

(郑长江同志为本文的统计分析做了大量工作,特此致谢)

参 考 文 献

- [1] Dallman PR, Iron deficiency: Diagnosis and treatment (Nutrition in Medicine), West J Med 1981, 134: 466~505
- [2] Piomelli S, A micromethod for free erythrocyte porphyrin: The FEP test, J Lab Clin Med 1973, 81: 932~940
- [3] 第四军医大学第二附属医院: 血清铁蛋白酶免疫分析试剂盒说明书
- [4] Garcic AA, Highly sensitive, simple determination of serum iron using chromazurcl B, Acta Clin Chim 1979, 91: 115~119
- [5] 张尧庭等: 多元统计分析引论, 科学出版社 1982
- [6] Iron deficiency in women, A report of the International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG) 1981
- [7] Fielding J: Serum iron and iron binding capacity, In: Iron, edited by Cook JD, Published by Churchill Livingstone 1980, 21

甘蔗及甘蔗汁中3-硝基丙酸的 薄层色谱测定法

胡文娟 王玉华 陈晓明 刘 勇

(中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所)

摘要 甘蔗及甘蔗汁中的3-硝基丙酸经提取、净化后,在硅胶G薄层色谱板上,与酚试剂反应,在长波紫外灯下形成黄色荧光显色物,本法最低检出量为0.2 μ g,按本方法测定甘蔗及甘蔗样品中3-硝基丙酸的最低检量为2ppm。在样品中加入3-硝基丙酸水平为1~10ppm时,其回收率范围为80.0~106.0%之间。

关键词 3-硝基丙酸 薄层色谱测定 甘蔗

3-硝基丙酸是存在于某些高等植物中及少数微生物产生的有毒物质,可引起人畜中毒。在我国北方某些地区发生的变质甘蔗食物中毒,就是由于霉变甘蔗中污染了节菱孢霉菌,该菌产毒所引起的[1~3]。其中毒症状主要表现为中枢神经系统损害,严重者甚至死亡或者留下以锥体外系损害为主的后遗症[4]。儿童中毒尤为严重。目前国外对该毒素的测定方法有TLC[5]、HPLC[6]、GLC[7]等。虽然HPLC和GLC的最低检出量可达1ppm,但方法繁琐、不经济,在我国不易推广普及。而TLC法虽然灵敏度低,最低检出量仅为33ppm,但方法简便,易于推广。为了适应我国食品卫生监督和防病工作的需要,我们在过去研究的基础上,改进了三硝基丙酸的提取和纯化,选择了较为满意的展开系统和显色剂,建立了简便、准确、灵敏度高的测定方法。

实 验 方 法

一、原理 样品中的3-硝基丙酸经提取,净化及浓缩,点样液于硅胶G薄层板上,

本课题为国家自然科学基金资助课题

展开后喷以MBTH(3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脒水合盐酸盐)显色剂,在长波紫外灯下显示出黄色荧光点。利用目视定量或用薄层扫描仪来测定其含量。

二、仪器

- 1.岛津CS-910双波长扫描仪及C-EIB微处理机;
- 2.减压吹气浓缩装置;
- 3.层析槽:内径25 cm,宽6 cm,高4 cm;
- 4.喷雾头装置:日本岛津公司产。

三、试剂(均为分析纯)

- 1.乙酸乙酯,三氯甲烷,苯,冰醋酸;
- 2.无水硫酸钠,2%碳酸氢钠,85%磷酸,6N盐酸;
- 3.硅胶G:青岛化工厂生产;
- 4.显色剂:0.5% MBTH 水溶液,置于4℃冰箱保存,每三天重新配制;
- 5.展开剂:苯:冰醋酸(9:1V/V),确证用展开剂石油醚:冰醋酸(9:1V/V);
- 6.3-硝基丙酸标准溶液:精确称取自制标准品,用乙酸乙酯制成储备液,再将此液用乙酸乙酯稀释成使用液,含3-硝基丙酸为20 μg/ml,置于4℃冰箱保存。

四、操作步骤

(一)3-硝基丙酸的提取和净化

1.甘蔗汁样品:取经去皮后切碎挤压得到的甘蔗汁10 ml,置于100 ml分液漏斗中,用6N盐酸调pH为2~3,用乙酸乙酯等体积提取三次,合并乙酸乙酯层于另一100 ml分液漏斗中,用2%碳酸氢钠溶液30 ml和10 ml分别提取,振摇2分钟,静置分层,将水相置于另一100 ml分液漏斗中,弃去乙酸乙酯层。用氯仿20 ml提取碳酸氢钠层弃去氯仿层,用6N盐酸调pH为2~3,用乙酸乙酯40 ml、30 ml、20 ml分别提取,将乙酸乙酯吸出于150 ml梨形瓶浓缩至干,用少量乙酸乙酯洗瓶壁数次,分别在40~45℃水浴中减压浓缩至干,加1 ml乙酸乙酯定容,待测定。

2.甘蔗样品:将市售经冰冻的样品去皮后切碎,取20 g置于具塞200 ml锥形瓶中,加无水硫酸钠20 g混匀,加乙酸乙酯60 ml,85%磷酸0.12 ml,浸泡30分钟后振荡30分钟,用粗滤纸过滤,取滤液30 ml于100 ml分液漏斗中。以下按四(一)1.“用2%碳酸氢钠溶液”起方法操作。

(二)薄层色谱测定

1.制板:取硅胶3 g,加水10 ml,搅成匀浆,涂布于三块5×20 cm玻璃板上,薄层厚度为0.3 mm,于110℃烘烤3小时后,置于干燥器中备用。

2.滴板:以薄板的短边为底边,距底边3 cm的基线上用微量注射器滴加10 μl标准液(20 μg/ml)一个点,以及10 μl样液两个点,在其中一个10 μl样液点上再滴加10 μl标准液(20 μg/ml)。

3.展开:上行展开16 cm,展开剂为苯:冰醋酸(9:1V/V)。

4.显色:展开后的薄板经挥干后,喷以显色剂至刚呈潮湿状,置于145~150℃烤箱中烘烤15分钟冷却后,在365 nm紫外灯下目视定量或用薄层扫描仪定量。3-硝基丙酸R_f值约为0.39。

5. 扫描条件: 岛津CS-910双波长薄层扫描仪, 用氙灯为光源, 在380nm激发波长, 500nm发射波长条件下, 测量标准与样液斑点的荧光强度。

6. 目测条件: 在365 nm紫外灯下观察, 结果判定如下: ①标准点应出现黄色荧光, ②如样液点在标准点相应处未出现黄色荧光点, 则样品中3-硝基丙酸的含量在测定方法灵敏度以下。如在相应位置上有黄色荧光点, 而另一点中样液与标准液点重叠, 则为阳性。根据样液点的荧光强度估计减少滴加微升数, 或稀释后再滴加不同微升数, 直至样液与标准点的荧光强度一致为止。并进行确证试验, 即用展开剂石油醚: 冰醋酸(9:1V/V); 展开16 cm后, 显色再测定, Rf值约为0.23。

(三) 计算公式

$$M(\mu\text{g/g或}\mu\text{g/ml}) = 0.2 \times \frac{V_1}{V_2} \times D \times \frac{1}{W}$$

式中:

M为甘蔗(或甘蔗汁)中3-硝基丙酸的量; 0.2为3-硝基丙酸的最低检出量(μg); V_1 为加入乙酸乙酯溶解的体积(ml); V_2 为出现最低检出量时滴加样液的体积(ml); D为样液的总稀释倍数; W为甘蔗取样量(g)或甘蔗汁取样量(ml)。

结 果 与 讨 论

一、提取剂的选择: 我们试用丙酮, 丙酮: 乙酸乙酯: 85%磷酸(1:5:0.01V/V)和乙酸乙酯: 85%磷酸(5:0.01V/V)等三种溶液分别提取阳性甘蔗样品, 用目测和扫描仪分别进行测定, 结果后者提取率不低于前者并且杂质少, 提取率基本一致, 因此选用了乙酸乙酯: 85%磷酸(5:0.01V/V)作为提取剂。

二、薄层色谱分离条件的研究

1. 制备好的薄层板放于干燥器中保存一天, 如果超过一天, 应重新活化一小时, 否则会出现灵敏度降低, 斑点不清楚, 不集中等现象。

2. 经多次实验最终选择苯: 冰乙酸(9:1V/V)作为展开剂, 石油醚: 冰乙酸(9:1V/V)作为确证时展开剂, 无假阳性结果出现, 分离效果满意, 其Rf值分别为0.39和0.23。

三、显色条件的研究

1. 荧光稳定性观察: 点板要集中, 展开后须用风扇尽量将酸吹干后再均匀地喷上显色剂至刚潮湿为适宜, 然后放入145~150℃烤箱中烘烤15分钟, 每次烘板量以4~5块为宜, 以免板过多烤箱温度降低, 待冷却后在紫外光下观察呈黄色荧光点, 如果烤箱温度过高则出现橙黄色荧光点并且底色深, 烤箱温度过低<130℃时则不出现显色反应。

2. 显色剂使用时现配

3. 3-硝基丙酸浓度与喷显色剂后的荧光强度关系: 在同一薄层板上, 点3-硝基丙酸0.1 μg 、0.3 μg 、0.4 μg 经展开显色后, 用扫描仪测定其荧光强度, 结果表明良好的线性。

四、薄层色谱荧光扫描条件 根据多次试验结果, 选择了以下测定条件: 光源: 氙灯。测定波长: 激发波长380 nm, 发射光波长为500 nm, 纸速20 mm/min, 扫描速度

20 mm/min,扫描时用纵向扫描,即从下往上扫描。

五、检出灵敏度及测定误差 在本实验条件下3-硝基丙酸在TLC上的最低检出量为0.16 μg ~0.2 μg ,为了安全起见,方法中定为0.2 μg 。

在TLC上3-硝基丙酸的含量在0.16 μg ~0.2 μg 时,两者的荧光强度可以在测定条件下加以区别,因此,目测误差为20%左右,仪器对同一点的多次扫描峰面积值误差在10%以内

六、方法回收率与最低检出量 在甘蔗样品中加入2~10 ppm的3-硝基丙酸,在甘蔗汁样品中加1~5 ppm的3-硝基丙酸,其回收试验结果列于附表。甘蔗及甘蔗汁样品中3-硝基丙酸的目测及荧光扫描的薄层色谱方法的灵敏度均为2 ppm,两种方法的回收率并无明显差别。

附表

甘蔗及甘蔗汁样品中加入3-硝基丙酸的回收率

样品名称	加入水平 PPm	薄层色谱目测法			薄层色谱荧光扫描法		
		测定次数	回收率%		测定次数	回收率%	
			范围	平均值		范围	平均值
甘蔗	10	3	90~123	101.0	3	89.3~123	101.1
	5	7	90~100	95.7	7	75~130	100.2
	2.5	5	90~100	96.0	5	69.4~108.1	88.6
	2	4	96~100	98.8	4	96~116	101.8
甘蔗汁	5	3	83~100	94.3	3	94.1~118.5	106.0
	2.5	3	100	100	3	91.4~104.7	96.9
	2	6	80~100	917	6	70.8~117.5	92.7
	1	2	80	80	3	78.5~92.0	87.0

(陈晓明整理)

参 考 文 献

- [1] 刘兴玠等:变质甘蔗中毒的病因研究,卫生研究 1984, 13(5):28~33
- [2] 胡文娟等:变质甘蔗节菱孢毒性物质——3-硝基丙酸的分离与鉴定,中华预防医学杂志 1986, 20(6):321~323
- [3] 刘兴玠等:产毒节菱孢培养物对动物的毒性研究,卫生研究 1987, 16(5):26~29
- [4] 何凤生等:变质甘蔗中毒引起锥体外系神经损害,中华医学杂志 1987, 67(7):395~396
- [5] Mosrowitz G. J. et al.: A method for the detection of β -nitroPropionic acid in crude biological extracts, Cereal Chem 1974, 51:96~105
- [6] Muir A. D. et al.: Conversion of 3-nitroPropanol (miserotoxin aglycone) to 3-nitroPropionic and in cattle and sheep, Toxicol Lett 1984, 30:137~141
- [7] Panei A. D.: β -nitroPropionic acid in foods with reference to *Aspergillus oryzae*, Diss Abstr Infor B 1978, 38:4070