

光化学衍生生化法和非衍生法检测中药配方颗粒中的黄曲霉毒素

LC-208

摘要：本文参考 2020 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，采用液相色谱柱后光化学衍生法对中药配方颗粒中的黄曲霉毒素 G1、G2、B1、B2 进行了分析。基于岛津荧光检测器的高灵敏性能，本实验同时采用了直接分析的非衍生法进行了对比研究，考察了两种分析方法的线性范围、定量限检测限、精密密度、回收率，并应用于大枣配方颗粒实际样品的分析。二者的分析结果表明，两种分析方法均可用于中药配方颗粒黄曲霉毒素的准确检测。

关键词：液相色谱 光化学衍生 非衍生 黄曲霉毒素 配方颗粒

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，其中 AFB1 的毒性最强。目前，我国对中药配方颗粒黄曲霉毒素控制的主要依据为国家药典委员会发布的 160 个中药配方颗粒品种试点统一标准的公示稿。公示稿标准显示大枣、远志、合欢花等 10 个品种的中药配方颗粒需要进行黄曲霉毒素的控制，并规定黄曲霉毒素 B1 限量为不得过 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，黄曲霉毒素 G2、G1、B2 和 B1 的总量限量为不得过 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

由于反相洗脱会使黄曲霉毒素 B1 和 G1 的荧光效应发生猝灭，通常需要进行衍生化以增强其荧光强度。衍生化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 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。本文参考光化学衍生法检测条件，采用岛津光化学衍生反应器 PR-1000 对经免疫亲和柱净化后的大枣配方颗粒样品进行柱后光衍生反应，衍生好的样品经荧光检测器 RF-20A xs 进行检测。岛津 RF-20A xs 是一种灵敏度较高的荧光检测器，可对黄曲霉毒素进行高灵敏度分析。本文对比分析了柱后光化学衍生法和直接进样分析的非衍生化法用于检测中药配方颗粒中的黄曲霉毒素，结果表明两种方法均能准确地进行黄曲霉毒素分析，且灵敏度均符合药典要求，两种分析方法可供相关检测人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 Nexera LC-40 液相色谱仪，包括 CBM-40A Lite 系统控制器，DGU-405 脱气机，LC-40B XR 输送泵，SIL-40CXR 自动进样器，CTO-40S 柱温箱，RF-20A xs 荧光检测器，PR-1000 光衍生反应器，LabSolutions Ver. 5.98 色谱工作站

1.2 分析条件

色谱柱：Shim-pack Scepter C18-120 色谱柱 (250 mm \times 4.6 mm I.D., 5 μm , SGLC P/N: 227-31020-06)

流动相：甲醇：乙腈：水 =40：18：42

流速：1.0 mL/min

柱温：30 $^{\circ}\text{C}$

检测波长： $E_x=360\text{ nm}$ ， $E_m=450\text{ nm}$

洗脱方式：等度洗脱

■ 样品前处理

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、黄曲霉毒素 G2 标示浓度分别为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）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 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得。

供试品溶液的制备：取大枣配方颗粒样品适量，研细，过二号筛，取粉末约 15 g，精密称定，置于均质瓶中，加入氯化钠 3 g，精密加入 70% 甲醇溶液 75 mL，高速搅拌 1 分钟（搅拌速度大于 11000 转 / 分钟），离心 5 分钟（离心速度 4000 转 / 分钟），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 转 / 分钟），精密量取上清液 20 mL，通过免疫亲和柱（SHIMSEN 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱，3 mL, P/N:380-00910），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 2 mL 量瓶中，并用甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜过滤（0.22 μm ），取续滤液得。

■ 结果与讨论

3.1 色谱图

光化学衍生法和非衍生法空白溶剂和混合对照品溶液色谱图如图 1-4 所示。其中，AFG1、AFB1 浓度为 2.0 ng/mL，AFG2、AFB2 浓度为 0.6 ng/mL。两种分析方法下，空白溶剂均不干扰黄曲霉毒素的检测。

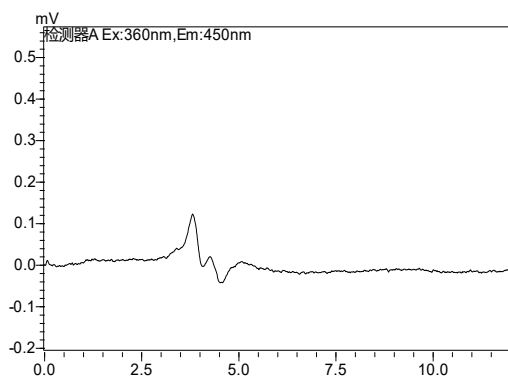


图 1 光化学衍生法空白溶剂色谱图

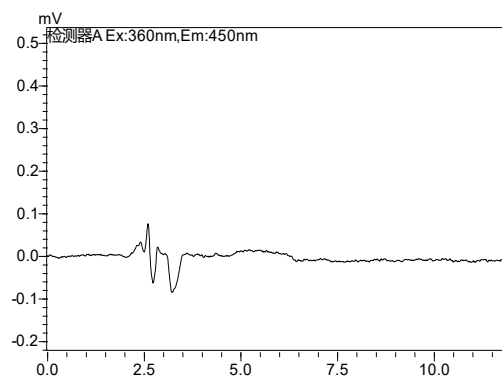


图 2 非衍生法空白溶剂色谱图

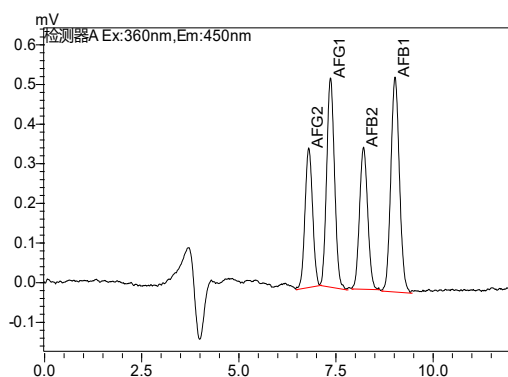


图 3 光化学衍生法混合对照品溶液色谱图
(进样量 5 μL)

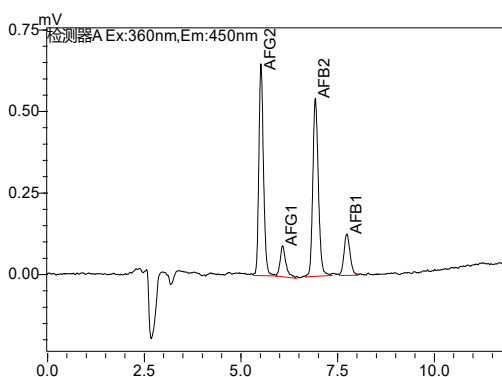


图 4 非衍生法混合对照品溶液色谱图
(进样量 5 μL)

3.2 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 1 μL、5 μL、10 μL、15 μL、20 μL、25 μL。非衍生条件下，混合对照溶液分别进样 2 μL、5 μL、10 μL、15 μL、20 μL、25 μL，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，绘制标准曲线，线性关系情况如表 1-2。

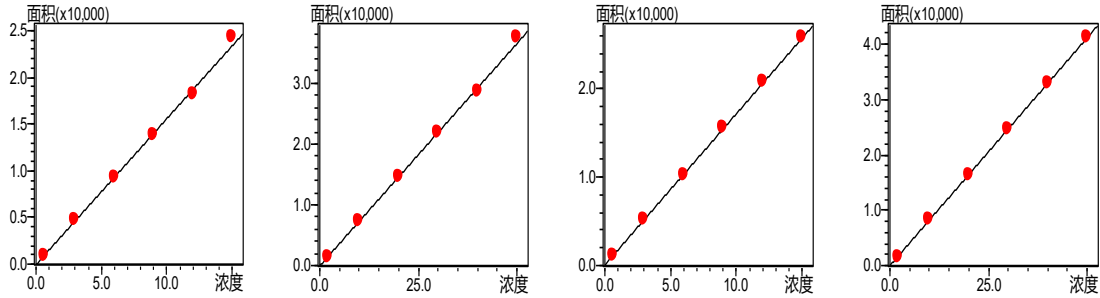


图 5 光化学衍生法 4 种组分线性图 (AFG2、AFG1、AFB2、AFB1)

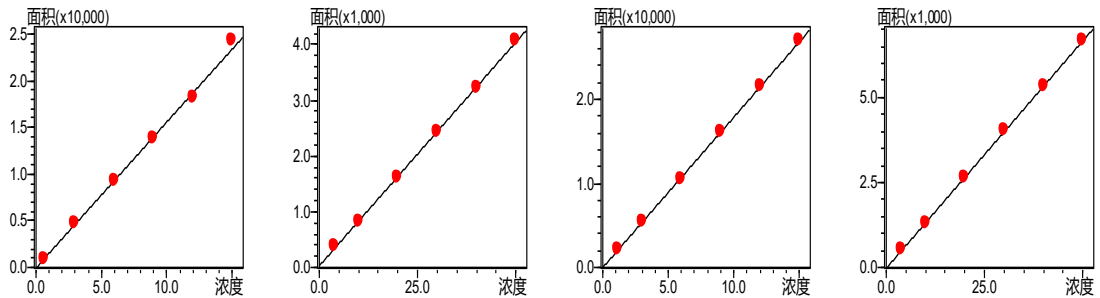


图 6 非衍生法 4 种组分线性图 (AFG2、AFG1、AFB2、AFB1)

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 (%)
AFG2	$Y = 1563.25X - 53.6638$	0.6-15	0.99968	97.3-103.7
AFG1	$Y = 731.877X - 34.3247$	2-50	0.99987	98.1-102.4
AFB2	$Y = 1712.61X + 63.3205$	0.6-15	0.99997	99.1-101.0
AFB1	$Y = 824.822X - 21.7857$	2-50	0.99999	99.8-100.5

表 2 非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 (%)
AFG2	$Y = 1755.19X + 38.4827$	1.2-15	0.99999	99.2-100.2
AFG1	$Y = 80.3249X + 27.5913$	4-50	0.99991	98.3-106.7
AFB2	$Y = 1789.41X - 22.2039$	1.2-15	0.99996	98.5-100.7
AFB1	$Y = 133.847X - 27.8287$	4-50	0.99996	99.7-100.4

3.3 定量限检出限

依据 2020 版《中国药典》2351 黄曲霉毒素测定法第一法，黄曲霉毒素 G2、G1、B2、B1 的定量限检出限要求如表 3，实测定量限检测结果如表 4。对比表 3 和表 4 可知，光化学衍生法和非衍生法灵敏度均符合《中国药典》要求。在光化学衍生条件下，AFG1、AFB1 的灵敏度要明显高于非衍生法；非衍生法条件下，由于系统死体积相对较小，色谱峰峰宽较窄，AFG2、AFB2 的灵敏度则高于光化学衍生法。

表3 《中国药典》定量限、检出限要求

组分	LOQ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ(ng/mL)	LOD(ng/mL)	LOQ*(pg)	LOD(pg)*
AFG2	0.4	0.2	0.24	0.12	4.8	2.4
AFG1	1	0.5	0.6	0.3	12	6
AFB2	0.4	0.2	0.24	0.12	4.8	2.4
AFB1	1	0.5	0.6	0.3	12	6

表4 定量限、检出限结果

组分	光化学衍生法				非衍生法			
	LOQ (pg)	LOD (pg)	LOQ* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ (pg)	LOD (pg)	LOQ* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
AFG2	0.42	0.14	0.035	0.012	0.17	0.06	0.014	0.005
AFG1	0.89	0.30	0.074	0.025	4.17	1.38	0.348	0.115
AFB2	0.38	0.12	0.032	0.010	0.20	0.07	0.017	0.006
AFB1	0.88	0.29	0.073	0.024	2.91	0.96	0.243	0.080

* 中国药典要求供试品进样量为 20~50 μL ，此处定量限检出限以最低进样量 20 μL 进行计算

3.4 精密度

在光化学衍生及非衍生条件下，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 5 μL 连续进样 6 次，考察仪器精密度，结果如表 5，各组分的保留时间 $\text{RSD}\% < 0.2\%$ ，峰面积 $\text{RSD}\% < 2.0\%$ ，仪器精密度良好。

表5 精密度结果

组分	光化学衍生法		非衍生法	
	保留时间 $\text{RSD}\%$	峰面积 $\text{RSD}\%$	保留时间 $\text{RSD}\%$	峰面积 $\text{RSD}\%$
AFG2	0.15	0.70	0.03	0.60
AFG1	0.14	1.02	0.03	1.70
AFB2	0.16	0.82	0.03	0.95
AFB1	0.18	1.08	0.03	1.76

3.5 样品测定

取供试品溶液进样 20 μL ，色谱图见图 7-8，检测结果见表 6。光化学衍生条件下，供试品中检出黄曲霉毒素 B1，其含量为 0.053 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，该结果小于仪器定量限及《中国药典》规定的方法定量限。非衍生条件下，所有组分均未检出。AFB1 在非衍生条件下会发生荧光淬灭，灵敏度相对较低，故光化学衍生条件下能检测到的 AFB1 组分在非衍生条件下未检出。两种分析方法下，供试品中的黄曲霉毒素检测结果均符合该品种中药配方颗粒对黄曲霉毒素的限量要求，即黄曲霉毒素 B1 不大于 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，黄曲霉毒素 G1、G2、B1、B2 的总和不大于 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

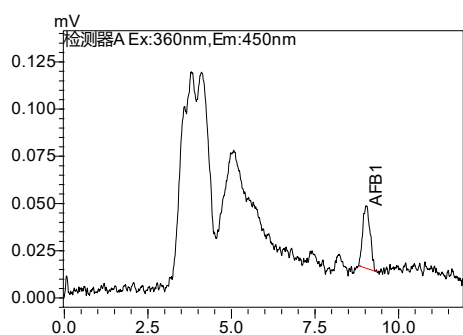


图7 光化学衍生法供试品色谱图

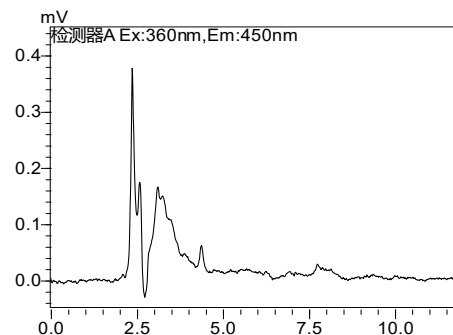


图8 非衍生法供试品色谱图

表 6 样品测定结果

组分	光化学衍生法		非衍生法	
	含量 (pg)	含量 (µg/kg)	含量 (pg)	含量 (µg/kg)
AFG2	-	-	-	-
AFG1	-	-	-	-
AFB2	-	-	-	-
AFB1	0.635	0.053	-	-
总量	0.635	0.053	-	-

3.6 加标回收率

取大枣配方颗粒样品粉末各 15 g, 分别加入低中高不同浓度的黄曲霉毒素对照品溶液, 按照“2. 样品前处理”方法进行处理, 光化学衍生法及非衍生法条件下 4 种组分的加标回收率分别在 95.2%-107.3%、94.5%-107.6% 之间, 两种分析方法的准确性良好, 回收率结果见表 7。

表 7 加标回收率测定结果

组分	加标量 (pg)	光化学衍生法回收率 (%)	非衍生法回收率 (%)
AFG2	3.6	95.2	95.9
	5.4	101.4	102.2
	7.2	95.4	94.5
AFG1	12	102.0	107.6
	18	101.9	104.6
	24	99.0	100.3
AFB2	3.6	97.4	98.2
	5.4	102.4	103.0
	7.2	98.5	95.7
AFB1	12	104.4	97.7
	18	107.3	101.8
	24	100.4	96.0

■ 结论

本文采用液相色谱法对中药配方颗粒样品中的黄曲霉毒素 G1、G2、B1、B2 进行了分析。样品经免疫亲和柱净化后采用岛津光化学衍生反应器 PR-1000 衍生后进行荧光检测, 同时基于荧光检测器 RF-20A xs 的高灵敏性能, 本实验同时考察了不衍生条件下进行黄曲霉毒素的可行性。通过对比考察两种分析方法的线性范围、定量限检测限、精密度、回收率, 并应用于实际样品大枣配方颗粒的分析, 结果表明两种分析方法均可用于中药配方颗粒黄曲霉毒素的准确检测。

岛津应用云

