

# LC-MS/MS 法同时测定活血止痛胶囊/片中 16 种真菌毒素及污染状况分析

史 达<sup>1</sup>, 陈 洁<sup>2</sup>, 张 玲<sup>1</sup>, 胡紫艳<sup>1</sup>, 曹 玉<sup>1\*</sup>

(1. 南京市食品药品监督检验院, 江苏南京 211198; 2. 南京医科大学药学院, 江苏南京 211112)

**摘要:** 目的 建立 LC-MS/MS 法同时测定活血止痛胶囊/片中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，赭曲霉毒素 A，玉米赤霉烯酮，脱氧雪腐镰刀菌烯醇，T-2 毒素，HT-2 毒素，桔青霉毒素，杂色曲霉毒素的含量，并对其进行污染状况进行分析。方法 以亲水-亲脂 HLB 固相萃取柱净化作为前处理方式，分析采用 Agilent RRHD Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)；流动相乙腈-水 (0.1% 甲酸-2 mmol/L 甲酸铵)，梯度洗脱；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；电喷雾电离源 (ESI)，正负离子模式，动态多反应离子检测 (DMRM) 模式。结果 16 种真菌毒素在各自范围内线性关系良好 ( $R^2 > 0.999$ )，平均加样回收率 81.7% ~ 118.0%，RSD 0.9% ~ 13.1%。40 批样品中检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>，赭曲霉毒素 A，杂色曲霉毒素，检出率分别为 20%、32.5%、57.5%、25%、42.5%、27.5%，其中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量最高，为 10.26 μg/kg。结论 活血止痛制剂中真菌毒素残留较严重，对人体产生危害的潜在风险较高。

**关键词:** 活血止痛胶囊；真菌毒素；污染状况；LC-MS/MS

中图分类号: R284.1

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2024)03-1019-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2024.03.049

活血止痛胶囊/片均由三七、土鳖虫等 6 味药材组成，具有活血散瘀、消肿止痛的功效<sup>[1]</sup>。真菌毒素是真菌产生的具有生物体内蓄积效应的有害次生代谢物，具有人体造血系统、免疫系统、生殖系统等毒性以及致癌和致畸作用<sup>[2-4]</sup>。据已有文献研究，处方中三七与土鳖虫均有玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素、伏马毒素、杂色曲霉毒素等真菌毒素残留现象<sup>[5-9]</sup>。同时，活血止痛胶囊及活血止痛片制备工艺均为全粉入药，2020 年版《中国药典》通则“9305 中药中真菌毒素测定指导原则”规定，处方中含有易污染的药材及生粉投料的中成药品种应注意相关真菌毒素的测定。

2020 年版《中国药典》仅对处方中土鳖虫规定黄曲霉毒素限度，活血止痛胶囊规定项下及活血止痛片剂执行标准<sup>[10]</sup>均未规定真菌毒素残留限度。目前较为成熟的测定方法有液相色谱法<sup>[11]</sup>、酶联免疫法<sup>[12]</sup>及液相色谱质谱联用法<sup>[13-15]</sup>；真菌毒素常用的前处理方法包括 QuEChERS 净化<sup>[13]</sup>、液液萃取<sup>[16]</sup>、固相萃取<sup>[17]</sup>、免疫亲和净化<sup>[18]</sup>等。本实验通过对比 QuEChERS 净化、固相萃取净化、免疫亲和柱净化这 3 种前处理方法，建立高效液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 法准确、灵敏、快速筛查活血止痛胶囊和活

血止痛片剂中 16 种真菌毒素，以期为合理评价活血止痛制剂质量及为该类中成药安全监管提供数据支撑与技术参考。

## 1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 液相色谱仪、Agilent 6470 三重四级杆质谱（美国 Agilent 公司）；CPA225D 十万分之一电子天平（德国 Sartorius 公司）；Milli-Q 纯水仪（美国 Merck 公司）；KQ-250B 型超声波清洗器（昆山市超声仪器有限公司，功率 250 W，频率 30 kHz）；涡旋混匀器（德国 Wiggens 公司）；N-EVAP24 型氮吹仪（美国 Organomation 公司）；Oasis Prime HLB 固相萃取柱、Oasis HLB 固相萃取柱（美国 Waters 公司）。

1.2 试剂与药物 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 对照品溶液 (25 μg/mL)，黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 对照品溶液 (10 μg/mL)，伏马毒素对照品溶液 (50 μg/mL)，HT-2 毒素对照品溶液 (100 μg/mL)，T-2 毒素对照品溶液 (100 μg/mL)，杂色曲霉毒素对照品溶液 (50 μg/mL)，脱氧雪腐镰刀菌烯醇对照品溶液 (100 μg/mL)，赭曲霉毒素 A 对照品溶液 (10 μg/mL)，玉米赤霉烯酮对照品溶液 (100 μg/mL)，桔青霉毒素对照品溶液 (100 μg/mL)，真菌毒素六合一复

收稿日期: 2023-01-12

基金项目: 江苏省市场监督管理局 2020 年度科技计划项目 (KJ207564)

作者简介: 史 达 (1989—), 女, 主管药师, 研究方向为中药分析及质量评价。Tel: 18951782917, E-mail: shidastar@163.com

\* 通信作者: 曹 玉 (1981—), 男, 副主任中药师, 研究方向为中药分析及质量评价。Tel: (025) 89636150, E-mail: 23580305@qq.com

网络出版日期: 2023-03-21

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20230320.1712.006.html>

合免疫亲合柱（黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、伏马毒素、T-2毒素，6 mL），均购自青岛普瑞邦生物工程有限公司。QuEChERS试剂1（ $MgSO_4$  6 g、 $CH_3COONa$  1.5 g，货号 5982-5755）、QuEChERS试剂2（PSA 800 mg、 $MgSO_4$  1 200 mg，货号 5982-6666）、QuEChERS试剂3（PSA 400 mg、 $MgSO_4$  1 200 mg，货号 5982-5058）、QuEChERS试剂4（Carbon S 90 mg、 $C_{18}$  300 mg、PSA 300 mg、 $SiO_2$  300 mg、 $MgSO_4$  900 mg，货号 5610-2056）、QuEChERS试剂5（PSA 150 mg、 $C_{18}$  EC 150 mg、 $MgSO_4$  1 200 mg，货号 5982-5156）购自美国Agilent公司。甲醇、乙腈为色谱纯（美国Honeywell公司）；甲酸、甲酸铵、乙酸铵为色谱纯（上海阿拉丁生化科技股份有限公司）；水为超纯水（实验室自制）。活血止痛胶囊、活血止痛片均为市售，共40批，来源于6家生产企业，具体见表1。

表1 样品信息

序号	名称	生产企业	批号
1~6	活血止痛胶囊	南京中山制药有限公司	190506、190915、201008、190328、181207、200622
7~12	活血止痛胶囊	珠海安生凤凰制药有限公司	18040110、20080123、19060118、19080120、18120129、19060116
13~18	活血止痛胶囊	江西百神昌诺药业有限公司	200504、181204、200502、200604、200804、210101
19~25	活血止痛片	江西桔王药业有限公司	2011026、200605、200810、200807、201201、2009123、190228
26~31	活血止痛片	合肥今越制药有限公司	190603、181009、201004、190403、210305、201202
32~40	活血止痛片	江苏万高药业股份有限公司	2003233、2010073、2008074、1902241、1906111、1906061、1811101、2101234、2008064

## 2 方法与结果

### 2.1 LC-MS/MS 条件

2.1.1 色谱 Agilent RRHD Eclipse Plus  $C_{18}$  色谱柱（2.1 mm×50 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ）；流动相水（含有 0.1% 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵，A）-乙腈（B），梯度洗脱（0~3 min, 90% A；3~8 min, 90%~60% A；8~12 min, 60%~30% A；12~14 min, 30%~10% A；14~15 min, 10% A；15~15.1

min, 10%~90% A；15.1~18 min, 90% A）；体积流量 0.3 mL/min；柱温 35 °C；进样量 3  $\mu\text{L}$ 。

2.1.2 质谱 电喷雾离子源（ESI），正、负离子扫描；离子源温度 350 °C；毛细管电压 3 500 V (+)、2 500 V (-)；鞘气体积流量 12 L/min，温度 350 °C；雾化器压力 45 psi（1 psi=6.895 kPa）；采集模式，动态多反应离子监测模式（MRM）。其他质谱参数见表2，MRM 色谱图见图1。

表2 各真菌毒素质谱参数

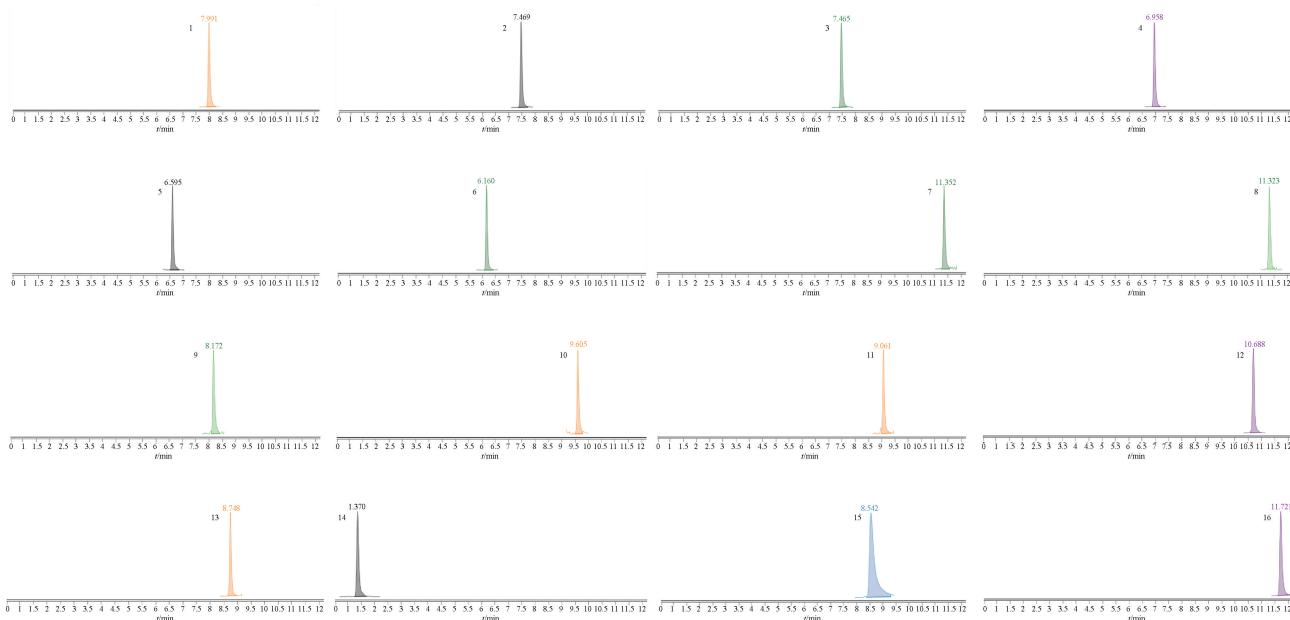
真菌毒素	电离模式	母离子 $m/z$	子离子 $m/z$	裂解电压/V	碰撞能量/V
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	+	313.1	285.1 <sup>*</sup> /241.0	145	25/41
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	+	315.1	287.1 <sup>*</sup> /259.1	140	29/33
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	+	329.1	311.1/243.1 <sup>*</sup>	125	29/25
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	+	331.1	257.1/245.1 <sup>*</sup>	130	30/33
黄曲霉毒素 M <sub>1</sub>	+	329.1	273.1 <sup>*</sup> /259.0	100	25/25
黄曲霉毒素 M <sub>2</sub>	+	331.1	285.1/273.1 <sup>*</sup>	120	25/25
赭曲霉毒素 A	+	404.2	239.1 <sup>*</sup> /102.0	105	24/94
玉米赤霉烯酮	-	317.2	273.1 <sup>*</sup> /131.0	150	20/33
伏马毒素 B <sub>1</sub>	+	722.4	352.4/334.4 <sup>*</sup>	165	45/41
伏马毒素 B <sub>2</sub>	+	706.4	336.1 <sup>*</sup> /318.4	170	41/45
伏马毒素 B <sub>3</sub>	+	706.4	336.3 <sup>*</sup> /318.3	160	33/41
T-2毒素	+	489.2	387.2/245.3 <sup>*</sup>	100	29/36
HT-2毒素	+	442.2	263.1 <sup>*</sup> /215.2	80	9/9
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	+	297.2	249.1 <sup>*</sup> /231.1	95	9/9
桔青霉毒素	+	251.2	233.0 <sup>*</sup> /205.0	100	17/29
杂色曲霉毒素	+	325.3	310.1/281.0 <sup>*</sup>	135	33/33

注：\* 表示定量离子。

### 2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密吸取黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>，黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，赭曲霉毒素 A，玉米赤霉烯酮，T-2毒素，HT-2毒素，脱氧雪腐镰刀菌烯醇，桔青霉毒素，杂色曲霉毒素对照品溶液适量，置于 20 mL 量瓶中，乙腈稀释至刻度，制成含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，桔青霉毒素 80 ng/mL，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，T-2毒素 800 ng/mL，玉米赤霉烯酮 200 ng/mL，赭曲霉毒素 A、杂色曲霉毒素 160 ng/mL，HT-2 噻

素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 2 000 ng/mL 的贮备液，密封，在 -20 °C 下保存。精密吸取 0.5 mL，置于 10 mL 量瓶中，50% 乙腈稀释至刻度，逐级稀释，即得（含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，桔青霉毒素 0.1、0.2、0.4、1、2、4 ng/mL，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，T-2 噻素 1、2、4、10、20、40 ng/mL，玉米赤霉烯酮 0.25、0.5、1、2.5、5、10 ng/mL，赭曲霉毒素 A、杂色曲霉毒素 0.2、0.4、0.8、2、4、8 ng/mL，HT-2 噻素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 2.5、5、10、25、50、100 ng/mL，编号 S1~S6）。



1. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 2. 黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> 3. 黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> 4. 黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> 5. 黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 6. 黄曲霉毒素 M<sub>2</sub> 7. 肖曲霉毒素 A  
8. 玉米赤霉烯酮 9. 伏马毒素 B<sub>1</sub> 10. 伏马毒素 B<sub>2</sub> 11. 伏马毒素 B<sub>3</sub> 12. T-2 毒素 13. HT-2 毒素 14. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 15. 桔青霉毒素 16. 杂色曲霉毒素

图 1 各真菌毒素 MRM 色谱图

## 2.2.2 供试品溶液

**2.2.2.1 QuEChERS-HLB 净化法** 取本品约 5 g, 精密称定, 置于 50 mL 离心管中, 精密加入提取液 (80% 乙腈-15% 水-5% 甲酸) 20 mL, 涡旋振荡 2 min, 加入 QuEChERS 提取试剂盒 (含 PSA 150 mg、C<sub>18</sub> 150 mg、MgSO<sub>4</sub> 1 200 mg) 涡旋振荡 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min。精密量取上清液 5 mL, 加水稀释至 10 mL, 摆匀, 10 000 r/min 离心 5 min, 精密量取 3 mL, 缓慢通过已处理好的 Oasis HLB 固相萃取柱 (3 mL/150 mg, 依次用甲醇、水各 3 mL 洗脱) 直至有适量空气通过, 收集洗脱液, 用 3 mL 含 0.2% 甲酸的乙腈洗脱, 收集合并洗脱液, 40 ℃ 氮气缓慢吹至近干, 加入 50% 乙腈 (含 0.2% 甲酸) 定容至 1.5 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.2.2.2 Prime HLB -IAC 净化法** 取本品约 5 g, 精密称定, 置于 50 mL 离心管中, 精密加入提取液 (80% 乙腈-15% 水-5% 甲酸) 20 mL, 涡旋振荡 2 min, 10 000 r/min 离心 5 min。精密量取上清液 5 mL, 缓慢通过 Oasis Prime HLB 固相萃取柱, 1 mL 乙腈洗脱柱子, 接净化液加 PBS 磷酸缓冲液配方 (8.0 g NaCl、1.2 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2 g KCl, 加 990 mL 水溶解, 盐酸调节 pH 值至 7.0, 再加水稀释至 1 000 mL) 稀释至 40 mL, 稀释液以重力自然速度通过免疫亲合柱, 20 mL 水洗脱, 弃去洗脱液, 使空气进入柱子, 将水挤出柱子后再用 1.5 mL 乙腈 (含 0.2% 甲酸)、0.5 mL 水依次洗脱 (乙腈洗脱时稍作停留), 收集洗脱液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.2.2.3 QuEChERS 净化法** 取本品约 5 g, 精密称定, 置于 50 mL 离心管中, 精密加入提取液 (80% 乙腈-15% 水-

5% 甲酸) 20 mL, 涡旋振荡 2 min, 加入 6 g MgSO<sub>4</sub>、1.5 g CH<sub>3</sub>COONa 涡旋振荡 2 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 精密吸取上清液 10 mL, 置于 50 mL 离心管中, 加入 QuEChERS 提取试剂 (PSA 150 mg、C<sub>18</sub> 150 mg、MgSO<sub>4</sub> 1 200 mg), 涡旋 5 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 5 mL, 40 ℃ 氮气缓慢吹至近干, 50% 乙腈 (含 0.2% 甲酸) 定容至 1 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

**2.2.3 基质效应** 取未检出 16 种真菌毒素的活血止痛胶囊 (批号 190328) 作为空白基质, 按“2.2.2.1”项下方法制备空白基质溶液, 将“2.2.1”项下贮备液分别用空白基质溶液、50% 乙腈逐级稀释, 以各真菌毒素质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 进行回归, 分别以空白基质、50% 乙腈制备标准曲线的斜率的比值对基质效应 (ME) 进行评估<sup>[17,19]</sup>, 以 ME>100% 为基质增强效应, ME<100% 为基质抑制效应, ME 85% ~ 115% 为基质效应不明显。结果, 黄曲霉毒素 B<sub>2</sub>、T-2 毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇均有明显的基质抑制效应, 而黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>、黄曲霉毒素 M<sub>2</sub>、伏马毒素 B<sub>1</sub>、伏马毒素 B<sub>3</sub>、HT-2 毒素存在明显基质增强效应, 见图 2。

## 2.3 方法学考察

**2.3.1 线性关系考察** 取“2.2.3”项下基质空白溶液适量, 按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液 S1 ~ S6, 在“2.1”项条件下进样测定。以对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积响应值为纵坐标 (Y) 进行回归, 并以 S/N=10 时的质量浓度为定量限, S/N=3 时的质量浓度作为检测限, 结果见表 3, 可知各真菌毒素在各自范围内线性关系良好。

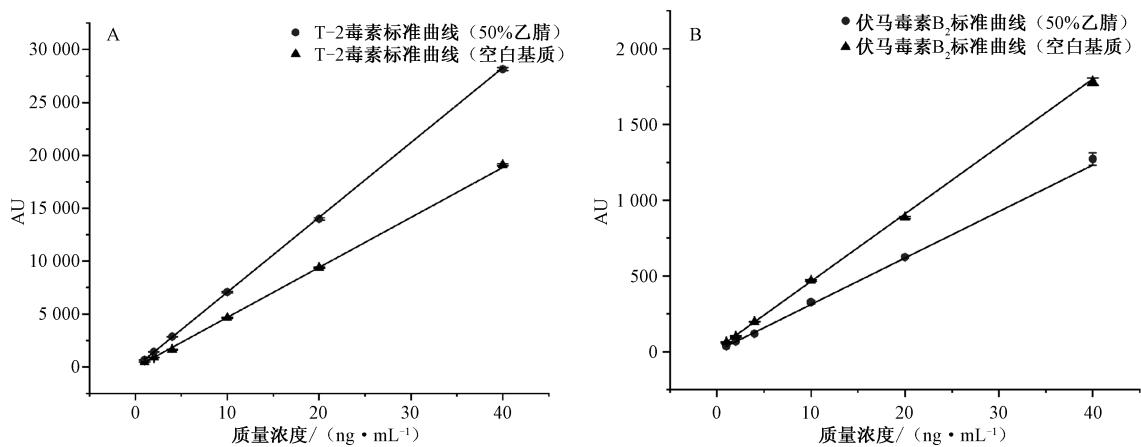


图2 各真菌毒素基质抑制效应(A)、基质增强效应(B)

表3 各真菌毒素线性关系

真菌毒素	回归方程	R <sup>2</sup>	线性范围/(ng·mL <sup>-1</sup> )	检测限/(μg·kg <sup>-1</sup> )	定量限/(μg·kg <sup>-1</sup> )	基质效应/%
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	$Y=13.556X-117.42$	0.9997	0.1~4.0	0.12	0.36	96.6
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	$Y=9.130.8X-117.76$	0.9999	0.1~4.0	0.11	0.34	76.3
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	$Y=6.258.4X+161.65$	0.9999	0.1~4.0	0.11	0.39	94.1
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	$Y=3.526.3X-37.389$	0.9999	0.1~4.0	0.12	0.37	97.6
黄曲霉毒素 M <sub>1</sub>	$Y=6.154.3X+188.40$	0.9995	0.1~4.0	0.14	0.33	133.6
黄曲霉毒素 M <sub>2</sub>	$Y=4.717.3X-27.729$	0.9999	0.1~4.0	0.11	0.36	117.4
赭曲霉毒素 A	$Y=625.96X+12.027$	0.9997	0.2~8.0	0.16	0.52	107.1
玉米赤霉烯酮	$Y=17.023X-0.32042$	0.9998	0.25~10	0.32	1.0	98.8
伏马毒素 B <sub>1</sub>	$Y=32.269X-1.7075$	0.9996	1~40	1.80	3.8	129.5
伏马毒素 B <sub>2</sub>	$Y=45.992X+5.1043$	0.9999	1~40	1.70	3.6	113.2
伏马毒素 B <sub>3</sub>	$Y=29.308X+7.6088$	0.9997	1~40	1.84	3.9	123.0
T-2 毒素	$Y=538.19X+5.0922$	0.9999	1~40	1.36	4.0	68.3
HT-2 毒素	$Y=53.993X-80.492$	0.9992	2.5~100	4.52	8.9	122.6
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	$Y=77.011X-5.3143$	0.9999	2.5~100	4.00	9.6	63.2
桔青霉毒素	$Y=25.341X-375.04$	0.9996	0.1~4.0	0.11	0.32	94.5
杂色曲霉毒素	$Y=3.802.5X+1.050.9$	0.9999	0.2~8.0	0.36	0.75	109.3

2.3.2 精密度试验 取“2.3.1”项下对照品溶液S2，在“2.1”项条件下进样测定6次，测得黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，伏马毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，赭曲霉毒素A，玉米赤霉烯酮，脱氧雪腐镰刀菌烯醇，T-2毒素，HT-2毒素，桔青霉毒素，杂色曲霉毒素峰面积RSD分别为2.39%、2.68%、4.76%、2.70%、5.28%、3.84%、2.12%、5.87%、4.36%、7.91%、7.29%、5.77%、3.82%、3.77%、4.11%、3.48%，表明仪器精密度良好。

2.3.3 稳定性试验 精密称取本品(批号190328)5 g，按“2.2.2.1”项下方法制备供试品溶液，室温下于0、2、4、8、12、24 h在“2.1”项条件下进样测定，测得黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，伏马毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，赭曲霉毒素A，玉米赤霉烯酮，脱氧雪腐镰刀菌烯醇，T-2毒素，HT-2毒素，桔青霉毒素，杂色曲霉毒素含量RSD分别为2.39%、1.67%、2.87%、2.93%、1.72%、1.41%、5.18%、9.32%、8.31%、11.06%、9.32%、9.05%、1.97%、3.58%、8.11%、6.13%，表明溶液在24 h内稳定性良好。

2.3.4 重复性试验 精密称取本品(批号190328)5 g，平行6份，按“2.2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项条件下进样测定，测得黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>，伏马毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>，赭曲霉毒素A，玉米赤霉烯酮，脱氧雪腐镰刀菌烯醇，T-2毒素，HT-2毒素，桔青霉毒素，杂色曲霉毒素含量RSD分别为1.78%、1.88%、3.11%、4.85%、3.89%、1.88%、6.20%、5.50%、10.76%、8.46%、6.39%、3.81%、1.22%、7.93%、3.91%、2.33%，表明方法重复性良好。

2.3.5 加样回收率试验 精密称取本品(批号190328)5 g，按低、中、高质量浓度水平分别精密加入对照品溶液50、125、500 μL，平行3份，按“2.2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项条件下进样测定，计算回收率，结果见表4。

2.4 样品含量测定 取40批样品，各2份，按“2.2.2.1”项下方法制备供试品溶液，在“2.1”项条件下进样测定，以基质匹配标准曲线法测定含量。结果，检出黄曲霉毒素B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>、伏马毒素B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、赭曲霉毒素A、杂

表4 各真菌毒素加样回收试验结果( $n=3$ )

真菌毒素	低质量浓度		中质量浓度		高质量浓度	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	109.9	2.5	108.8	1.9	92.5	1.1
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	108.9	1.9	102.1	3.3	106.0	1.3
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	105.1	3.5	111.6	2.6	93.3	2.3
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	112.4	2.8	110.3	2.4	104.6	0.9
黄曲霉毒素 M <sub>1</sub>	89.5	3.3	102.4	2.5	96.4	4.5
黄曲霉毒素 M <sub>2</sub>	87.0	8.3	88.9	1.3	105.4	3.4
赭曲霉毒素 A	106.0	13.1	117.7	11.2	98.8	5.3
玉米赤霉烯酮	81.7	8.3	96.1	7.2	80.2	7.6
伏马毒素 B <sub>1</sub>	93.6	4.5	111.4	1.7	92.3	1.5
伏马毒素 B <sub>2</sub>	98.4	9.9	111.1	4.1	91.4	2.3
伏马毒素 B <sub>3</sub>	90.0	2.8	109.7	3.2	85.7	8.9
T-2 毒素	115.2	3.3	95.0	8.5	115.6	4.3
HT-2 毒素	110.6	8.1	89.6	6.7	99.0	1.8
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	111.6	4.4	84.8	3.3	118.0	3.3
桔青霉毒素	100.5	5.1	101.4	5.0	113.2	9.3
杂色曲霉毒素	111.8	2.6	110.9	5.0	89.7	1.5

色曲霉毒素，检出率分别为 20%、32.5%、57.5%、25%、42.5%、27.5%，其中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub> 检出量分别为 1.96~10.26、2.16~20.41 μg/kg，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 检出量分别为 22.45~812.2、12.52~913.8 μg/kg，赭曲霉毒素 A 检出量为 2.75~12.50 μg/kg，杂色曲霉毒素检出量为 2.99~32.78 μg/kg，表明真菌毒素残留较严重，存在潜在用药安全隐患。

### 3 讨论

3.1 色谱条件、提取溶剂选择 乙腈较甲醇洗脱能力强，柱效更高，甲酸铵较乙酸铵各真菌毒素响应更好，加入 0.10% 甲酸可明显提高部分毒素离子化效率，故最终选择乙腈-甲酸铵（2 mmol/L, 0.10% 甲酸）作为流动相。甲醇虽比乙腈有更好的溶解性，但乙腈具有更好的选择性，可有效避免过多提取脂肪、色素等杂质成分，并且一定比例水及甲酸可使部分水溶性、酸敏感性真菌毒素（伏马毒素、赭曲霉毒素）有更好响应，同时还可使样品保持较高渗透性，故最终选择 80% 乙腈-15% 水-5% 甲酸系统作为提取溶剂。

3.2 净化方式优化 活血止痛胶囊/片存在基质效应，同位素内标能够最大程度减少基质效应的干扰，但其定制繁琐，价格昂贵，而合适的提取净化方式也能有效减少基质效应，本实验参考文献 [13-14]，比较不同净化方式选择最优去除干扰物方式，发现仅以 QuEChERS 提取净化活血止痛基质，伏马毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A 和 HT-2 毒素回收率较差，但加入 PSA、MgSO<sub>4</sub> 试剂后有助于水相与有机相分层，而加入 carbon S、SiO<sub>2</sub> 等可导致黄曲霉毒素、伏马毒素、杂色曲霉毒素、赭曲霉毒素 A 等响应值偏低，并且过多 PSA 也会影响伏马毒素回收率，最终选择 PSA 150 mg、C<sub>18</sub> 150 mg、MgSO<sub>4</sub> 1 200 mg 为提取试

剂。进一步研究不同净化方式组合，发现基质经过 QuEChERS 提取并过 Oasis HLB 固相萃取柱净化或者直接通过 Oasis Prime HLB 固相萃取柱与免疫亲合柱串联净化可满足目标真菌毒素回收率要求，但免疫亲合柱中不含有杂色曲霉毒素、HT-2 毒素和桔青霉毒素等抗体导致该部分毒素回收率较差<sup>[20-24]</sup>。考虑到活血止痛胶囊/片中杂色曲霉毒素有较高的检出率，因此本实验为合理考察活血止痛胶囊/片中 16 种真菌毒素残留情况，最终选择更经济、适合高通量真菌毒素筛查的 QuEChERS 提取组合 Oasis HLB 固相萃取柱净化作为提取净化方式。

### 4 结论

本实验采用 LC-MS/MS 法，从 40 批活血止痛胶囊/片中检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、G<sub>1</sub>，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>，赭曲霉毒素 A，杂色曲霉毒素，提示该类中药品种存在潜在的真菌毒素污染风险，患者口服用药后有较大安全隐患，故应加强其来源药材、加工、储存等环节的监管。另外，该方法快速简便，准确灵敏，可为合理评价活血止痛胶囊/片中真菌毒素残留风险提供技术支撑，并为安全监管提供参考依据。

### 参考文献：

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：2020 年版一部 [S]. 北京：中国医药科技出版社，2020：1392-1395.
- [2] 孙梅峰，豆小文，张磊，等. 真菌毒素毒性及其在生物样本中检测技术研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2020，34(10)：788-800.
- [3] 张烈远，张书敏，蔡丹，等. 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 污染风险评估及防控[J]. 中国口岸科学技术，2022，4(6)：10-14.
- [4] 孙梅峰，豆小文，张磊，等. 真菌毒素毒性及其在生物样本中检测技术研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志，

- 2020, 34(10): 788-800.
- [5] 王少敏, 杜春晓, 刘贤贤, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定三七中 26 种真菌毒素[J]. 世界中医药, 2019, 14(4): 798-804.
- [6] 陈勇, 陈重均, 李劲, 等. 超高效液相色谱串联质谱法检测三七药材中 10 种真菌毒素[J]. 药学学报, 2015, 50(1): 81-85.
- [7] 李媛, 张楠, 张亚峰, 等. QuEChERS 结合 UHPLC-MS 同时测定土鳖虫及其成方制剂中 9 种真菌毒素含量[J]. 中国现代中药, 2022, 24(1): 142-146.
- [8] 白玲. 中药材土鳖虫污染真菌快速鉴定及黄曲霉毒素生物降解研究[D]. 西宁: 青海大学, 2020.
- [9] 余诗琪, 汪波, 吕盼, 等. 固相萃取-液质联用法测定土鳖虫中 12 种真菌毒素[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2019, 21(7): 1411-1417.
- [10] YBZ25062005-2010Z, 国家食品药品监督管理局. 国家药品标准[S].
- [11] 徐小龙, 刘颖, 陈乃江. 葛根定眩胶囊中黄曲霉毒素 G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> 含量测定及安全性评价[J]. 中国药业, 2021, 30(23): 55-58.
- [12] 王长健, 骆骄阳, 秦家安, 等. 间接和直接竞争酶联免疫吸附法快速检测中药材中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的对比研究[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(22): 5861-5866.
- [13] 覃冬杰, 张鹏, 钟文俊, 等. QuEChERS-LC-MS/MS 法同时测定陈香露白露片中 10 种真菌毒素[J]. 中成药, 2022, 44(7): 2282-2285.
- [14] 许莉, 黄晓婧, 罗霄等. 使君子中 22 种真菌毒素 UHPLC-MS/MS 同步检测与风险评估[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 984-987.
- [15] 胡佳哲, 陈俏, 曹雅静, 等. 首批立法保护岭南中药材中真菌毒素的 LC-MS/MS 法检测 [J]. 药物分析杂志, 2020, 40(3): 477-482.
- [16] 王东旭, 王新财, 王凤丽, 等. 挥发性铵盐盐析辅助液液萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法测定酱油中 4 种黄曲霉毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4634-4640.
- [17] 万青, 肖凌, 聂晶, 等. 固相萃取-液质联用法测定藤茶中 11 种真菌毒素[J]. 医药导报, 2021, 40(7): 920-926.
- [18] 邵亮亮, 应芙蓉, 杜京霖, 等. 复合免疫亲和柱净化高效液相色谱法同时测定小麦中的 4 种真菌毒素[J]. 食品科技, 2021, 46(2): 328-334.
- [19] 孟繁磊, 牛红红, 何智勇, 等. 基于 UPLC-MS-MS 技术定量确证小麦中 10 种真菌毒素[J]. 食品工业, 2018, 39(1): 149-153.
- [20] 刘笑笑, 丁辉, 吴福祥, 等. 杂质吸附固相萃取-液相色谱串联质谱法同时测定粮食中 15 种真菌毒素[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(1): 155-167.
- [21] 陈悦铭, 黄景初, 徐婷, 等. 多功能免疫亲和柱净化-超高效液相色谱串联质谱法快速检测咖啡豆中的 11 种真菌毒素[J]. 食品工业科技, 2021, 42(16): 285-293.
- [22] 周颖, 唐登峰, 李文庭, 等. 固相萃取-液相色谱-质谱法测定益母草中 7 种真菌毒素[J]. 化学分析计量, 2020, 29(3): 51-54.
- [23] 李洪波, 宋志超, 陈蔷, 等. 复合免疫亲和柱净化 UPLC-MS/MS 测定饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、玉米赤霉烯酮和 T-2 毒素[J]. 中国饲料, 2022(5): 79-83.
- [24] 和佳鸳, 张春玲, 蒲彦利, 等. 复合免疫亲和柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定婴幼儿谷物辅食中 10 种真菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(9): 1044-1048.