

· 基础研究 ·

HPLC 柱后光衍生法测定珠子参中
两类真菌毒素残留量

曹红云, 刘开庆, 游燕*, 秦波, 刘慧, 李东娴

(云南白药集团创新研发中心 云南省药物研究所 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 云南 昆明 650111)

[摘要] 目的: 建立免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生法测定珠子参药材中真菌毒素 (AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁、OTA) 的方法。方法: 参考 2015 年版《中华人民共和国药典》及相关文献对珠子参药材中真菌毒素 (AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁、OTA) 进行测定。结果: 本实验采用的柱后光衍生荧光检测法测定的 AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁、OTA 的检测下限分别为 0.19、0.63、0.19、0.56、4.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 珠子参药材真菌毒素回收率为 78% ~ 110%。结论: 实验结果表明柱后光衍生荧光检测法具有更高的灵敏度, 且该分析方法适合于珠子参药材及饮片中这些真菌毒素的检测。

[关键词] 珠子参; 真菌毒素; 柱后光衍生荧光法; 高效液相色谱法

Study of Method for Determining two Kinds of Mycotoxins in *Panax japonicus* var. *major*

CAO Hongyun, LIU Kaiqing, YOU Yan*, QIN Bo, LIU Hui, LI Dongxian

(Yunnan Bai Yao Group Innovation and R&D Center, Yunnan Institute of Materia Medica, Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

[Abstract] **Objective:** To study the method for determining mycotoxins in *Panax japonicus* var. *major* with HPLC-FLD after immunoaffinity column cleanup and online post-column photochemical derivatization. **Methods:** According to the 2015 edition of Chinese Pharmacopoeia and the references, mycotoxins in *Panax japonicus* var. *major* were determined by HPLC. **Results:** The detection limits of aflatoxins G₂, G₁, B₂, B₁, and ochratoxin A were 0.19, 0.63, 0.19, 0.56, 4.0 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. The recoveries analytes were from 78% -110%. **Conclusion:** The results showed that the HPLC-FLD online post-column photochemical derivatization is higher sensitivity, and it is suitable for determining mycotoxins in *Panax japonicus* var. *major*.

[Keywords] *Panax japonicus* var. *major*; mycotoxins; post-column photochemical derivatization; HPLC

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.8.017

珠子参又名纽子七、扣子七、珠儿参, 系五加科 (Araliaceae) 人参属 (*Panax*) 植物珠子参 *Panax japonicus* C. A. Mey. var. *major* (Burk.) C. Y. Wu et K. M. Feng 的干燥根茎^[1], 其性微寒, 味苦、甘, 归肝、肺、胃经, 具有补肺养阴、祛瘀止痛、止血等功效。现代药理学研究证明其具有提高免疫功能、增强造血功能、抗肿瘤、抗心律不齐及抗炎等作用^[2]。珠子参一般加工方法为洗净后放入锅中蒸煮, 煮至透心后捞出晒干, 而云南大多地方常年处于高温高湿的天气, 即使药材放在通风效果良好的仓库, 珠子参药材还是容易发生霉变。霉变的药材易被真

菌毒素污染, 黄曲霉毒素 (aflatoxins) 是已知真菌毒素中毒性最强的一类, 被国际癌症研究机构 (IARC) 划定为 I 类致癌物, 赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 的毒性仅次于黄曲霉毒素而列第二位。2015 年版《中华人民共和国药典》对大枣、水蛭、柏子仁等中药材及饮片规定了“黄曲霉毒素”检查项目和限量标准, 欧盟规定辣椒、肉豆蔻、干姜、姜黄及甘草根的浸出物中 OTA 的限量检查^[3], 因此本实验用 HPLC 柱后光化学衍生荧光法测定珠子参中真菌毒素的方法学进行了研究, 建立了免疫亲和柱净化 HPLC 同时测定珠子参中真菌毒素 (AFB₁、AFB₂、

* [通信作者] 游燕, 硕士, 副高级工程师, 研究方向: 中药分析; Tel: (0871) 66226009-8201, E-mail: youwanyan@sohu.com

AFG₁、AFG₂和 OTA)含量的方法,从而提高了对珠子参药材中有害物质的控制水平。

1 仪器与材料

1.1 仪器设备

Agilent1200 高效液相色谱仪; Agilent1200 荧光检测器; PHRED 光化学衍生器(美国 AURA 公司); AG285 型电子天平(瑞士 METTLER TOLEDO 公司); SK8200HP 型超声波清洗仪(上海科导超声仪器有限公司); THZ-82 型恒温振荡器(金坛市富华仪器公司); 黄曲霉毒素/赭曲霉毒素复合免疫亲和柱(批号: A0228, 北京中检维康生物技术有限公司); 玻璃纤维滤纸(青岛普瑞邦公司); Milli-Q 超纯水发生器(美国密理博公司, A10)。

1.2 材料

黄曲霉毒素混合对照品溶液(中国食品药品检定研究院, 批号: 610001-201301, 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁(AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁)质量浓度分别为 0.59、1.18、0.35、1.04 μg·mL⁻¹); 赭曲霉毒素 A(美国色谱科公司, 批号: XA12003V, 质量浓度为 50 μg·mL⁻¹); 色谱纯甲醇(德国默克); 分析纯甲醇(上海国药, 批号: 20150930); 水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

InertsilODS-3 色谱柱(250 mm×4.6mm, 5 μm);

流动相: 以甲醇为流动相 A, 以 0.5% 醋酸水溶液为流动相 B, 按表 1 中的规定进行梯度洗脱; 流速为 0.8 mL·min⁻¹, 柱温为 30 ℃, 进样量为 20 μL, 采用柱后光化学衍生, 以荧光检测器进行检测, 0~25 min: 激发波长为 360 nm, 发射波长为 450 nm, 26~55 min: 激发波长为 333 nm, 发射波长为 477 nm^[4-9]。

表 1 流动相洗脱程序

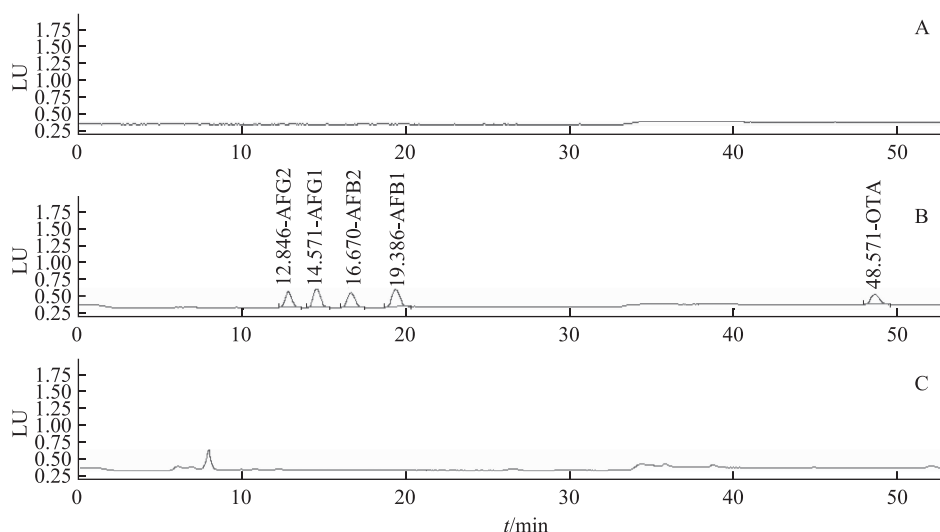
t/min	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0~25	51	49
25~26	51→80	49→20
26~50	80	20
50~51	80→51	20→49
51~55	51	49

2.2 混合对照品溶液的制备

取赭曲霉毒素 A 对照品用甲醇稀释得 1.0 μg·mL⁻¹的储备液。

精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液 2.5 mL 和赭曲霉毒素 A(OTA)储备液 10.0 mL, 置 25 mL 棕色容量瓶中, 用 70% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为真菌毒素混合对照品储备液。

精密量取真菌毒素混合对照品储备液 1.0 mL, 置于 25 mL 量瓶中, 用 70% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得真菌毒素混合对照品溶液^[4]。混合对照品 HPLC 图见图 1。



注: A. 空白溶液; B. 黄曲霉毒素混合对照品溶液; C. 供试品溶液。

图 1 珠子参供试品溶液及对照品 HPLC 图

2.3 供试品溶液的制备

取珠子参供试品粉末约 15 g(过二号筛),精密称定,加氯化钠 3 g,置于均质瓶中,精密加入 70% 甲醇水溶液 75.0 mL,振荡 30 min,玻璃纤维滤纸过滤,精密量取续滤液 15.0 mL,置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,量取续滤液 20.0 mL,通过复合免疫亲和柱,流速为 3 mL·min⁻¹,用 20 mL 水洗脱,洗脱液弃去,使空气进入柱子,将水挤出柱子,再用 1.5 mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,置 2 mL 量瓶中,并用水稀释至刻度,摇匀,即得^[4,6]。

2.4 线性关系的考察

取上述真菌毒素混合对照品储备液适量,用 70% 甲醇水溶液逐级稀释配制成一系列质量浓度的混合对照品溶液,分别进样 20 μL,测定峰面积,以对照品的进样量(ng)为横坐标(X),以峰面积为纵坐标(Y),进行线性回归,AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁、OTA 的线性方程分别为 $Y = 112.87X - 0.2848$, $r = 0.9999$; $Y = 71.092X - 2.2982$, $r = 0.9998$; $Y = 193.78X - 0.3856$, $r = 0.9999$; $Y = 83.99X - 0.7754$, $r = 0.9999$; $Y = 13.649X - 0.1036$, $r = 1.0000$ 。结果表明,在上述色谱条件下,AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁、OTA 分别在 0.0118 ~ 1.18、0.0236 ~ 2.36、0.007 ~ 0.7、0.0208 ~ 2.08、0.08 ~ 8.00 ng 呈良好的线性关系。

2.5 检测下限及定量下限

取上述真菌毒素混合对照品储备液用 70% 甲醇水溶液稀释配制成一系列质量浓度的混合对照品溶液,分别进样,以信噪比 3 倍和 10 倍作为指标,考察 AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁ 和 OTA 的检测下限(LLOD)和定量下限(LLOQ),AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁、OTA 的检测下限分别为 0.19、0.63、0.19、0.56、4.0 μg·kg⁻¹,定量下限为 0.79、1.97、0.47、1.73、10.0 μg·kg⁻¹。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取混合对照品溶液,按照 2.1 项下的色谱条件,注入液相色谱仪,连续进样 6 次,记录峰面积,计算 RSD,分别为 0.6%、0.4%、0.9%、0.6%、1.1%。结果表明本法具有良好的仪器精密度。

2.7 重复性试验

取同一批次供试品 15 g,精密称定,共 6 份,

分别加入 1.50 mL 真菌毒素混合对照品储备液,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样测定,RSD 分别为 3.6%、2.2%、2.7%、4.2%、4.7%。结果表明本法具有良好的重复性。

2.8 稳定性试验

取供试品 15 g,精密称定,加入 1.5 mL 真菌毒素混合对照品储备液,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,于制备后 0、2、4、6、8、12 h 进样测定,RSD 分别为 2.2%、2.1%、4.2%、3.8%、4.2%。结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

取同一批次供试品 6 份,各 15 g,精密称定,分别加入 0.50 mL 真菌毒素混合对照品储备液,按 2.3 项下方法制备供试品溶液,进样测定,计算回收率。结果表明,真菌毒素的平均加样回收率为 78.03% ~ 110.26%,RSD 分别为 3.8%、2.6%、3.7%、3.2%、2.9%。该方法准确度符合美国官方分析化学师协会(AOAC)(1 ~ 10 μg·kg⁻¹加样回收率为 60% ~ 120%)的检测要求^[10]。

3 样品测定

将 2 个不同批次珠子参药材,各取 4 份,每份 100 g。每批次药材选 2 份分别洒上少量水将其密封于自封袋中任其自然发霉,1 份放置 14 d 后药材轻度发霉,可见少量霉斑,40 ℃ 烘干后待测定;另 1 份放置 21 d 后药材严重发霉,可见较多霉斑,40 ℃ 烘干后待测定。其余 2 份,将 1 份经水洗净,40 ℃ 烘干后待测定;另 1 份未经处理。按以上测定方法对 4 份珠子参药材中真菌毒素进行含量测定,结果见表 2,发现有 1 个批次的 2 份霉变珠子参药材中有少量黄曲霉毒素检出。

表 2 珠子参样品真菌毒素残留量测定结果

批号	样品处理	质量分数/μg·kg ⁻¹				
		AFG ₂	AFG ₁	AFB ₂	AFB ₁	OTA
131022	未处理	—	—	—	—	—
	经水洗	—	—	—	—	—
	轻度霉变 14 d	—	—	—	—	—
	重度霉变 21 d	—	—	—	—	—
100113	未处理	—	—	—	—	—
	经水洗	—	—	—	—	—
	轻度霉变 14 d	—	0.207	—	0.118	—
	重度霉变 21 d	—	0.693	—	0.569	—

4 讨论

黄曲霉毒素为国际公认的一类致癌物,即使在极低量时 also 具有很强的生物毒性,因此国际上对其限量控制越来越严格。建立灵敏度高、操作简便的检测方法具有重要意义。此外中药材在贮藏、加工、运输过程中,如条件不当,极易产生或污染黄曲霉毒素和赭曲霉毒素,黄曲霉毒素不溶于水,耐热温度高达 280 ℃,一旦污染很难去除。而珠子参的加工方法为“挖回后,剪尽须根,置箩筐中,浸于长流水中足穿新草鞋踩去外层粗皮,放入锅中煮,水与珠子参平,火力不大不小,不要翻动,煮至透心后,撤火搅拌焖干,倒出晒干即可”。因为加工方法中有蒸煮,若水分没晒干,珠子参容易发生霉变,所以测定珠子参中的真菌毒素残留量非常有必要。

参照 2015 年版《中华人民共和国药典》,对照品溶液溶剂为甲醇,当进样量大于 10 μL 时,AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁ 色谱峰均出现前沿现象,考虑可能是样品溶剂极性与流动相极性不匹配,当进样量加大时,样品溶剂突然影响流动相极性,导致色谱峰出现前沿、分叉等现象,所以改用 70% 甲醇水溶液稀释对照品,可以避免加大进样量出现峰前沿的现象。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北

京:中国医药科技出版社,2015:271-272.

- [2] 王加付,张忆华,金永日. 珠子参化学成分的研究[D]. 长春:吉林大学,2012.
- [3] 李峻媛,万丽,杨美华,等. 真菌毒素限量标准及其在中药中的研究进展[J]. 中草药,2011,42(3):602-607.
- [4] 李鹏,贺澎,欧国静. 中药黄曲霉毒素检测方法学的改良研究[J]. 中国医疗前沿,2012,7(6):71.
- [5] 郝爱鱼,赵丽元,刘英慧,等. HPLC 柱后光衍生荧光法测定中药饮片中的黄曲霉毒素残留量[J]. 药物分析杂志,2012,32(12):2203-2207.
- [6] 韦日伟,覃洁萍,杨美华. 甘草中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素 A 的同时检测方法及免疫亲和柱的再利用研究[D]. 柳州:广西中医药大学,2012.
- [7] 谢静,杨惠莲,冷静,等. HPLC-柱后光化学衍生法测定 72 批舒筋活血丸中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 的含量[J]. 药物分析杂志,2014,34(3):437-441.
- [8] 杨文武,熊凌云,王瑞芳,等. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生法测定 34 批中药材中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ [J]. 现代中药研究与实践,2013,27(1):43-47.
- [9] 胡一晨,万丽,范成杰,等. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生法检测中药及染菌中药制剂中间体的黄曲霉毒素[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):116-119.
- [10] Trucksess M, Weaver C, Oles C, et al. Determination of aflatoxins and ochratoxins A in Ginseng and other botanical roots by immunoaffinity column cleanup and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. J AOAC INT, 2006,89(3):624-630.

(收稿日期 2016-11-17)

(上接第 1130 页)

参考文献

- [1] 新疆植物志编辑委员会. 新疆植物志[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:93-94.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志:第 75 卷[M]. 北京:科学出版社,1979:364-367.
- [3] 热阳古·阿布拉,夏娜,木尼热·阿不都克里木,等. 昆仑雪菊总黄酮的提取及含量测定[J]. 喀什师范学院学报,2013,34(3):45-47.
- [4] 王艳,张彦丽,阿依吐伦·斯马义. 分光光度法测定新疆昆仑雪菊中总黄酮的含量[J]. 新疆医科大学学报,2011,34(8):817-819.
- [5] 宗惠. 雪菊黄酮降血压、血脂及血粘度效应研究[D]. 兰州:西北师范大学,2015.
- [6] 邱佳俊,高飞,李雅丽,等. 雪菊总黄酮抗氧化活性研究[J]. 中国现代中药,2015,17(5):435-439.
- [7] 邱佳俊. 雪菊总黄酮的制备及其抗氧化活性研究[D]. 苏州:苏州大学,2015.

- [8] 沙爱龙,吴瑛,盛海燕,等. 昆仑雪菊黄酮对衰老模型小鼠脑及脏器指数的影响[J]. 动物医学进展,2013,34(7):66-68.
- [9] 刘苑星. 昆仑雪菊中总黄酮的提取及其对肿瘤细胞活性研究[J]. 科技经济市场,2016(5):197-198.
- [10] 帕尔哈提·买买提依明,令狐晨,朱青梅,等. 雪菊对肝癌和肺癌细胞体外抗肿瘤作用研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(24):46-48.
- [11] 贾明贤,张媛,董世芬,等. 雪菊不同提取部位对 3T3-L1 前脂肪细胞增殖与分化的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2015,17(3):544-549.
- [12] 高飞. 雪菊总黄酮降血脂作用及其机制研究[D]. 苏州:苏州大学,2016.
- [13] 丁豪,苏里阳,王文君,等. 昆仑雪菊中 5 个黄酮类化合物抗氧化活性的 DFT 研究[J]. 农产品加工,2016(11):1-4.

(收稿日期 2017-03-26)