

QuEChERS-LC-MS/MS 法同时测定陈香露白露片中 10 种真菌毒素

覃冬杰¹, 张鹏², 钟文俊¹, 覃华亮¹, 刘永逸^{1*}

(1. 柳州市质量检验检测研究中心, 广西柳州 545006; 2. 广西壮族自治区花红药业集团股份有限公司, 广西柳州 545007)

摘要: 目的 建立 QuEChERS-LC-MS/MS 法测定陈香露白露片(陈皮、川木香等)中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮, 伏马毒素 B₁、B₂, T-2 毒素, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量。方法 该药物的分析采用 Boltimate C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm); 流动相 [0.1% 甲酸+2 mmol/L 甲酸铵] - [甲醇-乙腈(1:1)], 梯度洗脱; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; ESI 离子源, 正负离子模式, 多反应模式检测。结果 10 种真菌毒素在各自范围内呈良好的线性关系($r>0.9983$), 平均加样回收率 80.7%~109.6%。结论 该方法简便快速, 准确灵敏, 可用于陈香露白露片的质量控制。

关键词: 陈香露白露片; 真菌毒素; QuEChERS; LC-MS/MS

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2282-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.038

陈香露白露片由陈皮、川木香等 9 种药材组成, 具有健胃和中、理气止痛的功效^[1], 因处方中陈皮易发霉变质, 而且所有药材均为生粉入药, 故根据 2020 年版《中国药典》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检测^[2]。

真菌毒素是产毒真菌产生的有毒代谢物, 对人体有致畸、致癌、致突变作用^[3-6], 较为成熟的相关检测方法有气相色谱法^[7]、液相色谱法^[8]、液质联用法^[9]。其中, 液质联用法以其高灵敏度、高选择性、多目标物同时检测的优点, 成为了目前常用手段。在前处理方面, 大多采用固相萃取柱^[10-12]、分散固相萃取^[13-15]净化, 其中 QuEChERS 法以其快速、简便、廉价、有效、耐用、安全、回收率高等优点, 正越来越多地应用于真菌毒素的检测。因此, 本实验采用 QuEChERS-LC-MS/MS 联用技术测定陈香露白露片中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮, 伏马毒素 B₁、B₂, T-2 毒素, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇的含量, 以期评价该制剂安全性提供参考依据。

1 材料

1.1 仪器 LC-30AD 超高效液相色谱仪(日本岛津公司); Triple Quad 4500 三重四极杆质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); SK8200HP 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); 3-30K 台式高速离心机(德国 Sigma-Aldrich 公司); VIBRAX VXR 振荡器(德国 IKA 集团); TTL-DCII 型

氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司); XP26 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); 24 UV 超纯水器(德国默克密理博公司)。

1.2 材料 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮, 伏马毒素 B₁、B₂, T-2 毒素, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇对照品, 纯度均大于 95%, 购于青岛普瑞邦生物工程公司。¹³C₁₈-玉米赤霉烯酮(25 μg/mL)、¹³C₁₅-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(25 μg/mL)标准溶液均购于美国 Romer Labs 公司。陈香露白露片共 20 批, 由广西壮族自治区花红药业集团股份有限公司提供, 批号分别为 20190402、20190705、20190922、20191001、20191106、20200102、20200301、20200502、20200522、20200630、20200701、20200715、20200724、20200817、20201101、20201103、20201105、20201106、20201109、20201114。流动相所用甲醇、乙腈均为色谱纯, 购自美国 Thermo Fisher 公司; 其余试剂均为分析纯; 水为自制超纯水。

2 方法与结果

2.1 分析条件

2.1.1 色谱条件 Boltimate C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 2.6 μm); 流动相 [0.1% 甲酸+2 mmol/L 甲酸铵] (A) - [甲醇-乙腈(1:1)] (B), 梯度洗脱(0~2.0 min, 95% A; 2.0~2.1 min, 95%~60% A; 2.1~7.0 min, 60%~45% A; 7.0~10.0 min, 45%~10% A); 体积流量 0.3 mL/min;

收稿日期: 2021-02-02

作者简介: 覃冬杰(1986—), 男(壮族), 硕士, 主管药师, 从事药品检测分析及质量控制研究。Tel: 13768898553, E-mail: 176425865@qq.com

*通信作者: 刘永逸(1973—), 男, 硕士, 副主任药师, 从事食品药品检验和质量标准研究。Tel: 13807723600, E-mail: 1447667562@qq.com

网络出版日期: 2021-09-22

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210920.0153.008.html>

柱温 30 ℃；进样量 1 μL。

2.1.2 质谱条件 电化学喷雾 ESI 离子源；正、负离子模式，多反应监测 (MRM) 模式采集；离子源温度 550 ℃；

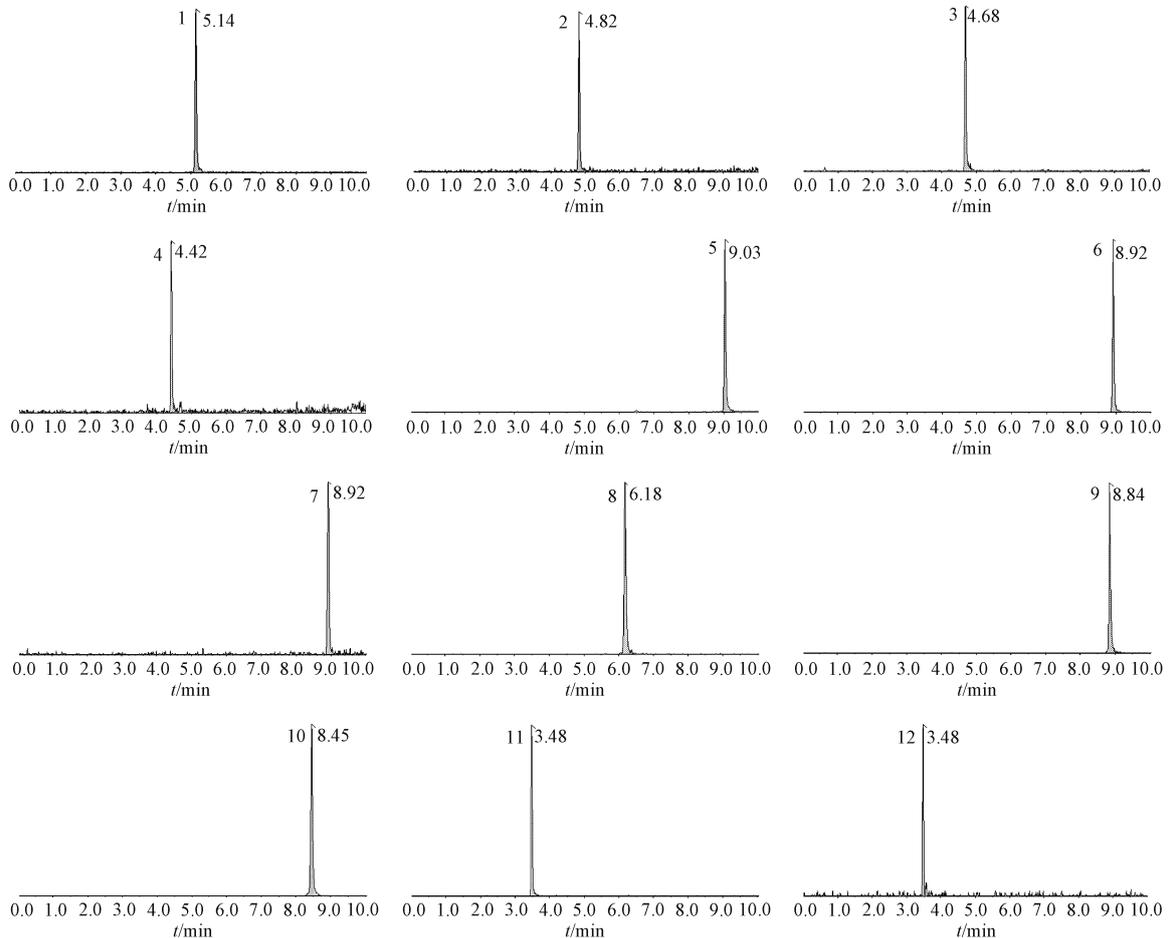
气帘压力 25 psi (1 psi = 0.133 kPa)；雾化器压力 45 psi；

辅助加热器压力 55 psi。质谱参数见表 1，MRM 色谱图见图 1。

表 1 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	去簇电压/V	碰撞能/eV
黄曲霉毒素 B ₁	+	313.1	241.0 [*] /285.1	140	50/40
黄曲霉毒素 B ₂	+	315.1	259.1 [*] /287.1	140	35/40
黄曲霉毒素 G ₁	+	329.1	243.1 [*] /311.1	140	35/30
黄曲霉毒素 G ₂	+	331.1	313.1 [*] /245.1	140	33/40
赭曲霉毒素 A	-	402.1	358.1 [*] /211.0	-110	-28/-38
玉米赤霉烯酮	-	317.2	175.1 [*] /131.2	-150	-32/-38
¹³ C ₁₈ -玉米赤霉烯酮	-	335.1	290.2 [*] /185.2	-150	-40/-48
伏马毒素 B ₁	+	722.3	334.4 [*] /352.4	100	53/49
伏马毒素 B ₂	+	706.4	336.1 [*] /318.4	100	49/52
T-2 毒素	+	489.2	245.2 [*] /387.1	150	29/36
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	+	297.1	249.1 [*] /231.1	120	17/18
¹³ C ₁₅ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇	+	312.2	263.1 [*] /246.0	120	17/18

注：* 为定量离子。



注：1 为黄曲霉毒素 B₁，2 为黄曲霉毒素 B₂，3 为黄曲霉毒素 G₁，4 为黄曲霉毒素 G₂，5 为赭曲霉毒素 A，6 为玉米赤霉烯酮，7 为¹³C₁₈-玉米赤霉烯酮，8 为伏马毒素 B₁，9 为伏马毒素 B₂，10 为 T-2 毒素，11 为脱氧雪腐镰刀菌烯醇，12 为¹³C₁₅-脱氧雪腐镰刀菌烯醇。

图 1 各真菌毒素 MRM 色谱图

2.2 对照品溶液制备 精密称取黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、赭曲霉毒素 A，玉米赤霉烯酮，伏马毒素 B₁、B₂、T-2

毒素对照品适量，加甲醇制成质量浓度为 5 μg/mL 的单标贮备液；精密称取脱氧雪腐镰刀菌烯醇对照品适量，加甲

醇制成质量浓度为 500 μg/mL 的单标贮备液, 置于-20 °C 冰箱中备用; 精密量取¹³C₁₈-玉米赤霉烯酮、¹³C₁₅-脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准溶液适量, 加甲醇制成质量浓度分别为 40、4 μg/mL 的混合内标溶液, 置于-20 °C 的冰箱中备用, 即得。

2.3 供试品溶液制备 取片剂 50 片, 研细, 精密称取 2 g, 置于 50 mL 离心管中, 精密加入混合内标溶液 100 μL, 待溶剂挥干后精密加入乙腈-10% 甲酸 (9 : 1) 20 mL, 超声处理 10 min, 加入 4 g 无水 MgSO₄、1 g NaCl, 涡旋 2 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 精密量取上清液 5 mL 至 10 mL 离心管中, 加入 100 mg C₁₈、300 mg 无水 MgSO₄, 涡旋 2 min, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液至 10 mL 离心管中, 40 °C 氮气吹至近干, 加入初始流动相定容至 1 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

表 2 各真菌毒素线性关系

真菌毒素	回归方程	r	线性范围/(ng·mL ⁻¹)	检出限/(μg·kg ⁻¹)	定量限/(μg·kg ⁻¹)
黄曲霉毒素 B ₁	Y=10 246X-973. 42	0. 999 2	0. 5~10	0. 3	1. 0
黄曲霉毒素 B ₂	Y=7 062. 8X+276. 6	0. 998 9	0. 5~10	0. 3	1. 0
黄曲霉毒素 G ₁	Y=5 689. 9X-707. 86	0. 999 6	0. 5~10	0. 3	1. 0
黄曲霉毒素 G ₂	Y=5 463. 8X+396. 33	0. 998 3	0. 5~10	0. 3	1. 0
赭曲霉毒素 A	Y=2 930. 7X+1 383. 8	0. 999 4	0. 5~10	0. 3	1. 0
玉米赤霉烯酮	Y=0. 786 4X+2. 523 3	0. 998 9	0. 5~10	0. 3	1. 0
伏马毒素 B ₁	Y=659. 63X-1 467. 2	0. 998 6	5~100	3. 2	10. 7
伏马毒素 B ₂	Y=917. 81X-2 044. 8	0. 999 6	5~100	3. 0	10. 0
T-2 毒素	Y=1 660. 3X+5 224. 2	0. 999 6	5~100	2. 7	9. 0
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Y=0. 817 5X-1. 202 4	0. 999 8	50~1 000	30. 6	101. 9

2.6 方法学考察 取空白样品, 加入一定量对照品溶液, 按“2.3”项下方法分别制备低、中、高水平供试品溶液 (黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮添加水平为 1、5、10 μg/kg, 伏马毒素 B₁、B₂, T-2 毒素添加水平为 10、50、100 μg/kg, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇添加水平为 100、500、1 000 μg/kg), 每个水平平行 6 份。取中水平 1 份, 在“2.1”项条件下进样测定 6 次, 计算精密度 RSD; 另取 1 份, 于 0、4、8、12、24 h 在“2.1”项条件下进样测定, 计算稳定性 RSD; 另取 6 份, 在“2.1”项条件下进样测定, 计算重复性 RSD; 3 种水平各取 6 份, 在“2.1”项条件下进样测定, 计算回收率。结果, 10 种真菌毒素精密度 RSD 为 0.7%~2.2%, 稳定性 RSD 为 1.3%~3.3%, 重复性 RSD 为 0.9%~2.8%, 平均加样回收率为 80.7%~109.6%, 均符合相关要求。

2.7 样品含量测定 以建立的方法对 20 批样品进行测定, 发现有 2 批检出黄曲霉毒素 B₁, 质量分数分别为 0.6、0.7 μg/kg; 有 1 批检出赭曲霉毒素 A, 质量分数为 3.3 μg/kg; 其余真菌毒素均未检出。

3 讨论

3.1 前处理考察

3.1.1 提取条件 比较不同比例的乙腈-水系统, 发现 9 : 1 时回收率最高。进一步比较了不同 pH 值对回收率的影响, 发现随着甲酸加入, 伏马毒素 B₁、B₂ 的回收率显著提高, 当以乙腈-10% 甲酸 (9 : 1) 为提取溶剂时, 各真菌毒

2.4 基质效应 以基质标准曲线的斜率与溶剂标准曲线的斜率的比值来评价基质效应, 发现黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮, 伏马毒素 B₁、B₂, T-2 毒素, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇分别为 67.3%、70.5%、81.4%、84.5%、88.6%、68.9%、126.1%、131.0%、58.6%、65.8%, 大部分有明显的基质效应, 故需采用基质标准曲线法进行定量分析。

2.5 线性关系考察 取空白样品, 按“2.3”项下方法处理, 制备空白基质液, 用以配制混合系列标准工作液, 在“2.1”项条件下进样测定。以各真菌毒素峰面积为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行回归, 再分别以各组分 3、10 倍基线噪音时所对应的质量浓度为检出限、定量限, 结果见表 2, 可知各真菌毒素在各自范围内呈良好的线性关系。

素回收率均大于 80%。

3.1.2 净化方式 比较了 GCB、PSA、C₁₈ 与无水 MgSO₄ 作为净化材料对回收率的影响, 发现当加入 GCB 时, 玉米赤霉烯酮回收率明显下降; 当加入 PSA 时, 伏马毒素 B₁、B₂ 和赭曲霉毒素 A 回收率也明显下降; 仅用 C₁₈ 与无水 MgSO₄ 作为净化材料时, 有最好的净化效果, 回收率最高, 最优净化材料为 100 mg C₁₈ 和 300 mg 无水 MgSO₄。

3.2 色谱条件考察 比较了甲醇、乙腈、甲醇-乙腈 (1 : 1) 系统, 发现在甲醇-乙腈 (1 : 1) 系统下各组分有较适宜的出峰时间, 可在较短时间内完成分析测定。水相加入甲酸时, 正离子模式组分的响应值明显提高, 但其体积分数过高时, 负离子模式组分的响应值会降低; 当加入甲酸铵时, 情况则相反。由于本实验是正负离子同时采集, 为兼顾所有组分, 最终以 0.1% 甲酸+2 mmol/L 甲酸铵作为水相, 此时各真菌毒素响应值最高。

3.3 质谱条件考察 分别取各真菌毒素单标液, 分别在正、负离子模式下进行母离子扫描, 选取各自响应值最高的模式进行采集。二级质谱分析时, 选取响应值高而稳定的 2 个子离子分别作为定性、定量离子, 通过仪器自动优化最佳的去簇电压和碰撞能量, 使响应值最高。

4 结论

本实验建立的方法简便快速, 准确灵敏, 经方法学验证, 各项指标均满足分析要求, 可作为陈香露白露片中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂, 赭曲霉毒素 A, 玉米赤霉烯酮,

伏马毒素 B₁、B₂、T-2 毒素, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 10 种真菌毒素含量的快速测定方法。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准(中药成方制剂第八册)[S]. 1993: 87.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 525.
[3] 黄晓静, 王少敏, 毛丹, 等. 镰刀菌属真菌毒素的毒性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(8): 3117-3128.
[4] 黄晓静, 王少敏, 毛丹, 等. 曲霉属真菌毒素的毒性研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(5): 1679-1687.
[5] 胡佳哲, 赖宇红, 陈浩桢. 中药材中常见真菌毒素污染状况及分析方法研究进展[J]. 海峡药学, 2019, 31(1): 1-5.
[6] 张鑫, 王福, 陈鸿平, 等. 中药材真菌及真菌毒素污染研究现状[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2015, 17(11): 2381-2388.
[7] 唐吉旺, 周丛, 林源, 等. 毛细管柱-气相色谱法测定谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和雪腐镰刀菌烯醇含量[J]. 理化检验(化学分册), 2012, 48(12): 1441-1443.
[8] 栗建明, 顾利红, 隆颖. 高效液相色谱柱后衍生法测定归脾丸中的黄曲霉毒素[J]. 今日药学, 2017, 27(7):

460-462.
[9] 毛丹, 叶林链, 王少敏, 等. LC-MS/MS法同时测定中药肉豆蔻中12种真菌毒素[J]. 中国药师, 2020, 23(7): 1311-1315.
[10] 黄晓燕, 方磊, 李荣玮, 等. HPLC法测定小儿扶脾颗粒中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 含量[J]. 中国药师, 2018, 21(2): 334-336.
[11] 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.
[12] 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.
[13] 范妙璇, 董娇娇, 王京辉, 等. QuEChERS-超高效液相-三重四极杆串联质谱测定白茅根中16种真菌毒素[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(19): 3770-3775.
[14] 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.
[15] 王少敏, 黄晓静, 毛丹, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法同时测定中药瓜蒌皮中22种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 5843-5850.

基于 PI3K/Akt 通路研究孕育丹糖浆防治大鼠多囊卵巢综合征不孕症的机制

徐云霞¹, 徐璐萍², 卞景新²

(1. 安徽中医药大学第一附属医院妇产科, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038)

摘要: 目的 观察孕育丹糖浆对多囊卵巢综合征(PCOS)大鼠卵巢组织中PI3K/Akt信号通路表达的影响, 探讨其防治多囊卵巢综合征不孕症的可能机制。方法 大鼠随机分为正常组、模型组、枸橼酸氯米芬组及孕育丹糖浆低、中、高剂量组, 每组10只, 除正常组外各组均采用来曲唑诱导建立PCOS模型, 每天于同一时间点灌胃给药1次, 持续12d, 给药最后5d每天进行阴道涂片, 观察大鼠动情周期。ELISA法检测血清雌二醇(E₂)、睾酮(T)、卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)水平, HE染色观察卵巢及卵泡形态, Western blot法检测卵巢组织PI3K、Akt、p-Akt、VEGF蛋白表达, RT-qPCR法检测卵巢组织PI3K、Akt、VEGF mRNA表达。结果 与模型组比较, 孕育丹糖浆给药后不仅可以改善PCOS大鼠卵泡发育及性激素水平(P<0.05, P<0.01), 还可降低血管内皮生长因子(VEGF)水平, 上调PI3K、Akt、p-AKT、VEGF蛋白和PI3K、Akt、VEGF mRNA表达(P<0.05, P<0.01)。结论 孕育丹糖浆可能是通过激活PI3K/Akt信号通路来改善PCOS大鼠卵巢功能, 提高卵泡质量, 增加排卵率, 从而提高妊娠率。

关键词: 孕育丹糖浆; 多囊卵巢综合征; 不孕症; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2285-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.039

收稿日期: 2022-03-18

基金项目: 安徽省卫生健康委、安徽省中医药管理局、安徽省中医药学术流派“庐江徐氏妇科流派”传承工作室建设项目(皖中医药发展秘[2021]30); 安徽高校自然科学研究项目(KJ2020A0446)

作者简介: 徐云霞(1978—), 女, 硕士, 副主任医师, 研究方向为中西医结合治疗妇科疾病。Tel: 13083448356, E-mail: xyxcloud@sina.com