液液萃取 -HPLC-MS/MS 测定发酵药物中 4 种黄曲霉毒素

吴春艳[1,2]，杨荷友[2]，徐海菊[1]，邵伍军[1,2]*，和燕玲[2]*

（1. 台州科技职业学院，浙江台州 318000；2. 浙江海正药业股份有限公司，浙江台州 318000）

摘要：建立了一种液液萃取 - 高效液相色谱 - 三重四极杆质谱（HPLC-MS/MS）法，分析发酵药物中 4 种黄曲霉毒素（AF）（B_1、B_2、G_1、G_2）的残留量。样品先经水溶解，再用二氯甲烷液液萃取，然后氮吹浓缩、经 30％甲醇溶液复溶，最后经 HPLC-MS/MS 检测分析。结果显示，4 种 AF 在 0.10 ～ 10 ng/L 内线性关系良好，检测限为 0.03 μg/kg，定量限为 0.1 μg/kg。在发酵药物基质中，AF 的加标回收率为 80％～ 105％，RSD 为 0.2％～ 5％。样品检测结果显示，8 种发酵药物中 AF 均未检出。建立的方法简单、灵敏，准确度高，既可定量检测 AF，又可为发酵药物的质量控制及 AF 污染控制提供有力的技术支持。

关键词：液液萃取；高效液相色谱；三重四极杆质谱；发酵药物；黄曲霉毒素；污染控制

中图分类号：R917；TQ920　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255（2025）04-0525-06

引用：吴春艳，杨荷友，徐海菊，等．液液萃取 -HPLC-MS/MS 测定发酵药物中 4 种黄曲霉毒素［J］．中国医药工业杂志，2025, 56（4）: 525-530．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.04.013

Determination of Four Aflatoxins in Fermented Drugs by Liquid-liquid Extraction-HPLC-MS/MS

WU Chunyan[1,2], YANG Heyou[2], XU Haiju[1], SHAO Wujun[1,2]*, HE Yanling[2]*

（*1. Taizhou Vocational College of Science & Technology, Taizhou 318000; 2. Zhejiang Hisun Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318000*）

ABSTRACT: A liquid-liquid extraction-high performance liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry（HPLC-MS/MS）method was established to analyze the residual levels of four aflatoxins（AF）, namely AFB_1, AFB_2, AFG_1, and AFG_2, in the fermented drugs. The sample was dissolved in water and extracted with dichloromethane, and then concentrated by nitrogen blowing and dissolved in 30％ methanol. Finally, it was detected by the HPLC-MS/MS method. The results showed that it was linear for four AFs in the range of 0.10 – 10 ng/L, with a detection limit of 0.03 μg/kg and a quantification limit of 0.1 μg/kg. In the fermented drug matrix, the spiked recovery rate of AFs was 80％ – 105％, with the RSD of 0.2％ – 5％. The sample testing results showed that AF was not detected in any of the 8 fermented drugs. The established method is simple, sensitive, and highly accurate, which can quantitatively detect AF and provide strong technical support for the quality control of fermented drugs and AF contamination control.

Key Words: liquids extraction; HPLC; triple quadrupole mass spectrometry; fermented drug; aflatoxin; contamination control

黄曲霉毒素（aflatoxins，AF）是黄曲霉菌和寄生曲霉菌新陈代谢的产物，为真菌毒素的一种，对热不敏感，具有免疫毒性[1]、致突变性和遗传毒性[2]，是公认的最强烈的一种自然致癌物[3—4]。黄曲霉菌和寄生曲霉菌主要寄生在食品、调味品、饲料中，并产生毒素，可引起人和畜禽中毒[5]。AF 衍生物有 20 多种，分别命名为 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2、

收稿日期：2024-06-16

基金项目：浙江省 2023 年度高校国内访问工程师“校企合作项目”（FG2023323）

作者简介：吴春艳（1990—），女，博士，副教授，专业方向：药物分析方法开发。

通信作者：邵伍军（1979—），男，高级工程师，从事药物质量与控制的研究。

E-mail：shaowj@hisunpharm.com

和燕玲（1978—），女，工程师，从事创新药物的药理研究。

E-mail：yanlinghe2000@163.com

AFM_1、AFM_2、AFG/M、AFP_1、AFQ_1、毒醇等[6]。AF 属于Ⅰ类致癌物，其中 AFB_1 是目前已知致癌物质中致癌性最强烈的毒性物质，能诱发动物肝癌，能引起某些动物急性中毒，甚至死亡[7—8]。因此，WHO 和联合国粮食及农业组织（Food and Agriculture Organization，FAO）把真菌毒素列为食源性疾病的三大根源之首。我国是真菌毒素污染严重的国家之一，ChP 2020 年版规定，AFB_1 不得过 5 μg/kg；AFB_2、AFG_1、AFG_2 总量不得过 10 μg/kg。发酵类药物所用的粮食类原材料可能寄生有黄曲霉菌或寄生曲霉菌，产生 AFB_1、AFB_2、AFG_1、AFG_2 等，因此需对这些产品中的 AF 残留情况进行监测。

目前报道的 AF 检测方法主要有 HPLC 法[9—10]、免疫分析法[11—12]和质谱法[13—14]。HPLC 法是检测 AF 常用的方法之一，但样品需经提取、净化、衍生化等前处理，前处理烦琐、检测周期长、成本高。免疫分析法具有检测速度快、成本低等特点，但一种试剂盒只能针对一种 AF 进行检测，不能同时检测多种 AF；同时，该方法中使用的酶不稳定，易出现假阳性结果，不适合药品中 AF 的放行检测。质谱法近几年在药物分析、食品安全、环境监测等领域得到了广泛应用，目前也被应用到真菌毒素的检测中。但文献[13—14]报道的真菌毒素的质谱检测方法样品前处理操作复杂，AF 需经提取、QuEChERS 萃取盐包萃取、离心、净化柱净化等前处理步骤，成本高、耗时长，不适用于大批量药品中 AF 的放行检测。

本研究建立了一种液液萃取 - 高效液相 - 三重四极杆质谱联用的定量检测方法，样品依次经水超声溶解、二氯甲烷萃取、萃取液氮气吹干、稀释剂再溶解，然后直接上机检测。该方法样品前处理简单、耗时短，样品基质对检测干扰小，适于药厂大批量样品中 AF 的放行检测，可为其他药品中 AF 的检测提供参考[15]。

1　仪器与试药

ACQUITY I UPLC® PLUS\XEVO TQ-XS 型高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪（美国 Waters 公司）；XPE205 型十万分之一天平（美国梅特勒托利多公司）。

AFB_1（CAS 号 1162-65-8，含量≥ 99.0%）、AFB_2（CAS 号 7720-81-7，含量≥ 99.9%）、AFG_1（CAS 号 1165-39-5，含量≥ 99.0%）、AFG_2（CAS 号 7241-98-7，含量≥ 99.0%）的标准品，均购自美国 Sigma 公司；甲醇、二氯甲烷为色谱纯，甲酸铵为质谱纯。

发酵药物：阿卡波糖（含量 98.2%，批号 231101、231102、231103）、吗替麦考酚酯（含量 99.8%，批号 221210、221211、221213）、1,4- 丁二磺酸腺苷蛋氨酸（含量 98.3%，批号 230503、230504、230505）、L- 赖氨酸（含量 99.6%，批号 231009、231010、231011）、谷胱甘肽（含量 99.6%，批号 221205、221206、221207）、磷酸氟达拉滨（含量 98.9%，批号 230701、230702、230703）、替考拉宁（含量 98.6%，批号 20231204、20231205、20231206）、艾莫德斯（含量 99.9%，批号 20231204、20231205、20231206），均为浙江海正药业股份有限公司生产。

2　方法与结果

2.1　色谱和质谱条件

色谱条件：色谱柱 Waters CORTECS® UPLC® C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）；流动相 A 为 10 mmol/L 甲酸铵溶液，B 为甲醇，梯度洗脱（0—3.0 min，B 30%—80%；3.0—5.0 min，B 80%；5.0—5.1 min，B 80%—30%；5.1—7.0 min，B 30%）；流速 0.3 mL/min；柱温 40 ℃；进样量 10.0 μL。

质谱条件：离子源 电喷雾电离（electrospray ionization, ESI）源，正离子扫描模式，多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式；离子源温度 150 ℃，毛细管电压 0.5 kV，电喷雾探头温度 550 ℃；脱溶剂气流速 1 000 L/h；雾化气压力 600 kPa；锥孔电压 35 V；锥孔气流速 150 L/h；采集及分析软件为 MassLynx，4 种 AF 的其余质谱参数如表 1 所示。

2.2　溶液配制

标准贮备溶液：取 4 种 AF 标准品适量，用甲醇溶解并稀释，制成含 AF 100 ng/mL 的贮备溶液，备用。

对照品溶液：取标准贮备溶液 1 mL，置 25 mL 量瓶中，用 30%甲醇溶液定容，混匀。

线性溶液：取标准贮备溶液，用 30%甲醇溶液

表 1 4 种黄曲霉毒素的保留时间和质谱参数

Tab.1 Retention Times and MS Parameters of the 4 Aflatoxins

黄曲霉毒素	保留时间 /min	离子对 (*m/z*)	碰撞能量 /eV
AFB1	2.47	313.0/285.0*	22
		313.0/241.0	40
AFB2	2.33	315.0/287.0*	26
		315.0/259.0	30
AFG1	2.17	329.0/243.0*	25
		329.0/311.0	22
AFG2	2.02	331.0/313.0*	24
		331.0/245.0	29

注：* 表示定量离子。

稀释，配制成含 AF 0.10 ～ 10.00 ng/L 的溶液，每个线性浓度平行配制 2 份。

定量限溶液：取标准贮备溶液，用 30% 甲醇溶液稀释，配制成含 AF 0.10 ng/L 的溶液，平行配制 6 份。

检测限溶液：量取定量限溶液 3 mL，置 10 mL 量瓶中，用 30% 甲醇溶液定容，混匀。

加标溶液：取标准贮备溶液，用水稀释配制成含 AF 0.04 ng/L（低浓度加标溶液）、2 ng/L（中浓度加标溶液）、3.2 ng/L（高浓度加标溶液）的溶液。

2.3 样品前处理

称取样品 600 mg 置 15 mL 离心管中，加入蒸馏水 5 mL，超声溶解 5 min，再加入二氯甲烷 2 mL，混匀，静置 2 min，弃去上层溶液，移取下层溶液 1 mL 于 15 mL 离心管中，氮气吹干，加入 30% 甲醇溶液 1 mL 溶解，得样品溶液，供高效液相色谱 - 三重四极杆质谱分析。

2.4 方法学研究

2.4.1 专属性考察

取空白溶剂（30% 甲醇溶液）、对照品溶液、样品溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，记录色谱图。结果如图 1 所示，空白溶剂、样品溶液对 4 种 AF 的检测不存在干扰，专属性良好。

2.4.2 线性试验、检测限和定量限

取“**2.2**”项下线性溶液、定量限溶液、检测限溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定，以 AF 定量离子对的质量浓度 *c* 为横坐标、平均峰面积 *A* 为纵坐标，通过线性回归拟合，得到 4 种 AF 线性方程及回归系数，如表 2 所示。结果表明，4 种 AF 在 0.10 ～ 10 ng/L 内线性关系良好，相关系数（*r*）为 0.999 5 ～ 0.999 9。

按定量限溶液信噪比 >10 的要求，4 种 AF 的定量限为 0.1 μg/kg；按检测限溶液信噪比 >3 的要求，4 种 AF 的检测限为 0.03 μg/kg。

2.4.3 精密度和准确度

称取阿卡波糖、吗替麦考酚酯、1,4- 丁二磺酸腺苷蛋氨酸、L- 赖氨酸、谷胱甘肽、磷酸福达拉滨、替考拉宁和艾莫德斯 8 种水溶性发酵药物的样品各 600 mg，每种样品 12 份，其中 3 份样品分别加入“**2.2**”项下低浓度加标溶液 5 mL，6 份样品分别加入“**2.2**”项下中浓度加标溶液 5 mL，3 份样品分别加入“**2.2**”

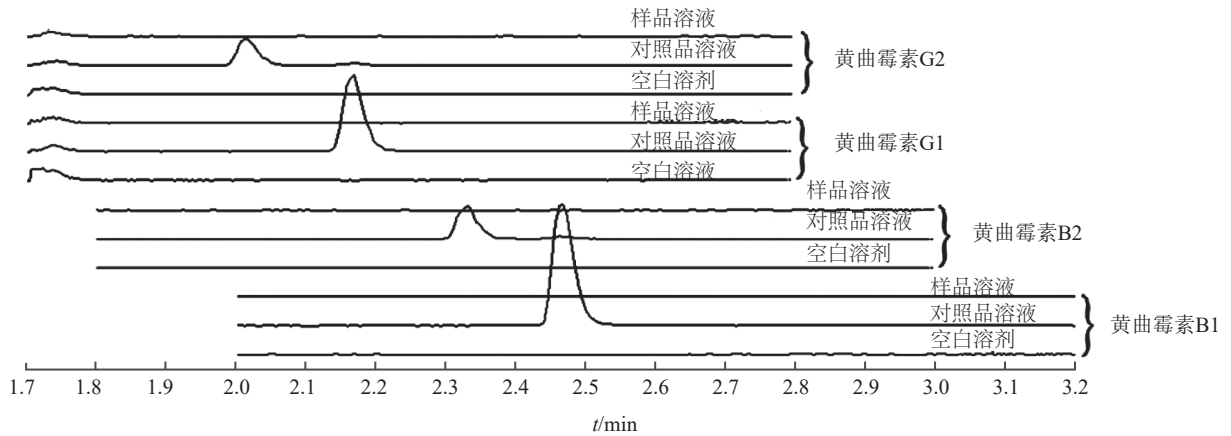


图 1 典型色谱图

Fig.1 Typical Chromatogram

表 2　4 种黄曲霉毒素的线性范围、相关系数（*r*）、检测限和定量限

Tab.2　Linearity Ranges, Linear Equations, Correlation Coefficients (*r*), LODs and LOQs of Four Aflatoxins

AF	线性范围 /(ng·L^{-1})	线性方程	*r*	LOQ/(μg·kg^{-1})	LOD/(μg·kg^{-1})
AFB1	0.10 ～ 10	*A*=836.708 9*c* − 148.548 8	0.999 7	0.1	0.03
AFB2	0.10 ～ 10	*A*=676.343 1*c* − 98.808 1	0.999 5	0.1	0.03
AFG1	0.10 ～ 10	*A*=746.334 5*c* − 338.177 2	0.999 9	0.1	0.03
AFG2	0.10 ～ 10	*A*=462.568 7*c* − 43.026 9	0.999 9	0.1	0.03

项下高浓度加标溶液 5 mL。按“**2.3**”项下方法处理样品，进行精密度和准确度试验，并计算 RSD。结果表明，在 8 种水溶性发酵药物中，4 种 AF 的低（*n*=3）、中（*n*=6）、高（*n*=3）水平的平均加标回收率为 80%～ 105%，RSD 为 0.2%～ 5%，说明该方法具有良好的精密度和准确度，可准确测定发酵药物中的 AF 残留量。

2.4.4　稳定性试验

取对照品溶液、样品溶液、加标溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件，于 0、6、12 h 时取样分析并记录色谱图，考察对照品溶液、样品溶液、样品加标溶液的稳定性。结果表明，对照品溶液中 4 种黄曲霉毒素在 0、6、12 h 时的峰面积与系统适用性溶液峰面积的 RSD（*n*=7）为 0.9%～ 4.5%（要求 < 10%）；8 种发酵药物样品中在 0、6、12 h 时均未检测到 4 种黄曲霉毒素；样品加标溶液在 0、6、12 h 时，4 种黄曲霉毒素的平均回收率（*n*=3）88.35%～ 101.05%，说明对照品溶液、样品溶液、样品加标溶液在 12 h 内稳定。

2.5　样品测定

取 8 种发酵药物，按“**2.3**”项下方法将样品处理成样品溶液，按“**2.1**”项下色谱质谱条件进样测定。结果表明，8 种发酵药物中均未检出 4 种黄曲霉毒素。

3　讨论

3.1　质谱条件优化

通过蠕动泵将对照品溶液以 10 μL/min 的流速注入质谱仪中，在正离子模式下进行一级质谱全扫描，调节毛细管电压、锥孔电压、电喷雾探头温度、脱溶剂气流速、雾化气压力、锥孔气流速等质谱参数，使 4 种黄曲霉毒素的母离子响应值最高。全扫描结果表明，当毛细管电压为 0.5 kV、电喷雾探头温度为 550 ℃、脱溶剂气流速为 1 000 L/h、雾化气压力为 600 kPa、锥孔电压为 35 V、锥孔气流速为 150 L/h 时，4 种黄曲霉毒素的母离子响应值最高。MRM 模式二级质谱定量扫描时，通过优化碰撞能量，使二级质谱离子响应值最高，每个化合物选择 2 个特征离子，响应值高的离子作为定量离子，较低响应值的离子作为定性离子。4 种黄曲霉毒素 MRM 特征定量离子质谱图如图 2 所示。

3.2　色谱条件优化

3.2.1　色谱柱的选择

色谱柱的填料、柱长、柱径和类型是分离目标化合物的重要因素，选择合适的色谱柱，可以提高目标化合物和样品的分离度，同时可以减少基质对目标物测定的影响，提高质谱响应的灵敏度。本试验比较了 Waters CORTECS® UPLC® C_{18} 柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）、Agilent Eclipse Plus C_{18} RRHD 柱（2.1 mm×50 mm，1.8 μm）、Waters ACQUITY UPLC® HSS T3 柱（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）3 种色谱柱的分离效果。结果表明，3 种色谱柱对 AF 和样品基质均可实现分离，但使用 Waters CORTECS® UPLC® C_{18} 色谱柱时，AF 与基质分离效果更好、峰形更对称、更尖锐，推测可能是该色谱柱的填料粒径更小，小粒径填料色谱柱可以增加化合物的分离度和峰形对称性，提高化合物的质谱响应。因此，本试验最终选择 Waters CORTECS® UPLC® C_{18} 色谱柱（2.1 mm×100 mm，1.6 μm）。

3.2.2　流动相的选择

流动相的 pH 值、缓冲盐种类及浓度、有机相的种类均会影响目标化合物出峰时间、与基质的分离度及化合物在质谱的响应强度。本试验考察了甲酸铵 - 甲醇、甲酸铵 - 乙腈、甲酸 - 甲醇、甲酸 - 乙腈等流动相体系。结果表明，当有机相为甲醇时，4 种 AF 在质谱中的响应强度均高于乙腈；当无机相

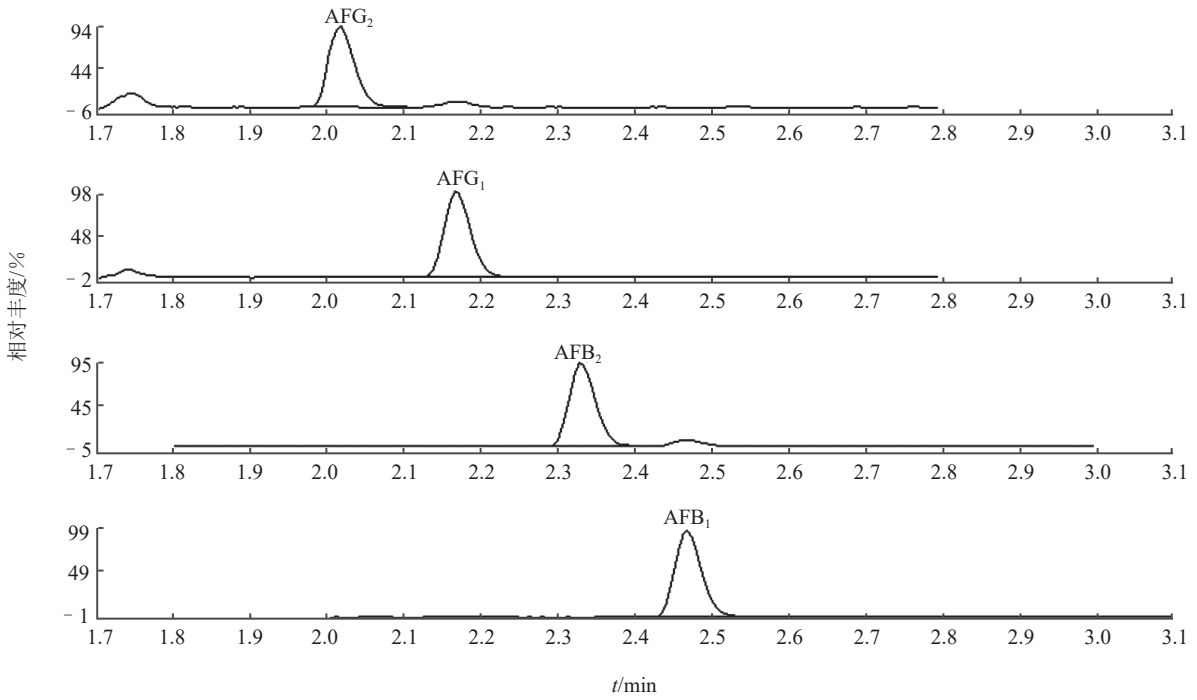


图 2 4 种黄曲霉毒素的定量离子质谱图

Fig.2 Quantitative Ion Chromatograms of the Four Aflatoxins

采用缓冲盐时，4 种 AF 分离度明显好于甲酸体系。考虑到缓冲盐的浓度太高会抑制化合物在质谱中的响应，同时会污染质谱离子源，甲酸铵的浓度选择 10 mmol/L。因此，流动相体系选择甲酸铵 - 甲醇体系，并梯度洗脱。

3.3 前处理方法的优化

3.3.1 萃取溶剂的选择

据文献[15—16]报道，AF 常见的提取溶剂有甲醇 - 水、乙腈 - 水、甲醇、乙腈等溶剂。本试验所检测的发酵类药物极易溶于水，同时也可溶于甲醇或乙腈。溶剂中的发酵药物会干扰 HPLC-MS/MS 检测 AF，同时会抑制 AF 在质谱中的响应。因此，所选的萃取剂需满足 3 个条件：①萃取剂与水不能互溶；②发酵药物在萃取剂中的溶解度需小于水溶液；③ AF 在萃取剂中的溶解度需大于水溶液。基于此，本试验比较了 DCM、乙酸乙酯、正己烷、乙醚 4 种萃取剂的萃取效果，结果显示 DCM 的萃取效果明显优于乙酸乙酯、正己烷、乙醚，故选用 DCM 为 AF 的萃取剂。

3.3.2 萃取溶剂体积的选择

萃取剂 DCM 的不同加入量会影响 AF 的萃取效果。本试验比较了 DCM 在 2、3、4、6 mL 水平下的萃取效果。结果显示，加入量为 2、3 mL 时，4 种 AF 的加标回收率（n=3）在 75%以上。随着 DCM 加入量的增加，AF 加标回收率反而降低。因此，萃取剂 DCM 加入量为 2 mL。

参考文献：

[1] 姜莲华，张 玉，张 玲，等. 食品中真菌毒素的危害、污染现状及检测技术分析 [J]. 食品科技，2023, **29**(8): 98-100.

[2] BHAT R, RAI R V, KARIM A A. Mycotoxins in food and feed: present status and future concerns [J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2010, **9**(1): 57-81.

[3] MACRI A M, POP I, SIMEANU D, *et al*. The occurrence of aflatoxins in nuts and dry nuts packed in four different plastic packaging from the romanian market [J]. *Microorganisms*, 2020, **9**(1): E61.

[4] 李雅静，秦 曙，杨艳梅，等. 中国谷物真菌毒素污染研究现状 [J]. 中国粮油学报，2020, **35**(3): 186-194.

[5] 叶　萍, 张慧娥, 李　光, 等. 质谱技术在黄曲霉毒素检测中的研究进展[J]. 食品与机械, 2021, **37**(10): 227-234.
[6] 刘　英, 胡建华, 刘春朝. 黄曲霉毒素毒理效应及检测方法[J]. 生物加工过程, 2013, **11**(3): 83-88.
[7] LOI M, FANELLI F, LIUZZI V C, *et al*. Mycotoxin biotransformation by native and commercial enzymes: present and future perspectives[J]. *Toxins*, 2017, **9**(4): 111.
[8] KADEMI H I, BADA I A, SAAD F T. Modelling the dynamics of toxicity associated with aflatoxins in foods and feeds[J]. *Toxicol Rep*, 2017, **25**(4): 358-363.
[9] 汪秀秀. 色谱检测技术对食品真菌毒素的检测方法研究[J]. 现代食品, 2023, **34**(10): 109-111.
[10] ABNOUS K, DANESH N M, RAMEZANT M, *et al*. A novel colorimetric aptasensor for ultrasensitive detection of aflatoxin M1 based on the combination of CRISPR-Cas12a rolling circle amplification and catalytic activity of gold nanoparticles[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, **1165**: 338549.
[11] GAO Y, ZHOU Y Z, CHANDRAWATI R. Metal and metal oxide nanoparticles to enhance the performance of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. *ACS Appl Nano Mater*, 2020, **3**(1): 1-21.
[12] ZHAO Q, LU D, ZHANG G Y, *et al*. Recent improvements in enzyme-linked immu-nosorbent assays based on nanomaterials[J]. *Talanta*, 2021, **223**(Pt 1): 121722.
[13] YE Z, CUI P, WANG Y, *et al*. Simulta-neous determination of four aflatoxins in dark tea by multifunctional purification column and immunoaffinity column coupled to liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, **67**(41): 11481-11488.
[14] 赵　芮, 黄晴雯, 余智颖, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质偶发同时测定水果中36种真菌毒素[J]. 色谱, 2023, **41**(9): 760-770.
[15] 邵伍军, 和燕玲, 袁红露, 等. 一种水溶性发酵药物中微量黄曲霉毒素分析检测方法: 中国, 113390992A[P]. 2023-05-12.
[16] HE Z, WANG L, PENG Y, *et al*. Determination of selected polychlorinated biphenyls in soil and earthworm (*Eisenia fetida*) using a QuEChERS-based method and gas chromatography with tandem MS[J]. *J Sep Sci*, 2015, **38**(21): 3766-3773.

(上接第 504 页)

[4] 严易贵. 药物剂型的含义与特点[J]. 心理医生(下半月版), 2012, (10): 459-460.
[5] ONO A, SUGANO K. Application of the BCS biowaiver approach to assessing bioequivalence of orally disintegrating tablets with immediate release formulations[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2014, **64**: 37-43.
[6] 黎桃敏, 彭帮贵, 张兰兰, 等. 陈皮配方颗粒提取工艺的优化[J]. 中国医药工业杂志, 2023, **54**(8): 1241-1246.
[7] 原国家食品药品监督管理总局. 普通口服固体制剂溶出度试验技术指导原则[EB/OL]. (2015-02-05)[2024-09-24]. https://www. nmpa. gov. cn/xxgk/ggtg/ypggtg/ypqtggtg/20150205120001100. html.
[8] 王光函, 姜　鸿, 刘　晶, 等. 基于多指标综合评分法优选化胃舒颗粒挥发油包合工艺[J]. 中草药, 2020, **51**(6): 1537-1541.
[9] 莫秋怡, 施文婷, 徐东婷, 等. 响应面法结合熵权法优选麦门冬汤颗粒的干法制粒工艺[J]. 中南药学, 2022, **20**(5): 1005-1009.
[10] 秦国正, 余正芝, 张明芮, 等. 正交试验数据快速分析Excel模块的建立和应用[J]. 广州化工, 2014, **42**(11): 12-14.
[11] MUKHARYA A, CHAUDHARY S, SHAH A, *et al*. Development and scale-up of SD-FBP formulation technology in line with parametric QbD[J]. *Res J Pharm Sci*, 2012, **1**(1): 1-21.
[12] 梁超峰, 陈桐楷, 卢克伟, 等. 复方非伪调释胶囊的制备及流化床中试放大研究[J]. 今日药学, 2014, **24**(7): 477-480.