

薄层色谱及其在食品卫生分析上的应用

陶 锐 编 著

四川人民出版社

薄层色谱及其在食品卫生 分析上的应用

陶 锐 编著

四川人民出版社

一九八二年·成都

责任编辑：吕华琦

薄层色谱及其在食品卫生分析上的应用

四川人民出版社出版 (成都盐道街三号)
四川省新华书店发行 四川新华印刷厂印刷

开本 787×1092 毫米 $\frac{1}{32}$ 印张10.5 插页2 字数229千

1982年1月第1版 1982年1月第1次印刷
印数：1—2,600册

书号：13118·46 定价：0.87元

前 言

食品的营养与卫生是保证广大人民身体健康，提高身体素质的最重要因素之一。但在食品加工、贮存过程中所造成的食品污染，以及环境污染引起的有害物质进入食物链，使一些食品的卫生质量有所下降，严重地影响人们的身体健康。因此，为了保证优质食品供应，必须加强食品卫生监测工作。薄层色谱作为一种高效、快速、灵敏的分离分析手段，对于微量物质的分析是一种有效的技术方法，在食品卫生监测工作中有着广泛的用途。不少国家的食品分析都已采用了这一技术。这种方法具有设备简单，易于掌握的特点，更实用于我国目前的实际情况。近年来在我国食品卫生分析工作中，已广泛采用了这一技术。

本书就薄层色谱技术及其在食品卫生监测中的应用，作了较为系统的介绍。全书分两部分，基础部分扼要地叙述了有关薄层色谱法的原理，并就其操作技术作了较为详尽的介绍；应用部分对霉菌毒素、亚硝胺等几类常见的有害物质作了专题讨论，并推荐一些国内外介绍的具体操作方法，供有关人员使用参考。

本书编写时，承四川医学院卫生系彭恕生教授提出许多宝贵意见，谨此致谢。

由于编写者水平有限，书中的错误不妥之处，欢迎同志们指正。

目 录

第一篇 基础部份

第一章 绪论	1
第一节 色谱分析的发展.....	1
第二节 色谱分析分类.....	3
第三节 薄层色谱简述.....	4
第二章 原理	8
第三章 静相物质与动相溶剂	14
第一节 静相物质.....	14
(一) 无机静相物质.....	14
(1) 硅胶.....	14
(2) 氧化铝.....	15
(3) 硅藻土.....	16
(4) 其他无机物质.....	16
(二) 有机静相物质.....	16
(1) 聚酰胺粉.....	16
(2) 纤维素.....	17
(3) 离子交换纤维素.....	18
(4) 亲水性凝胶.....	20
(5) 其他有机物质.....	20

第二节 粘合剂及其他附加剂	22
(一) 粘合剂	22
(1) 煅制石膏	22
(2) 淀粉	22
(3) 其他粘合剂	23
(二) 附加剂	23
(1) 荧光物质	23
(2) 其他附加剂	23
第三节 动相溶剂	23
第四章 薄层色谱操作技术	28
第一节 薄层板的制备及性质	28
(一) 载板	28
(二) 吸附剂糊的配制	29
(三) 薄层板制备	30
(四) 薄层板的活化与贮存	31
(五) 烧结薄层板的制备及性质	34
(六) 薄层板质量规格	36
第二节 点样	37
(一) 直接点样法	37
(二) 滤纸移样法	39
第三节 展开	39
(一) 上行展开法	39
(1) 不饱和展开槽	40
(2) 饱和展开槽	41
(3) 夹层展开槽	41
(二) 水平展开法	42
(三) 楔形展开法	43

(四) 双向展开法·····	43
(五) 梯度展开法·····	44
(六) 分阶展开法·····	44
(七) 多级展开法·····	45
第四节 显色·····	45
(一) 物理显色法·····	45
(二) 化学显色法·····	46
(三) 酶化学显色法·····	46
(四) 生物显色法·····	47
第五节 制备薄层色谱·····	47
第五章 R_f值及其影响因素 ·····	49
第一节 R_f 值的意义·····	49
第二节 影响 R_f 值的因素·····	50
(一) 薄层的厚度·····	50
(二) 展开方式·····	51
(三) 相对湿度·····	52
(四) 温度·····	52
(五) 展开溶剂·····	53
(六) 薄层板的活度·····	53
第六章 薄层色谱定量 ·····	54
第一节 洗脱法·····	54
第二节 面积法·····	57
第三节 扫描光密度法·····	61
第七章 样品的提取与净化 ·····	66
第一节 样品的提取·····	66
(一) 浸渍法·····	67
(二) 索氏提取法·····	67

(三) 洗脱法·····	67
(四) 萃取法·····	68
第二节 提取液的净化·····	68
(一) 柱色谱法·····	68
(二) 液-液分配法·····	73
(三) 磺化法·····	77
(四) 扫集共蒸馏法·····	85
(五) 其他净化法·····	89
第三节 样品溶液的浓缩·····	90
(一) 直接水浴浓缩法·····	90
(二) 减压蒸馏浓缩法·····	90

第二篇 应用部分

第八章 霉菌毒素·····	97
第一节 提取与净化·····	104
(一) 提取·····	104
(二) 净化·····	105
(三) 操作方法·····	107
1. 花生及花生制品中的黄曲霉毒素·····	107
2. 棉籽及棉籽制品中的黄曲霉毒素·····	112
3. 乳与乳制品中黄曲霉毒素M ₁ ·····	114
4. 酒精性饮料中的黄曲霉毒素·····	117
5. 咖啡中的黄曲霉毒素·····	118
6. 饲料中黄曲霉毒素、棕曲霉毒素、赤霉烯酮·····	119
7. 小麦及大麦中杂色曲霉毒素·····	120
第二节 色谱分离·····	121
(一) 黄曲霉毒素分离的溶剂系统·····	122

1. 氯仿为基础的二元溶剂系统·····	122
2. 氯仿为基础的三元溶剂系统·····	122
3. 二氯甲烷为基础的四元溶剂系统·····	124
4. 黄曲霉毒素M ₁ 、M ₂ 的展开溶剂系统·····	124
5. 双向展开分离黄曲霉毒素的溶剂系统·····	125
6. 其他霉菌毒素分离的溶剂系统·····	128
(二) 操作方法·····	130
1. 黄曲霉毒素B ₁ 、B ₂ 、G ₁ 、G ₂ ·····	130
2. 黄曲霉毒素M ₁ ·····	133
3. 棕曲霉毒素·····	133
4. 杂色曲霉毒素·····	134
第三节 显色与确证·····	135
(一) 显色·····	135
(二) 确证实验·····	137
1. 黄曲霉毒素B ₁ 、G ₁ 的确证·····	137
2. 黄曲霉毒素B ₁ 、B ₂ 的确证·····	141
3. 黄曲霉毒素M ₁ 的确证·····	143
4. 棕曲霉毒素的确证·····	146
5. 赤霉烯酮的确证·····	147
6. 青霉酸的确证·····	148
7. 杂色曲霉毒素的确证·····	149
8. 桔青霉素的的确证·····	151
第九章 亚硝胺类化合物·····	153
第一节 提取与净化·····	154
(一) 提取·····	154
(二) 净化·····	155
(三) 提取与净化的操作方法·····	158

1.粮食谷物类	158
2.乾酪与鱼肉	159
3.食用植物油与腌肉脂肪	159
4.腌肉制品	161
5.酒精性饮料.....	162
第二节 色谱分离.....	163
第三节 显色.....	169
(一) 化学显色反应.....	169
1.格依氏试剂反应	169
2.茚三酮反应	170
3.二氯化钼一二苯胺反应	171
4.Fluorescamine反应	171
5.其他化学显色反应	173
(二) 显色试剂的配制与使用.....	173
第十章 合成食用色素.....	177
第一节 提取与净化.....	177
(一) 聚酰胺粉净化法.....	178
(二) 聚酰胺柱净化法.....	180
(三) 氧化铝净化法.....	182
(四) 羊毛净化法.....	183
(五) 皂化法净化油溶性色素.....	184
第二节 水溶性食用色素的色谱分离.....	184
第三节 油溶性食用色素的色谱分离.....	199
第十一章 无营养甜味剂.....	203
第一节 提取与净化.....	203
(一) 非酒精性饮料的提取 (I)	204
(二) 非酒精性饮料的提取 (II)	205

第二节	色谱分离·····	206
第三节	显色·····	208
第十二章	化学防腐剂 ·····	213
第一节	提取与净化·····	213
	(一) 苯甲酸和对羟基苯甲酸酯类·····	214
	(二) 面包中的醋酸、丙酸、山梨酸·····	215
	(三) 酱油、食醋中的苯甲酸·····	215
	(四) 多种化学防腐剂的提取方法·····	216
第二节	色谱分离·····	217
第三节	显色·····	221
第十三章	有机磷农药 ·····	226
第一节	提取与净化·····	228
	(一) 蔬菜、水果、油脂、谷物样品的提 取与净化法·····	231
	(二) 蔬菜、柑桔中乐果的提取与净化法·····	239
	(三) 谷物、蔬菜中敌敌畏的提取与净化法·····	241
	(四) 蔬菜、水果、谷物应用薄层-酶抑制法 的样品提取法·····	241
第二节	色谱分离·····	242
第三节	显色·····	262
	(一) 化学显色法·····	262
	(二) 酶化学显色法·····	265
	(三) 显色试剂的配制与使用·····	277
第十四章	有机氯农药 ·····	283
第一节	提取与净化·····	285
	(一) 含高油脂食品·····	288
	(二) 蛋制品·····	294

(三) 肉类及鱼类.....	295
(四) 谷物.....	296
(五) 油脂、牛奶.....	297
(六) 各种食品的磺化净化法.....	298
第二节 色谱分离.....	300
第三节 显色.....	308

第一篇 基础部分

第一章 绪 论

薄层色谱是色谱分析技术中的一项重要分支。由于这一方法具有简单、迅速、灵敏度高、分离效能好等优点，因此已广泛地应用于化学分析的多种领域。目前在食品卫生化学分析中，也多采用薄层色谱技术，特别是对食品中的微量有机毒物的分离和分析，更显出薄层色谱的优越性，故已成为食品卫生化学分析中的一项重要技术。

第一节 色谱分析的发展

色谱分析是分离混合物组分的一种方法。这种方法是借助于混合物中的组分，在互不相溶的两相间进行吸附或分配，以达到分离的目的。本世纪初，植物学家茨维特(Tswett)用菊根粉柱及石油醚分离植物叶子提取物，结果在菊根粉柱上形成了几种植物色素的色谱带，从而分离出植物叶子中的各种色素。这种分离分析的方法，被称为色谱分析法，茨维特因此而被认为是色谱分析的奠基人。^[1-2]但这一方法在较长的时期内并没有被人们所重视。直至1931年以后，人们在应用色谱分析方法分离类胡萝卜素等工作中，提出了色谱分析的原理及其实用价值的报告，于是才逐步完善了这一技术方法，促进了色谱分析的发展。

茨维特所建立的色谱分析方法，被称为液-固吸附色谱法。这种方法是将溶解了的待分离组分的溶液，通过固体吸附剂柱，进行分离。1941年马丁(Martin)等人，用含有水份的惰性支持剂（如含水硅胶）代替液-固吸附色谱中的固体吸附剂，将样品溶于不溶于水的有机溶剂中，并使通过装有含水的惰性支持剂柱，由于被分离的各组分在有机溶剂及水之间的溶解度不同，从而在两相间进行分配分离，这就诞生了液-液分配色谱。此后，康斯登(Consden)用滤纸代替含水硅胶作惰性支持剂，称之为纸色谱。〔3〕

马丁等进一步将色谱分离系统中的流动相由液体改为气体，并在涂有硅酮油液体的硅藻土支持剂上成功地分离了脂肪酸，创建了一种新型的色谱分析方法。由于这一方法具有分离效能高、速度快等优点，因而得到了迅速的发展，成为目前色谱分析中的一项重要分枝——气相色谱法。

五十年代中期，斯塔尔(Stahl)发展了一种新型的色谱分析技术——薄层色谱法。这一方法将在第三节讨论。

由于色谱分析中所用静相物质的不同，于是产生了另外两种色谱分析方法：（1）离子交换色谱。这种方法是以离子交换树脂为色谱分析中的静相，利用交换树脂中的极性化学键，使被分离物质在两相之间形成可逆的反应。（2）凝胶透过色谱。这种方法是用分子筛为静相，用以分离分子大小不同的化合物。

第二节 色谱分析分类

色谱分析不断发展，出现了多种类型的色谱技术方法，而任何一种色谱分析，被分离的组分都是在两相间进行分

离。其中一相是一种含有很大表面积的静止的物质,称为“静相”;而另外一相是通过或者沿着静相的表面流动的物质,称为“动相”。静相可以是固体,也可以是液体(这种液体是附着在惰性支持剂上);动相可以是液体,也可以是气体。根据每一相的两种可能在色谱分离中所处的状态,可将色谱法分为四种基本类型,即气固色谱、气液色谱、液固色谱、液液色谱,如图1—1所示。但这一分类方法无法表示

图1—1 色谱法分类图

		动 相	
		气 体	液 体
静 相	固 体	气—固色谱	吸附柱色谱 薄层色谱
	液 体	气—液色谱	分配柱色谱 薄层色谱 纸色谱

色谱分离的性质,因而有人提出按色谱分离过程的物理和化学性质分类的方法:

(一) 吸附色谱: 静相为固体吸附剂, 包括气固吸附色谱及液固吸附色谱。利用固体吸附剂对混合物中各组分吸附性能的不同, 达到分离的目的。

(二) 分配色谱: 静相为附着在担体上的液体, 包括气液分配色谱及液液分配色谱。利用混合物中各组分在两相中的溶解度不同而有着不同的分配系数, 从而进行分离。

(三) 离子交换色谱: 静相为离子交换树脂。利用交换树脂中的极性化学键, 使被分离的物质在两相间形成可逆的反应, , 达到分离混合物组分的目的。

(四) 凝胶过滤色谱: 静相为分子筛。利用混合物中各组分的分子大小的差异, 使通过分子筛静相, 进行分离。

除以上的两种理论的分类方法外，考虑到某些特殊情况，还可以根据色谱操作的技术方法来分类。图 1—2 即为这种分类的表示方法。

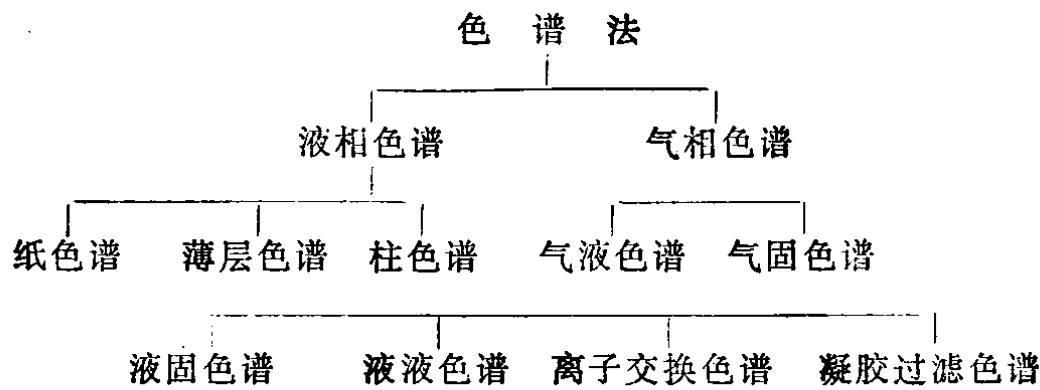


图1—2 色谱分析分类法

第三节 薄层色谱简述

早在1938年依斯迈洛夫 (Izmailov) 等人在试图将柱色谱的管柱内径缩小到 1 毫米，从而建立一种“微柱色谱”的工作失败以后，考虑到一种开放式的微柱色谱法。这种方法是在涂有氧化铝薄层的玻璃板上分离药用植物提取液内的生物碱。当时仅用几滴样品溶液，因此称之为“点滴色谱”。继后，人们用这一方法成功地进行了萜、烯等植物挥发油的分离，这一方法才有所发展，被称为“带色谱法”或“板色谱法”。〔1—4〕

五十年代初，克尔希内 (Kirchner) 发展了依斯迈洛夫的方法，〔7〕但目前广泛使用的薄层色谱技术，应归功于斯塔尔的工作。他在研究植物细胞组成的过程中，探索了高灵敏度的微量分离方法，详尽地研究了以往的微量色谱技术，并将依斯迈洛夫提出的色谱方法中的仪器、吸附剂以及操作条件等标准化，使这一方法进一步发展成为一种新的色谱分析

技术。斯塔尔称这种方法为“薄层色谱法”(简称TLC)。

薄层色谱实际上是柱色谱的一种改良,薄层板可以认为是一个开放的色谱柱。但就技术操作来看,又很类似纸色谱。其操作方法概述如下:

先制备薄层板,即在大小适当的玻璃板上,均匀涂上吸附剂,厚度在一毫米以内,然后在距底边1.5厘米处点上样品溶液,形成一个小点,称为“原点”。再将薄层板置于盛有动相溶剂的玻璃缸内(此溶剂称为“展开溶剂”,玻璃缸称为“展开槽”)。当溶剂沿薄层扩散到距原点以上一定距离时(一般10—12厘米),取出薄层板,记录展开溶剂扩展前沿距原点的距离A。然后用喷洒显色试剂或紫外光线照射的方法使被分离的化合物显色,此过程称为“显谱”。观察并记录所显斑点的中心距原点的距离。如图1-3,点1的展开距离为a,点2的展开距离为b。斑点在薄层板上的位置通常用比移值(R_f)表示。 R_f 值为斑点中心距原点的距离与溶剂展开前沿距原点距离的比值:

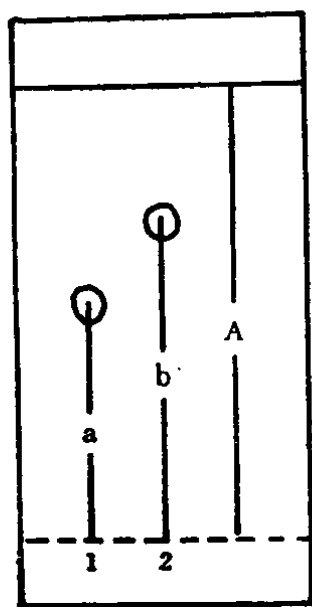


图1—3 薄层色谱图

$$R_f = \frac{\text{斑点中心至原点的距离}}{\text{溶剂前沿至原点的距离}}$$

如图1—3所示,点1及点2所得色谱的斑点的 R_f 值分别为:

$$R_{f1} = \frac{a}{A} \quad R_{f2} = \frac{b}{A}$$