

UPLC-MS/MS 检测浙产延胡索中 4 种黄曲霉毒素

湛宇, 刘宇文, 张伟, 卢智玲*(杭州市食品药品检验研究院, 杭州 310017)

摘要:目的 建立延胡索中黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)超高效液相色谱-三重四级杆质谱检测方法。方法 以 Agilent Zorbax Eclipse C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)色谱柱分离, 在电喷雾离子源(ESI)正离子模式下电离, 多反应监测(MRM)模式下测定。结果 样品用 70%甲醇提取, 检测 20 批延胡索中的 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂。4 种 AF 质谱检测的线性范围宽, 相关性好, $r \geq 0.997$; 回收率 78.3%~93.7%; 重复性 RSD 为 1.5%~2.7%($n=6$)。结论 该方法专属性强, 灵敏度高, 重复性好, 适用于延胡索中 AF 的检测, 鉴于市场上延胡索饮片的 AF 风险较高, 建议中国药典增加延胡索的 AF 检测。

关键词: 延胡索; 超高效液相色谱-三重四级杆质谱; 黄曲霉毒素

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2019)20-2548-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.20.012

引用本文:湛宇, 刘宇文, 张伟, 等. UPLC-MS/MS 检测浙产延胡索中 4 种黄曲霉毒素[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(20): 2548-2551.

Determination of Four Kinds of Aflatoxin in Zhejiang Corydalis Rhizoma by UPLC-MS/MS

CHEN Yu, LIU Yuwen, ZHANG Wei, LU Zhiling*(Hangzhou Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310017, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of aflatoxin(AF) in Corydalis Rhizoma by UPLC-MS/MS. **METHODS** Agilent Zorbax Eclipse C₁₈(2.1 mm × 50 mm, 1.8 μm) column was used for separation. Detection was carried out by positive electrospray ionization(ESI) mass spectrometer in multiple reaction monitor(MRM) mode. **RESULTS** Twenty samples were extracted with 70% methanol solution and AFB₁, AFB₂, AFG₁ and AFG₂ were detected. All the 4 kinds of aflatoxin compounds showed good linearity in their reasonable ranges, $r \geq 0.997$. The average recoveries of all the compounds were in range of 78.3%–93.7%, the RSD were 1.5%–2.7%($n=6$). **CONCLUSION** The method is specific, sensitive and reproducible which is suitable for the detection of AF in Corydalis Rhizoma. In view of the risk of AF which exists in the market of Corydalis Rhizoma, suggested the addition of the quality examination method in Chinese Pharmacopoeia.

KEYWORDS: Corydalis Rhizoma; UPLC-MS/MS; aflatoxin

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)主要是由真菌黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*A.parasiticus*)产生的毒性次生代谢产物, 其中较为常见的 AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 为 AF 系剧毒物质, 其中以 AFB₁ 的毒性最大, 分布最广, 其毒性是氰化钾的 10 倍, 对肝脏有明显的损伤, 能诱发原发性肝癌。

AF 具有强致癌和致畸性。目前被世界卫生组织的癌症研究机构定为 I 类致癌物^[1-3], 鉴于 AF 的严重危害性, 中国药典 2015 年版一部对 19 种中药材的 AF 作了相关规定: AFB₁ 的限量规定为 $\leq 5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂ 的总量规定为 $\leq 10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[4]。

延胡索为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎。延胡索是常用理气止痛药, 具活血化瘀、行气止痛功效, 临床常用于胸胁、脘腹疼痛、经闭痛经、产后淤阻、

跌打肿痛等症, 延胡索主产于浙江, 是“浙八味”之一^[5]。但其采收和加工在 5~6 月份, 梅雨气候环境适宜黄曲霉的生长, 极有可能感染霉菌并产生 AF, 进而对消费者的身体健康造成危害, 本研究根据中国药典 2015 年版四部 AF 测定法的第二法^[6]测定浙产延胡索中 4 种 AF 的含量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱-串联四级杆质谱联用仪(配 LC-20AD 高效液相色谱仪、LCMS-8050 串联四级杆质谱仪, 日本岛津公司); 四方匀浆均质器(中国铁道部电化院四方电器设备厂); CF16RX II 离心机(日本日立公司); KQ-600DV 台式数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); XS105 十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); Mili-Q 去离子水发生器(美国 Milipore 公司)。

基金项目: 杭州市农业与社会发展科研自主申报项目(20191203B71)

作者简介: 湛宇, 女, 硕士, 主管中药师 Tel: (0571)85463891
主任中药师 Tel: (0571)85463890 E-mail: luzl@163.com

E-mail: 15867187209@163.com *通信作者: 卢智玲, 女, 博士,

1.2 试剂

AFB1、AFB2、AFG1、AFG2 混合对照品溶液(中国食品药品检定研究院, 批号: 610001-201602, 标示浓度依次为 1.02, 0.43, 1.06, 0.38 mg·L⁻¹); AF 免疫亲和柱(Pribolab 公司, 批号: 171117); 乙腈和甲醇为色谱纯(德国 Merck 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 药材

延胡索 20 批样品(批次: S1~S20), 均购于医院、药店、饮片厂等, 且均经杭州市食品药品检验研究院中药室刘宇文副主任中药师鉴定为正品。样品信息详见表 1。

表 1 收集的延胡索样品

Tab. 1 Collection samples of Corydalis Rhizoma

编号	规格	批号	产地	外观
S1	延胡索	180201	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S2	延胡索	180201	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S3	延胡索	170701	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S4	延胡索	170920	浙江新昌	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S5	延胡索	171011	浙江新昌	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S6	延胡索	170101	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S7	延胡索	160301	浙江新昌	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S8	延胡索	160708	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S9	延胡索	170605	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S10	醋延胡索	170912	浙江新昌	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S11	醋延胡索	180108	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S12	醋延胡索	171122T	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S13	醋延胡索	171202	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S14	醋延胡索	180203A	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S15	醋延胡索	171218	浙江新昌	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S16	醋延胡索	160418	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S17	醋延胡索	171014	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S18	醋延胡索	170501	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S19	醋延胡索	170602	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味
S20	醋延胡索	170423	浙江磐安	符合药典性状描述, 未见霉斑异味

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent Zorbax Eclipse C₁₈(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm); 柱温: 25 °C; 流动相: 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(A)-甲醇(B), 梯度洗脱, 0~4.5 min, 65%→15%A; 4.5~6 min, 15%→0A; 6~6.5 min, 0→65%A; 6.5~10 min, 65%A; 流速 0.3 mL·min⁻¹。

2.2 质谱条件

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 正离子检测方式; 多反应检测(MRM 模式); 离子源电压: 4 kV;

雾化器流速: 8 L·min⁻¹; 接口温度: 300 °C; DL 温度: 150 °C; 加热模块温度: 250 °C; 干燥器流速: 10 L·min⁻¹; 质量轴自动调谐校正; 4 种 AF 其他质谱分析参数详见表 2。

表 2 4 种 AF 的质谱分析参数

Tab. 2 Mass spectrometric analysis parameters of four AF

组分	监测离子对 <i>m/z</i>	Q1/V	碰撞能量/eV	Q3/V
AFB1	313.1>241.0	15.0	37.0	17.0
	313.1>285.1	15.0	23.0	19.0
AFB2	315.1>259.1	12.0	30.0	18.0
	315.1>287.1	14.0	25.0	21.0
AFG1	329.1>243.1	12.0	27.0	17.0
	329.1>311.1	12.0	23.0	22.0
AFG2	331.1>313.1	10.0	24.0	12.0
	331.1>245.1	12.0	29.0	22.0

2.3 溶液准备

2.3.1 混合对照品溶液的制备 精密量取 AF 混合对照品 1.0 mL, 置 20 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 过 0.22 μm 膜, 即得。

2.3.2 供试品溶液的制备 取上述样品粉末约 15 g(过二号筛), 精密称定, 加入氯化钠 3 g, 置于匀浆均质器中, 精密加入 70% 甲醇溶液 75 mL, 高速搅拌 2 min(搅拌速度>11 000 r·min⁻¹), 离心 5 min(离心速度 2 500 r·min⁻¹), 精密量取上清液 15 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 量取续滤液 20.0 mL, 采用固相萃取装置, 通过免疫亲和柱, 流速 3 mL·min⁻¹, 用水 20 mL 洗脱, 洗脱液弃去, 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, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 过 0.22 μm 膜, 即得。

2.3.3 空白对照溶液的制备 以甲醇为空白对照溶液。

3 结果

3.1 系统适用性试验

在“2.2”项质谱条件下, 精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液 5 μL 注入 LC-MS/MS, 4 种 AF 的总离子流图见图 1。

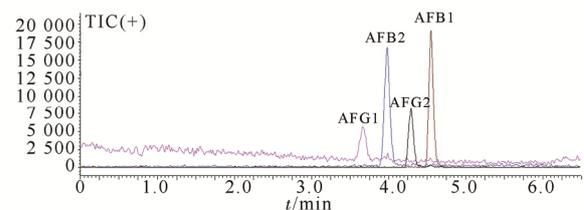


图 1 AF 总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of AF

3.2 线性关系考察

精密吸取“2.3.1”项下混合对照品溶液 0.05, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mL 至 25 mL 量瓶中, 加流动相稀释定容, 制成 AFB1 浓度为 0.102, 1.02, 2.04, 5.10, 10.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; AFB2 浓度为 0.043, 0.43, 0.86, 2.15, 4.30 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; AFG1 浓度为 0.106, 1.06, 2.12, 5.30, 10.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; AFG2 浓度为 0.038, 0.38, 0.76, 1.90, 3.80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分别进样 5 μL , 注入 LC-MS/MS, 测定峰面积, 以谱峰峰面积为纵坐标, 进样浓度为横坐标, 绘制标准曲线。取 S2 样品(检测结果为阴性)10 g, 加入适当稀释的混合对照品溶液, 按法制备供试品溶液, 以信噪比为 3 和 10 的浓度分别作为 4 种 AF 的检测限(LOD)与定量限(LOQ), 结果见表 3。

表 3 线性关系、检测限及定量限

Tab. 3 Linear relation, LOD and LOQ

组分	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	线性方程	<i>r</i>	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
AFB1	0.102~10.2	$y=13\ 480x+2\ 431.6$	0.998 3	0.06	0.20
AFB2	0.043~4.30	$y=18\ 599x+17.246$	0.999 3	0.10	0.30
AFG1	0.106~10.6	$y=16\ 021x+3\ 485.7$	0.997 9	0.03	0.15
AFG2	0.038~3.80	$y=9\ 977.3x+203.49$	0.998 8	0.08	0.25

3.3 重复性试验

取 S2 样品(检测结果为阴性), 加入适当稀释的混合对照品溶液, 使样品中各组分最终浓度: AFB1、AFG1 为 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, AFB2、AFG2 为 4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 按“2.3.2”项下方法重复制备 6 份, 测定 4 种 AF 的含量, RSD 分别为 2.1%, 1.8%, 1.5%, 2.7%, 说明重复性良好。

3.4 加标回收率试验

取 S2 样品(检测结果为阴性), 每份称取样品 15 g, 分别加入适量混合对照品溶液, 使供试品溶液最终加样量分别为低、中、高 3 种(其中 AFB1、AFG1 分别约为 2, 5, 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, AFB2、AFG2 分别约为 0.8, 2, 4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$), 平行 3 份, 按样品制备方法制备供试品溶液, 检测含量, 计算回收率, 结果见表 4。

3.5 样品检测

根据定量监测离子对的离子流图中谱峰峰面积外标法计算样品中 4 种 AF 的含量。结果见图 2~4, 表 5。

结果表明, 20 批延胡索样品中有 9 批样品检出。AFB1 的检出范围为 4~98 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 4 种 AF 总量的检出范围为 4~102 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

表 4 加标回收率($n=3$)

Tab. 4 Results of precision($n=3$)

组分	对照品含量/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得量/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
AFB1	2.04	1.68	82.4	5.1
	5.10	4.44	87.1	
	10.2	9.44	92.5	
AFB2	0.86	0.67	77.9	6.2
	2.15	1.86	86.5	
	4.30	3.88	90.2	
AFG1	2.12	1.84	86.8	3.4
	5.30	4.76	89.8	
	10.6	9.93	93.7	
AFG2	0.76	0.61	80.3	5.7
	1.90	1.59	83.7	
	3.80	3.46	91.1	

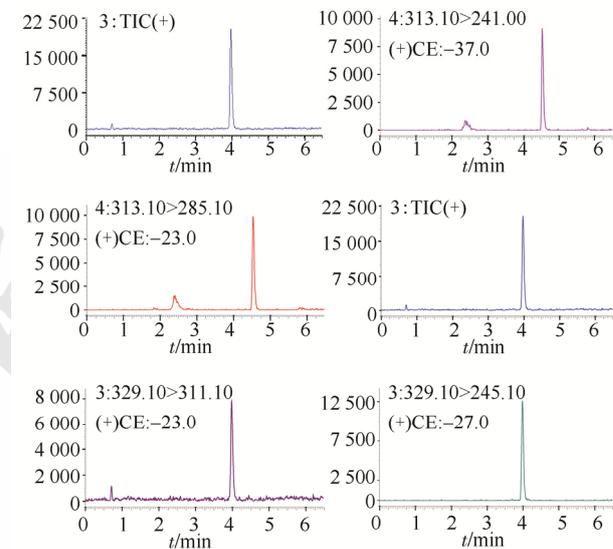


图 2 阳性样品总离子流图和监测离子对提取图

Fig. 2 Total ion chromatograms and monitoring ion chromatograms in positive sample

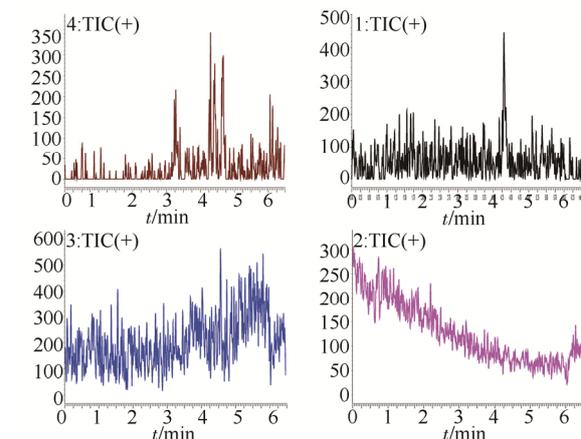


图 3 未检出样品的 4 种 AF 总离子流图

Fig. 3 Total ion flow diagram of four AF species in negative sample

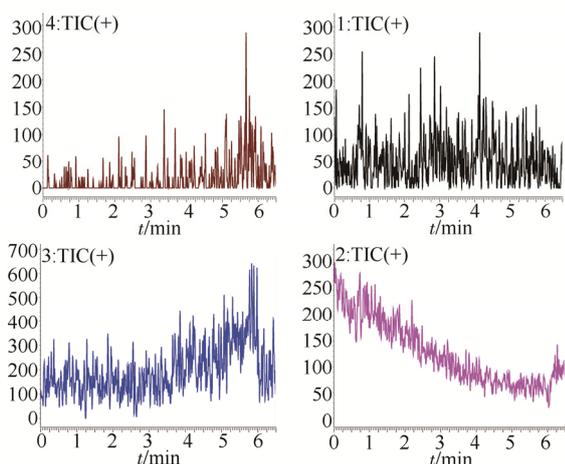


图4 空白对照溶液的4种AF总离子流图
Fig. 4 Total ion flow charts of four AF species in blank

表5 样品中4种AF含量

Tab. 5 Content of four AF in samples

编号	规格	批号	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	
			AFB1	总量
S1	延胡索	180201	98	102
S2	延胡索	180201	未检出	未检出
S3	延胡索	170701	8	9
S4	延胡索	170920	未检出	未检出
S5	延胡索	171011	未检出	未检出
S6	延胡索	170101	未检出	未检出
S7	延胡索	160301	未检出	未检出
S8	延胡索	160708	4	5
S9	延胡索	170605	未检出	未检出
S10	醋延胡索	170912	未检出	未检出
S11	醋延胡索	180108	75	78
S12	醋延胡索	171122T	4	4
S13	醋延胡索	171202	未检出	未检出
S14	醋延胡索	180203A	未检出	未检出
S15	醋延胡索	171218	71	73
S16	醋延胡索	160418	25	25
S17	醋延胡索	171014	13	14
S18	醋延胡索	170501	未检出	未检出
S19	醋延胡索	170602	未检出	未检出
S20	醋延胡索	170423	12	12

参照中国药典2015年版AF规定,有7批样品的AFB1超过限量,6批样品AF总量超过限量,而1号,11号,15号样品超出限度的10倍以上。

4 讨论

本实验过程中发现4种AF回收率均符合中国药典2015年版四部9101药品质量标准分析方法验证分析的要求,但低浓度的回收率较低,加入对照品含量为 $0.76\sim 2.12\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,回收率为77.9%~86.8%,分析其原因可能有点:①加标浓度较低,前处理存在一定的损失,结果有一定偏差。②样品本身成分复杂,对待测组分的响应有一定的影响。后续考虑对造成回收率低的因素将进行系统考察。

笔者对上述20批次样品同时采用HPLC及LC-MS来检测AF,结果发现有3批次假阳性结果。

为综合比较AF对延胡索质量的影响,笔者同时按药典标准做了延胡索乙素含量测定项目。以上20批样品均合格,说明AF对于样品含量的影响不大。

5 结论

本实验建立了延胡索中4种AF的定性定量检测方法,简捷快速,灵敏度高,抗干扰能力强,可满足实际样品检测的需要。

这20批药材的产地均为浙江,咨询饮片企业,大多来源于磐安和新昌,从批号来看,往往4~5月和10—12月的延胡索检出率较高,分析其原因:①采收加工多在4—6月,由于气候条件较为湿热,外观、气味均无明显异常,但从上述检测结果来看,如若不及时采挖和加工,会增加AF产生的风险。②10—12月的延胡索AF的产生可能是由于贮藏条件不好所致。

综上所述,市场上延胡索的AF检出比率较高,存在一定的风险,现行中国药典2015年版中延胡索的标准中无控制AF的项目,笔者认为有必要增加该检查项目,现在有AF快速检测技术,下一步课题组将利用该技术在产地采挖和加工、储存过程中进行筛查并指导农户如何预防,有效控制延胡索质量,预防AF的产生。

相对日常采用荧光检测器来检测AF,本方法可以避免检测结果假阳性,为后续的监管提供了有力的技术支持。

REFERENCES

- [1] CHEN J M, ZHANG X H, YANG M H, et al. Recent advances in the determination methods of aflatoxins [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2005, 30(24): 1890-1894.
- [2] YANG M H. Research progress in fungi and mycotoxin infection of medicinal plants and their products [J]. *Guizhou Agric Sci*(贵州农业科学), 2008, 36(6): 59-63.
- [3] ZHENG R S, XU H, WANG E L, et al. Determination of aflatoxin B1, B2, G1, G2 in *Armeniaca Semen Amarum* by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2013, 38(20): 3534-3535.
- [4] 中国药典. 一部[S]. 2015: 139.
- [5] WU J G, XIN Z S. Textual research on the source of *yanhusuo* (*Corydalis spp.*) [J]. *Bull Chin Mater Med*(中药通报), 1987, 12(12): 9-12, 57.
- [6] 中国药典. 四部[S]. 2015: 224.

收稿日期: 2019-01-07
(本文责编: 李艳芳)