自动固相萃取-HPLC-在线柱后光化学衍生法测定藿香正气水中黄曲霉毒素

陈宗良，周玲娜，赵静芳，蒋士鹏，陈桂茜，沈子博(金华市食品药品检验检测研究院，浙江 金华 321000)

摘要：目的 通过优化提取、净化和梯度洗脱程序建立藿香正气水中黄曲霉毒素(aflatoxin，AF)的测定方法。**方法** 采用免疫亲和柱自动固相萃取对样品提取液进行净化，通过 HPLC-在线柱后光化学衍生荧光检测器检测，对全国 18 个生产企业的 55 批藿香正气水中 AF 进行检测。**结果** AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 进样量分别在 0.545~2.725，0.195~0.975，0.495~2.475，0.320~1.600 ng·mL^{-1} 线性关系良好；平均加样回收率分别为 94.90%，98.49%，94.17%，92.06%。在 55 批样品中均未检测出 AF。**结论** 本法能有效去除杂质，排除色谱干扰，可作为藿香正气水中 AF 定量分析的检测方法。虽在 55 批样品中未检测出 AF，但鉴于其处方饮片存在易被污染的风险，建议增加 AF 测定，以提高安全性。

关键词：黄曲霉毒素；藿香正气水；自动固相萃取；柱后光化学衍生；提取；净化

中图分类号：R917.101 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2021)10-1218-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.10.011

引用本文：陈宗良，周玲娜，赵静芳，等. 自动固相萃取-HPLC-在线柱后光化学衍生法测定藿香正气水中黄曲霉毒素[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(10): 1218-1221.

Determination of Aflatoxin in Huoxiang Zhengqi Liquid by Automatic Solid Phase Extraction with HPLC and on Line Post Column Photochemical Derivatization

CHEN Zongliang, ZHOU Lingna, ZHAO Jingfang, JIANG Shipeng, CHEN Guiqian, SHEN Zibo(*Jinhua Institute for Food and Drug Control, Jinhua 321000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of aflatoxin in Huoxiang Zhengqi liquid through the optimization of extraction, purification and gradient elution prcedures. **METHODS** The sample extract was purified by automatic solid phase extraction with immunoaffinity column. And the AF was detected in 55 batches of Huoxiang Zhengqi liquid from 18 manufacturing enterprises nationwide by HPLC and on line post column photochemical derivatization fluorescence. **RESULTS** AFB_1, AFB_2, AFG_1 and AFG_2 had a good linear relationship within 0.545–2.725, 0.195–0.975, 0.495–2.475, 0.320–1.600 ng·mL^{-1} respectively. And the average recoveries of them were 94.90%, 98.49%, 94.17% and 92.06% respectively. AF was not detected in 55 batches of Huoxiang Zhengqi liquid. **CONCLUSION** The method can effectively remove impurities and eliminate chromatographic interference, and can be used for quantitative analysis of aflatoxin in Huoxiang Zhengqi liquid. Although AF is not detected in 55 batches of samples, it is suggested to increase the determination of AF in order to improve the safety in view of the risk of contamination of prescription pieces.

KEYWORDS: aflatoxin; Huoxiang Zhengqi liquid; automatic solid phase extraction; post column photochemical derivation; extraction; purification

藿香正气水具解表化湿、理气和中的功效，赵宏杰等[1]系统评价了藿香正气多种制剂治疗胃肠型感冒的临床疗效和安全性，提示藿香正气组疗效优于单纯西药组。在 2020 年 3 月 4 日国家卫健委发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》中明确表示，COVID-19 属于中医“疫”病范畴，病因为感受“疫戾”之气，病位在肺[2]，方案推荐医学观察期出现乏力伴有胃肠不适症状时，可使用藿香正气系列中成药治疗。文献分析，临床证据显示其在改善恶寒、发热、咳嗽、流涕、鼻塞等症状中存在显著优势[3]。

黄曲霉毒素(aflatoxin，AF)是由黄曲霉和寄生曲霉产生的次生代谢产物，其中植物来源的主要种类有黄曲霉毒素 B_1(aflatoxin B_1，AFB_1)、黄曲霉毒素 B_2(aflatoxin B_2，AFB_2)、黄曲霉毒素 G_1(aflatoxin G_1，AFG_1)和黄曲霉毒素 G_2(aflatoxin G_2，AFG_2)[4]，于 1993 年被 WHO 的癌症研究机构定为 I 类致癌物，其毒性比砒霜大 68 倍，一旦污染也没有简便可行的脱毒措施[5]。目前，几乎没有对中成药检测 AF 含量的规定，藿香正气水使用广泛，特别是疫情期间，它被作为诊疗方案推荐使用的中成药。2016 年贵州省 16 种中药黄曲霉素污染调查

基金项目：浙江省食品药品监督管理局科技计划项目(2019013)

作者简介：陈宗良，男，副主任中药师 Tel: (0579)82310374 E-mail: zongliangchen@163.com

中，槟榔中 AF 检出率高达 73%[6]，而处方中大腹皮为槟榔果皮，出于对其安全性的考虑，研究其中是否存在 AF 污染风险具有重要意义。

目前常见检测真菌毒素残留的主要分析方法有薄层色谱法、HPLC、HPLC-MS、免疫分析法[4]，笔者采用自动固相萃取-HPLC-在线柱后光化学衍生法对藿香正气水中 AF 含量检测进行研究，旨在对全国 18 个生产企业 55 批样品进行相关检测及安全性评价，为控制其安全性提供参考。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AD 液相色谱仪(包括 RF-20A 荧光检测器、月旭柱后在线光化学衍生器，日本岛津)；Fotector Plus 全自动固相萃取仪(中国睿科)。

1.2 材料

55 批次藿香正气水均为浙江省省级药品质量风险考核抽验样品，在全省 11 个地市抽取，共涉及 18 个厂家，占全国生产厂家的 10.5%；AF 混合对照品溶液(中国食品药品检定研究院，批号：610001-201703；AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 标识浓度分别为 1.09，0.39，0.99，0.64 μg·mL^{-1})；乙腈、甲醇均为色谱纯，水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 WATERS SunFire C_{18}(4.6 mm×150 mm，3.5 μm)；以甲醇-乙腈(1∶1)为流动相 A，水为流动相 B，流速：1.0 mL·min^{-1}；梯度洗脱(0~20 min，25%→35%A；20~30 min，35%→70%A；30~40 min，70%A；40~45 min，70%→25%A；45~55 min，25%A)；进样量：10 μL；采用光化学衍生法(254 nm)；以荧光检测器检测，激发波长 λ_{ex}=360 nm，发射波长 λ_{ex}=450 nm。2 个相邻色谱峰的分离度应>1.5。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液的制备　精密量取 AF 混合对照品溶液 0.5 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 1 mL，置 25 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度，即得。

2.2.2 供试品溶液的制备　精密量取藿香正气水 50 mL，置均质瓶中，加入氯化钠 3 g，精密加入甲醇 25 mL，高速搅拌 2 min，2 500 r·min^{-1} 离心 5 min，精密量取上清液 15 mL，置 50 mL 量瓶中，加水适量，再加入 10%吐温–20 溶液 1 mL，再用水稀释至刻度，摇匀，滤过，取续滤液即得。

2.2.3 供试品溶液的净化　精密量取“2.2.2”项下续滤液 20 mL，置全自动固相萃取仪的试管中，以水为淋洗液，甲醇为洗脱液，按表 1 的条件，通过免疫亲合柱净化后，收集 2 mL 洗脱液，涡旋混匀，0.45 μm 的微孔滤膜滤过，即得进样溶液。

表 1 全自动固相萃取仪萃取程序

Tab. 1 Automatic solid phase extraction program

序号	步骤命令	溶剂	体积/mL	上柱流速/mL·min^{-1}	洗脱液
1	活化	甲醇	5	5	弃去
2	活化	水	5	5	弃去
3	气推	空气	20	30	弃去
4	清洗样品通道	水	20	30	弃去
5	上样	/	30	3	弃去
6	淋洗	水	20	3	弃去
7	气推	空气	10	10	弃去
8	洗脱	甲醇	2	3	收集
9	气推	空气	10	10	收集
10	清洗注射泵	甲醇	15	10	/

2.3 系统适用性试验

取藿香正气水样品(批号：180519，试验时未检出 AF)和同批次样品加标(AF 混合对照品溶液加标)，按“2.2”项下方法制备阴性供试品溶液和加标供试品溶液。精密吸取以上 2 种供试品溶液及“2.2.1”项下 AF 混合对照品溶液，按“2.1”项下条件进行测定，记录色谱图，结果显示，相邻色谱峰的分离度>1.5，以 AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 计的理论板数分别为 29 246，39 145，45 688，114 564，阴性样品无干扰，结果见图 1。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察　精密吸取 AF 混合对照品贮备液 0.5，1.0，1.5，2.0，2.5 mL，分别置 50 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度，得系列对照品溶液。分别吸取上述溶液各 10 μL，注入液相色谱仪，按“2.1”项下条件进行测定。以进样量(X，pg)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线，回归方程及考察结果见表 2，表明各成分在表中范围内线性关系良好。

2.4.2 重复性试验　精密量取批号为 180519 藿香正气水样品 50 mL(取 6 份)，分别精密加入 AF 混合对照品贮备液 0.5 mL，按“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备成进样溶液。按“2.1”项下色谱条件测定，结果，AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 峰面积的 RSD 分别为 0.59%，1.98%，2.43%，3.56%(n=6)，表明重复性良好。

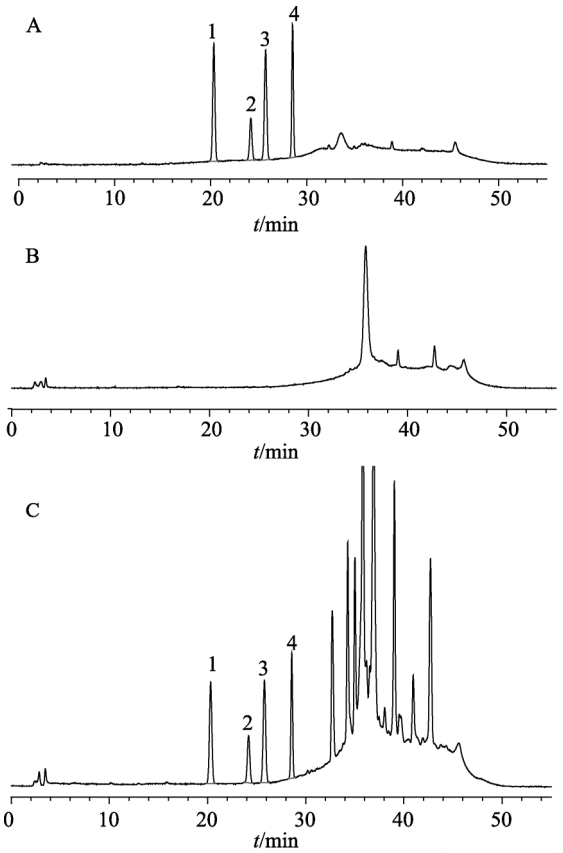

图 1 HPLC 色谱图

A–混合对照品溶液；B–阴性供试品溶液；C–加标供试品溶液；1–AFG_2；2–AFG_1；3–AFB_2；4–AFB_1。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A–mixed standard solution; B–negative sample solution; C–sample addition solution; 1–AFG_2; 2–AFG_1; 3–AFB_2; 4–AFB_1.

表 2 线性关系考察结果

Tab. 2 Investigation results of linear relationship

成分	线性回归方程	r	线性范围/ng·mL^{-1}
AFG_2	Y=34 940X+140	0.999 9	0.320~1.600
AFG_1	Y=10 692X–17	0.999 8	0.495~2.475
AFB_2	Y=56 283X–335	0.998 9	0.195~0.975
AFB_1	Y=17 993X–51	0.999 8	0.545~2.725

2.4.3 仪器精密度试验　精密吸取混合对照品溶液 10 μL，按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，测定峰面积，结果 AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 峰面积的 RSD<2.0%(n=6)，表明仪器精密度良好。

2.4.4 稳定性试验　精密吸取加标供试品溶液，分别放置 0，2，4，8，24，48 h 后按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果，AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 峰面积的 RSD<3.2%(n=6)，表明 AF 溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.4.5 回收率试验　精密量取 6 份未检出 AF 的藿香正气水(批号：180519)样品 50 mL，分别精密加入 AF 混合对照品贮备液 0.5 mL，按“2.2.2”“2.2.3”项下方法制备成加样回收率试液。按“2.1”项下色谱条件进行测定，计算回收率，AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 的平均回收率分别为 92.06%，94.17%，98.49%，94.90%，RSD 为 0.59%~3.56%，结果见表 3。

表 3 回收率试验测定结果(n=6)

Tab. 3 Determination results of recovery experiment(n=6)

成分名称	加入量/ng	测得量/ng	回收率/%	平均值/%	RSD/%
AFG_2	16.00	14.71	91.94	92.06	0.59
	16.00	14.80	92.50		
	16.00	14.87	92.94		
	16.00	14.55	90.94		
	16.00	14.67	91.69		
	16.00	14.78	92.38		
AFG_1	24.75	22.68	91.64	94.17	1.98
	24.75	23.30	94.13		
	24.75	23.77	96.03		
	24.75	23.69	95.72		
	24.75	23.85	96.36		
	24.75	22.56	91.15		
AFB_2	9.75	9.31	95.44	98.49	2.43
	9.75	9.64	98.90		
	9.75	9.99	102.46		
	9.75	9.77	100.21		
	9.75	9.71	99.59		
	9.75	9.20	94.36		
AFB_1	27.25	24.69	90.61	94.90	3.56
	27.25	26.01	95.46		
	27.25	26.88	98.63		
	27.25	24.27	89.06		
	27.25	25.99	95.38		
	27.25	27.32	100.26		

2.4.6 检出限和定量限的测定　精密量取加标供试品溶液 0.5，1 mL，分别置 5 mL 量瓶中，加 50%甲醇稀释至刻度，摇匀，按“2.1”项下色谱条件进行测定，结果 S/N 最接近 3 和 10 的分别是取加样回收率试液 0.5，1 mL 稀释的溶液，故计算得 AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 的检出限分别为 1.18，1.86×10^{-4}，0.77×10^{-4}，2.07×10^{-4} μg·mL^{-1}，定量限分别为 2.36×10^{-4}，3.73×10^{-4}，1.54×10^{-4}，4.14×10^{-4} μg·mL^{-1}。

2.4.7 样品测定　对浙江省 11 个地市抽取的 55 批次藿香正气水进行 AFG_2、AFG_1、AFB_2、AFB_1 含量测定。结果，均未检出。

3 讨论

3.1 增加 AF 限度检测的必要性

中药饮片真菌毒素污染问题已经成为公共卫生健康问题，得到了大家的广泛关注。尤其是 AF 的检出率较高[4,7]，马双成等[8]对 2 000 多批次药材及饮片进行 AF 检测及林方芬等[9]对 30 种中药饮片行 AFB_1 的检测结果都表明中药材及饮片中 AF

的检出率非常高。中国药典中收载检测 AF 的品种数量也从 2015 年版 19 种增加到了 2020 年版的 22 种，其中槟榔在国评探索性研究检测中 AF 的检出率非常高，据国评机构调查原因可能和加工过程有关，而藿香正气水处方中的大腹皮即为槟榔的果皮，因此受污染的风险较高，有必要增加 AF 限度的检测。

3.2 色谱条件的选择

以甲醇-乙腈-水系统不同比例[5,10-11]进行等度洗脱比较，使用了 WATERS XBridge C_{18}、SunFire C_{18}、ZORBAX SB-C_{18}、Omni Hubble C_{18} 等色谱柱进行比较，结果 AF 保留时间均在 8~20 min，分离度>1.5，但藿香正气水供试品溶液中残留的杂质有不同程序的干扰，且在药典规定的等度条件下，有些杂质保留较强，杂质出峰时间需 > 90 min。故考虑选用梯度洗脱方式，参考王云霞等[12]测定清火片中 AF 时的色谱条件，优化后得到本研究的梯度洗脱条件，AF 的保留时间在 20~30 min，分离度>3.5，理论板数>29 000，且供试溶液中的杂质能在<50 min 洗脱完毕，因此确定了“2.1”项下选用的色谱条件。

3.3 供试品溶液提取净化方法的优化

在实验初期，参照药典方法[10]匀浆后，过免疫亲和柱进行处理，进样后发现，杂质干扰明显。查阅文献[5,12]发现，表面活性剂吐温-20 有助溶性、复抗性作用，可提高特异性的识别能力，有效去除免疫亲和柱中杂质，排除目标峰附近的小杂质峰干扰。通过回收率试验验证确定吐温-20 溶液对 AF 在免疫亲和柱中的保留未产生影响，故选择在供试品溶液中加入 10%吐温-20 溶液 1 mL 后，再进行固相萃取。另外在图谱中发现保留时间在 30~50 min 有较多响应较强的杂质峰，王少敏等[13]采用改良 QuEChERS 前处理技术对供试品溶液进行提取净化，效果极佳，笔者将进一步参考采用改良 QuEChERS 前处理技术进行实验，以期得到更好的净化效果。

4 小结

中国药典附录“2351”由 2015 年版的 AF 测定法修订为 2020 年版的真菌毒素测定法，表明外源性有毒有害物质越来越受重视，通则“9305”指导原则监控品种中也规定“处方中含有易污染的药材以及生粉投料的中成药品种应注意相关真菌毒素的检测”。而藿香正气水处方中陈皮、大腹皮等均为易受 AF 污染的药材，现行 2020 年版药典均未收载进行黄曲霉素测定的中药制剂品种，而制剂基质复杂，对不同品种提取净化的研究较少，仅按通则“2351”进行测定，藿香正气水的基质已经干扰检测，影响准确度。故对其前处理和色谱条件的优化进行研究，对其他中药制剂中真菌毒素测定具有实践指导意义。

REFERENCES

[1] ZHAO H J, GUO L P, YANG F W, et al. Huoxiang Zhengqi formulas for treatment of gastrointestinal type cold: A systematic review and meta-analysis[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志), 2017, 42(8): 1495-1499.

[2] 国家卫生健康委办公厅.关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)的通知[EB/OL]. (2020-03-04)[2020-03-04]. http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml.

[3] LIU Y, LIU L, CAO M M, et al. Literature analysis of Chinese patent medicine treatment in the observation period of Clinical Management of Corona Virus Disease 2019(trial 6th Edition)[J]. Clin Med J(临床药物治疗杂志), 2020, 18(2): 62-66.

[4] LIU R, ZHAO X Y, MAO W W, et al. Aflatoxin and ochratoxin A contamination in Chinese herbal medicines[J]. Chin J Pharmacovigil(中国药物警戒), 2020, 17(2): 117-120, 128.

[5] ZHANG W, SHEN Y, SHI S, et al. Extraction and purification technology of aflatoxin used for the determination of aflatoxin in Rhizoma Corydalis[J]. China Pharm(中国药师), 2019, 22(10): 1810-1814.

[6] YANG C, LIU F, LI L N, et al. Pollution investigation of aflatoxins in traditional Chinese medicines from Guizhou province in 2016[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2018, 49(7): 956-961.

[7] HU J Z, LAI Y H, CHEN H A. Research progress of the pollution status and analysis methods of common fungal toxins in Chinese medicinal herbs[J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2019, 31(1): 1-5.

[8] MA S C, JIN H Y, LIU L N, et al. Risk control of exogenous harmful residues in traditional Chinese medicines[J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2015, 50(2): 99-103.

[9] 林方芬, 郑志勇, 黄剑, 等. 中药饮片中黄曲霉毒素 B_1 含量的快速测定研究[J]. 江苏中医药, 2016, 48(12): 65-66, 69.

[10] 中国药典. 四部[S]. 2015: 224-225.

[11] 唐健新, 区桂姗, 苏章轩, 等. 柱后衍生-HPLC 测定与分析沉香中黄曲霉毒素[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(11): 31-35.

[12] WANG Y X, WANG J, XIE Z M. Content determination of aflatoxin G_2, G_1, B_2 and B_1 in Qinghuo tablets(capsules) by HPLC-post-column photochemical derivatization and its safety evaluation[J]. China Pharm(中国药房), 2019, 30(7): 906-909.

[13] WANG S M, DU C X, LIU X X, et al. Simultaneous determination of 26 mycotoxins in Notoginseng Radix et Rhizoma by QuEChERS-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass SpectrometryFull text replacement[J]. World Chin Med(世界中医药), 2019, 14(4): 798-804.

收稿日期：2020-07-29

(本文责编：李艳芳)