

# 液相色谱柱后碘衍生法和柱后光衍生法 检测中药材中的黄曲霉毒素

No.LC-044

**摘要：**采用液相色谱柱后碘衍生法和柱后光衍生法检测中药材中的黄曲霉毒素，比较两者的线性、重现性、检测限、回收率，并应用于实际样品柏子仁的分析。两者的线性、重现性、检测限、回收率均良好且相似，均可用于中药材中黄曲霉毒素的检测。

**关键词：**柱后碘衍生法 柱后光衍生法 黄曲霉毒素 中药材

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 $\leq 5 \mu\text{g/kg}$ 。韩国中药材中黄曲霉毒素B1限量标准和试验方法中黄曲霉毒素B1限量为 $\leq 10 \mu\text{g/kg}$ 。

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版一部附录IXV黄曲霉毒素测定法中采用碘柱后衍生法对中药材中的黄曲霉毒素进行检测。

本文同时采用柱后碘衍生法和柱后光衍生法检测中药材中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2，并对分析结果进行比较。

## ■ 实验部分

### 1、仪器与试剂

#### 1.1 液相色谱系统

LC-10ADvp（输液泵），DGU-14A（在线脱气机），FCV-10Avp（低压梯度单元），SIL-HTC（自动进样器），CTO-10Avp（柱温箱），RF-10AXL（荧光检测器），SCL-10Avp（系统控制器），LCsolution（色谱工作站）；

#### 1.2 柱后衍生系统

柱后碘衍生系统：LC-10ADvp（衍生泵），CRB-6A（化学反应箱），碘衍生柱后反应管套件，包括：三通接头，衍生管（PTFE 0.5 mm I.D. × 1000 cmL.）

柱后光化学衍生装置，AURA公司，内置反应管（PTFE 0.5 mm I.D. × 1500 cmL.）；

#### 1.3 其它设备和试剂

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，Supeclo公司；甲醇，HPLC级，Merck公司；乙腈，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：**取中药材粉末约5 g（过二号筛，精确到0.01 g），置于锥形瓶中，精密加入60%甲醇溶液50 mL，往复振荡60 min。精密量取上清液5 mL，置于50 mL量瓶中，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10 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，收集洗脱液，置于2 mL量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤，待测。

### 3、分析条件

#### 3.1 碘衍生分析条件

液相分离条件

流动相：乙腈/甲醇/水 = 20/25/55 (v/v)

流速：0.8 mL/min

色谱柱：Intersil ODS-3 4.6 × 250 mm, 5 μm

柱温：40°C

进样体积：50 μL

检测波长：Ex=360 nm, Em = 440 nm

柱后衍生条件

衍生溶液：0.05%碘溶液（取0.5 g，加入甲醇100 mL，用水稀释至1000 mL）

流速：0.3 mL/min

衍生化温度：70°C

#### 3.2 光衍生分析条件

流动相：乙腈/甲醇/水 = 25/25/50 (v/v)

流速：0.8 mL/min

色谱柱：Intersil ODS-3 4.6 × 250 mm, 5 μm

柱温：40°C

进样体积：50 μL

检测波长：Ex=360nm, Em = 440nm

## 结果与讨论

### 1、线性范围及检出限

黄曲霉毒素混标进样液相色谱检测，碘衍生和光衍生法所得图谱如下图1、2所示。

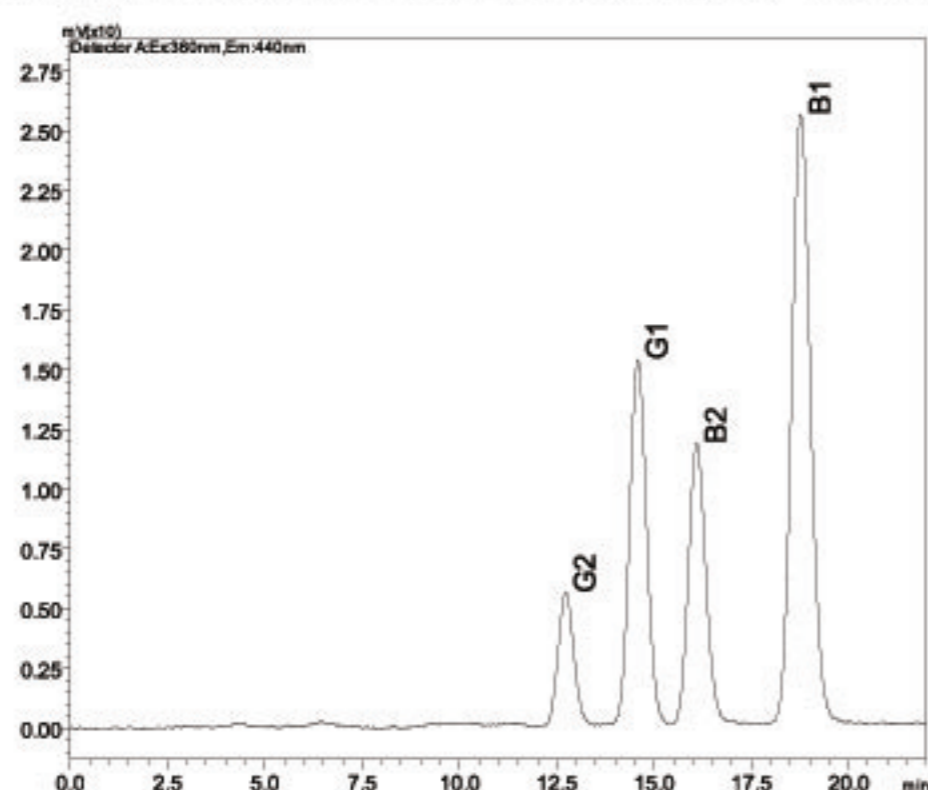


图1 碘衍生法混标溶液色谱图 (G2 : 1.5 ng/mL; G1 : 5.0 ng/mL; B2 : 1.5 ng/mL; B1 : 5.0 ng/mL)

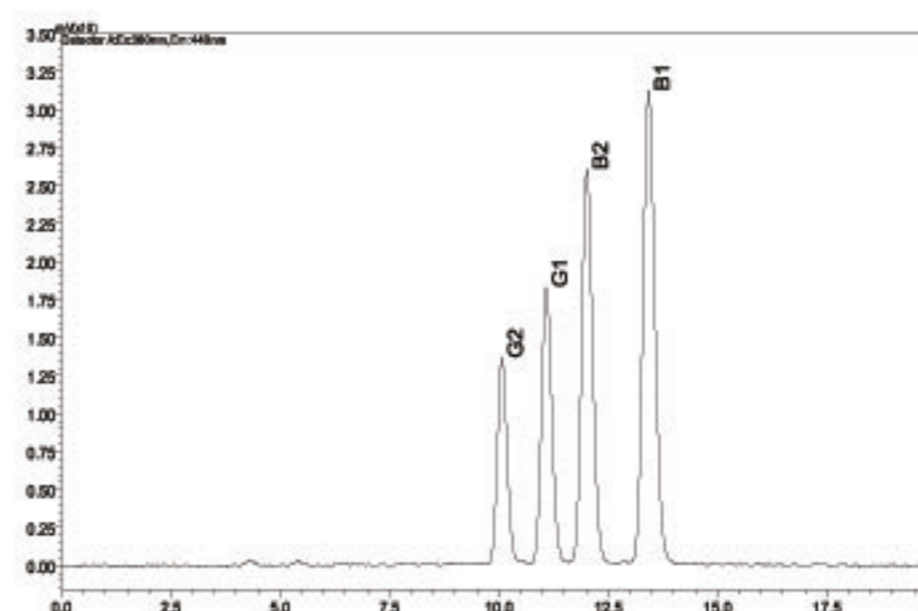


图2 光衍生法混标溶液色谱图 (G2 : 1.5 ng/mL; G1 : 5.0 ng/mL; B2 : 1.5 ng/mL; B1 : 5.0 ng/mL)

以B1、G1浓度分别为0.20、0.50、1.0、2.0、5.0 ng/mL；B2、G2浓度分别为0.06、0.15、0.30、0.60、1.5 ng/mL混标溶液，分别采用碘衍生和光衍生方法制作校准曲线，并进行比较，标准曲线图如图3-图6，标准曲线方程见表1。

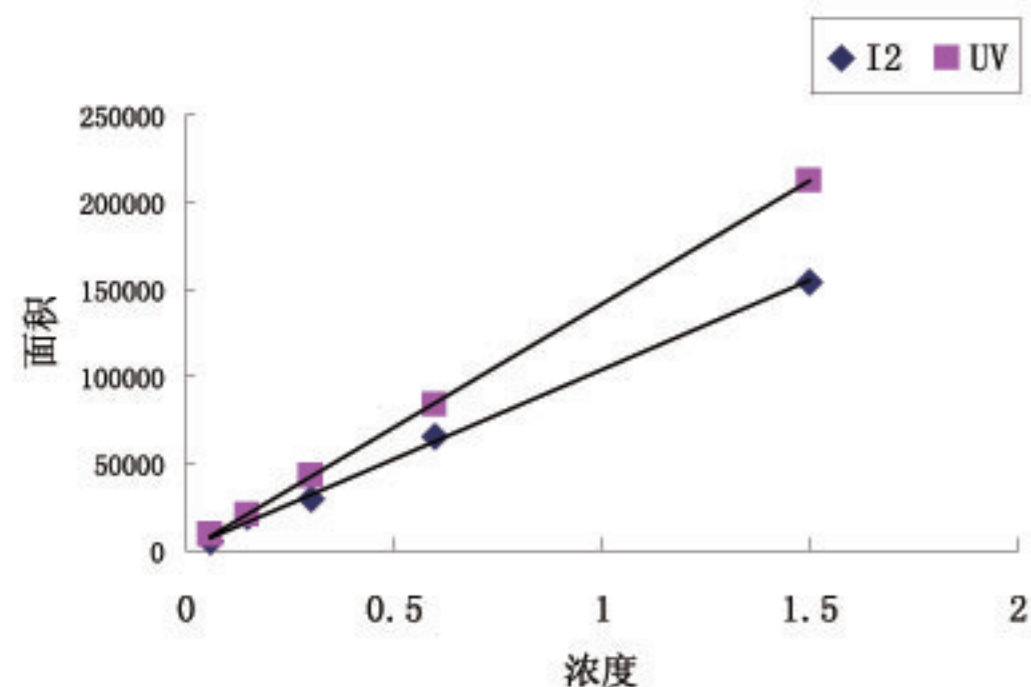


图3 黄曲霉毒素G2的校准曲线

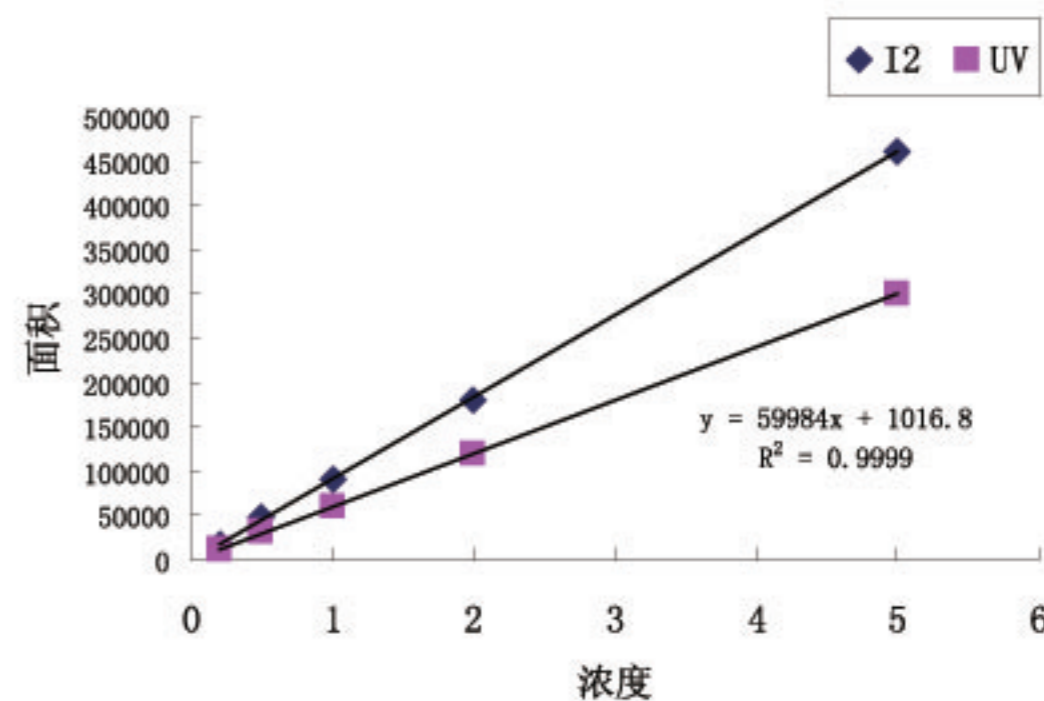


图4 黄曲霉毒素G1的校准曲线

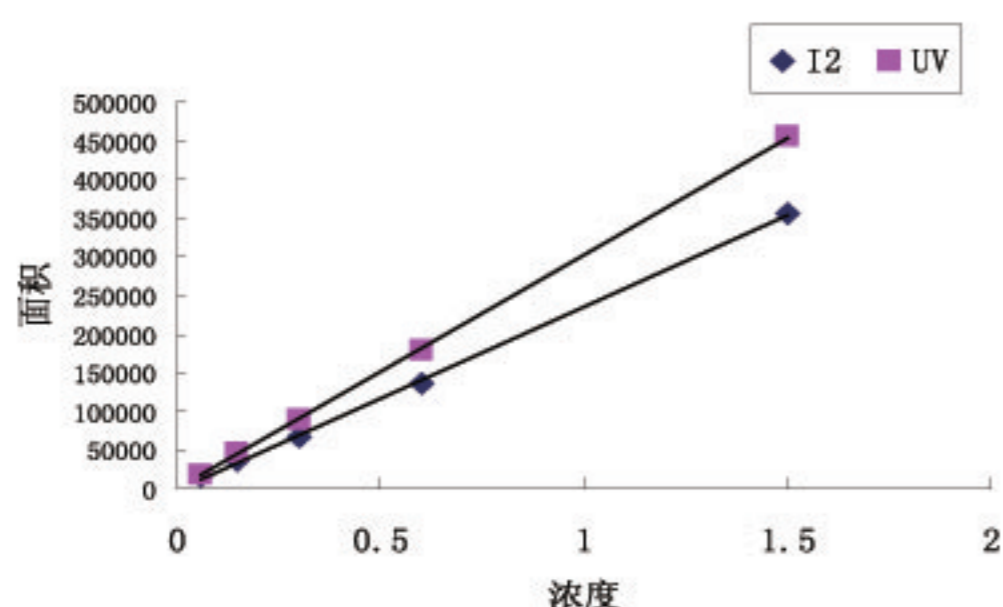


图5 黄曲霉毒素B2的校准曲线

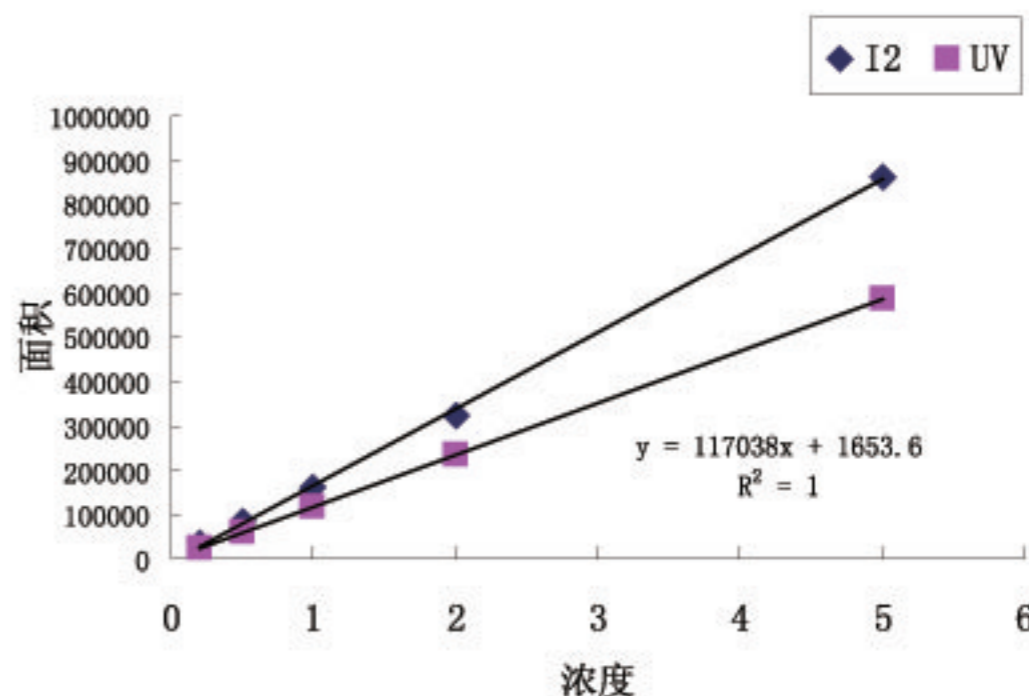


图6 黄曲霉毒素B1的校准曲线

表1 标准曲线方程

碘衍生法		
组分	Y=AX+B	R
G2	Y=98842X+405	0.999
G1	Y=90366X+728	0.999
B2	Y=215544X+2432	0.999
B1	Y=158510X+5598	0.999
光衍生法		
组分	Y=AX+B	R
G2	Y=137928X+631	0.999
G1	Y=59694X+1251	0.999
B2	Y=299943X+318	0.999
B1	Y=116411X+2161	0.999

四种AF的检出限和定量限, 见表2。

表2 四种AF的检出限

光衍生法四种 AF 的检出限		
组分	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
G2	0.028	0.09
G1	0.065	0.21
B2	0.015	0.05
B1	0.041	0.14
碘衍生法四种 AF 的检出限		
G2	0.070	0.23
G1	0.093	0.31
B2	0.032	0.11
B1	0.052	0.17

## 2、重现性试验

连续进样(混合标样, G2: 1.5 ng/mL; G1: 5.0 ng/mL; B2: 1.5 ng/mL; B1: 5.0 ng/mL), 分别采用碘衍生法和光衍生法进行分析, 考察各个组分的保留时间和峰面积重现性, 分析结果如下表3, 两者的保留时间RSD%<0.1%, 峰面积RSD%<1.0%。

表3 重现性实验结果 (n=3)

组分	碘衍生法		光衍生法	
	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%	保留时间 RSD%	峰面积 RSD%
G2	0.04	0.66	0.04	0.51
G1	0.04	0.62	0.06	0.57
B2	0.07	0.39	0.06	0.20
B1	0.05	0.84	0.07	0.22

## 3、样品分析

按照1.2所述方法处理柏子仁样品, 检出B2、B1, 样品色谱图见图7、8, 检测结果见表4。

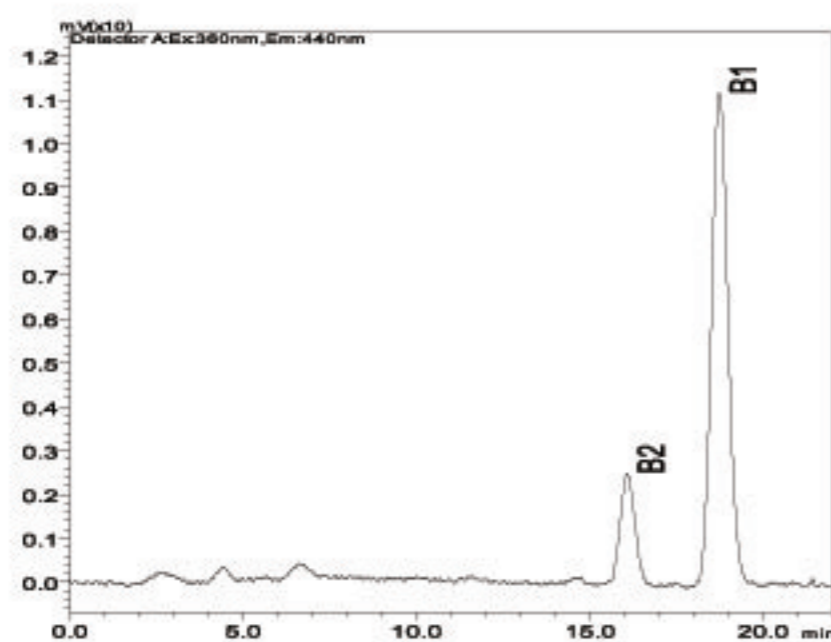


图7 碘衍生法样品色谱图

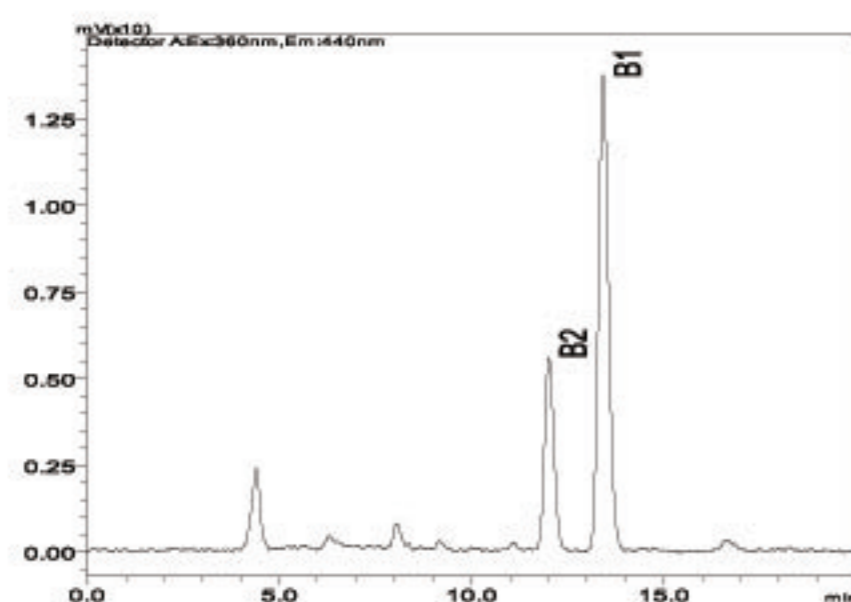


图8 光衍生法样品色谱图

表4 样品分析结果

组分	碘衍生		光衍生	
	浓度 (ng/mL)	含量 (μg/kg)	浓度 (ng/mL)	含量 (μg/kg)
G2	-	-	-	-
G1	-	-	-	-
B2	0.32	2.53	0.31	2.49
B1	2.21	17.67	2.15	17.18

#### 4、回收率试验

按照上述方法处理空白黄芪样品，样品加标色谱图见图9、10。样品加标回收率在80.0%–104.6%之间，回收率结果见表5和表6。

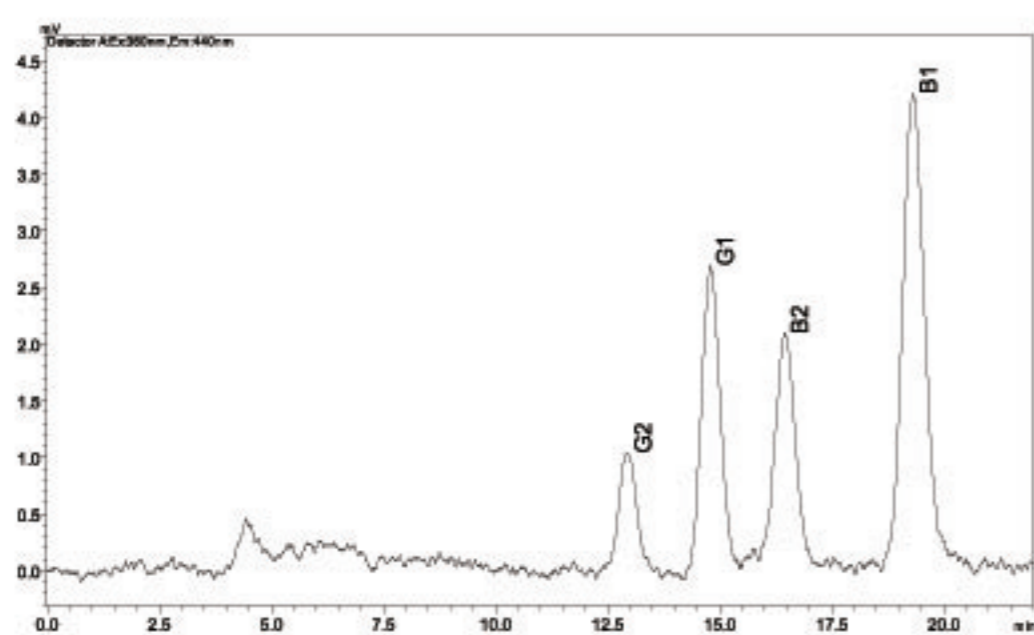


图9 碘衍生样品加标色谱图

表 5 碘衍生回收率结果

组分	加标量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率%
G2	3	104.6
G1	10	103.9
B2	3	90.0
B1	10	86.5

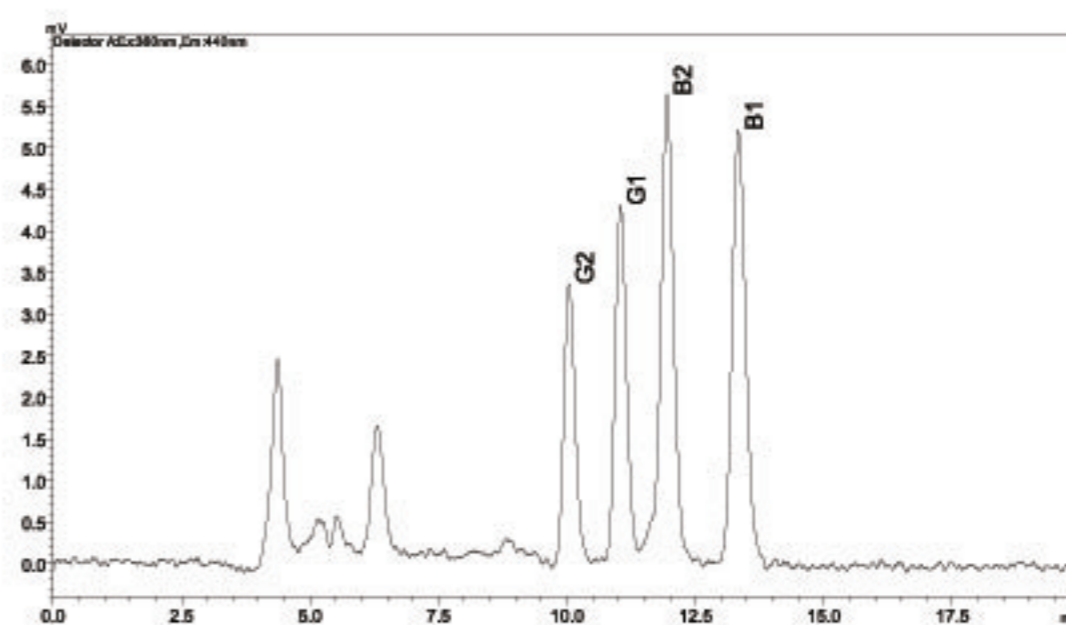


图10 光衍生样品加标色谱图

表 6 光衍生回收率结果

组分	加标量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	回收率%
G2	3	97.4
G1	10	93.2
B2	3	91.4
B1	10	80.0

#### ■ 结论

本文分别采用液相色谱柱后碘衍生法和柱后光衍生法对中药材中的黄曲霉毒素进行检测。两种方法的相关系数R均为0.999以上，保留时间和峰面积重现性均良好，回收率在80%~104%之间，且两者对阳性样品分析的结果一致。碘衍生法和光衍生法均可用于中药材中黄曲霉毒素的检测。