

而不是常规的 pH7.5, 以保证酶裂解终 pH 为 8.0, 这是溶菌酶的最适 pH 值。改进后的方法还引入了冻融作用, 在冻融过程中, 细胞壁受到了极大的张力作用, 再加上溶菌酶在其上“钻孔”, 从而大大降低了细胞壁的牢固性, 提高了破壁率。本法采用低电压<sup>[1]</sup> 反向电泳的目的是延长了 SDS 作用于菌体的时间, 使裂解更充分。实验中采用三级培养, 菌体新鲜, 生长活跃, 粘性蛋白积累少, 菌壁易破裂。在第三级培养中, 采用 TA 培养基效果优于 PA 培养基, 原因待考。

## 参 考 文 献

1. 罗孝相, 王子芳: 微生物学报, 23(1): 68—72, 1983.
2. 王常霖, P R Hirsch: 遗传学报, 15(1): 25—33, 1988.
3. Okon Y et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 85—88, 1977.
4. Döbereiner J et al.: *Can. J. Microbiol.*, 22(10): 1464—1473, 1979.
5. Jacek Plazinski et al.: *J. Bacteriol.*, 155(3): 1429—1433, 1983.
6. Meyers J A et al.: *J. Bacteriol.*, 127: 1529—1537, 1976.
7. Casse F et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 113: 229—242, 1976.
8. Maniatis T et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 90—91, 1982.

## 饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 和棕曲霉毒素 A 的薄层层析测定法\*

殷蔚申 张耀东 吴小荣

(郑州粮食学院)

**摘要** 饲料样品 25g, 用 100ml 乙腈: 4% 氯化钠溶液 (9:1) 抽提, 吸取 25ml 提取液, 以石油醚脱脂二次, 加 0.1mol/L 碳酸氢钠溶液 12.5ml 后, 用氯仿提取二次, 氯仿层放入蒸发皿中, 于 60℃ 水浴挥干, 残渣以苯乙腈溶解定容为 1ml, 供测定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>。碳酸氢钠水层中加 1mol/L 盐酸 1ml 左右调节 pH 值为 4—5, 再以氯仿提取二次, 氯仿层放入蒸发皿中, 于 60℃ 水浴挥干, 残渣以苯乙酸溶解定容至 1ml, 供测定棕曲霉毒素 A。黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 的薄层板以乙醚横展、丙酮氯仿纵展。棕曲霉毒素 A 的薄层板以丙酮氯仿横展, 甲苯乙酸乙酯 90% 甲酸纵展。展板后分别在波长为 365nm 和 254nm 的紫外光下观察。如为阳性样品, 标记后用薄层扫描仪定量。棕曲霉毒素 A 阳性样品应先喷碳酸氢钠乙醇溶液后再扫描。本测定方法对三种毒素的最低检出量均为 0.2ng/点, 最低检出限量均为 3.2ppb。

**关键词** 黄曲霉毒素; 棕曲霉毒素; 真菌毒素; 饲料

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 是众所周知的危害最严重的两种真菌毒素。尤其是黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 不仅毒性强而且污染基质种类多, 污染量大。棕曲霉毒素 A 是棕曲霉毒素中毒性最强的一种, 它可使多种动物发生肝肾损害。玉米、花生饼、豆饼、麦麸等均为配合饲料的主要成份, 据报道, 这三种毒素均在以上成份中检出过<sup>[1,2]</sup>。因此饲料中这些毒素的污染情况是值得注意的问题。

由于配合饲料中除有以上成份外, 还有鱼

粉、骨粉、羽毛粉、石粉、维生素、抗生素等多种物质, 采用常规测定方法, 往往因干扰物质太多, 影响测定结果。本文报道的方法, 一次提取可以同时测定这三种毒素, 且干扰物质去除得干净, 测定效果好, 灵敏度较高, 操作也较简单。

## 材 料 与 方 法

### (一) 仪器

\* 国家自然科学基金资助项目。

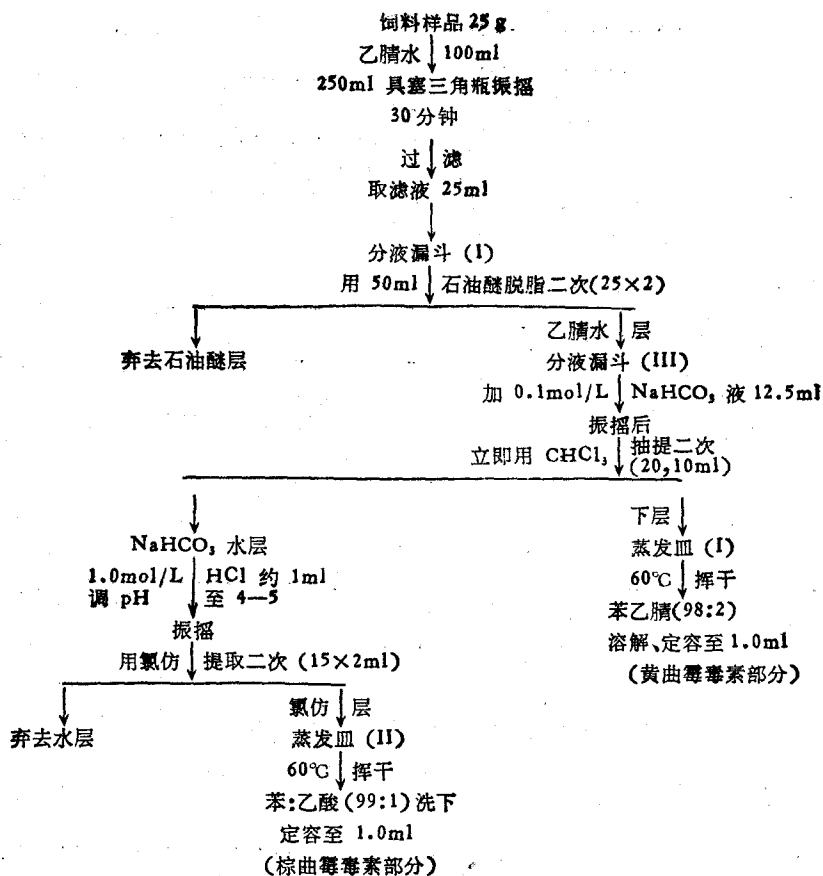


图1 饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 及棕曲霉毒素 A 提取净化流程

1. 电动振荡器。
2. 薄层板：称硅胶 G 4g，加蒸馏水 10—11 ml，研磨成糊状，立即倒入涂布器内，涂成 5.5 cm×20cm 规格的薄层板三块，晾干后于 105—110°C 活化 1 小时，取出放干燥器中保存备用。
3. 薄层涂布器。
4. 展开槽：内长 25cm，宽 6cm，高 4cm。
5. 紫外灯：波长 254nm、365nm。
6. 微量注射器：10、50 $\mu$ l。
7. CS910 薄层扫描仪（日本岛津公司生产）。
8. Shimadzu U-235 记录仪和 C-E1B 数据处理器。
9. 玻璃仪器：125ml 分液漏斗，1ml 具塞小瓶，50、75ml 蒸发皿，250ml 带塞三角瓶，移液管，玻璃喷雾器。

## (二) 试剂

1. 乙腈、石油醚、氯仿、丙酮、乙酸乙酯、苯、

甲酸、乙醚、乙醇，1mol/L 盐酸，0.1mol/L 碳酸氢钠溶液，甲苯、氯化钠。以上试剂均为化学纯或分析纯。

2. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 标准液：配制方法见参考文献 [2]。浓度为每 ml 含标准黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 或 G<sub>1</sub> 0.2 $\mu$ g。

3. 棕曲霉毒素 A 标准溶液：用十万分之一分析天平或百万分之一分析天平称取一定量的棕曲霉毒素 A 结晶，用苯：乙酸 (9:1) 溶解至容量瓶刻度，用紫外分光光度计标定其浓度 ( $\lambda_{333nm}$  5550) 作贮备液。精确吸取贮备液稀释成每 ml 含棕曲霉毒素 A 0.2 $\mu$ g 作点样标准液。

4. 碳酸氢钠乙醇液：称 6g NaHCO<sub>3</sub> 溶于 20ml 乙醇并加水至 100ml。

## (三) 操作步骤

1. 样品的提取与净化：称 25g 配合饲料样品置于 250ml 具塞三角瓶中，加 100ml 乙腈：4% 氯化钠溶液 (9:1)，以水封盖防漏。振

摇 30 分钟后过滤。吸取滤液 25ml 于分液漏斗 I 中。加石油醚 25ml 振摇, 静置分层后将下层放入分液漏斗 II 中, 再用 25ml 石油醚脱脂一次, 下层放入分液漏斗 III 中, 并于其中加 12.5ml 0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 溶液, 摇匀后立即加入 20ml 氯仿振摇, 静置分层后, 将下层放入蒸发皿 I 中(75ml 蒸发皿); 在分液漏斗 III 中加 40ml 4% 氯化钠溶液, 再加 10ml 氯仿振摇, 静置分层后将下层一并放入蒸发皿 I 中。蒸发皿 I 放在 69℃ 水浴上挥干, 残渣以苯:乙腈(98:2) 定容至 1ml, 供测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 和 G<sub>1</sub> 用。

分液漏斗 III 中的碳酸氢钠水层中加 1mol/L 盐酸 1ml 左右, 调节 pH 为 4—5。用 30ml 氯仿(分两次, 15 × 2ml) 萃取, 振摇分层后, 二次氯仿层一并放入蒸发皿 II 中(50ml), 将蒸发皿 II 放在 60℃ 水浴上挥干, 残渣以苯:乙酸(99:1) 定容至 1ml, 供测棕曲霉毒素 A 用。整个过程如图 1 所示<sup>[3]</sup>。

2. 点样: 在距薄层板下缘 1.5cm, 距左边缘 0.5cm 处点 10μl 样液, 在同一水平距左边缘 2.5cm 处点黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 混合标准液 10μl; 若测棕曲霉毒素 A, 则点棕曲霉毒素标准液 10μl。

3. 展板: 在展开槽中加横展剂后, 将薄层板放入展开槽中, 当溶剂前缘达板上缘后过 2 分钟取出, 待溶剂挥发后再放入另一展开槽中加纵展剂纵展至 12cm 处取出挥干。

表 1 毒素展层使用的溶剂系统

毒素种类	横展剂	纵展剂
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> 、G <sub>1</sub>	无水乙醚	氯仿:丙酮(98:2)
棕曲霉毒素 A	氯仿:丙酮(90:10)	甲苯:乙酸乙酯:90%甲酸(60:30:10)

4. 观察与确证: 将展开后的板放在波长 365nm 的紫外光灯下, 观察黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>, 在波长 254nm 下观察棕曲霉毒素 A。如在与标准点 R<sub>f</sub> 值相同的位置上, 出现与标准点颜色相同的荧光点, 则初步确定为阳性样品, 并进一步作确证试验。确证方法见参考文献[4]、[5]。

5. 定量测定: 已确证为阳性的样品, 在紫外光灯下将薄层板上的样液荧光点和标准荧光点分别针刺标记后, 用 CS910 薄层扫描仪测定样液点和标准点峰面积。棕曲霉毒素 A 的阳性样品则针刺标记后, 应喷 NaHCO<sub>3</sub> 乙醇水溶液, 使荧光点显蓝色荧光再进行扫描定量。仪器的工作条件为: 光源为氙灯, 激发波长均为 365nm, 截止滤光片 450nm, 狭缝 0.8 × 8 mm, 扫描速度 40mm/分; 记录仪纸速 40mm/分, 满标 100mV。样品中毒素含量 (ppb) 按下式计算:

样品中毒素含量 (ng/g)

$$= \frac{A_{\#}}{A_{\#}} \times 2 \times \frac{V_d}{V_s} \times \frac{1}{6.25}$$

式中 A<sub>#</sub>: 样液点峰面积

A<sub>#</sub>: 2ng 标准点的峰面积

V<sub>d</sub>: 样液定容体积 (1000μl)

V<sub>s</sub>: 样液点样体积 (10μl)

6.25 为 25ml 提取液相当的样品克数。

6. 回收率的测定: 在阴性样品中添加一定量的标准毒素, 按测样品同样的程序测定回收情况。

## 结果与讨论

1. 回收率的测定结果: 回收率高是评价检测方法优劣的重要依据, 为此我们用本方法做了 50、100、200 和 500ppb 的回收率试验, 结果见表 2。

表 2 阴性样品中加标准毒素的回收率结果(%)

回收水平	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	棕曲霉毒素 A
50ppb	87.6, 74.0, 79.4	100.7, 103.2, 85.5	87.5, 93.2, 78.0, 105.3
100ppb	69.3, 76.4, 79.0	79.9, 72.3, 89.6	87.4, 85.2, 86.1
200ppb	72.0, 69.8	81.8, 67.8	88.9, 109.4, 113.1
500ppb	—	—	83.0, 129.4, 121.2

由上表可见, 从回收率来看, 本方法适用于测定干扰物多的配合饲料样品中的这三种毒