

ICS 11.120.01

CCS C 27

团 体 标 准

T/TPPA 0017-2025

五味子黄曲霉毒素 UPLC 测定法

Determination method of aflatoxin in *Schisandrae Chinensis Fructus*
by UPLC

2025-12-09发布

2025-12-09实施

天津市医药行业协会 发布

目 次

前言 I

1 范围 2

2 规范性引用文件 2

3 术语和定义 2

4 检测原理 2

5 材料与设备 3

 5.1 材料 3

 5.2 设备 3

6 实验方法 3

 6.1 溶液配制 3

 6.2 色谱条件 4

7 数据分析及判定 6

 7.1 系统适用性 6

 7.2 免疫亲和柱回收率 6

 7.3 专属性 6

 7.4 数据处理 错误！未定义书签。

 7.5 判定 6

附录A（资料性）方法学验证..... 7

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由天津天士力之骄药业有限公司提出。

本文件由天津市医药行业协会归口。

本文件起草单位：天津天士力之骄药业有限公司、天津市药品检验研究院、天津市药品化妆品审评查验中心、河北省中药材质量检验检测研究中心有限公司、天津市中药注射剂安全性评价企业重点实验室、现代中药创制全国重点实验室、天津大学、天津中医药大学、现代中医药海河实验室。

本文件主要起草人：宋丽丽、岳洪水、周军、段宝健、王跃飞、王文博、鞠爱春、周水平、高文远、郑文科、柴欣、张敏、李霞、刘朋、胡靖、李宏影、卢卿、林梅、王嘉、李子瞻、王帅。

五味子黄曲霉毒素UPLC测定法

1 范围

本文件规定了五味子黄曲霉毒素的UPLC测定的技术要求、实验方法、限度。

本文件适用于五味子黄曲霉毒素的UPLC测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本标准必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

《中华人民共和国药典》（2025年版）四部通则 2351真菌毒素测定法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 五味子 *Schisandrae Chinensis Fructus*

本品为木兰科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. 的干燥成熟果实。习称“北五味子”。秋季果实成熟时采摘，晒干或蒸后晒干，除去果梗和杂质。

3.2 黄曲霉毒素 aflatoxin; AF

黄曲霉毒素（AF）是黄曲霉和寄生曲霉等菌株产生的双呋喃环类毒素。其衍生物有约20种，分别命名为黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁、黄曲霉毒素G₂等。其中黄曲霉毒素B₁的毒性最大，致癌性最强。

3.3 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱 aflatoxin total immunoaffinity column

键合有黄曲霉毒素特殊抗体的免疫亲和柱。

4 检测原理

样品中的黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁、黄曲霉毒素G₂经70%甲醇溶液提取，通过黄曲霉毒素总量免疫亲和柱净化和富集后采用液相色谱仪-荧光检测器进行定量检测。

5 材料与设备

5.1 材料

5.1.1 耗材

- a) 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱
- b) 玻璃纤维滤纸

5.1.2 试剂试药

- a) 甲醇：色谱纯
- b) 乙腈：色谱纯
- c) 氯化钠：分析纯
- d) 氯化钾：分析纯
- e) 磷酸氢二钠：分析纯
- f) 磷酸二氢钾：分析纯
- g) 盐酸：分析纯
- h) 氢氧化钠：分析纯
- i) 对照品：黄曲霉毒素混合对照品溶液（黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁和黄曲霉毒素G₂）

5.2 设备

- a) 电子分析天平
- b) pH计
- c) 超高效液相色谱仪
- d) 离心机
- e) 均质机

6 实验方法

6.1 溶液配制

6.1.1 70%甲醇溶液的配制

取甲醇700 mL，加水至1000 mL，摇匀，即得。

6.1.2 5%氢氧化钠溶液的配制

取氢氧化钠5 g，加水使溶解成100 mL，即得。

6.1.3 磷酸缓冲盐溶液的配制

称取8.0 g氯化钠、1.2 g磷酸氢二钠、0.2 g磷酸二氢钾、0.2 g氯化钾，加水990 mL使溶解，用盐酸调节pH值至7.0，加水稀释至1000 mL，即得。

6.1.4 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(黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁和黄曲霉毒素G₂)适量，用70%甲醇溶液稀释成含黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁和黄曲霉毒素G₂浓度分别约为0.01 μg·mL⁻¹、0.003 μg·mL⁻¹、0.01 μg·mL⁻¹和0.003 μg·mL⁻¹的溶液，作为贮备溶液。精密量取贮备溶液3 mL，置10 mL量瓶中，用70%甲醇溶液稀释至刻度，即得。

6.1.5 黄曲霉毒素总量免疫亲和柱回收率溶液的制备

精密量取6.1.4项下贮备溶液3 mL，置100 mL量瓶中，用水稀释至刻度。精密量取20 mL，通过黄曲霉毒素总量免疫亲和柱，流速约3 mL·min⁻¹，用水20 mL洗脱，弃去洗脱液，使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置2 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.22 μm）滤过，取续滤液，即得。

6.1.6 供试品溶液的制备

取五味子药材粉末约15 g(过二号筛)，精密称定，置于均质瓶中，加入氯化钠3 g，精密加入70%甲醇溶液75 mL，高速搅拌2分钟，离心5分钟（离心速度3000 r·min⁻¹），精密量取上清液15 mL，用5%氢氧化钠溶液调节pH值至6，置50 mL量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，放置2小时。以玻璃纤维滤纸滤过，精密量取续滤液20 mL，通过黄曲霉毒素总量免疫亲和柱，流速约3 mL·min⁻¹，依次用磷酸缓冲盐溶液10 mL、水10 mL洗脱，弃去洗脱液，使空气进入柱子，将水挤出柱子，再用适量甲醇洗脱，收集洗脱液，置2 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，用微孔滤膜（0.22 μm）滤过，取续滤液，即得。

6.1.7 空白溶液的制备

取氯化钠3 g，置于均质瓶中，精密加入70%甲醇溶液75 mL，照“6.1.6 供试品溶液的制备”项下进行制备。

6.2 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂（100 mm×2.1 mm×1.7 μm）；以乙腈-甲醇（50:50）为流动相A，以水为流动相B；柱温为30 ℃；流速为每分钟0.4 mL；荧光检测器检测，激发波长λ_{ex}=365 nm，发射波长λ_{em}=450 nm，按表1中的规定进行梯度洗脱。

表1 流动相梯度

时间（分钟）	流动相A（%）	流动相B（%）
0~8	30	70
8~10	30→70	70→30
10~13	70	30
13~14	70→30	30→70

14~16

30

70

6.2.1 测定法

分别精密吸取6.1.4项下混合对照品溶液1 μL、1.5 μL、2 μL、2.5 μL、3 μL、4 μL，注入液相色谱仪，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。另精密吸取6.1.6项下供试品溶液2 μL，注入液相色谱仪，测定峰面积，从标准曲线上读出供试品相当于黄曲霉毒素B₁、黄曲霉毒素B₂、黄曲霉毒素G₁、黄曲霉毒素G₂的量，用公式（1）计算样品中黄曲霉毒素的含量，即得。

$$\text{黄曲霉毒素}(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}) = [(R - a)/S] \times C \times V/W \quad (1)$$

式中：

R — 供试溶液的峰面积；

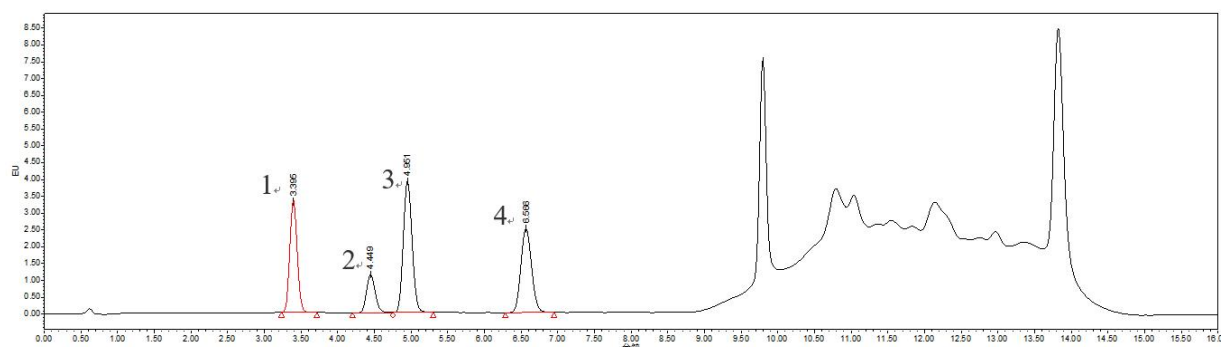
a — 截距；

S — 斜率；

C — 对照品浓度（μg·mL⁻¹）；

V — 稀释倍数；

W — 样品重量（kg）。



标引序号说明：1-黄曲霉毒素G₂；2-黄曲霉毒素G₁；3-黄曲霉毒素B₂；4-黄曲霉毒素B₁。

图1 混合对照品溶液色谱图

6.2.2 系统适用性

取6.1.4项下混合对照品溶液，连续进样6次，记录各成分峰面积、分离度及理论塔板数。

6.2.3 免疫亲和柱回收率

取6.1.5项下黄曲霉毒素总量免疫亲和柱回收率溶液，按上述色谱条件进行测定，记录各成分峰面积。

6.2.4 专属性

取6.1.4项下混合对照品溶液、6.1.6项下的供试品溶液和6.1.7项下空白溶液，按上述色谱条件进行测定，记录各成分峰面积。

7 数据分析及判定

7.1 系统适用性

各成分峰面积的相对标准偏差应不大于2.0%，分离度大于1.5，理论塔板数不小于5000。

7.2 免疫亲和柱回收率

各成分回收率不得小于80%。

7.3 专属性

空白溶液在对照品相应出峰位置处无干扰。

7.4 判定

本品每1000 g含黄曲霉毒素B₁不得过5 μg，含黄曲霉毒素G₂、黄曲霉毒素G₁、黄曲霉毒素B₂和黄曲霉毒素B₁的总量不得过10 μg。

附录 A

（资料性）

方法学验证

A.1 检测限与定量限

表 A.1 各成分检出限及定量限结果汇总

成分	黄曲霉毒素 G ₂	黄曲霉毒素 G ₁	黄曲霉毒素 B ₂	黄曲霉毒素 B ₁
检出限 (μg/kg)	0.04	0.08	0.04	0.04
定量限 (μg/kg)	0.1	0.4	0.1	0.1

A.2 准确度

表 A.2 准确度测定结果

回收率%	黄曲霉毒素 G ₂	黄曲霉毒素 G ₁	黄曲霉毒素 B ₂	黄曲霉毒素 B ₁	黄曲霉毒素总量
低浓度-1	87	73	81	73	76
低浓度-2	87	73	80	72	75
低浓度-3	86	71	79	70	74
中浓度-1	91	76	84	75	79
中浓度-2	93	77	86	77	80
中浓度-3	92	77	85	76	80
高浓度-1	91	76	84	75	78
高浓度-2	92	77	85	77	80
高浓度-3	92	77	85	77	80
RSD%	3.3	3.1	2.9	3.5	3.2

A.3 方法学验证数据

表A.3 方法学验证结果汇总表

项目	接受标准	结果
专属性	空白溶液对于检测无干扰。	空白溶液对于检测无干扰。
系统适用性	6针对照品峰面积RSD%≤2.0%；分离度>1.5；理论塔板数>5000。	6针对照品峰面积RSD%≤1.8%；分离度均≥2.5；理论塔板数均>5000。
线性和范围	各测定成分标准曲线相关系数≥0.999。	各测定成分标准曲线相关系数≥0.999。
精密 度	重复性	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 和黄曲霉毒素总量RSD≤5.0%。
	中间精 密度	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 和黄曲霉毒素总量RSD≤5.0%。
准确度	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 和黄曲霉毒素总量的回收率≥70%，RSD≤10%。	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 和黄曲霉毒素总量的回收率≥70%，RSD≤3.5%。
稳定性	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 峰面积RSD≤5.0%。	24h内，对照品及供试品黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 峰面积RSD≤1.4%。
耐用性	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 、黄曲霉毒素B ₁ 和黄曲霉毒素总量RSD≤5.0%。	黄曲霉毒素G ₂ 、黄曲霉毒素G ₁ 、黄曲霉毒素B ₂ 和黄曲霉毒素B ₁ 、黄曲霉毒素总量RSD≤1.9%。