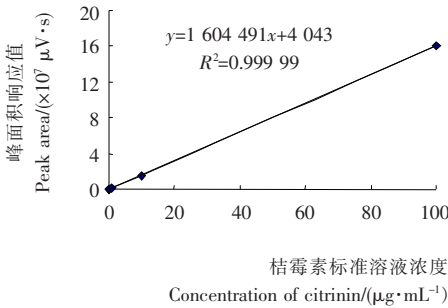


图 2 桔霉素标准曲线

Figure 2 Standard curve of citrinin

2.4 回收率及重复性

采用添加回收的方法,测定回收率。分别添加高、中、低 3 个水平,加标样品按 1.3.3 处理,并按 1.3.1 的色谱条件进行检测,每个添加水平平行检测 6 次,回收率和重复性数据见表 4。结果表明,方法回收率在 90.4%~107.9%,相对标准偏差( $RSD_6$ )小于 6%,可见本方法有较高的准确度和可靠性。

表 4 桔霉素的回收率和重复性测定结果

Table 4 Recovery rate and determination precision of citrinin determinations

| 本底值/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 加标量/<br>(mg · kg <sup>-1</sup> ) | 平均<br>回收率/% | RSD <sub>6</sub> /<br>% |
|----------------------------------|----------------------------------|-------------|-------------------------|
| 0.08                             | 0.5                              | 107.9       | 5.69                    |
| 0.08                             | 10.0                             | 94.6        | 3.90                    |
| 0.08                             | 40.0                             | 90.4        | 4.36                    |

2.5 样品测定

采用本方法对 8 个市售腐乳样品进行桔霉素含量测定,结果见表 5。由表 5 可知,试验的 8 个腐乳产品均检出桔霉素,并且桔霉素含量差别较大,桔霉素含量最低的只有 0.08 mg/kg,而最高达 8.69 mg/kg。这主要是腐乳是利用霉菌发酵作用的传统食品,容易受到桔霉素污染,同时由于生产工艺不同、菌种不同等因素影响,腐乳产品桔霉素含量差别较大。

表 5 腐乳桔霉素含量测定结果

| Table 5 Determination results of citrinin content in sufu |                             |      |                             |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------|------|-----------------------------|
| 样品                                                        | 检测结果/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 样品   | 检测结果/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
| 腐乳 1                                                      | 0.08                        | 腐乳 5 | 8.69                        |
| 腐乳 2                                                      | 0.78                        | 腐乳 6 | 0.69                        |
| 腐乳 3                                                      | 5.26                        | 腐乳 7 | 1.92                        |
| 腐乳 4                                                      | 3.63                        | 腐乳 8 | 6.86                        |

3 结论

本试验采用甲醇－乙酸乙酯－甲酸(7：3：1,V/V)作为提取剂,超声处理 10 min,提取温度 50 ℃,能有效提取腐乳中桔霉素,减少杂质干扰。建立了高效液相色谱荧光检测器法检测腐乳中桔霉素含量,其目标物分离效果好、回收率高、重现性好,试验方法可用于腐乳产品桔霉素含量检测。另外提取液未经净化处理,操作简便,分析时间短。对市售 8 个腐乳产品进行桔霉素含量检测,检测结果表明所检的 8 个腐乳样品普遍受桔霉素污染,但受污染程度相差较大,可能是因为腐乳产品桔霉素含量水平受产品生产工艺和菌种的影响较大。建议建立腐乳产品桔霉素污染数据库,改进生产工艺,选用低风险菌种,降低甚至清除腐乳产品桔霉素污染。

参考文献

1 张国艳,石彦国. 腐乳生产回顾[J]. 食品与发酵工业,1993(6): 72~74.

2 Wong H C, Koehler P E. production and isolation of an antibiotic from monascus purpureus and its relationship to pigment production [J]. Journal of Food Science,1981, 46(2):589~592.

3 Blanc P J, Laussac J P, Bars J, et al. Characterization of monascidin A from Monascus as citrinin[J]. International Journal of Food Microbiology, 1995(27): 201~213.

4 Chiba H, Yoshikawa M. Opioid antagonist peptides derived from k-casein[J]. Journal of Dairy Research, 1989, 3(56): 363~366.

5 Sabater-Vilar M, Maas R F M, Fink-Gremmels J. Mutagenicity of commercial Monascus fermentation products and the role of citrinin contamination[J]. Mutation Research, 1999(444): 7~

16.

6 许赣荣,卢晨,穆晓青,等. 部分红曲霉菌株产桔霉素的研究[J]. 无锡轻工大学学报,2000, 19(1):58.

7 李凤琴,许赣荣,李玉伟,等. 食品工业用红曲菌株产桔霉素能力的研究[J]. 卫生研究,2003(6):16~20.

8 李凤琴,许赣荣,李玉伟,等. 国产红曲制品中桔霉素污染水平的研究[J]. 卫生研究,2005(4):451~454.

9 Li Xue-Mei, Shen Xing-Hai, Xue Lan, et al. A validated RP—HPLC method for the determination of citrinin in Xuezhikang capsule and other monascus-fermented products[J]. E-Journal of Chemistey, 2012, 9(1):260~266.

10 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, 31(9):1 726~1 730.

11 文镜,徐东. 红曲中桔霉素的 HPLC 苯基柱分离分析[J]. 中国酿造,2010(6):148~151.

12 郭雪梅,许杨,刘仁荣. 免疫亲和柱—高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素[J]. 食品与发酵工业,2007, 33(10): 148~151.

13 柴秋儿,田亚琼,钟其顶,等. 食品添加剂红曲红中桔霉素检测方法的研究[J]. 食品与发酵工业,2008, 34(11): 144~148.

14 孙伟伟,王静,吴彩梅. 腐乳中存在的安全隐患[J]. 食品研究与开发,2009, 30(4): 156~160.

15 国家认证认可监督管理委员会. SN/T 2916—2011 出口食品中桔霉素的测定方法 免疫亲和柱净化—高效液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2011.

16 国家认证认可监督管理委员会. SN/T 2426—2010 进出口粮谷中桔霉素含量检测方法 液相色谱法[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

17 文镜,贾继春. 高效液相色谱法测定红曲醋中桔霉素含量[J]. 中国酿造,2008(9): 76~79.

18 黄志兵,李燕萍,王延华,等. HPLC 法测定橙色红曲菌 As3. 4384 及其诱变体发酵产物中的桔霉素[J]. 食品科学,2006, 27(12): 614~617.

19 陈蕴,许赣荣,虞慧玲. 红曲桔霉素高效液相色谱测定条件的优化[J]. 食品与发酵工业,2004, 30(1): 118~123.

20 王彩霞,肖杰,孙爱东,等. 高效液相色谱法检测红曲米中的桔霉素[J]. 中国粮油学报,2010, 25(7): 125~128.

21 靳赛,尤晓颜,王玉芬,等. 红曲米中桔霉素的高效液相色谱法检测[J]. 河南科学,2005, 23(2): 204~206.

(上接第 101 页)

8 韩双,杨金宝. 气相色谱—质谱/选择离子法测定牛奶中的香兰素[J]. 中国乳品工业,2008,36(8):53~55.

9 乙小娟,朱加叶. 气相色谱—质谱法测定巧克力中香兰素、特丁基对苯二酚、咖啡因[J]. 理化检验(化学分册),2009(12):1 404~1 406.

10 Zanjani M R K, Yamini Y, Shariati S. A new liquid-phase micro-extraction method based on solidification of floating organic drop[J]. Analytica. Chimica. Acta, 2007, 585(2): 286~293.

11 翦英红,胡艳. 分散液液微萃取—上浮溶剂固化/高效液相色谱法测定沉积物中的十溴联苯醚[J]. 分析化学,2010,38(1):62~66.

12 王宇,邹晓莉. 混合萃取剂—悬浮固化分散液相微萃取测定尿中

的苯巯基尿酸[J]. 分析化学,2013,41(5):749~753.

13 Zhang Jing-Wen, Ke Xiao-jing. Development of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for determination of trace cobalt in water samples[J]. Journal of the chinese Chemical Society,2011,58(7):911~918.

14 Zhang Jing-Wen, Wang Yu-kun. Development of dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop for determination of trace lead in water samples[J]. CLEAN-Soil, Air, Water,2011,39(12):1 095~1 098.

15 石慧,夏丹. 分散液液微萃取—反萃取—接受相固化—高效液相色谱法测定减肥茶中的西布曲明[J]. 分析化学,2013, 41(9): 1 444~1 448.