

HPLC 法检测食管癌高发区林县井头村 玉米中的腐马素 B₁ (FB₁)

王颖* 朱彤霞

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 采用 201 强碱性阳离子粉末树脂为净化介质,以萘二醛(NDA)为衍生试剂进行腐马素(fumonisin B₁)FB₁的 HPLC 检测。方法回收率平均为 92.3%,仪器检测限为 9.7×10^{-11} g,方法检测限为 $60 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。该方法灵敏度高,适于低含量样品中 FB₁ 的定性及定量检测。共检测了 23 份林县井头村玉米样品(19 份口粮玉米和 4 份霉玉米),均证实受到了镰刀菌的严重侵染。经 HPLC 检测,只在 2 份口粮玉米中检出了 FB₁,其污染水平皆在 $121 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $2560 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 范围内,阳性率分别为 10.5% 和 50.0%。此外,还检测了由口粮玉米中分出的镰刀菌的培养物共 9 份,阳性率为 100%,其中 *Fusarium proliferatum* 形成 FB₁ 的产量最高,平均为 $1.66 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,而胶孢镰刀菌(*F. subglutinans*)的产量最低,平均为 $1.9 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。这种在玉米样品中检出 FB₁ 残留量水平较低的事实表明,在我国食管癌高发区林县井头村,玉米上镰刀菌毒素 FB₁ 的污染水平与食管癌高发率之间不存在统计相关性。

关键词 高效液相色谱(HPLC); 腐马素 FB₁

中图分类号 Q936

Determination of FB₁ in Corn with High Incidences of Esophageal Cancer in Linxian Jingtoucn

Wang Ying Zhu Tongxia

(College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The strong alkali cation powder resin(201) is used as a cleansed medium and the naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde (NDA) as a derivative reagent to determinate fumonisin B₁(FB₁) by HPLC. The mean recovery of FB₁ by this method has reached 92.3% with 9.7×10^{-11} g as the instrumental determination limit and $60 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ as the limit of the method. This method is sensitive and especially fit for the qualitative and/or quantitative determination of minim FB₁ in samples. We have investigated 23 corn samples of Linxian Jingtoucn, which including 19 staple corns and 4 moldy corns, and all of them have been tested and confirmed that they are heavily contaminated by Fusarium species. We have found that only 2 of 19 staple corns and 2 of 4 moldy corns have been detected with the level of FB₁ in the range from $121 \sim 2560 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, and the positive rate is 10.5% and 50.0% respectively. In additional, we have also detected FB₁ in 9 cultures of fusarium strains which isolated from staple corns, the positive rate is 100%. In which the specie of *F. proliferatum* has the highest production of FB₁ with mean of $1.67 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, while *F. subglutinans* has the lowest one, only with mean production of FB₁, $1.9 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$. This fact that the

收稿日期: 2001-05-10

* 王颖, 讲师, 研究方向为微生物发酵工程。

lower level of FB₁ is produced in corns shows that the contaminated level of FB₁ in corns is not related with the high incidence of esophageal cancer in Linxian Jingtoucun, China.

Key words high pressure liquid chromatogram; fumonisin B₁ (FB₁)

腐马素(fumonisin)是一组结构类似的镰刀菌毒素,其结构见图1。在自然界中共存在7种腐马素组分,其中腐马素B₁(FB₁)的污染最严重、毒性最强。FB₁易溶于水和极性溶剂,具有良好的热稳定性。其毒性作用对动物呈多样性,目前国际上已公认的有马属动物脑白质软化症(equine leukoencephalomalacia, ELEM)^[1],猪肺水肿(porcine pulmonary edema, PPE)^[2]等。FB₁对人的毒性作用尚未肯定,但在南非食管癌高发区 Transkei 的流行病学调查中发现,玉米中FB₁的污染水平与食管癌高发率在统计学上相关^[3],食管癌高发区玉米中FB₁含量明显高于低发区^[4]。腐马素越来越受到国际社会的关注,已被国际癌症研究机构列为2B级致癌物^[5]。

FB₁的检测方法有许多种,如薄层层析法(TLC、RPTLC)^[6]、气相色谱法(GC)^[7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8~10]、及酶联免疫吸附法(ELISA)^[11]等,其中HPLC法准确可靠,重复性好,是国际上常用的腐马素定性定量分析法。本文以作者所在实验室的原有方法为基础^[8],以201粉末树脂为净化材料,严格控制该树脂的装量和待测液流量,进行样品的前处理,并以萘二醛(naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde, NDA)为衍生化试剂进行HPLC检测,使方法

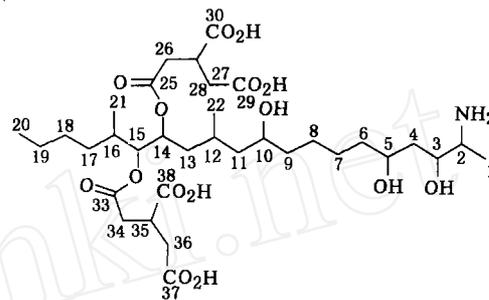


图1 FB₁[2-氨基-12,16-二甲基-3,5,10-三羟基-14,15-二(3,4-二羧基-丁酰氧基)-二十烷]的化学结构

回收率由原来的74.3%^[8]提高到92.3%,仪器检测限为 9.7×10^{-11} g,方法检测限为 $60 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。河南省林县是我国食管癌高发区,而井头村又是林县的食管癌高发区之一,当地居民所食用的口粮玉米受镰刀菌污染严重^[13],其中最具污染优势的串珠镰刀菌(*Farium moniliforme*)和*F. proliferatum*是目前国际上公认的具有很强产毒能力的镰刀菌种。本工作旨在通过对井头村玉米中镰刀菌毒素FB₁的污染检测,探索FB₁污染量与食管癌高发率之间的可能联系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 1995—1996年采自河南林县井头村的口粮玉米19份,霉玉米4份,共计23份。1996年对照区北京玉米样品6份。在这些样品中镰刀菌的侵染率均高于50%^[13]。

1.1.2 仪器 Varian 5000 高压液相色谱仪,Varian 荧光检测器,Alltime C₁₈色谱柱(4.6 mm × 250 mm),Shimadzu C-RIB 记录仪。

1.1.3 试剂 201 强碱性阳离子粉末树脂(200目);FB₁ 标准品(Sigma公司),以体积比为7:3的乙腈和水配成 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的贮备液,-18℃保存; $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ NDA(Sigma公司),-18℃保存; $0.13 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氰化钠(Sigma公司);以 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH将 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼酸钠(A R)调至pH9.5,备用;磷酸氢二钾(A R)。 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无水甲醇,石油醚,冰醋酸均为A. R.级,乙腈为色谱纯。

1.1.4 培养基 PDA 培养基,大米培养基。

1.1.5 镰刀菌培养物 随机选取由林县玉米口粮中分离出的串珠镰刀菌、*F. proliferatum* 和胶孢镰刀菌各 3 株,经单孢分离后点种于 PDA 平板上,25℃培养 5 d。然后以内径 5 mm 的灭菌不锈钢打孔器制得培养物琼脂块,接入大米培养基。每一菌株接种 2 瓶,25℃培养 3 周后,室温下通风橱内晾干。

1.2 方法

1.2.1 回收率测定 在陈鹏方法^[8]基础上,通过选用不同颗粒度的树脂、改变萃取液 pH 值以及降低待测液的吸附和洗脱流速等方法,来提高方法的回收率。测定时 25 g 阴性玉米粉中 FB₁ 的添加污染量为 $5 \times 10^3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

萃取 取 25 g 添加 FB₁ 的玉米粉置于 500 mL 具塞三角瓶中,加 100 mL 甲醇和水(3:1, pH 3.5)振荡萃取 1 h 后,双层定量滤纸快速过滤,然后取 40 mL 滤液加入 40 mL 石油醚于 125 mL 分液漏斗中充分振摇,待静置分层后,取下层脱脂萃取液备用。

净化 将 201 强碱性阳离子粉末树脂装于 $\phi 1 \times 9 \text{ cm}$ 玻璃小柱内,填充高度控制为 3 cm。分别以 5 mL 甲醇、5 mL 甲醇和水(体积比 3:1)洗柱,然后取 10 mL 萃取液上柱,并控制流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。分别用 8 mL 甲醇:水(体积比 3:1)和 3 mL 甲醇洗柱,再以 14 mL 1% 醋酸甲醇溶液进行洗脱,控制流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集 14 mL 洗脱液, N₂ 气流中挥干。以 1 mL 乙腈:水(体积比 7:3)溶解残留物,取出 50 μL 置于 5 mL 小瓶中,60℃条件下 N₂ 气流挥干,-18℃保存待测。

衍生 取上述 50 μL 挥干物,分别加入 250 μL 甲醇、250 μL 硼酸钠溶液、125 μL NaCN 溶液和 125 μL NDA 溶液,充分混匀后,于 60℃反应 15 min,冷却至室温。再加入 250 μL K₂HPO₄ 溶液:乙腈(2:3),充分混匀,终体积为 1 mL。

HPLC 检测 进样 20 μL ,进行检测。Ex=(380±50)nm,Em=460 nm。衰减为 4~8。流动相为乙腈、水和冰醋酸(体积比为 60:39:1),流速为 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。计算公式为

$$\text{FB}_1 \text{ 含量} = \frac{\text{样品或培养物峰面积/标准品峰面积} \times \text{标准品进样量}(\text{ng})}{\text{样品(或培养物)进样量}(\text{g})} \times \text{稀释倍数}$$

1.2.2 样品的检测 方法同回收率的测定。

1.2.3 培养物检测 取相当于 10 g 的镰刀菌大米培养物,加 200 mL 甲醇和水(体积比 3:1, pH 3.5)进行振荡萃取,双层滤纸过滤后,取 10 mL 滤液上柱净化。净化步骤同上述,收集后,取 200 μL 挥干物进行衍生处理。衍生步骤同上,最后加入 1.75 mL K₂HPO₄ 溶液和乙腈(体积比 2:3),充分混匀,终体积为 2.5 mL。

2 结果与讨论

2.1 回收率的测定

研究表明降低净化过程中待测液的吸附和洗脱流速可显著提高方法回收率,使其由原方法的 74.3%^[8],提高到 92.3%(表 1)。HPLC 图谱见图 2。由于 FB₁ 分子中的自由氨基 R-

表 1 回收率测定结果

流 速	处理 1				处理 2			
	R%	\bar{X}	S ₀	CV%	R%	\bar{X}	S ₀	CV%
方法回收率	91.8	94.9	4.7	5.0				
	94.8				79.4	79.6	0.16	0.2
	90.3				79.7			

处理 1:吸附流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,洗脱流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

处理 2:吸附流速为 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,洗脱流速为 $0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

NH₂ 在酸性条件下,能离解为[R-NH₃]⁺形式,而这种荷电形式有利于FB₁从玉米粉中游离出来。因此,降低萃取液的pH值可能有助于回收率的提高,但实验结果表明降低萃取液pH值和改变净化树脂的颗粒度等措施对提高回收率的影响并不显著。

2.2 林县和对照区玉米样品中FB₁的HPLC检测

总共检测了23份受镰刀菌严重侵染的林县井头村玉米样品^[13]。其中,19份口粮玉米样品中只有2份被检出了FB₁,含量分别为212 ng·g⁻¹和737 ng·g⁻¹,样品阳性率为10.5%。4份林县霉玉米样品中,有2份检出了FB₁,含量分别为2.56×10³ ng·g⁻¹和1.07×10³ ng·g⁻¹,阳性率为50.0%。这一结果低于Chu^[14]和Yoshizawa^[15]对林县玉米样品的检测结果,推测这可能与样品的来源、采集以及检测时间的不同有关。然而井头村玉米中FB₁的污染量和阳性率均较低的事实则说明,镰刀菌的严重污染与FB₁的高度污染之间不一定存在必然正相关性。此结果还表明,同样是在食管癌高发区,我国林县井头村FB₁的污染情形与南非Transkei的情形显著不同,即林县井头村玉米样品中FB₁的污染水平与食管癌的高发率之间不存在统计相关性。

共检测了6份对照区北京的玉米样品,也都遭受了镰刀菌的严重污染(污染率≥50%)^[13],但并未检出FB₁(表2)。表明食管癌高发区和对照区北京之间可能存在着促使镰刀菌毒素形成的环境差异,林县井头村当地特殊的气候条件和水文环境有可能是导致食管癌高发的主要因素之一。

动物中马对腐马素最为敏感,因此,美国兽医诊断师和真菌毒素委员会(Amer. Assn. of Vet. Lab. Diagnosticians, Mycotoxin Comm.)提出了马饲料中FB₁的最高限量为5 μg·g⁻¹^[5],而我们人类对FB₁的敏感性与马相近。从这一角度来说,在我国无论是食管癌高发区河南省林县井头村还是对照区北京,在自然条件下玉米中FB₁的污染水平均低于1.0 μg·g⁻¹的事实,表明我们的玉米是相对安全的。

表2 林县井头村和北京对照区玉米样品的HPLC检测结果

玉米样品	测定份数	检出份数	阳性率/%	FB ₁ 含量/(ng·g ⁻¹)
井头村 口粮 霉玉米	19	2	10.5	212,737
	4	2	50.0	2.56×10 ³ ,1.07×10 ³
北京 玉米穗	6	0	0	0

2.3 由林县井头村玉米中分出的镰刀菌培养物的HPLC检测

检测由林县井头村口粮玉米中分离出的串珠镰刀菌、*F. proliferatum*和胶孢镰刀菌培养

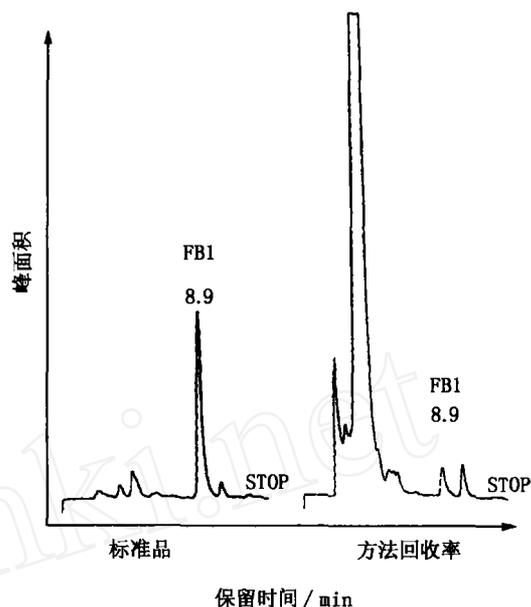


图2 HPLC回收率图谱

物共 9 份(表 3)。全部 9 个菌株的培养物均可产生 FB₁, 阳性率为 100.0%。其中, *F. proliferatum* 是产毒能力最高的菌株, 平均产量可达 $1.67 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。串珠镰刀菌的产毒能力仅次于 *F. proliferatum*, 平均为 $1.44 \times 10^5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。胶孢镰刀菌的产量最低,

平均为 $1.9 \times 10^4 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。以上结果预示, 由井头村分离出的镰刀菌具有较强的产毒能力, 只要自然环境条件适宜, 这些镰刀菌就有可能产生大量腐马素 FB₁, 因此, 我们不能忽视其存在的潜在危险性。

表 3 镰刀菌培养物的 HPLC 检测结果 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$

菌株	<i>F. moniliforme</i>	<i>F. proliferatum</i>	<i>F. subglutinans</i>
1	1.05×10^5	1.05×10^5	550
2	1.81×10^5	1.85×10^5	9.35×10^3
3	1.45×10^5	2.08×10^5	4.7×10^4
平均	1.44×10^5	1.66×10^5	1.9×10^4

参 考 文 献

- 1 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*. Onderstepoort J Vet Res, 1988, 55: 197~203
- 2 Motelin G K, Haschek W M, Ness D K, et al. Temporal and dose-response features in swine fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. Mycopathologia, 1994, 126: 27~40
- 3 Reeder J P, Marasas W F O, Theil P G, et al. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology, 1992, 82: 353~357
- 4 Sydenham E W, Theil P G, Marasas W F O, et al. Nature occurrence of some *Fusarium mycotoxins* in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. J Agric Food Chem, 1990, 38: 1900~1903
- 5 Shephard G S, et al. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. J AOAC Int, 1996, 79(3): 671~687
- 6 Rottinghaus G E, Coatney C E, Minor H C. A rapid, sensitive thin layer chromatography procedure for the detection of fumonisin B₁ and B₂. J Vet Diagn Invest, 1992, 4: 326~329
- 7 Plather R D, Norred W P, Bacon C W, et al. A method of detection of fumonisins in corn samples associated with field cases of Equine Leukoencephalomalacia. Mycologia, 1990, 82(6): 698~702
- 8 陈鹏. 腐马素 B₁ 分析方法的研究. 北京农业大学学报, 1995, 21(2): 126
- 9 Sydenham E W, Shephard G S, Theil P G. Liquid chromatographic determination of fumonisin B₁, B₂ and B₃ in food and feeds. J AOAC Int, 1992, 75(2): 313~318
- 10 Shephard G S, Sydenham E W, Theil P G, et al. Quantitative determination of fumonisin B₁ and B₂ by HPLC with fluorescence detection. J Liq Chromatogr, 1990, 13(10): 2077~2087
- 11 Sydenham E W, Shephard G S, Theil P G, et al. Determination of fumonisins in corn: Evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. J Agric Food Chem, 1996, 44: 159~164
- 12 Chen J P. Production of the mycotoxin FB₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(12): 3928~3931
- 13 王颖, 朱彤霞. 食管癌高发区林县井头村玉米样品的真菌区系分析. 中国农业大学学报, 2002, 7(1): 5~8
- 14 Fun S Chu, Guo Y Li. 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(3): 847~852
- 15 Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y. Fumonisin occurrence in corn from high- and low-risk areas for human esophageal cancer in China. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(5): 1626~1629