

Application News

No. L500

高效液相色谱
 High Performance Liquid Chromatography

使用 Nexera-i 和 RF-20A_{XS} 分析葛根汤中的黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂

Analysis of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in Kakkonto Using Nexera-i and RF-20A_{XS}

黄曲霉毒素作为一种霉菌毒素，具有很强的急性毒性和致癌性。日本的相关部门规定，对用天然植物制造的生药以及以生药为原料的制剂需要检查黄曲霉毒素。并且，将 JP 论坛上刊登的《生药以及生药制剂的黄曲霉毒素试验法》（截至 2015 年 7 月）作为日本药典第十七次修订草案。在本试验法草案中，将总黄曲霉毒素的标准（黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的总和）规定为小于或等于 10 μg/kg。

本文向您介绍参考日本药典第十七次修订草案对复合生药之一葛根汤进行分析的示例。在该草案中，规定使用三氟醋酸（TFA）对黄曲霉毒素进行衍生化处理，使用荧光检测器进行分析的方法。本应用报告还为您介绍在该方法的基础上，不进行衍生化处理而直接进行荧光检测的方法。

另外，世界各国对食品中的黄曲霉毒素均设有限量标准。在日本也颁布了限量标准⁽¹⁾以及试验通知⁽²⁾。有关通过该试验法分析食品中的黄曲霉毒素的分析示例，请参考已发布的应用报告 L351、L422、L428、L430 和 L435。

■ 使用 TFA 衍生化处理进行分析

Analysis with Trifluoroacetic Acid Derivatization

众所周知，极性溶剂中的黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 与黄曲霉毒素 B₂ 和 G₂ 相比，荧光强度要低。因此，通过基于光化学反应器的衍生化法、基于 TFA 的衍生化法，以及电化学衍生化法等方法可以增加荧光强度。在本次分析中，使用了试验法草案中记载的 TFA 衍生化法。TFA 衍生化反应通常被称为柱前衍生化，对注入到 HPLC 前的待测样品进行衍生化处理。图 1 为各种黄曲霉毒素的结构式以及 TFA 衍生化后的结构式。

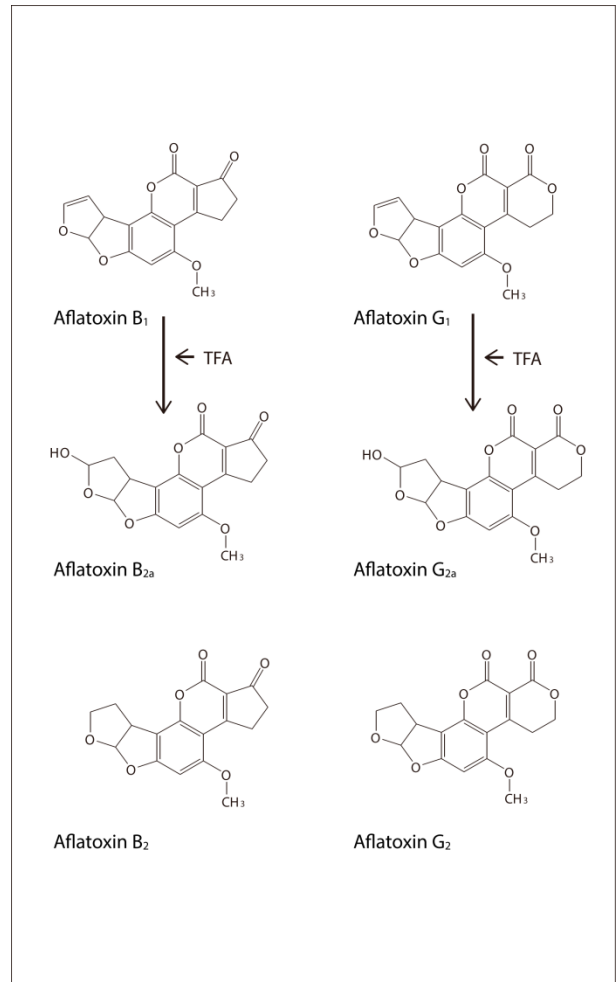


图 1 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 以及通过三氟醋酸进行衍生化 (B_{2a}、G_{2a}) 的结构式
 Structures of Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ and Aflatoxin Structures After TFA Derivatization (B_{2a} and G_{2a})

向复合生药葛根汤中添加黄曲霉毒素标准溶液并进行分析。

图 2 为预处理步骤。此分析按照日本药典第十七次修订草案中的规定进行。使用免疫亲和柱“AFLAKING”（堀场制作所制造）以去除杂质。为了使生药样品中的各种黄曲霉毒素分别达到 0.25 µg/kg（总量 1 µg/kg），添加了黄曲霉毒素标准溶液，使该浓度值达到草案规定的标准浓度值的 1/10。

图 3 为葛根汤的分析结果；表 1 为分析条件。图 3 中还显示了未添加黄曲霉毒素标准溶液样品的分析结果，以供参考。因为在洗脱黄曲霉毒素 B₂ 后还确认到杂质峰，因此增加了色谱柱清洗工序。有关标准溶液的分析结果，请参考已发布的应用报告 L428。

表 1 HPLC 分析条件
HPLC Analytical Conditions

仪器	: Nexera-i
色谱柱	: Shim-pack FC-ODS (150 mm L × 4.6 mm I.D., 3 µm)
流动相	: A:水/甲醇/乙腈=6/3/1 (v/v/v) : B:乙腈
时间程序	: A.Conc/B.Conc = 100/0 (0.00-15.00 min)→ 10/90 (16.00-23.0 min)→ 100/0 (24.00-34.00 min)
流速	: 0.80 mL/min
柱温	: 40 °C
进样体积	: 20 µL
检测器	: RF-20AXS, Ex at 365 nm, Em.at 450 nm
池温	: 25 °C

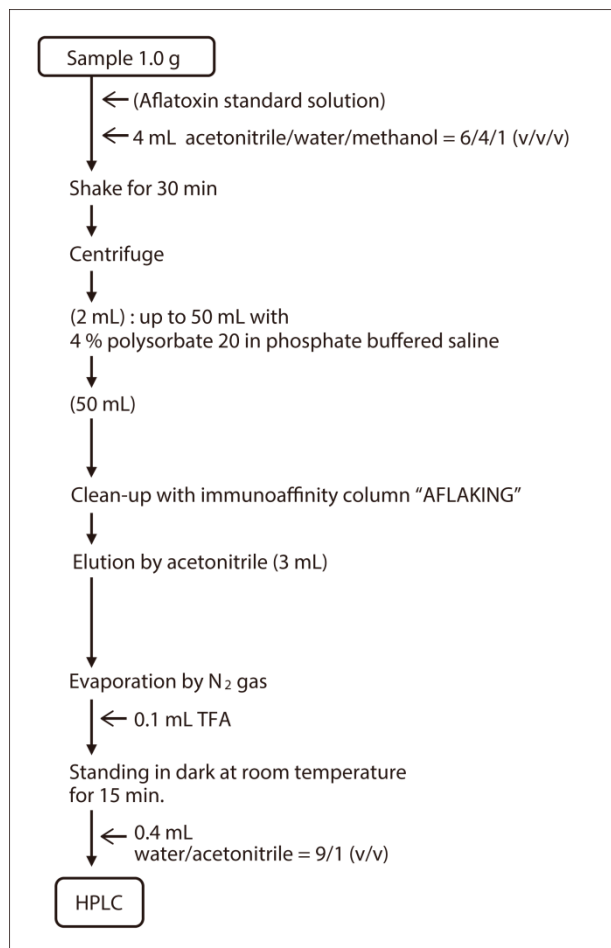


图 2 预处理步骤
Pretreatment Procedure

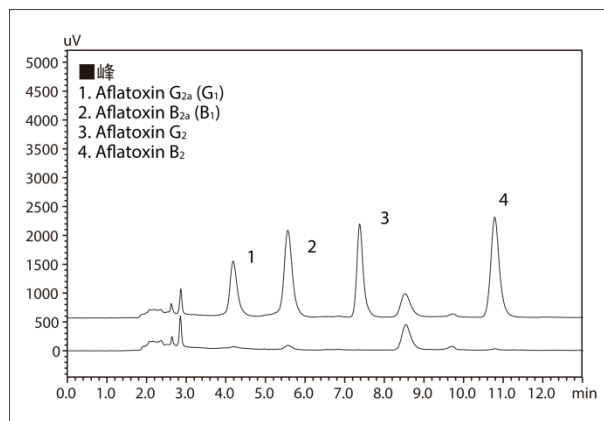


图 3 葛根汤 TFA 衍生化 HPLC 条件
(上方: 添加有标准溶液, 下方: 未添加)
Chromatogram of Kakkonto After TFA Derivatization
(Upper: With Standard Solution, Lower: Without Standard Solution)

■ 通过直接检测进行分析

Analysis by Direct Detection

虽然黄曲霉毒素 B₁ 和 G₁ 的荧光强度较低,但是如果使用高灵敏度的荧光检测器 RF-20Axs, 则无需进行衍生化即可直接进行检测。在此, 我们使用 RF-20Axs 进行直接检测, 同时, 还利用高性能色谱柱 Shim-pack XR-ODS II 以缩短分析时间。图 4 为不进行 TFA 衍生化处理而直接分析黄曲霉毒素标准溶液的结果 (各种黄曲霉毒素浓度: 20 µg/L); 图 5 为低浓度下的分析结果 (各种黄曲霉毒素浓度: 0.1 µg/L); 表 2 为分析条件。0.1 µg/L 的黄曲霉毒素 B₁ 的峰面积相对标准偏差 (n=6) 为 2.6%。由此可知, 只要使用 RF-20Axs, 无需通过 TFA 进行衍生化也能得到高灵敏度。而且, 与 TFA 衍生化相比, 可缩短大约 1/3 的分析时间。图 6 为各种黄曲霉毒素浓度在 0.1~20 µg/L 范围的标准曲线。由图可知, 4 种成分的相关系数均在 R²=0.9999 以上, 表明线性良好。

表 2 UHPLC 分析条件
UHPLC Analytical Conditions

仪器	: Nexera-i
色谱柱	: Shim-pack XR-ODSII (100 mm L × 3.0 mm I.D., 2.2 µm)
流动相	: A;水 : B;甲醇 : C;乙腈
时间程序	: A.Conc/B.Conc/C.Conc = 65/30/5 (0.00 - 5.50 min)→ 15/5/80 (5.51-7.0 min)→20/80/0 (7.01-9.00 min)→ 65/35/5 (9.01-12.00 min)
流速	: 1.00 mL/min
柱温	: 50 °C
进样体积	: 10 µL

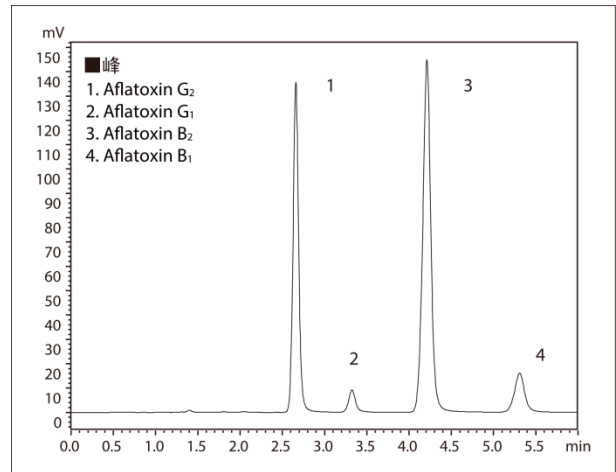


图 4 黄曲霉毒素标准溶液的色谱图—直接检测 UHPLC 条件
(各 20 µg/L、10 µL)
Chromatogram of Aflatoxin Standard Solution
by Direct Detection - UHPLC Analysis (each 20 µg/L, 10 µL)

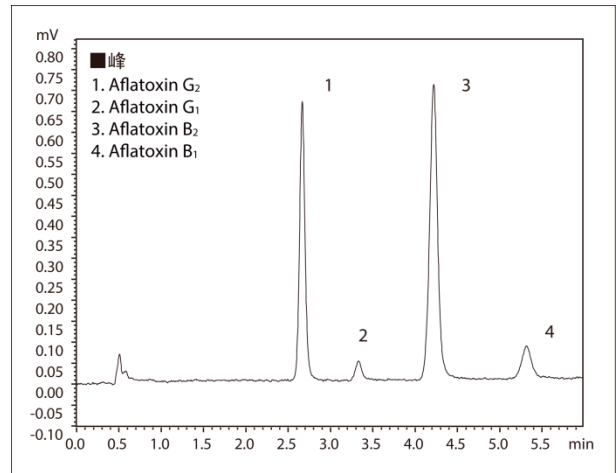


图 5 黄曲霉毒素标准溶液的色谱图—直接检测 UHPLC 条件
(各 0.1 µg/L、10 µL)
Chromatogram of Aflatoxin Standard Solution
by Direct Detection - UHPLC Analysis (each 0.1 µg/L, 10 µL)

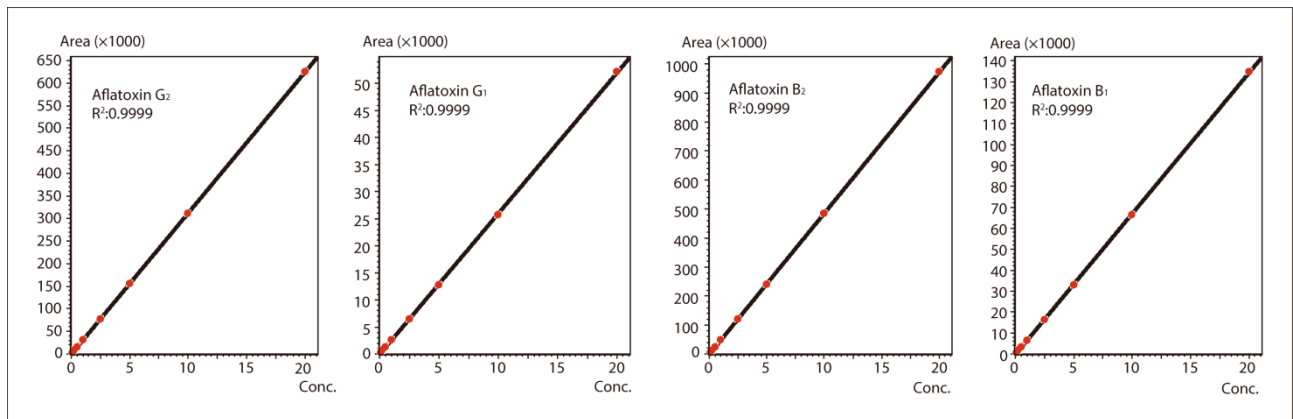


图 6 黄曲霉毒素标准溶液的标准曲线—直接检测 (各 0.1~20 µg/L、10 µL)
Aflatoxin Standard Solution Calibration Curves - Direct Detection (each 0.1 to 20 µg/L, 10 µL)

与 TFA 衍生化的步骤相同，向复合生药葛根汤中添加黄曲霉毒素标准溶液后进行分析。图 7 为预处理步骤。此处也同样使用免疫亲和柱 AFLAKING（堀场制作所制造）以去除杂质。精制前的预处理步骤与图 2 相同。添加黄曲霉毒素标准溶液后，使生药样品中的各种黄曲霉毒素分别达到 0.25 μg/kg（总量 1 μg/kg），使该浓度值达到草案规定的标准浓度值的 1/10。

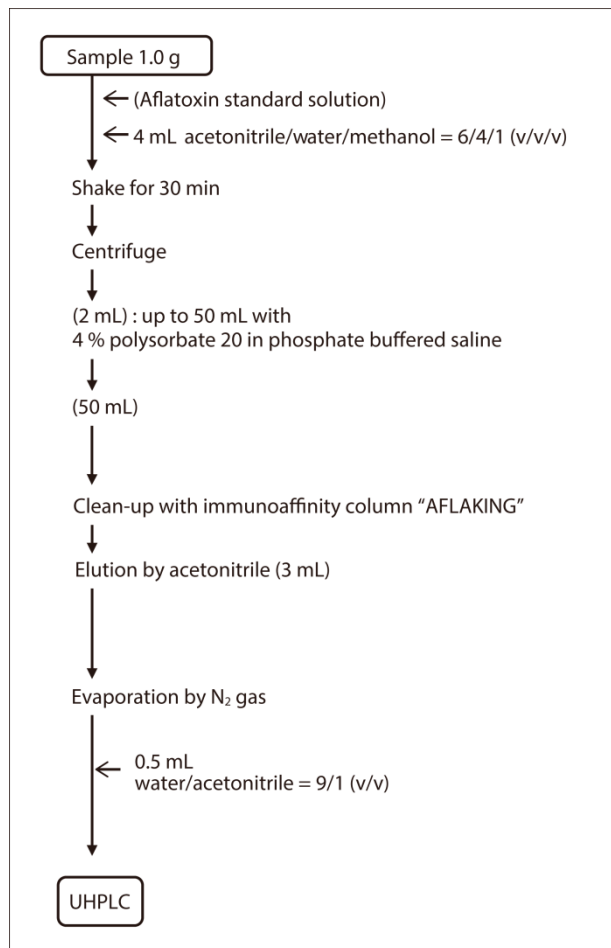


图 7 预处理步骤
Pretreatment Procedure

图 8 为葛根汤的分析结果；表 2 为分析条件。由此可知，即使使用了免疫亲和柱，在黄曲霉毒素 G₁ 和 B₂ 之间仍然存在杂质峰，但与黄曲霉毒素峰高度分离。而且，即使增加了清洗工序，整个分析过程也仅需要 12 分钟。

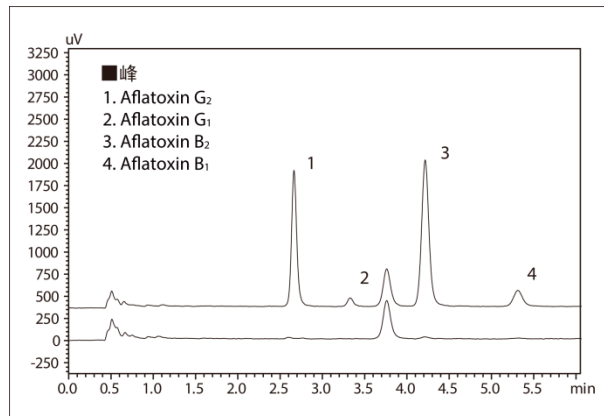


图 8 在 UHPLC 条件下对葛根汤进行直接检测的结果
(上方：添加有标准溶液，下方：未添加)
Chromatogram of Kakkonto by Direct Detection—UHPLC Analysis
(Upper: With Standard Solution, Lower: Without Standard Solution)

- * 黄曲霉毒素具有被紫外线分解以及在水溶液中吸附于玻璃上的特性。本次分析中使用的样品瓶为经清洗的低吸附褐色玻璃样品瓶。
- (1) 《关于含有黄曲霉毒素的食品的处理》（2011 年 3 月 31 日，日本食安发 0331 第 5 号）
 - (2) 《关于总黄曲霉毒素的试验法》（2011 年 8 月 16 日，日本食安发 0816 第 2 号）