

HPLC法测定土鳖虫中黄曲霉素的含量

张 伟*, 邹耀华, 诸葛陇(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310017)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4269-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.33

摘要 目的:建立测定土鳖虫中黄曲霉素含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Phenomenex C₁₈,流动相为甲醇-乙腈-水(28:17:55, V/V/V),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,荧光检测器激发波长 λ_{ex} 为365 nm,发射波长 λ_{em} 为450 nm,衍生溶液为0.05%碘溶液,衍生化泵流速为0.3 ml/min,衍生化温度为70 ℃,进样量为20 μ l。结果:黄曲霉素G₂、黄曲霉素B₂的进样量在1.2~12 pg,黄曲霉素G₁、黄曲霉素B₁进样量在4~40 pg范围内与各自峰面积呈良好线性关系(r 均 ≥ 0.9993);精密性、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 2.3\%$;加样回收率为77.4%~94.8%,RSD为3.1%~4.3%($n=6$)。结论:本方法简便、准确、重复性好,可用于测定土鳖虫中黄曲霉素的含量。

关键词 高效液相色谱法;黄曲霉素;土鳖虫;含量测定

Content Determination of Aflatoxins in Eupolyphaga by HPLC

ZHANG Wei, ZOU Yao-hua, ZHUGE Long (Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310017, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of aflatoxins in eupolyphaga. METHODS: HPLC was performed on the column of Phenomenex-C₁₈ with mobile phase of methanol-acetonitrile-water (28:17:55, V/V/V) at flow rate of 1.0 ml/min, column temperature was 30 ℃, fluorescence detector (FLD) λ_{ex} was 365 nm, λ_{em} was 450 nm; derivative solution was 0.05% iodine solution, derivatized pump flow rate was 0.3 ml/min, derivatized temperature was 70 ℃ and volume injection was 20 μ l. RESULTS: Aflatoxin G₂ and aflatoxin B₂ showed good linear relationship at 1.2-12 pg, and aflatoxin G₁ and aflatoxin B₁ showed a good linear relationship at 4-40 pg ($r \geq 0.9993$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were $\leq 2.3\%$; average recovery was 77.4%-94.8% (RSD=3.1%-4.3%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the determination of aflatoxins in eupolyphaga.

KEYWORDS HPLC; Aflatoxins; Eupolyphaga; Content determination

土鳖虫为鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* Walker 或冀地鳖 *Steleophaga plancyi* (Bolensy) 的雌虫干燥体,首载于《神农本草经》,列为中品。其主要成分含挥发油和氨基酸,具有破血逐瘀、续筋接骨之功效,主要用于跌打损伤、筋伤骨折、血瘀经闭、产后瘀阻腹痛、癥瘕痞块等。该药材若存储不当,可能会发生霉变滋生黄曲霉素。黄曲霉素于1993年被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构定为I类致癌物。其毒性比砒霜大68倍,仅次于肉毒霉素,是目前已知霉菌中毒性最强的^[1]。黄曲霉素的基本结构为二氢呋喃香豆素的衍生物,其中以黄曲霉素B₁的毒性最大,动物摄入经过肝脏转化后产生环氧衍生物,在体内经过激活,可产生碳正离子,能与核酸或蛋白质等大分子结合,从而导致细胞畸变或癌变。流行病学资料显示,黄曲霉素污染严重的地区,也是肝癌的高发地区^[2]。为此,在本研究中笔者采用高效液相色谱(HPLC)法测定了土鳖虫中黄曲霉素的含量,以为相关质量标准的制定提供依据。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括荧光检测器(美国Agilent公司);四方匀浆均质器(中国铁道部电化院四方电器设备厂);CF16RX II离心机(日本日立公司);Pickering Vector PCX柱后衍生仪(美国PICKERING公司);KQ-600DV台式数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);XS105十万分之一电子分析天平

(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 试剂

黄曲霉素B₁对照品溶液(批号:LB65891,质量浓度:1.0 μ g/ml)、黄曲霉素B₂对照品溶液(批号:LB80163,质量浓度:0.30 μ g/ml)、黄曲霉素G₁对照品溶液(批号:LB83051,质量浓度:1.0 μ g/ml)、黄曲霉素G₂对照品溶液(批号:LB67231,质量浓度:0.3 μ g/ml)均购于美国Supelco公司;乙腈和甲醇为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 药材

土鳖虫10批样品(批次:S1~S10)均购于医院、药店、饮片厂等,且均经本院中药室诸葛陇副主任药师鉴定为真品。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:甲醇-乙腈-水(28:17:55, V/V/V);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;荧光检测器激发波长(λ_{ex}):365 nm,发射波长(λ_{em}):450 nm;衍生溶液:0.05%碘溶液;衍生化泵流速:0.3 ml/min;衍生化温度:70 ℃;进样量:20 μ l。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 分别精密吸取黄曲霉素B₁、黄曲霉素B₂、黄曲霉素G₁、黄曲霉素G₂对照品溶液各0.5 ml,置于同一10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备溶液。精密吸取对照品贮备液1 ml,置于25 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

*主管药师,硕士。研究方向:中药鉴定及质量标准研究。电话:0571-85460802。E-mail:769890618@qq.com

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品粉末(过二号筛)10 g,加入氯化钠3 g,置于均质瓶中,精密加入70%甲醇溶液75 ml,高速搅拌2 min(搅拌速度:12 000 r/min),以半径15 cm、2 500 r/min离心5 min,精密量取上清液15 ml置于50 ml量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,经微孔滤膜(0.45 μm)滤过;量取续滤液20 ml,加水20 ml,混匀,通过免疫亲和柱(AflaT-est@P),流速1~3 ml/min,用水20 ml洗脱,洗脱液弃去,使空气进入柱子,将水挤出柱子,再加适量甲醇洗脱;收集洗脱液,置于2 ml量瓶中,并用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得^[3-4]。

2.2.3 空白对照溶液 以甲醇试剂为空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

分别精密吸取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,黄曲霉素G₂、黄曲霉素G₁、黄曲霉素B₂、黄曲霉素B₁峰的平均保留时间分别为9.9、11.6、12.9、15.5 min,各成分分离良好,分离度均大于1.5;供试品在与对照品色谱峰相应保留时间位置上亦有色谱峰出现。

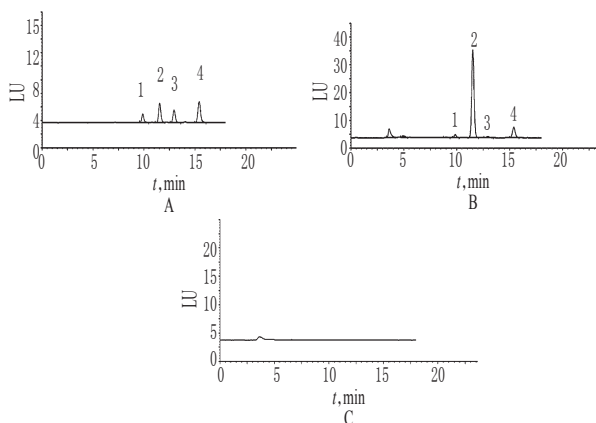


图1 高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.空白对照;1.黄曲霉素G₂;2.黄曲霉素G₁;3.黄曲霉素B₂;4.黄曲霉素B₁

Fig 1 HPLC chromatograms

A.substance control; B.test sample; C.blank control; 1.aflatoxin G₂; 2.aflatoxin G₁; 3.aflatoxin B₂; 4.aflatoxin B₁

2.4 线性关系考察

分别精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液2、5、8、10、15、20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以进样量(x, pg)为纵坐标、峰面积(y)为横坐标进行线性回归,得黄曲霉素G₂回归方程为 $y=1.496 5x-0.075 9$ ($r=0.999 3$)、黄曲霉素G₁回归方程为 $y=1.078 5x-0.085 9$ ($r=0.999 9$)、黄曲霉素B₂回归方程为 $y=2.421 1x+0.047 1$ ($r=0.999 9$)、黄曲霉素B₁回归方程为 $y=1.458 2x-0.139 4$ ($r=0.999 9$)。结果表明,黄曲霉素G₂、黄曲霉素B₂的进样量在1.2~12 pg,黄曲霉素G₁、黄曲霉素B₁进样量在4~40 pg范围内与各自峰面积呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次测定。结果,黄曲霉素G₂、黄曲霉素G₁、黄曲霉素B₂、黄曲霉素B₁峰面积的RSD分别为1.0%、1.2%、1.3%、0.4%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取同一份样品溶液(批次:S6)适量,分别于放置0、2、4、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,黄曲霉素G₂、黄

曲霉素G₁、黄曲霉素B₂、黄曲霉素B₁峰面积的RSD分别为0.9%、1.3%、1.2%、1.0%($n=5$),表明供试品溶液在12 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

称取同一批次(批次:S6)样品粉末共5份,每份约10 g,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果,黄曲霉素G₂、黄曲霉素G₁、黄曲霉素B₂、黄曲霉素B₁的平均含量分别为0.26、10.60、0.06、1.03 μg/kg, RSD分别为2.3%、2.0%、2.3%、2.2%($n=5$),表明该方法的重复性良好。

2.8 加样回收率试验

称取同一批次已知含量的样品(批次:S6)粉末共6份,每份约5 g,加入“2.2.1”项下对照品贮备液0.5 ml,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

待测成分	称样量, g	样品含量, ng	加入量, ng	测得量, ng	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
黄曲霉素G ₂	5.015 4	1.30	7.50	7.25	79.3	80.7	3.3
	5.022 1	1.31	7.50	7.36	80.7		
	5.014 9	1.30	7.50	7.25	79.3		
	5.008 7	1.30	7.50	7.11	77.4		
	5.020 7	1.31	7.50	7.56	83.4		
	5.028 9	1.31	7.50	7.63	84.3		
黄曲霉素G ₁	5.015 4	53.16	25.00	72.59	77.7	83.0	4.3
	5.022 1	53.23	25.00	73.63	81.6		
	5.014 9	53.16	25.00	73.36	80.8		
	5.008 7	53.09	25.00	74.77	86.7		
	5.020 7	53.22	25.00	74.31	84.4		
	5.028 9	53.31	25.00	75.00	86.8		
黄曲霉素B ₂	5.015 4	0.30	7.50	7.08	90.4	87.1	3.2
	5.022 1	0.30	7.50	7.02	89.6		
	5.014 9	0.30	7.50	6.72	85.6		
	5.008 7	0.30	7.50	6.96	88.8		
	5.020 7	0.30	7.50	6.56	83.5		
	5.028 9	0.30	7.50	6.68	85.0		
黄曲霉素B ₁	5.015 4	5.17	25.00	27.22	88.2	91.2	3.1
	5.022 1	5.17	25.00	28.13	91.8		
	5.014 9	5.17	25.00	27.76	90.4		
	5.008 7	5.16	25.00	28.65	94.0		
	5.020 7	5.17	25.00	27.24	88.3		
	5.028 9	5.18	25.00	28.88	94.8		

2.9 样品含量测定

取10批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量,结果见表2。

3 讨论

本试验发现,将样品溶液20 ml直接过柱,回收率偏低,若再加20 ml水与样品溶液混匀后过柱,则回收率明显提高。分析认为,这可能与样品溶液中甲醇的浓度过高,黄曲霉素在甲醇中溶解性较好,不易在免疫亲和柱中保留有关。此外,样品直接用纯甲醇1 ml洗脱定容,亦会影响回收率,改为2 ml洗脱定容,结果理想。色谱条件的选择上,笔者曾比较了甲醇-水、甲醇-乙腈-水为流动相,虽分离度都能达到要求,但在同一色谱柱上甲醇-乙腈-水柱压较低,保留时间适当,峰形更好。

线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量动态变化研究

卢琴*(湖北省中西医结合医院,武汉 430015)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)30-4271-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.30.34

摘要 目的:建立同时测定线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷含量的方法,以确定线纹香茶菜的最佳采摘期。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamondsil C₁₈,流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为0.8 ml/min,检测波长为334 nm,柱温为25℃,进样量为15 μl。结果:咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷检测的质量浓度线性范围分别为0.23~5.68、0.31~7.76、0.45~11.30 μg/ml($r=0.999\ 9$ 、 $0.999\ 8$ 、 $0.999\ 9$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;加样回收率分别为95.1%~98.9%、97.4%~101.3%、95.5%~98.8%,RSD分别为1.8%、1.7%、1.4%($n=6$)。采收于每年4~5月、7~8月的线纹香茶菜中上述3种成分含量最高。结论:该方法简便、准确、重复性好,可用于同时测定线纹香茶菜中咖啡酸、新西兰牡荆苷2、异夏佛塔苷的含量;线纹香茶菜的最佳采摘期为每年4~5月、7~8月。

关键词 线纹香茶菜;咖啡酸;新西兰牡荆苷2;异夏佛塔苷;高效液相色谱法

Study on the Content Dynamic Changes of Caffeic Acid, Vicenin-2 and Isoschaftoside in *Rabdosia lophanthoides*

LU Qin(Chinese and Western Medicine Hospital of Hubei Province, Wuhan 430015, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of caffeic acid, vicenin-2 and isoschaftoside in *Rabdosia lophanthoides* to assess its optimal harvest period. METHODS: HPLC was performed on the column of Diamondsil C₁₈ with mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution) at a flow rate of 0.8 ml/min, detection wavelength was 334 nm, column temperature was 25℃ and volume injection was 15 μl. RESULTS: The linear range was 0.23-5.68 μg/ml for caffeic acid($r=0.999\ 9$), 0.31-7.76 μg/ml for vicenin-2($r=0.999\ 8$) and 0.45-11.30 μg/ml for isoschaftoside($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2.0%, average recoveries were 95.1%-98.9% (RSD=1.8%, $n=6$), 97.4%-101.3% (RSD=1.7%, $n=6$) and 95.5%-98.8% (RSD=1.4%, $n=6$), respectively. The contents of above-mentioned 3 ingredients of *R. lophanthoides* were the highest harvested in Apr. to May and Jul. to Aug. in a year. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the simultaneous determination of caffeic acid, vicenin-2 and isoschaftoside in *R. lophanthoides*. The optimal harvest period is Apr. to May and Jul. to Aug. in a year.

KEYWORDS *Rabdosia lophanthoides*; Caffeic acid; Vicenin-2; Isoschaftoside; HPLC

表2 样品含量测定结果($n=10$, μg/kg)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=10$, μg/kg)

批次	黄曲霉素G ₂	黄曲霉素G ₁	黄曲霉素B ₂	黄曲霉素B ₁
S1	未检出	6.83	未检出	5.44
S2	未检出	0.95	0.06	0.30
S3	未检出	0.63	0.06	0.27
S4	未检出	2.03	0.11	0.89
S5	1.82	48.12	0.19	2.30
S6	0.26	10.60	0.06	1.03
S7	1.24	56.67	0.35	5.94
S8	2.31	198.09	1.20	33.35
S9	未检出	1.09	未检出	0.21
S10	未检出	未检出	未检出	未检出

样品测定结果显示,10批样品仅1批未检出,若按2010年版《中国药典》(一部)对陈皮、僵蚕、胖大海等5个品种所规定的限度来判定,则S1、S5、S6、S7、S8 5批次样品不合格,现状不

*副主任药师。研究方向:药品质量标准。E-mail: luqing20150601@163.com

容乐观。因此,有必要在土鳖虫的检查项下增加黄曲霉素的含量测定,以更好地控制其质量。

综上所述,本方法简便、准确、重复性好,可用于测定土鳖虫中黄曲霉素的含量。

参考文献

- [1] 林浪,林景涛,庄华,等.肝癌高发区福建同安居民AF-TB₁摄入量及膳食营养状况分析[J].福建医学院学报,1994,28(4):405.
- [2] 何水桂.高要市1995—1997年土榨花生油中酸价黄曲霉毒素B₁含量调查[J].广东卫生防疫,1998,24(4):57.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录61—62.
- [4] 赵宁,郭玉梅,姚妍妍,等.高效液相色谱法测定花生中黄曲霉素的含量[J].科技信息,2009(25):44.

(收稿日期:2014-12-29 修回日期:2015-08-25)

(编辑:陈宏)