高效液相色谱-蒸发光散色法测定西洋参中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇的方法研究*

□吴剑威** （中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所 北京 100193）
（中国药材集团公司科技研发部 北京 102600）
赵润怀 陈 波（中国药材集团公司科技研发部 北京 102600）

摘 要：目的：建立西洋参中脱氧雪腐镰刀菌烯醇（DON）和雪腐镰刀菌烯醇（NIV）的高效液相色谱-蒸发光散色同时检测的方法。方法：样品采用甲醇-水（75:25）混合溶剂进行震荡提取，通过多功能净化柱（MFC）进行一次性净化，以 C_{18} 柱为分离柱，水-乙腈（80:20）混合溶剂为流动相进行高效液相色谱分离和检测。结果：在西洋参样品中，本方法在 0.15~20μg·g^{-1} 添加范围内的回收率为 86.4%~91.5%；相对标准偏差（RSD）为 2.3%~7.4%；DON 和 NIV 的最低检测限分别为 15 和 10ng·g^{-1}（S/N=3）。结论：此方法简便、可靠，可用于西洋参中的 DON 和 NIV 含量测定。

关键词：脱氧雪腐镰刀菌烯醇 雪腐镰刀菌烯醇 高效液相色谱-蒸发光散色 多功能净化柱 西洋参

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.01.020

脱氧雪腐镰刀菌烯醇（Deoxynivalenol，DON）俗称为“呕吐毒素”，1972 年几乎在日本和美国被同时发现。其与雪腐镰刀菌烯醇（Nivalenol，NIV）均属于单端孢霉烯族毒素，主要由某些镰刀菌产生。DON、NIV 具有较强的危险性，不仅可以引起人及动物呕吐、厌食，免疫系统和造血系统受到损害，还具有很强的皮肤毒性和细胞毒性。DON 还能影响机体内脏器官，导致神经系统的紊乱，抑制 DNA 和蛋白质的生物合成，并使生物体致癌、致畸。NIV 在急性毒性、皮肤毒性、细胞毒性和其他生物作用方面均比 DON 强 10 倍。DON、NIV 污染粮谷类的现象非常普遍，世界各地均有报道[1~3]。为此，美国及欧盟等许多国家对食品和饲料中的真菌毒素含量进行了严格的限制，我国则在《粮食卫生标准》（GB2715-2005）中规定面粉、玉米中 DON 的限量为 1mg·kg^{-1}。但是，到目前为止对 NIV 的研究还不够深入，我国尚未制定出其适用的分析检测仲裁方法；关于 DON、NIV 在中药中存在的污染情况及相应的检测分析方法方面的研究更是鲜有文献报道。

测定 DON、NIV 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

收稿日期：2010-05-22
修回日期：2010-05-31
* 国家中医药管理局公益性行业科研专项（200807042）：中药中真菌及真菌毒素污染分析及检测技术标准，负责人：陈波。
** 通讯作者：吴剑威，中级，研发主管，主要研究方向：中药材质量控制及新药开发研究，Tel：010-61252980，E-mail:wujianwei22@sina.com。

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

免疫吸附法(ELISA)等[1]。由于 DON、NIV 在样品中的含量甚微，而共存干扰物质甚多，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、C_{18}、中性氧化铝、弗罗里硅土等固相萃取法等[1]。另外,现有研究中对 DON 和 NIV 的高效液相色谱法检测时,多配备荧光检测器。目前还未见有使用高效液相色谱-蒸发光散射检测(ELSD)检测上述毒素的报道。

本文研究了采用多功能净化柱(MFC)进行样品的净化，建立了 HPLC 同时检测中药中 DON 和 NIV 的简便、快速方法,DON 和 NIV 均获得了理想的回收率和分离效果，为建立制定快速、准确检测中药中 DON 和 NIV 毒素方法的标准打下了基础。

一、材料与方法

1. 试剂与仪器

除特殊注明外,所用试剂均为分析纯,实验用水为重蒸馏水。乙腈、甲醇为色谱纯（飞世尔公司)。DON 和 NIV 标准品购自美国 Sigma 公司，纯度不低于 98%(批号分别为:079K4097、SZE9264X)。

多功能净化柱 MycoSep 227(美国 Romer Labs 公司)。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。

DON 和 NIV 混合标准溶液：分别精密称取适量的 DON 和 NIV 标准物质溶于甲醇，配制成浓度为 100μg·mL^{-1} 的混合标准储备溶液。

2. 样品处理

(1)提取。

准确称取磨碎混匀的待测样品 25.0g，置于 200mL 具塞瓶中,加入 150mL 甲醇-水(75:25)混合溶剂,震荡提取 30min,静置过滤。50℃减压浓缩至约 10mL。

(2)净化。

将 10mL 浓缩液转移至 MycoSep 227 柱管中,以 1mL·min^{-1} 的流速通过,收集 8mL 滤液,于 50℃减压蒸发至干。残渣用 1mL 甲醇溶解, 过 0.45μm 滤膜,供液相色谱测定。

3. 色谱条件

色谱柱:Agela Technologies (AGT) Venusil MP C_{18} 柱[250mm×4.6mm (i.d.),5μm];流动相:水-乙腈(80:20);流速:1.0mL·min^{-1};漂移管温度 50℃;高纯氮气流压力 30psi;柱温:25℃;进样量:50μL。见图 1。

二、结果与讨论

1. MFC 柱的选择

MFC 柱是一种特殊的 SPE 柱，其中 MycoSep 113、MycoSep 225 和 MycoSep 227 柱,均适用于 DON 和 NIV 等单端孢霉烯族真菌毒素的净化处理。MycoSep 227 柱由于在柱填料上进行了一定的改进,因此更适于大量提取液的净化。本文采用 MycoSep 227 柱净化，不但可以提高 DON 和 NIV 的检测灵敏度,而且回收率同样较为理想。

2. 提取溶剂体系的选择和优化

在样品的提取阶段，选择适当极性的提取溶剂对提高回收效率十分重要。Tanaka 等[4]发现乙腈-水(75:25) 提取 DON 的回收率最高。考虑到乙腈的毒性,我们通过预实验摸索,最终发现甲醇-水(75:25)可以有效地将 DON 和 NIV 提取出来。同时,在提取时间上,我们比较了 15min、30min、45min、60min 等几个不同时间,最终确定 30min 为适宜提取时间。

3. 标准曲线与检出限

取适量体积标准储备溶液，用色谱级甲醇分别配制浓度为 0.1~48μg·mL^{-1} 7 个不同浓度的 DON 和 NIV 混合标准液,按上述实验条件进样,以所得峰面积(y)对 DON 和 NIV 的浓度(x)进行回归分析,结果表明线性关系良好。回归方程、相关系数见表 1。

在本实验条件下，将标准溶液连续稀释后进行空白样品的添加回收,根据 3 倍噪音的峰响应值、取样量和进样量,计算出 DON 和 NIV 的方法检出限分别为 15、10ng·g^{-1}。图 1 是标准品、西洋参加标样品和空白样品的 HPLC 图。DON 和 NIV 的保留时间分别为 3.915、5.699min。

4. 回收率与精密度

在中药材样品中，分别以 0.15、5、20μg·g^{-1} 3 个

表 1　线性范围、相关系数(r)和添加回收率(n=5)

对照品	线性方程	相关系数(r)	添加量(μg·g^{-1})	回收率(%)	RSD(%)
DON	y=443602x-466531	0.9996	0.15	86.4	7.4
			5	87.9	4.5
			20	90.7	5.5
NIV	y=192788x-35347	0.9996	0.15	88.3	6.9
			5	86.8	6.1
			20	91.5	2.3

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

水平加标，按照本实验方法和条件进行回收率实验，每个添加浓度水平重复 5 次操作，测定精密度，实验数据见表 1。由表 1 可以看出，在 0.15~20μg·g^{-1} 添加浓度范围之间，DON 和 NIV 的加标回收率分别为 86.4%~90.7%和 86.8%~91.5%，5 次测定的 RSD 分别在 4.5%~7.4%和 2.3%~6.9%之间。

精密吸取含有 DON 和 NIV 的西洋参样品溶液 50μL，每隔 2h 进样 1 次，共测定 7 次，测定峰面积积分值，结果其 RSD 分别为 3.8%和 4.2%。表明供试品溶液在 12h 内稳定性良好。

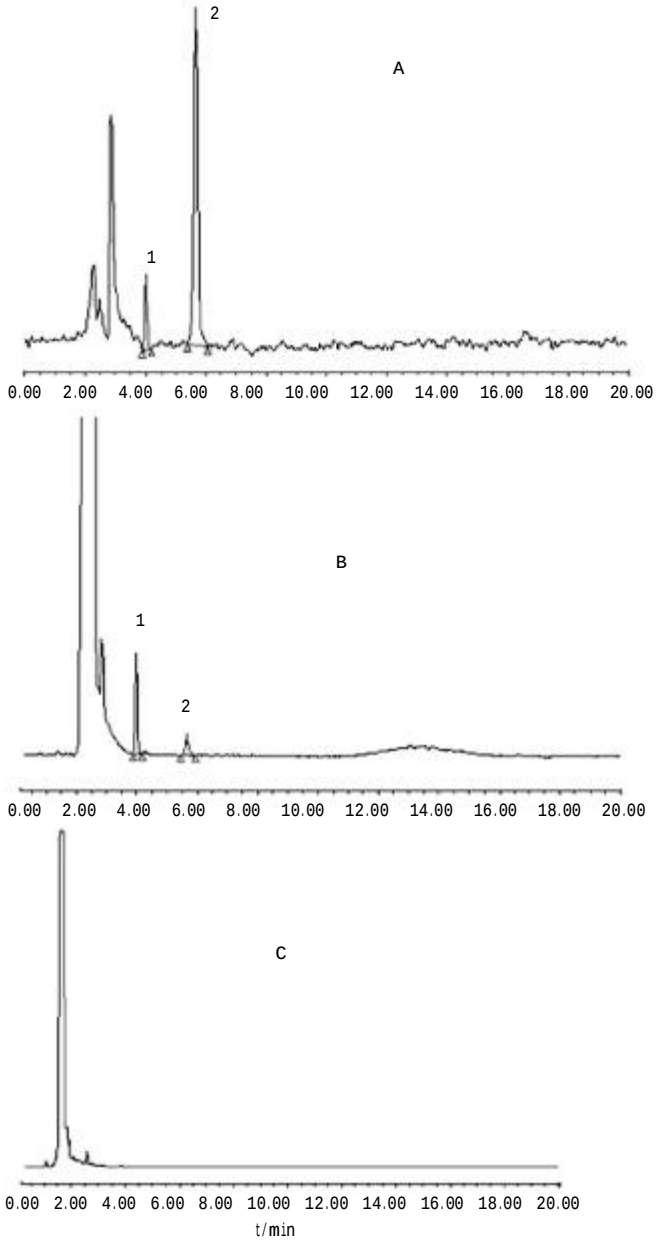

图 1 标准品(A)、西洋参加标样品(B)及空白样品(C)的 HPLC 图

注：1. NIV，2. DON。

三、结 论

目前，国内外对镰刀菌毒素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 DON 和 NIV 以及其他镰刀菌毒素的分析行业标准，目前尚属空白。由于镰刀菌为土壤伴生菌，中药材中根和根茎类药材极易受到镰刀菌的侵染。据报道，F. oxysporum、F. solani 和 F. moniliforme 等产毒镰刀菌是导致中药白术、黄芪、三七、葛根等药材根腐病的主要致病菌[5~8]。本课题组现已从人参、西洋参、三七、柴胡、山豆根、荆芥、芍药、黄芪等 10 余种药用植物中分离得到 30 余株镰孢属真菌，主要为致病菌和根际菌[9]。这些菌株附生或寄生在药用植物植株上，与其寄主密切相关，其中主要包括产生单端孢霉烯族类毒素菌株。因此，很有必要对中药材，尤其是易受镰刀菌侵染的根和根茎类药材，建立全面的、系统的中药中 DON 和 NIV 以及其他镰刀菌毒素的检测技术及限量标准。

本研究采用多功能柱净化，并结合 HPLC-ELSD 可同时检测西洋参中的 DON 和 NIV，其方法检出限分别为 15 和 10ng·g^{-1}。该方法具有净化效果好、灵敏度高、操作简便、快速等特点。经考察该方法的回收率、精密度均可以满足实际工作的要求。

参考文献

1 Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals. Fresenius J Anal Chem, 2001, 371:285.

2 Langseth W, Rundberget T. Instrumental methods for determination of nonmacrocyclic trichothecenes in cereals, foodstuffs and cultures. J Chromatogr A, 1998, 815:103.

3 Creppy E E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol Lett, 2002, 127:19.

4 Tanaka T, Hasegawa A, Matsuki Y, et al. A survey of the occurrence of nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in foodstuffs and health foods in Japan. Food Addit Contam, 1985, 2(4):259.

5 臧少先，安信伯，石丽军，等. 白术根腐病症状类型及病原鉴定. 河北农业大学学报，2005，28(3):73.

6 林兰稳，李兆雄，何熊威，等. 粉葛根腐病的病原鉴定. 生态环境，2003，12(4):516.

7 邓成贵. 黄芪根腐病病原鉴定研究初报. 中药材，2005，28(2):85.

8 缪作清，李世东，刘杏忠，等. 三七根腐病病原研究. 中国农业科学，2006，39(7):1371.

9 高微微，陈震，张丽萍，等. 药剂消毒对西洋参根际微生物及根病的作用研究. 中国中药杂志，2006，31(8):684.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

Simultaneous Determination of Deoxynivalenol and Nivalenol in Radix Panacis Quinquefolii by High Performance Liquid Chromatography with Evaporative Light Scattering Detection (HPLC-ELSD)

Wu Jianwei[1,2], Zhao Runhuai[2], Chen Bo[2]

(1. Institute of Medicinal Plant Development, affiliated with the Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
2. Technology Development Center, China National Group Corp. of Traditional and Herbal Medicine, Beijing 102600, China)

Abstract: The study aimed to establish the method for determining simultaneously deoxynivalenol (DON) and nivalenol (NIV) in Radix Panacis Quinquefolii. The method is to extract the sample with a mixture of acetonitrile-water (75:25). The extract was purified by multifunctional cleanup column. DON and NIV were then separated and determined by reversed-phase HPLC with C_{18} column and a mixture of water-acetonitrile(80:20) as mobile phase. The results showed that the average recoveries of DON and NIV from the Radix Panacis Quinquefolii spiked at levels of 0.15~20 $\mu g \cdot g^{-1}$ ranged from 86.4%~91.5%, with the relative standard deviation less than 8%. The detection limits for DON and NIV were 15 and 10 $ng \cdot g^{-1}$ (S/N=3), respectively. The conclusion is that the content of DON and NIV in the Radix Panacis Quinquefolii were determined for the first time. The established method can be used in determining the contents of multiple DON and NIV in the Radix Panacis Quinquefolii simultaneously.

Keywords: Deoxynivalenol, Nivalenol, HPLC-ELSD, Multifunctional cleanup column (MFC), Radix Panacis Quinquefolii

（责任编辑：李沙沙　张志华，责任译审：王　晶）

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn