高效液相色谱-光化学衍生法测定陈皮中黄曲霉毒素 G2 的不确定度评定

谢良山[1], 沈君子[1], 钱 勇[2*]

(1. 上海佰年诗丹德检测技术有限公司, 上海 201314; 2. 上海诗丹德标准技术服务有限公司, 上海 201314)

摘 要: 目的 评定高效液相色谱法-光化学衍生法测定陈皮中黄曲霉毒素 G2 的含量的不确定度。**方法** 参考中国药典四部通则 2351 黄曲霉毒素测定法第一法对陈皮进行提取, 以 C_{18} 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)为分析柱, 甲醇:乙腈:水(30:12:58, *V*:*V*:*V*)为流动相进行洗脱, 流速 0.6 mL/min, 柱温 40 ℃, 使用柱后光化学衍生器连接荧光检测器进行检测。找出影响不确定度的因素, 对不确定度进行评估, 并给出不确定度, 如实反映测量的置信度和准确度。**结果** 该批次陈皮样品中黄曲霉毒素 G2 的含量为 0.08 μg/kg, 其实际含量可表示为(0.08±0.005) μg/kg (*k*=2)。**结论** 黄曲霉毒素 G2 测定过程中主要影响因素为高效液相色谱仪的校准, 其次为测量重复性, 而样品溶液的配置与对照品溶液的稀释引入的不确定因素较小, 天平称量引入的不确定因素可以忽略不计。

关键词: 高效液相色谱-光化学衍生法; 陈皮; 黄曲霉毒素 G2; 不确定度评定

Evaluation of uncertainty in determination of aflatoxin G2 in tangerine peel by high performance liquid chromatography-photochemical derivatization

XIE Liang-Shan[1], SHEN Jun-Zi[1], QIAN Yong[2*]

(1. *Standard Testing Lab* (*Shanghai*) *Co*., *Ltd*., *Shanghai* 201314, *China*;
2. *Shanghai Standard Technology Co*., *Ltd*., *Shanghai* 201314, *China*)

ABSTRACT: Objective To evaluate the uncertainty of determination of aflatoxin G2 in tangerine peel by high performance liquid chromatography-photochemical derivatization. **Methods** The extraction of dried tangerine peel was extracted with reference to the first method of the Chinese Pharmacopoeia, four general rules 2351, aflatoxin assay, using C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) as the analytical column, methanol: acetonitrile: water (30:12:58, *V:V:V*) elution as the mobile phase for gradient elution, the flow rate was 0.6 mL/min, and the column temperature was 40 °C. The fluorescence detector was connected with a post-column photochemical derivator for detection. The factors affecting the uncertainty were found out, the uncertainty was evaluated, and the uncertainty was given to accurately reflect the confidence and accuracy of the measurement. **Results** The content of aflatoxin G2 in this batch of tangerine peel samples was 0.08 g/kg, and the actual content could be expressed as (0.08±0.005) g/kg (*k*=2). **Conclusion** The main influencing factors in the determination process of aflatoxin G2 are the calibration of the

基金项目: 上海市科委科研计划项目(16142200200)

Fund: Supported by the Science and Technology Plan of STCSM (16142200200)

***通讯作者:** 钱勇, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为中药和健康食品的检测及化学成分研究。E-mail: Qianyong2232@163.com

***Corresponding author:** QIAN Yong, Master, Senior Engineer, Shanghai Standard Technology Co., Ltd, Building 25, #58 Xinhao Road, Shanghai 201314, China. E-mail: Qianyong2232@163.com

high-performance liquid chromatography, followed by the measurement of repeatability, and the uncertainty factors of the sample solution configuration and the dilution introduction of the reference solution are less. The uncertainty introduced by the balance weighing is negligible.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-photochemical derivatization; tangerine peel; aflatoxin; uncertainty evaluation

1　引　言

1993 年黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为 1 类致癌物, 是一种毒性极强的剧毒物质[1−3]。黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用, 严重时可导致肝癌甚至死亡。黄曲霉毒素有很多种[4], 其毒性和致癌性也最强。为进一步加强中药材的质量控制, 国家食品药品监督管理局, 增加中药材的安全性指标控制项目, 尤其是加强对中药材中重金属及有害元素、黄曲霉毒素、农药残留量的控制。《中国药典》对中药材的规定限度为黄曲霉毒素 B1 不得过 5 μg/kg; 黄曲霉毒素 G2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 B2 总量不得过 10 μg/kg。

陈皮为芸香科植物橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其栽培变种的干燥成熟果皮, 药材分为陈皮和广陈皮, 具有理气健脾、燥湿化痰的功效, 临床用于脘腹胀满, 食少吐泻, 咳嗽多谈的治疗。现代药理学研究表明, 陈皮具有抗炎[5]、抗氧化[6]、抗心血管疾病[7]及抗癌[8,9]的作用, 其活性成分主要为黄铜雷化合物, 如橙皮苷、川陈皮素、橘皮素等[10]。但陈皮在加工储存过程中, 由于温度和湿度等环境影响, 很容易霉变而产生如黄曲霉等真菌, 这些微生物代谢从而产生黄曲霉毒素[11]。因此, 黄曲霉毒素对食品药品安全具有重要影响。目前, 陈皮中黄曲霉毒素的检测方法主要有薄层层析法、液相色谱法、荧光光度法和酶联免疫法等[12]。本试验参考 2015 年版《中国药典》中黄曲霉毒素测定法, 经免疫亲和柱处理, 使用光化学衍生法, 结合高效液相色谱-荧光检测仪, 对市面上随机购买的陈皮样品进行黄曲霉毒素含量的测定, 评价陈皮的安全性, 对提高人们的食品药品安全意识和保障人体健康具有重要意义。

不确定度能定量评价检测数据质量的优劣, 而且还能反映检测过程中各项不确定度来源对测量结果的影响程度[13,14]。不确定度的评估方法是先对测量过程进行全面分析, 识别每一个可能的不确定度[15,16]。本试验根据 CNAS- GL06《化学分析中的不确定度的评估指南》[17]、国家计量技术规范《测量不确定度评定与表示》[18]和《化学分析测量不确定度评定》[19], 系统全面地对陈皮中黄曲霉毒素 G2 含量测定结果的不确定度进行评定, 找出影响不确定度的因素, 提高实验精度, 为正确评价数据提供参考依据。

2　材料与方法

2.1　材料及试剂

陈皮(随机购买市面上的某批次陈皮药材, 常温干燥保存)。

甲醇(色谱纯, 上海安谱科技股份有限公司); 氯化钠(分析纯, 上海泰坦科技股份有限公司); 黄曲霉毒素对照品溶液(黄曲霉毒素 G2 标示浓度为 0.64 μg/mL, 中国食品药品检定研究院)。

2.2　仪器与设备

XS-205DU 电子天平(梅特勒-托利多集团); Agilent 1260 高效液相色谱仪(配荧光检测器); Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C_{18} 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(美国安捷伦科技有限公司); FJ200-S 均质机(上海齐威仪器有限公司); TGL-16C 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); 黄曲霉毒素免疫亲和柱(3 mL, 上海安谱科技股份有限公司); PHRE-15 光化学衍生器(中世沃克(天津)科技发展股份有限公司)。

2.3　测定方法

对照品溶液的制备: 精密量取黄曲霉毒素 G2 对照品溶液(黄曲霉毒素 G2 标示浓度为 0.64 μg/mL)1.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 作为贮备溶液。精密量取贮备溶液 0.9 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 再精密移取 1 mL 置 10 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 即得。

供试品溶液的制备、色谱条件及测定法均参考 2015 年版《中国药典》四部通则 2351 黄曲霉毒素测定法第一法[20], 取陈皮粉末约 5 g[21], 进行测试。

3　结果与分析

3.1　根据外标法建立数学模型

$$w=\frac{A_{\text{供试品峰面积}}}{A_{\text{对照品峰面积}}}\times\frac{M_{\text{对照品进样质量}}}{M_{\text{供试品进样质量}}}$$

$$=\frac{A_{\text{供试品峰面积}}}{A_{\text{对照品峰面积}}}\times\frac{C_{\text{对照品母液浓度}}\times V_{\text{对照品稀释倍数}}\times V_{\text{对照品进样体积}}}{M_{\text{供试品取样量}}\times V_{\text{供试品稀释体积}}\times V_{\text{供试品进样体积}}}$$

其中: $A_{\text{供试品峰面积}}$为供试品峰面积, mAU*s; $A_{\text{对照品峰面积}}$为对照品峰面积, mAU*s; $C_{\text{对照品母液浓度}}$: 对照溶液母液浓度,

μg/mL; $V_{对照品稀释倍数}$: 对照品稀释倍数; $V_{对照品进样体积}$: 对照品进样体积, μL; $M_{供试品取样量}$: 供试品取样质量, kg; $V_{供试品稀释体积}$: 供试品稀释体积, mL^{-1}; $V_{供试品进样体积}$: 供试品进样体积, μL。

3.2 分析不确定度来源

如图 1 所示, 高效液相色谱-光化学衍生法测定过程引入的不确定度主要有:

称量引起的不确定度: 由天平度读数引起, 由天平校准和示值误差决定。

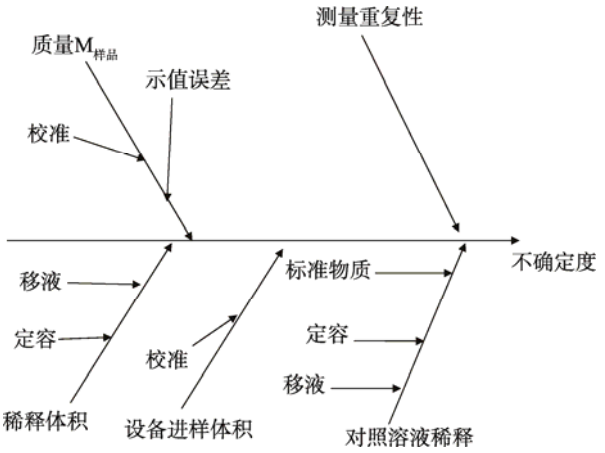

图 1 不确定的来源分析图

Fig.1 Analysis diagram of uncertainty sources

稀释引起的不确定度: 主要由容量瓶定容引起的不确定度(该不确定度由容量瓶体积校准和温度校准决定)和移液管移液产生的不确定度(该不确定度由移液管体积校准和温度校准决定)组成。

对照溶液稀释引起的不确定度: 主要由容量瓶定容引起的不确定度(该不确定度由容量瓶体积校准和温度校准决定)和移液管移液产生的不确定度(该不确定度由移液管体积校准和温度校准决定)组成。

测量重复性实验引起的不确定度。

液相色谱仪进样体积与荧光检测器峰面积重复性引起的不确定: 主要由仪器校准决定。

根据以上分析, 结合《化学分析中不确定度的评估指南》规定, 样品中黄曲霉毒素 B1 相对标准不确定度合成公式为:

$$u_r(X)=\sqrt{u_r^2(m)+u_r^2(yx)+u_r^2(dx)+u_r^2(\bar{x})+u_r^2(yq)}$$

其中, $u_r(X)$: 样品中 G2 的含量测定的相对标准不确定度; $u_r(m)$: 样品称量引入的相对标准不确定度; $u_r(yx)$: 样品溶液稀释引入的相对标准不确定度; $u_r(dx)$: 对照品溶液稀释引入的相对标准不确定度; $u_r(\bar{x})$: 6 次测试重复性引入的相对标准不确定度; $u_r(yq)$: 仪器引入的相对标准不确定度。

3.3 不确定度分量的评定

3.3.1 样品称量引入的相对标准不确定度$u_r(m)$

使用万分之一电子分析天平称量, 称量过程产生的不确定度主要来自天平自身存在的系统误差。由检定证书知, 重复性误差为 0.2 mg, 按均匀分布考虑, 则有标准不确定度为 $0.2/\sqrt{3}=0.115$ mg; 示值误差为 0.1 mg, 按均匀分布考虑, 则有标准不确定度为 $0.1/\sqrt{3}=0.0577$ mg; 合成上述 2 项不确定度为 $u=\sqrt{0.115^2+0.0577^2}=0.129$ mg; 则称量引入的相对标准不确定度取质量平均数 5.1284 g(即 5128.4 mg)计算得$u_r(m)=0.129/5128.4=0.0000252$。

3.3.2 样品溶液$u_r(yx)$和对照品$u_r(dx)$稀释引入的相对标准不确定度

此部分不确定度包括容量瓶和移液管的校准引起的允差和温度波动引起的体积变化 2 个部分。根据 JJG 196–2006《常用玻璃量器检定规程》[22]和 JJF 1059-1999《测量不确定度评定与表示》的规定, 玻璃器皿根据 B 类计算允差, 取矩形分布 $k=\sqrt{3}$, 则校准引入的标准不确定度和相对标准不确定度见表 1; 由于温度波动引起的体积变化, 根据制造商提供的信息, 常用玻璃量器校准温度为 20 ℃, 而进行试验时, 实验室室内环境温度为 24.9 ℃, 与校准时的温差为 4.9 ℃, 液体的体积膨胀明显大于容量瓶的膨胀, 因此只考虑前者即可, 由膨胀系数(以水的膨胀系数计算)为 2.1×10^{-4}/℃, 取矩形分布 $k=\sqrt{3}$, 故温度波动引起的体积不确定度以及与校准引入的标准不确定度合成结果见表 1。

从表 1 可得样品溶液和对照品稀释引入的相对标准不确定度分别为:

$$u_r(yx)=\sqrt{0.00063^2+0.00113^2+0.00083^2+0.00105^2+0.00437^2}=0.00475;$$

$$u_r(dx)=\sqrt{0.00295^2+0.00130^2+0.00408^2+0.00130^2+0.00408^2+0.00130^2}=0.00686。$$

3.3.3 测量重复性引起的不确定度$u_r(\bar{x})$

在相同条件下, 对同一样品进行连续 6 次实验, 所得结果见表 2。黄曲霉毒素 G2 含量的标准偏差为: $S=\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X_i-\bar{x})^2}{n-1}}=0.1605\%$, 取三角分布 $k=\sqrt{6}$, 则有标准不确定度为: $S/\sqrt{6}=0.06552\%$, 重复性测定的相对标准不确定度为:

$$u_r(\bar{x})=0.0006552/0.0831=0.007885。$$

3.3.4 液相色谱仪荧光检测器校准引入的相对标准不确定度$u_r(yq)$

由校准知 $u_r=5.1\%$, $k=2$ 则相对标准不确定度为: $u_5=5.1\%/2=0.0255$。

3.4 不确定度的合成与扩展不确定度

根据上述计算得到的各不确定度分量, 合成相对标准不确定度为:

表 1　量具引入的不确定度
Table 1　Uncertainty introduced by the gauge

项目	不同器具								
	25 mL 移液管	50 mL 移液管	15 mL 移液管	50 mL 容量瓶	20 mL 移液管	2 mL 容量瓶	2 mL 移液管	10 mL 容量瓶	1 mL 移液管
允差/mL	0.03	0.05	0.025	0.05	0.03	0.015	0.01	0.02	0.007
校准引入的标准不确定度/mL	0.01732	0.02887	0.01443	0.02887	0.01732	0.00866	0.00577	0.01155	0.00404
温度引起的体积变化/mL	0.02573	0.05145	0.01544	0.05145	0.02058	0.00206	0.00206	0.01029	0.00103
温度引入的标准不确定度/mL	0.01485	0.02970	0.00891	0.02970	0.01188	0.00119	0.00119	0.00594	0.00059
合成 2 项标准不确定度结果/mL	0.02282	0.04142	0.01696	0.04142	0.02100	0.00874	0.00589	0.01299	0.00408
合成 2 项相对标准不确定度结果	0.00091	0.00083	0.00113	0.00083	0.00105	0.00437	0.00295	0.00130	0.00408

注: 其中样品处理时“精密加入 75 mL 70% 甲醇”使用 50 mL 移液管和 25 mL 移液管 2 次移液, 则其相对标准不确定度为 u_r (75 mL)=$\frac{\sqrt{0.02282^2+0.04142^2}}{75}$=0.00063。

表 2　重复测量结果
Table 2　Result of repeated measurement

编号	取样量/g	黄曲霉毒素 G2 含量/(μg/kg)
1	5.13680	0.084395
2	5.10810	0.082635
3	5.17510	0.082328
4	5.07700	0.085508
5	5.15680	0.082805
6	5.11650	0.080975
平均值$\bar{x}$	5.12838	0.083108
标准偏差 S	0.03537	0.001605

$$u_r(X)=\sqrt{u_r^2(m)+u_r^2(yx)+u_r^2(dx)+u_r^2(\bar{x})+u_r^2(yq)}$$

$$=\sqrt{0.0000252^2+0.00475^2+0.00686^2+0.007885^2+0.0255^2}=0.02797。$$

则标准不确定度为:

u=0.02797×0.0831=0.00232 μg/kg。

3.5　相对扩展不确定度

取包含因子 k=2, 在 95%的置信区间下, 则扩展不确定度为:

U=0.00232×2 = 0.00464 μg/kg。

当陈皮样品中黄曲霉毒素 G2 的含量为 0.08 μg/kg, 其实际含量可表示为(0.08±0.005) μg/kg (k=2)。

4 结论与讨论

本研究对市面上随机抽取的一批陈皮中黄曲霉毒素 G2 含量的检测过程中的不确定度分量进行评估，最后计算出相对扩展不确定度。对各分量的相对标准不确定度进行分析比较发现，高效液相色谱法检测黄曲霉毒素 G2 的测量不确定度评估结果为：对于黄曲霉毒素 G2 含量为 0.08 μg/kg 的样品，其扩展不确定度为 0.005 μg/kg，占 6%，说明黄曲霉毒素 G2 含量测定方法由各测量不确定因素带来的测量误差仍然存在。通过对各分量的相对标准不确定度进行比较发现，黄曲霉毒素 G2 测定过程中主要影响因素为高效液相色谱仪的校准，其次为测量重复性，而样品溶液的配置与对照品溶液的稀释引入的不确定因素较小，天平称量引入的不确定因素可以忽略不计。可能是该仪器使用时间较长，在后续的实验过程中应增加其期间核查频次，以保证其状态良好，降低实验误差。此外，操作人员应熟悉实验过程，掌握操作细节，以避免操作误差。

参考文献

[1] 谢光洪，陈承祯，徐闯．黄曲霉毒素检测方法的研究[J]．饲料工业，2007, 28(6): 53−56.
Xie GH, Chen CZ, Xu C. Research on detection method of aflatoxin [J]. Feed Ind, 2007, 28(6): 53−56.

[2] 赵飞，焦彦朝，连宾，等．黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J]．贵州农业科学，2006, 34(5): 123−126.
Zhao F, Jiao YC, Lian B, *et al*. Research progress in determination methods of aflatoxins [J]. Guizhou Agric Sci, 2006, 34(5): 123−126.

[3] Peraica M, Radic B, Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in human [J]. Bull World Health Organiz, 1999, 77: 754−766.

[4] 丁晓雯，柳春红．食品安全学[M]．北京：中国农业大学出版社，2011.
Ding XW, Liu CH. Food safety [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2011.

[5] 贺燕林，杨中林．陈皮不同提取物及橙皮苷部位的抗炎活性比较研究[J]．亚太传统医药，2014, 10(13): 23−25.
He YL, Yang ZL. Comparative study on anti-inflammatory activity of different extracts of orange peel and orange-skin glycosides [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 2014, 10(13): 23−25.

[6] 刘邦夫．几种植物有效成份抗氧化性的综合性研究[D]．长沙：湖南农业大学，2008.
Liu BF. Comprehensive study on the antioxidant properties of several plant active ingredients [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2008.

[7] 俞静静，苏洁，吕圭源．陈皮抗心脑血管疾病相关药理研究进展[J]．中草药，2016, 47(17): 3127−3132.
Yu JJ, Su J, Lv GY. Advances in pharmacological research related to Chen Pi's anti-cardio-cerebrovascular disease [J]. Chin Herb Med, 2016, 47(17): 3127−3132.

[8] 胡燕飞．陈皮中抗肿瘤活性成分的研究[D]．大连：大连理工大学，2014.
Hu YF. Study on anti-tumor active ingredients in Chen's skin [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2014.

[9] 王宏．新会陈皮植物化学物生物活性及橙皮素抑制乳腺癌细胞活性机理研究[D]．广州：华南理工大学，2017.
Wang H. Study on the bioactivity of Xinhui Chenpi chemicals and the mechanism of orange peel in inhibiting breast cancer cell activity [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.

[10] 都盼盼，白宗利，乐智勇，等．陈皮药材和饮片黄酮类成分特征图谱研究[J]．亚太传统医药，2019, 2(15): 31−33.
Du PP, Bai ZL, Le ZY, *et al*. Study on the characteristics of flavonoids in Chen Pi and drinking tablets [J]. Asia-Pacific Tradit Med, 2019, 2(15): 31−33.

[11] 王帆，乙引，杨占南，等．陈皮中黄曲霉毒素测定及其安全评价[J]．广东农业科学，2012, 39(3): 84−86.
Wang F, Yi Y, Yang ZN, *et al*. Determination of aflatoxin in orange peel and its safety evaluation [J]. Guangdong Agric Sci, 2012, 39(3): 84−86.

[12] 张艺兵，鲍蕾，褚庆华，等．农产品中真菌毒素的检测分析[M]．北京：化学工业出版社，2006.
Zhang YB, Bao L, Chu QH, *et al*. Detection and analysis of fungal toxins in agricultural products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006.

[13] Behrens TEJ, Woolrich MW, Jenkinson M, *et al*. Characterization and propagation of uncertainty in diffusion-weighted MR imaging [J]. Magnet Res Med, 2003, 50(5): 1077−1088.

[14] 乌吉木．高效液相色谱法测定植物油中黄曲霉毒素 B1 含量的不确定度评定[J]．现代食品，2018, (6): 81−84.
Wu JM. Determination of aflatoxin B1 in vegetable oil by high performance liquid chromatography [J]. Mod Food, 2018, (6): 81−84.

[15] Kruth JP, Van GN, Bleys P, *et al*. Uncertainty determination for CMMs by Monte Carlo simulation integrating feature form deviations [J]. CIRP Annals-Manufact Technol, 2009, 58(1): 463−466.

[16] 伍雅婷，郭怡阳．HPLC 同步测定多种合成色素含量检测结果的不确定度评定[J]．中国食物与营养，2016, 22(12): 22−26.
Wu YT, Guo YY. Evaluation of uncertainty of determination results of various synthetic pigments by HPLC [J]. Chin Food Nutr, 2016, 22(12): 22−26.

[17] CNAS-GL 06 化学分析中不确定度的评估指南[S].
CNAS-GL 06 Guidelines for the evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].

[18] JJF 1059.1-2012 测量不确定度评定与表示[S].

JJF 1059.1-2012 Measurement uncertainty assessment and representation [S].

[19] JJF 1135-2005 化学分析测量不确定度评定[S].
JJF 1135-2005 Evaluation of uncertainty in chemical analysis [S].

[20] 国家药典委员会. 中国药典四部 2351 黄曲霉毒素测定法[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
National Pharmacopoeia Committee. Determination of aflatoxin from 2351 in four parts of the Chinese Pharmacopoeia [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing House, 2015.

[21] 国家药典委员会. 中国药典一部陈皮[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
National Pharmacopoeia Committee. Chinese Pharmacopoeia a tangerine peel [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing House, 2015.

[22] JJG 196-2006 常用玻璃量器检定规程[S].
JJG 196-2006 Verification regulation of working glass container [S].

(责任编辑：韩晓红)

作者简介

谢良山，助理工程师，主要从事中药和健康食品的检测及化学成分研究。
E-mail: xls@nature-standard.com

钱　勇，硕士，高级工程师，主要研究方向为中药和健康食品的检测及化学成分研究。
E-mail: Qianyong2232@163.com