

免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定红曲制品中桔霉素的含量

许艳丽¹, 吴振兴¹, 何晓霞², 静平¹, 梁君妮³, 梁成珠^{1*}

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266001; 2. 青岛出入境检验检疫局, 青岛 266001;
3. 烟台出入境检验检疫局, 烟台 261400)

摘要: **目的** 建立免疫亲和柱净化-高效液相色谱法测定红曲制品中桔霉素含量的分析方法。 **方法** 试样经甲醇-水提取, 稀释过滤后经含桔霉素特异性抗体的免疫亲和柱净化, 洗脱液经 Merck Hibar RP-18e 色谱柱分离, 以乙腈:0.1%磷酸水溶液作为流动相, 采用荧光检测器测定(激发波长 350 nm, 发射波长 500 nm), 以外标法定量。 **结果** 桔霉素在 1~50 ng/mL 范围内有良好的线性关系, 相关系数为 0.99991, 方法检测限为 50 µg/kg, 在 50、100 和 200 µg/kg 3 个水平的加标回收率为 67.55%~89.12%, 相对标准偏差为 5.43%~11.25%。 **结论** 该方法操作简便、准确, 可适用于红曲制品中桔霉素的测定。

关键词: 桔霉素; 红曲制品; 免疫亲和柱; 高效液相色谱法

Determination of citrinin in monascus products by high performance liquid chromatography combined with immunoaffinity column

XU Yan-Li¹, WU Zhen-Xing¹, HE Xiao-Xia², JING Ping¹, LIANG Jun-Ni³, LIANG Cheng-Zhu^{1*}

(1. *Inspection and Quarantine Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China*; 2. *QingDao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China*;
3. *Yantai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Yantai 261400, China*)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of citrinin in monascus products by high performance liquid chromatography combined with immunoaffinity column. **Methods** Samples were extracted with methanol-water solution, purified by a immunoaffinity column containing specific antibody of citrinin after dilution and filtration. The eluate was separated by Merck Hibar RP-18e column with acetonitrile and 0.1% H₃PO₄-water as mobile phase, and detected by fluorescence detector with the excitation wavelength of 350 nm and the emission wavelength of 500 nm. Also the external standard method was used for quantitative analysis. **Results** Citrinin had a good linear relationship in the range of 1~50 ng/mL with correlation coefficient of 0.99991. The limit of detection was 50 µg/kg. The recoveries of citrinin spiked at 3 levels of 50, 100 and 200 µg/kg were 67.55%~89.12%, and the relative standard deviations were 5.43%~11.25%. **Conclusion** This method is simple, accurate and is suitable for the determination of citrinin in monascus products.

KEY WORDS: citrinin; monascus products; immunoaffinity column; high performance liquid chromatography

基金项目: 青岛市创业创新领军人才计划 (13-CX-28)

Fund: Supported by Qingdao Pioneering and Innovative Leading Talent Program (13-CX-28)

*通讯作者: 梁成珠, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: liangcz@163.com

*Corresponding author: LIANG Cheng-Zhu, Researcher, Inspection and Quarantine Center of Shandong Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266001, China. E-mail: liangcz@163.com

1 引言

红曲是中国传统大米发酵制品,是一种天然食品添加剂。它是利用中国特有的红曲霉菌在大米中培养发酵而成,经烘干后研磨,因为是深红色,所以称之为红曲^[1]。红曲被广泛用于食品着色、发酵制品及中医药中;作为天然食品添加剂,红曲具有色泽鲜艳、着色力强、热稳定性好等优点,在酿制酒、酿制醋、饮料、腐乳特别是在火腿等肉制品中将可能替代有致癌隐患的亚硝酸盐^[2]。红曲中含有的酸性洛伐它丁、豆甾醇等多种功能活性成分对高血压、高血糖、高血脂、高胆固醇、动脉粥样硬化等心脑血管疾病及癌症均有疗效,广泛应用于食品、化妆品、制药等行业^[3-5]。

1981年,李云等^[6]首次从红曲产品和发酵液中分离出一种对革兰氏阳性菌具有抗性作用的抗菌因子,命名为 Monascidin A。1993年,法国 Blanc 等^[7]研究人员通过仪器检测方法确认其具有与桔霉素具有相同的结构。红曲霉在发酵过程中能产生具有肾毒性、致畸性和致癌性的桔霉素,红曲产品的安全性问题受到广泛关注。桔霉素在红曲产品中的普遍存在不但威胁到食用者的健康,而且也成为限制我国红曲产品研发、生产和出口的瓶颈问题。研究表明,桔霉素可引起实验动物的肾脏肿大、尿量增多,肾小管扩张和上皮细胞变性坏死等症状^[8,9];桔霉素对小鼠半致死量(LD₅₀)经口喂试验为 110 mg/kg^[10]。

近年来,国内外市场对各类食品红曲、药用红曲及其相关产品的需求呈直线增长,红曲行业具有巨大的经济效益。红曲产品安全性由于桔霉素的存在而面临严峻的挑战,并受到国内外的广泛重视。日本厚生省在 1999 年颁布、2003 年修订的《日本食品添加剂标准》^[11]中将红曲色素中的桔霉素含量限量定为 0.2 mg/kg,我国对以红曲为原料的保健食品设有桔霉素限量,GB/T 5009.222-2008《红曲类产品中桔青霉素的测定》^[12]中对固态红曲产品中桔霉素的限量为 1 mg/kg,能性红曲米(粉)中桔霉素含量(以绝干计) 50 μg/kg,轻工业标准 QB/T2847-2007 功能性红曲米(粉)^[13]中对功能性红曲米(粉)中桔霉素的限量为 50 μg/kg(以绝干计);2014 年 3 月 6 日,欧盟发布(EU)No212/2014 号法规^[14],修订了(EC) No1881-2006 中关于食品中污染物桔霉素在红曲霉发酵大米食品补充剂中最大限量值为 2000 μg/kg 的规定。由于红曲主要作为食品添加剂使用,对于普通食品国内暂时还没有设定相关的限量标准,但是我国很多的出口食品都需要进行桔霉素含量的检测,因此研究红曲制品中桔霉素的含量的测定方法很有必要。

2 材料与方 法

2.1 试剂与仪器

桔霉素标准品(美国 Sigma 公司);免疫亲和柱(桔霉素,

美国 VICAM 公司);PBS 缓冲液(美国 VICAM 公司);甲醇、乙腈、磷酸(色谱纯,美国 VICAM 公司);吐温 20(美国 VICAM 公司);

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配荧光检测器,美国安捷伦公司);METTLER PM480 天平(瑞士梅特勒公司);ULTRA-TURRAX T-25 高速均质器(德国 IKA 公司);MAXI MIX II 混匀器(美国赛默飞世尔公司);MILLIPORE 纯水系统(美国密理博公司);玻纤滤纸(美国 VICAM 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

(1) 提取

称取经充分粉碎红曲样品 1.0 g 于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 甲醇-水(70:30,V:V)提取液、均质提取 2 min,移取 2.0 mL 滤液于 50 mL 量筒中,加入 38 mL PBS 缓冲溶液稀释、混匀;以玻纤滤纸过滤。

(2) 净化

准确移取 10.0 mL 上述澄清滤液过免疫亲和柱,以 3 mL/min 的流速全部通过亲和柱;加入 10 mL 0.1%吐温 PBS 溶液以 3 mL/min 的流速淋洗柱子,弃去全部流出液;准确加入 1.0 mL 甲醇-0.1%磷酸(70:30, V:V)进行洗脱,收集全部洗脱液于进样瓶中,供检测用。

2.2.2 仪器条件

色谱柱: Merk Hibar RP-18e(150 mm×4.6 mm, 5 μm);柱温: 30 °C;流速: 1 mL/min;进样量: 100 μL;检测条件: 激发波长 350 nm,发射波长 500 nm;流动相 A: 乙腈,流动相 B: 0.1% 磷酸;梯度洗脱条件见表 1。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	A/%	B/%
0	40	60
1	40	60
7	90	10
9	90	10
10	40	60
15	40	60

2.2.3 标准溶液的配制

桔霉素标准溶液: 将 1 mg 桔霉素粉末以甲醇溶解并定溶至 10 mL,于 4 °C 下保存。

取桔霉素标准溶液配制 1、5、10、25 和 50 ng/mL 5 个不同浓度的标准工作液,以峰面积为纵坐标,标准溶液的浓度为横坐标,绘制标准曲线,以保留时间定性,外标法定量。

3 结果与分析

3.1 提取方法的优化

由于红曲制品属于发酵制品, 导致桔霉素定量测定干扰因素多。所以, 样品前处理方法尤为重要。红曲制品中红曲色素含量很高, 传统的有机溶剂萃取后存在严重的色素干扰, 对目标峰分离有很大的影响, 而且有机溶剂萃取法存在操作繁琐、耗时、有机试剂毒性大等缺点^[15]; 本研究采用免疫亲和柱净化, 以甲醇-水为提取液进行提取, 经试验证明甲醇-水溶液(70:30, V:V)提取效果最佳, 由于红曲制品中红曲色素含量很高, 为避免红曲色素对免疫亲和柱特异性吸附桔霉素的影响, 所以吸取 2.0 mL 滤液, 加入 38 mL PBS 缓冲液进行稀释, 可以有效降低色素对目标峰的影响。

3.2 色谱条件的优化

本研究比较了不同流动相组成即甲醇:水、乙腈:水对目标峰的影响, 发现乙腈:水作为流动相能较好分离目标峰与杂质峰; 班昭等^[16]优化了红曲霉发酵液中桔霉素检测方法, 发现流动相的 pH 值对桔霉素的出峰时间会有影响, 并且对样品中桔霉素与杂质峰的分离效果也有很大影响。本研究用乙腈:0.1%磷酸溶液作为流动相, 采用梯度洗脱方式, 流动相比例如表 1 所示, 流动相的 pH 范围为 2.6~2.92, 能够有效将桔霉素的目标峰与杂质峰分开。图 1 是浓度为 1 ng/mL 的桔霉素标准品色谱图, 图 2 是红曲色素样品中桔霉素色谱图, 从图 2 可以看出, 在该色谱条件下, 桔霉素目标峰与杂质峰分离效果很好。

3.3 方法可靠性评价

3.3.1 线性范围

按上述色谱测定方式, 配制浓度为 1、5、10、25 和 50 ng/mL 的标准工作液并于 2.2.2 色谱条件下测定, 结果见图 3。由图 3 可知, 桔霉素浓度在 1~50 ng/mL 范围内具有良好的线性关系, 相关系数为 0.99991。

3.3.2 方法检测限

在样品中添加桔霉素标准品后, 以 3 倍信噪比计算, 红曲及其制品的检测限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

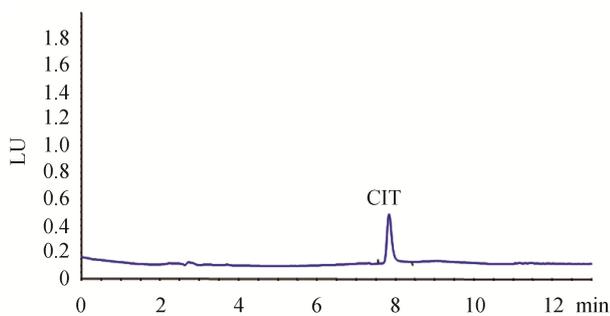


图 1 桔霉素标准品谱图(1 ng/mL)

Fig. 1 Chromatogram of CIT(1 ng/mL)

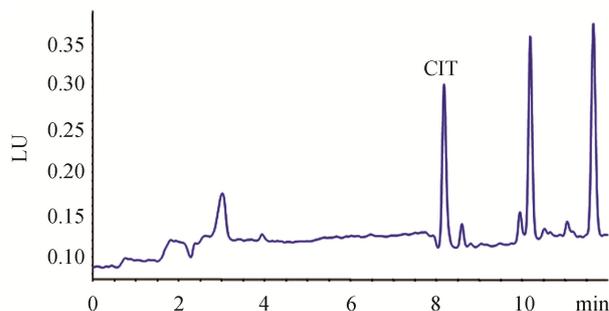


图 2 红曲色素样品中桔霉素谱图

Fig. 2 Chromatogram of CIT in monascus products

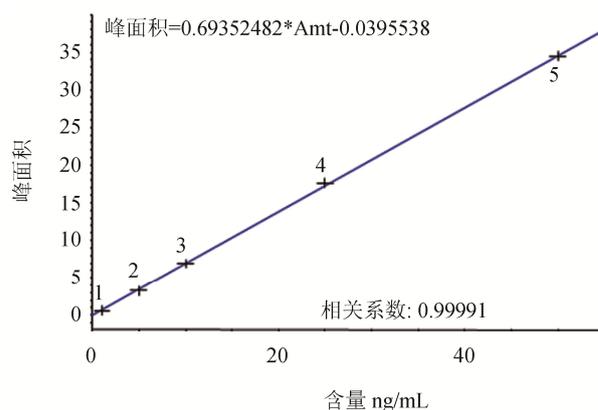


图 3 桔霉素标准曲线

Fig. 3 Standard curve of CIT standard

3.3.3 方法回收率和精密度

以红曲制品为基底, 选取红曲米、红曲红色素、功能性红曲 3 种具有代表性的红曲样品, 添加 50、100 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个水平, 按 2.2 方法进行提取净化操作, 每水平进行 10 次平行实验, 回收率和精密度实验结果见表 2, 由表 2 可知, 红曲制品中桔霉素平均回收率范围在 67.55%~89.12%之间, 相对标准偏差为 5.43%~11.25%。

4 结论

红曲是以大米为原料, 用红曲菌属红曲霉发酵培养制得, 目前红曲可分为色曲、酒曲和功能性红曲, 红曲制品的成分复杂, 干扰因素较多, 测定难度大, 其检测难点主要在样品净化。

本研究选取了具有代表性的红曲米、红曲红色素和功能性红曲作为实验对象, 采用免疫亲和柱净化, 利用抗原抗体特异性吸附, 能够快速地将桔霉素从样品中分离出来, 梯度洗脱能有效将桔霉素目标峰与杂质峰分离, 方法的定量限为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 回收率范围在 67.55%~89.12%, 相对标准偏差为 5.34%~11.25%。该方法特异性高、简便快速、灵敏准确、可重复性好, 且不使用有毒的有机溶剂如氯仿、二氯甲烷等, 对操作人员的安全更有保障, 适用于红曲制品中桔霉素的测定。

表2 回收率和精密度实验($n=10$)
Table 2 The result of precision and recovery ($n=10$)

基质	添加水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均测定值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率%	标准偏差	相对标准偏差%
红曲米	50	41.171	82.33	4.63	11.25
	100	79.032	79.03	8.00	10.12
	200	178.249	89.12	12.74	7.15
红曲红色素	50	33.782	67.55	3.00	8.88
	100	80.713	80.71	8.12	10.07
	200	159.458	79.73	8.66	5.43
功能性红曲	50	38.981	77.97	2.86	7.35
	100	80.939	80.94	8.87	10.96
	200	162.712	81.35	13.42	8.25

参考文献

- [1] 连喜军, 罗庆丰, 张申生, 等. 红曲红色素光稳定性测定方法探讨[J]. 中国食品添加剂, 2005, (3): 28–29.
Lian XJ, Luo QF, Zhang SS, *et al.* Study on the method of determining light stability of monascus red pigment [J]. China Food Addit, 2005, (3): 28–29.
- [2] 刘颖. 红曲色素的固态发酵法制取技术及其稳定性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.
Liu Y. Study on preparation technology and stability of monascus pigment by solid state fermentation [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2006.
- [3] 葛峰, 王艳, 王坚平, 等. 红曲中主要活性成分的研究[J]. 昆明理工大学学报, 2012, (37): 61–64.
Ge F, Wang Y, Wang JP, *et al.* Research on main bioactive components in red fermented rice[J]. J Kunming Univ Sci Technol (Nat Sci Ed), 2012, (37): 61–64.
- [4] 毛宁, 陈松生. 红曲霉有效成分的生理活性及应用研究[J]. 中国酿造, 1997, (1): 9–12.
Mao N, Chen SS. Study on the physiological activity and application of the active ingredient of monascus [J]. Chin Brew, 1997, (1): 9–12.
- [5] 刘仁荣, 许杨. 桔青霉素简介及其免疫学检测方法研究进展[J]. 卫生研究, 2004, 33(1): 124–127.
Liu RR, Xu Y. A brief introduction of citrinin and study progress of its immunoassay methods [J]. J Hyg Res, 2004, 33(1): 124–127.
- [6] 李云, 阎雪秋, 李枚秋, 等. 红曲与桔霉素[J]. 食品与发酵工业, 2000, 26(3): 82–86.
Li Y, Yan XQ, Li MQ, *et al.* Monascus and citrinin [J]. Food Ferment Ind, 2000, 26(3): 82–86.
- [7] Blanc PJ, Laussac JP, Lebars J, *et al.* Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin [J]. Int J Food Microbiol, 1995, (27): 201–213.
- [8] 孟昭赫, 张国柱, 宋圃菊. 真菌毒素图解[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979.
Meng ZH, Zhang GZ, Song PJ. Illustrations of monascus [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 1979.
- [9] 许贇荣, 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): 58–61.
Xu GR, Lu C, Mu XQ, *et al.* Investigation of Citrinin production by some monascus [J]. J Wuxi Univ Light Ind, 2000, 19(1): 58–61.
- [10] Ciegler A, Vessonder RF, Jackson LK. Production and biological activity of patulin and citrinin in from *Penicillium expansum* [J]. Appl Environ Microbiol, 1977, 33(4): 1004–1006.
- [11] 日本食品添加物协会. 食品添加物公定书[J]. 化工标准化与质量监督, 1999, 10: 1238–1224.
Food Additives Association of Japan. Food additives book [J]. Chem Standard Qual Superv, 1999, 10: 1238–124.
- [12] GB/T 5009.222-2008 红曲类产品中桔青霉素的测定[S].
GB/T 5009.222-2008 Determination of citrinin in monascus products [S].
- [13] QB/T2847-2007 功能性红曲米(粉) [S].
QB/T2847-2007 Functional red yeast rice (powder) [S].
- [14] (EC)No 1881/2006 Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [S].
- [15] 陈蕴, 许贇荣, 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.
Chen Y, Xu GR, Yu HL. The optimization of high performance liquid chromatographic conditions of monascus citrinin analysis [J]. Food Ferment Ind, 2004, 30(1): 118–123.
- [16] 班昭, 王昌禄, 陈勉华, 等. 红曲发酵液中桔霉素快速检测方法的优化[J]. 氨基酸和生物资源, 2010, 32(2): 70–73.
Ban Z, Wang CL, Chen MH, *et al.* Optimization of Rapid detection for citrinin in monascus fermentation broth [J]. Amino Acids Biotic Resources, 2010, 32(2): 70–73.

(责任编辑: 姚菲)

作者简介



许艳丽, 工程师, 硕士, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: evillive1124@163.com