

高效液相色谱法定量测定玉米中 腐马素毒素(Fumonisin)

白清云, 廖楠, 沈跃, 张克强

(农业部环境保护科研监测所, 农业部农产品污染与防治重点开放实验室, 天津 300191)

摘要: 本研究介绍了一种简单、快速分析测定玉米中腐马素毒素(fumonisin)残留的方法。样品用甲醇+水混合液提取, 对提取液用小型强酸性阴离子固相萃取柱(SAX)纯化。纯化后的样品经化学衍生处理后, 用反相高效液相色谱分离, 并以荧光分光光度检测器定量测定。该方法对于添加已知量、添加水平在 0.3—2 mg·kg⁻¹ 腐马素的玉米样的测定证实: 其平均回收率在 80% 以上, 而该方法对于腐马素三种同系物的最低检出限分别为 0.1—0.05 mg·kg⁻¹。此外, 本方法也对有限数目的大米、大麦、小米、高粱样中存在腐马素毒素污染的可能性进行了验证, 结论是否定的。

关键词: 玉米; 腐马素毒素; 化学衍生; 反相高效液相色谱; 痕量测定

中图分类号: O652.63 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0267(2002)06-0512-04

A High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Fumonisin in Maize

BAI Qing-yun, LIAO Nan, SHEN Yue, ZHANG Ke-qiang

(Key Laboratory of Agro - Product Pollution Control of MOA, Agro - Environmental Protection Institute, Tianjin 300191, China)

Abstract: A simple, rapid procedure has been described for determination of fumonisin (FB1, FB2), the metabolites of *Fusarium moniliforme* and *proliferatum* in maize. The toxins were extracted by shaking after addition a mixture of methanol + water (3 + 1, V/V) as extractant and a mini - SAX solid phase column was employed for cleaning - up the sample. The toxins from cleaning up step were derivatized with O - phthalaldehyde in the presence of mercaptoethanol as a catalyst to form highly fluorescent derivatives. A reversed phase LC was utilized for final separation of the sample and quantitation of the toxins was achieved by a fluorescent detection. The recoveries from fortified maize samples were found to be 78.0%—95.7% with relative variation of 5.2%—12.7%, respectively. The minimum detection limits of the present method for FB1 and FB2 were 0.04 and 0.1 mg·kg⁻¹, respectively.

Keywords: maize; fumonisin; derivatization; reversed - phase HPLC; determination

腐马素毒素, 又称为伏马毒素(Fumonisin), 于 1988 年被发现, 主要是由镰刀菌 *Fusarium* 属的 *F. moniliforme* 和 *F. proliferatum* 产生的次要代谢产物, 其主要污染对象是玉米或玉米制品^[1-4]。到目前为止, 共发现有 6 种腐马素异构体或同系物, 其中以腐马素 B₁、B₂ 和 B₃ 为主^[5]。玉米在生长或在加工、贮存、运输过程中最容易受上述真菌污染, 特别是当温度适宜, 湿度较高时, 更利于其生长繁殖, 产生结构性相似的该类毒素。动物试验和流行病学资料已表明, 腐马素毒素主要损害肝肾功能, 能引起马大脑白质细胞缺乏症和猪肺水肿等^[6,7]。也有报道, 腐马素毒素对食品的污染可能与我国林县和南非部分地区高发的食道癌有关^[8], 现已引起世界范围的广泛注意。据最新可靠消息, 欧盟正在着手制定该类毒素在食品

饲料中最大限量标准, 以保证其食品安全^[12]。

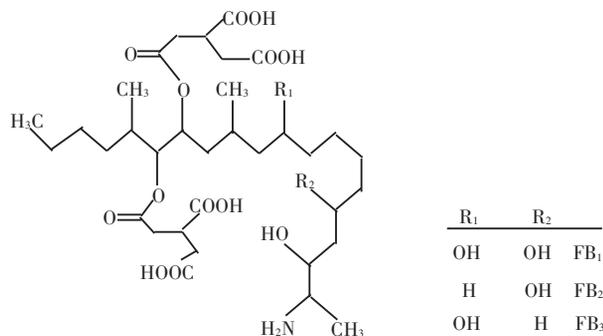


图 1 自然界中腐马素毒素的化学结构

Figure 1 Chemical structure of main fumonisin in nature

对于腐马素的痕量测定, 国外主要的报道是用高效液相色谱分离, 荧光检测器定量测定^[9-11]。也有使用气相色谱、气谱-质谱联用定量测定和酶联免疫

收稿日期: 2002-09-28

基金项目: 科技部 2000 年公益研究资助项目

作者简介: 白清云(1947—), 男, 研究员。

法(ELISA)半定量测定的报道^[3]。到目前为止,在国内我们尚没有见到有使用一种快速高效液相色谱法定量测定玉米及其相应的食品中腐马素毒素痕量污染的分析方法。因此,研制开发出一种简单、快速、可靠的测定玉米及相关食品中痕量腐马素残留方法,对于我国玉米及相关制品的进出口质量控制、普查我国含玉米类食品中该类毒素污染状况、检测我国畜牧养殖业饲料质量以提高饲料的生物效率和监督我国食品的安全等都具有实际的意义。

1 实验部分

1.1 仪器与实验装置

1.1.1 超声波清洗器

HS3120D 型,天津市恒奥科技发展有限公司。

1.1.2 往返式震荡提取机

F-Z2 型,南京土壤仪器厂制造。

1.1.3 植物样本粉碎机

FSJ-114 型,农业部扶沟科学仪器厂。

1.1.4 旋转蒸发器

ZFQ-971 型,天津玻璃仪器厂。

1.1.5 循环水式多用真空泵

SHB-C 型,郑州长城科工贸有限公司。

1.1.6 固相萃取柱

Strata SAX, 阴离子型, $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 美国 Phenomenex 产品。

1.1.7 高效液相色谱仪组合

液相色谱泵, Gynkotek 300B 型, 德国产; 进样装置: Rheodyne 7125 型 $20 \mu\text{L}$ 固定体积样品注入器, 美国产; 色谱柱: 长 125 mm , 内径 46 mm , 内填粒度 $5 \mu\text{m}$ Hypersil-ODS, 色谱柱前附加一长度 20 mm 、填料为 C-18 型、粒度为 $10 \mu\text{m}$ 的保护柱。

1.1.8 荧光分光光度计

日本岛津 RF-500L 型, 激励光波长: 335 nm , 发射光波长: 440 nm 。

1.2 实验试剂

1.2.1 甲醇

HPLC 级, 江苏淮阴塑料制品厂精细化工研究所。

1.2.2 标准溶液的配制

1 mg 腐马毒素(美国 Sigma 公司)FB₁ 和 FB₂ 分别溶于 25 mL 甲醇, 该标准溶液含腐马毒素 $40 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.3 固相柱淋洗液

100 mL 甲醇, 加 1 mL 冰醋酸, 摇匀。

1.2.4 巯基乙醇、邻苯二甲醛: 美国 Sigma 公司产品。

1.2.5 衍生液配制

称取 16 mg (精确到 0.1 mg) 邻苯二甲醛溶于 0.4 mL 甲醇, 加入 2 mL 预先配制好的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四硼酸钠溶液, 摇匀; 再加入 $20 \mu\text{L}$ 巯基乙醇, 摇匀。该衍生液置于棕色瓶中, 避免阳光直射, 每周需配制新鲜溶液。

1.2.6 高效液相层析用流动相

甲醇加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaH_2PO_4 (3:1, V/V), 逐渐加入磷酸, 直至溶液 pH 值达 3.35, 用前用超声波清洗器脱气处理后使用。

除非另有说明, 本实验中所有使用的试剂均为分析纯。

1.3 样品中腐马毒素的提取

25 g 经粉碎的玉米样(40 目), 置于 250 mL 三角瓶中, 加入 50 mL 甲醇+水(3:1, V/V)的提取液, 放置过夜, 在震荡提取机上提取 30 min 。用定量滤纸把浆状混合物过滤到一平底烧瓶中。检验滤液的 pH 值, 如果需要, 逐滴加入 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液(仅需要 1—2 滴), 直到滤液的 pH 值达到 5.8—6.5。

1.4 固相萃取柱条件化

依次向固相柱加 2 mL 甲醇, 2 mL 甲醇+水混合液(3:1, V/V), 用于对固相柱的条件化处理, 操作中注意保持流速不超过 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (10 滴左右), 在对固相柱条件化处理中, 特别是在向固相柱加玉米提取液前, 必须保持固相柱处于湿润状态。

1.5 玉米提取液纯化

在保证固相柱处于湿润的条件下, 定量取 1 mL 玉米提取液(相当于 0.5 g 玉米样), 添加到固相柱上, 在重力作用下过滤, 如果需要, 可以用橡皮吸耳球稍加压力, 但要保证流速不超过 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (大约 4 滴)。待全部玉米提取液过柱后, 依次用 2 mL 甲醇+水(3:1, V/V), 2 mL 甲醇, 预洗固相柱, 并弃去所有预洗液。再用 8 mL 甲醇+冰醋酸(100:1, V/V)作为淋洗液对保留在固相柱上的腐马毒素进行淋洗, 在此操作中, 要保持流速在大约 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。收集所有淋洗液, 用旋转蒸发器挥发溶剂至干, 水浴温度控制在 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右。用甲醇溶解瓶中残留物, 并定量地用甲醇(共计 3 mL 左右)分数次把残留物移到一小瓶中, 在一束干燥氮气下挥发掉所有溶剂, 并重新用甲醇定溶至 0.2 mL 。

1.6 衍生物的制备和高效液相色谱测定

定量吸取预先配制好的不同浓度的腐马毒素标准溶液或上述纯化后溶液 10 μL , 转到一容积为 2 mL 小型衍生瓶中, 再加入 30 μL 衍生液, 在超声波清洗器下混匀, 立即用 100 μL 注射器全部吸取之, 并迅速注入到高效液相色谱仪器中。

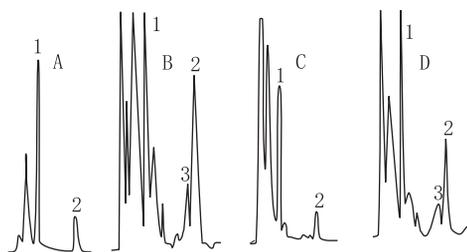
1.7 玉米中腐马毒素残留的定量

对于玉米中腐马毒素的定量采用外标法, 即注入相当于 2、4、8、16、20、40 ng 的腐马毒素衍生物到仪器中, 以相应毒素色谱峰面积与对应进入仪器中标准样量求出相应的函数关系。把未知样中的腐马素峰的面积与上述所得到函数关系加以比较处理, 同时综合地利用注入到仪器中玉米提取物的量, 就极为容易地计算出待测样中腐马素含量。

2 结果与讨论

图 2 所给出的是腐马毒素的高效液相色谱图, 其中阿拉伯数字 1、2 分别表示 FB_1 、 FB_2 。对分析测定使用的各种条件和参数, 请见文中说明。

在 FB_2 色谱峰的前边有一个未知峰 3, 尽管手头上没有 FB_3 标准样, 根据用严重发霉的玉米上收集到的菌丝提取物分析, 以及与许多已经发表的文献对照、分析, 可以认为: 该色谱峰应该是腐马毒素 FB_3 。由于 FB_2 和 FB_3 的化学结构非常类似, 其保留时间又十分接近, 因此, 对于未知样中 FB_3 的定量可以借用仪器对 FB_2 的应答系数来解决。可看出, 在本实验的条件下, 3 种腐马素 FB_1 、 FB_2 和 FB_3 得到了良好的分离, 且 3 种色谱图中也没有显著的玉米共萃物干扰。



注: A 为腐马素 FB_1 和 FB_2 , 每种毒素的量相当于 10 ng; B 为用玉米发霉的菌丝中提取物; C 为实际玉米样, 玉米提取物的注入量相当于 12.5 mg; D 为用样品 C 的回收率添加样, 其添加浓度对 FB_1 、 FB_2 和 FB_3 分别为 2.0、1.6 和 0.6 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

图 2 腐马毒素的标准样和添加样高效液相色谱图

Figure 2 HPLC Chromatograms of the toxins and fortified samples of maize (A: Chromatograms of fumonisins for FB_1 and FB_2 , each equivalent to 10 ng; B: that of mixture of the toxins extracted from fungi colonized on maize; C: that of extract of maize, equivalent to 12.5 mg; and D: that of fortified maize sample)

2.1 分析方法的设计

痕量分析是指所要测定的对象含量非常低(一般在几个 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下)的分析测定。为了研制开发一种良好的痕量分析方法, 必须充分利用好手头所掌握的资源, 因此, 预先作好对分析方法的设计就是一项重要的工作。首先要确定分析方法的最低检出限需要达到的目标。一般确定最低检出限是根据这一毒物的官方设置的最大残留限量而定。例如, 腐马毒素在欧、美、日多数国家目前临时最大残留限量被设置在 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 左右, 因此所要开发的分析方法的最低检出限应设置在低于这个最大限量一个数量级, 也就是 0.1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 就可以了。为了达到能够测定玉米中含有 0.1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的腐马毒素, 必须首先挖掘检测器资源, 使所用的检测器达到最敏感而同时又处在稳定的状态。经过努力, 尽管所用的荧光检测器是上世纪 60 年代产品, 但仍然可以达到最低检出量为 0.5 ng 左右的腐马毒素。所以, 可以用较少提取液就达到检测的目的, 因而对玉米提取物的纯化就减小了压力。实验证实, 仅仅用一支小型固相提取柱就可以承担 0.5 g 玉米提取物, 而最终玉米提取物注入到仪器中量仅为 12.5 mg, 就轻易地达到了我们的预先目标。由于对这种小型固相萃取柱的负载轻, 使得对固相萃取柱至少可以重新使用 2 次用以纯化玉米提取液。还要说明的是, 尽管最终只用 1 mL 提取液便可以满足用于纯化处理供定量测定玉米中的腐马毒素, 但是最初对玉米提取时所使用的分析样品量不能太少, 因为太少的分析样用量很难具有代表性。

2.2 对玉米样中腐马毒素的提取

对提取用的溶剂选择的原则是: 提取效率要高, 所提取的共萃杂质要少, 使用的提取溶液要经济而且毒性低。根据相关报道, 含有不同量水的甲醇和乙腈最常用于对谷物样中腐马素的提取。尽管有报道指出, 使用乙腈 + 水所得到的提取效率要稍微优于甲醇 + 水, 但本实验仍然选用甲醇 + 水(3: 1, V/V)为提取剂, 主要就是使用甲醇所得到的共萃杂质少, 而且既经济, 毒性又低。此外, 使用乙腈 + 水作为提取溶液与本方法所得到的结果进行比较后, 发现提取效率并没有显著地提高。

2.3 对玉米提取液的纯化

由于腐马毒素的化学结构中含有氨基和羧基, 可以看出与氨基酸非常类似。在用强阴离子交换柱对玉米提取物的纯化过程中, pH 值无疑起着重要的作用, 因为溶液的酸碱度是腐马毒素的离子电性的决定

因素。我们实验数据证实, 提取液的 pH 值在 6.0 比较有利于层析柱对毒素的吸附, 因此, 对提取液的 pH 值的调节是必需的。

2.4 衍生液的反应比例

本实验对于衍生液与待测定样样品的体积比例作了优化检验。用 9:1、8:1、4:1、3:1、2:1、1:1 不同的比例作了比较, 以腐马毒素 FB₁ 做参照。发现注入同样量的毒素, 仪器给出的应答随衍生液比例的减少而减小, 不过这种降低的幅度不大。但是对于比例在 4:1 以下, 这种单位量的应答值减小趋势变的非常缓慢 (见图 3)。考虑到玉米提取液的纯化样品中可能含有能损耗衍生液的杂质, 因此最终选用衍生液与待测定样品的体积比例为 3:1。这样的比例一方面可以保证衍生液不会处于短缺, 同时又兼顾了注入高效液谱仪器中毒素的实际进样量。

2.5 腐马毒素对仪器的线性范围

向仪器中分别注入 1、2、4、8、16、20、40、80、100 ng FB₁ 毒素, 发现毒素在 2—40 ng 范围内线性关系良好, 因此, 在样品的测定过程中, 如果发现所测定样品

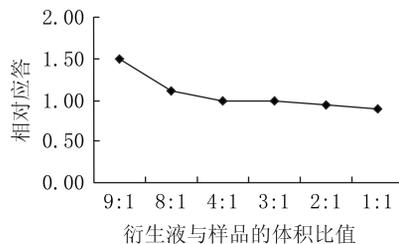


图 3 衍生液与样品体积比的最优化选择

Figure 3 Optimization of volume ratios between derivatization mixture and sample used

中毒素含量较高, 注入到仪器中的毒素超出了线性范围, 应该对原纯化样的取样量进行调整, 并重新制备衍生物后加以测定。

2.6 添加回收率与最小检出限

为检验该方法的准确度, 使用已知量的腐马毒素添加到玉米样中, 经测定 (表 1), 回收率是满意的。

仪器对于 0.5 ng FB₁ 能显示出明显的至少区别于 3 倍背景噪音的应答, 如果以此作为仪器的最低检出量, 而同时可以注入 12.5 mg 的玉米提取物到仪器中

表 1 添加已知量的毒素到玉米中后用本方法测定到的回收率

Table 1 Recoveries of fortified maize samples with known amounts of fumonisins at different levels of the toxins

腐马毒素	添加水平	回收率(标准误差)	添加水平	回收率(标准误差)	添加水平	回收率(标准误差)
	/mg · kg ⁻¹	/% (sd)*		/mg · kg ⁻¹		/% (sd)*
FB ₁	2.0	95.7(9.2)	1.0	95.3(7.2)	0.5	81.1(9.0)
FB ₂	1.6	89.6(8.7)	0.8	112.9(5.2)	0.4	79.6(12.7)
FB ₃	0.6	78.0(10.3)	0.3	68.0(11.3)	—	—

注: * 代表至少 3 次重复测定结果的标准偏差。

(25 g 玉米, 用 50 mL 提取液, 取 1 mL 过柱, 终液量 0.2 mL, 取 10 mL 纯化液 + 30 mL 衍生液, 注入 20 mL 被仪器分析测定), 那么整个分析方法对于 FB₁ 的最低检出量为 0.04 mg · kg⁻¹。按照同样的推理计算, 该分析方法对于其它另外两种毒素 FB₂ 和 FB₃ 的最低检出量分别为 0.1 和 0.08 mg · kg⁻¹。

参考文献:

[1] 白清云. 农产品中的真菌毒素污染[J]. 农业环境保护, 1997, 16 (1): 40-43.
 [2] 白清云. 赵静, 郑向群. 农产品中真菌毒素的污染与控制对策 [A]. 见: 中国农学会. 新的农业科技革命—战略与对策 [C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1998. 632-638.
 [3] Shephard G S. Chromatographic determination of the fumonisin mycotoxins[J]. *J Chromatogr*, 1998, 815: 31.
 [4] Gelderblom W C A, Jaskiewicz K, Marasas W F O, et al. Fumonisins novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 1 806.
 [5] Musser S M, Plattner R D. Fumonisins composition in cultures of

Fusarium moniliforme, *Fusarium proliferatum*, and *Fusarium nygami*[J]. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 1 169.
 [6] Marasas W F O, Kellerman T S, Gelderblom W C A, et al. Leukoencephalomalacia in a horse induced by Fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*[J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 1988, 55: 197.
 [7] Kellerman T S, Marasas W F O, Thiel P G, et al. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of Fumonisin B₁[J]. *Onderstepoort J Vet Res*, 1990, 57: 269.
 [8] Chu F S, Li G Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B₁ and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 847.
 [9] Sydenham E W, Shephard G S, Thiel P G. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in foods and feeds[J]. *JAOAC Int*, 1992, 75: 313.
 [10] Stack M E, Epply R M. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁ and B₂ in corn and corn products[J]. *JAOAC Int*, 1992, 75: 834.
 [11] Sydenham E W, Shephard G S, Thiel P G, Stockenström S, et al. Liquid chromatographic determination of fumonisins B₁, B₂ and B₃ in corn: AOAC - IUPAC collaborative study[J]. *JAOAC Int*, 1996, 79: 688.
 [12] <http://europa.eu.int/comm/food/fs/sfp/fcr/comtaminants.en.html>