

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.012

QuEChERS 超高效液相色谱 – 串联质谱法检测中药 饮片中黄曲霉毒素

孙夏荣, 葛晓明, 王建花

(江苏省南京市食品药品监督管理局, 江苏 南京 211198)

摘要:目的 建立检测中药饮片中黄曲霉毒素的 QuEChERS 净化样品结合超高效液相色谱 – 串联质谱法。方法 色谱柱采用 Agilent Eclipse XDB C₁₈ RRHD 柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸) – 乙腈(梯度洗脱), 采用电喷雾离子源模式(ESI)、动态多反应监测(DMRM)正离子扫描下采集数据。结果 4 种黄曲霉毒素在相应测定范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.99, 在低、中、高不同浓度加标水平下, 平均回收率为 88.47% ~ 108.06% (n=6)。结论 该方法简便快速、选择性好、灵敏度高, 适用于中药饮片中黄曲霉毒素的快速检测。

关键词:超高效液相色谱 – 串联质谱法; QuEChERS; 黄曲霉毒素; 中药饮片

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)11-0044-04

Determination of Aflatoxins in Traditional Chinese Medicines Prepared in Ready-To-Use Forms by QuEChERS Combined with UPLC-MS/MS

SUN Xiarong, GE Xiaoming, WANG Jianhua

(Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing, Jiangsu, China 211198)

Abstract: Objective To establish a method for the detection of aflatoxins in traditional Chinese medicines prepared in ready-to-use forms with QuEChERS purification by ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry(UPLC-MS/MS).

Methods The samples were separated on an Agilent Eclipse XDB C₁₈ RRHD column(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm). The mobile phase composed of 2 mmol/L ammonium acetate solution(containing 0.1% formic acid) and acetonitrile with gradient elution. Dynamic multi-reaction monitoring(DMRM) scanning was employed for quantification with switching electrospray ion(ESI) source polarity in positive ions. **Results** The four kinds of aflatoxins showed good linear relationships within their own ranges, the correlation coefficients were above 0.99. Under different concentration levels of low, medium and high, their average recoveries ranged from 88.47% to 108.06% (n=6). **Conclusion** The method is simple, rapid, highly selective and sensitive, which can be used for the rapid analyzing of aflatoxins in traditional Chinese medicines prepared in ready-to-use forms.

Key words: ultra performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry; QuEChERS; aflatoxins; traditional Chinese medicines prepared in ready-to-use forms

黄曲霉毒素(aflatoxins)是由黄曲霉和寄生曲霉中某些产菌毒株产生的双呋喃环类毒素,是迄今发现的毒性最大的真菌毒素,常见有 B₁, B₂, G₁, G₂ 4 种,其中以黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最大、致癌性最强,其毒性相当于氰化钾的 10 倍、砒霜的 68 倍,已被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构(IARC)划定为 I 类致癌物,是一种毒性极强的剧毒物质^[1-4]。中药材及其制剂在储存过程中常会发生霉变,产生很多对人体有害的真菌毒素^[5-6],2015 年版《中国药典(一部)》已规定了部分中药材品种黄曲霉毒素 B₁ 的限量不得超过 5 μg/kg、黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的总量不得超过 10 μg/kg^[7]。

目前,文献报道的黄曲霉毒素检测方法主要有薄层色谱(TLC)法^[8]、酶联免疫(ELISA)法^[9]、高效液相色谱

谱(HPLC)法^[10-11]、液相色谱 – 串联质谱(LC-MS/MS)法^[12-13]等。样品的前处理方面,现行《中国药典》执行的标准为免疫亲和柱净化法联用色谱技术,由于免疫亲和柱填料大多采用进口填料,单根免疫亲和柱售价约为 100 元,若长期使用则相关检测成本较高。LC-MS/MS 法专属性好、灵敏度高、抗干扰强,能有效排除假阳性的干扰,适合在复杂基质下同时筛查痕量的多种黄曲霉毒素。

QuEChERS(quick, easy, cheap, effective, rugged, safe)是由美国农业部的化学家 ANASTASSIADIS 等于 2003 年提出的一种快速样品前处理技术^[14-15],用于农药残留的检测。该方法具有分析快速、回收率高、精确度和准确度高、使用溶剂量少、污染少、操作简便等优点,近年来主要用于农产品和食品的各项检测中,但在药品

的检测中应用较少。本研究中采用基于 QuEChERS 原理的样品前处理的快速提取方法,结合超高效液相色谱(UPLC) - MS/MS 法,建立中药饮片 4 种黄曲霉毒素(AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2)的检测方法,提供一种不使用免疫亲和柱的黄曲霉毒素的检测思路,为药品的监管提供有效的技术支持。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 6470 型三重四极杆串联质谱联用仪,包括电喷雾离子化源(ESI)、MassHunter 数据处理系统(美国安捷伦公司);CPA225D 型电子天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一);涡旋混匀器(德国维根公司);X-30R 型冷冻离心机(德国 Beckman 公司);Milli-Q 型超纯水系统(美国默克公司);N-EVAP 24 型氮吹仪(美国 Organomation 公司);KQ-250B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 250 W,频率为 30 kHz)。

1.2 试剂

甲醇、乙腈(色谱纯, Honeywell 公司);甲酸、乙酸铵(色谱纯, Aladdin 公司);无水硫酸镁(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司);氯化钠(分析纯, 南京化学试剂股份有限公司);水为超纯水;黄曲霉毒素混合对照品(批号为 610001-201804), AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2 含量分别为 0.93, 0.30, 0.93, 0.35 $\mu\text{g/mL}$, 均购自中国食品药品检定研究院;陈皮、大枣、柏子仁均为市售样品或抽样样品。

2 方法与结果

2.1 液相色谱及质谱条件

2.1.1 液相色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB C_{18} RRHD 柱(50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μm);流动相: 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸, 流动相 A) - 乙腈(流动相 B), 按表 1 进行梯度洗脱;流速: 0.3 mL/min;柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量: 2 μL 。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	A(%)	B(%)	时间(min)	A(%)	B(%)
0	65	35	6.5	5	95
4.5	15	85	7.0	65	35
5.0	5	95	10.0	65	35

2.1.2 质谱条件

离子源模式(ESI): 正离子模式;毛细管电压 4 000;雾化器流速: 9 L/min;干燥器温度: 325 $^{\circ}\text{C}$;雾化器压力: 40 psi(1 psi = 6.89 kPa);鞘气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$;鞘气流量: 11 L/min;扫描模式: 动态多反应离子监测(DMRM)。相关质谱采集参数见表 2。

2.2 溶液制备

分别精密量取黄曲霉毒素混合对照品 1 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 用 70% 甲醇溶液稀至刻度, 摇匀, 作为标准贮备液。精密量取标准贮备液适量, 用 70% 甲醇溶液稀释成每 1 mL 含 AFB_1 , AFG_1 0.093, 0.465, 0.930, 1.860, 3.720, 9.300 ng, AFB_2 0.030, 0.150, 0.300, 0.600, 1.200, 3.00 ng, AFG_2 0.035, 0.175, 0.350, 0.700, 1.400, 3.50 ng 的混合标准系列溶液。取供试品粉末 2 g(过 3 号筛), 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 加入 80% 乙腈溶液(含 0.1% 甲酸)20 mL, 超声 10 min, 离心 5 min(离心速率 10 000 r/min), 取上清液, 再加入 0.5 g 氯化钠和 2 g 无水硫酸镁, 充分涡旋振荡 2 min, 离心 5 min(离心速率 6 000 r/min), 取上清液 1 mL 用 50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干, 快速加入 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸) - 乙腈(65:35, V/V)1 mL, 过微孔滤膜(0.22 μm), 取滤液, 供 LC-MS/MS 分析。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 取 6 个不同质量浓度的混合标准系列溶液, 分别进样, 记录峰面积。以质量浓度(X , ng/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线。结果见表 3。

精密度试验: 取同一质量浓度的混合标准系列溶液(AFB_1 , AFG_1 0.930 ng/mL; AFB_2 0.300 ng/mL; AFG_2 0.350 ng/mL), 进样 6 次。测定结果见表 3, 各组分峰面积的 RSD 均在 1.80% ~ 3.52% ($n=6$), 表明仪器精密度良好。

重复性试验: 精密称取空白样品 2 g(过 3 号筛), 共 6 份, 加入标准贮备液 0.1 mL, 按供试品溶液制备方法制备, 按拟订条件进样测定。结果见表 3, 上述各组分峰面积的 $RSD < 4.00\%$ ($n=6$), 表明方法重复性良好。

稳定性试验: 取重复性试验项下供试品溶液 1 份, 置室温, 分别于 0, 4, 8, 12, 24 h 时依法进样测定。结果见表 3, 各组分峰面积的 $RSD < 5.00\%$ ($n=5$), 表明供

表 2 黄曲霉毒素的质谱离子参数

序号	化合物	模式	相对保留时间(min)	母离子相对分子质量	碎裂电压(V)	定性离子相对分子质量	定量离子对分子质量
1	AFB_1	+	3.62	313.1	171	241.0	285.0
2	AFB_2	+	3.42	315.1	170	259.0	287.0
3	AFG_1	+	3.16	329.1	151	311.0	243.0
4	AFG_2	+	2.93	331.1	101	257.0	245.1

表3 黄曲霉毒素方法学考察结果($n=6$)

化合物名称	线性回归方程	相关系数(r^2)	LOD($\mu\text{g/kg}$)	LOQ($\mu\text{g/kg}$)	精密性 RSD(%)	重复性 RSD(%)	稳定性 RSD(%)	回收率(%)
AFB ₁	$Y=1\,855.43X+78.81$	0.999 7	0.10	0.30	1.8	1.52	4.18	92.20~107.43
AFB ₂	$Y=1\,423.50X+8.541$	0.998 5	0.10	0.30	3.0	2.75	3.93	89.14~108.06
AFG ₁	$Y=1\,213.46X+135.76$	0.997 5	0.20	0.60	3.5	1.93	3.54	92.31~103.78
AFG ₂	$Y=330.36X+6.78$	0.998 7	0.10	0.30	3.3	3.20	4.73	88.47~106.12

试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

检测限与定量限确定:将混合标准系列溶液加入空白样品溶液中,依法制备供试品溶液并进样测定。以信噪比(S/N)为 3:1 确定各组分的检测限(LOD),当 S/N 为 10:1 确定各组分的定量限(LOQ)。结果见表 3。

准确度试验:取空白样品 2 g,精密称定,共 18 份,每 6 份按低、中、高 3 种质量浓度水平分别精密加入标准贮备液 0.05,0.10,0.50 mL,依法制备供试品溶液并进样测定,计算回收率。结果见表 3。

2.4 样品含量测定

对 10 批市售样品进行测定,结果在 2 批样品中检出 AFB₁,其余均未检出。详见图 1 和图 2。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

曾考察不同比例的甲醇-水系统、乙腈-水系统、乙酸铵-乙腈系统等多个流动相体系进行梯度洗脱。结果显示,在 2 mmol/L 乙酸铵溶液的流动相体系下,各

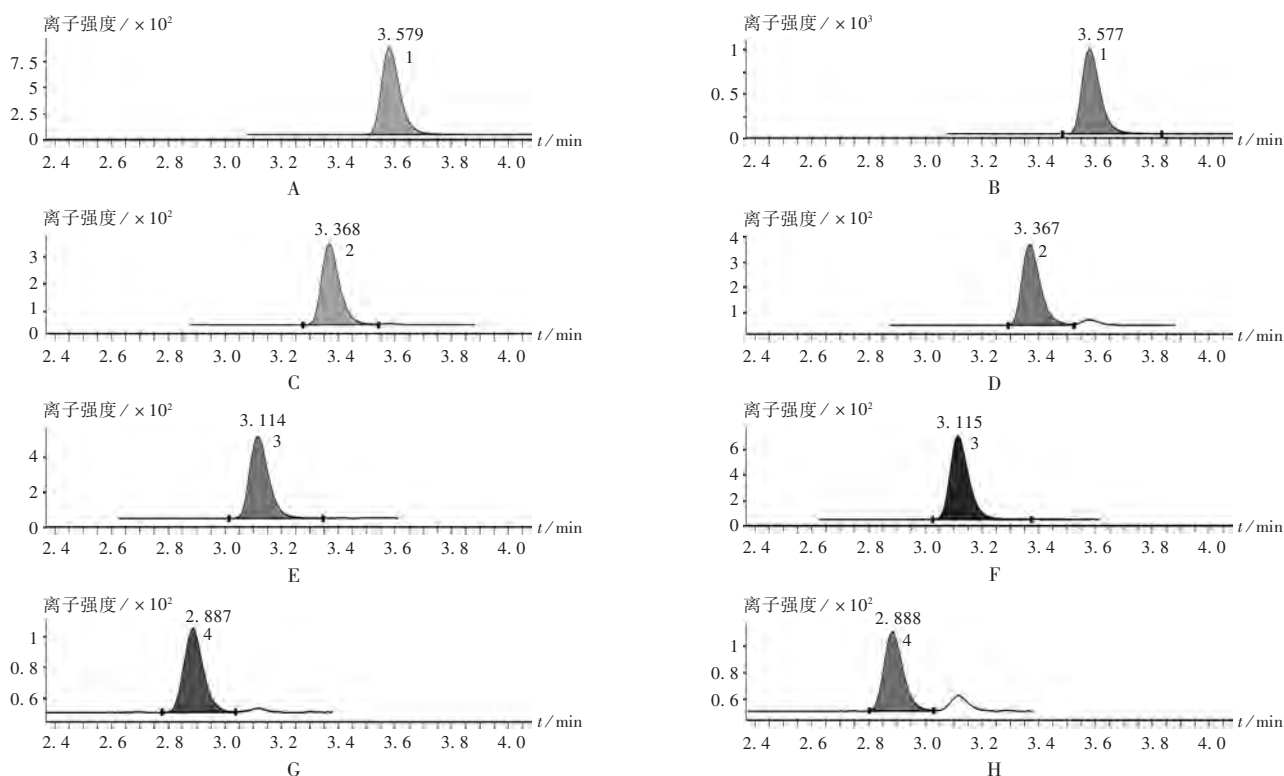
化合物的响应值最高、峰形较好,且加入一定量的甲酸可进一步提高各化合物的离子化效率,故选取 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)-乙腈系统为流动相。

3.2 质谱条件优化

本试验中对影响离子化效率的干燥器温度、鞘气温度、鞘气流量、雾化器压力、毛细管电压、碰撞能量等条件均进行了优化,最终选择电喷雾正离子扫描模式,得各化合物最佳的质谱条件。

3.3 样品前处理优化

提取溶剂选择:曾考察不同提取溶剂对 4 种黄曲霉毒素的提取效率,比较了甲醇、乙腈、不同比例的酸化甲醇水溶液(含 0.1% 甲酸)、不同比例的酸化乙腈水溶液(含 0.1% 甲酸),结果发现,不同类型的提取溶剂对黄曲霉毒素的提取效率存在差异。当提取溶剂为 80% 乙腈溶液(含 0.1% 甲酸)时,提取效率最高,各化合物回收率均超过 85%,且选择高有机相比率的提取溶剂,可明显缩短氮吹时间,节约试验时间。因此,确定 80% 乙



1. AFB₁ 2. AFB₂ 3. AFG₁ 4. AFG₂
A, C, E, G. 定性离子 B, D, F, H. 定量离子
图1 黄曲霉毒素定性和定量离子对的 DMRM 图

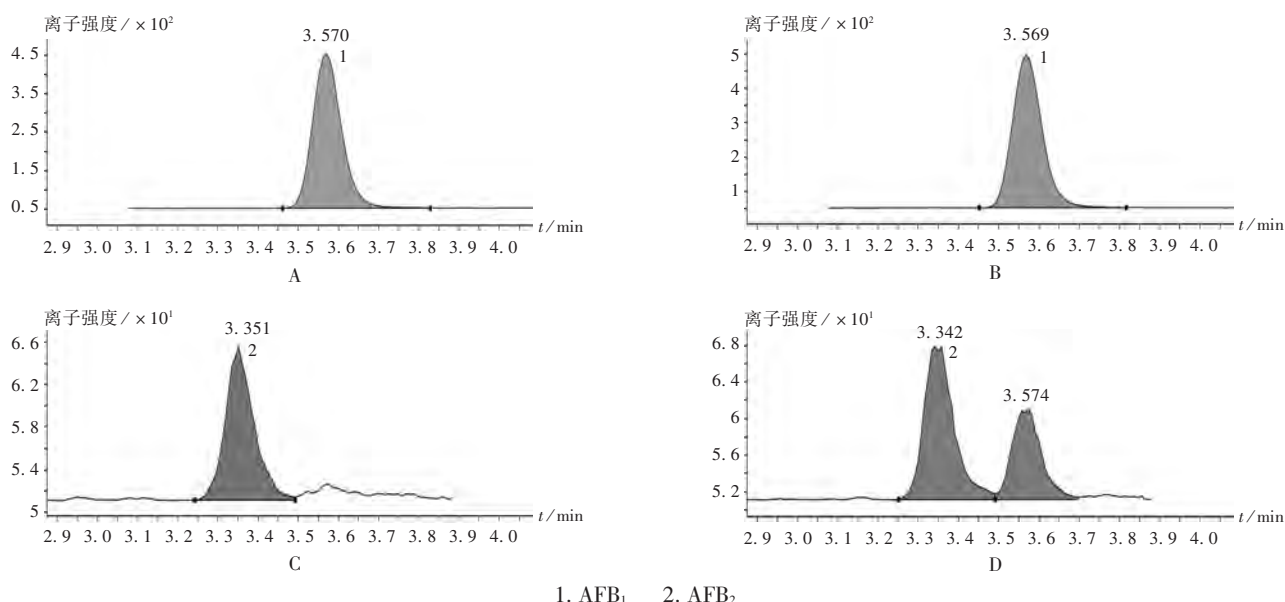


图2 典型阳性供试品定性和定量离子对的 DMRM 图

腈溶液(含 0.1% 甲酸)为提取溶剂。

提取方式选择:曾考察超声波提取、涡旋振荡提取 2 种方式对提取效率的影响,结果无显著性差异。从试验操作的方便性考虑,宜采用超声波提取。此外,进一步比较了不同超声时间(2, 5, 10, 20, 30 min)对提取结果的影响。结果显示,样品超声处理 10 min 和 20 min 与 30 min 相比,回收率无显著差异,故选择超声处理 10 min。

盐析剂和复溶溶剂选择:QuEChERS 方法中盐析剂对黄曲霉毒素的回收率也有一定影响。经比较发现,0.5 g 氯化钠和 2 g 无水硫酸镁能促进提取液分层,回收效率最高。曾考察样品在氮吹蒸干后不同的复溶溶剂对试验的影响,比较甲醇、乙腈、2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)-乙腈(65:35, V/V)的复溶溶液,结果直接采用甲醇或乙腈作为复溶溶液,会出现溶剂效应。故最终选择 2 mmol/L 乙酸铵溶液(含 0.1% 甲酸)-乙腈(65:35, V/V)作为复溶溶液,也作为流动相的初始比例溶液。

3.4 方法评价

本研究中建立了基于 QuEChERS 原理的样品前处理方法,结合 UPLC-MS/MS 技术,建立中药饮片 4 种黄曲霉毒素(AFB_1 , AFB_2 , AFG_1 , AFG_2)的检测方法。该方法快速简便、操作性强、灵敏度高,为中药饮片中快速检测 4 种黄曲霉毒素提供了新的研究思路和参考。

参考文献:

[1] 程翠利,赵小会,蒋红梅,等. 黄曲霉及毒素防控技术研究进展[J]. 食品工业,2018,39(2):296-300.
[2] 吴佳遥,李磊,游海平,等. 黄曲霉毒素的危害及植物精油的抑制作用进展[J]. 天津农业科学,2019,25(7):61-64.

[3] 张正锋,张毅. 高效液相色谱法测定愈伤灵胶囊中黄曲霉毒素 G_2 , G_1 , B_2 , B_1 含量[J]. 中国药业,2015,24(15):37-40.
[4] 徐荣,张佩华. 黄曲霉毒素 B_1 的检测方法[J]. 湖南饲料,2018(1):38-39.
[5] 蒋孟圆,胡琳,杨青松,等. 18 批中药材中黄曲霉毒素的检测分析[J]. 环境化学,2018,37(10):2326-2328.
[6] 李婷,胡小松,巩颖,等. 中药材中黄曲霉毒素的防控措施研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(7):228-234.
[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:191,273.
[8] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素 B_1 [J]. 现代畜牧科技,2018(8):20.
[9] 李江,蔡艳,余之蕴,等. 酶联免疫法对食用油中黄曲霉毒素 B_1 的检测[J]. 广东化工,2017,44(11):73-74.
[10] 王艳红,胡丹丹,潘雪静. 高效液相色谱法测定小麦中黄曲霉毒素 B_1 含量[J]. 山东化工,2019,48(12):74-75.
[11] 吴高芬,李慧敏. 柱后衍生法荧光检测黄曲霉毒素的方法探讨[J]. 中国药业,2016,25(18):64-67.
[12] 杨晶,梁国华,杨润陆. 液相色谱-串联质谱法测定柏子仁中黄曲霉毒素残留量[J]. 中国药业,2011,20(14):35-37.
[13] 郭舒臣,汪成,彭治添,等. UPLC-MS/MS 法与 HPLC-FLD 法分析检测中药中的黄曲霉毒素[J]. 药物分析杂志,2019,39(7):1272-1278.
[14] 叶雪玲,陈小燕,姜小涵,等. QuEChERS 提取-高效液相色谱法测定泰山虫草中 4 种黄曲霉毒素的含量[J]. 理化检验:化学分册,2019,55(4):442-446.
[15] 程盛华,杨春亮,曾绍东,等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定植物油中黄曲霉毒素[J]. 化学试剂,2015,37(10):897-902.

(收稿日期:2019-09-24;修回日期:2020-01-22)