

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)23-0067-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.23.015



超高效液相色谱串联质谱法检测山药丸中4种黄曲霉毒素*

赵庆林, 王孟阳, 姚晨, 宋忠强, 贾睿琦, 武红娜[△]

(河北省沧州市食品药品检验所, 河北 沧州 061000)

摘要:目的 建立同时测定山药丸中4种黄曲霉毒素含量的超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)。方法 样品经70%甲醇提取,再用QuEChERS净化管和免疫亲和柱净化,色谱柱为Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm),流动相为乙腈-10 mmol/L乙酸铵溶液(梯度洗脱),流速为0.20 mL/min,柱温为25℃,进样量为2 μL,采用多反应监测、电喷雾电离、正离子扫描模式,毛细管电压为2.4 kV,脱溶剂气温度和流量分别为450℃、950 L/h。结果 黄曲霉毒素B₁、B₂、G₁、G₂的质量浓度分别在0.108~2.160 ng/mL、0.033~0.660 ng/mL、0.101~2.020 ng/mL、0.030~0.600 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.998, n = 5$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于4.0%($n = 6$);平均回收率分别为93.00%、87.22%、87.88%、87.44%,RSD分别为1.63%、3.05%、1.85%、3.26%($n = 6$)。6批样品检出黄曲霉毒素,检出量分别为0.6、0.5、1.4、0.9、0.9、0.8 μg/kg。结论 该方法操作简便、灵敏度高、快速准确、专属性强,可用于同时测定山药丸中4种黄曲霉毒素的含量。

关键词:超高效液相色谱串联质谱法;山药丸;黄曲霉毒素B₁;黄曲霉毒素B₂;黄曲霉毒素G₁;黄曲霉毒素G₂

Determination of Four Aflatoxins in Shanyao Pills by UPLC - MS / MS

ZHAO Qinglin, WANG Mengyang, YAO Chen, SONG Zhongqiang, JIA Ruiqi, WU Hongna

(Cangzhou Institute for Food and Drug Control, Cangzhou, Hebei, China 061000)

Abstract: Objective To establish an ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS/MS) method for simultaneous determination of four aflatoxins in Shanyao Pills. **Methods** The sample was extracted with 70% methanol and purified by the QuEChERS purification tubes and immunoaffinity columns. The chromatographic column was Acquity UPLC BEH C₁₈ column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile-10 mmol/L ammonium acetate solution (gradient elution), the flow rate was 0.20 mL/min, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 2 μL. Multi-reaction monitoring mode was adopted with electric spray ion and positive ion scanning, the capillary voltage was 2.4 kV, the desolvation gas temperature was 450℃, and the flow rate was 950 L/h. **Results** The linear ranges of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ were 0.108-2.160 ng/mL, 0.033-0.660 ng/mL, 0.101-2.020 ng/mL, and 0.030-0.600 ng/mL ($r \geq 0.998, n = 5$),

*基金项目:2022年度河北省药品监督管理局科技计划项目[2022ZC1005]。

第一作者:赵庆林,男,大学本科,食品药品工程师,研究方向为药物分析与质量标准,(电子信箱)313196273@qq.com。

[△]通信作者:武红娜,女,硕士研究生,高级工程师,研究方向为中药质量分析,(电子信箱)505982831@qq.com。

mation an injectable 3D porous hydrogel for speeding up deep second-degree scald wound healing[J]. RSC Adv, 2020, 10(59):36101-36110.

[15] XU HL, CHEN PP, WANG LF, et al. Skin-permeable liposome improved stability and permeability of bFGF against skin of mice with deep second degree scald to promote hair follicle neogenesis through inhibition of scar formation[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2018, 172:573-585.

[16] MEDINA JL, FOURCAUDOT AB, SEBASTIAN EA, et al. Standardization of deep partial-thickness scald burns in C57BL/6 mice[J]. Int J Burns Trauma, 2018, 8(2):26-33.

[17] BAI J, XIE Y, LI M, et al. Ultrasound-assisted extraction of emodin from *Rheum officinale* Baill and its antibacterial mechanism against *Streptococcus suis* based on CcpA[J]. Ultrason Sonochem, 2024, 102:106733.

[18] 邱水生,肖淋,肖钦. 正交试验优选紫白栓中大黄的提取工艺[J]. 海峡药学, 2020, 32(9):46-48.

[19] 王倩. 白头翁喷膜剂的研制[D]. 青岛:青岛科技大学, 2019.

[20] 胡桂新,刘雨洁,张文哲,等. 抑菌型可降解PLA/PCL/T-ZnOw形状记忆复合材料的制备与性能研究[J]. 塑料工业, 2022, 50(8):25-32.

[21] 钱雪,王晓东,陈斌,等. 薰衣草精油纳米乳的制备及其体外抑菌活性研究[J]. 中国野生植物资源, 2022, 41(4):10-15.

[22] SAMUELSON R, LOBL M, HIGGINS S, et al. The Effects of Lavender Essential Oil on Wound Healing: A Review of the Current Evidence[J]. J Altern Complement Med, 2020, 26(8):680-690.

[23] SEQUEIRA RS, MIGUEL SP, CABRAL CSD, et al. Development of a poly(vinyl alcohol)/lysine electrospun membrane-based drug delivery system for improved skin regeneration[J]. Int J Pharm, 2019, 570:118640.

(收稿日期:2023-10-11;修回日期:2024-05-13)

respectively. The *RSDs* of precision, stability, and repeatability tests were all lower than 4.0% ($n = 6$). The average recoveries of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ were 93.00%, 87.22%, 87.88%, and 87.44%, with *RSDs* of 1.63%, 3.05%, 1.85%, and 3.26% ($n = 6$), respectively. Six batches of samples were detected with aflatoxin contents of 0.6, 0.5, 1.4, 0.9, 0.9, and 0.8 μg / kg, respectively.

Conclusion The method is simple, highly sensitive, fast, accurate, and highly specific, which can be used for the simultaneously determination of four aflatoxins in Shanyao Pills.

Key words: UPLC - MS / MS; Shanyao Pills; aflatoxin B₁; aflatoxin B₂; aflatoxin G₁; aflatoxin G₂

中药材在加工、炮制及储存运输过程中易受真菌污染而产生真菌毒素^[1-2],其中最常见、毒性最强且危害最大的为黄曲霉毒素^[3]。黄曲霉毒素为二氢呋喃香豆素衍生物,肝毒性极强,已被国际癌症研究机构(IARC)列为I类致癌物^[4]。2020年版《中国药典(一部)》新增加了延胡索、土鳖虫、九香虫、蜂房、马钱子药材的黄曲霉毒素检查项,并规定每1000g药材含黄曲霉毒素B₁(AFB₁)不得超5μg,黄曲霉毒素G₂(AFG₂)、黄曲霉毒素G₁(AFG₁)、黄曲霉毒素B₂(AFB₂)、黄曲霉毒素B₁(AFB₁)的总量不得超10μg。虽未对中成药中黄曲霉毒素的限度加以规定,但应关注含易被黄曲霉毒素污染的药材或饮片的中成药受黄曲霉毒素污染的风险^[5]。山药丸由山药、杜仲(炒炭)、牛膝、甘草、木香、乳香(醋制)、没药(醋制)、千年健、自然铜(煅醋淬)、羌活、地枫皮、红花、防风、续断、柴胡、狗脊(沙烫)、麻黄、马钱子粉等中药材组方,具有祛风通络、强筋壮骨功效,用于治疗痹症、筋骨痿软、关节不利、跌打损伤、瘀血作痛等症^[6]。处方中的马钱子粉是马钱子的炮制加工品,故该制剂可能存在黄曲霉毒素污染风险。真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法^[7-8]、免疫测定法^[9-10]、高效液相色谱法^[11-12]、液相色谱串联质谱法^[13-15]等。其中,液相色谱串联质谱法可解决色谱分离不完全的问题,实现多成分同时检测,还可避免假阳性情况。故本研究中建立了同时测定山药丸中AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂含量的超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法,为提升山药丸质量标准 and 评价山药丸安全性提供了参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Xevo TQ-S型超高效液相色谱三重四极杆质谱联用仪(美国Waters公司);KQ300VDE型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为300W,频率为45kHz);XS105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为十万分之一);H3-16KR型离心机(湖南可成仪器设备有限公司);QuEChERS净化管(迪马科技公司);免疫亲和柱(青岛普瑞邦生物工程有限公司)。

1.2 试剂

黄曲霉毒素混合对照品(中国食品药品检定研究

院,批号为610001-202107, AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂质量浓度分别为1.08, 0.33, 1.01, 0.30 μg / mL);甲醇、乙腈(质谱级,德国Merck公司);水为实验室自制超纯水;乙酸铵(色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司);山药丸(A企业,批号分别为20220701, 20201002, 20210503; B企业,批号分别为21370902, 22330806, 22190705; C企业,批号分别为191910, 201809, 202107; D企业,批号分别为200907, 210908, 211001; E企业,批号分别为20201002, 20220501, 20210611; F企业,批号分别为220902, 220309, 220901)。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC BEH C₁₈柱(100mm×2.1mm, 1.7μm);流动相:10mmol/L乙酸铵溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~4.5min时65%A→15%A, 4.5~6.0min时15%A→0A, 6.0~6.5min时0A→65%A, 6.5~10.0min时65%A);流速:0.20mL/min;柱温:25℃;进样量:2μL。

2.1.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离(ESI);监测模式:多反应监测(MRM)模式,正离子扫描;毛细管电压:2.4kV;脱溶剂气温度:450℃;脱溶剂气流量:950L/h;碰撞气:氦气(Ar);离子源温度:150℃;其他质谱参数见表1。

表1 监测离子对与碰撞电压

Tab. 1 Monitoring ion pair and collision voltage

黄曲霉毒素	保留时间(min)	母离子	子离子	锥孔电压(V)	碰撞能量(V)
AFB ₁	3.66	313.1	241.0	50	38
		313.1	285.1	40	43
AFB ₂	3.46	315.1	259.1	35	36
		315.1	287.1	40	26
AFG ₁	3.25	329.1	243.1	35	28
		329.1	311.1	30	31
AFG ₂	3.04	331.1	245.1	40	28
		331.1	313.1	33	33

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:精密量取黄曲霉毒素混合对照品1mL,置20mL容量瓶中,用70%甲醇稀释并定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取混合对照品贮

备液适量,用70%甲醇稀释成系列混合对照品溶液(见表2)。

表2 系列混合对照品溶液质量浓度(ng/mL)

Tab. 2 Mass concentration of series mixed reference solution (ng/mL)

序号	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
1	0.108	0.033	0.101	0.030
2	0.216	0.066	0.202	0.060
3	0.540	0.165	0.505	0.150
4	1.080	0.330	1.010	0.300
5	2.160	0.660	2.020	0.600

供试品溶液:取样品适量,剪碎,取5g,精密称定,置具塞锥形瓶中,加氯化钠3g,精密加入70%甲醇75mL,高速搅拌(转速为10000r/min)2min,离心(转

速为5000r/min)5min,精密量取上清液10mL,置QuEChERS净化管(含400mgN-丙基乙二胺,400mgC₁₈,1200mg硫酸镁)中,涡旋振荡3min,离心(转速为10000r/min)5min,精密量取5mL上清液,过免疫亲和柱,流速为3mL/min,用20mL水洗脱,弃洗脱液,将水挤出免疫亲和柱,再用少量70%甲醇洗脱,收集洗脱液,置2mL容量瓶中,用70%甲醇稀释并定容,摇匀,0.22μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:分别取2.2项下混合对照品溶液、供试品溶液(AFB₁阳性供试品溶液和AFB₁阴性供试品溶液)各适量,按2.1项下试验条件进样分析。结果各成分的峰形较好,响应值高。详见图1。

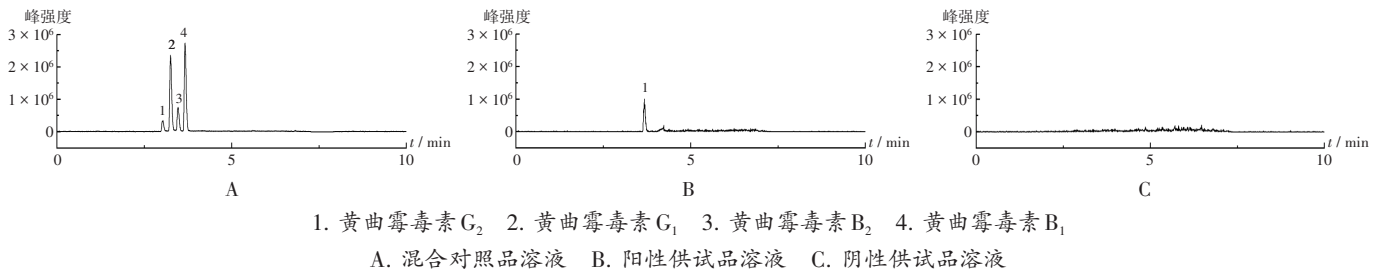


图1 总离子流图

1. Aflatoxin G₂ 2. Aflatoxin G₁ 3. Aflatoxin B₂ 4. Aflatoxin B₁
A. Mixed reference solution B. Positive test solution c. Negative test solution

Fig. 1 TIC chromatograms

线性关系考察:分别精密吸取2.2项下系列质量浓度的混合对照品溶液各2μL,按2.1项下试验条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、进样质量浓度(X)为横坐标进行线性回归。结果见表3,表明各成分在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

表3 线性关系考察结果(n=5)

Tab. 3 Results of the linear relation test (n=5)

黄曲霉毒素	回归方程	线性范围(ng/mL)	r
AFB ₁	Y = 35 625 X - 194.655	0.108 ~ 2.160	0.999
AFB ₂	Y = 11 940.9 X - 117.128	0.033 ~ 0.660	0.999
AFG ₁	Y = 30 767.4 X - 2 067.16	0.101 ~ 2.020	0.998
AFG ₂	Y = 5 899.34 X - 96.486 1	0.030 ~ 0.600	0.999

检测限与定量限确定:取2.2项下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时各成分的质量浓度为检测限和定量限。结果AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂的检测限分别为0.027, 0.042, 0.051, 0.038 μg/kg, 定量限分别为0.054, 0.083, 0.101, 0.075 μg/kg。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下试验条件进样测定6次,记录峰面积。结果AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂峰面积的RSD分别为1.58%,

2.63%, 2.05%, 1.23%(n=6),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为220902),剪碎,取5g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入2.2项下混合对照品贮备液0.2mL,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,记录峰面积。结果AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂峰面积的RSD分别为1.69%, 3.01%, 1.86%, 3.27%(n=6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(批号为220902),剪碎,取5g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24h时按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂峰面积的RSD分别为2.33%, 3.23%, 3.09%, 2.88%(n=6),表明供试品溶液放置24h内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(批号为220902),剪碎,取5g,精密称定,共6份,置具塞锥形瓶中,分别精密加入2.1项下混合对照品贮备液0.2mL,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,并计算回收率。结果见表4,表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取18批山药丸样品,按2.2项下方法制备供试品

表4 加样回收试验结果(n=6)
Tab. 4 Results of the recovery test (n=6)

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
10.8	3.3	10.1	3.0	10.03	2.96	8.91	2.65	92.87	89.69	88.21	88.33								
10.8	3.3	10.1	3.0	9.98	2.91	9.02	2.71	92.40	88.18	89.30	90.33								
10.8	3.3	10.1	3.0	10.11	2.83	8.99	2.69	93.61	85.75	89.00	89.66								
10.8	3.3	10.1	3.0	9.85	2.99	8.57	2.64	91.20	90.60	84.85	88.00	93.00	87.22	87.88	87.44	1.63	3.05	1.85	3.26
10.8	3.3	10.1	3.0	9.97	2.80	8.83	2.48	92.31	84.84	87.42	82.66								
10.8	3.3	10.1	3.0	10.33	2.78	8.94	2.57	95.64	84.24	88.51	85.66								

溶液,按2.1项下试验条件进样测定。结果仅6批(批号分别为20201002,21370902,191910,201809,202107,220309)样品检出AFB₁,检出量分别为0.6,0.5,1.4,0.9,0.9,0.8 μg/kg,其余样品均未检出AFB₁,AFB₂,AFG₁,AFG₂。

3 讨论

3.1 样品提取方法选择

山药丸成分复杂,去除杂质和富集黄曲霉毒素是试验成功的关键。2020年版《中国药典(一部)》检测黄曲霉毒素采用溶剂提取后直接过免疫亲和柱的方法,这种方法复杂,且去除山药丸中杂质的效果不理想。本研究中考察了不同体积分数的甲醇/乙腈溶液和不同体积分数的甲醇/乙腈-0.1%甲酸溶液的提取效果,最终确定采用70%甲醇提取,同时结合QuEChERS法对样品进行净化,净化后过免疫亲和柱,有效去除了样品中大量辅料及各种杂质的干扰,且操作简便、回收满意。

3.2 流动相选择

分别考察了甲醇/乙腈-水、甲醇/乙腈-10 mmol/L 甲酸铵、甲醇/乙腈-10 mol/L 乙酸铵、甲醇/乙腈-0.1%甲酸在等度和梯度洗脱条件下的分离效果,结果乙腈-乙酸铵体系中4种黄曲霉毒素的分离效果和响应最好。故流动相选择乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱)。

3.3 样品含量测定结果分析

18批样品中有6批检出AFB₁,虽低于《中国药典》规定的5 μg/kg的限度,但检出率较高,有1家企业(C企业)检出率达100.00%,故山药丸受黄曲霉毒素污染的风险应引起监管部门重视。为分析山药丸中检出黄曲霉毒素的原因,对自购3批马钱子进行了黄曲霉毒素检测,结果有1批检出黄曲霉毒素,故山药丸中黄曲霉毒素的污染可能是使用了被污染的原药材。

3.4 方法评价

本研究建立的方法操作简便、灵敏度高、专属性强,可用于测定山药丸中AFB₁,AFB₂,AFG₁,AFG₂的含量,对提高山药丸的质量标准和用药安全有重要意义。

参考文献

- [1] 隋 鸣,孔丹丹,丁淑敏,等. 中药中外源性污染物的健康风险评估研究进展[J]. 中国中药杂志,2021,46(21):5593-5599.
- [2] 刘丽娜,李海亮,李耀磊,等. 中药真菌毒素质量控制概况、限量标准制定及有关问题的思考[J]. 中草药,2023,54(19):6197-6207.
- [3] 何 元,顾崇梅. HPLC-光化学衍生法测定滋阴清热降糖丸中的黄曲霉毒素[J]. 中兽医医药杂志,2022,41(6):60-63.
- [4] 睦世闰,曾肖寒,李凤标,等. 2018—2022年广西贵港市食用植物油中黄曲霉毒素B₁监测结果分析及暴露风险评估[J]. 中国油脂,2023,48(10):87-92.
- [5] 刘东升,刘志荣,姚世霞,等. UPLC-MS/MS测定健脾丸中的黄曲霉毒素G₂、G₁、B₂和B₁[J]. 分析仪器,2021(5):43-47.
- [6] 姜 涛,滕统华,韩松涛. HPLC法测定山药丸中士的宁和马钱子碱的含量[J]. 中国药品标准,2016,17(1):34-37.
- [7] 闵 曼,潘浣钰,李 丰. 中药中黄曲霉毒素检测技术的研究进展[J]. 广东化工,2021,48(5):223-224.
- [8] 冯 莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素B₁[J]. 现代畜牧科技,2018(8):20.
- [9] 南铁贵,洪小翔,徐昕怡,等. 中药黄曲霉毒素测定酶联免疫吸附法的研制[J]. 中国中药杂志,2020,45(17):4158-4162.
- [10] 李耀磊,刘丽娜,姚 云,等. 基于胶体金免疫层析技术对中药材中黄曲霉毒素B₁的定量检测研究[J]. 中国药学杂志,2019,54(17):1432-1437.
- [11] 马 彧,李正刚,程 焱,等. 超声萃取-免疫亲和柱净化-柱后光化学衍生高效液相色谱法同时测定蜂房药材中4种黄曲霉毒素[J]. 化学分析计量,2023,32(2):20-23.
- [12] 吴定芳,王 磊,戴佩珍,等. 高效液相色谱法测定茶叶中6种真菌毒素[J]. 分析仪器,2023(1):32-38.
- [13] 朱伟堃,井改革,赵蕊蕊,等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定红曲米中10种真菌毒素含量[J]. 中国药业,2023,32(3):89-93.
- [14] 王小乔,许晓辉,张虹艳,等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法快速测定婴幼儿奶粉中5种黄曲霉毒素含量[J]. 分析测试技术与仪器,2022,28(1):96-102.
- [15] 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.

(收稿日期:2023-12-22;修回日期:2024-06-15)