

标题：国内外的黄曲霉毒素测定法

黄曲霉毒素具有较强的毒害作用，可诱发肝、肾、肺、胃等部位的癌变，黄曲霉毒素 B1 被公认为是目前致癌力最强的天然物质。

药材、饮片及制剂在贮藏、制备、运输过程中，如保存不当，就会有受潮霉变而污染黄曲霉毒素的可能。

因此，各药典都将黄曲霉毒素列为很重要的安全性指标，中国药典和欧洲药典对多种中药材都建立了黄曲霉毒素检查指标，美国药典对植源性的药品也要求检查黄曲霉毒素。

今天小编就详细介绍中国药典、欧洲药典和美国药典的黄曲霉毒素测定方法，总结出各药典的差异，并列出详细的检验方法，供各位参考。

1、比较中国药典、美国药典、欧洲药典的检查方法

对比内容	中国药典	美国药典	欧洲药典
依据	通则 2351 真菌毒素测定法	GENERAL CHAPTERS<561>	2.8.18 DETERMINATION OF AFLATOXIN B1 IN HERBAL DRUGS
方法	第一法 HPLC 法	TLC 法	HPLC 法
	第二法 HPLC-MS 法	薄层扫描法	
	第三法 酶联免疫法	HPLC 法	
限度	每 1000g 含黄曲霉毒素 B1 不得过 5 μ g，总量不得过 10 μ g。	每 1000g 含黄曲霉毒素 B1 不得过 5 μ g，总量不得过 20 μ g。	每 1000g 含黄曲霉毒素 B1 不得过 2 μ g，总量不得过 4 μ g。
说明	中国药典的三种方法都可以使用，当测	首先使用第一法，第一法系统适用性不通过才会使	只有一种方法，适用于 devil's claw root, ginger and

	定结果超出限度时，采用第二法进行确认。	用第二法或第三法。	senna pods，用于其他品种需要验证适用性。
--	---------------------	-----------	---------------------------

注：总量为黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、黄曲霉毒素 B2 (AFB2)、黄曲霉毒素 G1 (AFG1) 和黄曲霉毒素 G2 (AFG2) 的总量。

2、详解中国药典、美国药典、欧洲药典的 HPLC 方法

黄曲霉毒素检查方法中，唯一同时适用于三家药典的方法，只有 HPLC 法（荧光检测器），而且光化学检测器与 HPLC-荧光检测器配套使用，在线对黄曲霉毒素 B1、G1 进行衍生，不需要任何化学试剂，应用范围较广，因此本文重点比较此法在各药典中的异同。

从以下几部分可以看出，色谱柱、流动相、流速、波长、供试品和对照品的配制方法、进样量等内容都存在较大差异，需要谨慎对照使用。

本文详细写出了 USP 中的几种测定方法。

2.1 中国药典中黄曲霉毒素检查方法（HPLC 法）

检验方法	具体内容
色谱柱	十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂
流动相	甲醇-乙腈-水(40 : 18 : 42)
流速	1.0mL/min
柱后衍生化	光化学衍生器 (254nm)
检测器	荧光检测器，激发波长 360nm (或 365nm)，发射波长 450nm。
系统适用性	两个相邻色谱峰的分度应大于 1.5；需确认回收率应在 60~120%，线性回归的相关系数应不低于 0.990；
混合对照	精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液（黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 标示浓度分别为 1.0μg/mL、0.3μg/mL、1.0μg/mL、0.3μg/mL）0.5mL，置 10mL 量瓶中，用甲醇稀释

品溶液	至刻度，作为贮备溶液。精密量取贮备溶液 1mL，置 25mL 量瓶中，用甲醇稀释至刻度，即得。
供试品溶液	取供试品粉末约 15g（过二号筛），精密称定，置于均质瓶中，加入氯化钠 3g，精密加入 70%甲醇溶液 75mL，高速搅拌 2 分钟（搅拌速度大于 11000 r/min），离心 5 分钟（离心速度 4000r/min），精密量取上清液 15mL，置 50mL 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，离心 10 分钟（离心速度 4000r/min），精密量取上清液 20mL，通过免疫亲和柱，流速每分钟 3mL，用水 20mL 洗脱（必要时可以先用淋洗缓冲液 10mL 洗脱，再用水 10mL 洗脱），弃去洗脱液，使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置 2mL 量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.22μm）滤过，取续滤液，即得。
进样量	混合对照品溶液 5μl、10μl、15μl、20μl、25μl；供试品溶液 20~50μl。
定量方法	测定各对照品溶液的峰面积，以峰面积为纵坐标，以进样量为横坐标，绘制标准曲线；测定供试品溶液的峰面积，从标准曲线上读出供试品中黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 的量，并计算出四者总和。

2.2 美国药典中黄曲霉毒素检查方法（HPLC 法）

检验方法	具体内容
色谱柱	4.6-mm×15 cm, 3-μm 填料 L1（即十八烷基硅烷键合硅胶）
流动相	水-甲醇-乙腈（60:25:15）
流速	0.8 mL/min
柱后衍生化	光化学衍生器（254nm）
检测器	荧光检测器，激发波长 362nm，发射波长 440nm
系统适用性	洗脱顺序为 AFG2、AFG1、AFB2 和 AFB1； 将 5 号线性对照溶液 5mL 加入到 5g 的样品中，按“供试品溶液”（甲醇-0.5%碳酸氢钠（7:3）用量为 20mL）处理方法，计算 AFB1（2 μg/kg）和黄曲霉毒素（5 μg/kg）的平均回收率，应分别不低于 68%和 70%。AFB1 和黄曲霉毒素总量的相对标准偏差（RSD）不高于 10%。
免疫亲和	免疫黄曲霉毒素柱的总黄曲霉毒素最小容量不低于 100ng。将 AFB1、AFB2、AFG1 和 AFG2 每个 5ng，溶于 10mL 10%甲醇的磷酸盐缓冲盐溶液（v/v）中时，各回收率不

柱预处理	低于 80%。
对照品溶液	用乙腈制备 AFB1、AFB2、AFG1 和 AFG2 分别含有 2.0、0.50、2.0 和 0.50 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照溶液。首先用乙腈制备标示浓度均为 10 $\mu\text{g/mL}$ 的各储备液，在 360nm 附近测定最大吸光度，计算公式为：黄曲霉毒素浓度 ($\mu\text{g/mL}$) = $(A \times M_r \times 1000) / \epsilon$ ，其中 A 为吸光度， M_r 为分子量， ϵ 为摩尔吸收系数，见附表 1。准确量取一定量黄曲霉毒素各储备液至同一容量瓶，用乙腈稀释至规定浓度。冰箱储存，使用前平衡至室温。用甲醇 - 水 (1:1) 稀释黄曲霉毒素对照溶液，最终浓度见附表 2。冰箱保存，使用前平衡至室温，每日新制。
供试品溶液	取样品 5g，置于 50mL 离心管中，加入氯化钠 1 g 和甲醇 - 0.5%碳酸氢钠 (7:3) 25 mL。在涡流混合器上混合，直到样品颗粒和提取溶剂充分混合，400 rpm 振摇 10min，7000 rpm 离心 10min，立即取 7 mL 至 50 mL 离心管中，加入 0.1 M 磷酸盐缓冲溶液 28 mL，混合，过滤，收集 25mL 滤液（相当于 1g 样品）到 25mL 刻度量筒中，并立即上 IAC 柱。[注：对于 IAC 柱在使用前必须在室温下至少平衡 15 分钟。] 从小柱上取下顶盖，并将其与储液罐连接。从柱上拆下端盖，并将其连接到柱歧管上（必须拧紧）。让柱中的液体通过，直到液体高出柱床约 2~3 mm。将滤液 25mL 倒入储液罐。让液体自然流过柱子，让柱子流干。为了便于再次开始流动，从歧管上取下色谱柱，向柱中加入磷酸盐缓冲盐溶液约 2 mL，将色谱柱重新连接到储液罐上，然后用磷酸盐缓冲盐溶液 3mL 和水 5mL 清洗色谱柱（如果使用其他技术去除柱末端的气泡并很容易重新开始流动，则可将磷酸盐缓冲盐溶液 5mL 直接加入到柱储液罐中）。让柱子流干，然后用注射器注入 3mL 空气通过柱子，用甲醇 1mL 洗脱，并用 3mL 容量瓶中收集洗脱液，使洗脱液自由滴落。让柱子流干。静置 1 分钟，然后用额外的甲醇 1mL 洗脱，并收集在同一容量瓶中。让柱子流干，并注入 10mL 空气通过柱子，用水稀释洗脱液至刻度，立即进行分析。
进样量	50 μl
定量方法	毒素 ($\mu\text{g/kg}$) = $\{[(R-a) / S] \times V / W\} \times F$ R=样品溶液的峰面积；a=校准曲线的 y 截距；S=校准曲线的斜率；V=样品溶液的最终体积 (mL)；W=通过免疫柱的供试品 1g；F=稀释系数，V=3 mL 时为 1；黄曲霉毒素的总量是 AFG1、AFG2、AFB1 和 AFB2 的总和。

2.3 欧洲药典中黄曲霉毒素检查方法（HPLC 法）

检验方法	具体内容
色谱柱	柱长 0.25m，直径 4.6mm，十八烷基硅烷键合硅胶为固定相（5- μm ）
流动相	乙腈-甲醇-水(2:3:6)

流速	1.0mL/min
柱后衍生化	光化学衍生器（254nm）
检测器	荧光检测器检测，激发波长= 365nm，发射波长 λ_{em} =435nm。
系统适用性	出峰顺序：G2、G1、B2、B1；需满足验证要求。
对照品溶液	用甲苯-乙腈(98:2)制备 10 μ g/mL AFB1 贮备溶液，并在 330nm~370nm 波长范围内测定吸收曲线，计算公式为：黄曲霉毒素浓度（ μ g/mL）=（A \times M \times 100）/ ϵ ，其中 A 为紫外吸收曲线上的最大吸光度，M 为 B1 的分子量（312g/mol）， ϵ 为摩尔吸收系数（1930m ² /mol）。用甲苯-乙腈(98:2)将初级贮备液稀释为 100ng/mL 的次级贮备液，用铝箔紧密包好后，置于 4 $^{\circ}$ C 储存，使用前，待溶液恢复至室温后才能取下铝箔。使用前记录容量瓶的重量。按附表 3 制备系列对照溶液，将所需体积的次级贮备液置于 250ml 容量瓶中，氮气吹干，加入甲醇 75mL 溶解黄曲霉毒素 B1，并用水稀释至刻度。
免疫亲和柱预处理	免疫亲和柱对黄曲霉毒素 B1 的容量不低于 100 ng。将 AFB1 5 ng，溶于 12.5mL 甲醇和 87.5 mL 水中时，回收率不低于 80%。使用前平衡至室温。
供试品溶液	取本品粉末 5.00g，加入甲醇:水(70:30)混合溶液 100mL，超声处理 30min，取滤液 10mL 至 150mL 锥形瓶，并加入水 70mL。取 40mL 以流速 3mL/min(不得超过 5mL/min)通过免疫亲和柱。用水以流速 5mL/min 冲洗小柱两次，每次 10mL。用注射器注入空气 10s。取甲醇 5mL 注入小柱，并保持自然流出，收集洗脱液至 5mL 容量瓶中，1min 后，注入甲醇 0.5mL，再隔 1min 后，注入甲醇 0.5mL，每次加入甲醇后，均通过注入空气收集洗脱液，用水稀释至容量瓶刻度，摇匀。溶液澄清的话，可直接用于分析；否则应过滤处理，并确保黄曲霉毒素没有损失。
进样量	500 μ l
定量方法	用黄曲霉毒素 B1 系列对照溶液 1~5 做标准曲线，样品浓度超出线性范围，则需要做相应稀释。 毒素（ μ g/kg）= [（R-b）/a] \times V /W R=样品溶液的峰面积；b=校准曲线的截距；a=校准曲线的斜率；V 稀释倍数；W=通过免疫柱的供试品 g；黄曲霉毒素的总量是 AFG1、AFG2、AFB1 和 AFB2 的总和。

2.4 上述方法中的三个附表

附表 1

黄曲霉毒素	M	溶剂	ϵ
AFB1	312	乙腈	20700
AFB2	314	乙腈	22500
AFG1	328	乙腈	17600
AFG2	33	乙腈	18900

附表 2

序号	黄曲霉素对照溶液加入量 (μ l)	黄曲霉素工作对照溶液 (ng/ml)				
		AFB1	AFB2	AFG1	AFG2	总和
1	0	0	0	0	0	0
2	12.5	0.25	0.0625	0.25	0.0625	0.625
3	25	0.5	0.125	0.5	0.125	1.25
4	50	1	0.25	1	0.25	2.5
5	100	2	0.5	2	0.5	5
6	200	4	1	4	1	10

附表 3

系列对照溶液	加入次级贮备液的体积 (μ l)	对照溶液的最终浓度 (ng/ml)
1	125	0.05
2	250	0.1
3	500	0.2
4	750	0.3
5	1000	0.4

3、注意事项

由于黄曲霉毒素的毒性，实验过程必须小心谨慎，小编总结出 4 条注意事项，供大家参考：

1、使用真菌毒素对照品，必须穿好防护服，带好手套，在通风橱内进行，并将工作台

盖上胶布。非实验人员未经允许，不得进入实验室，以免发生意外。

2、黄曲霉毒素容易光降解，实验过程需要避光，对照品和供试品溶液也需要避光保存，线性对照溶液需要临用现配。

3、真菌毒素为痕量分析，易受环境污染，应随行进行空白试验与加样回收率实验。

4、用过的玻璃仪器需用次氯酸钠溶液浸泡 2 小时。

注：

来源：环凯转载于食品微生物检测公众号

说明：文章、视频、图片等所有内容，仅用于学习交流，若有侵权内容及其他涉法内容，请及时

联系删除或修改，特此声明！