

HPLC 法测定虫草发酵粉中黄曲霉毒素残留量*

刘丽娜¹, 王莹², 金红宇¹, 马双成¹, 林瑞超¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 北京华安麦科生物技术有限公司, 北京 102200)

摘要 目的: 建立虫草发酵粉中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的残留量测定方法。方法: 样品经有机溶剂提取、免疫亲和柱净化后, 利用高效液相色谱-光化学衍生-荧光检测器进行分析测定。结果: 黄曲霉毒素 G₂、B₂ 在 1.5 ~ 150 pg 范围内线性关系良好, 黄曲霉毒素 G₁、B₁ 在 5 ~ 500 pg 范围内线性关系良好, $r > 0.9998$ 。回收率在 80% ~ 93% 之间。结论: 该方法快速简便、准确, 可作为虫草发酵粉黄曲霉毒素的残留量测定方法, 亦可作为原料药的黄曲霉毒素筛查方法, 以达到控制产品质量的目的。

关键词: 高效液相色谱; 黄曲霉毒素; 免疫亲和柱; 虫草发酵粉

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)07-1256-04

HPLC residual determination of aflatoxins in a fermented cordyceps powder *

LIU Li-na¹, WANG Ying², JIN Hong-yu¹, MA Shuang-cheng¹, LIN Rui-chao¹

(1. National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China;

2. Huan Magnech Bio-Tech Co. Ltd., Beijing 102200, China)

Abstract Objective: To establish a rapid and accurate method for the residual determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in a fermented cordyceps powder. **Methods:** After extracted by organic solvent, purified by immunoaffinity column, aflatoxins were analysed by HPLC with fluorescence detection after photochemistry derivation. **Results:** Aflatoxin G₂, B₂ showed a good linear relationship at a range of 1.5 - 150 pg, and aflatoxins G₁, B₁ at a range of 5 - 500 pg, $r > 0.9998$. The recovery was between 80% - 93%. **Conclusion:** The method is simple, accurate and can be used to determine aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in a fermented cordyceps powder. It also can be used as raw material drug screening methods of aflatoxins in order to control product quality.

Key words: HPLC; aflatoxins; immunoaffinity column; fermented cordyceps powder

黄曲霉毒素可以由黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪溜曲霉 4 种曲霉菌产生, 是一组化学结构类似的二呋喃香豆素的衍生化合物。黄曲霉毒素是由一组大约 17 种相关的真菌代谢产物组成, 在植物来源的食物中通常只污染黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 其中产生黄曲霉毒素 B₁ 的量比其他黄曲霉毒素多, 而且 B₁ 的毒性最强, 急性毒性是氰化钾的 10 倍, 慢性中毒可诱发肝癌。黄曲霉毒素可通过多种途径污染食品和饲料, 直接或间接进入人类食物链, 从而威胁人类健康和生命安全, 对人体及动物器官尤其是肝脏损害严重, 其诱发肝癌的能力比二甲基亚硝胺大 75 倍^[1]。中药在采集、贮藏、制备、运输过程中如保存

不当极易受潮霉变而污染黄曲霉毒素。

虫草发酵药物所使用的某些原料可能被黄曲霉毒素污染, 发酵过程的高温高湿环境也易造成黄曲霉污染^[2], 所以应制订虫草发酵药物的黄曲霉毒素检查项, 以控制产品质量, 保证用药安全。

黄曲霉毒素是小分子物质, 在免疫学上属于半抗原, 不能直接产生抗体, 需要偶联到大分子物质上, 制成人工抗原后才具有免疫性。用此人工抗原免疫动物后, 可得到高特异、高效价的单克隆抗体。再将一定量的抗体固定在合适的担体上, 即可制成相应的免疫亲和柱。免疫亲和净化技术具有灵敏度高、特异性强、回收效果好的特点, 并且操作简单、

* “十一五”国家重大科技专项课题——中药中有害残留物检测技术标准平台(课题编号: 2009ZX09 308-006)

第一作者 Tel: (010) 67095424; E-mail: kllln@163.com

快速,是分析黄曲霉毒素样品理想的净化方法^[3,4]。

本实验建立了高效液相色谱法测定虫草发酵粉中黄曲霉毒素残留量的方法,并进行了方法学验证。其线性、精密度、回收率均符合要求,可作为虫草发酵粉中黄曲霉毒素的残留量测定方法。

1 仪器和材料

Waters 2695 型高效液相色谱单元,配 Waters 2475 荧光检测器(美国 WATERS 公司);光化学衍生器(美国 VICAM,紫外光灯 254 nm);AE 240 型十万分之一电子分析天平(瑞士 METTLER 公司);旋转振荡器(江苏太仓市实验设备厂);Z2064 离心机(德国 HERMLE 公司);Milli-Q 超纯水处理系统。

发酵虫草胶囊及原料药由 A 公司提供;甲醇、乙腈均为色谱纯;水为高纯水;黄曲霉毒素混合标准品(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂)由 SUPELCO 公司提供(Lot: LB 62461);黄曲霉总量(B₁、B₂、G₁、G₂)免疫亲和层析柱(北京华安麦科生物技术有限公司)。

2 实验方法

2.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 Venusil MP C₁₈(5 μm, 4.6 mm × 150 mm);柱温: 40 °C;以甲醇-乙腈-水为流动相,按表 1 中的梯度比例进行梯度洗脱,流速 1.1 mL · min⁻¹;采用柱后光化学衍生法:光化学衍生器(254 nm);以荧光检测器检测,激发波长 λ_{ex} = 360 nm,发射波长 λ_{em} = 450 nm。进样量: 50 μL。

表 1 HPLC 梯度洗脱程序
Tab 1 HPLC gradient elution

t/min	A: 乙腈 (acetonitrile) /%	B: 甲醇 (methanol) /%	C: 水 (water) /%
0	10	25	65
17	10	45	45
20	10	65	25
22	10	65	25
23	10	25	65

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液 精密量取黄曲霉毒素混合标准品(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂标示浓度分别为 1.0 0.3 1.0, 0.3 μg · mL⁻¹) 0.5 mL,置 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀作为储备液。精密量取储备液 1 mL,置 25 mL 量瓶中,用 70% 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀即得。

2.2.2 供试品溶液 取供试品粉末约 5 g,精密称定,精密加入 70% 甲醇溶液 50 mL,振摇 20 min,离心 5 min(离心速度 2500 r · min⁻¹) 精密量取上清液 5 mL,置 50 mL 量瓶中,加入 70% 甲醇溶液 5

mL,用水稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 的微孔滤膜滤过,精密量取续滤液 25 mL,通过免疫亲和层析柱,流速每分钟 3 mL,用水 20 mL 分 2 次洗脱,洗脱液弃去,使空气进入柱子,将水挤出柱子,再用 1.5 mL 甲醇分次洗脱,收集洗脱液,浓缩至 0.7 mL,并用水稀释至 1 mL,摇匀,即得。

2.2.3 空白溶液 取 70% 甲醇溶液 50 mL,按“2.2.2”项下方法自“振摇 20 min”起操作,即得。

2.2.4 测定法 精密吸取上述供试品溶液 50 μL,注入液相色谱仪,即得。

3 方法学考察

3.1 检出限与定量限 将混合品适当稀释后制得一系列不同浓度的溶液,进样分析,以信噪比 S/N = 3 作为检出限, S/N = 10 作为定量限,检出限与定量限见表 2(单位: pg)。

表 2 检测限与定量限

Tab 2 Limit of detection and limit of quantitation

	B1	B2	G1	G2
LOD	0.49	0.20	0.66	0.33
LOQ	1.27	0.89	1.41	1.15

3.2 线性关系 将黄曲霉毒素混合标准品适当稀释后制得一系列不同浓度的溶液,进样分析,测定各色谱峰峰面积(Y)对黄曲霉毒素的绝对量(X, pg)进行回归。结果表明,黄曲霉毒素 G₂、B₂ 在 1.5~150 pg 范围内线性关系良好,黄曲霉 G₁、B₁ 在 5~500 pg 范围内线性关系良好, r > 0.9998。黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的标准曲线回归方程及线性范围分别为:

$$Y = 81508X + 341.23 \quad r = 0.9999$$

$$\text{线性范围: } 5.55 \sim 555.0 \text{ pg}$$

$$Y = 54385X - 1716.7 \quad r = 0.9998$$

$$\text{线性范围: } 1.64 \sim 164.5 \text{ pg}$$

$$Y = 49903X + 3079.9 \quad r = 0.9998$$

$$\text{线性范围: } 5.20 \sim 519.5 \text{ pg}$$

$$Y = 32267X + 348.35 \quad r = 0.9999$$

$$\text{线性范围: } 1.60 \sim 160.4 \text{ pg}$$

3.3 精密度试验 将黄曲霉毒素对照品溶液(B1 浓度: 2 ng · mL⁻¹) 连续进样 6 次,以各色谱峰的峰面积值计算 RSD, G₂、G₁、B₂、B₁ 的 6 针精密度均小于 3.0%,表明精密度良好。

3.4 回收率试验 对该方法进行添加回收试验,添加浓度以黄曲霉毒素 B1 计分别为高(10 μg · kg⁻¹)、中(2 μg · kg⁻¹)、低(0.5 μg · kg⁻¹) 3 个浓度。分别取样品(批号 090914,阴性样品) 5 g,各加入混合储备液(黄曲霉毒素 B1 含量为 50 ng · mL⁻¹)

4 0.8 0.2 mL, 分别加 70% 甲醇溶液至 50 mL, 按 结果见表 3。

“2.2.2”项下方法自“振摇 20 min”起操作 进样测定。

表 3 回收率测定结果(%)

Tab 3 Recovery of assay

	低 1 (low 1)	低 2 (low 2)	低 3 (low 3)	中 1 (medium 1)	中 2 (medium 2)	中 3 (medium 3)	高 1 (high 1)	高 2 (high 2)	高 3 (high 3)	平均回收率 (average recovery)	RSD/%
G2	80.66	76.49	87.92	79.72	79.28	76.33	87.00	86.14	88.20	82.41	5.93
G1	79.47	78.48	85.31	77.89	81.02	74.33	83.75	81.31	78.20	79.97	4.13
B2	102.29	105.04	109.85	86.28	84.84	86.61	88.38	88.13	80.70	92.46	11.23
B1	98.83	106.88	110.17	92.98	95.04	89.13	85.61	86.18	75.96	93.42	11.54

4 样品测定

分别按建立的方法测定了 A 公司生产的 6 批虫草发酵粉(批号:090914 091027 091028 091029, 080421 080424)样品和 A 公司提供的几种原料的黄曲霉毒素含量,其中 6 批样品和 4 种原料中均未检出黄曲霉毒素(检出限:0.4 pg),而原料蚕蛹粉中检出了较高的黄曲霉毒素含量。结果见图 1~3 表 4。

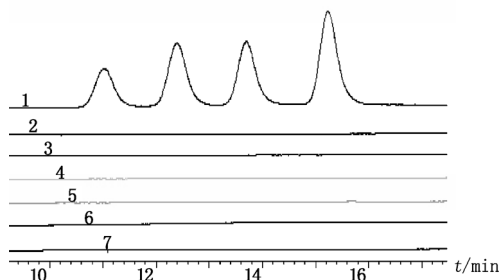


图 1 样品色谱图(未检出)

Fig 1 Chromatograms of samples(not detection)

1. 混合黄曲霉毒素对照品(reference substances of mix - aflatoxins)
2. 批号(lot number): 090914
3. 批号(lot number): 091027
4. 批号(lot number): 091028
5. 批号(lot number): 091029
6. 批号(lot number): 080421
7. 批号(lot number): 0280424

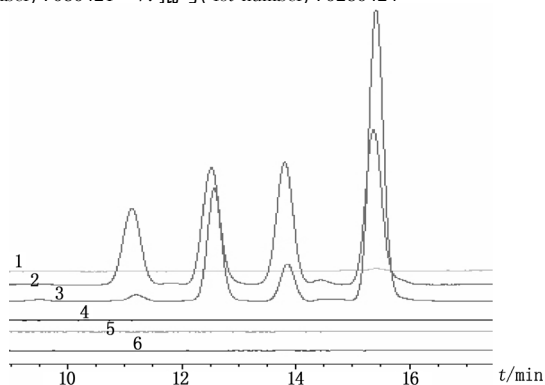


图 2 原料色谱图

Fig 2 Chromatograms of raw materials

1. 鱼冻(jelly - stock)
2. 混合黄曲霉毒素对照品(reference substances of mix - aflatoxins)
3. 蚕蛹粉(powder of silkworm pupa)
4. 玉米粉(powder of corn)
5. 肉脰(meat peptone)
6. 酵母粉(yeast powder)

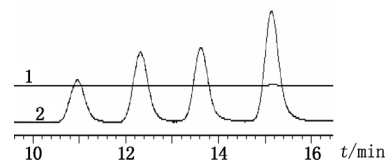


图 3 空白溶液色谱图

Fig 3 Chromatograms of blank solution

1. 空白溶液(blank solution)
2. 混合黄曲霉毒素对照品溶液(reference substances of mix - aflatoxins)

表 4 样品黄曲霉毒素测定结果($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Tab 4 Results of aflatoxin determination of samples

($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

名称(name)	B1	B2	G1	G2	总和(total)
蚕蛹粉 (powder of silkworm pupa)	13.87	0.62	6.19	ND	20.68

5 结果确证

取阳性检出结果的供试品溶液, 进行 LC - MS/MS 测定, 证实确为黄曲霉毒素。

6 讨论

6.1 紫外线对低浓度黄曲霉毒素有一定的破坏性, 所以混合黄曲霉毒素对照品储备液应配制在棕色量瓶中, 并避光保存。混合黄曲霉毒素对照品溶液则需临用新配, 并注意避光。

6.2 黄曲霉毒素在中药材中的分布非常不均匀^[5], 尤其是颗粒状样品, 如柏子仁、玉米等, 而且黄曲霉毒素并不集中在颗粒表面, 而是常常包裹在种子内部, 并且与某些成分结合在一起, 加之含量甚微, 所以为保证取样均匀, 应尽可能的将样品粉碎, 并且应适当地加大取样量。

6.3 国标^[6]黄曲霉毒素测定采用的流动相是甲醇 - 水等度系统, 而本文则采用了乙腈 - 甲醇 - 水梯度洗脱, 可获得更高的柱效, 更有助于使各黄曲霉峰与杂质峰分离, 并大幅提高了信噪比, 降低检出限。

6.4 本法基于免疫亲和柱对黄曲霉毒素的专一选

择性,利用 HPLC 的良好分离效果,结合光化学衍生反应,以增强 B₁ 和 G₁ 的荧光强度,从而达到灵敏、准确的检测效果。本实验采用的光化学衍生池是利用紫外光照射,使流动相光解出具有荧光特性的基团,与黄曲霉 B₁、G₁ 反应,生成荧光特性更强、更稳定的物质,解决了黄曲霉毒素 B₁、G₁ 在水溶液中有荧光淬灭的现象。2010 年版中国药典^[7]黄曲霉毒素测定采用的是碘衍生法,操作较为烦琐。光化学衍生池的衍生效果在操作过程、检测时间及耗材等方面均优于碘衍生法,更加方便、准确、省时。同时,光化学衍生器可以方便地进行开关操作,在一定程度上可以有效地排除假阳性。该方法也被欧洲药典、韩国药品标准广泛采用。

6.5 “危险性分析”已经成为各国制定和实施食品安全标准的重要理论和手段。其中危险性分析包括:危险性评估、危险性管理、危险性交流。其中危险性评估包括:危险识别、危害特征描述、摄入量评估和危险性特征描述。所以,限量标准不仅仅取决于物质的毒性,还取决于接触的机会、接触的剂量和吸收速度与程度等多种因素^[8]。由于我国还缺少黄曲霉毒素危险性分析的相关数据,所以参考食品黄曲霉毒素限量^[9]、2010 年版中国药典^[7]及相关文献^[10]对药材中黄曲霉毒素限度规定,结合国外相关研究数据,暂定最大残留限量(MRL)为“每 1000 g 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”。本方法的定量限为 0.2 μg · kg⁻¹,已低于 MRL 的 1/10,符合相关残留分析国际规范的要求。但中药成分复杂,基质干扰严重,有时会出现假阳性干扰,因此需要对其进行确证,本实验对检出的阳性样品进行了 LC-MS/MS 确证,证实确为黄曲霉毒素。

6.6 此方法可作为虫草发酵粉中黄曲霉毒素的测定方法,亦可作为原料药的黄曲霉毒素筛查方法,从源头把关而达到更好的控制产品质量的目的。对欲购入的原料进行了黄曲霉毒素筛查,其中,蚕蛹粉检出了较高的黄曲霉毒素含量,弃之未用,从而避免了更大的经济损失。玉米粉中虽未检出黄曲霉毒素,

但因玉米粉较易污染黄曲霉毒素,亦应作为监测重点。

参考文献

- 1 ZHANG Yi-bing(张艺兵),BAO Lei(鲍蕾),ZHU Qing-hua(褚庆华). Detection of mycotoxins in agricultural products(农产品中真菌毒素的检测分析). Beijing(北京) Chemical Industry Press(化学工业出版社) 2006. 5
- 2 LU Zhi-yan(卢志雁),YE Jin-wen(叶锦文),YUAN Wen-ping(苑文平),et al. Determination and analysis of aflatoxins in seven kinds of drugs(七种药物中黄曲霉毒素测定与分析). *Stud J Tradit Chin Med* (中医药学刊) 2001, 19(5): 527
- 3 ZHENG Rong(郑荣),MAO Dan(毛丹),WANG Ke(王柯),et al. HPLC determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in traditional Chinese medicine(HPLC 法测定中药中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2005, 25(6): 610
- 4 DAI Bo(戴博),JIN Hong-yu(金红宇),TIAN Jin-gai(田金改),et al. Progress achieved in determination method of extrinsic harmful residues in traditional Chinese medicine (中药中外源性有害残留物检测方法研究进展). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008, 28(6): 1014
- 5 Cole RJ, Dorner W J. Extraction of aflatoxin from naturally contaminated peanuts and solvent/peanut ratios. *J AOAC*, 1994, 77(6): 1509
- 6 GB/T18979-2003. Determination aflatoxins content in food—Cleanup by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography and fluorometer(食品中黄曲霉毒素的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法)
- 7 ChP(中国药典). 2010. Vol I (一部): 343, 177, 352, 245, 260
- 8 GU Xiao-jun(顾晓军),ZHANG Zhi-yong(张志勇),TIAN Su-fen(田素芬). Pesticide risk assessment principles and methods (农药风险评估原理与方法). Beijing(北京) China Agricultural Science and Technology Press (中国农业科学技术出版社), 2008. 1
- 9 GB2761-2005. Maximum levels of mycotoxins in foods(食品中真菌毒素限量)
- 10 ZHANG Zhen-ling(张振凌). The establishment of maximum levels of mycotoxins in Chinese herbal medicine(关于建立中药饮片黄曲霉毒素限度标准的探讨). *Stud J Tradit Chin Med* (中医药学刊) 2006, 24(11): 2025

(本文于 2010 年 9 月 14 日收到)