

高效液相色谱-荧光检测法测定沉香中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂

张金星¹, 龚旭东¹, 周 溢¹, 徐丹洋¹, 高 慧^{2*}

1. 南通市食品药品监督检验中心, 江苏 南通 226006

2. 南京中医药大学连云港附属医院, 江苏 连云港 222004

摘要: 目的 建立高效液相色谱-光化学衍生-荧光检测法测定沉香药材中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂。方法 采用高效液相色谱法, 通过免疫亲和柱提取和净化, 荧光检测器检测。Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水 (45:55); 体积流量: 0.8 mL/min; 柱温: 30 ℃; 进样盘温度: 4 ℃; 荧光激发波长为 360 nm, 发射波长为 450 nm。结果 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 分别在 9.3~74.4、3.0~24.0、9.3~74.4、3.5~28.0 pg 线性关系良好, *r* 均大于 0.998 0; 检测限分别为 1.86、0.60、1.86、0.70 pg, 定量限分别为 7.44、2.40、7.44、2.80 pg。平均回收率分别为 78%、92%、82%、99%, RSD 值分别为 4.4%、3.0%、4.3%、2.8%。结论 所建立的方法结果准确、重复性、稳定性均良好, 可用于沉香药材中黄曲霉毒素的质量控制。

关键词: 沉香; 黄曲霉毒素 B₁; 黄曲霉毒素 B₂; 黄曲霉毒素 G₁; 黄曲霉毒素 G₂; 高效液相色谱; 荧光检测器

中图分类号: R985 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)01-0035-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.01.006

Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, and G₂ in *Aquilariae Lignum Resinatum* by HPLC-fluorescence detection

ZHANG Jin-xing¹, GONG Xu-dong¹, ZHOU Mi¹, XU Dan-yang¹, GAO Hui²

1. Nantong Food and Drug Control Center, Nantong 226006, China

2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine Lianyungang Hospital, Lianyungang 222004, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-fluorescence detection method for determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, and G₂ in *Aquilariae Lignum Resinatum*. **Methods** HPLC method was adopted, extracting and purifying were used with an immunoaffinity column, enhanced by a photochemical high-performance liquid chromatography, and detected by a fluorescent detector. The contents of aflatoxins were determined on Agilent C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was methanol - water (45 : 55) with a flow rate of 0.8 mL /min, and the column temperature was 30 ℃. The Sample tray temperature was 4 ℃. The excitation wavelength was set as 360 nm and the emission wavelength was 450 nm. **Results** Aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ had good linear relationship in the range of 9.3 — 74.4, 3.0 — 24.0, 9.3 — 74.4, and 3.5 — 28.0 pg with *r* values above 0.998 0. The average recovery rates were 78%, 92%, 82%, and 99% with the RSDs were 4.4%, 3.0%, 4.3%, and 2.8%, respectively. The detection limits of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ were 1.86, 0.60, 1.86, and 0.70 pg, and the quantitative limits were 7.44, 2.40, 7.44, and 2.80 pg. respectively. **Conclusion** The method is accurate, reproducible, and stable, and can be used for the quality control of aflatoxins in *Aquilariae Lignum Resinatum*.

Key words: *Aquilariae Lignum Resinatum*; aflatoxin B₁; aflatoxin B₂; aflatoxin G₁; aflatoxin G₂; HPLC; fluorescence detection

沉香为瑞香科植物白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 含有树脂的木材^[1], 是一种名贵药材, 素有“药中黄金”之称。作为一种中医常用药, 沉香具有行气止痛、温中止呕、纳气平喘之功效^[2]。

黄曲霉毒素是黄曲霉、寄生曲霉、集峰曲霉和伪滑曲霉 4 种霉菌产生的次生代谢产物, 是目前为止发现的毒性最大的真菌毒素, 对人体、动物器官尤其是肝脏损害严重。黄曲霉毒素已经被国际癌症研究

收稿日期: 2020-12-10

基金项目: 南通市市级科技计划 (指导性) 立项项目 (YYZ17091)

作者简介: 张金星, 男, 主管中药师, 从事中药质量标准研究。E-mail: 181918413@qq.com

*通信作者: 高 慧, 女, 主任中医师, 从事质量标准研究。E-mail: ymm0209@sina.com

机构确定为 I 类致癌物^[3]。黄曲霉毒素的毒性是氰化钾毒性的 10 倍以上,是剧毒物砒霜的 68 倍,诱发肝癌的风险比二甲基亚硝胺大 75 倍^[4-5]。黄曲霉毒素主要有 4 种,即黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂,其中黄曲霉毒素 B₁被公认为是主要的有毒物质,主要存在于农产品、饲料和中药材中^[6-8]。除了《中国药典》2015 年版所规定的 19 种中药材必须检测黄曲霉毒素外,在日常检验过程中也发现一些中药材品种中存在黄曲霉毒素污染问题,甚至存在毒素超标现象。高效液相色谱法灵敏度高、重复性强;柱后衍生法主要有电化学衍生法、光化学衍生法。光化学衍生法在荧光检测器之前接入了结构简单的光化学反应池,不需要化学试剂,仪器连接和操作方便。本研究采用高效液相色谱-光化学衍生-荧光检测法对沉香药材中黄曲霉毒素进行测定。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Ultimate 3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技有限公司);HX-G 光化学柱后衍生仪(武汉恒信世纪科技有限公司);T25 Digital ULTRA-TURRAX 分散机(德国 IKA);Centrifuge 5430 离心机(Eppendorf AG);CPA225D 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];TUBE-Mill 100C S025 研磨机(德国 IKA);Milli-Q 超纯水仪(美国密理博公司);P116/110 免疫亲和柱(AFLARHONE WIDE)。

1.2 试药

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 混合对照品溶液购自中国食品药品检定研究院,批号 610001-201804,质量浓度分别为 0.93、0.30、0.93、0.35 μg/mL,溶剂为乙腈;沉香药材收集于药材市场和产地,共 41 批,分别编号为 S1~S41,经南通市食品药品监督管理局中心龚旭东主任中药师鉴定后均为正品;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent Zorbax Ecilpse Plus C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(45:55);体积流量:0.8 mL/min;柱温:30 ℃;进样盘温度:4 ℃;荧光激发波长为 360 nm,发射波长为 450 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 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 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,用 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,作为贮备溶液。精密量取贮备溶液 1 mL,置于 25 mL 量瓶中,用 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的质量浓度分别为 1.86、0.60、1.86、0.70 ng/mL)。

2.2.2 供试品溶液的制备 取沉香药材,粉碎,过二号筛,取粉末 15 g,精密称定,置于烧杯中,加入氯化钠 1 g,精密加入 70%甲醇 40 mL,12 000 r/min 高速搅拌 2 min,4 000 r/min 离心 5 min,取上清液 15 mL,用 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液 10 mL,置于 50 mL 量瓶中,用超纯水稀释至刻度,摇匀,再次 7 000 r/min 离心 5 min,用 0.45 μm 滤膜滤过,取续滤液 30 mL,通过免疫亲和柱,体积流量 3 mL/min,弃去洗脱液,用水 20 mL 洗脱,弃去洗脱液,使空气进入免疫亲和柱,再用适量甲醇洗脱,收集洗脱液,置于 2 mL 量瓶中,用 70%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

取混合对照品溶液,进样测定,记录色谱图,结果出峰顺序依次为黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁,两个相邻色谱峰的分度均大于 1.5。

2.4 线性关系考察

分别取混合对照品溶液 5、10、15、20、25、30、40 μL,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,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,结果见表 1。

表 1 回归方程及线性范围

Table 1 Regression equation and linear range

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/μg
黄曲霉毒素 B ₁	$Y=235.2 X-90.32$	0.998 0	9.3~74.4
黄曲霉毒素 B ₂	$Y=508.8 X+101.9$	0.999 0	3.0~24.0
黄曲霉毒素 G ₁	$Y=163.3 X-7.334$	0.999 0	9.3~74.4
黄曲霉毒素 G ₂	$Y=395.4 X-69.92$	0.999 0	3.5~28.0

2.5 检测限测定

将混合对照品适当稀释后制得一系列不同质量浓度的对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以信噪比 3:1、10:1 分别作为检测限和定量限。结果黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 检测限分别为 1.86、0.60、1.86、0.70 pg,定量限分别为 7.44、2.40、7.44、2.80 pg。

2.6 精密度试验

取混合对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,连续测定 7 次,进样量 15 μL。结果黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 峰面积的 RSD 值分别为 3.6%、3.7%、1.8%、1.5%。

2.7 稳定性试验

取 S38 样品制备的供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 进样测定,结果黄曲霉毒素 B₁、G₁ 峰面积的 RSD 值分别为 2.9%、2.5%。

2.8 重现性试验

取 S38 样品制备的供试品溶液,更换高效液相色谱仪器、色谱柱和实验人员,按拟订色谱条件进样测定,结果黄曲霉毒素 B₁、G₁ 峰的峰形良好、分离度良好,黄曲霉毒素 B₁、G₁ 峰面积的 RSD 值分别为 3.3%、2.3%。

2.9 回收率试验

精密称取 S1 样品 6 份,分别加入混合对照品溶液 12 mL (其中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 加入量分别为 22.3、7.2、22.3、8.4 ng),制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。根据《中国药典》2015 年版四部分析方法验证指导原则,待测组分质

量分数为 1×10^{-6} ,回收率为 75%~120%;待测组分质量分数 10×10^{-6} ,回收率为 70%~125%。结果黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的回收率分别为 78%、92%、82%、99%,RSD 值分别为 4.4%、3.0%、4.3%、2.8%。

2.10 样品测定

取沉香样品,制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,从标准曲线上计算出供试品中黄曲霉毒素的量。结果在 41 批沉香中有 5 批样品(S16、S18、S34、S38、S43)受到黄曲霉毒素的污染,虽然都没有超出《中国药典》2015 年版给出的限度,但检出率达到了 12%。结果见图 1、表 2。

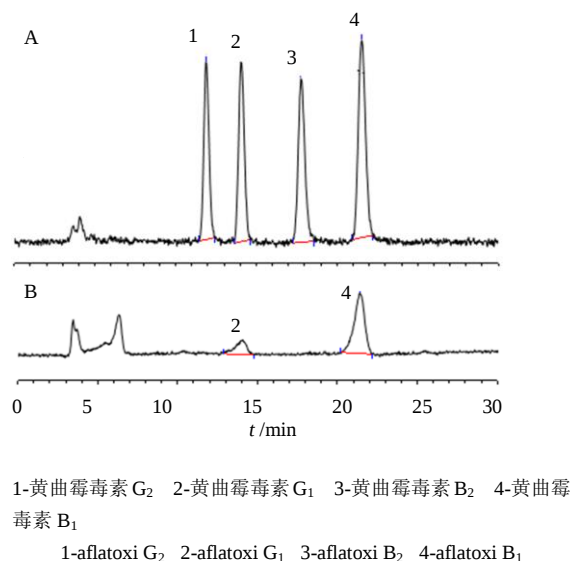


图 1 混合对照品(A)和沉香 S38 样品(B)的 HPLC 图谱
Fig. 1 HPLC Chromatograms of mixed reference substances (A) and Aquilariae Lignum Resinatum sample S38 (B)

表 1 沉香中黄曲霉毒素的测定结果

Table 1 Determination of aflatoxins in Aquilariae Lignum Resinatum

样品	产地	黄曲霉毒素 B ₁ /(ng·kg ⁻¹)	黄曲霉毒素 B ₂ /(ng·kg ⁻¹)	黄曲霉毒素 G ₁ /(ng·kg ⁻¹)	黄曲霉毒素 G ₂ /(ng·kg ⁻¹)
S16	广东电白	未检出	未检出	3.6	未检出
S18	广东电白	未检出	未检出	2.9	未检出
S34	广东电白	5.2	未检出	2.1	未检出
S38	广西玉林	3.3	未检出	3.1	未检出
S43	广东电白	1.9	未检出	2.8	未检出

3 讨论

本研究对《中国药典》2015 年版中黄曲霉毒素检测方法进行了完善,通过调整流动相的比例来改善对照品分离度,并通过改变对照品溶剂来解决进

样量过大时对照品峰变形问题。此法较薄层色谱法、酶联免疫吸附法具有专属性强、灵敏度高、重复性强的特点。前处理过程中借助高速匀浆、免疫亲和柱的净化,解决了杂质干扰严重的问题,回收

率好。由于黄曲霉毒素为剧毒物质,实验过程中应注意防护。用完后的实验器皿应经过次氯酸钠溶液浸泡处理后,再清洗或作为废弃物丢弃。

随着我国中医药事业的不断发展,中药疗效在被认可、重视的同时,其安全性也受到广泛关注。沉香无论是作为名贵中药材还是艺术藏品都日益受到人们的重视。作为一种传统中药材,沉香需要不断完善质量标准,才可切实保障药品的安全、有效、可控。结合药材实际情况,可以看出受黄曲霉污染的沉香都为存放时间较长的老料,产地收集的近年样品以及在市场流通环节的样品中均未检测出黄曲霉。可以看出尽管沉香在生长过程中是受伤形成树脂,但在伤口处受黄曲霉污染的可能性较小,贮存时间、贮存条件影响着沉香药材的质量。黄曲霉毒素在中药材生长、采集、储藏、加工过程中均可能污染。应该引起监管部门的高度重视,不断完善中药中黄曲霉毒素的检测方法和限量标准,保证人民用药安全。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 185.

- [2] 江苏省药品监督管理局. 江苏省中药饮片炮制规范(2002年版) [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 2002: 150.
- [3] *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins* [M]. Lyon: World Health Organization International Agency for Research on Cancer, 1993: 245.
- [4] Ono E Y, Ono M A, Funo F Y, *et al.* Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA [J]. *Food Addit Contam*, 2001, 18(8): 719-729.
- [5] Egner P A, Wang J B, Zhu Y R, *et al.* Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(25): 14601-14606.
- [6] 罗自生, 秦 雨, 徐艳群, 等. 黄曲霉毒素的生物合成、代谢和毒性研究进展 [J]. *食品科学*, 2015, 16(3): 250-257.
- [7] 刘丽娜, 李耀磊, 金红宇, 等. 免疫亲和净化 HPLC 柱后光化学衍生荧光法测定动物药中黄曲霉毒素 [J]. *中草药*, 2017, 48(6): 1220-1224.
- [8] 郑 荣, 毛 丹, 王 柯, 等. HPLC 法测定中药中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的含量 [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(6): 610-613.

【责任编辑 解学星】