

高效液相色谱碘柱后衍生法测定中药材酸枣仁中的黄曲霉毒素 G2,G1,B2,B1 的含量

LC-069

摘要：本文使用岛津 LC-20A 液相色谱仪柱后衍生系统建立了碘柱后衍生荧光检测法测定中药材酸枣仁中黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 的方法。本方法采用 C18 色谱柱, 水 / 甲醇 =47/53(v/v) 为流动相, 0.05% 碘溶液为碘柱后衍生试剂, 荧光检测器的检测波长为激发波长: 360 nm, 发射波长: 450 nm。G2、B2 在 0.006-1.50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度范围内标准曲线的线性相关系数 $r=0.9999$, 线性关系良好。G1、B1 在 0.20-5.00 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内标准曲线的线性相关系数 $r=0.9999$, 线性关系良好。对 G2,B2 浓度为 0.3 $\mu\text{g/L}$, G1,B1 浓度为 1.0 $\mu\text{g/L}$ 的六个平行标准品进行分析, 重复性结果 (RSD% 表示): G2 的保留时间 RSD 为 0.02%, 峰面积 RSD 为 0.6%; G1 的保留时间 RSD 为 0.02%, 峰面积 RSD 为 0.6%; B2 的保留时间 RSD 为 0.04%, 峰面积 RSD 为 0.6%; B1 的保留时间 RSD 为 0.03%, 峰面积 RSD 为 0.6%, 结果的重复性良好。仪器检出限为 G2: 0.002 $\mu\text{g/kg}$; G1: 0.001 $\mu\text{g/kg}$; B2: 0.002 $\mu\text{g/kg}$; B1: 0.001 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 G2: 0.008 $\mu\text{g/kg}$; G1: 0.004 $\mu\text{g/kg}$; B2: 0.006 $\mu\text{g/kg}$; B1: 0.003 $\mu\text{g/kg}$, 具有较高的检测灵敏度。

关键词：酸枣仁, 黄曲霉毒素 G2,G1,B2,B1, 碘柱后衍生

黄曲霉毒素被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 1 类致癌物, 是一种毒性极强的剧毒物质。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用, 严重时可导致肝癌甚至死亡。

在天然污染的食品和中药材中以黄曲霉毒素 B1 最为多见, 其毒性和致癌性也最强。B1 是最危险的致癌物。它们在紫外线照射下能产生荧光, 根据荧光颜色不同, 将其分为 B 族和 G 族两大类及其衍生物, 黄曲霉毒素的主要分子型式含 G2, G1, B2, B1 等。B1 为毒性及致癌性最强的物质。

美国在 FDA “遵守政策指南 (Compliance Policy Guide)” 委员会决定 2007/563/EC 中对黄曲霉毒素在食品、牛奶、花生及其制品、坚果 (包括巴西坚果、阿月浑子果仁) 中的限量作出规定: 人类消费食品和奶牛饲料中的黄曲霉毒素含量 (指 G2+G1+B2+B1 的总量) 不能超过 20 $\mu\text{g/kg}$ 。

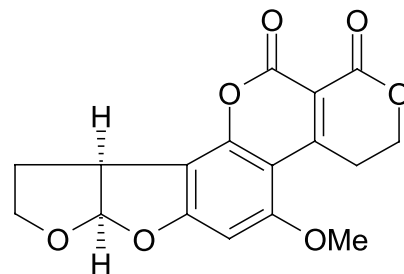
日本在肯定列表制度中规定: 食品中黄曲霉毒素的限量是 10 $\mu\text{g/kg}$ 。

欧盟在委员会条例 (EC) No 629/2008、(EC) No

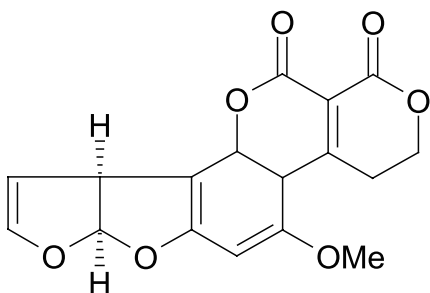
1881/2006 中, 对黄曲霉毒素在花生、谷类、坚果等食品中的限量作出明确规定: 黄曲霉毒素含量 (指 G2+G1+B2+B1 的总量) 不能超过 4 $\mu\text{g/kg}$ 。

我国 2010 版中国药典质量标准中规定每 1000g 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 。

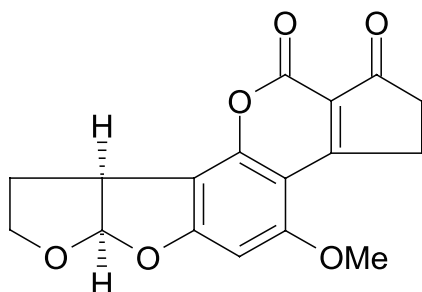
本实验应用岛津高效液相色谱 LC-20A 柱后衍生系统建立了一种对黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 的碘柱后衍生荧光检测方法, 并应用于酸枣仁样品的分析。



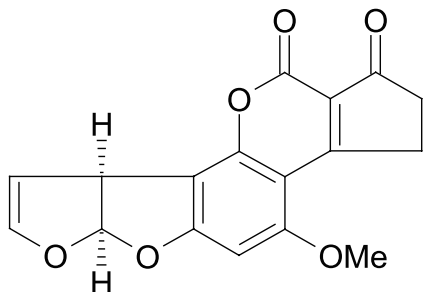
黄曲霉毒素G2的化学结构式



黄曲霉毒素G1的化学结构式



黄曲霉毒素B2的化学结构式



黄曲霉毒素B1的化学结构式

实验部分

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂：

甲醇：HPLC 级

水：超纯水。

黄曲霉毒素混标储备液：精密量取黄曲霉毒素混合标准品(黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 标示浓度分别为 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 0.3 $\mu\text{g/mL}$, 1.0 $\mu\text{g/mL}$) 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 甲醇稀释至刻度, 作为储备液。

1.1.2 仪器：

LC-20A, 包括 CBM-20A 系统控制器, LC-20AD 高精度溶液输送泵 $\times 3$, DGU-20A₅ 在线脱气机, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 柱温箱, CRB-6A 柱后衍生反应箱, RF-20A 荧光检测器。

1.2 分析条件

色谱柱：Inertsil ODS-3

(4.6 mm I.D. X 250 mm L, 5 μm)

流动相：A - 水, B - 甲醇, A/B=47/53 (v/v);

流速：1.0 mL/min;

洗脱方式：等度洗脱

柱温：40 ;

荧光检测波长：激发波长 $E_x=350 \text{ nm}$,
发射波长 $E_m=450 \text{ nm}$;

进样量：25 μL 。

柱后衍生条件：

衍生试剂：0.05% 碘溶液 (取 0.5 g, 加入 100 mL 甲醇, 超纯水定容至 1000 mL)

流速：0.3 mL/min

衍生化温度：70

1.3 样品处理

1.3.1 黄曲霉毒素混合标准品的配制

取不同量的黄曲霉毒素储备液, 用甲醇稀释, 配制浓度为 G2, B2 浓度为 0.006, 0.012, 0.30, 0.60 及 1.50 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列; G1, B1 浓度为 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准系列, 储存在棕色小瓶中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放。

1.3.2 试样的制备

取供试品粉末约 10 g, 精密称定, 加入氯化钠 2 g, 精密加入 70% 甲醇溶液 100 mL, 超声处理 20 分钟, 离心 5 分钟 (离心速度 8000 转/分), 精密量取上清液 10 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 25 mL, 通过免疫亲和柱, 流速每分钟 2-3 mL, 用水 5 mL 淋洗, 洗液弃去, 使空气进入柱子, 再用甲醇 1.4 mL 分 2 次洗脱, 收集洗脱液, 用水定容至 2 mL, 即得。

■ 结果与讨论

2.1 黄曲霉毒素标准谱图及标准曲线

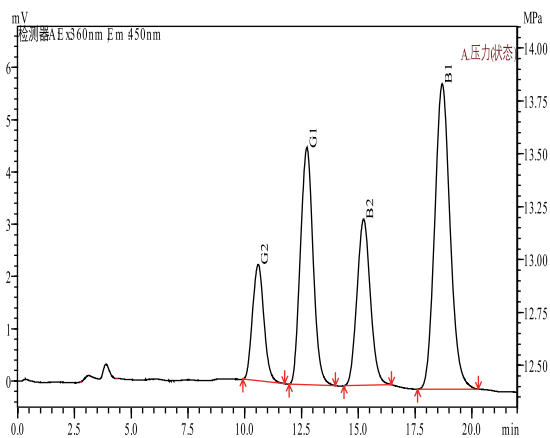


图1 黄曲霉毒素混合标准品10.0 µg/L的色谱图

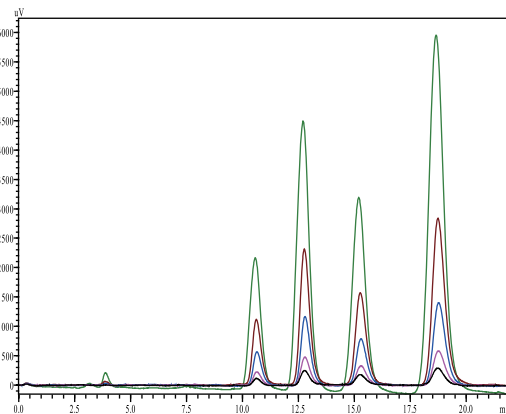


图2 五个不同浓度的黄曲霉毒素混合标准品的色谱图

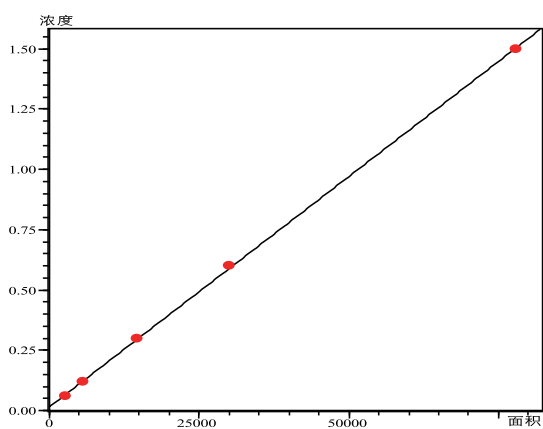


图3 G2标准校准曲线
 $Y=1.908e-005X+1.583e-002$ $R=0.9999$

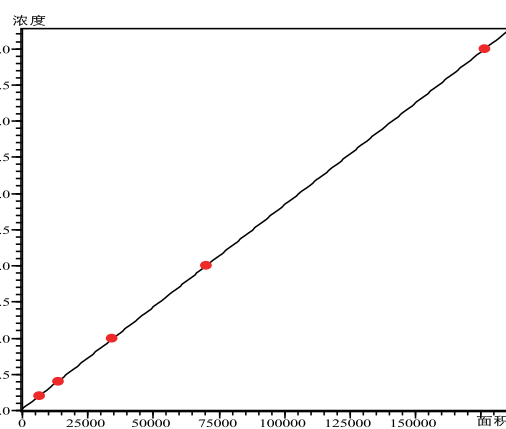


图4 G1标准校准曲线
 $Y=2.820e-005X+2.184e-002$ $R=0.9999$

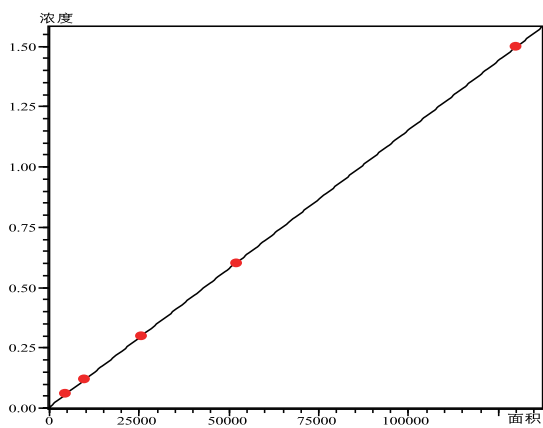


图5 B2标准校准曲线
 $Y=1.148e-005X+5.480e-003$ $R=0.9999$

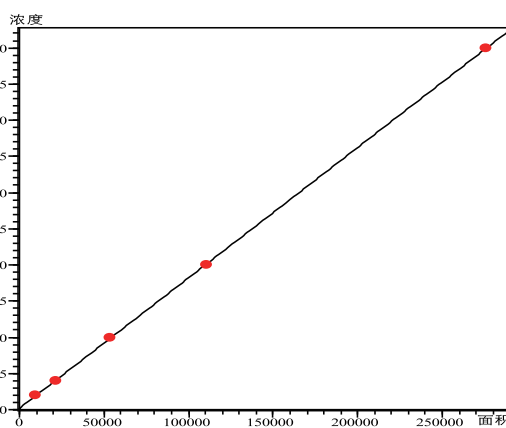


图6 B1标准校准曲线
 $Y=1.803e-005X+1.882e-002$ $R=0.9999$

2.2 方法的重复性

为了进一步考察该方法的重复性，本文分别对 G2, B2 浓度为 0.60 $\mu\text{g/L}$ ，G1, B1 浓度为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 的黄曲霉毒素混合标准样品进行了 6 次重复实验，重复性结果 (RSD% 表示)：G2 的保留时间 RSD 为 0.02%，峰面积 RSD 为 0.60%，G1 的保留时间 RSD 为 0.02%，峰面积 RSD 为 0.60%，B2 的保留时间 RSD 为 0.04%，峰面积 RSD 为 0.60%，B1 的保留时间 RSD 为 0.03%，峰面积 RSD 为 0.60%，结果汇总如下表。

表1 黄曲霉毒素G2 0.6 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液，G1 2.0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的保留时间和峰面积的重复性结果

No.	保留时间(min)		峰面积	
	G2	G1	G2	G1
物质				
数据 1	10.614	12.761	30284	70179
数据 2	10.619	12.764	29966	70407
数据 3	10.619	12.765	30108	70796
数据 4	10.614	12.759	30457	70247
数据 5	10.615	12.762	30333	70772
数据 6	10.615	12.761	30361	71544
平均	10.616	12.762	30252	70658
RSD%	0.02	0.02	0.60	0.60

表2 黄曲霉毒素B2 0.6 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液，B1 2.0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的保留时间和峰面积的重复性结果

No.	保留时间(min)		峰面积	
	B2	B1	B2	B1
物质				
数据 1	15.255	18.732	51895	113102
数据 2	15.266	18.737	52588	111836
数据 3	15.268	18.737	52671	112187
数据 4	15.255	18.724	52853	111267
数据 5	15.261	18.735	52684	112924
数据 6	15.251	18.723	52936	112004
平均	15.259	18.731	52605	112220
RSD%	0.04	0.03	0.60	0.60

样品分析

按照 1.3.2 所述步骤处理酸枣仁样品，检测出黄曲霉毒素 G1, G2, B1, B2。

图 7 为酸枣仁样品色谱图。图 8 为 G1、B1 加标 0.75 $\mu\text{g/L}$ ，G2、B2 加标 2.5 $\mu\text{g/L}$ 色谱图。得出结果见表 3。

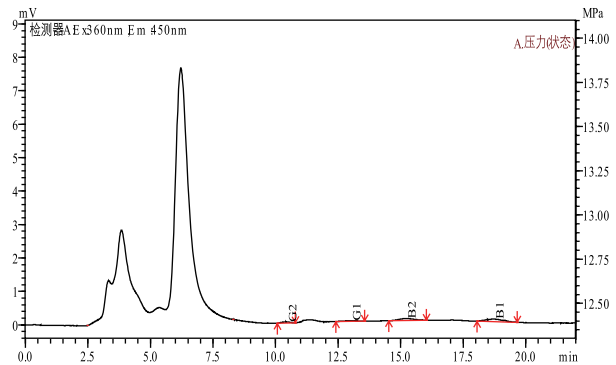


图7 酸枣仁样品色谱图

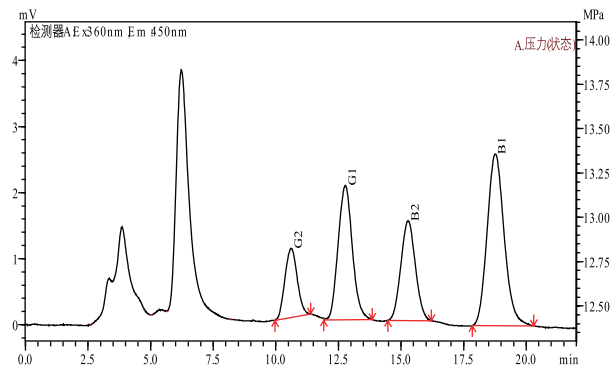


图8 酸枣仁样品加标图

表3 酸枣仁样品加标回收率表

物质	浓度 ($\mu\text{g/L}$)	加标量 ($\mu\text{g/L}$)	实测浓度 ($\mu\text{g/L}$)	回收率 %
G2	0.032	0.75	0.747	95.33
G1	0.043	2.5	2.435	95.68
B2	0.046	0.75	0.714	89.07
B1	0.084	2.5	2.430	93.84

为考察方法的灵敏度，对浓度为 0.06 $\mu\text{g/L}$ 的标准品进行分析，得到色谱图如图 9 所示，此时信噪比为 G2 : 15.852, G1 : 33.062, B2 : 21.457, B1 : 38.481。经计算得到此分析方法的检出限，定量限见表 4。

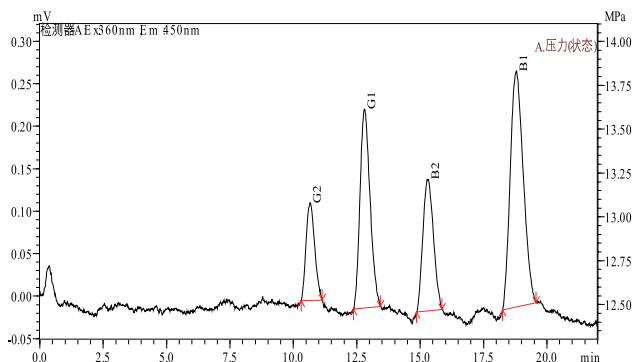


图9 浓度为0.06 $\mu\text{g/L}$ 标准品的色谱图

表4 黄曲霉毒素仪器检出限，定量限

物质	检出限 ($\mu\text{g/L}$)	定量限 ($\mu\text{g/L}$)	检出限 ($\mu\text{g/kg}$)	定量限 ($\mu\text{g/kg}$)
G2	0.011	0.038	0.002	0.008
G1	0.005	0.018	0.001	0.004
B2	0.008	0.028	0.002	0.006
B1	0.004	0.015	0.001	0.003

结论

本实验中使用 LC-20A 柱后衍生系统，开发了中药材酸枣仁中黄曲霉毒素 G2, G1, B2, B1 的碘柱后衍生检测方法。本法具有快速，线性、重复性好和灵敏度高等优点。