

奶牛血液中蓖麻碱含量的 HPLC 检测

张显华¹, 张学富², 张翠艳¹, 窦亚平³

(1. 内蒙古民族大学动物科技学院, 内蒙古通辽 028000; 2. 内蒙古民族大学分析测试中心, 内蒙古通辽 028000;

3. 通辽市科尔沁区兽医工作站, 内蒙古通辽 028000)

[收稿日期] 2006-08-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2007)04-0025-04 [中图分类号] S859.81

[摘要] 建立了血液中蓖麻碱残留量的高效液相色谱(HPLC)检测法。用三氯甲烷提取蓖麻碱, 除去蛋白质和脂肪后, 用 HPLC 法对其进行测定。采用 Hypersil ODS C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 25 μm), 水-乙腈(9:1, V/V)为流动相, 流速 0.8 mL/min, 检测波长为 220 nm。结果显示, 在 0.26~5.2 μg 范围内, 蓖麻碱峰面积与质量的线性关系良好, 回归方程为 $y = 1.57 \times 10^4 x - 4.93 \times 10^5$, $r = 0.999$, $RSD = 3.82\%$ 。牛血中蓖麻碱平均回收率为 72.1%, RSD 为 2.54% ($n = 5$)。饲喂蓖麻粕的牛血液中蓖麻碱的含量为 0.512 μg/mL。

[关键词] 蓖麻碱; 高效液相色谱法; 奶牛血; 检测

Determination of Ricinine in Dairy Cow Blood by HPLC

ZHANG Xianhua¹, ZHANG Xuefu², ZHANG Cuïyan¹, DOU Yaping³

(1. Animal's Scientific and Technological Institute, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028000;

2. Experiment Center, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia, 028000;

3. Veterinary Station of Keerqin District, Tongliao, Inner Mongolia, 028000; China)

Abstract: A HPLC method for determination of ricinine in the blood was established. Ricinine was extracted by chloroform, separated with Hypersil ODS C₁₈ (250mm × 4.6mm, 25μm) chromatogram column and acetonitrile water(9:1, V/V) as liquid phase that the flow rate was 0.8 mL/min, determined with diode array detector and ultraviolet detector at 220 nm of the wavelength. Results showed that there was a good linear relation in the range of 0.26~5.2 μg ricinine, the equation of recovery rate was $y = 1.57 \times 10^4 x - 4.93 \times 10^5$ ($r = 0.999$), RSD was 3.82%. Average recovery rate of ricinine in cow blood was 72.1%, RSD was 2.54% ($n = 5$). The content of ricinine in blood from the dairy cow fed with castor bean meal was 0.512 μg/mL.

Key words: ricinine; HPLC; dairy cow blood; detection

蓖麻碱(Ricinine)是1864年Tuson从蓖麻籽中分离出来一种中性生物碱, 化学名称为3-氰基-4-甲氧基-1-甲基-2-吡啶酮。因分子中含氰基, 毒性很大, 人食入可引起恶心、呕吐、血压下降, 严重时呼吸抑制死亡^[1], 在农业上被用于制备杀虫剂^[23]。小白鼠腹腔注射的最小致死量(MLD)为16 mg/kg。

鸡饲料含蓖麻碱为0.1%, 甚至0.01%时, 便可抑制鸡的生长, 雏鸡蓖麻碱的半致死剂量(LD₅₀)为11.24 μg/kg 体重^[4]。

蓖麻籽经榨油后剩下的残渣为蓖麻饼粕, 含有丰富的蛋白质、氨基酸、微量元素等物质, 其中蛋氨酸等必需氨基酸的含量较大豆饼还高。蓖麻饼粕

中的粗蛋白含量达 33%~35%, 脱壳脱脂饼粕粗蛋白含量可高达 69%, 为饲料行业良好的蛋白质来源。但蓖麻粕中含有蓖麻碱、蓖麻毒蛋白、血细胞凝集素、变应原等毒素, 未经脱毒的蓖麻饼粕不能直接用于饲料生产。

近年来很多研究者研究了蓖麻饼粕的毒素检测方法, 如紫外分光光度法^[5]、薄层层析定量分析法^[6-7]、红外分光光度法^[8]、高效液相色谱法^[9-10]等, 对于畜产品中的蓖麻碱的检测国内尚未有报道。为保证食品安全和畜产品安全评估工作, 为研究蓖麻碱对畜体健康的影响和蓖麻粕在饲料中使用的安全性, 需要建立可靠的检测方法。本实验探讨了用高效液相色谱法(HPLC)检测奶牛血液中蓖麻碱的含量。

1 材料

1.1 仪器 高效液相色谱仪, Waters600 型, Waters2996 二极管阵列检测器和 2487 紫外检测器, 美国 Waters 公司; 傅立叶红外光谱仪, AVATAR-360FT-IR, 美国 Nicolet 仪器公司; 超声波清洗器, SK2200LH 型, 上海科导超声仪器有限公司; 磁力加热搅拌器, 79-1 型, 金坛市恒丰仪器厂; 台式离心机, TGL-16G 型, 上海安亭科学仪器厂; 循环水式真空泵, SHZ-D(III) 型, 巩义市予华仪器有限公司; 旋转蒸发器, RE52-2 型, 上海沪西分析仪器厂; 可调微量移液器, 5~15 μL , 上海亚荣生化仪器厂; 熔点测定仪, b 型; 索氏提取器; 0.45 μm 样品过滤器等。

1.2 试剂 无水乙醇、无水乙醚, 天津市东丽区天大化学试剂厂; 三氯甲烷, 天津市标准科技有限公司, 均为分析纯试剂。甲醇、乙腈, 色谱纯, 天津市福晨化学试剂厂。实验用水为蒸馏水或超纯水(18.2M Ω .CM), 因实验项目不同而异。

1.3 脱毒蓖麻粕 由内蒙古通辽市天润蓖麻公司提供。

1.4 试验牛 在内蒙古通辽市清河乡选择两头体况良好、三胎、泌乳 4 个月、泌乳 24 kg 左右的荷斯坦泌乳牛, 一头为试验牛, 另一头牛为对照牛。

1.5 血液样品 采自饲喂含上述蓖麻粕 15% 混合精料 20 天的试验牛, 上午 9 时采血 300 mL, 同时采集另一头未饲喂蓖麻粕的对照牛的血液为阴性对照。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Hypersil ODS C₁₈(250 mm \times

4.6 mm, 25 μm); 流动相为乙腈-水(1:9, V/V), 流速 0.8 mL/min; 检测波长 220 nm; 进样量 10 μL 。

2.2 蓖麻碱的提取与检测

2.2.1 蓖麻碱的提取 蓖麻碱提取主要是参考叶锋等^[10-12]报道的方法并改进后进行制备和检测。

将 200 g 蓖麻粕样品粉碎并过 40 目筛, 加水 800 mL, 加热煮沸并保持微沸 2 h, 用真空泵连接布氏漏斗抽滤, 重复 3 次, 合并黄棕色水提液, 用旋转蒸发器连接真空泵减压浓缩至黑褐色稠膏状。用脱脂滤纸包好后置于索氏提取器的抽提管内, 用三氯甲烷回流提取 10 h 后回收三氯甲烷。将脂肪瓶中黄色三氯甲烷提取液置于旋转蒸发器上浓缩至深褐色油膏状。将此膏状物包好后置于索氏提取器的抽提管内, 再用无水乙醚回流冲洗除去油脂, 至提取管内乙醚变为无色再回流三次, 回收无水乙醚。将包有蓖麻碱粗提物的滤纸包取出置于通风橱内挥干乙醚, 置于索氏提取器的抽提管内, 用无水乙醇回流抽提 4~5 h, 回收提取管中的无水乙醇。当脂肪瓶中剩余 20~30 mL 蓖麻碱乙醇溶液时, 将溶液用旋转蒸发器减压浓缩挥发乙醇至干, 得到浅黄色蓖麻碱的粗提物。

粗提物用热的无水乙醇溶解, 反复重结晶后得白色棱柱状结晶。最后将白色棱柱状结晶用甲醇溶解定容至 20 mL, 以硅胶 G 层析柱进行纯化。收集色谱带最宽的组分子具塞三角烧瓶内, 挥干甲醇使蓖麻碱结晶, 即得纯净蓖麻碱晶体。

2.2.2 蓖麻碱的检测

2.2.2.1 熔点测定 在蓖麻碱 2/3 熔化时, 用熔点测定仪测熔点温度。实验测得提取的蓖麻碱晶体熔点为 199.8 $^{\circ}\text{C}$, 与叶锋等^[10]报道的 200~201 $^{\circ}\text{C}$ 接近。

2.2.2.2 紫外光谱测定 取上述蓖麻碱晶体, 溶于甲醇, 用二极管阵列检测器在 200~400 nm 波长范围内进行扫描, 得到紫外吸收光谱图(图 1)。

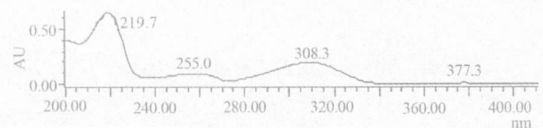


图 1 蓖麻碱紫外吸收光谱图

图 1 显示, 在 219.7、255.0 和 308.3 nm 处有 3 个吸收峰, 其中 219.7 nm 处紫外吸收最强, 与文献报道的蓖麻碱紫外吸收光谱^[5,9]的 3 个吸收峰相同。

2.2.2.3 红外光谱测定 取蓖麻碱粗提物少许, 与 KBr 充分研磨混匀, 压片, 用 AVATAR-360FT-

IR 傅立叶红外光谱仪测得红外光谱图(图 2)。

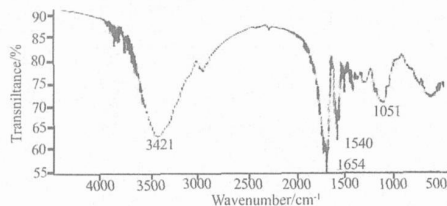


图 2 菟麻碱红外光谱图

菟麻碱的化学名称为 3-氟基-4-甲氧基-1-甲基-2-吡啶酮, 分子式为 $C_8H_8N_2O_2$, 从图 2 中可以看到: $3\ 089\ cm^{-1}$ 、 $3\ 040\ cm^{-1}$ 可能为不饱和环上的不饱和碳 C-H 伸缩振动引起的吸收峰。 $2\ 301\ cm^{-1}$ 的吸收峰为典型 C-N 三键伸缩振动引起的。出现在 $1\ 654\ cm^{-1}$ 为 C-O 的伸缩振动引起的吸收峰, 是由于 C-O 与环上不饱和键共轭作用伸缩振动向低波数方向位移引起的。 $1\ 480\ cm^{-1}$ 可归结为单环上 C-C 伸缩振动引起的吸收峰。 $1\ 370\ cm^{-1}$ 为 CH_3 伸缩振动吸收峰, $1\ 030\ cm^{-1}$ 为 C-O 伸缩振动引起的吸收峰, $980\ cm^{-1}$ 归结为 C-H 摇摆振动, $790\ cm^{-1}$ 、 $670\ cm^{-1}$ 为不饱和环上取代基变形振动引起的吸收峰。目前尚无菟麻碱的标准红外光谱图。从谱图分析其结果, 基本符合菟麻碱命名的结构, 说明提纯物为菟麻碱。

综合上述检测, 与文献^[8-10]对照, 证明实验得出的白色棱柱状晶体是菟麻碱, 获得的样品可作为标准品。

2.3 牛血液样品菟麻碱的测定

2.3.1 牛血液样品处理 在清洗消毒的三角瓶中加入 1 mg 肝素和 5 mL 蒸馏水, 溶解后旋转三角瓶使肝素均匀分布, 蒸干并加棉塞, 用于收集血样。将采得的牛血液样品用液氮制冷, 结冻后用研钵研磨至细粉状, 融化后取 10 mL, 加 5 mL 三氯甲烷, 磁力加热 ($60\ ^\circ C$) 搅拌 2 min; 血液凝固变黑后, 于 10 000 r/min 离心 5 min, 取下部清液再次以 10 000 r/min 离心 3 min, 最终取下部清液旋转蒸发至干; 加甲醇 2 mL 溶解残渣, 待测。试验血样和阴性对照血样同时按此法进行处理。

2.3.2 标准曲线的绘制 用电子天平准确称量制备的菟麻碱结晶 10.0 mg, 用甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中, 再分别取 1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中, 以甲醇稀释到刻度, 分别制成 0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 mg/mL 的标

准工作液, 用 $0.45\ \mu m$ 滤膜过滤, 收集滤液, 按 2.1 项色谱条件进行测定(图 3)。

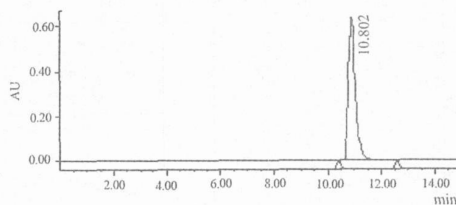


图 3 菟麻碱结晶标准液的 HPLC 色谱图

以含量为横坐标, 以响应值(峰面积)为纵坐标, 通过 Empower 色谱工作站处理实验数据, 绘制标准曲线。回归方程: $y = 1.57 \times 10^4 x - 4.93 \times 10^5$, $r = 0.999$, $RSD = 3.825\%$, 线性范围为 0.26~5.2 μg 。最低检测限为 0.26 μg 。

2.3.3 血液中菟麻碱的含量 实验牛血液提取液色谱图见图 4。

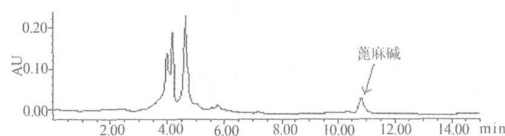


图 4 实验牛血液提取液的 HPLC 色谱图

由图 4 可见, 10.883 min 有菟麻碱的色谱峰。其光谱图见图 5, 其紫外吸收特征与菟麻碱一致。经测定, 实验牛血液中菟麻碱的含量为 0.512 $\mu g/mL$ 。取处理过的阴性对照血液样品进行测定, 未检测到菟麻碱, 其色谱图见图 6。

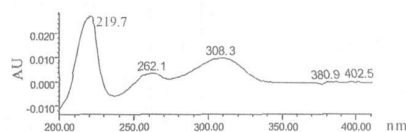


图 5 实验牛血液中菟麻碱的紫外吸收光谱图

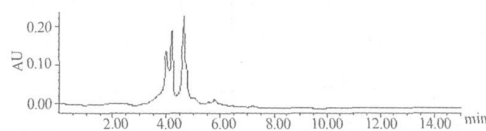


图 6 对照牛血液提取液的 HPLC 色谱图

2.3.4 菟麻粕中菟麻碱的测定 参考叶锋等^[10]报道的方法, 取 20 g 菟麻粕, 依据 2.2.1 项的提取方法制得菟麻碱粗提物, 用甲醇定容至 10 mL, 测定前再稀释 10 倍。经 $0.45\ \mu m$ 微孔滤膜过滤后进行 HPLC 分析, 根据测得的峰面积, 用回归方程计算含量。对菟麻粕样品中的菟麻碱用与检测血液中

蓖麻碱相同的 HPLC 法进行检测, 检测结果见表 1。

表 1 蓖麻粕中蓖麻碱的含量

| 样品名称 | 峰面积 | 测得量 | 蓖麻粕中蓖麻碱 |
|------|---------|----------------------|--------------------------|
| | | $/(mg \cdot L^{-1})$ | 含量 $/(mg \cdot kg^{-1})$ |
| 蓖麻粕 | 2751347 | 382.8874 | 366.9269 |

2.4 检测方法考察

2.4.1 样品加标回收率 用电子天平准确称量 3 mg 蓖麻碱用超纯水定容到 30 mL, 用微量移液器准确移取 10、20、30、40、50 μ L 分别加入到 5 组实验血液样品内, 每组实验血液样品体积为 5 mL。按 2.3.1 项下所述血样的制备方法处理后, 甲醇定容到 10 mL, 用高效液相色谱仪检测。

将配好的加标待测样按样品测定项操作, 按 2.1 项色谱条件测定峰面积, 每个样品重复进样 3 次, 计算平均实测量和回收率。测定结果见表 2, 平均回收率为 72.1%, RSD 为 2.54($n=5$)。

表 2 蓖麻碱加标回收率

| 编号 | 样品含量 $/(\mu g \cdot mL^{-1})$ | 加标量 $/ \mu g$ | 实测量 $/ \mu g$ | 回收率 $/ \%$ | 平均值 $/ \%$ | RSD $/ \%$ |
|----|------------------------------------|------------------|------------------|---------------|---------------|-----------------|
| 1 | 0.512 | 1.000 | 1.099 | 72.7 | | |
| 2 | 0.512 | 2.000 | 1.808 | 72.0 | | |
| 3 | 0.512 | 3.000 | 2.434 | 69.3 | 72.1 | 2.54 |
| 4 | 0.512 | 3.000 | 2.541 | 72.4 | | |
| 5 | 0.512 | 4.000 | 3.343 | 74.1 | | |

2.4.2 稳定性实验 同一浓度加标血样于 24、36 h 再分别测定两次, 计算峰面积。 RSD 为 5.61%。

2.4.3 重复性实验 将蓖麻碱浓度为 0.512 μ g/mL 的血样三次平行进样 10 μ L, 测得峰面积分别为 2 751 347、2 751 454、2 751 196, 保留时间分别为 10.883、10.872、10.802 min, 峰面积 RSD 为 0.003 8%, 时间 RSD 为 0.309%, 证明本实验重现性良好。

3 讨论与结论

3.1 通过对蓖麻碱结晶进行 200~ 400 nm 全波长扫描, 对其色谱图提取光谱图结果显示如图 1 所示, 蓖麻碱在 219.7、256.0、308.3 nm 处具有明显吸收峰, 且在 219.7 nm 处具有最大吸收峰, 故选择 220 nm 为检测波长。与赵青余^[9] 254 nm、徐文清^[5] 313 nm、郑成等^[11] 280 nm 的试验报道有所不同。

3.2 加标回收率的测定方案参考了汪风梅等测定甜菜碱含量^[3] 的文献。实验结果显示, 血液样品的平

均加标回收率是 72.1%, RSD 是 2.54% ($n=5$)。血液中蓖麻碱回收率较低, 经过对实验方案的考察, 其原因可能是在处理过程中血液样品用三氯甲烷萃取次数过少所致, 其正确性有待更多实验确定。

3.3 从表 2 的结果和饲喂设计计算, 当奶牛日采食精饲料中蓖麻碱的量达到 440 mg 时, 牛血液中蓖麻碱的量约为 0.512 μ g/mL, 但并未观察到奶牛外观上的异常。即说明蓖麻碱会出现在牛产品中。因此, 在没弄清楚蓖麻碱对人畜健康确切影响之前, 为确保食品安全, 牛饲料中不宜添加含有蓖麻碱的蓖麻粕。

3.4 根据 24、36 h 稳定性测定结果($RSD=5.61\%$) 显示, 相对标准偏差较大。说明蓖麻碱的检测必须在 24 h 内完成。这一结果与徐文清等^[5] 的报道结果一致。

3.5 实验显示, 利用高效液相色谱法检测牛血液中蓖麻碱含量的方法, 样品处理简单, 操作简便易行, 检测灵敏度高, 重现性良好, 可以作为血中蓖麻碱残留量检测的方法。

参考文献:

- [1] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京: 科学出版社, 1977: 706.
- [2] 赵建兴, 张树怀, 余国珍, 等. 蓖麻毒素粗提物杀虫作用的研究[J]. 内蒙古农业大学学报, 2001, 22(4): 78-80.
- [3] 杜小凤, 徐建明. 植物源农药研究进展[J]. 农药, 2000, 39(11): 8-10.
- [4] 金征宇, 李星. 蓖麻籽脱毒新工艺[J]. 中国油脂, 1991, 16(6): 17-19.
- [5] 徐文清, 陈艾, 庄湘莲. 紫外光光度法测定蓖麻籽饼中蓖麻碱的含量[J]. 中国油脂, 2001, 26(2): 45-46.
- [6] 邵桂林. 微生物法对蓖麻饼去毒的研究[D]. 中国农业科学院, 2002.
- [7] 金曙光, 乌力吉, 闫永保. 蓖麻碱的薄层层析定量分析研究[J]. 内蒙古石油化工, 2001, 24(12): 12-14.
- [8] 高宝岩, 霍建中, 刘伟, 等. 蓖麻碱的提取及光谱研究[J]. 光谱实验室, 2000, 17(1): 88-90.
- [9] 赵青余, 桂荣, 那日苏, 等. 蓖麻碱的分离鉴定及其含量测定方法的研究[J]. 饲料研究, 2003, (6): 27-28.
- [10] 叶锋, 王德润. 蓖麻毒素的毒性和毒素的分离及检测方法[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(1): 89-93.
- [11] 郑成, 雷德柱, 周勇强, 等. 蓖麻碱的提取[J]. 广东化工, 2003, (6): 12-15.
- [12] 陈亚敏, 陈禹锋, 何流. 蓖麻饼粕毒素化学分析方法的研究[J]. 现代商检科技, 1997, 7(2): 4-6.
- [13] 汪风梅, 周丽, 姚彤炜, 等. 高效液相色谱法测定口服银杏制剂后家兔血液中槲皮素和山萘酚浓度[J]. 中国医药学杂志, 2005, 25(1): 10-13.