

# 岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统测定 中药材莲子中的黄曲霉毒素

LC-272

**摘要：**本文按照 2020 年版《中国药典》四部 2351 真菌毒素测定法中黄曲霉毒素测定法（第一法），采用岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统对莲子中黄曲霉毒素进行方法建立和测定。以外标法定量，4 种黄曲霉毒素在各自浓度范围内标准曲线线性良好，相关系数  $r$  均大于 0.999，准确度在 95.5~102.4% 之间。对加标样品溶液连续进样 6 次，重复性结果（RSD% 表示）显示，4 种黄曲霉毒素的保留时间 RSD% 在 0.06~0.08% 之间，峰面积的 RSD% 在 0.55~1.01% 之间，加标回收率在 78.7~95.0% 之间。上述结果表明，该方法准确度高，重复性好，可为莲子中黄曲霉毒素的测定提供参考。

**关键词：**2020 年版《中国药典》 黄曲霉毒素 柱后碘衍生法

黄曲霉毒素（AF）是黄曲霉和寄生曲霉的代谢产物，具有极强的毒性和致癌性，可引发动物的肝癌、肾癌、胃癌等，其中以黄曲霉毒素 B1 最为多见，其毒性和致癌性也最强。免疫亲和柱是将特异性的黄曲霉毒素单克隆抗体与载体蛋白偶联并填柱而成，能特效性、高选择性地吸附黄曲霉毒素，而让其它杂质通过柱子，使样品得以纯化，黄曲霉毒素吸附后可被极

性有机溶剂洗脱。免疫亲和柱将提取、净化、浓缩一次完成，大大简化了前处理过程，提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

本研究参考 2020 年版《中国药典》，采用岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统对莲子中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 进行测定。

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本文使用岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统，配置信息如下：

系统控制器：CBM-20Alite

自动进样器：SIL-16

柱温箱：CTO-16L

输液泵：LC-16 × 3

脱气机：DGU-20A<sub>5R</sub>

化学反应箱：CRB-40

检测器：RF-20A

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98

### 1.2 分析条件

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

进样体积：5 μL

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

## ■ 样品前处理

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、黄曲霉毒素 G2 标识浓度分别为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）0.5 mL，置 10 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，作为储备溶液 1，精密量取储备溶液 1200  $\mu\text{L}$  置 5 mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，作为工作溶液。

供试品溶液的制备：参照 2020 年版《中国药典》四部 2351 真菌毒素测定法中黄曲霉毒素测定法（第一法）供试品溶液的制备方式制得。

## ■ 结果与讨论

### 3.1 系统适用性

按照 1.2 中分析条件进行测定，对照品色谱图如图 1 所示，结果见表 1（药典中规定，两个相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。）。

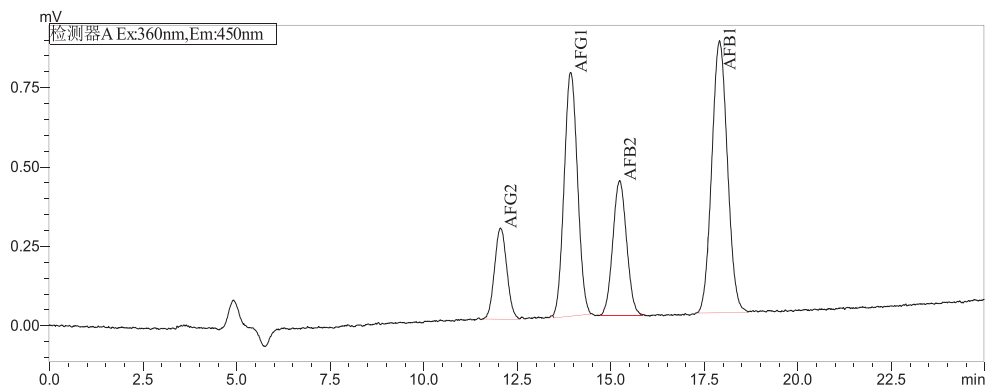


图 1 对照品溶液色谱图（进样量 5  $\mu\text{L}$ ）

表 1 系统适用性溶液测定结果

#	化合物	分离度	分离度 (标准要求)
1	AFB1	/	
2	AFB2	2.9	>1.5
3	AFG1	1.9	
4	AFG2	3.7	

### 3.2 线性

将对照品溶液按照 1.2 分析条件进行测定，依据药典规定分别吸取黄曲霉毒素混合标准溶液 5  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ 、15  $\mu\text{L}$ 、20  $\mu\text{L}$ 、25  $\mu\text{L}$  注入液相色谱仪，外标法定量。以进样量 (pg) 为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准曲线，进行线性回归分析，在线性测定范围内，线性良好，线性相关系数均 >0.999，准确度在 95.5-102.4% 之间，线性方程、相关系数见表 2。LabSolutions 工作站信噪比自动计算检出限 (S/N=3) 及定量限 (S/N=10) 见表 2。

表 2 黄曲霉毒素标准曲线

#	化合物	线性范围 (pg)	校准曲线	准确度 (%)	相关系数 r	检出限 (pg)	定量限 (pg)
1	AFB1	10-50	$Y = (2486.76)X + (-555.325)$	98.4-101.1	0.9999	0.37	1.11
2	AFB2	3-15	$Y = (3711.27)X + (1116.72)$	98.0-101.0	0.9999	0.22	0.67
3	AFG1	10-50	$Y = (1921.41)X + (41.5114)$	97.0-101.8	0.9998	0.43	1.30
4	AFG2	3-15	$Y = (2125.62)X + (123.683)$	95.5-102.4	0.9996	0.34	1.04

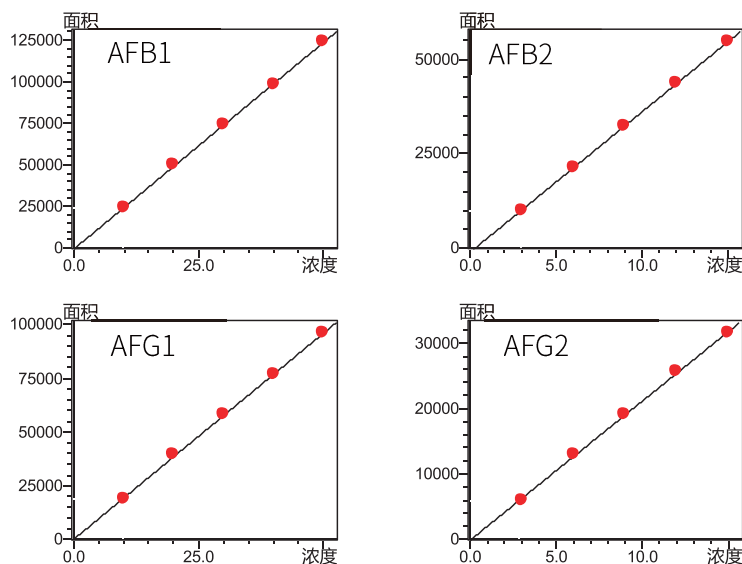


图 2 黄曲霉毒素校准曲线

### 3.3 精密度

按照 1.2 分析条件，取样品加标溶液重复测试 6 次，并计算各化合物保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%)，结果显示 RSD 分别在 0.06~0.08% 和 0.55~1.01% 之间，表明该系统精密度良好。

表 3 精密度实验结果 (n=6)

#	化合物	RSD%	
		保留时间	峰面积
1	AFB1	0.07	1.01
2	AFB2	0.08	1.00
3	AFG1	0.06	0.92
4	AFG2	0.07	0.55

### 3.4 方法回收率

取空白莲子样品进行加标，按照 1.2 步骤制备样品和加标样品，加标浓度为黄曲霉毒素 B1 和 G1 为 1 μg/kg，黄曲霉毒素 B2 和 G2 为 0.3 μg/kg，加标样品平行测定 3 次。测试结果显示：各目标物平均加标回收率在 78.7~95.0% 之间，相对标准偏差在 0.71~1.44% 之间，说明本方法准确性良好。

按照 1.2 中分析条件进行测定，空白样品色谱图如图 3 所示，加标回收率结果见表 4。

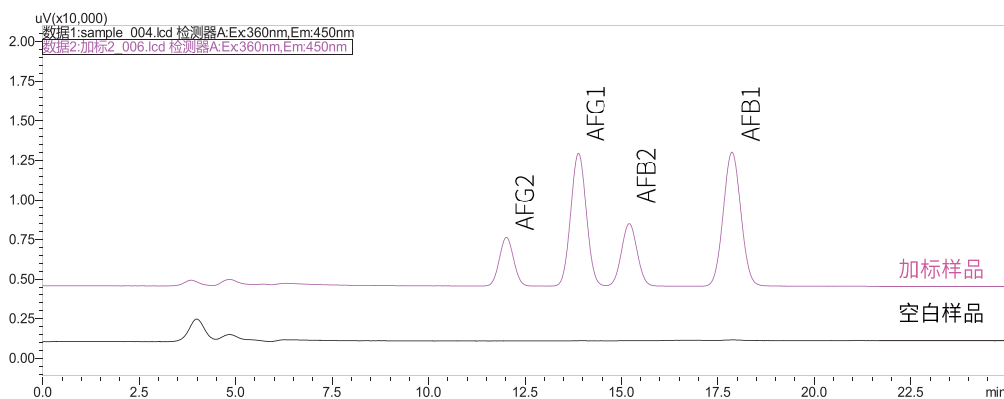


图3 空白样品溶液和样品加标回收率重叠色谱图 (进样量 5  $\mu$ L)

表4 加标回收实验结果 (n=3)

#	名称	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	AFB1	84.1	0.81
2	AFG1	95.0	1.44
3	AFB2	78.7	0.71
4	AFG2	95.0	1.41

## ■ 结论

本研究采用岛津 Essentia 黄曲霉毒素分析系统对莲子中黄曲霉毒素进行测定。按照 2020 年版《中国药典》四部中 2351 真菌毒素测定法中黄曲霉毒素测定法（第一法）进行方法建立和测定。实验结果表明，系统适用性试验、专属性、线性及精密度试验结果均符合规定，系统稳定性良好、结果准确度高。该方法为制药药检相关行业检验检测工作提供了参考。

岛津应用云

