

高效液相色谱光化学衍生法用于黄曲霉毒素的分析

LC-283

摘要：本文建立了采用岛津 Essentia LC-16 高效液相色谱柱后光化学衍生法检测黄曲霉毒素的方法，并对方法的线性、准确性、重现性进行了考察。结果表明，黄曲霉毒素 B1、G1 标准工作液线性范围是 3~5 pg，B2、G2 标准工作液线性范围是 10~50 pg，相关系数 R 均大于 0.9997，线性良好。黄曲霉毒素 B1、G1、B2、G2 定量限和检测限满足药典要求。对标准品连续 6 次进样，各组分的保留时间 RSD%<0.3%，峰面积 RSD%<2.0%，仪器精密度良好。

关键词：LC-16 光化学衍生 黄曲霉毒素

黄曲霉毒素 (aflatoxin, AFT) 是一组具有强毒性和致癌性的次级真菌代谢产物，主要有 B1、B2、G1 和 G2，其中 B1 毒性最大。目前 2020 年版《中国药典》黄曲霉毒素测定法主要有液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、酶联免疫法。中国药典质量标准中规定每 1000 g 含黄曲霉毒素 B1 不得过 5 μg ，含黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 B2 和黄曲霉毒素 B1 的总量不得过 10 μg 。

由于黄曲霉毒素在水溶液中会发生荧光淬灭，反相色谱中检测黄曲霉毒素 B1 和 G1 两种异构体荧光强度很弱，需进行衍生化。衍生化的方法一般有柱前和

柱后两类，柱前衍生一般使用三氟乙酸，柱后衍生有碘液、过溴化吡啶溴以及电化学和光化学衍生等方法。

2020 年版《中国药典》2351 真菌毒素测定法之黄曲霉毒素测定法第一法，即液相色谱法，该法分为碘衍生法和光化学衍生法，均为柱后衍生法。光化学衍生无需配制衍生试剂和额外的输液泵，也无需电化学衍生器，操作较为简便，成本较低。

本实验采用岛津高效液相色谱 Essentia LC-16 柱后光化学衍生系统建立了黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的检测方法，该方法能准确地进行黄曲霉毒素分析，且灵敏度符合药典要求，供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津 Essentia LC-16 高效液相色谱仪，具体配置如下：

| | |
|--|--------------|
| 系统控制器：CBM-20Alite | 自动进样器：SIL-16 |
| 柱温箱：CTO-16L | 输液泵：LC-16 |
| 脱气机：DGU-20A ₃ | 检测器：RF-20A |
| 色谱工作站：LabSolutions Essentia Ver. 5.106 | |

1.2 分析条件

| | |
|---|-------------|
| 色谱柱：Inertsil ODS-3 (150 mm L×4.6 mm I.D., 5 μm) | 流速：1 mL/min |
| 检测波长：激发波长 360 nm；发射波长 450 nm | 洗脱方式：等度洗脱 |
| 柱温：35°C | 衍生波长：254 nm |
| 流动相：甲醇 / 乙腈 / 水 =40/18/42(V/V/V) | |
| 光衍生器：PriboLab® (光化学衍生反应器) | |

1.3 混合对照品溶液的制备

精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液（黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1 和黄曲霉毒素 G2，浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.3 $\mu\text{g/mL}$ ）0.5 mL，置 10 mL 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 1 mL，置 25 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品色谱图

光化学衍生法混合对照品溶液色谱图如图 1 所示。其中，AFG1、AFB1 浓度为 2.0 ng/mL，AFG2、AFB2 浓度为 0.6 ng/mL，分离度满足药典要求。

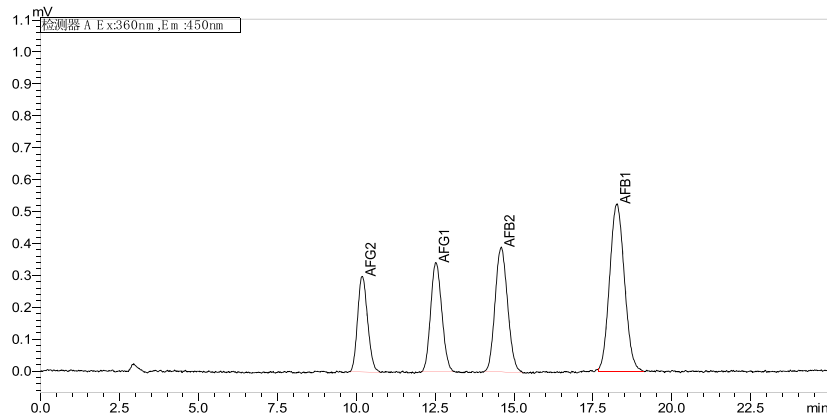


图 1 黄曲霉素 B1、B2、G1、G2 标准样品色谱图 (进样量 5 μ L)

2.2 线性范围

光化学衍生条件下，混合对照溶液 (AFG1、AFB1 浓度为 2.0 ng/mL，AFG2、AFB2 浓度为 0.6 ng/mL) 分别进样 5 μ L、10 μ L、15 μ L、20 μ L、25 μ L。按照中国药典要求，以进样量 (pg) 为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制校准曲线，线性关系情况和实测定量限检测限结果见表 1，校准曲线见图 2。由结果可见，AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 校准曲线线性良好，定量限和检测限满足药典要求。

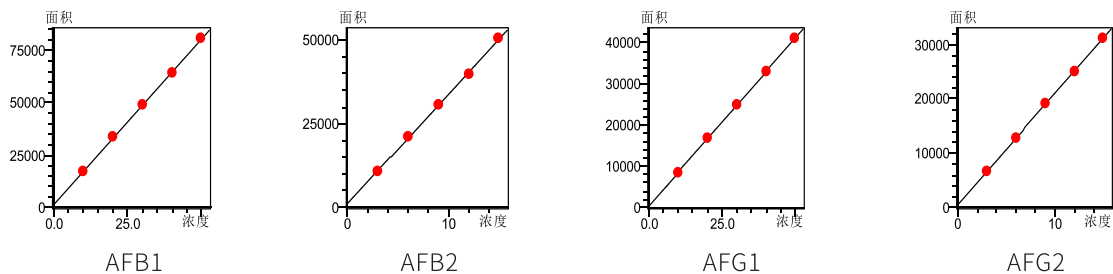


图 2 校准曲线

表 1 光化学衍生法线性关系结果

| # | 组分 | 线性方程 | 线性范围 (pg) | 相关系数 | 准确度 (%) | LOQ(pg) | LOD(pg) |
|---|------|------------------------------|-----------|---------|------------|---------|---------|
| 1 | AFG2 | $Y = (41187.4)X + (439.331)$ | 10-50 | 0.99994 | 99.2-100.8 | 0.66 | 0.20 |
| 2 | AFG1 | $Y = (16328.8)X + (350.115)$ | 3-15 | 0.99996 | 98.1-100.9 | 1.97 | 0.57 |
| 3 | AFB2 | $Y = (65587.0)X + (934.706)$ | 10-50 | 0.99977 | 98.3-102.1 | 0.52 | 0.16 |
| 4 | AFB1 | $Y = (31717.7)X + (1182.91)$ | 3-15 | 0.99995 | 99.5-101.0 | 1.28 | 0.38 |

2.3 重复性

在光化学衍生条件下，混合对照品溶液 (G1、B1 浓度为 2.0 ng/mL，G2、B2 浓度为 0.6 ng/mL) 各取 10 μ L 连续进样 6 次，考察仪器精密度，结果如表 4，各组分的保留时间 RSD% < 0.3%，峰面积 RSD% < 2.0%，仪器精密度良好。

表 4 重复性结果

| # | 组分 | 保留时间 RSD(%) | 峰面积 RSD(%) |
|---|------|-------------|------------|
| 1 | AFG2 | 0.242 | 0.742 |
| 2 | AFG1 | 0.250 | 0.819 |
| 3 | AFB2 | 0.256 | 1.019 |
| 4 | AFB1 | 0.262 | 0.926 |

■ 结论

本文建立了采用岛津 Essentia LC-16 高效液相色谱柱后光化学衍生法检测黄曲霉毒素的方法，并对方法的线性、准确性、重现性进行了考察。结果表明，黄曲霉毒素 B1、G1 标准工作液线性范围是 3~5 pg，B2、G2 标准工作液线性范围是 10~50 pg，相关系数 R 均大于 0.9997，线性良好。黄曲霉毒素 B1、G1、B2、G2 定量限和检测限满足药典要求。对标准品连续 6 次进样，各组分的保留时间 RSD%<0.3%，峰面积 RSD%<2.0%，仪器精密度良好。

岛津应用云

