

## 2351 黄曲霉毒素测定法

### 第一法<sup>1</sup>

本法系用高效液相色谱法(通则 0512)测定药材、饮片及制剂中的黄曲霉毒素(以黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1 和黄曲霉毒素 G2 总量计),除另有规定外,按下列方法测定。**当测定结果不符合规定时,以第二法测定结果为准。**

**色谱条件与系统适用性试验** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以甲醇-乙腈-水(40:18:42)为流动相;采用柱后衍生法检测,(1)碘衍生法:衍生溶液为 0.05%的碘溶液(取碘 0.5g,加入甲醇 100ml 使溶解,用水稀释至 1000ml 制成),衍生化泵流速每分钟 0.3ml,衍生化温度 70℃;(2)光化学衍生法:光化学衍生器(254nm);以荧光检测器检测,激发波长  $\lambda_{ex}=360\text{nm}$ (或 365nm),发射波长  $\lambda_{em}=450\text{nm}$ 。两个相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。

**混合对照品溶液的制备** 精密量取黄曲霉毒素混合标准品(黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2 标示浓度分别为 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )0.5ml,置 10ml 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,作为储备液。精密量取储备液 1ml,置 25ml 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,即得。

**供试品溶液的制备** 取供试品粉末约 15g(过二号筛),精密称定,加入氯化钠 3g,置于均质瓶中,精密加入 70%甲醇溶液 75ml,高速搅拌 2 分钟(搅拌速度大于 11000 转/分钟),离心 5 分钟(离心速度 2500 转/分钟),精密量取上清液 15ml,置 50ml 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,用微孔滤膜(0.45 $\mu\text{m}$ )滤过,量取续滤液 20.0ml,通过免疫亲和柱,流速每分钟 3ml,用水 20ml 洗脱,洗脱液弃去,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,并用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

**测定法** 分别精密吸取上述混合对照品溶液 5 $\mu\text{l}$ 、10 $\mu\text{l}$ 、15 $\mu\text{l}$ 、20 $\mu\text{l}$ 、25 $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定峰面积,以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标,绘制标准曲线。另精密吸取上述供试品溶液 20~25 $\mu\text{l}$ ,注入液相色谱仪,测定峰面积,从标准曲线上读出供试品中相当于黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2 的量,计算,即得。

**【附注】** (1)本实验应有相应的安全、防护措施,并不得污染环境。

(2)残留有黄曲霉毒素的废液或废渣的玻璃器皿,应置于专用贮存容器(装有 10%次氯酸钠溶液)内,浸泡 24 小时以上,再用清水将玻璃器皿冲洗干净。

<sup>1</sup> 2010 年版药典第二增补本修订该法,增加光化学衍生法。

## 第二法<sup>2</sup>

本法系用高效液相色谱-串联质谱法测定药材、饮片及制剂中的黄曲霉毒素，除另有规定外，按下列方法测定。

**色谱条件与系统适用性试验** 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；柱温：25℃，以甲醇为流动相 A 相，以 10mmol/L 醋酸铵水溶液为流动相 B 相，流速 0.3ml/min；按下表进行梯度洗脱：

流动相梯度

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	65	35
4.5	15	85
6	0	100
6.5	65	35
10	65	35

以三重四极杆质谱仪作为检测器，电化学喷雾离子源，采集模式为正离子模式，各化合物质谱参数见下表：

黄曲霉毒素测定质谱参数表

名称	去簇电压 (DP: 伏)	定量离子	碰撞能量 (CE: 伏)	定性离子 1	碰撞能量 (CE: 伏)
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	55	331.1/313.1	33	331.1/245.1	40
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	60	329.1/243.1	35	329.1/311.1	30
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	55	315.0/259.1	35	315.0/287.1	40
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	60	313.1/241.0	50	313.1/285.0	40

**混合对照品溶液的制备** 精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液（黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 的标示浓度分别为 1.0μg/ml、0.3μg/ml、1.0μg/ml、0.3μg/ml、）适量，用 70% 甲醇稀释成含黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、G<sub>2</sub> 浓度为 0.04~3ng/ml，含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 0.12~10ng/ml 的系列对照品溶液，即得（测定时可根据样品实际情况，制备混合对照品溶液或基质混合对照品溶液）。

**供试品溶液的制备** 取供试品粉末约 15g（过二号筛），精密称定，置于均质杯中，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 转 / 分钟），离心 5 分钟（离心速度 2500 转 / 分钟），精密量取上清液 15ml，置 50ml 量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.45μm）滤过，量取续滤液 20ml，通过免疫亲和柱，流速每分钟 3ml，用水 20ml 洗脱，洗脱液弃去，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，并用甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

<sup>2</sup> 增订第二法。

**测定法** 精密吸取上述混合对照品溶液各 5 $\mu$ l，注入液相色谱—质谱仪，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，进样浓度为横坐标，绘制标准曲线。另精密吸取上述供试品溶液 5 $\mu$ l，注入液相色谱—质谱仪，测定峰面积，从标准曲线上读出供试品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 的浓度，计算，即得。

征求意见稿