

免疫亲和柱净化光化学衍生液相色谱法 检测中药材柏子仁中的黄曲霉毒素

No.LC-039

摘要：建立免疫亲和柱净化光化学衍生液相色谱法检测柏子仁中黄曲霉毒素方法。柏子仁样品经70%甲醇提取，玻璃纤维滤纸过滤，免疫亲和柱净化，进样液相色谱分析，光化学柱后衍生，荧光检测器检测，方法简便快速，易操作。四种黄曲霉毒素线性范围B1、G1为0.50~20 ng/mL，B2、G2为0.15~6.0 ng/mL，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ范围分别在0.022~0.047 ng/mL和0.066~0.16 ng/mL，回收率87.0~107%。

关键词：免疫亲和柱 光化学衍生 黄曲霉毒素 柏子仁

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B1的毒性最强。我国对中药材霉菌毒素的限量标准没有强制要求，仅制定了黄曲霉毒素含量的非强制性限制标准，我国外经贸部药用植物及制品进出口绿色行业标准（WM/T2-2004）中黄曲霉毒素B1限量为 $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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，能特效性地、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。

由于黄曲霉毒素在水溶液中会发生荧光淬灭，反相色谱中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。我国药典2010年版药典拟增修订柱后光化学衍生法。光化学衍生无需配制衍生化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。光化学衍生可以使流动相中的水与黄曲霉毒素B1和G1作用，生成荧光特性更强、更稳定的化合物，其反应原理见下图1。

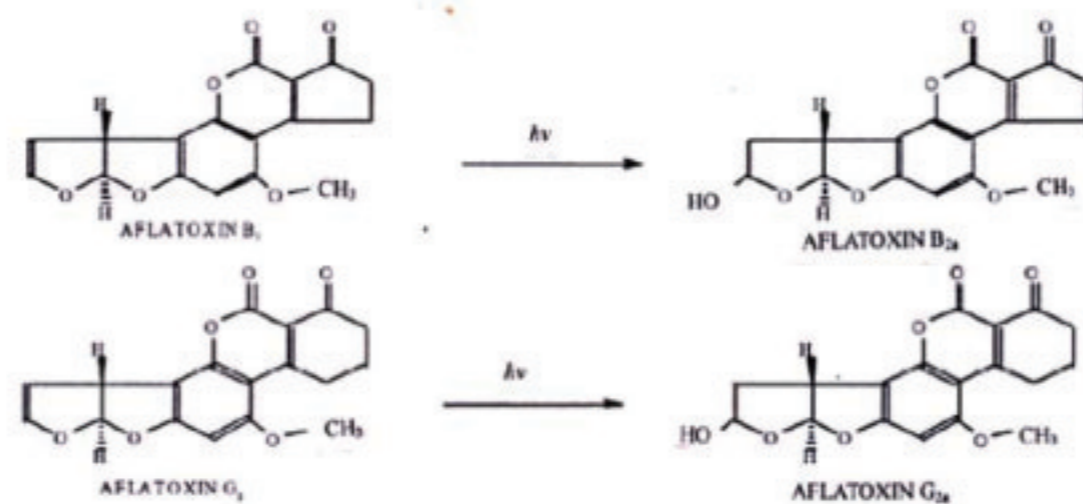


图1 柱后光化学反应原理

本文将采用免疫亲和柱净化光化学衍生液相色谱法检测中药材柏子仁中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2。

实验部分

1、仪器与试剂

LC-20AD×2(输液泵)，SIL-20A(自动进样器)，CTO-20A(柱温箱)，DGU-20A₃(在线脱气机)、CBM-20A(系统控制器)，LCsolution(色谱工作站)；光化学柱后衍生反应装置，AURA公司；Alfatest免疫亲和柱，VICAM公司；玻璃纤维滤纸，VICAM公司；黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2混标溶液，Sigma-Aldrich公司；甲醇，HPLC级，Merck公司；纯水，Millipore纯水机制得。

2、标准品溶液的配制及样品前处理

标准溶液配制：黄曲霉毒素混标原溶液(B1,G1: 1.0 mg/L; B2,G2: 0.30 mg/L)，经流动相稀释，配制标准溶液浓度系列。

前处理步骤：取柏子仁粉末约5 g，精密称定，置于三角瓶中，精密加入70%甲醇溶液50 mL，超声萃取15 min，离心5 min (3000rpm)，精密量取上清液5 mL，置50 mL量瓶中，加70%甲醇5 mL，用水稀释至刻度，摇匀，滤纸过滤，量取滤液25 mL，通过免疫亲和柱，流速控制约1~2滴/秒，用水5 mL洗脱，洗脱液弃取，使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用1 mL甲醇，流速控制1滴/秒（洗脱过快，可能导致回收率偏低），收集洗脱液，置2 mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，待测。

3、分析条件

流动相：甲醇/水 = 45:55 (v/v)

流速：1 mL/min

进样体积：20 μ L

色谱柱：Cloversil ODS-U4.6 \times 150 mm, 5 μ m

柱温：35 $^{\circ}$ C

检测波长：Ex=360 nm, Em = 450 nm

结果与讨论

1、线性范围及检出限

黄曲霉毒素混标图谱如下图2所示。

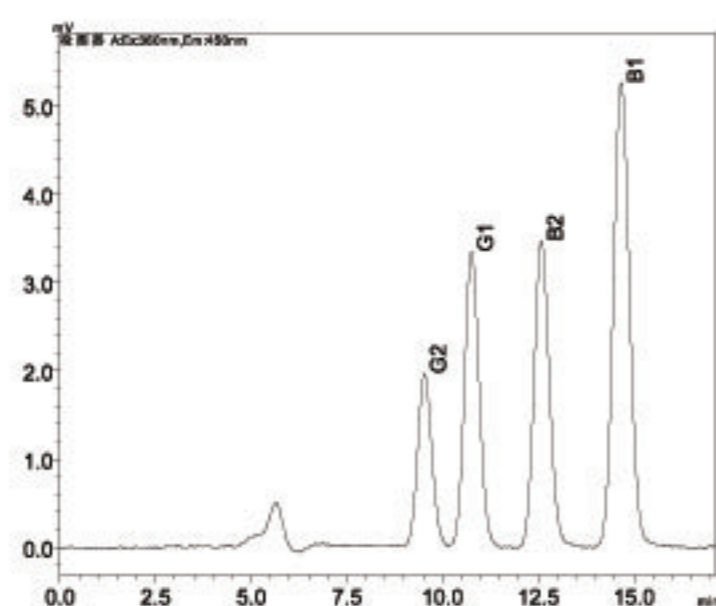


图2 混标溶液色谱图 (G2: 0.60 ng/mL; G1: 2.0 ng/mL
B2: 0.60 ng/mL; B1: 2.0 ng/mL)

以B1、G1浓度分别为0.50、1.0、2.0、5.0、10、20 ng/mL；B2、G2浓度分别为0.15、0.30、0.60、1.5、3.0、6.0 ng/mL混标制作校准曲线，标准曲线图如图3-图6，标准曲线方程见表1。

表1 标准曲线方程

组分	Y=AX+B		R
	A	B	
G2	83225	1727	0.9999
G1	42327	2806	0.9995
B2	158018	777	0.9998
B1	72540	3844	0.9999

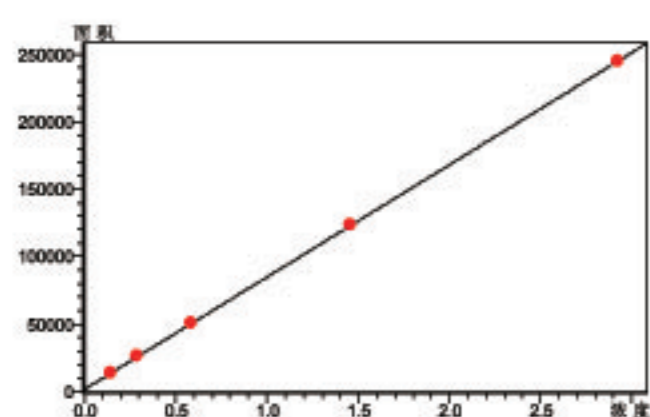


图3 黄曲霉毒素G2的校准曲线

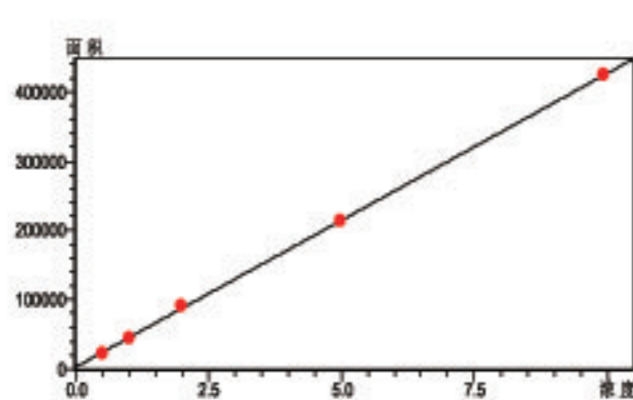


图4 黄曲霉毒素G1的校准曲线

四种AF的检出限和定量限，见表2。

表2 四种AF的检出限和定量限

组分	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
G2	0.022	0.066
G1	0.047	0.156
B2	0.014	0.046
B1	0.030	0.100

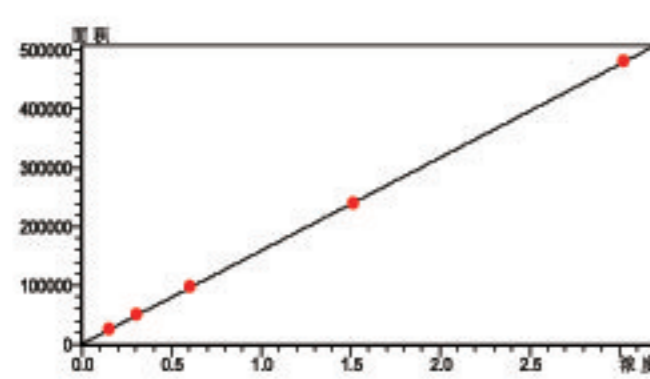


图5 黄曲霉毒素B2的校准曲线

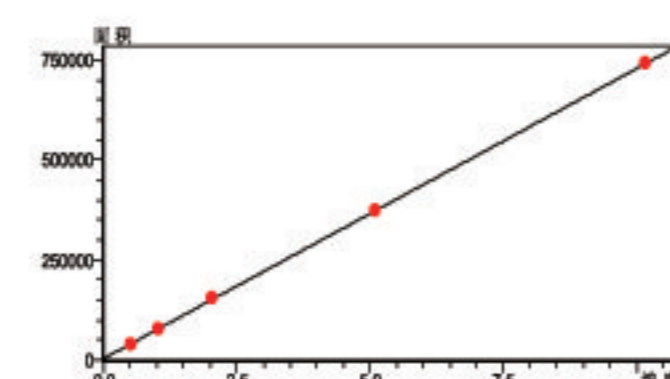


图6 黄曲霉毒素B1的校准曲线

2、重现性试验

连续进样（混合标样，B1、G1，1.0 ng/mL；B2、G2，0.30 ng/mL），考察各个组分的保留时间和峰面积重现性。保留时间RSD% < 0.5%，峰面积RSD% < 1%。

表3 重现性实验结果 (n=3)

组分	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
G2	0.20	0.71
G1	0.16	0.71
B2	0.24	0.62
B1	0.23	0.83

3、样品分析

按照1.2所述方法处理柏子仁样品，检出G2、B2、B1，样品色谱图见图7，检测结果见表4。我国外经贸部药用植物及制品进出口绿色行业标准（WM/T2-2004）中黄曲霉毒素B1限量为 $\leq 5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，柏子仁样品中B1含量大大超标。

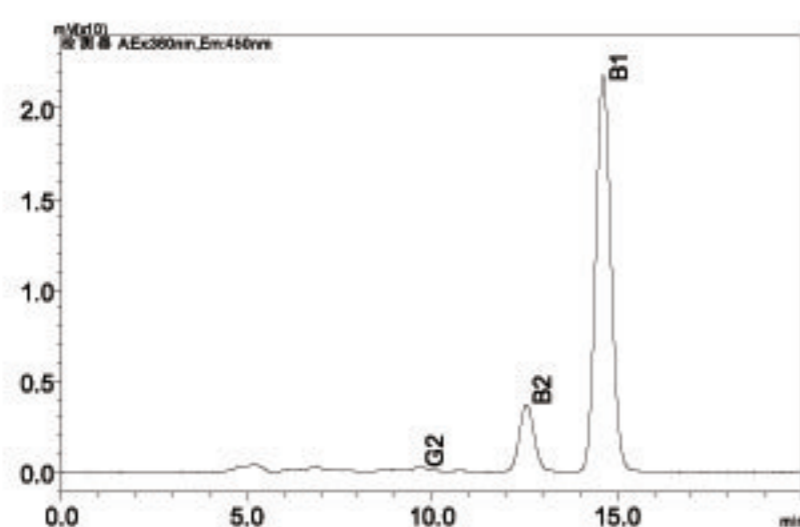


图7 样品色谱图

表4 样品检测结果

组分	浓度 (ng/mL)	含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
G2	0.092	0.75
G1	-	-
B2	0.65	5.30
B1	9.07	73.73

4、回收率试验

按照上述方法处理柏子仁样品，取样量减少50%，约2.5 g样品加标色谱图见图8。样品加标回收率在87.0%–107.4%之间，回收率结果见表5。

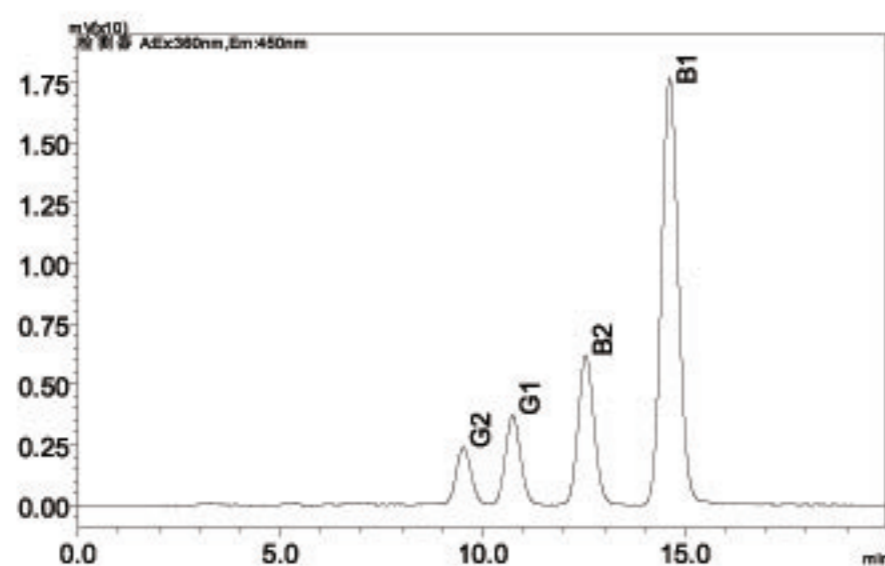


图8 样品加标色谱图

表5 回收率结果

组分	加标量(ng/g)	回收率%
G2	11.68	90.8
G1	39.76	87.0
B2	12.12	97.9
B1	40.72	107

结论

本文建立免疫亲和柱净化光化学衍生液相色谱法检测中药材柏子仁中的黄曲霉毒素方法。四种黄曲霉毒素线性范围B1、G1为0.50~20.0 ng/mL，B2、G2为0.15~6.0 ng/mL，线性相关系数R达0.999以上，LOD和LOQ范围分别在0.02~0.047 ng/mL和0.066~0.156 ng/mL，回收率87.0~107%。