柱前衍生-HPLC法测定食品中的伏马菌素

（南京师范大学食品系，南京 210097） 郑铁松
（南京师范大学化科院，南京 210097） 钟文辉

摘 要：主要综述了柱前衍生-HPLC法测定食品中伏马菌素的研究进展，对样品中伏马菌素的提取、纯化、衍生方法以及流动相的选择和方法的精密度做了深入的探讨。
关键词：伏马菌素，高效液相色谱，食品

Abstract: In this paper the research progresses on determination of fumonisin in food by precolumn derivation and HPLC are reviewed. The methods of extraction, purification and derivation of food samples, the selection of mobile phase and the precision are also discussed.
Key words: fumonisin; HPLC; food

中图分类号：TS207.4 文献标识码：A
文 章 编 号：1002-0306(2004)10-0133-03

伏马菌素是一类由串珠镰刀菌产生的真菌毒素。目前已知伏马菌素共有11种衍生物，其中伏马菌素B_1（FB_1，$C_{34}H_{59}O_{15}N$）是最主要成分，也是导致伏马菌素毒性作用的主要成分[1]。

伏马菌素分布广泛且毒性较大，因此它在食品安全中的意义越来越受到人们的重视。作为农业大国，我国迫切需要建立切实可行的检测方法，对伏马菌素的污染状况做全面调查和检测。

伏马菌素的测定方法有高效液相色谱(HPLC)[2-4]、薄层色谱(TLC)[5]、ELISA[6]以及气相色谱等[7]。在全球范围的玉米及其制品的调查中，超过90%的实验室是用柱前衍生和HPLC法分析伏马菌素，同时该方法也是国际权威机构认可的检测玉米中伏马菌素污染的方法[3]。本文将就该方法的研究进展做一综述。

1 食品中伏马菌素的提取

食品中伏马菌素的提取常采用乙腈-水（1:1，v/v）[1,8,9]或甲醇-水（3:1，v/v）[2,8,10]。乙腈-水（1:1）提取的回收率在80%以上，而甲醇-水（3:1）提取的回收率只有70%左右；同时，食品中伏马菌素的提取用振荡的效果较好，回收率达85%，而匀浆只有相对较低的回收率[3,7]。因此，食品中伏马菌素的提取采用乙腈-水溶液（30~60min振荡）比甲醇提取的效果好。研究表明，用不同比例的溶剂-样品（2:1~10:1）进行毒素提取时，其回收率没有明显的差别[7,8]。

然而，研究也表明，天然存在于食品中的伏马菌素远比人为添加到样品中的伏马菌素难以提取，特别是天然存在于玉米表皮中的伏马菌素更加难于提取，采用常规的乙腈-水（1:1，v/v）或甲醇-水（3:1，v/v）提取的效果都不是很好，因此，对于存在于这类特殊样品中的伏马菌素的提取，应当采用pH9.2甲醇-硼酸盐缓冲液（3:1，v/v），只有这样，才能获得比较好的提取效果[7,8]。

另外，在食品中伏马菌素的提取上，也有研究者采用含5%醋酸的二氧化碳超临界萃取的方法，但由于条件的限制和方法的不成熟，目前这一方法的使用比较少[7]。

2 提取液中伏马菌素的纯化

样品在HPLC分析之前，提取液必须经过纯化，以除去样品中杂质并浓缩伏马菌素。目前世界上纯化伏马菌素主要采用固相萃取柱（SPE C_{18}）、强阴离子交换柱（SAX）及免疫亲和柱。

2.1 SAX柱

使用SAX柱可获得比SPE C_{18}柱更好的纯化效果，应用也最为普遍[2]。过柱时样品提取液的pH是影响纯化效果的最关键因素，必须调节合适，一般要求pH大于5.8，并且要严格控制流速不能大于1mL/min，但对大米样品而言，提取液的pH要求调节到6.2[7-9]。虽然SAX柱在伏马菌素纯化中使用较普遍，但它不能用来纯化水解的伏马菌素，因为水解部分缺少

收稿日期：2003-12-05
作者简介：郑铁松（1963-），男，博士，副教授，研究方向：食品安全与食品生物技术。
基金项目：国家"十五"重大科技攻关项目（2001BA804A14）。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

SAX 柱纯化过程中所需的阴离子。

2.2 SPE C_{18} 柱

SPE C_{18} 柱可强烈吸附伏马菌素，洗脱较为困难，回收率不够稳定，但该纯化柱可以分离水解的伏马菌素。它已被应用到玉米、牛奶中水解的伏马菌素的纯化[1,8]。

2.3 SPE 和 SAX 联合柱

使用 SPE 和 SAX 联合柱可同时纯化伏马菌素和水解的伏马菌素，特别是碱处理过的玉米样品提取液中，同时含有伏马菌素和水解的伏马菌素，纯化时首先将样品提取液通过 SAX 柱分离伏马菌素，然后再将洗脱液通过 C_{18} 以分离水解的伏马菌素[9,11]。

2.4 免疫亲和柱

免疫亲和柱中含有与伏马菌素结合的抗体，可选择性地吸附伏马菌素，因此，该方法分离纯化效果好，检测灵敏度高、快速，但免疫亲和柱的纯化容量比较小[4,12]。

无论使用何种类型的纯化柱，在纯化时必须要注意柱子的体积，有的样品要经过稀释后才能被很好地纯化。

3 衍生剂的选择

应用 HPLC 方法进行伏马菌素检测时，一般需要柱前衍生。伏马菌素本身既没有特异的紫外吸收基团，同时也没有荧光特性，但在一定的条件下伏马菌素可同某些物质反应形成具有荧光的衍生物，从而可以采用 HPLC 荧光检测器进行灵敏的定量分析。因此，选择合适的荧光衍生剂和衍生方法是保证 HPLC 检测伏马菌素准确度和灵敏性最为重要的因素。不同的衍生方法已有所报道，大多与伏马菌素中的氨基反应有关。

3.1 荧光胺

荧光胺是一种最早应用于伏马菌素 HPLC 测定的荧光衍生剂，它能够产生必要的敏感性，但是样品和衍生剂反应后会产生两种不同的荧光衍生物，因而影响测定的准确性[9]。

3.2 萘-2,3-二羧醛(NDA)

NDA 在氰化钾存在下与伏马菌素反应生成一种荧光衍生剂，并且比较稳定，可保存 24h，还可以同时用于伏马菌素和伏马菌素水解物的测定；但它的缺点是其本身有荧光，因而对检测峰值有影响，准确度不高[8]。

3.3 4-氟-7-硝基苯呋咱(NBDF)

检测极限为 100ng/g，但稳定性比较差[13]。

3.4 9-芴基甲基-氯甲酸酯(FMOC)

FMOC 与伏马菌素反应生成一种荧光衍生剂，可稳定 72h，但灵敏度较低，检测极限为 200ng/g[9]。

3.5 6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺-氨基甲酸酯

6-氨基喹啉-N-羟基琥珀酰亚胺-氨基甲酸酯与伏马菌素反应后能够形成较为稳定的荧光物质，但检测的灵敏度较低(260ng/g)[14]。

3.6 邻苯二甲醛(OPA)

在室温下 OPA 和 2-巯基乙醇在硼酸盐缓冲液的条件下与伏马菌素迅速反应产生荧光产物，检测灵敏度可达 50 ng/g 以下，但所产生的荧光产物不够稳定[2,10,15]。

自 1990 年 Shephard 等首次把邻苯二甲醛(OPA)用作伏马菌素 HPLC 测定的荧光衍生剂后，OPA 至今仍然是大多数实验室中进行 HPLC 法荧光检测伏马菌素时普遍使用的柱前衍生剂[2,7,10,14~16]。但伏马菌素-OPA 衍生产物不稳定，在 8min 后有 5%的衰减，在 64min 后，减少到 48%[10]。如果能使衍生剂添加到 HPLC 时进样控制在 2min 内，则可保证荧光产物的稳定性。所以，样品的衍生时间一定要严格控制好。这种方法可检测到 50ng/g 以下的伏马菌素[2,10,15]。

另外，也有报道使用 OPA-半胱氨酸柱后衍生的方法测定伏马菌素，但该方法较为烦琐，且测定的灵敏度比 OPA 柱前衍生法要低，为 80ng/g[7]。

4 流动相的选择

应用 HPLC 方法进行伏马菌素检测时，常用的流动相主要有两种，甲醇-磷酸盐[4,10]或乙腈-水-乙酸[1,8]。多数实验采用甲醇-磷酸盐作为流动相，甲醇-0.1mol/L 磷酸二氢钠(68:32，v/v)用磷酸调节 pH3.3，并用 0.25μm 或 0.45μm 的有机微孔滤膜过滤。调节 pH 的目的一是为了防止水解现象的发生，允许被反相技术分离；同时也能使峰形更为美观。

此外，据报道，还有用乙腈-柠檬酸盐作为流动相的[9]。

5 方法的精密度

精密度是评价一种分析测定方法的最为重要的指标之一。伏马菌素主要存在于玉米类食品中，分布在 6 个国家的 11 个实验室采用同样的 HPLC 方法(甲醇-水提取，SAX 柱纯化，OPA 衍生)对同一批天然污染的玉米样品的分析结果表明，样品中伏马菌素 B_1 的含量在 200~2000ng/g 之间；在同一个实验室测定结果的变异系数(RSD)为 7.7%~25.5%；在不同的实验室之间测定结果的变异系数(RSD)为 18.0%~26.7%[2,11]。欧洲 24 个实验室对人为添加 2000ng/g 伏马菌素 B_1 和 1000ng/g 伏马菌素 B_2 的玉米样品的分析也获得了类似的结论，在同一个实验室伏马菌素 B_1 和 B_2 测定结果的变异系数(RSD)分别为 10%和 11%；在不同的实验室之间伏马菌素 B_1 和 B_2 测定结果的变异系数(RSD)分别为 11%和 13%[11]。这两组实验结果也再次说明，天然存在于食品中的伏马菌素远比人为添加到样品中的伏马菌素难以提取，因此前者测定结果的变异系数比后者高。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Mallmann C A, Santurio J M, Almeida CAA, Dilkin P. Fumonisin B_1 levels in cereals and feeds from southern Brazil [J]. Arq Inst Biol Sao Paulo, 2001,68:41~45.

[2] Shephard G S.Worldwide Survey of Fumonisin Contamination of Corn and Corn-Based Products[J]. J AOAC Int,1996,79(3): 671~687.

[3] Marin S, Magan N, Sorra J, Ramos A J, Canola R, Sanchls V. Fumonisin B_1 production and growth of Fusarium moniliforme and Fusarium proliferatum on maize, wheat, and barley grain[J]. Food Sci,1999,64:921~924.

[4] 林维宣,田苗.单克隆免疫亲和柱-高效液相色谱法测定啤酒中伏马菌素 B_1、B_2[J]. 食品科学,2001,22(2):71~73.

[5] Gelderblom WCA,Marasas WFO.Cancer promoting potential of different strains of Fusarium moniliforme in a short term cancer initiation promotion assay[J].Carcinogenesis,1988(9): 1405~1409.

[6] 郭云昌,刘素梅,刘江.伏马菌素 B_1 免疫检测方法的研究[J].卫生研究,1999,28(4):238~241.

[7] Shephard G S. Chromagraphic determination of the fumonisin mycotoxins[J].Chromatography A,1998(815):31~39.

[8] Bennet G A, Richard J L. Liquid chromatographic method for analysis of the naphthalene dicarboxadehyde derivative of fumonisins[J]. J AOAC Int,1994(77):501~506.

[9] Holcomb M, Thompson H C, Hunkins L J. Analysis of fumonisin B_1 in rodent feed by gradient elution HPLC using precolumn derivatization with FMOC and fluorescence detection[J]. J Agric Food Chem,1993,41:761~767.

[10] Sydenham E W,Shephard G S, Thiel P G.Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1, B_2, and B_3 in foods and feeds[J]. J AOAC Int,1992,75(2):313~318.

[11] Shephard G S, Thiel P G, Sydenham E W. Liquid chromatographic determination of the mycotoxin fumonisin B_2 in physiological samples[J]. Chromtogr A,1995,692:39~43.

[12] Trucksess M W, Stack M B, Allen SJ.Immonoaffinity column coupled with liquid chromatography for determination of FB_1 in canned and frozen sweet corn[J]. J AOAC Int,1995 (78):705~710.

[13] Scott P M, Lawrence G A. Liquid Chromatographic determination of fumonisins with 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan [J]. J AOAC Int,1992,75:829~834.

[14] Velazquez C, van Bloemendal C,Scanchis V, Canela R. Liquid chromatographic determination of fumonisins with 6-amino-quinolyl N-hydroxysuccinimidyl carbamate[J]. J Agric Food Chem,1995,43:1535~1539.

[15] Shephard G S, Sydenham E W, Thiel P G, Gelderblom WCA. Quantitative determination of fumonisins B_1 and B_2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. J Liq Chromatogr,1990,13:2077~2087.

[16] Harrison L R, Colvin B M, Greene J T. Pulmonary Edema and Hydrothorax in Swine Produced by Fumonisin B_1, a Toxic Metabolite of Fusarium moniliforme[J]. Vet Diagn Invest,1990(2):217~221.

(上接第 126 页)

4 结论

本研究证实，高浓度 CO_2 贮藏显著延缓了菜心叶绿素、可溶性固形物、可溶性糖和可溶性蛋白含量的下降；高浓度 CO_2 贮藏菜心具有在实际生产上应用的可行性。

参考文献：

[1] Tian SP, Fan Q, Xu Y, et al. Evaluation of the use of high CO_2 concentrations and cold storage to control Monilinia fructicola on sweet cherries [J]. Postharvest biology and technology,2001,22:53~60.

[2] 邹琦.植物生理学实验指导[M].北京:中国农业出版社, 2000,134~138,199~200.

[3] Bradford M M. A rapid and sensitive method for quantitantion of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1978(72):248~258.

[4] Lers A, Jiang W B, Lomaniec E, Aharoni N. Gibberellic acid and CO_2 additive effect in retarding postharvest senescence of parsley[J]. Food Sci,1998, 63: 66~68.

[5] 周相娟,姜微波,胡小松,周立刚.赤霉素和乙烯对香菜叶片衰老的影响[J].北方园艺,2003(3):54~57.

[6] 姜微波,Lers A,Aharoni N.CO_2 对欧芹离体叶片中蛋白质代谢的影响[J].植物学通报,2000,17(2):185~187.

[7] 李正国,高雪. 贮藏温度对青花菜品质的影响[J].中国蔬菜,2000(4):6~9.

全国中文核心期刊 轻工行业优秀期刊

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net