

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.22.020

超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法同时测定 舒眠胶囊(片)中 4 种黄曲霉毒素含量

陈 莉

(中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院药剂科,福建 福州 350000)

摘要:目的 建立同时测定舒眠胶囊(片)中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂(AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)含量的超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC-QQQ/MS)法。方法 以 3 个市售厂家的舒眠胶囊和舒眠片各 6 批为样品。色谱柱为 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 柱(150 mm×2.1 mm,2.6 μm),流动相为 9.0 mmol/L 乙酸铵溶液(A)-甲醇-乙腈(1:1,V/V,B)(梯度洗脱),流速为 0.3 mL/min,柱温为 28℃,进样量为 2 μL;采用电喷雾离子源(ESI+),多反应监测模式(MRM)。结果 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 进样量分别在 0.372~37.20 ng($r=0.999\ 3$)、0.132~13.20 ng($r=0.999\ 1$)、0.408~40.80 ng($r=0.999\ 0$)、0.140~14.00 ng($r=0.999\ 2$)范围内与峰面积线性关系良好,检测限分别为 1.86、0.66、2.04、0.70 pg/mL,定量限分别为 5.44、2.19、6.01、2.24 pg/mL;精密度、重复性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 2.5%;回收率为 79.07%~88.88%,RSD 为 1.05%~3.02%($n=9$)。3 个厂家的 12 批样品中均未检测出 AFG₂、AFG₁、AFB₂、AFB₁。结论 该方法灵敏、简便、专属性强,可用于舒眠胶囊(片)中 4 种黄曲霉毒素的同时测定。

关键词:黄曲霉毒素;舒眠胶囊;舒眠片;超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法;含量测定

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)22-0077-04

Simultaneous Determination of Four Aflatoxins in Shumian Capsules (Tablets) by UPLC-QQQ/MS

CHEN Li

(Department of Pharmacy, The 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force, Fuzhou, Fujian, China 350000)

Abstract: Objective To establish an ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry (UPLC-QQQ/MS) method for the simultaneous determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) in Shumian Capsules (Tablets). **Methods** Six batches of Shumian Capsules and six batches of Shumian Tablets from three manufacturers were selected

第一作者:陈莉,女,大学本科,药师,研究方向为药物分析与药品质量标准研究与评价,(电子信箱)935840852@qq.com。

效果监测和灭菌器工艺开发显得尤为重要,和欧美国家相比,我国灭菌工艺相关的法规、标准、规范和指导原则相对不健全。近年来,国家药品改革不断深入,对于药品无菌工艺保障要求越来越多,无菌工艺也是药品安全性保障的重要指标,对相应指导原则或标准规范的需求就更迫切,为此,2020年版《中国药典(四部)》通则在以往版本的基础上对灭菌法进行了重大修订,增加了与灭菌工艺相关的2个BI的指导原则,即通则9207(灭菌用生物指示剂指导原则)和通则9208(生物指示剂耐受性检查法指导原则)。2020年12月31日,国家药品监督管理局药品审评中心(CDE)正式发布《化学药品注射剂灭菌和无菌工艺研究及验证指导原则(试行)》并试行。上述指导原则的发布,为BI的质量控制提供了参考,为检测实验室和药品生产企业在灭菌工艺研究、灭菌效果验证和日常灭菌监控中正确选用BI提供了技术指导,同时,良好的灭菌工艺能减少药品污染,降低实验室感染性材料灭菌不彻底的风险。

综上所述,本研究中确立了适用于本实验室的脉动真空灭菌器的灭菌程序、装载方式及其日常监测的方法。初步确定的灭菌程序(121℃灭菌15 min),能杀灭孢子菌而达到预期灭菌效果,保障培养基和试剂的灭菌质

量。在日常微生物检验过程中,用该灭菌程序能彻底杀灭包括孢子菌在内的所有微生物,而不会因为杀菌不彻底,检验用物品引入微生物造成假阳性风险。蒸汽灭菌器可满足日常检验时的灭菌使用要求。需注意在每次灭菌时应使用指示胶带,根据灭菌器的使用年限和使用频率定期进行B-D试验和生物指示剂挑战试验。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:204-205,512-513.
- [2] 孙世雄,孙翔翔,樊晓旭,等. 病原微生物实验室压力蒸汽灭菌器的规范化使用[J]. 中国标准化,2021(22):238-243.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:204-206.
- [4] 黄浩,张青,李卡. 医院消毒供应中心操作常规[M]. 北京:科学出版社,2014:143.
- [5] 彭飞,王世英,杨亚娟. 消毒供应中心操作规范[M]. 上海:上海科学技术出版社,2019:48.
- [6] GB/T 32310-2015,医疗保障产品灭菌化学指示物选择、使用和结果判断指南[S].
- [7] BOWIE JH, KELSEY JC, THOMPSON GR. The Bowie and Dick autoclave tape test[J]. Lancet, 1963, 1(7281):586-587.

(收稿日期:2021-12-30;修回日期:2022-06-07)

as samples. The chromatographic column was Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm), the mobile phase was 9.0 mmol/L ammonium acetate solution (A) – methanol – acetonitrile (1 : 1, V/V, B) with gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 28 °C, and the injection volume was 2 μL. Electrospray ion (ESI+) source was adopted with multi-reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The linear ranges of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were 0.372 – 37.20 ng ($r = 0.999\ 3$), 0.132 – 13.20 ng ($r = 0.999\ 1$), 0.408 – 40.80 ng ($r = 0.999\ 0$) and 0.140 – 14.00 ng ($r = 0.999\ 2$), respectively. The limits of detection were 1.86, 0.66, 2.04 and 0.70 pg/mL respectively, and the limits of quantitation were 5.44, 2.19, 6.01 and 2.24 pg/mL, respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability tests were less than 2.5%. The average recovery of AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ was in the range of 79.01% – 88.88% with an RSD of 1.05% – 3.02% ($n = 9$). AFG₂, AFG₁, AFB₂ and AFB₁ were not detected in 12 batches of samples from three manufacturers. **Conclusion** The method is sensitive, simple and specific, which can be used for the simultaneous determination of aflatoxin in Shumian Capsules (Tablets).

Key words: aflatoxin; Shumian Capsules; Shumian Tablets; UPLC – QQQ/MS; content determination

舒眠胶囊(片)由酸枣仁、柴胡、白芍、合欢花、合欢皮、僵蚕、蝉蜕、灯心草等8味药材组方,用于治疗肝郁伤神所致失眠症^[1]。根据2020年版《中国药典(四部)》规定的僵蚕、酸枣仁等25个中药品种的黄曲霉毒素(AF)检查项和“中药中真菌毒素测定指导原则”^[2],应多加关注处方中含有易污染药材中成品种种的AF污染问题,目前,尚无有关舒眠胶囊(片)中AF的研究。AF属真菌毒素曲霉属,是黄曲霉和寄生曲霉产生的双呋喃环类剧毒次级代谢产物^[3-4],以AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂较常见^[5-6]。中药材和饮片在生产工艺和储存运输过程中,易受基质、湿度、温度等因素影响,有可能发生霉变而产生AF污染,继而对人体健康产生危害。本研究中建立了同时测定舒眠胶囊(片)中AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂含量的超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC – QQQ/MS)法,并对3家生产企业的舒眠胶囊和舒眠片样品进行检测,为评价制剂安全性提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent G7120A – G6460C型超高效液相色谱 – 三重四极杆质谱联用仪,包括G7120A型二元梯度泵, G7167B型自动进样器, G7116B型柱温箱, MassHunter Workstation数据处理系统(安捷伦科技有限公司); MS105DU/A型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg); KQ – 500DBG型数控超声波清洗器(昆山超声波仪器有限公司); TGL – 20M型高速台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); PriboFast IAC型免疫亲和柱(青岛普瑞邦生物科技有限公司,规格为3 mL)。

1.2 试剂

舒眠胶囊(贵州大隆有限责任公司,批号分别为20210511、20210906、20211028、20211115、20211224、20220109,规格为每粒0.4 g); 舒眠片(无锡济民可信山禾药业股份有限公司,批号分别为210923、211107、211212,北京长城制药厂,批号分别为20210607、20211123、20211218,规格均为每片0.48 g); AF对照溶

液(中国食品药品检定研究院,批号为610011 – 202104, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂标示质量浓度分别为0.93, 0.33, 1.02, 0.35 μg/mL); 乙腈、甲醇、乙酸铵均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

色谱条件:色谱柱为Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈柱(150 mm × 2.1 mm, 2.6 μm); 流动相为9.0 mmol/L乙酸铵溶液(A) – 甲醇 – 乙腈(1:1, V/V, B), 梯度洗脱(0 ~ 4.5 min时 68%A → 12%A, 4.5 ~ 6 min时 12%A → 1%A, 6 ~ 6.5 min, 1%A → 68%A, 6.5 ~ 10 min时 68%A)^[7-8]; 流速为0.3 mL/min; 柱温为28 °C; 进样量为2 μL。

质谱条件^[9-10]: 电离方式为电喷雾离子源(ESI+); 检测方式为多反应监测模式(MRM), 分析参数见表1; 雾化气流速为7.5 L/min, 温度为400 °C; 毛细管电压为0.6 kV; 离子源温度为200 °C。

表1 黄曲霉毒素质谱参数

Tab. 1 Mass spectrum parameters of aflatoxin

待测成分	保留时间(min)	母离子	子离子	碰撞电压(V)
AFB ₁	4.19	331.1	313.1/245.1	33/40
AFB ₂	3.98	329.1	243.1/311.1	35/30
AFG ₁	3.69	315.1	259.1/287.1	35/40
AFG ₂	3.47	313.1	241.0/285.1	50/40

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:精密吸取AF对照溶液2 mL,置100 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得混合对照品溶液(AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂质量浓度分别为18.6, 6.6, 20.4, 7.0 ng/mL)。

供试品溶液:取样品或样品内容物适量,研细,取约3 g,精密称定,置均质瓶中,加入氯化钠5 g、正己烷100 mL^[11], 30 000 r/min搅拌3 min, 滤过, 滤渣挥干,精密加入85%甲醇50 mL, 5 000 r/min离心5 min,精密量取上清液20 mL,置50 mL容量瓶中,加水定容,摇匀,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液10 mL,过免疫亲和柱

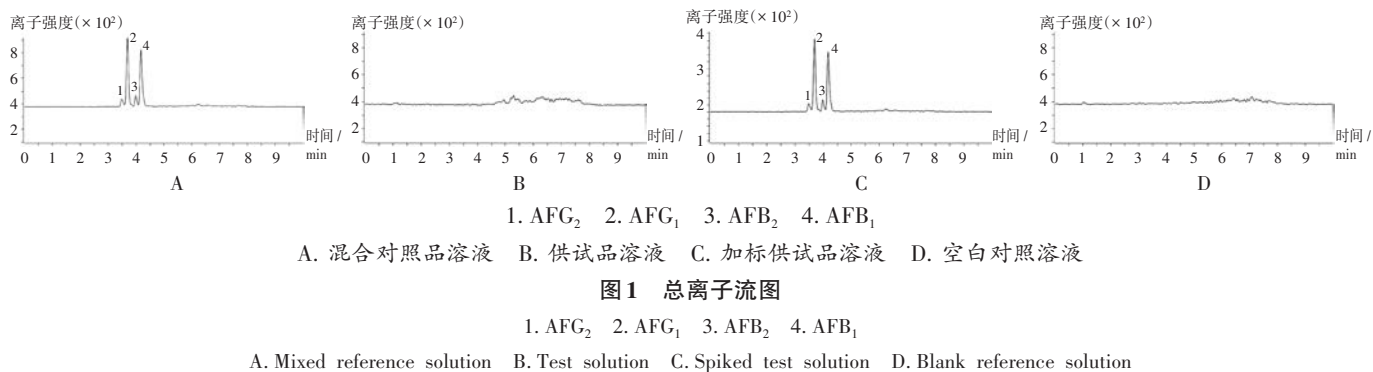


Fig. 1 Total ion chromatograms

(25 ℃), 流速为 3 mL/min, 加水 10 mL 洗脱, 弃去洗脱液, 使空气入柱, 挤出水, 再加甲醇洗脱, 收集洗脱液, 置 2 mL 容量瓶中, 并加甲醇定容, 摇匀, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

加标供试品溶液: 取预试验中未检出 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, 且与制备供试品溶液所用同一批样品, 及系列混合对照品溶液适量, 按供试品溶液制备方法制得加标供试品溶液。

空白对照溶液: 不取样品, 按供试品溶液制备方法制得空白对照溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 分别取 2.2 项下混合对照品溶液、供试品溶液、加标供试品溶液及空白对照溶液各适量, 按 2.1 项下试验条件下进样测定, 记录色谱图。结果空白对照无干扰, 详见图 1。

线性关系考察: 取 2.2 项下混合对照品溶液适量, 加 70% 甲醇逐级稀释成 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ 质量浓度分别为 0.186, 0.744, 1.488, 7.440, 18.600 ng/mL; 0.066, 0.264, 0.528, 2.640, 6.600 ng/mL; 0.204, 0.816, 1.622, 8.160, 20.400 ng/mL; 0.070, 0.280, 0.560, 2.800, 7.000 ng/mL 的系列混合对照品溶液。按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录峰面积, 以峰面积(Y) 为纵坐标, 进样量(X, ng) 为横坐标进行线性回归。结果见表 2。

检测限与定量限考察: 取混合对照品溶液适量, 逐级稀释, 以信噪比(S/N) 为 3:1 和 10:1 时各待测成分的质量浓度为检测限和定量限。结果见表 2。

表 2 线性关系、检测限、定量限考察结果

Tab. 2 Results of linear relation test, limit of detection and limit of quantification

待测成分	回归方程	r	线性范围 (ng)	检测限 (pg/mL)	定量限 (pg/mL)
AFB ₁	$Y_1 = 178.32X_1 + 16.23$	0.999 3	0.372 ~ 37.20	1.86	5.44
AFB ₂	$Y_2 = 264.51X_2 - 49.46$	0.999 1	0.132 ~ 13.20	0.66	2.19
AFG ₁	$Y_3 = 174.69X_3 + 37.12$	0.999 0	0.408 ~ 40.80	2.04	6.01
AFG ₂	$Y_4 = 204.07X_4 - 95.81$	0.999 2	0.140 ~ 14.00	0.70	2.24

精密度试验: 精密吸取混合对照品溶液 2 μL, 按 2.1 项下试验条件连续进样测定 6 次, 记录离子强度。结果 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ 峰面积的 RSD 分别为 0.95%、1.33%、1.26%、1.34% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 精密吸取 2.2 项下加标供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 h 时按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录离子强度。结果 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ 峰面积的 RSD 分别为 1.47%、1.92%、1.65%、1.78% (n = 7), 表明加标供试品溶液室温下放置 18 h 内基本稳定。

重复性试验: 取样品或样品内容物适量, 按 2.2 项下方法制备加标供试品溶液, 共 6 份, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录离子强度并计算含量。结果 AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ 含量的平均值分别为 0.990 6, 0.332 8, 0.972 4, 0.335 4 ng, RSD 分别为 1.85%、1.93%、2.06%、2.11% (n = 6), 表明方法重复性良好。

回收试验: 取未检出 AF 的样品 (批号为 20211115, 211107) 约 1.5 g, 共 9 份, 分别精密加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液各 1.0 mL, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下试验条件进样测定, 记录离子强度并计算回收率。结果见表 3。

2.4 样品含量测定

取样品或样品内容物适量, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下试验条件下进样测定, 记录离子强度。结果 12 批样品中均未检出 AF。

3 讨论

目前测定中药中 AF 的方法主要有高效液相色谱-柱后光化学衍生法、高效液相色谱-柱后碘衍生荧光检测法、酶联免疫层析法及液相色谱质谱联用法等^[8, 12-14]。舒眠胶囊 (片) 成分复杂, 基质干扰大, 液相色谱质谱联用的 MRM 具有较高的灵敏度和专属性, 可减少其衍生误差, 排除基质干扰, 避免假阳性结果。本研究中采用的 UPLC-QQQ/MS 法检测 AF 分析周期仅 10 min, 显著缩短了分析时间, 减少了溶剂消耗, 相比于高效液相色谱 (HPLC) 法具有更高的分析效率和更佳的峰容量。

表3 舒眠胶囊回收试验结果($n=9$)
Tab. 3 Results of the recovery test ($n=9$)

加入量(ng)				测得量(ng)				回收率(%)				$\bar{X}$ (%)				RSD(%)			
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
0.744	0.264	0.816	0.280	0.663	0.235	0.645	0.220	89.13	89.09	79.08	78.46								
0.744	0.264	0.816	0.280	0.664	0.212	0.654	0.224	89.25	80.11	80.15	80.04								
0.744	0.264	0.816	0.280	0.669	0.214	0.658	0.222	89.88	81.02	80.69	79.14								
1.488	0.528	1.622	0.560	1.313	0.438	1.295	0.443	88.24	82.97	79.84	79.07								
1.488	0.528	1.622	0.560	1.326	0.439	1.297	0.450	89.11	83.09	79.96	80.36	88.68	83.11	80.10	79.78	1.05	3.02	1.42	1.26
1.488	0.528	1.622	0.560	1.333	0.434	1.285	0.452	89.58	82.27	79.22	80.64								
7.440	2.640	8.160	2.800	6.479	2.205	6.404	2.197	87.08	83.52	78.48	78.46								
7.440	2.640	8.160	2.800	6.550	2.181	6.656	2.269	88.04	82.61	81.57	81.04								
7.440	2.640	8.160	2.800	6.533	2.198	6.684	2.262	87.81	83.26	81.91	80.79								

预试验中对4种AF的母离子进行全扫描,结果发现4种AF在正离子模式下的响应值较高,然后通过仪器自动优化最佳的毛细管电压和碰撞能量,选取响应值高且稳定的2个子离子作为定性和定量离子;并依次考察了流动相系统(甲醇-乙酸铵、乙腈-乙酸铵、甲醇-甲酸、甲醇-乙腈-乙酸铵),柱温(25℃、28℃、30℃),进样量(1 μL、2 μL、5 μL),不同体积分数的甲醇提取溶剂(75%、85%、90%),过免疫亲和柱的流速(1 mL/min、3 mL/min、5 mL/min),过免疫亲和柱的温度(10℃、25℃、30℃、35℃),最终确定了正式试验条件及供试品溶液提取方法;同时发现柱温对测定结果影响不大,供试品溶液制备过程中免疫亲和柱上酶的活性与室内温度有关,免疫亲和柱中抗体与样品中抗原反应的时间也会影响结果的准确性。

依据2020年版《中国药典》对需进行AF检测的品种规定限量,AFG₁、AFG₂、AFB₁、AFB₂总量的最大限量不得超过5 μg/kg及10 μg/kg,本研究中12批样品中均检测出上述4种成分,符合药典规定。分析原因可能是与药品制备方法相关,舒眠胶囊(片)处方中是以僵蚕、蝉蜕及酸枣仁提取物入药,及企业对中成药生产工艺及中成药存放条件控制较严。

综上所述,本研究中建立了同时测定舒眠胶囊(片)中AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂的UPLC-QQQ/MS法,该法检测速度快且满足方法学验证各项指标,可作为检查该制剂中AF的依据,同时可为检查含僵蚕、蝉蜕及酸枣仁的中成药中的AF提供一定参考。试验结果显示,制剂在AF方面相对较安全,但若在其质量标准中增加AF检查项,还需进一步研究制剂中AF的限度。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 国家食品药品监督管理局国家药品标准新药转正标准第33册[M]. 北京:化学工业出版社,2003:45.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:525.

[3] 刘震营,张永清. 中药材黄曲霉毒素污染与防控[J]. 山东中医药大学学报,2021,45(4):7-9.

[4] 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):117-120.

[5] 沈紧治,王政,苏玉纯. 35种中药饮片黄曲霉毒素B₁的含量考察[J]. 国际中医中药杂志,2019,41(6):614-617.

[6] 徐小龙,刘颖,陈乃江. 葛根定眩胶囊中黄曲霉毒素G₂、G₁、B₂、B₁含量测定及安全性评价[J]. 中国药业,2021,30(23):55-58.

[7] 于洲. 跌打丸中黄曲霉毒素的测定及安全性评价[J]. 药学研究,2021,40(8):504-507.

[8] 谭静玲,丁晓萍,姜涛,等. 安神益脑丸中黄曲霉毒素残留量测定及LC-QQQ/MS确证[J]. 中国医院药学杂志,2021,41(7):687-691.

[9] 孙夏荣,葛晓明,王建花. QuEChERS超高效液相色谱-串联质谱法检测中药饮片黄曲霉毒素[J]. 中国药业,2020,29(11):44-47.

[10] 毛丹,叶林健,王少敏,等. LC-MS/MS法同时测定中药肉豆蔻中12种真菌毒素[J]. 中国药师,2020,23(7):1311-1315.

[11] 刘英丽,毛慧佳,刘慧琳,等. 黄曲霉毒素B₁生物法脱毒机制及产物毒性评价[J]. 食品工业科技,2018,39(3):324-329.

[12] 于鹏浩,张磊,秦家安,等. 免疫亲和柱净化光化学衍生高效液相色谱-荧光检测法同时测定土鳖虫中黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂[J]. 中国中药杂志,2019,44(23):5083-5087.

[13] 吴高芬,李慧敏. 柱后碘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.

[14] 杨东顺,王莉丽,马芙蓉,等. 酶联免疫吸附法测定云南铁皮石斛中黄曲霉毒素B₁[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(19):7052-7056.

(收稿日期:2022-02-24;修回日期:2022-05-25)