

采用高效液相色谱法测定牛乳中腐马素含量

马丽艳^{1,2} 贾 茹² 李景明²

1(农业部农产品质量监督检验测试中心,北京,100083) 2(中国农业大学食品科学与营养工程学院,北京,100083)

摘 要 建立了牛乳中腐马素的提取与定量分析方法。样品以甲醇-丙酮体积比 1:1 为提取溶剂,利用强阴离子交换柱(SAX)使样品中的腐马素含量达到了浓缩、富集 5 倍的水平。提取后的样品通过柱前衍生(邻苯二甲醛,OPA)后采用高效液相色谱(HPLC)方法进行检测。采用荧光检测器,以乙腈、水和冰乙酸组成的体系为流动相进行 3 元梯度洗脱,腐马素 FB₁ 和 FB₂ 在 0.1~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。FB₁ 和 FB₂ 的添加浓度在 25~100 ng/mL 时,FB₁ 的回收率在 74.5%~84.1% 之间,FB₂ 的回收率在 71.7%~82.3% 之间,腐马素的最低检出限分别为 FB₁ 8 ng/mL 、FB₂ 5 ng/mL 。采用文中所建立的腐马素提取和分析方法对市场采集的巴氏消毒牛乳进行了分析,未发现腐马素 FB₁ 和 FB₂。

关键词 腐马素, 高效液相色谱

腐马素主要是由镰刀菌产生的次生代谢产物,是一类结构相似的真菌毒素。这些真菌通常寄生在玉米中,其中的串珠镰刀菌是全世界玉米中分布最广泛的一类真菌,是玉米上的主要致病菌。玉米在生长或贮存、运输过程中易受到该菌污染,特别是当温度适宜、湿度较高时,更利于其生长繁殖^[1]。自从 1988 年 Gelderblom 等人在霉变玉米的培养物中发现腐马素后^[2],引起了国内外学者的广泛关注。研究发现,它与多种动物疾病相关,其中国际上公认的由腐马素引起的疾病有马脑白质软化症^[3]、猪的肺水肿和老鼠的肝脏和肾脏疾病等^[4]。虽然目前并没有直接证据表明腐马素对人类有毒害作用,但通过对南非和中国林县的流行病学调查发现,腐马素与人类食道癌的发生率有一定的相关性^[5,6]。

我国是世界玉米生产的第二大国,70% 的玉米用于饲料^[7]。人们通常将质量较差,甚至发生霉变的玉米用作饲料,贮藏条件简陋,腐马素的含量相对较高。饲料中的腐马素是否会经过代谢进入到牛乳中,间接进入人体从而对人类造成危害,已引起人们的重视。

目前关于腐马素检测方法的研究主要针对谷物,特别是玉米进行的,国外对乳中腐马素的检测方法的研究较少。美国农业部农业综合研究中心的 Maragos 开展过相关研究,并建立了乳中腐马素的 ELISA 和 HPLC 检测方法。Maragos 发现,ELISA 的方法虽然具有操作简单、迅速的特点,但牛乳样品中的脂肪和蛋白含量对测定结果有一定的影响,灵敏度低,而

HPLC 方法较为灵敏^[8]。国内关于牛乳中腐马素的检测至今未见报道。文中所采用的方法同 Maragos 方法比较,虽同是 HPLC 方法,但具有衍生剂无毒、无需加热、效率高等优点。

1 材料与方法

1.1 实验材料

巴氏消毒牛乳购自超市,原料乳取自北京华冠乳品厂乳品基地。

1.2 仪器

Waters600 型高效液相色谱仪,474 荧光检测器(美国 Waters 公司),旋转蒸发仪(上海医械专机厂),DSHZ-300 多用途水浴恒温振荡器(江苏太仓市实验设备厂),pHS-25 数显 pH 计(上海精密科学仪器公司),RC26 SORVALL 高速冷冻离心机(美国科峻仪器公司),微型混合器,微型植物粉碎机。

LC-SAX 固相萃取柱,固相萃取装置(美国 SUPELCO 公司)。

1.3 试剂

腐马素 FB₁ 和 FB₂ 标准品(Acros 公司,纯度 > 98%);邻苯二甲醛(OPA,Fluka 公司,纯度 > 97%);甲醇、乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);超纯水;其他试剂均为分析级。

OPA 衍生剂:准确称取 40 mg 邻苯二甲醛,用 1 mL 甲醇溶解加入 5 mL 0.1 mol/L 四硼酸钠,混匀,加入 50 μL 巯基乙醇,混匀。该试剂贮存于棕色瓶中或用铝箔包裹,避免阳光直射,最多存放 1 周。

1.4 实验方法

1.4.1 牛乳中腐马素的提取

第一作者:硕士,助理研究员(李景明为通讯作者)。

收稿日期:2005-05-20, 改回日期:2005-12-09

准确量取 5 mL 牛乳,加入甲醇-丙酮(体积比 1:1)混合液 15 mL,振荡 30 min 后冷冻离心 (4℃, 10 000 r/min) 15 min。小心倾出上清液转移至干净的旋转瓶中,真空浓缩至 1~2 mL,加入 5 mL 甲醇混匀,用滴管转移至预先活化好的 SAX 柱中进行纯化,待全部提取液过柱后,依次用 5 mL 甲醇-水(体积比 3:2)、3 mL 甲醇淋洗,最后用 10 mL 质量分数 1% 乙酸甲醇洗脱,收集洗脱液。将洗脱液蒸干后用少量甲醇转移至 4 mL 样品瓶中用 N₂ 吹干。吹干后的样品于 -18℃ 保存,分析前用 1 mL 的乙腈-水(体积比 3:2)溶解。

1.4.2 衍生和分析

准确吸取 50 μ L 样品提取液,加入 200 μ L 衍生

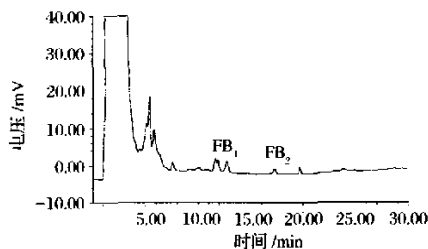
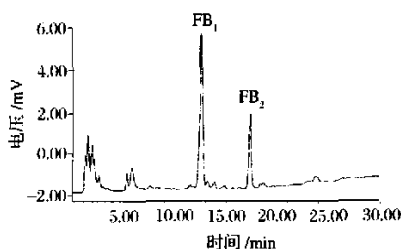


图1 腐马素标准色谱图(A)和加标牛乳样品色谱图(B)

2 结果与讨论

2.1 提取溶剂的选择

向空白样品中添加相当于 100 ng/mL 的 FB₁ 和 FB₂ 的腐马素标准物,分别用乙腈、甲醇、甲醇-丙酮作为提取溶剂进行提取,结果表明甲醇-丙酮的提取效果较好(见表 1)。

表 1 不同溶剂的提取效果比较

提取溶剂	FB ₁ 回收率/%	FB ₂ 回收率/%
乙腈	23.5	28.6
甲醇	75.2	71.8
甲醇-丙酮	84.1	80.3

2.2 标准工作曲线的建立

准确吸取浓度分别为 0.10、0.25、0.50、1.0、2.0 μ g/mL FB₁ 和 FB₂ 标准溶液 50 μ L,衍生后进样分析。以浓度 x 为横坐标、色谱峰面积 y 为纵坐标绘制标准曲线,并进行回归分析。

FB₁ 和 FB₂ 在 0.1~2.0 μ g/mL 范围内线性关系良好,FB₁ 的线性方程为 $y = 641\,136x - 9\,770.4$, 相关系数 0.999;FB₂ 的线性方程为 $y = 596\,868x - 14\,351$, 相关系数 0.999。

剂,混合均匀后,吸取 20 μ L 注入高效液相色谱中。为了保证重现性,加入 200 μ L 衍生剂后 5 min 内注入高效液相色谱中。

1.4.3 HPLC 色谱条件

色谱柱:Symmetry C₁₈ (3.9 mm \times 150 mm \times 5 μ m);

检测器:荧光检测器,激发波长 335 nm,发射波长 440 nm。

流动相: A 相为乙腈-水-乙酸(体积比 40:60:1), B 相为乙腈-水-乙酸(体积比 60:40:1), C 相为乙腈。100% A 相保持 1 min, 然后 9 min 内由 100% A 相变为 100% B 相,随后在 23 min 内变为 100% 的 C 相。从图 1 中可以看出 FB₁ 和 FB₂ 得到了很好的分离。

2.3 精密度、回收率和检出限

向空白牛乳样品中分别添加相当于 50 ng/mL FB₁ 和 FB₂ 的腐马素标准物,按样品处理方法进行处理,重复 5 次,测定方法的精密度。腐马素 FB₁ 的相对标准偏差为 4.3%,FB₂ 的相对标准偏差为 3.9%。

向空白牛乳样品中分别添加不同浓度的标准物,测定方法的回收率,测定结果见表 2。FB₁ 的回收率在 74.5%~84.1% 之间,FB₂ 回收率在 71.7%~82.3% 之间。

按 3 倍信噪比计算,牛乳中腐马素的最低检出限分别为 FB₁ 8 ng/mL 和 FB₂ 5 ng/mL。

2.4 牛乳中腐马素的稳定性

牛乳样品在采集、运输过程,一般需要冷藏处理,为了确定腐马素在冷藏过程中的变化,本实验对添加了 50 ng/mL FB₁ 和 FB₂ 原料乳样品进行了处理,分别在冷藏 2、7 d 进行提取,结果表明,4℃ 条件下冷藏 7 d,腐马素含量无明显变化。

牛乳在生产中通常要经过杀菌处理,本实验模拟巴氏杀菌的条件(65℃、30 min)对添加了 50 ng/mL FB₁ 和 FB₂ 原料乳样品进行了处理,结果表明巴氏杀菌处理不能降低腐马素的含量(见表 3),该结果说明,原料牛乳中如果含有腐马素,在后期加热处理环

节不会对其产生破坏作用,腐马素就会转移到牛乳制品中,从而通过牛乳及其制品进入人类的食物链。

表2 FB₁和FB₂的加标回收率(n=3)

FB ₁				FB ₂			
加入量	测定值	回收率	RSD	加入量	测定值	回收率	RSD
/ng·mL ⁻¹	/ng·mL ⁻¹	/%	/%	/ng·mL ⁻¹	/ng·mL ⁻¹	/%	/%
25.00	16.82	67.3	7.2	25.00	16.27	65.1	6.4
25.00	18.60	74.4		25.00	18.05	72.2	
25.00	20.43	81.7		25.00	19.46	77.8	
平均值	18.62	74.5		平均值	17.93	71.7	
50.00	40.90	81.8		50.00	39.56	79.1	
50.00	37.72	75.4	5.5	50.00	36.74	73.5	4.7
50.00	43.21	86.4		50.00	41.42	82.8	
平均值	40.61	81.2		平均值	39.24	78.5	
100.0	79.18	79.2		100.0	76.52	76.5	
100.0	82.24	82.2		100.0	80.19	80.2	
100.0	90.92	90.9	6.1	100.0	84.30	84.3	3.9
平均值	84.11	84.1		平均值	80.34	80.3	

表3 加热处理和贮藏时间对回收率的影响(n=3)

温度/℃	时间	FB ₁ 回收率/%	FB ₂ 回收率/%
4	2 d	80.3±4.9	76.2±3.8
4	7 d	78.6±6.1	75.8±6.2
65	30 min	77.6±5.3	75.9±5.7

2.5 牛乳中腐马素的含量

利用本实验建立的检测方法分别测定了从市场采集的8个主要品牌的巴氏消毒牛乳,从检测结果看,牛乳中未检测到腐马素FB₁和FB₂。

3 结论

通过研究发现,采用丙酮-甲醇体系提取,SAX柱净化,可以提取纯化牛乳中的腐马素,使其富集,采用乙腈-水-乙酸3元梯度洗脱可将腐马素与干扰物质分开,能测定低腐马素残留的样品;同时检测结果显示目前消毒乳中尚未发现腐马素,消费者可放心食用。

参考文献

1 Miller J D. Factors that affect the occurrence of fumonisin

[J]. Environ Health Perspect, 2001,109(2):321~324

- Gelderbolom W C A, Jaskiewicz K, Marasas W F O, et al. Fumonisin novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by fusarium moniliforme[J]. Appl Environ Microbiol,1988,54:1 806~1 811
- Kellerman T S, Marasas W F O, Thiel P G, et al. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1 onderstepoort [J]. J Vet Res,1990,57:269~275
- 钟秋芳,肖希龙,章红. 腐马素研究进展[J]. 中国兽医杂志,2000(6):37~38
- Rheeder J P, Marasas W F O, Thiel P G, et al. Fusarium moniliforme and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei[J]. Phytopathology, 1992, 82:353~357
- Chu F S, Li G Y. Simultaneous occurrence of fumonisins B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high of esophageal cancer[J]. Environ Microbiol,1994,60:847~852
- 刘笑然. 中国玉米中长期供求分析及调控研究[J]. 粮食与油脂,2001(2):16~21
- Maragos C M, Richard J L. Quantitation and Stability of Fumonisin B1 and B2 in milk[J]. Food Chemical Contaminants,1994,1 162~1 167

Determination Fumonisin in Milk by HPLC

Ma Liyan^{1,2} Jia Ru² Li Jingming²

1(Supervision & Testing Center for Agricultural Products Quality, Ministry of Agriculture, Beijing; 100083)

2(Food science and nutrition engineering college, China Agriculture University, Beijing, 100083)

ABSTRACT A high-performance liquid chromatograph (HPLC) system to determination fumonisins in milk was described. By this method, the samples were extraction by methanol-acetone, purify on strong anion exchange cartridges. Fumonisin were concentrated five times. Then the samples were derivatized with OPA, and determined by fluorescence detection. The mobile phases was composed with methanol-water-acetic acid. Under such conditions, the recovery of FB₁ and FB₂ were between 74.5~84.1% and 71.7~82.3%, respectively. The detection limits for FB₁ and FB₂ in milk were 8 ng/g and 5 ng/g, respectively. Pasteurized milk samples collected from supermarkets were detected, and not found FB₁ and FB₂.

Key words fumonisins, HPLC