

6种动物类药材中黄曲霉毒素污染的液质联用检测

罗朝权, 张敏玲, 郑润生, 蔡晓吟, 徐晖*, 贡小芸, 覃嘉良

(广州中医药大学 中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广州 510006)

[摘要] **目的:**建立一种快速检测动物类药材污染黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 和黄曲霉毒素 G₁ (AFG₁) 的液质联用方法,并用于水蛭等6种动物类中药材污染情况的分析。**方法:**药材样品加84%乙腈提取,提取液挥干后用甲醇溶解,采用高效液相串联质谱检测方法, C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 3 μm), 以甲醇-4.0 mmol·L⁻¹ 乙酸铵-0.1% 甲酸水溶液为流动相梯度洗脱, 质谱使用 ESI 离子源, 正离子扫描模式, 选择反应检测 (SRM) 模式进行定量。**结果:**6种药材中 AFB₁, AFG₁ 的基质效应介于 82% ~ 119%; 以水蛭作为代表性基质, 进行加样回收率试验, 按低、中、高3个浓度水平添加时, AFB₁ 与 AFG₁ 的提取回收率、绝对回收率介于 80% ~ 117%。方法学考察精密度 RSD 1.8% ~ 7.5%, 重复性 RSD 5.1% ~ 14%。将该方法应用于55份动物药材样品检测, 结果显示包括水蛭和土鳖虫在内的4份样品受到污染, 其中土鳖虫污染率达 33.3%, 污染水平处于 1.26 ~ 26.3 μg·kg⁻¹。**结论:**土鳖虫等动物类药材受黄曲霉毒素污染的情况应当引起足够的重视。针对药材生产的各个环节, 采取恰当的措施降低黄曲霉毒素污染的风险是十分必要的。

[关键词] 黄曲霉毒素 B₁; 黄曲霉毒素 G₁; 动物类药材; 液质联用分析; 水蛭

[中图分类号] R931; R282; R2-03; R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0067-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2018030067

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1053.002.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 10:53

Detection of Aflatoxin Contamination in 6 Traditional Chinese Animal Medicines by LC-MS/MS

LUO Chao-quan, ZHANG Min-ling, ZHENG Run-sheng, CAI Xiao-yin, XU Hui*, YUN Xiao-yun, QIN Jia-liang
(The Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Key Laboratory of
Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, Guangzhou
University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) method for rapid determination of aflatoxin B₁ (AFB₁) and aflatoxin G₁ (AFG₁) in traditional Chinese animal medicines (TCAM), and evaluate the contamination of two aflatoxins in the sample of 6 frequently-used TCAM. **Method:** The sample was extracted with 84% acetonitrile; then the extract was evaporated and the residue was re-suspended in methanol. The separation was carried out on a high performance liquid chromatograph equipped with a C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 3 μm), with methanol-4.0 mmol·L ammonium acetate-0.1% formic acid as the mobile phase for gradient elution. The quantification was carried out with a tandem quadrupole mass spectrometer by using selective reaction monitoring (SRM) in positive ion mode. **Result:** The matrix effect for AFB₁ and AFG₁ in 6 TCAMs was acceptable, ranging from 82% to 119%. Recovery tests were performed with *Hirudo* as the representative matrix at three different concentration levels (low, middle, and high). The absolute recoveries and

[收稿日期] 20170504(003)

[基金项目] 广东省省级科技计划项目(2015A030401083)

[第一作者] 罗朝权, 硕士, 从事中药质量评价工作, Tel: 020-39358331, E-mail: 18825146206@163.com

[通信作者] * 徐晖, 博士, 研究员, 从事中药质量评价工作, Tel: 020-39358331, E-mail: zyzhsherry@gzucm.edu.cn

the extraction recoveries of AFB₁ and AFG₁ were between 80% and 117%. Precision RSD was between 1.8% - 7.5% and repeatability RSD was between 5.1% - 14%. The developed method was applied to evaluate the contamination of two aflatoxins in 55 samples of 6 TCAMs, and 4 of these 55 samples were contaminated, of which Eupolyphaga Steleophaga samples showed a contamination rate of 33.3% with a contamination level of 1.26-26.3 μg·kg⁻¹. **Conclusion:** TCAMs like Eupolyphaga Steleophaga are susceptible to aflatoxin contamination and attentions should thus be paid to their potential hazards. It is necessary to take appropriate measures to reduce the risk of aflatoxin contamination in various sections during the production of medicinal materials.

[**Key words**] AFB₁; AFG₁; traditional Chinese animal medicines; LC-MS/MS; Hirudo

黄曲霉毒素 (aflatoxins, 简称 AFs) 是一类由寄生曲霉、黄曲霉等真菌产生的毒性很强的次生代谢产物, 目前已知的有黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ (AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂) 等 10 多种。AFs 具有强烈的毒性和致畸、致癌、致突变等作用, 严重威胁人类和动物的健康^[1]。其中, AFB₁ 的毒性最强, 敏感动物半致死量 (LD₅₀) 仅为 0.29 μg·kg⁻¹, 毒性是氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍, 世界卫生组织癌症机构已将其指定为 I 类致癌物^[2-3]。AFG₁ 的毒性仅次于 AFB₁, 研究表明其对肺、肝脏有强烈的致癌作用^[4]。中药材污染黄曲霉毒素的事件时有发生报道。动物类中药材成分为油脂、蛋白质等高营养物质, 贮存不当容易受真菌感染而霉变, 真菌毒素污染风险高。《中国药典》2015 年版^[5] 规定了 14 种药材及饮片污染黄曲霉毒素的限量标准, 其中包括水蛭、地龙、全蝎、蜈蚣、僵蚕 5 种动物类药材。近年来, 对动物药材污染情况逐渐重视^[6-7], 张伟等^[8] 检测了 10 个批次的土鳖虫药材, 黄曲霉毒素污染率高达 90%, 且样品中 AFB₁ 污染水平最高达 33 μg·kg⁻¹, 动物类药材污染情况不容忽视, 建立一种相应、快速的筛查方法是十分必要的。

中药材污染黄曲霉毒素的检测方法主要有酶联免疫法 (ELISA), 薄层色谱法 (TLC), 高效液相色谱法 (HPLC) 以及液相-质谱串联法 (LC-MS/MS) 等。其中 LC-MS/MS 灵敏度高, 同时具有定性和定量的功能, 适用于黄曲霉毒素的分析, 但是由于样品基质引起的基质效应对检测结果准确度的影响不可忽视。本文使用的稀释法^[9], 主要是样品前处理过程中把基质的浓度稀释, 有效地降低干扰成分的影响, 提高目标分析物离子化的竞争力, 达到克服基质效应的目的, 已经被广泛应用于食品、饲料污染真菌毒素的高通量检测。本课题组前期建立了基于稀释法的植物根茎、果实种子类药材污染黄曲霉毒素的分析方法^[10-12], 与常规的柱纯化样品的前处理方法相比, 更为简便经济, 具有进一步开发应用的可能性。

因此, 本文在前期方法的基础上, 从基质效应考察的角度出发, 建立一种适用于水蛭等 6 种动物类药材污染 AFB₁, AFG₁ 的 LC-MS/MS 检测方法, 并对从广州市面上收集的药材样品进行检测, 以评价该地区药材污染 AFB₁, AFG₁ 的状况。

1 材料

TSQ Quantum Access 型液相色谱-串联三重四级杆质谱仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TurboVap LV 型氮吹仪 (美国 Caliper 公司); 3-18K 型台式冷冻离心机 (德国 Sartorius 公司); VXR 型涡旋振荡器 (德国 IKA 公司); BS 224 S 型 1/1 万电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); Millipore Q 系列超纯水仪 (法国 Millipore 公司); OKION3 STAR 型 pH 计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

黄曲霉毒素混合对照品溶液 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 批号 LB96951, LB99119), 其中 AFB₁ 质量浓度为 1.00 mg·L⁻¹, AFG₁ 为 0.98 mg·L⁻¹; 甲醇、乙腈色谱纯。

6 种 55 份动物类中药材, 包括水蛭 (Hirudo, 水蛭科动物蚂蟥、水蛭或者柳叶蚂蟥的干全燥体) 9 份、全蝎 (Scorpio, 钳蝎科动物东亚钳蝎 *Buthus martensii* 的干燥体) 9 份、僵蚕 (Bombyx Batryticatus, 蚕蛾科昆虫家蚕 *Bombyx mori* 幼虫感染白僵菌 *Beauveria bassiana* 而致死的干燥体) 10 份、广地龙 (Pheretima, 蛭蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* 的干燥体) 8 份、土鳖虫 (Eupolyphaga Steleophaga, 鳖蠊科昆虫地鳖 *Eupolyphaga sinensis* 或冀地鳖 *Steleophaga plancyi* 的雌虫干燥体) 9 份、乌梢蛇 (Zaocys, 游蛇科动物乌梢蛇 *Zaocys dhumnades* 的干燥体) 10 份, 分别来源于广州市区的 5 家医院和 5 家药店, 经广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心詹若挺研究员鉴定均为正品。药材分别置于恒温恒湿药材室保存备用。在检测前通过四分法将样品分成二等分, 其中一份留样备份, 另一份打粉 (过三号筛) 供后续实验使用。

2 方法

2.1 色谱条件 Thermo Fisher Scientific Hypersil GOLD C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm × 100 mm, 3 μm), 柱温 30 ℃, 样品盘温度 4 ℃。流动相 甲醇 (A) - 4.0 mmol·L⁻¹ 乙酸铵 0.1% 甲酸水溶液 (B) (pH 3.0), 梯度洗脱 (0 ~ 5 min, 20% A; 5 ~ 20 min, 20% ~ 80% A; 20 ~ 30 min, 80% ~ 100% A; 30 ~ 35 min, 100% A), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样体积 10 μL。

2.2 质谱条件 离子源 (ESI), 正离子模式, 喷雾电压 3 500 V, 离子传输毛细管温度 350 ℃, 辅助气高纯氮气, 鞘气、辅助气流量分别为 40, 15 arb, 碰撞气高纯氦气, 碰撞室压力 0.2 Pa, 选择反应监测模式 (SRM)。AFB₁, AFG₁ 的 SRM 检测的相关质谱参数见表 1。

表 1 AFB₁, AFG₁ 的质谱参数

Table 1 ESI-MS/MS parameters of AFB₁, AFG₁

成分	碰撞能量/eV	定量离子对 (m/z)	定性离子对 (m/z)	两对子离子峰面积比值	保留时间窗 ¹⁾ /min
AFB ₁	37	313 > 285	313 > 285	1.13 ~ 1.16	17.65 ~ 17.86
	23		313 > 241		
AFG ₁	27	329 > 243	329 > 243	3.29 ~ 4.50	16.22 ~ 16.45
	30		329 > 214		

注: ¹⁾ 以水蛭为代表药材。离子化方式均为正离子模式。

2.3 供试品溶液的制备 平行称取药材粉末 2 份, 每份约 2.0 g, 置于 50 mL EP 管中, 精密加入 84% 乙腈 10 mL, 浸泡 20 min, 经过 500 r·min⁻¹ 涡旋 10 min 混匀, 在 1 500 r·min⁻¹ 下提取 60 min, 并于 4 ℃, 5 000 r·min⁻¹ 下离心 5 min, 取上清液 250 μL 氮气吹干 (室温), 在残留物中精密加入甲醇 1 mL 溶解, 涡旋振荡 1 min, 经 0.22 μm 微孔有机滤膜过滤, 滤液备用。

3 结果

3.1 专属性试验 分别取黄曲霉毒素的对照品、等浓度的水蛭加标溶液和水蛭的阳性样品溶液, 按照

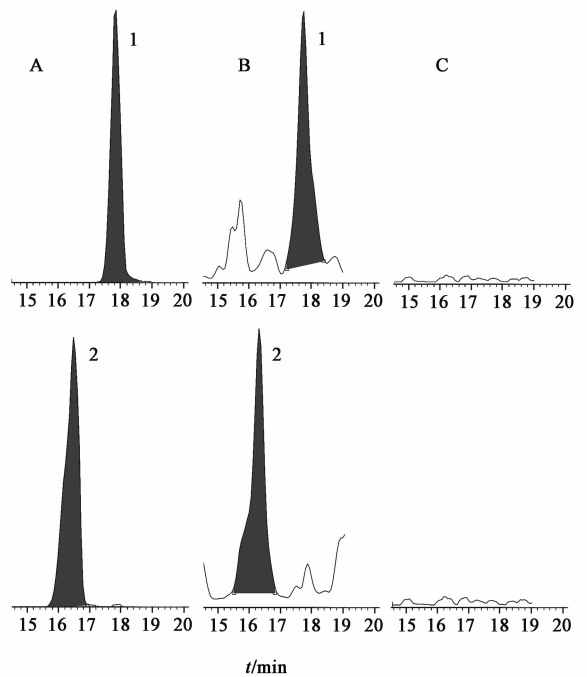
表 2 AFB₁, AFG₁ 线性范围、检测限 (LOD) 和定量限 (LOQ)

Table 2 Concentration range, linearity, LOD and LOQ of AFB₁ and AFG₁

成分	线性范围 /μg·L ⁻¹	线性方程	r	LOD /μg·L ⁻¹	LOQ /μg·L ⁻¹
AFB ₁	0.050 0 ~ 40.0	$Y = -11.1 \times 10^3 + 80.7 \times 10^3 X$	0.999	0.013 0	0.020 0
AFG ₁	0.049 0 ~ 39.6	$Y = -8.00 \times 10^3 + 59.4 \times 10^3 X$	0.990	0.025 0	0.010 0

3.4 日内、日间精密度试验 平行取水蛭 (未污染) 粉末 3 份, 每份 2.0 g, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 添加黄曲霉毒素对照品溶液, 每份样品分别

确定的 LC-MS/MS 条件检测, 记录图谱, 结果见图 1, 阴性样品未见干扰。



A. 对照品; B. 水蛭阳性样品 (AFB₁/AFG₁); C. 水蛭阴性样品; 1. AFB₁; 2. AFG₁

图 1 AFB₁, AFG₁ 的 LC-MS/MS

Fig. 1 LC-MS/MS of aflatoxins B₁ and aflatoxin G₁

3.2 线性关系考察 取黄曲霉毒素对照品溶液, 按原溶液浓度的 1/25, 1/50, 1/125, 1/250, 1/1 250, 1/2 500, 1/10 000, 1/20 000 梯度稀释, 按上述的色谱、质谱条件进行检测, 记录峰面积。以进样质量浓度 (X) 为横坐标, 峰面积 (Y) 为纵坐标进行线性回归 (权重因子 $W = 1/X^2$)。结果显示 AFB₁, AFG₁ 在各自质量浓度范围内具有良好的线性关系, 见表 2。

3.3 检测限 (LOD) 及定量限 (LOQ) 取上述 3.2 项下梯度稀释的 AFB₁, AFG₁ 对照品溶液, 按上述色谱质谱条件进样分析, 以 3/1 和 10/1 的信噪比分别测得 AFB₁, AFG₁ 的 LOD 和 LOQ, 结果见表 2。

配成低、中、高 3 个质量浓度水平的加标溶液 (AFB₁, AFG₁ 的质量浓度依次为 0.40, 0.39; 4.00, 3.9; 12.0, 11.7 μg·L⁻¹), 每份溶液重复测定 2 次,

连续测定 3 d, 根据峰面积结果进行方差分析。结果显示 AFB₁, AFG₁ 的 3 种质量浓度水平的日内精密度 RSD 在 1.8% ~ 5.8%, 日间精密度 RSD 在 3.3% ~ 7.5%, 表明仪器精密度良好。

3.5 重复性试验 平行取水蛭(未污染)粉末 9 份, 每份 2.0 g, 按低、中、高 3 个浓度水平(同 3.4 项), 分别添加黄曲霉毒素对照品溶液, 自然晾干 24 h, 按 2.3 项下方法制备供试品溶液, 并进行 LC-MS/MS 分析。结果显示 AFB₁, AFG₁ 检测结果的 RSD 在 5.1% ~ 14%, 表明该方法的重复性良好。

3.6 基质效应考察 平行取 6 种药材样品粉末, 每种 2 份, 每份约 2.0 g, 按照 2.3 项下方制备供试品溶液, 分别制成样品溶液以及低、中、高 3 个水平的加标溶液, 每个浓度各 2 份, 进样分析, 得出相应的峰面积。按公式(1)计算基质效应, 结果见表 3。6 种药材中 AFB₁, AFG₁ 的基质效应在 82% ~ 119%, 表明基质效应在可接受范围内容, 没有明显的离子增强或者抑制作用。

$$\text{基质效应(ME)} = \frac{\text{加标溶液峰面积} - \text{样品溶液峰面积}}{\text{对照品溶液峰面积}} \times 100\% \quad (1)$$

表 3 6 种动物类药材中 AFB₁, AFG₁ 的基质效应

Table 3 Matrix effects of AFB₁, AFG₁ in 6 traditional Chinese animal medicines %

药材	AFG ₁ 添加浓度 /μg·L ⁻¹	基质效应	
		AFB ₁	AFG ₁
水蛭	0.39	116	103
	3.9	97	100
	11.7	89	91
土鳖虫	0.39	92	98
	3.9	87	89
	11.7	82	83
乌梢蛇	0.39	100	94
	3.9	106	83
	11.7	96	97
全蝎	0.39	110	109
	3.9	106	104
	11.7	97	96
僵蚕	0.39	108	119
	3.9	94	97
	11.7	93	93
广地龙	0.39	99	114
	3.9	91	100
	11.7	93	97

3.7 回收率考察 以水蛭作为代表性基质, 进行加样回收率试验。平行取水蛭(未污染)粉末 9 份, 每份 2.0 g, 按 3.5 项下方法制备低、中、高浓度的加标溶液各 3 份, 进样分析, 峰面积记为 A; 另取水蛭(未污染)粉末 3 份, 每份 2.0 g, 按 3.4 项下方法制备成低、中、高 3 种质量浓度的加标溶液各 3 份, 进样分析, 峰面积记为 B; 用甲醇制备相应浓度的对照品溶液, 进样分析, 峰面积记为 C; 分别按照公式(2)和(3)计算提取回收率 R_E(%) 与绝对回收率 R_A(%), 结果见表 4。由表可知, 以水蛭(未污染)作为代表性基质, 测得低、中、高 3 个浓度水平时, AFB₁, AFG₁ 的回收率范围在 80% ~ 118%。

$$R_A = A/B \times 100\% \quad (2)$$

$$R_E = A/C \times 100\% \quad (3)$$

表 4 水蛭中 AFB₁, AFG₁ 的提取回收率和绝对回收率

Table 4 Extraction recoveries (R_E) and apparent recoveries (R_A) of AFB₁ and AFG₁ determined in Hirudo

成分	添加浓度/μg·L ⁻¹		R _E /%	R _A /%	RSD /%
	AFB ₁	AFG ₁			
AFB ₁	0.40	0.39	114	118	13.4
	4.0	3.9	84	107	5.1
	12.0	11.7	81	92	8.9
AFG ₁	0.40	0.39	83	96	6.2
	4.0	3.9	85	100	4.4
	12.0	11.7	80	89	8.0

3.8 样品测定结果 收集来自广州地区的药店和医院药材样品共 55 份, 按 2.3 项下方法制备, 按 2.1 项和 2.2 项的色谱、质谱条件进行检测分析。55 份的动物药材检测结果显示, 有 4 份受到污染, 包括水蛭 1 份和土鳖虫 3 份。土鳖虫污染率达 33.3%, 污染水平为 1.26 ~ 26.3 μg·kg⁻¹。全蝎、僵蚕、广地龙和乌梢蛇样品中未检出 AFB₁, AFG₁。见表 5。

4 讨论

本文考察了稀释法在动物类中药材真菌毒素检测中的适用性, 通过方法学评价, 建立了水蛭、土鳖虫等 6 种动物类中药材污染 AFB₁, AFG₁ 的快速、经济的 LC-MS/MS 检测方法, 适合用于大批量动物类药材的筛查而不影响定量结果的准确度。在实验过程中, 发现动物类药材基质对 AFB₂, AFG₂ 信号影响显著, 通过提高离子化效率, 优化色谱条件, 减少干扰成分的共流出, 有可能降低基质效应的干扰, 从而实现 AFB₂, AFG₂ 的检测。

表 5 6 种动物类药材样品污染 AFB₁, AFG₁ 的检测

Table 5 Contamination levels of AFB₁, AFG₁ in 6 traditional Chinese

样品	样品数 (药店/ 医院 药房)	μg·kg ⁻¹			
		AFB ₁		AFG ₁	
		药店样品 数(个) /质量分数	医院药样 品数(个) /质量分数	药店样 品数(个) /质量分数	医院药样 品数(个) /质量分数
水蛭	5/4	1(1.26)	-	-	-
全蝎	4/5	-	-	-	-
僵蚕	5/5	-	-	-	-
广地龙	4/4	-	-	-	-
土鳖虫	5/4	1(5.1)	2(3.0~5.14)	-	2(12.9~26.3)
乌梢蛇	5/5	-	-	-	-

《中国药典》2015 年版^[5] (一部) 规定了包括水蛭在内的 14 种药材及饮片污染黄曲霉毒素污染水平, 即 AFB₁ 与 AF(B₁ + B₂ + G₁ + G₂) 的最高限量分别为 5 μg·kg⁻¹ 和 10 μg·kg⁻¹。本文研究发现, 在所检测的 6 种动物类药材中, 土鳖虫受 AFB₁ 和 AFG₁ 污染的情况比较严重, 其中 2 份药材污染 AFB₁ 的水平超过《中国药典》2015 年版规定的限度, 1 份药材 AFG₁ 的污染水平高达 26 μg·kg⁻¹。该结果与张伟等^[8] 的研究报道相似。推测造成这一现象的原因, 可能与土鳖虫的生长环境有关, 而加工措施、储藏条件不当也导致其容易受到污染。因此, 探讨完善相关措施以降低土鳖虫受黄曲霉毒素污染的风险是十分必要的。进一步, 全面开展动物类药材污染黄曲霉毒素的现状调查, 对完善相关法律法规、保障用药安全, 具有重大意义。

[参考文献]

[1] 吴兆蕃. 黄曲霉毒素的研究进展[J]. 甘肃技术, 2010, 26(18): 89-94.

[2] Sweeney M J, Dobson A D. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species[J]. Int J Food Microbiol, 1998, 43(3): 141-158.

[3] Zöllner P. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmosphere pressure ionization mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2006, 1136(2): 123-169.

[4] 黄向华, 张祥宏, 李月红, 等. 黄曲霉毒素 G₁ 诱发 NIH 小鼠肺癌的实验研究[J]. 中华病理学杂志, 2004, 33(3): 260-263.

[5] 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: 4.

[6] 杨小丽. 动物类药材中真菌毒素的检测方法研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2012.

[7] 杨小丽, 仇峰, 韦日苇, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定地龙中 4 个黄曲霉毒素[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(4): 627-630.

[8] 张伟, 邹耀华, 诸葛陇, 等. HPLC 法测定土鳖虫中黄曲霉素的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(30): 4269-4271.

[9] Sulyok M. A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food sample [J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(5): 1505-1523.

[10] 郑润生, 徐晖, 王文丽, 等. 苦杏仁中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的液质联用检测分析[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(20): 3536-3538.

[11] ZHENG R S. Simultaneous determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, ochratoxin A, and sterigmatocystin in traditional Chinese medicines by LC-MS-MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2014, 406(13): 3031-3039.

[12] 郑润生, 徐晖, 彭苑霞, 等. 稀释法结合 LC-MS/MS 检测在黄曲霉毒素高通量筛查中的应用研究[J]. 药物分析杂志, 2014, 39(2): 273-277.

[责任编辑 顾雪竹]