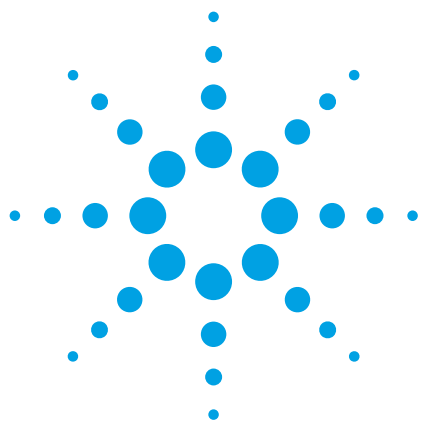




使用柱后光化学衍生 - 高效液相色谱 - 荧光检测法测定酸枣仁和陈皮中的四种黄曲霉毒素

应用简报

制药行业

作者

杨新磊

安捷伦科技（中国）有限公司

摘要

本文介绍了使用 Agilent 1260 Infinity 四元高效液相色谱 - 荧光检测器系统，通过柱后光化学衍生的方式建立了酸枣仁和陈皮中黄曲霉毒素污染量的测定方法。该方法线性范围好、灵敏度高，对黄曲霉毒素 B1 的定量限可达 $0.33 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，远低于 2015 年版《中国药典》关于中药材、饮片及制剂中黄曲霉毒素污染量的限定值。相比于柱后碘化学衍生，光化学衍生成本低廉、操作简单，更适合于中药材及相关产品中黄曲霉毒素的快速、有效测定。

前言

中药材生产、加工、贮藏、运输的过程复杂，耗时长，加之部分药材具有含油脂多、含糖量大等特性，使得中药材很容易发生霉变而产生黄曲霉毒素¹。黄曲霉毒素的毒害巨大，其毒性相当于氰化钾的 10 倍，砒霜的 68 倍。常见的黄曲霉毒素主要为 B1、B2、G1 和 G2。2015 年版《中国药典》较之 2010 年版对于黄曲霉毒素的控制更加严格，增加了十多种中药材及饮片中黄曲霉毒素污染量的测定，明确规定药材中 B1 的残留量不得超过 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，B1、B2、G1 和 G2 的残留总量不得超过 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ²。

关于黄曲霉毒素的测定有很多方法，如液相色谱 - 荧光检测法、液相色谱 - 质谱联用法³、酶联免疫吸附法和薄层色谱法等。为防止黄曲霉毒素 B1 和 G1 的荧光淬灭现象，液相色谱 - 荧光检测时需进行衍生后方可测定，常见的衍生方法有柱后碘化学衍生、柱后电化学（溴）衍生⁴、柱前三氟乙酸衍生、柱后光化学衍生⁵等方法，每种方法都有各自的优缺点。考虑到购买成本及操作简易性问题，对于大部分质量控制部门而言，柱后光化学衍生 - 液相色谱 - 荧光检测法最为合适。



Agilent Technologies

实验部分

仪器

Agilent 1260 Infinity 四元高效液相色谱系统，含有四元泵 (G1311B)、自动进样器 (G1329B)、柱温箱 (G1316A)、荧光检测器 (G1321B)、柱后光化学衍生装置 (LC tech) 和 OpenLab ChemStation C0105 版本软件。自动进样器至柱温箱加热模块采用 0.25 mm 内径 × 320 mm 的不锈钢毛细管（部件号：79835-87638）进行连接。Afla Test[®]P 免疫亲和柱购自 VICAM 公司。

试剂

乙腈、甲醇为色谱级，购自 Merck。水为 MilliQ 纯化水。黄曲霉毒素混合标准品购自 Sigma-Aldrich 公司。

供试品和对照品制备

混合对照品溶液制备（参考药典方法）

精密量取黄曲霉毒素混合标准品（黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 标示浓度分别为 1.0、0.3、1.0、0.3 µg/mL）0.5 mL，置于 10 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，作为储备液。精密量取储备液 1 mL，置于 25 mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得混合对照品溶液，黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 浓度分别为 2、0.6、2、0.6 ng/mL。

供试品溶液制备（参考药典方法）

取供试品粉末约 15 g（过二号筛），精密称定，加入氯化钠 3 g，置于均质瓶中，精密加入 70% 甲醇溶液 75 mL，高速搅拌 2 分钟（搅拌速度大于 11000 转/分），离心 5 分钟（离心速度 2500 转/分），精密量取上清液 15 mL，置于 50 mL 量瓶中，用水稀释

至刻度，摇匀，用微孔滤膜 (0.45 µm) 过滤，量取续滤液 20 mL，通过免疫亲和柱，流速每分钟 3 mL，用水 20 mL 洗脱，洗脱液弃去，使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置于 2 mL 量瓶中，并用甲醇稀释至刻度，摇匀即得。以黄曲霉毒素 B1 限量不超过 5 µg/kg 换算，该供试品溶液中 B1 的浓度不得超过 3 ng/mL。

液相色谱条件

色谱柱	Agilent Zorbax Plus C18, 4.6 × 150 mm × 5 µm
柱温	30 °C
检测器*	激发波长: 360 nm; 发射波长: 450 nm; 增益: 12; 采样频率: 2.31 Hz
流动相	水/甲醇/乙腈 = 60/30/10 (体积比)
流速	1.5 mL/min
进样量	5 - 25 µL
运行时间	15 min

*不同检测器可能需要调节乘积因子，本实验所用乘积因子为 10

结果与讨论

系统适用性

按上述液相色谱条件，取黄曲霉毒素混合对照品溶液 5 µL 进样，所得色谱图如图 1 所示。可以看出最低上样量 5 µL 时，各物质信噪比均大于 10，相邻两峰分离度均大于 1.5，完全满足 2015 年版《中国药典》系统适用性要求。

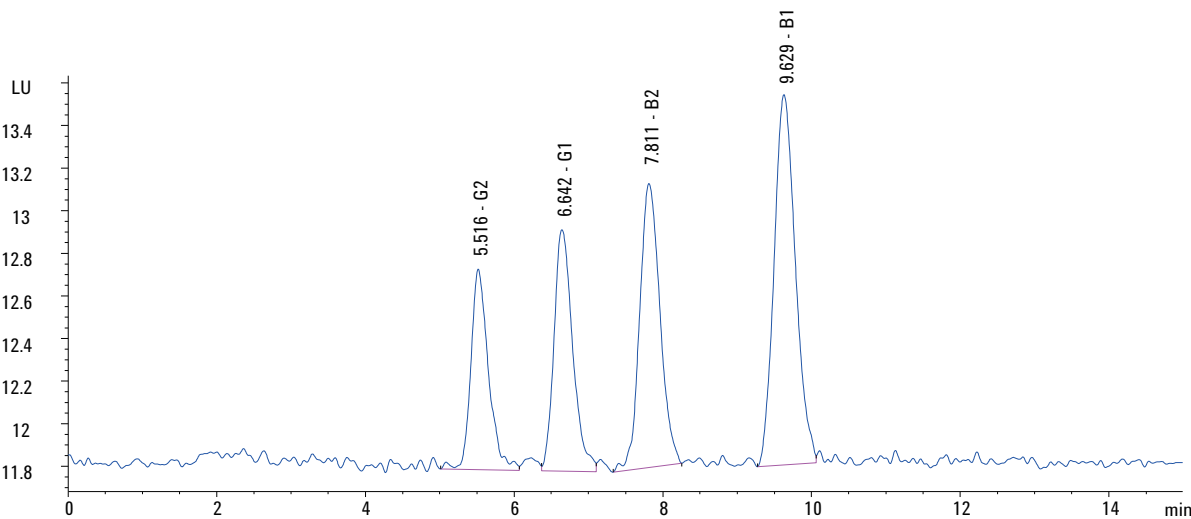


图 1. 黄曲霉毒素混合对照品溶液色谱图（进样量：5 µL），出峰顺序为 G2、G1、B2、B1

线性范围、重复性和定量限

按照 2015 年版《中国药典》要求，分别取黄曲霉毒素混合对照品溶液 5、10、15、20、25 μL 进样，得到各黄曲霉毒素标准曲线（见图 2），其线性相关系数均大于 0.9996。以 10 μL 黄曲霉毒素进样量考察方法重复性，连续 6 针进样，各黄曲霉毒素保留时间 RSD < 0.1%，峰面积 RSD < 0.5%。以 S/N = 10 计算，黄曲霉毒素 B1 的定量限为 0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

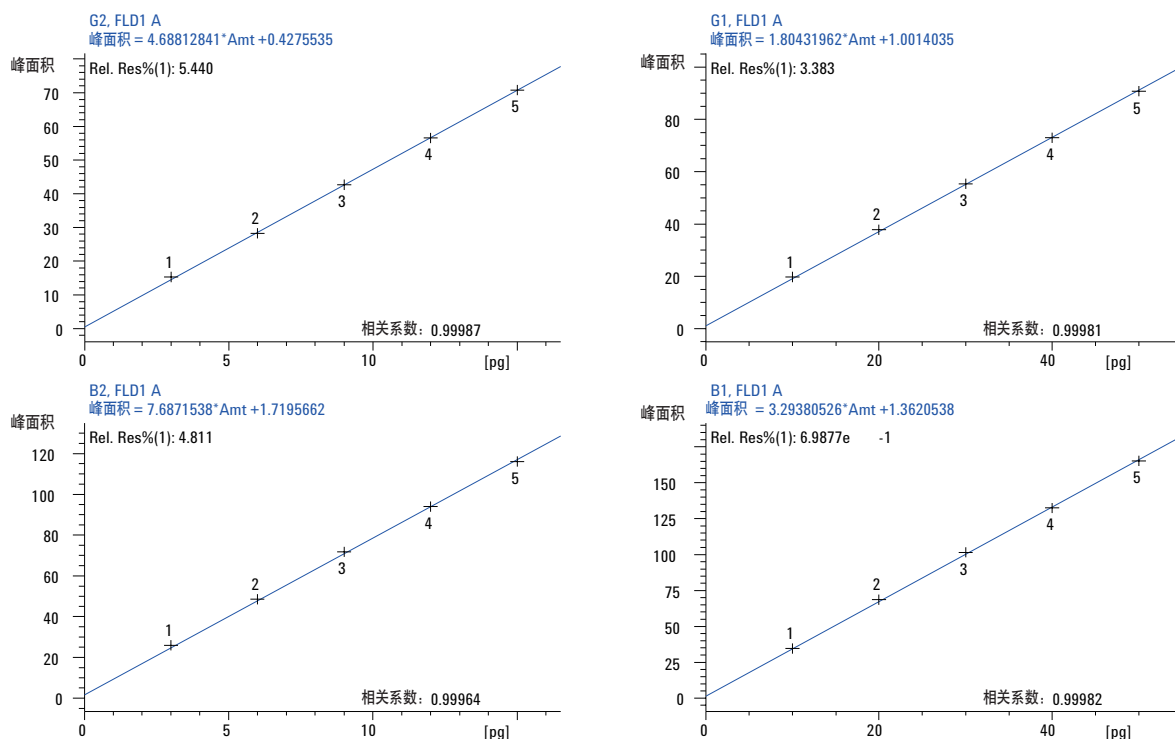


图 2. 黄曲霉毒素标准曲线

样品测定结果

按上述供试品溶液制备方法和液相色谱分析方法，对市售酸枣仁和陈皮中的黄曲霉毒素进行了测定，色谱图如图 3 所示。从结果看出，酸枣仁受黄曲霉毒素污染严重，B1 污染量达到 35.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，B2 污染量达到 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，G1 污染量达到 0.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，G2 的污染量低于检出限；陈皮样品中各黄曲霉毒素污染量均低于方法检出限（未检出）。

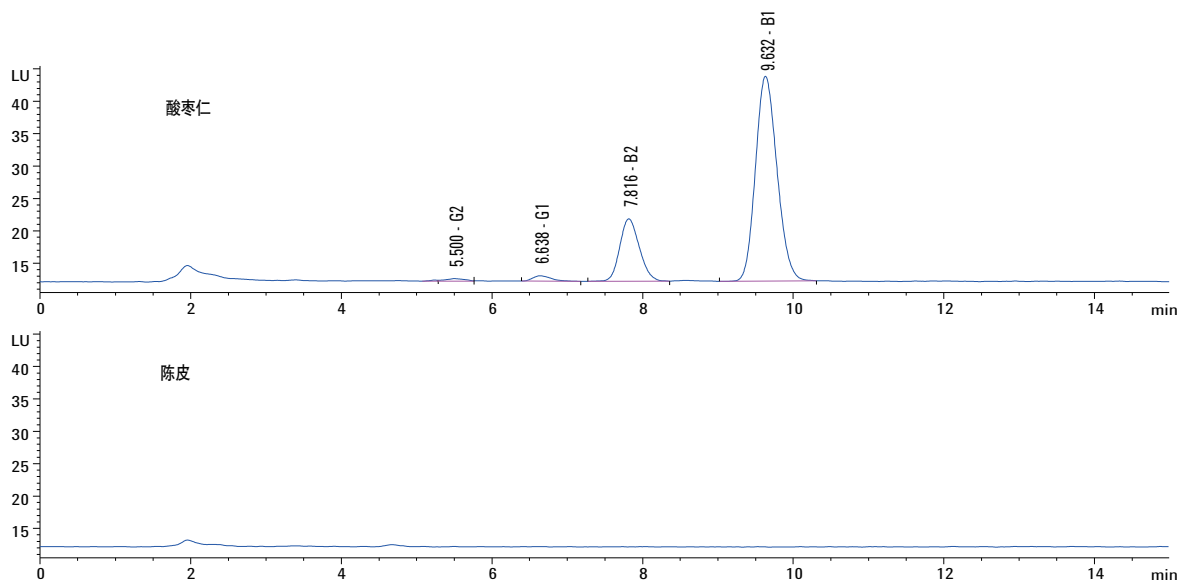


图 3. 酸枣仁和陈皮中黄曲霉毒素的测定谱图

结论

随着对中药安全性控制的进一步加强，2015 年版《中国药典》中大幅增加了必须进行黄曲霉毒素污染量测定的中药品种。在众多黄曲霉毒素测定方法中，柱后光化学衍生 - 高效液相色谱 - 荧光检测法操作最简单、成本较低廉。本文参考 2015 年版《中国药典》，采用 Agilent 1260 Infinity 四元高效液相色谱 - 荧光检测器系统，配置柱后光化学衍生装置，建立了详细的黄曲霉毒素测定方法。结果显示该方法可完全满足《中国药典》中关于黄曲霉毒素的系统适用性要求，可用于中药材中黄曲霉毒素的快速、准确测定。该方法线性范围好、灵敏度高，对黄曲霉毒素 B1 的定量限可达 0.33 µg/kg，远低于《中国药典》关于中药材、饮片及制剂中黄曲霉毒素污染量的限定值。

参考文献

1. 胡一晨、万丽、范成杰、吕维、杨芳、吉琅。免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生法检测中药及染菌中药制剂中间体的黄曲霉毒素，中国实验方剂学杂志，2012，18(10): 116-119
2. 《中国药典》第四部，2015
3. 韩深、刘莹、吕美玲、李建中、王金花。免疫亲和萃取-超高效液相色谱-串联质谱法分离测定中成药及中药材中的 5 种黄曲霉毒素，色谱，2011，29(7): 613-617
4. 杨新磊、安蓉。免疫亲和柱净化-柱后电化学衍生-HPLC 法测定玉米及花生酱中的 4 种黄曲霉毒素 B1、B2、G1 和 G2，安捷伦应用文集，5990-9125CHCN
5. 肖尧、安蓉。使用 Agilent 1260 Infinity 液相色谱和柱后光化学衍生方法同时测定四种黄曲霉毒素，安捷伦应用文集，5991-1565CHCN

www.agilent.com

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015
2015 年 8 月 14 日，中国印刷
5991-6179CHCN



Agilent Technologies