

HPLC-FLD 免疫亲和柱-光衍生化法 测定胖大海中黄曲霉毒素的残留量

苏静华, 张超*, 钟水生, 汪明志

(苏州市食品药品检验所, 江苏 苏州 215000)

[摘要] 目的: 利用 HPLC-FLD 结合免疫亲和柱-光衍生化法测定胖大海药材中黄曲霉毒素残留量。方法: 采用 Cloversil C₁₈ 色谱柱, 流动相甲醇-水 (47:53), 等度洗脱, 流速 1 mL·min⁻¹, 柱温 35 °C, 在此条件下进行测定。结果: 黄曲霉毒素的检测限和定量限均低于 0.2 μg·L⁻¹, 平均回收率 97.06% ~ 99.93%, RSD 低于 12%, 精密性、重复性均达到痕量分析的要求。结论: 该方法结果可靠, 可用于胖大海中测定黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 含量的要求。

[关键词] 胖大海; 黄曲霉毒素; 免疫亲和柱; 光衍生化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0075-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150075

Quantitative Analysis of Aflatoxin in Sterculiae Lychnophorae Semen by HPLC-FLD after Immunoaffinity Column with Post-column Photochemical Derivatization

SU Jing-hua, ZHANG Chao*, ZHONG Shui-sheng, WANG Ming-zhi

(Suzhou Institute for Food and Drug Control, Suzhou 215000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a stable method for quantitative analysis of aflatoxin in Sterculiae Lychnophorae Semen by HPLC-FLD after immunoaffinity column with post-column photochemical derivatization. **Method:** Cloversil C₁₈ column was applied and mobile phase was consisted of methanol and water (47:53) with gradient elution of 1 mL·min⁻¹, column temperature was maintained at 35 °C. **Result:** The detection limits and quantitation limits of aflatoxin were lower than 0.2 μg·L⁻¹, average recoveries were in range of 97.06%-99.93%, and RSDs were below 12%. Besides that, precisions and repetitiveness all achieve the requirement. **Conclusion:** The method is a simple, accurate and could be used to analyze the content of aflatoxin in Sterculiae Lychnophorae Semen.

[Key words] Sterculiae Lychnophorae Semen; aflatoxin; immunoaffinity column; photochemical derivatization

黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)是由黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株产生的一类化学结构类似的二氢呋喃香豆素的衍生化合物,并且具有强烈的致癌作用,被国际癌症研究机构(IARC)划定为I类致癌物^[1]。黄曲霉毒素是目前为止发现毒性最大的真菌毒素之一,其毒性相当于氰化钾的10倍,砒霜的68倍。目前已经分离鉴定出12种包括B₁, B₂, G₁, G₂, M₁,

M₂, P₁, Q, H₁, GM, B_{2a}等分子形式。在植物来源的食物中通常只污染黄曲霉毒素B₁, B₂, G₁, G₂,其中产生黄曲霉毒素B₁的量比其他黄曲霉毒素构型要多,而且毒性最强。当人体摄入量较大时,可发生急性中毒,出现急性肝炎、出血性坏死、肝细胞脂肪变性和胆管增生等症状。

现如今国内外关于黄曲霉毒素的测定主要集中

[收稿日期] 20140211(013)

[第一作者] 苏静华, 硕士, 主管药师, 从事药品质量控制研究, Tel:0512-67079940, E-mail:susan0702@163.com

[通讯作者] *张超, 硕士, 药师, 从事中药质量控制研究, Tel:0512-68223525, E-mail:colinspecial@163.com

在粮食、花生及其制品、奶类产品上,在中药产品中对于黄曲霉毒素的关注程度和检测力度还相当缺乏。中药产品在中国的消耗量大,使用率高,普及率好的同时也增加了黄曲霉毒素的应用风险,例如储存条件不当极易造成中药材的发霉变质。药食两用中药相对于药性强烈的植物药和矿物药来说药性缓和、流通量更大,民间使用更加的随意,理应受到更大的重视。

胖大海是是梧桐科植物灯籽苹婆的干燥成熟种子,主要依赖于进口,主产于东南亚的老挝、越南、泰国、马来西亚和印度等国。主要功效为清热、润肺、利咽、解毒。除了煎汤服用外,泡茶饮用是胖大海最主要的服用方式,可以药食两用治疗咽炎、肺热咳嗽、大便干结、急慢性扁桃体炎等疾病^[2]。鉴于果实种子类药物极易由于存储条件不当发生真菌感染继而产生黄曲霉毒素,而这一方面也提示,胖大海日趋增长的消耗量使得黄曲霉毒素致癌的风险也不断提高。目前,对于胖大海药材中黄曲霉毒素的有害残留分析研究还比较匮乏,现存方法的适用性还有待考察。定性定量测定黄曲霉毒素的有 TLC^[3], Elisa^[4], HPLC-UV^[5], HPLC-FLD^[6] 方法, HPLC 方法更为稳定、高效。本文利用 HPLC-FLD 结合免疫亲和柱净化富集和柱后光衍生化进行含量测定,针对胖大海药材考察前处理方法,以求建立可靠的定量方法,来同时检测药材中的 B₁, B₂, G₁, G₂ 4 种构型的黄曲霉毒素。

1 材料

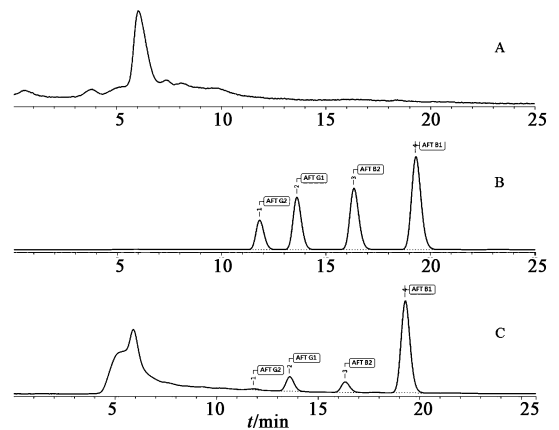
LC-20AD 型高效液相色谱仪(配 Shimadzu 荧光检测器,日本 Shimadzu 公司),ToxinFast 型光化学衍生器(中国北京华安麦科生物技术有限公司),Mettler Toledo XS105 型电子分析天平(瑞士 Mettler 公司),Milli-Q 型超纯水处理系统(美国密理博公司)。

胖大海药材抽样于江苏省境内(共 6 个批次样品),AflaTest 免疫亲和柱(美国 Vicam 公司);黄曲霉毒素混合对照品(黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂)(Supelco 公司,批号 LB96951),黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 溶液质量浓度分别为 0.288, 1.056, 0.314, 1.039 mg·L⁻¹, 甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Cloversil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(47:53),流速 1 mL·min⁻¹,柱温 35 °C,进样量 10 μL,采用柱后光衍生化法,激发波长 360 nm,发射波长 450 nm;在此条件下,各色谱峰间分离度均达到定量要求,阴

性样品无干扰。见图 1。



A. 阴性样品; B. 混和对照品; C. 供试品

图 1 胖大海 HPLC

2.2 混合对照品溶液的制备 精密量取黄曲霉毒素混合对照品(黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 分别为 0.288, 1.056, 0.314, 1.039 mg·L⁻¹) 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀作为储备液。精密量取储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇溶液稀释至刻度, 摇匀即得, 备用。

2.3 供试品溶液的制备 将胖大海原药材粉碎过 2 号筛, 精密称取粉末 5 g, 加入 70% 的甲醇溶液 50 mL, 超声处理 30 min, 离心 5 min(离心速度 4 000 r·min⁻¹), 精密量取上清液 20 mL 置 50 mL 量瓶中, 用超纯水稀释至刻度, 摇匀。离心 5 min(离心速度 4 000 r·min⁻¹), 精密量取 20 mL 通过免疫亲和柱(先用超纯水活化免疫亲和柱, 再将样品溶液缓慢通过免疫亲和柱, 控制速度为 3 mL·min⁻¹, 待样品溶液流尽, 接触空气数秒, 用 20 mL 超纯水依次洗脱杂质, 待水溶液流尽, 接触空气数秒), 用 1 mL 甲醇分次洗脱, 收集洗脱液置 2 mL 量瓶中, 用水稀释置刻度, 摇匀即得, 备用。

2.4 线性关系考察 取黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 混合对照品储备液, 用甲醇配制成一系列浓度的混合对照品溶液, 分别进样 10 μL 分析, 以浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程和线性范围, 结果显示在各自的浓度范围内线性关系良好, 见表 1。

2.5 检测线与定量限 将混合对照品不断稀释后制得一系列不同质量浓度的溶液, 进样分析后以信噪比 S/N = 3 作为检出限, S/N = 10 作为定量限。黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 的检出限分别为 0.014 4, 0.052 8, 0.015 7, 0.052 0 μg·L⁻¹; 定量限分别为 0.028 8, 0.105 6, 0.031 4, 0.103 9 μg·L⁻¹。

表 1 混合对照品标准曲线、线性范围和检测限量限

黄曲霉毒素	线性方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	定量限/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
AFT G ₂	$Y = 43\ 934X - 1\ 248$	0.144 ~ 28.8	0.014 4	0.028 8
AFT G ₁	$Y = 22\ 101X + 626.88$	0.528 ~ 105.6	0.052 8	0.105 6
AFT B ₂	$Y = 93\ 059X - 12\ 481$	0.157 ~ 31.4	0.015 7	0.031 4
AFT B ₁	$Y = 45\ 346X - 16\ 535$	0.520 ~ 103.9	0.052 0	0.103 9

注: r 均为 0.999 9。

2.6 精密度试验 将黄曲霉毒素对照品溶液(G₂, G₁, B₂, B₁ 质量浓度分别为 1.44, 5.28, 1.57, 5.20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)连续进样 6 次,以各色谱峰的峰面积值计算 RSD,结果表明 G₂, G₁, B₂, B₁ 的精密度 RSD 分别为 0.59%, 0.72%, 1.11%, 0.95% 精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取胖大海阳性药材粉末 5 g,共 6 份,按照 2.3 项下方法进行操作,进样测定。计算 RSD。结果黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 的 RSD 分别为 3.18%, 1.36%, 3.06%, 2.92%, 表明重复性良好。

2.8 回收率试验 精密称取胖大海阴性样品药材粉末 5 g,共 6 份,精密加入混合对照品储备液(G₂, G₁, B₂, B₁ 分别为 0.288, 1.056, 0.314, 1.039 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)0.2 mL,按照 2.3 项下方法进行操作,进样测定。计算平均回收率(表 2),结果表明该方法准确度好,回收率达到定量要求。

表 2 胖大海中各成分加样回收率

黄曲霉毒素	加入量 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量 $/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	平均回收率 $/\%$	RSD $/\%$
AFT G ₂	5.76	5.59	97.06	4.51
AFT G ₁	21.12	21.10	99.93	4.81
AFT B ₂	6.28	6.22	99.05	11.67
AFT B ₁	20.78	20.51	98.72	9.49

2.9 稳定性试验 精密称取胖大海阳性药材粉末 5 g,按照 2.2.2 项下方法进行操作,每隔一定时间进样测定。结果表明在 36 h 内,黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 的 RSD 分别为 2.13%, 2.28%, 3.22%, 3.36%, 基本稳定,不影响定量检测。

2.10 样品测定 测定 6 个批次的胖大海药材样品,按照 2.1 项下高效液相色谱方法检测。检测结果见表 3,其中 4 批样品未检出黄曲霉毒素,另 2 批样品均检测出黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁, 总量分别为 9.613, 10.546 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, 见表 3。

3 讨论

黄曲霉毒素的常规检测主要集中在食品和农产品行业,在中药行业中重视较晚,检测方法较多。前处理对于多组分系统的中药并没有一定的通用方法,不同药物的成分、杂质、pH 有所不同必定会造成

表 3 胖大海药材样品中黄曲霉毒素残留量 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

样品	AFT G ₂	AFT G ₁	AFT B ₂	AFT B ₁	总量
1	0.101	1.818	0.462	7.232	9.613
2	0.156	1.428	0.584	8.378	10.546
3	ND	ND	ND	ND	ND
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	ND	ND	ND

注:ND 表示未检出。

黄曲霉毒素的提取效率有所偏差。本文参考了部分文献所记载的前处理方法并且经过预实验确定较为适用于胖大海药材的前处理方法。经过本实验验证,方法学各项数据都基本能够达到痕量分析的要求,这对于保证定量分析的准确度以及方法的验证和转移都有着一定的意义。

黄曲霉毒素的检测方法主要分为 TLC, Elisa 和 HPLC。HPLC 相对于其他检测仪器和方法而言具有良好的稳定性和准确性^[7]。较于柱后碘衍生化方法^[8],柱后光衍生化方法简单,利用增加黄曲霉毒素 G₁ 和 B₁ 的荧光强度来达到增强检测信号的目的。通用的流动相系统一般是甲醇-乙腈-水三项梯度洗脱系统,而本文所采用的甲醇-水两项等度洗脱系统在简化流动相系统的前提下可以达到定量分析的相关要求,并且具有理想的检出限和定量限。

药典中对药材中黄曲霉毒素限度规定基本为“每 1 000 g 含黄曲霉毒素 B₁ 不得过 5 g, 含黄曲霉毒素 G₂, G₁, B₂, B₁ 的总量不得过 10 g”^[9]。本实验样品中阳性样品虽然检出黄曲霉毒素,并且总量为 10.546 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,依然在限度范围内,并没有超过标准规定,但是从药食两用的角度来看,由于日服用量较为随意,而且并没有相关的服用量约束^[10],很容易造成黄曲霉毒素在体内的蓄积和残留,由于真菌本身的毒性就比较大,理应更加被关注,所以应用于包括胖大海在内的药食两用中药材中黄曲霉毒素的定量分析检测方法,为推动该项目的日常监测和质量控制做出贡献。

[参考文献]

[1] 朱斌,马双成,林瑞超.天然药物及产品真菌毒素研究概况[J].中国药事,2009,23(11):1126.

几种开封观赏菊中总黄酮的研究

杨浩¹, 郭允², 郭猛¹, 袁琦¹, 蒲晓辉^{1*}

(1. 河南大学药学院, 河南 开封 475004; 2. 郑州市卫生学校, 郑州 450005)

[摘要] **目的:** 确定开封观赏菊中总黄酮的最佳提取工艺及其在不同品种与部位中含量的差异。**方法:** 以紫外分光光度法测定总黄酮的含量为指标, 首先对微波法和超声波法提取工艺进行比较, 考察提取时间、料液比、乙醇浓度等实验条件对3种开封观赏菊中总黄酮提取率的影响; 然后采用最佳的提取工艺方法, 考察开封观赏性大立菊的花、茎、叶中总黄酮含量的差异。**结果:** 超声波法提取效率高, 最佳提取工艺条件为乙醇浓度80%, 料液比1:25, 提取时间30 min。总黄酮在20~70 mg·L⁻¹线性关系良好, 平均加样回收率97.5%, RSD 1.81%, 3种菊花中紫悬崖菊花的总黄酮含量最高, 大立菊的总黄酮含量最低; 其中大立菊花中的黄酮含量最高, 叶中的黄酮含量次之, 茎中的黄酮含量最低。**结论:** 超声波法提取效率高, 稳定性好, 可作为观赏菊中总黄酮的最佳提取方法, 紫外分光光度法测定总黄酮的含量测定方法简单快速、准确可靠, 稳定性好, 为观赏性菊的质量控制研究提供更多的参考。

[关键词] 开封观赏菊; 总黄酮; 超声波法; 微波法; 紫外-可见分光光度法

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0078-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150078

Study on Total Flavonoid from Kaifeng Ornamental Chrysanthemum

YANG Hao¹, GUO Yun², GUO Meng¹, YUAN Qi¹, PU Xiao-hui^{1*}

(1. Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Zhengzhou Health School, Zhengzhou 450005, China)

[Abstract] **Objective:** To select the perfect method of extracting technology of total flavonoid from Kaifeng Ornamental chrysanthemum and to find differences of content from different parts. **Method:** Using total

[收稿日期] 20140115(017)

[基金项目] NSFC-河南省人才培养联合基金项目(U1304826)

[第一作者] 杨浩, 学士, 实验师, 从事药物分析及中药分析研究, Tel:0371-23880680, E-mail: yanghao@henu.edu.cn

[通讯作者] *蒲晓辉, 博士, 副教授, 从事药物新剂型及其质量研究, Tel:0371-23880680, E-mail: pgh425@163.com

[2] 王如峰, 安燕南, 袁铭, 等. HPLC 指纹图谱法评价市售胖大海的质量一致性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(17):73.

[3] 吴南. 一种测定食品中黄曲霉毒素快速、经济的薄层色谱法[J]. 国外医学:卫生学分册, 1993(1):97.

[4] 江涛, 柳楨, 郑佳, 等. 总黄曲霉毒素 ELISA 定量检测方法的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2006, 18(4):292.

[5] 梁雄宇, 黄义活, 麦浪. 小微粒色谱柱-高效液相色谱紫外检测器法测定花生中黄曲霉毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(3):701.

[6] 郑荣, 毛丹, 王柯, 等. HPLC 法测定中药中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25

(6):610.

[7] 韦日伟, 杨小丽, 仇峰, 等. 免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生-HPLC-FLD 同时测定甘草中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 和赭曲霉毒素 A 的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(17):2342.

[8] 陈娟, 肖丽恒. 羊乳以及羊奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 和黄曲霉毒素 B₁ 的 HPLC 柱后衍生生化法检测[J]. 中国民族民间医药, 2013, (13):33.

[9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.

[10] 李娜, 高昂, 巩江, 等. 胖大海药学研究概况[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16):9609.

[责任编辑 顾雪竹]