

免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生化法检测中药及染菌中药制剂中间体的黄曲霉毒素

胡一晨, 万丽*, 范成杰, 吕维, 杨芳, 吉琅

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 中央与地方共建中药安全性评价实验室, 成都 611137)

[摘要] **目的:**采用免疫亲和柱净化,结合柱后光化学衍生化的高效液相色谱-荧光检测器建立同步检测常用中药材及染菌中药制剂中间体中的黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的方法。**方法:**采用免疫亲和柱净化洗脱结合柱后光化学衍生手段,建立黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的分析方法,并分别对 14 种中药材及染菌中药制剂中间体进行检测。**结果:**黄曲霉毒素 B₂ 和 G₂, B₁ 和 G₁ 分别在 0.15~6.0 和 0.5~20.0 ng·mL⁻¹ 线性关系良好,方法准确稳定。所选的 14 种中药中川芎和柏子仁检测出黄曲霉毒素 B₁,而以染菌中药川芎所制备的 5 种提取物中均未检出黄曲霉毒素。**结论:**采用此方法检测常用中药材及其制剂中间体中的黄曲霉毒素无干扰性杂峰,结果准确可靠。

[关键词] 提取物; 黄曲霉毒素; 免疫亲和柱; 光化学衍生

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0116-04

Investigation on Detection of Aflatoxins in Chinese Materia Medica and Pharmaceutical Intermediates Microbiological Contaminated by Immunoaffinity Column Clean-up Combined with Post-column Derivatization

HU Yi-chen, WAN Li*, FAN Cheng-jie, LV Wei, YANG Fang, JI Lang

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine; The Ministry of Education Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine; State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources State Laboratory of Chinese Medicine Safety Evaluation, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method to determine aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in Chinese Materia Medica and pharmaceutical intermediates microbiological contaminated by immunoaffinity column clean-up combined with post-column derivatization and HPLC-FD detection. **Method:** Using immunoaffinity column clean-up combined with post-column derivatization, the analytical method to detect aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ was established firstly, and then 14 kind of Chinese Materia Medica and pharmaceutical intermediates microbiological contaminated was detected respectively. **Result:** The method with the great linear concentration range of 0.15-6.0 ng·mL⁻¹ for aflatoxins G₂, B₂, and 0.5-20.0 μg·L⁻¹ for G₁, B₁ respectively, was stable and accurate. As a result, aflatoxins B₁ was detected in Chuanxiong Rhizoma and Platycladi Semen in the 14 kind of Chinese Materia Medica, while there were none of aflatoxins in the pharmaceutical intermediates made by Chuanxiong Rhizoma. **Conclusion:** The method established in this study was specific and accurate for the detection of aflatoxins in

[收稿日期] 20110922(012)

[基金项目] 四川省教育厅科技创新重大培育项目(09ZZ08)

[第一作者] 胡一晨,在读硕士研究生,从事中药有效成分分析研究,Tel:13881913912,E-mail:huyichen0323@126.com

[通讯作者] *万丽,教授,博士生导师,从事药物分析研究,Tel:028-66174295,E-mail:wanni8801@163.com

Chinese Materia Medica and pharmaceutical intermediates.

[Key words] extracts; aflatoxins; immunoaffinity column; photochemical derivative

黄曲霉毒素 B_1, B_2, G_1, G_2 主要是由黄曲霉 *Aspergillus flavus* Link 和寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* Speare 产生的一类化学结构相似的代谢产物^[1],其中黄曲霉毒素 B_1 毒性最强也最为常见。中药材生产、加工、贮藏、运输的过程工序多,耗时长,加之部分药材含油脂多、含糖量大等特性,使得中药材很容易发生霉变而污染黄曲霉毒素。为了保障安全性,WHO、欧盟国家等相继制定了黄曲霉毒素的限量标准^[2-3]。韩国食品药品安全厅(KFDA)发布了有关中药材中黄曲霉毒素 B_1 限量标准和试验方法的公告,要求甘草、决明子、桃仁等9味中药材黄曲霉毒素 B_1 低于 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[4]。

随着黄曲霉毒素限量的日益严格,对检测方法在灵敏度、准确度和自动化等方面提出了新的要求。以前大多采用硅胶柱、 C_{18} 柱或液-液分配技术净化样品,随着生物技术的发展,越来越多的采用免疫亲和柱净化样品。免疫亲和柱(immuoaffinity column, IAC)^[5]操作简便、溶剂消耗少,特异性高、净化效果好,已在国内外得到了广泛的应用。目前,我国卫生部也已经制定了部分中药材中黄曲霉毒素含量限度的标准,但目前未见对染毒中药材的制剂过程传递性进行研究,本文旨在通过考察染菌中药的制剂中间体,发现黄曲霉毒素的制剂传递性,为成方制剂的安全性限量检查标准的制定提供依据。

本文将采用免疫亲和柱净化,结合柱后光化学衍生化的高效液相色谱-荧光检测器检测常用中药材及染菌中药制剂中间体中的黄曲霉毒素 B_1, B_2, G_1, G_2 ,建立常用中药及中药制剂中间体中黄曲霉毒素的检测方法,考察中药材中黄曲霉毒素的制剂传递性。

1 仪器和试剂

Agilent Technologies 1200 型高效液相色谱仪,荧光检测器 G1321A FLD(美国 Agilent),PHRED 光化学反应器(美国 AURA 公司),UPT-E-10T 型优普 UPT 系列超纯水机(成都超纯科技),Afla Test®P 免疫亲和柱(美国 VICAM 公司)。黄曲霉毒素对照品购自 SUPELCO,纯度 B_1 ($\geq 99.0\%$), B_2 ($\geq 99.0\%$), G_1 ($\geq 99.0\%$), G_2 ($\geq 99.9\%$);甲醇为色谱纯, Fisher 公司。所用药材自成都市中药材市场及川产道地药材产区购得。

2 方法与结果

2.1 供试品的制备及检测条件的确定

2.1.1 色谱条件 Agilent Eclipse XDB- C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),以甲醇-水(45:55)为流动相,流速 $0.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温 $30 \text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $20 \mu\text{L}$,采用柱后光化学衍生,以荧光检测器检测,激发波长 360 nm ,发射波长 440 nm 。

2.1.2 混合对照品储备液的配制 精密吸取各黄曲霉毒素对照品,加甲醇稀释制成 B_1 为 $19.959 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, B_2 为 $5.995 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, G_1 为 $19.915 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, G_2 为 $6.015 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照储备液。

2.1.3 供试品溶液的制备 取供试品粉末约 5 g (过二号筛),精密称定,置于均质瓶中,精密加入 70% 甲醇 25 mL ,超声 5 min ,用 Whatman 玻璃纤维滤纸过滤,收集续滤液于锥形瓶中,备用。

2.1.4 免疫亲和柱净化 精密量取供试液 10 mL ,置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜($0.45 \mu\text{m}$)滤过,量取续滤液 25.0 mL ,通过免疫亲和柱(Afla Test®P),流速 $1 \text{ d}\cdot\text{s}^{-1}$,用水 20 mL 洗脱,洗脱液弃去,使空气进入柱子,将水挤出柱子,再用 1 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,置氮吹仪上浓缩至近干,并用 50% 甲醇溶液稀释至 1 mL ,摇匀,即得。

2.1.5 衍生化方法的选择 高效液相色谱法结合荧光检测器检测黄曲霉毒素是国际上现流行的方法。由于黄曲霉毒素 B_1 和 G_1 接触水以后,容易发生荧光的淬灭现象,所以我们可以采用光化学衍生法使黄曲霉 B_1 和 G_1 的荧光性增强。实验证明,该方法的衍生化效果十分理想,操作简单,灵敏度高,见图 1~3。

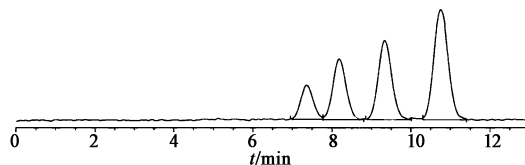
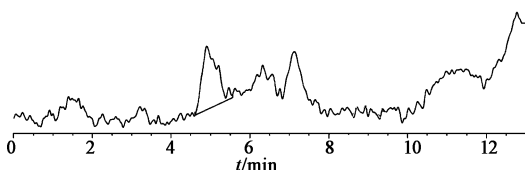
图1 黄曲霉毒素 G_2, G_1, B_2, B_1 混合对照品 HPLC

图2 未染菌川芎药材经光化学衍生后 HPLC

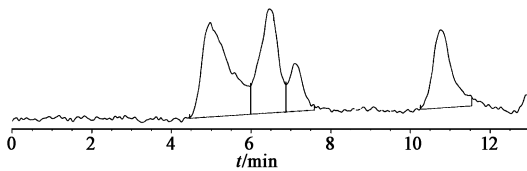


图 3 川芎药材经光化学衍生后色谱

2.2 方法学考察

2.2.1 最低检出限 将 2.1.2 项下的黄曲霉毒素混合对照品储备液稀释至较低浓度,根据信噪比 $S/N \geq 3$ 时相应的浓度确定被测物质的最低检出限, B_2 和 G_2 的最低检出限为 $0.06 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$, B_1 和 G_1 的最低检出限为 $0.20 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2.2 线性关系 将对照品储备液稀释成不同的浓度,分别进样 $20 \mu\text{L}$,获得的色谱峰峰面积(Y)对黄曲霉毒素的绝对值(X)做回归,得到标准曲线,见表 1。

2.2.3 日内精密性试验 将 2.1.2 项下的黄曲霉毒素混合对照品储备液连续进样 6 次,每次 $20 \mu\text{L}$,计算各化合物的峰面积得,黄曲霉毒素 G_2, G_1, B_2, B_1 的 RSD 分别为 1.13%, 1.48%, 1.06%, 1.37%,

结果表明,其日内精密性较好。

表 1 Aflatoxins G_2, G_1, B_2, B_1 线性关系

名称	线性范围/ ng	标准曲线	r
G_2	0.15 ~ 6.0	$Y = 0.7557X - 0.0081$	0.9994
G_1	0.5 ~ 20.0	$Y = 0.3874X + 0.0337$	0.9997
B_2	0.15 ~ 6.0	$Y = 2.0354X - 0.0002$	0.9999
B_1	0.5 ~ 20.0	$Y = 0.9012X + 0.0152$	0.9999

2.2.4 日间精密性试验 将 2.1.2 项下的黄曲霉毒素混合对照品储备液连续进样 6 d,每天进样 1 次,每次 $20 \mu\text{L}$,计算各化合物的峰面积得,黄曲霉毒素 G_2, G_1, B_2, B_1 的 RSD 分别为 2.89%, 2.54%, 3.05%, 2.46%,结果表明,其日间精密性较好。

2.2.5 回收率试验 选用半夏药材,且半夏经过免疫亲和柱处理后,进 HPLC 检测无任何峰出现,对添加的对照品检测无干扰,故可用来做回收率试验。取供试品粉末约 2.5 g(过二号筛)共 9 份,精密称定,分别添加 3 个水平的混合对照品,按 2.1.3, 2.1.4 制备供试品溶液,按样品含量测定方法,进行测定,结果见表 2。结果表明,该方法准确度较好。

表 2 免疫亲和柱净化光化学衍生化检测黄曲霉毒素回收率试验

黄曲霉毒素 B_1				黄曲霉毒素 B_2				黄曲霉毒素 G_1				黄曲霉毒素 G_2			
加入量 / ng	测得量 / ng	回收率 /%	RSD /%	加入量 / ng	测得量 / ng	回收率 /%	RSD /%	加入量 / ng	测得量 / ng	回收率 /%	RSD /%	加入量 / ng	测得量 / ng	回收率 /%	RSD /%
19.959	18.942	94.90	3.15	5.995	5.703	95.13	2.62	19.915	19.032	95.57	3.71	6.015	5.831	96.94	3.08
19.959	19.238	96.39		5.995	5.618	93.71		19.915	19.190	96.36		6.015	5.452	90.64	
19.959	19.070	95.55		5.995	5.783	96.46		19.915	19.238	96.60		6.015	5.648	93.90	
9.980	9.177	91.95		2.998	2.898	96.66		9.958	9.058	90.96		3.008	2.855	94.91	
9.980	9.351	93.70		2.998	2.683	89.49		9.958	9.421	94.61		3.008	2.810	93.42	
9.980	9.495	95.14		2.998	2.825	94.23		9.958	9.329	93.68		3.008	2.729	90.72	
4.990	4.628	92.75		1.499	1.427	95.20		4.979	4.627	92.93		1.504	1.322	87.90	
4.990	4.453	89.24		1.499	1.384	92.33		4.979	4.513	90.64		1.504	1.370	91.09	
4.990	4.382	87.82		1.499	1.462	97.53		4.979	4.273	85.82		1.504	1.350	89.76	

2.3 药材的检测 有的药材经过免疫亲和柱前处理后,经 HPLC 测定无任何峰出现,用“×”表示。有的药材经过免疫亲和柱前处理后,经 HPLC 测定有色谱峰出现,但这些色谱峰对检测的黄曲霉毒素色谱峰无干扰,用“-”表示。见表 3,结果表明,所采集的 14 种药材中唯有川芎、柏子仁中检出含有黄曲霉毒素 B_1 。

2.4 染菌中药提取物中黄曲霉毒素的检测 通过对以上 14 种药材中黄曲霉毒素的检测,选用染菌中药川芎为代表,考察药材中黄曲霉毒素在制剂过程

的传递性。根据《中国药典》2010 年版一部中含川芎的成分制剂中川芎的处理方法制备染菌药材的制剂中间体样品,大致共包括以下几种:

川芎提取挥发油,取挥发油 0.5 mL ,按 2.1.3 中“精密加入甲醇-水(7:3)的溶液 75 mL ”起制备供试品溶液,净化过程同 2.1.4。

收集提取挥发油后的药渣,加水煎煮 2 次,第一次 2 h,第二次 1.5 h,滤液合并,与蒸馏后的水溶液合并,浓缩至相对密度为 $1.25 \sim 1.30(60 \text{ }^\circ\text{C})$, $80 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ 烘干。精密称定上述烘干后的干膏 5 g ,按

表3 药材中黄曲霉毒素 B₁ 的检测 ng·g⁻¹

药材	结果	药材	结果
白芷	-	川芎	B ₁ :2.547
麦冬	×	半夏	×
天麻	×	莱菔子	×
砂仁	-	郁李仁	-
柏子仁	B ₁ :1.643	苏子	×
酸枣仁	-	葶苈子	×
白芥子	×	沙苑子	×

2.1.3 中“精密加入甲醇-水(7:3)的溶液 75 mL”起制备供试品溶液,净化过程同 2.1.4。

川芎药材加水煎煮 2 次,合并滤液,浓缩至相对密度为 1.15(60 ℃),加入 3 倍量的 90% 乙醇,取上清,回收至无醇味,烘干。精密称定上述烘干后的干膏 5 g,按 2.1.3 中“精密加入甲醇-水(7:3)的溶液 75 mL”起制备供试品溶液,净化过程同 2.1.4。

川芎药材用 70% 乙醇渗漉,减压浓缩。精密称定上述烘干后的干膏 5 g,按 2.1.3 中“精密加入甲醇-水(7:3)的溶液 75 mL”起制备供试品溶液,净化过程同 2.1.4。

川芎药材用 75% 乙醇提 2 次,每次 1 h,浓缩成干膏。精密称定上述烘干后的干膏 5 g,按 2.1.3 中“精密加入甲醇-水(7:3)的溶液 75 mL”起制备供试品溶液,净化过程同 2.1.4。

染菌中药川芎的制剂中间体中黄曲霉毒素的检测结果表明,在 5 种中间体制备方法所得制剂中间体中均未检测出黄曲霉毒素。

3 结论与讨论

笔者在前期研究中发现,目前国内外对药材及中成药中黄曲霉毒素的检测已逐渐重视,杜平华等^[6]检测了 121 个品种 155 批不同剂型、不同品种的中药材及中成药中黄曲霉毒素 B₁ 的含量,结果中

药材中阳性率为 37.8%;含豆豉、曲类制剂阳性率为 60.7%,最高含量达 140 ng·g⁻¹;而片剂经过预处理,加热烘干等过程,32 个品种 37 批次均未检出黄曲霉毒素 B₁。但是现代研究却忽略了对中药材中黄曲霉毒素的制剂传递性考察。本研究中发现制剂中间体中均未能检出黄曲霉毒素,可能是由于在提取挥发油、水煎煮及醇提过程中均经过长期加热等高温前处理过程,而随着煎煮及渗漉过程,势必影响药液的 pH,黄曲霉毒素遇碱能迅速分解,因此制剂中间体中未能检出毒素。提示中药材在制剂过程中,若经过加热等前处理过程可能会造成黄曲霉毒素分解。

[参考文献]

- [1] 陈建民,张雪辉,杨美华,等. 中药中黄曲霉毒素检测概况[J]. 中草药,2006,37(3):463.
- [2] Trucksess M W, Kurtzman M A, Tournas V H, et al. Occurrence of aflatoxins and fumonisins in *Incaparina* form Guatemala [J]. *Food Addit Contam*, 2002, 19(7): 671.
- [3] 苏福荣,王松雪,孙辉,等. 国内外粮食中真菌毒素限量标准制定的现状与分析[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(6): 57.
- [4] 辽宁出入境检验检疫局网站. 关于韩国制订中药材中二氧化硫和黄曲霉毒素相关标准事宜的通知[EB/OL]. (2008-04-16) [2010-04-01]. http://www.lnciq.gov.cn/ywpd/zwjy/ywbl/czjy/200804/t20080416_4539.htm.
- [5] Zhang X H, Liu H L, Chen J M. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for aflatoxins in medicinal herbs and plant extracts[J]. *J Chromatographic S*, 2005, 43(1):47.
- [6] 杜平华,杨晓峰. 间接竞争酶联免疫吸附法分析检测中药中黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 药物分析杂志, 1995,15(2):34.

[责任编辑 蔡仲德]