

超高效液相色谱—串联质谱检测猪胆粉中黄曲霉毒素的 2 种前处理方法比较研究

廖予菲, 王 萍, 张瑞瑞, 程茜菲

(陕西国际商贸学院, 陕西 咸阳 712046)

摘要:以中医药传统药物猪胆粉作为研究对象,采用 UPLC-MS/MS(超高效液相色谱—串联质谱)作为测定方法,分别通过免疫亲和柱法及 QuEChERS(Quick、Easy、Cheap、Effective、Rugged、Safe)法进行样品前处理,通过考察方法的稳定性、重复性、回收率、检测限,对两种前处理方法进行评价。结果表明两种前处理方法所制样品中杂质对四种黄曲霉毒素峰均无干扰,能专属的测定黄曲霉毒素,免疫亲和柱法处理效果更佳,杂质较少。两种方法对黄曲霉毒素 G 族回收率结果无显著性差异,对黄曲霉毒素 B 族则 QuEChERS 法回收率更高。重复性、检测限对比结果,免疫亲和柱法优于 QuEChERS 法。因此两种前处理方法各有优劣,但整体而言,从操作简便,节约成本的角度来讲,QuEChERS 法更优。此研究可为快速高效测定中药中的黄曲霉毒素提供思路,准确快速检验国药,对于“三农”中家畜猪的养殖,充分利用家畜副产品具有重要意义。

关键词:黄曲霉毒素;猪胆粉;免疫亲和柱法;样品前处理技术

中图分类号:R917 **文献标识码:**A **文章编号:**0488-5368(2022)08-0029-06

Comparison of Two Pretreatment Methods for Determination of Aflatoxin in Suis Fellis Pulvis by UPLC-MS/MS

LIAO Yufei, WANG Ping, ZHANG Ruirui, CHENG Qianfei

(Shaanxi Institute of International Trade & Commerce, Xi'an, Shaanxi 712046 China)

Abstract: Comparison of two commonly used pretreatment methods for the determination of aflatoxin. The traditional Chinese medicine Suis Fellis Pulvis p was used as the research object, and UPLC-MS / MS was used as the determination method. The samples were pretreated by immunoaffinity column method and QuEChERS method, respectively. The stability, repeatability, recovery rate and detection limit of the two methods were evaluated. The results showed that the impurities in the samples prepared by the two pretreatment methods had no interference on the four aflatoxin peaks, and could be used to determine aflatoxin exclusively. The immunoaffinity column method had better effect and less impurities. There was no significant difference in the recovery rate of aflatoxin group G between the two methods, but the recovery rate of QuEChERS method was higher for aflatoxin group B. The results of repeatability and detection limit showed that immunoaffinity column method was better than QuEChERS method. The two pretreatment methods had their own advantages and disadvantages, but on the whole, QuEChERS method was better in terms of simple operation and cost saving. This study can provide a reference for the rapid and efficient determination of aflatoxin in traditional Chinese medicine, accurate and rapid detection of traditional Chinese medicine, which is of great significance for the breeding of livestock and pigs and full use of livestock by-products.

Key words: Aflatoxin; Suis Fellis Pulvis; Immune affinity column method; Sample pretreatment technology

收稿日期:2021-05-13 修回日期:2021-06-15

基金项目:陕西省教育厅科研计划项目(地标药材猪胆膏与国标药材猪胆粉的质量一致性评价 编号:21JK0520)。

第一作者简介:廖予菲(1985-),女,陕西咸阳人,硕士,实验师,研究方向为中药成分分析。

黄曲霉毒素(Aflatoxins, AFs)是一类结构类似的真菌(黄曲霉 *Aspergillus flavus* 和寄生曲霉 *A. parasiticus* 等)代谢产物,目前发现的 20 余种黄曲霉毒素中毒性较强主要有 B₁、B₂、G₁、G₂ 等^[1]。黄曲霉毒素具有致癌、致畸、致突变作用,可导致动物全身性损害,其中黄曲霉毒素 B₁ 被联合国确定为 I 类致癌物^[2]。传统中药材储存运输中极易发生霉变,滋生黄曲霉毒素,其中以种子果实类为最。现行的 2020 版《中国药典》规定 24 种中药材应检测黄曲霉毒素,相对 2015 版《中国药典》增加了土鳖虫、延胡索等 5 个品种。本文研究对象猪胆粉是中医药传统药物,来源于猪胆汁的干燥品,虽未纳入中国药典规定应检测的药材品种,但其生产加工过程较易产生黄曲霉毒素,同样值得关注。

现行中国药典规定的黄曲霉毒素检测方法包括 HPLC-FLD(高效液相色谱-荧光检测法)、UPLC-MS/MS、ELISA(酶联免疫法)。因黄曲霉毒素为痕量检测,中药往往基质复杂,易出现假阳性结果^[3]。较其他两种方法,UPLC-MS/MS 法灵敏度高、专属性强,能有效排除强干扰基质影响,适用于中药黄曲霉毒素的检测^[4]。

药典中与色谱法配套的样品前处理方法为免疫亲和柱法,该方法利用高度专一性的抗体与黄曲霉毒素产生特异性结合,从而达到有效分离干扰物质的作用,净化效果较好,但该方法操作步骤多,成本较高,较难实现快速高效检测中药中黄曲霉毒素。QuEChERS 法是一种快速高效的样品前处理方法,近年来,在以农药残留量检测为代表的中药外源性污染物检测领域该方法得到了广泛应用,中国药典 2020 版中将该方法作为禁用农药残留测定的前处理方法之一,也有部分学者将其应用于中药黄曲霉毒素检测中^[5]。

笔者对比了免疫亲和柱法及 QuEChERS 法两种样品前处理方法,以期快速高效测定中药中的黄曲霉毒素提供思路。此外,准确快速检验国

药,对于“三农”中家畜猪的养殖,充分利用家畜副产品具有重要意义。

1 仪器与材料

1.1 实验仪器

Acquity UPLC H-Class XEVO TQD 超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(Waters 科技有限公司);TE124S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);PriboFast 固相萃取装置(普瑞邦科技有限公司);HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

1.2 实验材料

黄曲霉毒素混合对照品溶液(Bepure,批号 D0017654),其中黄曲霉毒素 G₂ 浓度为 0.3 μg/mL;黄曲霉毒素 G₁ 浓度为 1.0 μg/mL;黄曲霉毒素 B₂ 浓度为 0.3 μg/mL;黄曲霉毒素 B₁ 浓度为 1.0 μg/mL。

免疫亲和柱(美国 Romer Labs);QuEChERS dSPE 样品萃取净化管(岛津制作所),甲醇、乙腈(美国 Fisher 公司,色谱纯)、乙酸铵(德国 Merck 公司,色谱纯)、氯化钠(国药集团化学试剂有限公司,优级纯)。猪胆粉(批号:Y₁-190102, Y₁-190103,福建省仙游县南丰生化有限公司),由陕西国际商贸学院王萍副教授鉴定为猪科动物猪 *Sus scrofa domestica* Brisson. 胆汁的干燥品,其中经前期检测 Y₁-190102 未检出黄曲霉毒素污染,可作为阴性空白, Y₁-190103 检出黄曲霉毒素 B₂。

2 实验过程

2.1 质谱条件

离子源模式(ESI 源):正电离模式;扫描方式为多反应离子监测(MRM);离子源温度:150 ℃;毛细管电压:0.5 KV;脱溶剂气温度:450 ℃;脱溶剂气流速:900 L/Hr;锥孔气流速:30 L/Hr。质谱采集参数信息见表 1。

表 1 质谱采集参数信息

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
黄曲霉毒素 G ₂	313.1	313.1*	55	25
		245.1		30
黄曲霉毒素 G ₁	329.1	243.1*	55	25
		311.1		20
黄曲霉毒素 B ₂	315.1	259.1	55	30
		287.1*		25
黄曲霉毒素 B ₁	313.1	241.1*	55	35
		285.1		25

* 定量离子

2.2 色谱条件

色谱柱:waters ACQUITY UPLC C₁₈ (2.1×100 mm,1.7 μm);柱温:40 °C;流速:0.3 mL/min;进样体积:2 μL。以10 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相 A,以甲醇为流动相 B,按表 2 中的规定进行梯度洗脱。

表 2 液相色谱梯度条件

时间(min)	流动相 A	流动相 B
0~4.5	65→15	35→85
4.5~6	15→0	85→100
6~6.5	0→65	100→35
6.5~10	65	35

2.3 对照品溶液配制

精密吸取 1 mL 黄曲霉毒素混合对照品溶液,加 70% 甲醇定容于 10 mL 量瓶,制备成黄曲霉毒素 G₂ 浓度为 29.55 ng/mL、黄曲霉毒素 G₁ 浓度为 99.50 ng/mL、黄曲霉毒素 B₂ 浓度为 29.70 ng/mL、黄曲霉毒素 B₁ 浓度为 99.80 ng/mL 的混合对照品储备溶液。

移取上述混合对照品储备溶液适量,加 70% 甲醇稀释得黄曲霉毒素 G₂ 浓度分别为 0.06、0.15、0.30、0.59、1.48、2.36、2.96 ng/mL,黄曲霉毒素 G₁ 浓度分别为 0.20、0.50、1.00、1.99、4.98、7.96、9.95 ng/mL,黄曲霉毒素 B₂ 浓度分别为 0.06、0.15、0.30、0.59、1.49、2.38、2.97 ng/mL,黄曲霉毒素 B₁ 浓度分别为 0.20、0.50、1.00、2.00、4.99、7.98、9.98 ng/mL 的 1-7 号标准系列工作溶液。

2.4 样品前处理

2.4.1 免疫亲和柱法 取供试品粉末约 2 g,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 min(搅拌速度大于 11 000 r/min),离心 5 min(离心速度 4 000 r/min),精密量取上清液 15 mL,置 50 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,离心 10 min(离心速度 4 000 r/min),精密量取上清液 20 mL,通过免疫亲和柱,流速每分钟 3 mL,用淋洗缓冲液 10 mL 洗脱,再用水 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。

2.4.2 QuEChERS 法 取供试品粉末 2 g,精密称定,置 50 mL 离心管中,加入乙腈 20 mL,涡旋 1 min,超声 10 min,离心 5 min(离心速率 10 000 r/min),取上清液,倒入 QuEChERS dSPE 净化管,充分涡旋振荡 2 min,离心 5 min(离心速率 5 000 r/min),取上清液 1 mL 用 50 °C 氮气吹干,快速加入甲醇 1 mL,过微孔滤膜(0.22 μm),取滤液,即得。

2.5 测定法

按“2.2”项下色谱条件,分别精密吸取“2.3”项下对照品溶液和“2.4”项下两种前处理方法所制供试品溶液注入液相色谱仪,测得色谱图见图 1、图 2。

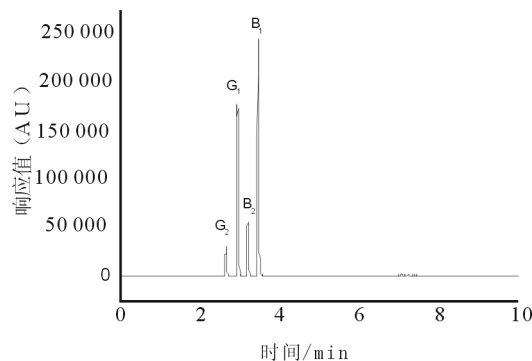


图 1 黄曲霉毒素混合对照品总离子流

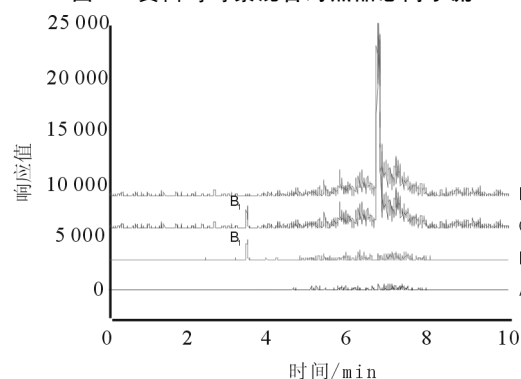


图 2 猪胆粉供试品总离子流

(B:免疫亲和柱法制备阳性猪胆粉样品;
C:免疫亲和柱法制备猪胆粉样品;
D:QuEChERS 制备猪胆粉样品;
E:QuEChERS 法制备阴性猪胆粉样品)

2.6 线性关系

精密吸取“2.3 项”下标准系列工作溶液各浓度 2 μL 分别注入高效液相色谱—串联质谱仪,每个浓度重复测定 2 次,以峰面积为纵坐标,进样浓度为横坐标,绘制标准曲线,结果如表 3 所示。

表 3 标准曲线回归方程

化合物	浓度范围 (ng/mL)	回归方程	相关系数/r
黄曲霉毒素 G ₂	0.06~2.96	y=596.421x-12.7079	0.9991
黄曲霉毒素 G ₁	0.20~9.95	y=788.326x-37.0307	0.9994
黄曲霉毒素 B ₂	0.06~2.97	y=1091.84x-14.9448	0.9990
黄曲霉毒素 B ₁	0.20~9.98	y=1138.45x-41.4516	0.9995

结果表明黄曲霉毒素 G₂ 在 0.06~2.96

ng/mL、黄曲霉毒素 G₁ 在 0.20~9.95 ng/mL、黄

曲霉毒素 B₂ 在 0.06~2.97 ng/mL、黄曲霉毒素 B₁ 在 0.20~9.98 ng/mL 浓度范围内相关系数 $r > 0.999$, 浓度与峰面积呈良好线性关系, 可用于标准曲线法定量。

2.7 重复性对比研究

取批号为 Y₁-191013 的供试品分别按照“2.4”项下两种前处理方法各制备 6 份样品, 每份重复测定 2 次, 按标准曲线法计算出样品中黄曲霉

毒素 B₂ 含量, 结果显示免疫亲和柱法 RSD 为 3.9%、QuEChERS 法 RSD 值为 2.7%。

2.8 回收率对比研究

2.8.1 免疫亲和柱法 取批号为 Y₁-191013 的供试品粉末, 精密称定 9 份, 分别按表 4 加入高、中、低浓度的“2.3”项下混合对照品储备溶液各三份, 按“2.4.1”项下的方法制备, 每份重复测定 2 次。

表 4 免疫亲和柱法加标回收率结果

化合物	梯度	称样量 /g	测得量 /ng	本底值 /mg	加入量 /ng	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD
黄曲霉毒素 G ₂	低	2.0 022	2.711			91.59		
		2.0 037	2.711		2.96	91.59	91.59	0.00
		2.0 050	2.711			91.59		
	中	2.0 012	5.416			91.49		
		2.0 003	5.467	0	5.92	92.35	91.63	0.72
		2.0 033	5.390			91.05		
	高	2.0 023	7.384			83.15		
		2.0 024	7.358		8.88	82.86	82.67	0.74
		2.0 037	7.280			81.98		
黄曲霉毒素 G ₁	低	2.0 022	9.931			99.81		
		2.0 037	10.285		9.95	103.37	102.01	1.89
		2.0 050	10.235			102.86		
	中	2.0 012	19.789			99.44		
		2.0 003	19.943	0	19.90	100.22	99.61	0.54
		2.0 033	19.738			99.19		
	高	2.0 023	23.998			80.40		
		2.0 024	23.920		29.85	80.13	79.38	1.94
		2.0 037	23.166			77.61		
黄曲霉毒素 B ₂	低	2.0 022	2.761			92.96		
		2.0 037	2.837		2.97	95.52	93.25	2.29
		2.0 050	2.711			91.28		
	中	2.0 012	5.518			92.90		
		2.0 003	5.544	0	5.94	93.33	92.32	1.50
		2.0 033	5.390			90.74		
	高	2.0 023	8.268			92.79		
		2.0 024	8.398		8.91	94.25	92.50	2.07
		2.0 037	8.060			90.46		
黄曲霉毒素 B ₁	低	2.0 022	28.095			91.90		
		2.0 037	28.272		9.98	93.68	92.66	0.99
		2.0 050	28.145			92.40		
	中	2.0 012	35.215			81.62		
		2.0 003	35.882	18.923	19.96	84.96	82.82	2.25
		2.0 033	35.266			81.88		
	高	2.0 023	42.536			78.87		
		2.0 024	43.186		29.94	81.04	79.65	1.51
		2.0 037	42.588			79.04		

2.8.2 QuEChERS 法 取批号为 Y₁-191013 的

供试品粉末, 精密称定 9 份, 分别按表 5 加入高、中、

低浓度的“2.3”项下混合对照品储备溶液各三份,按“2.4.2”项下的方法制备,每份重复测定2次。

表5 QuEChERSF法加标回收率结果

化合物	梯度	称样量 /g	测得量 /ng	本底值 /mg	加入量 /ng	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD
黄曲霉毒素 G ₂	低	2.0 038	2.613			88.28		
		2.0 020	2.594		2.96	87.64	88.82	1.72
		2.0 016	2.680			90.54		
	中	2.0018	5.616			94.86		
		2.0 027	5.667	0	5.92	95.73	96.13	1.57
		2.0 024	5.790			97.80		
	高	2.0 041	7.384			83.15		
		2.0 035	7.150		8.88	80.52	81.10	2.25
		2.0 030	7.072			79.64		
黄曲霉毒素 G ₁	低	2.0 038	9.931			99.81		
		2.0 020	10.285		9.95	103.37	102.01	1.89
		2.0 016	10.235			102.86		
	中	2.0018	19.789			99.44		
		2.0 027	19.943	0	19.90		100.22	100.65
		2.0 024	20.355			102.29		
	高	2.0 041	25.908			86.79		
		2.0 035	25.920		29.85	86.83	86.70	0.22
		2.0 030	25.816			86.49		
黄曲霉毒素 B ₂	低	2.0 038	3.057			102.93		
		2.0 020	3.009		2.97	101.31	102.38	0.90
		2.0 016	3.056			102.90		
	中	2.0018	5.606			94.38		
		2.0 027	5.544	0	5.94	93.33	94.83	1.87
		2.0 024	5.749			96.78		
	高	2.0 041	8.636			96.92		
		2.0 035	8.632		8.91	96.88	97.00	0.18
		2.0 030	8.660			97.19		
黄曲霉毒素 B ₁	低	2.0 038	28.397			94.93		
		2.0 020	28.305		9.98	94.01	95.32	1.62
		2.0 016	28.605			97.01		
	中	2.0018	38.157			19.96		
		2.0 027	38.281	18.923	19.96	96.98	96.36	96.90
		2.0 024	38.352			97.34		
	高	2.0 041	47.968			97.01		
		2.0 035	47.271		29.94	94.68	95.96	1.23
		2.0 030	47.718			96.18		

2.9 检测限对比研究

取批号为 Y1-190102 的供试品粉末,通过比较低浓度分析物样品与空白样品测量的信号,依据信噪比为 3:1 对应的最低浓度为检出限的规定,倍比稀释相应浓度的对照品溶液加入供试品,分别按照“2.4”项下两种前处理方法各制备 3 份样品,分

析可知,免疫亲和柱法检测限为黄曲霉毒素 G₂: 0.0 294 μg/kg,黄曲霉毒素 G₁: 0.0 988 μg/kg,黄曲霉毒素 B₂: 0.0 212 μg/kg,黄曲霉毒素 B₁: 0.0 888 μg/kg;QuEChERS 法检测限为黄曲霉毒素 G₂: 0.0 344 μg/kg,黄曲霉毒素 G₁: 0.1 256 μg/kg,黄曲霉毒素 B₂: 0.0 279 μg/kg,黄曲霉毒

素 B₁: 0.1 162 μg/kg。

3 结果与讨论

3.1 前处理方法对比研究结果

两种前处理方法所制样品中杂质对四种黄曲霉毒素峰均无干扰,能专属的测定黄曲霉毒素,相

表 6 两种前处理方法回收率结果比较

组别	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
免疫亲和柱法	88.68±6.65	93.67±10.84	92.69±1.64	85.04±5.99
QuEChERS 法	88.63±4.50	96.46±7.43	98.07±3.51	96.06±1.21
P	>0.05	>0.05	<0.05	<0.05

两种方法对黄曲霉毒素 G 族回收率结果无显著性差异,对黄曲霉毒素 B 族则 QuEChERS 法回收率更高,该方法操作简单,步骤少,能相应减少样品处理过程中分析对象的损失。重复性、检测限对比实验结果,免疫亲和柱法则略优于 QuEChERS 法。整体来看,两种方法均能专属、快速、灵敏、准确的实现样品处理分析,均可作为猪胆粉黄曲霉毒素测定的前处理方法,但综合经济成分和时间成本分析,QuEChERS 成本低、操作方便、回收率高、污染小,更符合“绿色化学”的理念^[6]。

3.2 提取方法考察

好的提取方法能够充分提出待测组分,有利于后续的分选纯化,对于黄曲霉毒素这种痕量污染物提取方法的优劣直接影响分析结果。实验分别对高速均质法和超声提取法进行了考察,发现对免疫亲和柱处理的样品,超声提取法效果不如高速均质法,而 QuEChERS 法两者差异不大,因此在免疫亲和柱处理前选择了高速均质法,QuEChERS 法则出于方便考虑选择涡旋后超声处理样品。

3.3 中药猪胆粉黄曲霉毒素污染情况

实验对不同厂家生产的 15 批次猪胆粉药材进行了黄曲霉毒素的测定,结果显示 6 批次有黄曲霉毒素检出,虽均未超过中国药典对黄曲霉毒素设定的限量:黄曲霉毒素 B₁ 不得超过 5 μg/kg,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 的总量不得超过 10 μg/kg^[7]。作为动物来源药材,猪胆粉虽未作为《中国药典》2020 年版中规定测定黄曲霉毒素的品种,其生产加工过程中易产生黄曲霉毒素污染,药品的安全值得我们关注。

4 结论

实验以中药猪胆粉作为研究对象,采用 UPLC

对而言,免疫亲和柱法处理效果更佳,杂质较少,这与该方法能特异性结合黄曲霉毒素有关。

回收率对比实验结果采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学处理。计量资料采用均数±标准差表示。数据均采用独立样本 t 检验, P ≤ 0.05 认为有显著性差异。分析结果见表 6。

—MS/MS 作为测定方法,分别通过免疫亲和柱法及 QuEChERS 法进行样品前处理,通过考察方法的稳定性、重复性、回收率、检测限,对两种前处理方法进行评价,结果表明两种前处理方法各有优劣,但整体而言,从操作简便,节约成本的角度来讲,QuEChERS 法更优。该方法可考虑进一步推广到其他药材及中成药黄曲霉毒素检测中,但中药往往基质复杂,基质对痕量物质检测结果影响较大,QuEChERS 法在黄曲霉毒素测定中是否具有普适性,仍需实验验证。

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(02): 296-300.
- [2] 李榆梅. 真菌的有毒次级代谢产物—黄曲霉毒素[J]. 山西食品工业, 1997(02): 28-30.
- [3] 郑荣, 毛丹, 王柯, 等. 柱后衍生—高效液相色谱法测定酸枣仁中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(01): 36-37+146.
- [4] 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(07): 1272-1278.
- [5] 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中的黄曲霉毒素[J]. 中国药业, 2020, 29(11): 44-47.
- [6] 叶学敏. 新型 QuEChERS 方法在果蔬农残分析中的应用研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2020.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[S]. 北京: 化学工业出版社, 2020: 127.