

## 超高效液相色谱-荧光法测定丹参饮片中黄曲霉毒素

潘超<sup>1,2</sup>, 李海燕<sup>1,2</sup>, 岳洪水<sup>1,2\*</sup>, 鞠爱春<sup>1,2\*</sup>

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室, 天津 300410

**摘要:** 目的 建立超高效液相色谱-荧光法测定丹参饮片中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>。方法 样品经70%甲醇提取, 通过免疫亲和柱净化后, 用超高效液相色谱-荧光法进行分析测定, Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相为甲醇-乙腈(1:1)、水, 梯度洗脱; 体积流量0.4 mL/min; 柱温30 °C; 荧光检测器激发波长365 nm; 发射波长456 nm; 进样量2 μL。结果 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>分别在0.120 1~1.920 8、0.036 1~0.577 2、0.122 1~1.954 0、0.042 1~0.673 2 ng/mL内线性关系良好, *r*均大于0.99; 定量限分别为0.10、0.03、0.39、0.03 ng/mL; 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的回收率为107%, RSD为6%; 黄曲霉毒素总含量的回收率为80%, RSD为9%。专属性、重复性、精密度、稳定性试验均符合检测要求。结论 所建立的方法准确、可靠、专属性强, 可准确地测定丹参饮片中黄曲霉毒素的含量。

**关键词:** 丹参饮片; 超高效液相色谱-荧光检测法(UPLC-FLR); 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>

中图分类号: R284.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)11-2419-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.11.019

Determination of aflatoxin in *Salvia miltiorrhiza* pieces by ultra performance liquid chromatography-fluorescence detectionPAN Chao<sup>1,2</sup>, LI Haiyan<sup>1,2</sup>, YUE Hongshui<sup>1,2</sup>, JU Aichun<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Advanced Technology Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China

**Abstract: Objective** To establish an ultra performance liquid chromatography - fluorescence detection method for determination of aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> in *Salvia miltiorrhiza* pieces. **Methods** After being extracted by 70% methanol solution and purification by immune affinity columns, aflatoxin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> were analyzed by ultra performance liquid chromatography-fluorescence detection. Chromatographic conditions were as follows: Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase consisted of methanol-acetonitrile (1 : 1) and water with gradient elution, volume flow was 0.4 mL/min, column temperature was 30 °C, excitation wavelength of fluorescence detector was 365 nm; the emission wavelength was 456 nm; injection volume was 2 μL. **Results** Aflatoxin B<sub>1</sub> showed a good linear relationship at a range of 0.120 1—1.920 8 ng/mL, aflatoxin B<sub>2</sub> at a range of 0.036 1—0.577 2 ng/mL, aflatoxin G<sub>1</sub> at a range of 0.122 1—1.954 0 ng/mL and aflatoxin G<sub>2</sub> at a range of 0.042 1—0.673 2 ng/mL, *r* ≥ 0.99. The quantitation limits are 0.10, 0.03, 0.39, 0.03 ng/mL. The recovery of aflatoxin B<sub>1</sub> was 107% and RSD was 6%. The recovery of total aflatoxin content was 80% and RSD was 9%. The specificity, repeatability, precision and stability tests all meet the testing requirements. **Conclusion** The established method is accurate, reliable and specific, it can accurately determine the content of aflatoxin in *Salvia miltiorrhiza* pieces.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza* decoction pieces; UPLC-FLR; aflatoxin

注射用丹参多酚酸是经柱色谱技术分离提纯的丹参水溶性有效成分丹参多酚酸冻干而成的现代中药粉针剂<sup>[1]</sup>。丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 最早

记载于《神农本草经》, 具有活血祛瘀、通经止痛、清心除烦、凉血消痛的功效<sup>[2-3]</sup>。丹参药材在产地加工和贮藏过程中可能会发生霉变, 产生黄曲霉毒素。

收稿日期: 2021-08-05

第一作者: 潘超(1990—), 女, 研究方向为中药质量标准研究。E-mail: panchao2014@tasly.com

\*共同通信作者: 岳洪水(1975—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺开发、质量研究及技术提升等。E-mail: yuehs@tasly.com

鞠爱春(1973—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。E-mail: juach@tasly.com

黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉等菌株产生的双呋喃环毒素,是一类真菌毒素,其中以黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的毒性最为剧烈,极毒量为1 000 μg/kg,可致人死亡<sup>[4-5]</sup>。因此,对于丹参饮片中黄曲霉毒素的检测和限量控制十分重要。

本研究采用免疫亲和柱净化手段,结合超高效液相色谱-荧光检测技术,建立了一种进样量小、分离度高、分析速度快、无需衍生、环保的黄曲霉毒素定量分析方法,对制剂的安全性保证有着不容忽视的意义。

## 1 材料

### 1.1 试剂与试药

丹参饮片来源于陕西天士力植物药业有限公司GAP药源基地,经西北农林科技大学生命学院梁宗锁教授、张跃进教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎;黄曲霉毒素混合对照品溶液:黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>标识浓度分别为0.97、0.29、0.98、0.34 μg/mL,批号LC08901V,美国SUPELCO公司;AflaTest<sup>®</sup>黄曲霉毒素免疫亲和柱,批号P2022E,美国VICAM公司;玻璃纤维滤纸,批号1827110,英国Whatman公司;氯化钠,分析纯,批号140722,天津市风船化学试剂科技有限公司;异丙醇,色谱纯,批号140715,天津市康科德科技有限公司;乙腈,色谱纯,批号JA045130,德国Merck公司;甲醇,色谱纯,批号I844007630,德国Merck公司。

### 1.2 主要仪器

超高效液相色谱仪Waters Acquity UPLC(美国Waters公司);荧光检测器(FLR,美国Waters公司);高速不锈钢均质机(美国Waring公司);台式离心机L550(湖南湘仪公司)。

## 2 方法

### 2.1 供试品溶液的制备

称取丹参饮片2 g(粉碎后过2号药典筛),精密称定,加入氯化钠3 g,置于均质瓶中,精密加入70%甲醇75 mL,高速搅拌2 min,将搅拌后的溶液倒入离心管中,3 000 r/min离心5 min,精密吸取上清液15 mL置于50 mL量瓶中,用纯化水定容,摇匀。以玻璃纤维滤纸滤过,精密吸取续滤液20 mL,加入免疫亲和柱(调节体积流量3 mL/min),完全通过后再分别用磷酸缓冲盐溶液、纯化水10 mL洗脱2次,弃去洗脱液,使空气进入柱子,将水挤出,再用甲醇2 mL洗脱,收集洗脱液,定容至2 mL量瓶中,摇匀,用0.22 μm有机微孔滤膜滤过,即得。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密量取黄曲霉毒素混合对照品0.25 mL,置于50 mL棕色量瓶中,用30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得黄曲霉毒素混合对照品贮备溶液。精密量取此溶液2 mL置于25 mL棕色量瓶中,30%甲醇定容,摇匀,即得黄曲霉毒素混合对照品溶液。

### 2.3 色谱条件

Waters Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub>色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:以甲醇-乙腈(1:1)为流动相A,以水为流动相B梯度洗脱(表1);体积流量0.4 mL/min;柱温30 °C;荧光检测器激发波长365 nm;发射波长456 nm;进样量2 μL。

表1 流动相洗脱程序

Table 1 Mobile phase elution procedure

时间/min	流动相A/%	流动相B/%
0	30	70
8	30	70
10	70	30
13	70	30
14	30	70
16	30	70

### 2.4 系统适用性考察

结果如图1所示,分别吸取空白溶液(初始流动相)、“2.1”“2.2”项下的各溶液,按照“2.3”项色谱条

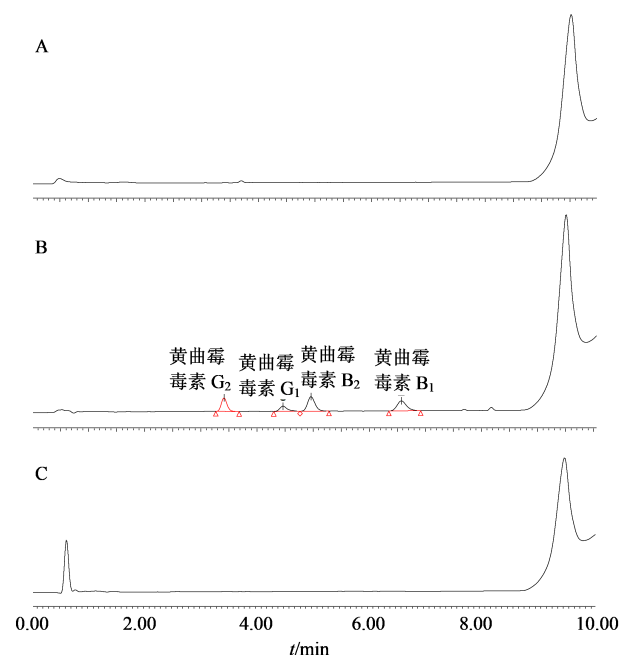


图1 空白溶液(A)、黄曲霉毒素混合对照品(B)、供试品(C)UPLC色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of blank solution (A), aflatoxin reference substance (B), test solution (C)

件进行检测,4种黄曲霉毒素色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于1.5,理论塔板数均大于5000;对照品溶液连续进样6针峰面积RSD均小于5.0%,样品中其他成分对4种目标成分的测定没有干扰,说明系统适用性试验符合要求。

## 2.5 线性关系与定量限考察

分别精密吸取“2.2”项下黄曲霉毒素混合对照

品溶液0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mL至10 mL棕色量瓶中,用30%甲醇稀释至刻度,摇匀,即得系列对照品溶液。按照“2.3”项色谱条件进行测定,以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归。根据10倍信噪比的峰响应值,得出此方法的定量限。如表2所示,4种成分线性关系良好,相关系数均大于0.99。

表2 线性关系及定量限

Table 2 Linear relationship and limit of quantitation

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	定量限/(ng·mL <sup>-1</sup> )
黄曲霉毒素B <sub>1</sub>	$Y=286\ 000 X-25\ 500$	0.994 6	0.120 1~1.920 8	0.10
黄曲霉毒素B <sub>2</sub>	$Y=1\ 010\ 000 X-28\ 400$	0.993 8	0.036 1~0.577 2	0.03
黄曲霉毒素G <sub>1</sub>	$Y=96\ 700 X-9\ 380$	0.994 2	0.122 1~1.954 0	0.39
黄曲霉毒素G <sub>2</sub>	$Y=544\ 000 X-15\ 800$	0.994 4	0.042 1~0.673 2	0.03

## 2.6 加样回收率试验

**2.6.1 免疫亲和柱回收率** 精密吸取黄曲霉毒素混合对照品贮备溶液(黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>: 4.802、1.443、4.885、1.683 ng/mL)2 mL,加入免疫亲和柱(调节体积流量3 mL/min),完全通过后再分别用10 mL纯化水洗脱2次,弃去洗脱液,使空气进入柱子,再用甲醇2 mL洗脱,收集洗脱液,置于2 mL量瓶中,摇匀,用0.22 μm有机微孔滤膜滤过,即得。平行制备3份。按照“2.3”项下色谱条件检测。结果表明,黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>平均回收率分别为102%、103%、100%、98%,免疫亲和柱净化法准确度良好,适用于黄曲霉毒素检测。

**2.6.2 加样回收率** 精密称取已知含量的丹参饮片2 g(粉碎后过2号药典筛),分别精密加入黄曲霉毒素混合对照品贮备溶液0.6、2.0、4.0 mL各3份,按照“2.1”项下供试品制备方法得到低、中、高浓度加标供试品溶液,按色谱条件检测,进样量为2 μL。计算黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的加样回收率,以及黄曲霉毒素总量的回收率。由表3可见黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的回收率为107%,RSD为6%;黄曲霉毒素总量的回收率为80%,RSD为9%,说明该方法准确度良好。

## 2.7 重复性试验

精密称取丹参阴性饮片2 g(粉碎后过2号药典筛),按照“2.6.2”项下中浓度加标供试品制备方法平行制备6份,按照“2.3”项下色谱条件检测。结果见表3,黄曲霉毒素B<sub>1</sub>含量RSD为3.3%,黄曲霉毒素总含量的RSD为3.8%,方法的重复性较好。

## 2.8 中间精密度试验

按照“2.6.2”项下中浓度加标供试品制备方法,制备中浓度供试品溶液,按照“2.3”项下色谱条件,分别由不同人员(2名)、不同天数(3 d)进行测定,计算黄曲霉毒素B<sub>1</sub>及黄曲霉毒素总量的RSD值,考察中间精密度,见表3。结果表明,方法的精密度良好。

## 2.9 稳定性试验

按照“2.6.2”项下中浓度加标供试品制备方法,制备中浓度供试品溶液,取“2.2”项下黄曲霉毒素混合对照品溶液,分别在0、3、7、10、15、20、24 h,按照“2.3”项下色谱条件进行分析,结果见表4,对照品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>峰面积的RSD值分别为4.6%、3.2%、2.5%、2.5%,供试品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>峰面积的RSD值分别为3.7%、3.2%、3.4%、4.3%,该方法的稳定性良好。

表3 回收率、重复性和中间精密度试验结果

Table 3 Results of recovery, repeatability and intermediate precision experiment

成分	回收率/%	回收率RSD/%	重复性RSD%	中间精密度RSD/%	
				不同人员	不同天数
黄曲霉毒素B <sub>1</sub>	107	6	3.3	1.0	2.9
黄曲霉毒素B <sub>1</sub> 、B <sub>2</sub> 、G <sub>1</sub> 、G <sub>2</sub> 总量	80	9	3.8	1.6	3.1

## 2.10 测定方法

分别取6批丹参饮片,按照“2.1”项下方法制备供试品溶液,按照“2.3”项下色谱条件进行测定,计算供试品中黄曲霉毒素含量。6批丹参饮片中均未检出黄曲霉毒素。实际样品分析结果表明,本方法能够满足对样品灵敏、快速的检测要求,适用于丹参饮片中黄曲霉毒素快速定量测定。

## 3 讨论

### 3.1 检测方法的选择

黄曲霉毒素的检测方法有很多种,其中薄层色谱法<sup>[6-7]</sup>由于不能做准确的定量等原因使用较少。高效液相色谱法<sup>[8-9]</sup>是目前最普遍的检测方法,但该方法相对耗时长,人工操作对最后结果影响较大。高效液相色谱与质谱联用方法<sup>[10-11]</sup>由于仪器价格昂贵,使用成本较高。免疫分析法<sup>[5]</sup>多用于黄曲霉毒素的快速筛查,在食品中研究较为广泛,对中药材研究较少。免疫亲和柱具有有机溶剂消耗少、基质干扰少、特异性强、灵敏度高和适用于各种复杂基质的样品等特点,因此免疫亲和层析净化高效液相色谱法是目前国际上普遍采用的黄曲霉毒素精确定量和确认的方法。基于上述问题,本研究建立了超高效液相色谱-荧光检测法结合免疫亲和柱净化法检测丹参饮片中的黄曲霉毒素。本方法简化了前处理过程,且4种毒素的出峰时间早,节省检测时间,操作简便,实用性强。

### 3.2 实验条件的优化

称样量的优化:由于中药基质成分较为复杂,称样量的多少会直接干扰到回收率测定结果。因此,在实验方法开发阶段,分别考察了不同称样量(1、2、3、5、15 g)对回收率结果的影响。结果表明,当称样量为1或2 g时,黄曲霉毒素B<sub>1</sub>及总量的回收率均能满足要求。综合考虑,本实验确定称样量为2 g。

提取净化条件的优化:在实验之前,查阅一些文献,黄曲霉毒素易溶于有机溶剂,其提取剂基本为乙腈-水溶液和甲醇-水溶液2种。因此,在实验之前分别以这2种溶液作为提取剂,观察提取效果。结果表明,以甲醇-水溶液为提取剂的样品其回收率相对较高。因此,实验时用甲醇-水(70:30)进行提取。提取过程采用均质机高速搅拌,使其充分溶解,可提高提取率与回收率。

本实验采用免疫亲和柱来进行净化,在净化过程中,为降低样品基质对于净化效果的影响,上样结束后,分别用磷酸缓冲盐溶液、纯化水进行洗脱。

另外,对于甲醇洗脱体积也进行了考察,结果表明,使用2 mL甲醇可以洗脱完全,洗脱效果较好。

### 3.3 检测波长的选择

查阅相关文献资料,考察了3种不同的激发波长/发射波长条件对于黄曲霉毒素检测的影响。不同波长下4种黄曲霉毒素均能达到有效分离。综合考虑,最后确定本实验过程中采用激发波长365 nm,发射波长456 nm。

### 3.4 安全性

本实验应有相应的安全防护措施,操作谨慎,避免污染环境。残留有黄曲霉素的废液废渣的玻璃器皿,应置于装有10%次氯酸钠溶液的专用贮存容器内,浸泡24 h以上,再用清水将玻璃器皿冲洗干净<sup>[12]</sup>。

## 4 结论

本研究建立的黄曲霉毒素检测方法,样品前处理采用免疫亲和柱净化手段,使用简便快捷,大大简化了提取、净化、衍生化等复杂的前处理过程;结合超高效液相色谱-荧光检测技术,无需柱前/柱后衍生化操作,分析迅速高效,减少了检测步骤并降低了检测成本,可以简单快速地测定丹参饮片中黄曲霉毒素的含量,同时为中药材中黄曲霉毒素的检测提供了一种新的思路,具有较高的实用价值。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 李德坤, 苏志刚, 万梅绪, 等. 注射用丹参多酚酸药理作用及临床应用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(2): 353-361.  
Li D K, Su Z G, Wan M X, et al. Research progress on pharmacological action and clinical application of Salvianolic Acid for Injection [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(2): 353-361.
- [2] 王伟. 丹参多酚酸对大鼠脑缺血再灌注内质网应激的影响 [J]. 中国老年保健医学, 2018(1): 52-54.  
Wang W. Effect of salvianolic acid on endoplasmic reticulum stress after cerebral ischemia-reperfusion in rats [J]. Chin J Geriatr Care, 2018(1): 52-54.
- [3] 郝晨伟, 李正翔, 张铭慧, 等. 丹参及其配伍制剂治疗冠心病的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(13): 4096-4106.  
Hao C W, Li Z X, Zhang M H, et al. Research progress of *Salvia miltiorrhiza* and its compatible preparations in treatment of coronary heart disease [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(13): 4096-4106.
- [4] 李敏, 马飞, 李培武, 等. 基于异源策略的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>酶联免疫(ELISA)分析方法的建立 [J]. 中国油料作物

- 学报, 2014, 36(6): 802-807.
- Li M, Ma F, Li P W, et al. Establishment of ELSA method for aflatoxin B1 analysis based on heterologous strategy [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2014, 36(6): 802-807.
- [5] 陈靖文. 黄曲霉毒素检测方法及预防措施 [J]. 科学技术创新, 2019(20): 47-48.
- Chen J W. Detection methods and preventive measures of aflatoxin [J]. Scient Technol Innovat, 2019(20): 47-48.
- [6] 刘蕊, 赵新悦, 毛雯雯, 等. 中药材中黄曲霉毒素及赭曲霉毒素A污染的研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2020, 17(2): 117-128.
- Liu R, Zhao X R, Mao W W, et al. Research progress on aflatoxin and ochratoxin A pollution of Chinese medicinal materials [J]. Chin J Pharmacovigil, 2020, 17(2): 117-128.
- [7] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素B1 [J]. 现代畜牧科技, 2018, 44(8): 24-25.
- Feng L. Determination of aflatoxin B1 in corn by TLC [J]. Mod Anim Husb Sci Technol, 2018, 44(8): 24-25.
- [8] 闵曼, 潘浣钰, 李丰. 中药中黄曲霉毒素检测技术的研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 5(48): 223-224.
- Min M, Pan H Y, Li F. Research progress on detection technology of aflatoxin in traditional Chinese medicine [J]. Guangdong Chem Ind, 2021, 5(48): 223-224.
- [9] 尹宁宁, 周黎明, 刘军田, 等. HPLC法同时测定21种中药饮片中4种黄曲霉毒素的含量 [J]. 山东中医杂志, 2019, 38(11): 1067-1071.
- Yin N N, Zhou L M, Liu J T, et al. Simultaneous determination of four aflatoxins in 21 Chinese herbal pieces by HPLC [J]. Shandong J Tradit Chin Med, 2019, 38(11): 1067-1071.
- [10] 张晓萍, 刘笑笑, 苗菊. 中药中黄曲霉毒素的研究进展 [J]. 甘肃科技, 2021, 37(5): 73-77.
- Zhang X P, Liu X X, Miao J. Research progress of aflatoxin in traditional Chinese medicine [J]. Gansu Sci Technol, 2021, 37(5): 73-77.
- [11] 李洪波, 宋志超, 吴宁鹏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定玉米AFB1和三种除草剂 [J]. 饲料工业, 2018(2): 56-60.
- Li H B, Song Z C, Wu N P, et al. Simultaneous determination of corn AFB1 and three herbicides by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Feed Ind, 2018(2): 56-60.
- [12] 黄钰婕, 池文杰, 江冬英. 山楂饮片中黄曲霉毒素残留量的测定 [J]. 福建分析测试, 2018, 27(4): 33-38.
- Huang Y J, Chi W J, Jiang D Y. Determination of aflatoxin residues in hawthorn pieces [J]. Fujian Anal Test, 2018, 27(4): 33-38.

[责任编辑 兰新新]