doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2021.23.016

葛根定眩胶囊中黄曲霉毒素 G_2,G_1,B_2,B_1 含量测定及安全性评价

徐小龙[1],刘 颖[1],陈乃江[2△]

(1. 南京中医药大学连云港附属医院·江苏省连云港市中医院,江苏 连云港 222006; 2. 江苏省连云港市食品药品检验检测中心,江苏 连云港 222006)

摘要:目的 建立测定葛根定眩胶囊中黄曲霉毒素(AF)G_2,G_1,B_2,B_1 含量的高效液相色谱－柱后光化学衍生法,并评价其安全性。**方法** 色谱柱为 Phenomenex C_{18} Gemini 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为甲醇－乙腈－水(40∶18∶42,*V*/*V*/*V*),流速为 1.0 mL/min,柱温为 25 ℃,检测器为荧光检测器,激发波长为 365 nm,发射波长为 450 nm,进样量为 10 μL。**结果** 葛根定眩胶囊 1 个批次中检出 AFB_1,AFB_2,AFG_2,含量分别为 1.39,0.13,0.10 μg/kg,3 个批次均未检出 AF。**结论** 该方法简便快捷,结果准确可靠,专属性强,灵敏度高,可用于葛根定眩胶囊中 AFG_2,AFG_1,AFB_2,AFB_1 的含量测定,且所检 AF 残留量均符合药典规定。

关键词:高效液相色谱法;光化学衍生法;葛根定眩胶囊;黄曲霉毒素;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0 **文献标志码:**A **文章编号:**1006－4931(2021)23－0055－04

Content Determination of Aflatoxins G_2, G_1, B_2 and B_1 in Gegen Dingxuan Capsules and Safety Evaluation of the Preparation

XU Xiaolong[1], *LIU Ying*[1], *CHEN Naijiang*[2]

(*1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine · Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang, Jiangsu, China 222006; 2. Lianyungang Institute for Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222006*)

Abstract: Objective To establish a high－performance liquid chromatography(HPLC)－post－column photochemical derivatization method for the content determination of aflatoxin (AF) G_2, G_1, B_2 and B_1 in Gegen Dingxuan Capsules, and to evaluate the safety of the preparation. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex C_{18} Gemini column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol－acetonitrile－water (40∶18∶42, *V*/*V*/*V*), the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 25 ℃, the fluorescent detector was adopted, the excitation wavelength was 365 nm, the emission wavelength was 450 nm, and the injection volume was 10 μL. **Results** AFB_1, AFB_2 and AFG_2 were detected in one batch of Gegen Dingxuan Capsules, with contents of 1.39, 0.13 and 0.10 μg/kg, respectively. No AF was detected in the other three batches. **Conclusion** The method is simple, rapid, accurate, reliable, specific and sensitive, which can be used for the content determination of AFG_2, AFG_1, AFB_2 and AFB_1 in Gegen Dingxuan Capsules, and the residue of AF meets the requirements of the *Chinese Pharmacopoeia*.

Key words: HPLC; photochemical derivatization; Gegen Dingxuan Capsules; aflatoxin; content determination

葛根定眩胶囊由葛根、桂枝、生白芍、炙甘草、僵蚕、羌活、川芎、钩藤、生姜 9 味中药组方,其主要功效为解肌和营、疏风定眩,主治太阳经枢不利所致颈项强痛、头痛、头晕目眩等症状。该制剂中含有僵蚕,2020 年版《中国药典(一部)》中收载的相关药材均涉及黄曲霉毒素(AF)的检测。AF 属呋喃香豆素的多环结构化合物,主要由黄曲霉和寄生曲霉次级代谢产生[1－2],AFB_1,AFB_2,AFG_1,AFG_2,AFM_1,AFM_2 是 AF 最常见的有毒衍生物,其中毒性最强的是 AFB_1[3]。目前,检测 AF 的方法有液相色谱－质谱联用法[4－6]、荧光分光光度法、高效液相色谱法、免疫层析法、酶联免疫吸附法、高效液相色谱(HPLC)－柱后光化学衍生法等[7－15]。其中 HPLC－柱后光化学衍生法简便快捷,且 AFB_1 和 AFG_1 经紫外线照射即具有荧光性[7],应用 HPLC 荧光检测器就可完成检测。本研究中建立了测定葛根定眩胶囊中 AF 有毒衍生物 AFB_1,AFB_2,AFG_1,AFG_2 含量的 HPLC－柱后光化学衍生法,并评价其安全性,为提高其质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),配有 Waters 2695－2475 型荧光检测器,Empower 3 型色谱工作站;KQ－500TDB 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司,功率为 500 W,频率为 80 kHz);AE－100 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.000 1 g);AF 免疫亲和柱(青岛普瑞邦生物工程有限公司,批号为 171117)。

1.2 试药

葛根定眩胶囊(江苏省连云港市中医院院内制剂,批号分别为 20201208,20210618,20210619,20210620);

第一作者:徐小龙,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)673377498@qq.com。

△**通信作者:**陈乃江,男,大学本科,副主任中药师,研究方向为药物检测,(电子信箱)459213946@qq.com。

AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2 混合对照品溶液（中国食品药品检定研究院，批号为610001－202006，标示浓度依次为1.04，0.38，1.08，0.38 μg/mL）；甲醇、乙腈（色谱纯，德国默克公司）；磷酸、氯化钠（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及系统适用性试验

色谱柱：Phenomenex C_{18} Gemini柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇－乙腈－水（40∶18∶42，*V*/*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；柱温：25 ℃；检测器：荧光检测器；激发波长：365 nm；发射波长：450 nm；进样量：10 μL。在此色谱条件下，相邻色谱峰的分离度大于1.5，阴性对照无干扰。色谱图见图1。

2.2 溶液制备

精密量取 AFB_1, AFB_2, AFG_1, AFG_2 混合对照品溶液0.5 mL，置10 mL容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，作为混合标准品贮备液。精密量取混合标准品贮备液1 mL，置25 mL容量瓶中，加甲醇稀释至刻度，即得AF混合标准品溶液。取样品，倾出内容物，研细，取15 g，精密称定，置匀质瓶中，加氯化钠3 g，精密加入70%甲醇溶液75 mL，高速搅拌2 min，离心（转速为12 000 r/min）5 min，精密量取上清液15 mL，置50 mL容量瓶中，加水稀释并定容，摇匀，离心（12 000 r/min）10 min，取上清液20 mL，过AF免疫亲合柱，加水20 mL洗脱，弃洗脱液，使空气入柱，将水挤出，加适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置2 mL容量瓶中，加甲醇稀释并定容，摇匀，0.45 μm微孔滤膜滤过，取续滤液，即得供试品溶液。以甲醇为阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

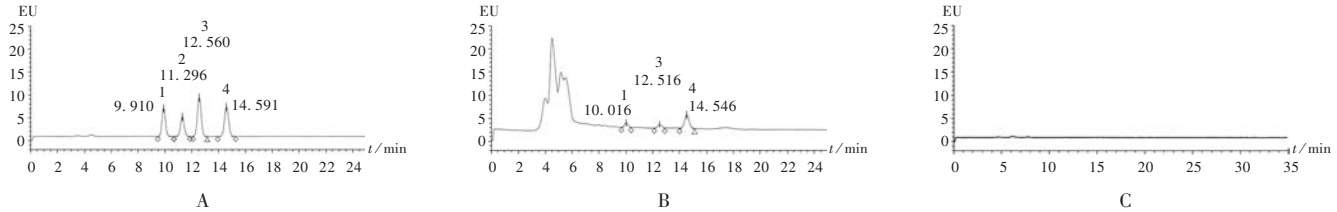
线性关系考察、检测限及定量限确定：精密吸取2.2项下AF混合标准品溶液5，10，15，20，25 μL，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以进样量（*X*，pg）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，结果见表1。精密量取2.2项下AF混合标准品贮备液，以甲醇逐级稀释，按2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）为3时的响应强度浓度为检测限，以*S*/*N*为10时的响应强度浓度为定量限。结果见表1。

精密度试验：取2.2项下混合标准品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定7次，记录峰面积。结果见表1，表明仪器精密度良好。

重复性试验：取同一批（批号为20210619）样品2 g，精密称定，共6份，精密量取2.2项下混合标准品溶液0.4 mL，依法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定2次，记录峰面积。结果见表1，表明方法重复性良好。

稳定性试验：取2.2项下供试品溶液适量，分别于室温下放置0，1，2，4，8，12 h时进样测定，并记录峰面积。结果见表1，表明供试品溶液在12 h内稳定。

加样回收试验：取不含AF的阴性样品，倾出内容物，研细，取15 g，精密称定，置匀质瓶中，加氯化钠3 g，精密加入70%甲醇75 mL，搅拌2 min，离心（转速为12 000 r/min）5 min，精密量取上清液15 mL，置50 mL容量瓶中，分别精密加入混合标准品溶液1，2，3 mL，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进



1. AFG_2　2. AFG_1　3. AFB_2　4. AFB_1

A. 混合标准品溶液　B. 供试品溶液　C. 阴性对照溶液

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. AFG_2　2. AFG_1　3. AFB_2　4. AFB_1

A. Mixed standard solution　B. Test solution　C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

表1 方法学考察结果

Tab. 1 Results of the methodological investigation

有毒衍生物	回归方程	*r*	线性范围（pg）	检测限（μg/kg）	定量限（μg/kg）	*RSD*(%) 精密度试验	*RSD*(%) 重复性试验	*RSD*(%) 稳定性试验
AFB_1	$Y_1 = 48\,549\,X_1 - 86\,317$	0.999 5	10.40～52.00	0.05	0.15	3.41	4.12	1.25
AFB_2	$Y_2 = 157\,759\,X_2 - 76\,654$	0.999 9	3.80～19.00	0.08	0.20	3.23	3.81	1.17
AFG_1	$Y_3 = 27\,427\,X_3 - 22\,630$	0.999 0	10.80～54.00	0.05	0.15	1.64	2.23	1.60
AFG_2	$Y_4 = 104\,759\,X_4 - 38\,981$	0.999 0	3.80～19.00	0.08	0.20	1.53	3.92	0.79

表 2 加样回收试验结果（$n=9$）

Tab. 2 Results of the recovery test（$n=9$）

取样量	加入量(ng)				测得量(ng)				回收率(%)				$\bar{X}$(%)				RSD(%)			
(g)	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2
15.032 1	2.08	0.76	2.16	0.76	1.95	0.70	2.01	0.64	93.75	92.11	93.06	84.21								
15.201 1	2.08	0.76	2.16	0.76	2.01	0.89	2.32	0.88	96.63	117.11	107.41	115.79								
15.037 5	2.08	0.76	2.16	0.76	2.18	0.64	1.95	0.70	104.81	84.21	90.28	92.11								
15.228 0	4.16	1.52	4.32	1.52	3.97	1.48	4.11	1.73	95.43	97.37	95.14	113.82								
15.207 0	4.16	1.52	4.32	1.52	4.07	1.59	4.29	1.33	97.84	104.61	99.31	87.50	97.45	93.30	95.70	98.76	4.08	12.37	6.02	13.78
14.988 7	4.16	1.52	4.32	1.52	4.30	1.30	3.87	1.75	103.37	85.53	89.58	115.13								
15.110 0	6.24	2.28	6.48	2.28	6.00	2.11	6.10	1.97	96.15	92.54	94.14	86.40								
15.078 0	6.24	2.28	6.48	2.28	5.92	1.87	5.95	2.41	94.87	82.02	91.82	105.70								
14.997 3	6.24	2.28	6.48	2.28	5.88	1.92	6.52	2.01	94.23	84.21	100.62	88.16								

样测定，并计算含量。结果见表 2。

2.4 样品含量测定

取样品（批号分别为 20201208，20210618，20200619，20210620）适量，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量，结果见表 3。2020 年版《中国药典（一部）》规定，AFB_1 和 AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2 总量的最高限量分别为 5 μg/kg 和 10 μg/kg，故 4 批样品 AF 残留量测定结果均符合药典规定。

表 3 样品含量测定结果（μg/kg）

Tab. 3 Results of content determination of AF in the samples（μg/kg）

批号	AFB_1	AFB_2	AFG_1	AFG_2
20201208	1.39	0.13	–	0.10
20210618	–	–	–	–
20210619	–	–	–	–
20210620	–	–	–	–

注：– 为未检测到。

Note: – indicates that no AF is detected.

3 讨论

3.1 检测方法选择

中药材和食品中 AF 检测方法主要有薄层层析法、液相色谱法、酶联免疫吸附法、金标免疫层析检测技术、质谱法等。葛根定眩胶囊由 9 味药材组方，成分复杂，其中僵蚕属昆虫类药物，生物活性蛋白成分多，用常规的薄层层析法及酶联免疫吸附法做定性检测，专属性不强。HPLC – 柱后光化学衍生法可定量快速检测；另外，商品化的免疫亲合柱多，获取方便，方法简单，易验证和确认，用于检测葛根定眩胶囊中 AF 有毒衍生物的含量，灵敏度高，特异性强，快捷准确。

3.2 流动相和检测波长选择

AF 为极性化合物，流动相以水为基础溶剂。曾考察乙腈 – 水（55∶45，V/V）和甲醇 – 水（70∶30，V/V）2 种流动相对色谱分离效果的影响，均能有效洗脱和检测 AF，但以甲醇 – 乙腈 – 水（40∶18∶42，$V/V/V$）为流动相时 AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2 4 个成分均能做到基线分离，色谱峰峰形尖锐、对称。以流动相为背景溶液，以荧光检测器在 190～600 nm 波长范围内测定混合标准品溶液，结果 AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2 最佳激发波长为 360 nm，AFG_1 和 AFG_2 在 450 nm 波长附近有最大吸收，AFB_1 和 AFB_2 在 430 nm 波长附近有最大吸收，最终选择激发波长为 360nm，发射波长为 450nm。AFB_2 和 AFG_2 荧光吸收较弱，借助紫外衍生器（254 nm）荧光吸收强度可提升 10 倍以上。

3.3 方法操作要点

AF 性质相对稳定，标准品溶液和供试品溶液在 2.1 项下色谱条件的响应稳定可靠，且考虑样品前处理净化、富集是影响测定结果的主要因素，必要时可进行加样回收试验。对于多数阴性样品或远低于限度的极弱阳性样品，不必追究其真实含量和检测精密度；对于远超限度的强阳性样品，可采用外标一点法予以定量控制。

3.4 安全性评价

AF 是一种剧毒物质，已被癌症研究机构划为一类致癌物，适宜生长和产毒的条件为 10～45 ℃，最适温度为 30 ℃，相对湿度为 85%，要求药品在存储、运输过程中要注意控制温度和相对湿度。需进行 AF 检测的中药材品种包括 15 个种子果实类中药材（马钱子、使君子、大枣、豆蔻等），2 个根和根茎类中药材（远志、延胡索），8 个动物类中药材（水蛭、地龙、全蝎、蜈蚣、僵蚕、蜂房、九香虫、土鳖虫）[16]。本研究中仅 1 个批次样品检出 AF 有毒衍生物，其含量为 AFB_1 1.39 μg/kg，AFB_2 0.13 μg/kg，AFG_2 0.10 μg/kg，其他 3 个批次均未检出。2020 年版《中国药典（一部）》规定，AFB_1 的最大限量为 5 μg/kg，AFB_1，AFB_2，AFG_1，AFG_2 总量不超过 10 μg/kg，符合药典规定，可为以僵蚕生药粉为原料的中成药检查 AF 提供参考。

3.5 方法评价

本研究中建立的方法简便快捷，结果准确可靠，专属性强，灵敏度高，可用于葛根定眩胶囊的质量控制，且所检测的 AF 残留量均符合药典标准。