

# Essentia 黄曲霉毒素分析系统测定中药材莲子中的黄曲霉毒素作业指导书 (SOP)

标准号：2020 年版《中国药典》通则 2351

## ■ 参考标准

2020 年版《中国药典》四部通则《2351 真菌毒素测定法》第一法 黄曲霉毒素测定法

## ■ 方法概述

### 2.1 方法编制说明

2020 年版《中国药典》一部药材及饮片部分品种项下规定了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的限度。通则《2351 真菌毒素测定法》第一法 黄曲霉毒素测定法明确了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的分析方法。

### 2.2 方法使用范围

本方法用于采用高效液相色谱法测定药材、饮片及中药制剂中的黄曲霉毒素（以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 总量计）。

### 2.3 方法技术指标

本方法的检出限：黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 应为 0.5 μg/kg；黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 应为 0.2 μg/kg。

本方法的定量限：黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 应为 1 μg/kg；黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 应为 0.4 μg/kg。

## ■ 方法原理

供试品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>，用甲醇 - 水溶液提取，通过免疫亲和柱净化、定容和过滤后经液相色谱分离测定。

## ■ 仪器设备及辅助设备

### 4.1 仪器设备

Essentia 黄曲霉毒素分析系统

### 4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AP225WD；

离心机：Eppendorf Centrifuge 5804 R；

涡旋仪：IKA MS 3 control；

移液枪：1000 μL，200 μL，20 μL

## ■ 标准品、试剂、耗材

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 混合标准品溶液（详细信息见附录）；

乙腈、甲醇：色谱级；

碘、氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、盐酸：分析纯级；

淋洗缓冲液：称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，加水 990 mL 使溶解，用盐酸调节 pH 值至 7.0，加水稀释至 1000 mL，即可；

无针注射器：5 mL；

微孔过滤膜：有机相尼龙针式过滤器，0.22 μm

## ■ 操作步骤

### 6.1 标准工作曲线制作

#### 6.1.1 对照品溶液的制备

精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液（黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 标识浓度分别为 1 µg/mL、0.3 µg/mL、1 µg/mL、0.3 µg/mL）0.5 mL，置 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，作为贮备溶液。精密量取贮备溶液 1200 µL 置 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得。

#### 6.1.2 标准系列工作溶液的制备

按照 6.2 仪器设备条件进行测定，依据药典规定分别精密吸取对照品溶液 5 µL、10 µL、15 µL、20 µL、25 µL 注入液相色谱仪，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，进样量为横坐标，绘制标准曲线。

### 6.2 仪器条件

色谱柱：WondaSil C18（250 mm×4.6 mm I.D.，5 µm）

流动相：甲醇 - 乙腈 - 水（20:25:55，v:v:v）

流速：0.8 mL/min

洗脱方式：等度洗脱

柱温：40°C

检测波长：Ex=360 nm；Em=450 nm

衍生溶液：0.05% 碘溶液（取 0.5 g 碘，加甲醇 100 mL，用水定容至 1000 mL）

衍生液流速：0.3 mL/min

衍生化温度：70°C

进样体积：5 µL

### 6.3 样品前处理

1) 称样：取供试品，粉碎成粉末（过二号筛），取约 15 g，精密称定，置均质瓶中。

2) 向均质瓶中加入氯化钠 3 g，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 r/min），离心 5 分钟（离心速度 4000 r/min）。

3) 从 2) 中精密量取上清液 15 mL，置 50 mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，离心 10 分钟（离心速度 4000 r/min）。

4) 从 3) 精密量取上清液 20 mL，以每分钟 3 mL 的流速通过免疫亲和柱，用水 20 mL 洗脱（必要时可以先用淋洗缓冲液 10 mL 洗脱，再用水 10 mL 洗脱）。

5) 弃去洗脱液，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 2 mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.22 µm）滤过，取续滤液，即得。

### 6.4 加标试样

取空白莲子样品进行加标，按照 6.3 步骤制备加标样品，加标浓度为黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 和 G<sub>1</sub> 为 1 µg/kg，黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 和 G<sub>2</sub> 为 0.3 µg/kg。

### 6.5 测定

按照 5.2 的仪器分析条件进行分析，进样量为 1.0 µL，若检测溶液中的残留量超过本方法的标准曲线范围，则需要稀释检测溶液后进样分析。

### 6.6 计算和报告

精密吸取供试品溶液 5 µL，注入液相色谱仪，测定峰面积，从标准曲线上读出供试品中相当于黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的量，计算，即得。

供试品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 的量按下式计算：

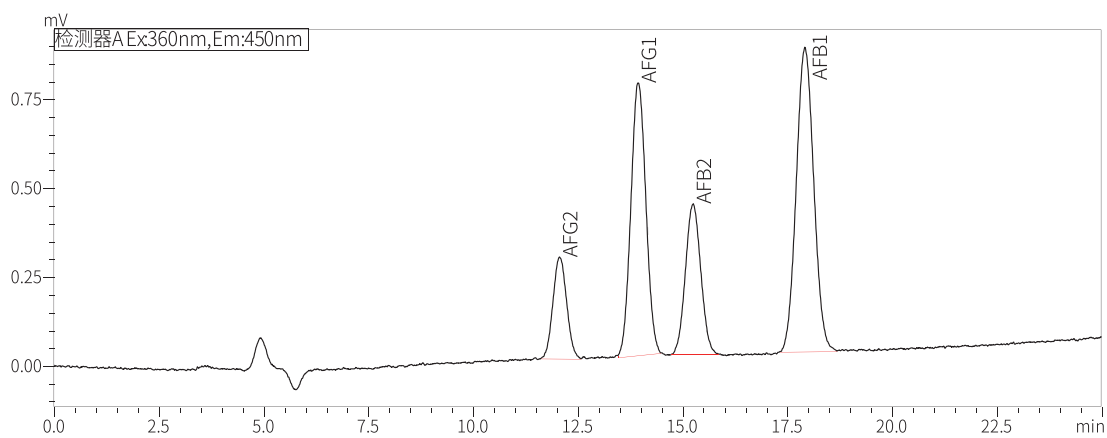
$$X = C_s \times \frac{A}{A_s} \times \frac{V \times D}{m}$$

- X — 供试品中待测物的含量, mg/kg;  
 Cs — 混合对照品溶液中被测物的浓度,  $\mu\text{g/mL}$ ;  
 A — 供试品溶液中被测物的色谱峰面积;  
 As — 混合对照品溶液中被测物的色谱峰面积;  
 V — 供试品最终定容体积, mL;  
 m — 供试品的称样量, g;  
 D — 稀释倍数

## 附录

表 各农药标准的信息黄曲霉毒素化合物信息

No.	化合物名称	英文名称	CAS 号	保留时间 (min)
1	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	Aflatoxin B <sub>1</sub>	1162-65-8	11.966
2	黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	Aflatoxin B <sub>2</sub>	7220-81-7	13.824
3	黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	Aflatoxin G <sub>1</sub>	1165-39-5	15.141
4	黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	Aflatoxin G <sub>2</sub>	7241-98-7	17.781



黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 混合对照品溶液色谱图

岛津应用云

