

免疫亲和柱-高效液相色谱检测中药中赭曲霉毒素

吴剑威^{1,3}, 谭丽杰², 赵润怀³, 陈波³

1. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

2. 山东省聊城市中医院 药剂科, 山东 聊城 252004

3. 中国药材集团公司 科技研发部, 北京 102600

摘要: 目的 建立免疫亲和柱(IAC)-高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)检测常用中药中赭曲霉毒素(OTA)的方法。方法 样品经甲醇-水(85:15)振荡提取后,通过IAC净化洗脱,HPLC分离定量。结果 OTA在2~200 ng/mL,呈良好的线性关系, r 为0.998 9;OTA的最低检出限为0.5 ng/g;回收率为89.8%~94.6%,RSD为3.1%~6.9%。结论 建立的IAC-HPLC方法检测常用中药中OTA无干扰性杂峰,结果准确可靠。

关键词: 赭曲霉毒素;免疫亲和柱;高效液相色谱;蒸发光散射;中药

中图分类号: R286.02 文献标志码: B 文章编号: 0253-2670(2011)08-1557-03

Analysis of ochratoxin A in Chinese materia medica herbs by immunoaffinity column-HPLC

WU Jian-wei^{1,3}, TAN Li-jie², ZHAO Run-huai³, CHEN Bo³

1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union of Medical College, Beijing 100193, China

2. Department of Pharmacy, Liaocheng Hospital of Traditional Chinese Medicine in Shandong Province, Liaocheng 252004, China

3. Technology Development Center, China National Group Corp. of Traditional & Herbal Medicine, Beijing 102600, China

Key words: ochratoxin A; immunoaffinity column; HPLC; ELSD; Chinese materia medica

赭曲霉毒素(ochratoxin A, OTA)是赭色曲霉属和几种青霉属真菌产生的有毒代谢产物。OTA广泛地分布于发霉的谷物(如小麦、大麦、玉米)、豆类、奶酪、葡萄干等食品中,在世界各地均有存在。动物实验表明,OTA具有较强的致癌活性和致畸作用,威胁到人类的健康^[1]。目前世界上多个国家和地区均制订了OTA的最大允许限量(maximum residue limit, MRL)。我国食品卫生标准中规定OTA在谷类、豆类中的MRL为5 ng/g。

测定OTA的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、气相色谱法(GC)和酶联免疫吸附法(ELISA)等。由于OTA在样品中的量甚微,而共存干扰物质较多,因此在检测过程中,提取和净化是十分关键的步骤。目前一般采用有机溶剂或有机溶剂-水体系提取,净化的方式主要有液-液萃取及C₁₈、中性氧化铝、弗罗里硅土

(Florisil)固相萃取法等。随着生物化学技术的发展,国内外学者越来越多地采用免疫亲和柱(IAC)净化样品。中华人民共和国国家标准GB/T 23502-2009中对食品样品采用了IAC净化方法。IAC具有操作简便、专属性好、溶剂消耗少、净化效果好等特点。

现有研究中采用高效液相色谱法检测OTA时,多配备荧光检测器。目前还未见有采用高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)检测OTA的报道,关于OTA在中药中的分析研究也鲜有报道。本实验采用IAC净化,建立HPLC-ELSD分离测定中药中OTA的新方法,为建立快速准确检测中药中OTA的方法提供参考。

1 试剂和仪器

水为重蒸水,甲醇、乙腈为色谱纯,缓冲溶液(8 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾,用水定容至1 L,盐酸调至pH 7.0)。

收稿日期: 2010-11-17

基金项目: 中国医学科学院药用植物研究所中央级公益性科研院所基本科研业务专项(YZ-1-20); 国家中医药管理局中医药行业科研专项(200807042)

作者简介: 吴剑威(1982—),男,主要从事中药材质量控制及新药开发研究。Tel/Fax: (010)61252980 E-mail: wujianwei22@sina.com

免疫亲和柱 OchraTest™ (美国维康公司); OTA 对照品购自 Sigma 公司, 质量分数≥99%, 于-20℃冰箱保存。液相色谱系统: Waters 600 液相色谱仪配备 Waters 2424 蒸发光散射检测器。

2 方法

2.1 色谱条件

ODS-A 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm) (日本 YMC); 流动相乙腈-水 (20:80); 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 25℃; 漂移管温度 50℃; 氮气流压力 206.85 kPa; 进样量 50 μL。

2.2 对照品溶液的制备

精密称取 1.0 mg OTA 对照品置 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解, 即得 OTA 对照品储备液。

2.3 供试品溶液的制备

取药材粉末 25 g, 精密称定, 置 200 mL 具塞瓶中, 加入 5 g 氯化钠及甲醇-水 (85:15) 150 mL 混合溶液, 振荡提取 30 min。滤过, 收集滤液并于 55℃减压浓缩至约 10 mL。备用。

2.4 IAC 净化

将“2.3”项浓缩液以 1 滴/s 的体积流量通过 IAC, 再用 10~15 mL 缓冲溶液及水依次以 1~2 滴/s 的体积流量洗涤亲合柱, 洗涤完后, 让空气进入柱中, 将水挤出柱子, 最后添加甲醇洗脱 OTA, 收集于 1 mL 量瓶中, 过 0.45 μm 滤膜, 所得样品待测。

2.5 样品测定

将“2.4”项所得样品, 按“2.1”项色谱条件, 进样测定。

3 结果

3.1 方法学考察

3.1.1 最低检测限

根据信噪比 $S/N=3$ 确定被测

物质的最低检测限, OTA 的最低检出限为 0.5 ng/g。

3.1.2 标准曲线的绘制 将 2、4、10、20、50、100、200 ng/mL 的 OTA 对照品溶液进样, 以色谱峰峰面积 (Y) 为纵坐标, OTA 的质量浓度 (X) 为横坐标, 进行线性回归, 得到标准曲线 $Y=996\,919X-19\,696$, $r=0.998\,9$ 。

3.1.3 精密度试验 将 OTA 对照品于 1 d 内连续进样 5 次, 考察日内精密度, 结果 RSD 为 1.5%。将 OTA 对照品于 5 d 内连续进样, 每天 1 次, 考察日间精密度, 结果 RSD 为 1.9%。

3.1.4 稳定性试验 精密吸取供试品溶液 50 μL, 每隔 2 h 进样 1 次, 测定 7 次, 计算峰面积的 RSD 为 4.6%。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

3.1.5 重现性试验 在空白药材样品添加 20 ng/g 对照品, 按“2.3、2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 进样, 测定峰面积, 结果 RSD 为 5.9%。

3.1.6 加样回收率试验 在药材样品 (事先检测无 OTA 存在), 分别加以 4、20、40 ng/g 对照品, 进行加样回收率试验, 每个添加浓度水平重复 5 次操作, 计算得 OTA 的回收率分别为 89.8%、92.7%、94.6%, RSD 分别为 6.9%、5.6%、3.1%。

3.2 样品测定结果

采用本实验建立的方法测定了 30 种常用中药材, 分别为人参、西洋参、党参、甘草、三七、熟地、麦冬、茯苓、山茱萸、枸杞子、桑椹、五味子、薄荷、百合、玉竹、川芎、六神曲、建曲、淡豆豉、青蒿、丁香、决明子、马齿苋、莲子、木瓜、木通、青风藤、半夏、黄芩、玄参。结果在所有被分析的样品中, OTA 峰所在位置均未有杂质峰干扰, 且 30 个样品未发现 OTA, 部分样品测定结果见图 1。

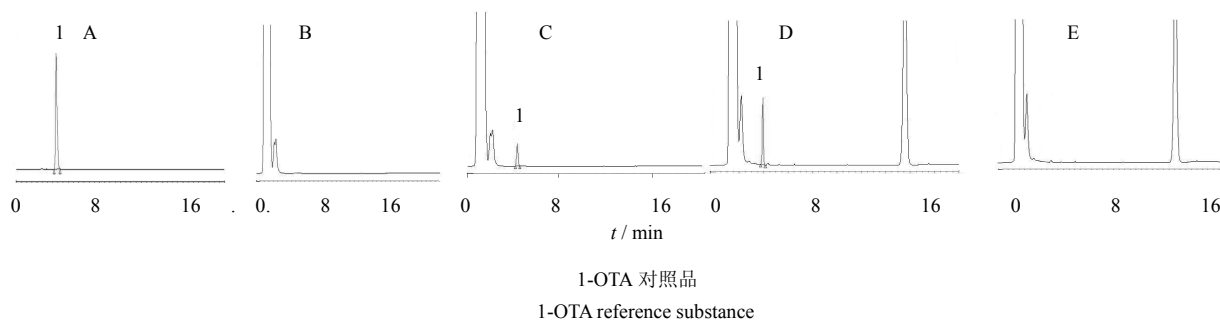


图 1 OTA 对照品 (A)、西洋参空白样品 (B)、西洋参加 OTA 对照品样品 (C)、青蒿加 OTA 对照品样品 (D) 和青蒿空白样品 (E) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of OTA reference substance (A), blank sample of *Panacis Quinquefolii Radix* (B), *Panacis Quinquefolii Radix* and OTA (C), *Artemisiae Annuae Herba* and OTA (D), and blank sample of *Artemisiae Annuae Herba* (E)

本实验所建立的方法的最低检出限为 0.5 ng/g, 可以满足对样品中 OTA 微量检测的要求。所测 30 种中药材中均未发现 OTA, 这可能与 OTA 发生率较低有关。

4 讨论

本实验采用 IAC 柱净化法对样品进行前处理, 该法使用的 IAC 柱虽价格较高, 但却具备其他净化柱无法比拟的专属性高等优势, 能够去除样品中大量干扰杂质峰, 确保目标峰与基质峰达到基线分离。目前, 使用 HPLC-ELSD 法对 OTA, 进行测定的报道极少。国内外对 OTA 的分析方法和限量标准多限于食品、农产品以及饲料中, 对中药材中 OTA 的分析标准目前还是空白。由于产生 OTA 的菌种为土壤伴生菌, 中药材中根和根茎类药材极易受到 OTA 的侵染。本研究选取了与土壤有广泛接触的根类药材, 如人参、西洋参等; 又选取了容易霉变并且所在产地属高温高湿地区的药材品种, 如麦冬、枸杞、六神曲等; 同时又选取了药食同源、使用量较大的品种, 如木瓜、决明子、薄荷等 30 种常用药材, 采用 HPLC-ELSD 检测其中 OTA 的量, 该方法具有快速、简便、灵敏、准确、自动化高等优点, 完全能够满足批量检测的需要。

据报道, *F. oxysporum*、*F. solani* 和 *F. moniliforme* 等产毒真菌是导致中药白术、黄芪、三七、葛根等药材根腐病的主要致病菌^[2-5]。目前,

本课题组已从人参、西洋参、三七、柴胡等 10 余种药用植物中分离得到 30 余株真菌, 这些菌株附生或寄生在药用植物植株上, 主要为致病菌和根际菌。此外, 应用 HPLC-ELSD 法对霉变中药材进行分析研究, 已经发现了多个批次的样品存在不同程度的 OTA 污染。因此, 很有必要对中药, 尤其是易受真菌侵染的根和根茎类药材, 建立全面、系统的中药中真菌毒素的检测技术及限量标准^[6-8]。

参考文献

- [1] Steyn P S. Mycotoxins, general view, chemistry and structure [J]. *Toxicol Lett*, 1995, 83: 843-851.
- [2] 臧少先, 安信伯, 石丽军, 等. 白术根腐病症状类型及病原鉴定 [J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(3): 73-76.
- [3] 林兰稳, 李兆雄, 何熊威, 等. 粉葛根腐病的病原鉴定 [J]. 生态环境, 2003, 12(4): 516-517.
- [4] 邓成贵. 黄芪根腐病病原鉴定研究初报 [J]. 中药材, 2005, 28(2): 85.
- [5] 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 等. 三七根腐病病原研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378.
- [6] 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): 602-609.
- [7] 吴剑威, 杨美华, 高微微, 等. 镰刀菌毒素分析方法研究进展 [J]. 中草药, 2008, 39(4): 634-638.
- [8] 郭 青, 吴晓燕, 史清水, 等. 中药注射剂质量评价研究的有关研究思路、方法和建议 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(5): 351-360.