化橘红中展青霉素含量测定方法的建立Δ

谢思敏[1*]，陈俊妃[1]，侯惠婵[1]，顾利红[1]，栗建明[1]，王艳慧[2#]（1.广州市药品检验所/国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室，广州 510160；2.广州市香雪制药股份有限公司，广州 510525）

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2022）23-2936-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.23.23

摘 要 目的 建立一种测定化橘红药材中展青霉素含量的方法。**方法** 采用高效液相色谱-串联三重四极杆质谱联用（HPLC-MS/MS）法。化橘红样品粉末加水溶散后经果胶酶酶解，用乙腈高速匀浆提取，提取液依次经无水硫酸镁-无水醋酸钠（4∶1，*m*/*m*）混合粉末分散固相萃取和SHIMSEN 228型固相净化柱净化后，采用岛津Shim-pack XR-ODS色谱柱、水-乙腈流动相、电喷雾离子源、负离子扫描、多反应监测模式测定，以基质标准曲线校正、外标法定量。**结果** 展青霉素的检测质量浓度在5～200 ng/mL范围内与峰面积成良好的线性关系（r=0.999 6）；精密度、重复性、稳定性（12 h）试验的RSD均小于6%；低、中、高3种浓度加样量的平均加样回收率分别为83.90%、92.08%、92.21%（RSD分别为11.09%、5.53%、1.75%）；定量限为6 μg/kg，检出限为3 μg/kg。20批样品均未检出展青霉素。**结论** 所建方法可实现对化橘红中展青霉素的快速筛查和准确定量，可为化橘红的安全性研究和质量控制提供实验依据和方法。

关键词 化橘红；展青霉素；高效液相色谱-串联三重四极杆质谱联用；含量测定；安全用药

Establishment of the method for the content determination of patulin in Citri Grandis Exocarpium

XIE Simin[1], CHEN Junfei[1], HOU Huichan[1], GU Lihong[1], LI Jianming[1], WANG Yanhui[2] (1. Guangzhou Institute for Drug Control/Key Laboratory for Quality Evaluation of Chinese Patent Medicine, National Medical Products Administration, Guangzhou 510160, China; 2. Guangzhou Xiangxue Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510525, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To establish a method for the content determination of patulin in Citri Grandis Exocarpium. **METHODS** High-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometer (HPLC-MS/MS) was used for the analysis. After water-soluble dispersion and pectinase enzymolysis, the Citri Grandis Exocarpium sample was extracted by acetonitrile with high-speed homogenated. The extracted solution was conducted dispersive solid phase extraction by mixing powder of $MgSO_4$ and NaAC (4∶1, *m*/*m*), then purified on SHIMSEN 228 solid phase purification column. Water acetonitrile was used as mobile phase, and the Shim-pack XR-ODS column was used to separate the target compound. And it was detected by electrospray ionization in the negative mode under multiple reaction monitoring, and quantified by the external standard method with matrix-matched standard correction curves. **RESULTS** Patulin showed good linear correlation in the concentration from 5 to 200 ng/mL (r=0.999 6). RSDs of precision, reproducibility and stability tests (12 h) were all lower than 6%. The average recoveries at low, medium, high concentrations were 83.9%, 92.08%, 92.21%, respectively (RSDs were 11.09%, 5.53%, 1.75%, respectively). The limit of quantitation was 6 μg/kg and limit of detection was 3 μg/kg. Patulin was not detected in 20 batches of samples. **CONCLUSIONS** Established method can be used for the rapid detection and accurate quantification of patulin in Citri Grandis Exocarpium, which can provide experimental basis and method for safety study and quality control of Citri Grandis Exocarpium.

KEYWORDS Citri Grandis Exocarpium; patulin; HPLC-MS/MS; content determination; safe drug use

展青霉素（patulin）又称棒曲霉素、珊瑚青霉毒素，是一种由青霉（penicillium）、曲霉（aspergillus）、丝衣霉菌（byssochlamys）3属16种真菌产生的有毒代谢产物[1]，具有明显的基因、遗传、免疫、细胞及神经毒性[2-7]。展青霉素最先在霉烂苹果中发现[8]，而作为药食两用的山楂、红枣、乌梅、肉桂、小茴香、干姜等产品均存在展青霉素污染的现象[9-11]。针对展青霉素的污染现状及相关研究结果，各国相关部门均对其制定了限量标准，比如我国GB 2761－2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定苹果、山楂等制品中展青霉素的限量为50 μg/kg。

化橘红为芸香科植物化州柚*Citrus grandis*‘Tomentosa’或柚*C. grandis*（L.）Osbeck的未成熟或近成熟的干燥外层果皮，属于岭南地区道地药材，为“粤八味”和“十

Δ **基金项目** 国家重点研发计划中医药现代化研究重点专项（No. 2018YFC1706700）；广州市科技计划项目（No.20212210005）

＊ **第一作者** 副主任中药师，硕士。研究方向：中药质量标准。电话：020-26283696。E-mail：798447372@qq.com

\# **通信作者** 高级工程师，博士。研究方向：中药产品开发与上市后再评价。电话：020-22211313。E-mail：wyh8303@126.com

大广药”之一。该药具有理气宽中、燥湿化痰的功效，主要用于咳嗽痰多、食积伤酒、呕恶痞闷的治疗[12]。化橘红与苹果、山楂等相似，同为果实类药材，其饮片传统炮制过程为用水闷润后切丝或块，再干燥；同时也有采用新型炮制工艺的，即产地趁鲜加工与炮制一体化技术。若炮制过程操作不当或贮藏条件不规范，就容易使药材受到真菌毒素的污染，这不仅影响药材的质量，还造成一定的安全隐患，威胁患者生命健康。因此，本研究拟对化橘红药材中的展青霉素进行检测。

目前，展青霉素常用的检测方法有薄层色谱法、高效液相色谱（HPLC）法、气相色谱-质谱联用法和液相色谱-质谱联用法，其中薄层色谱法的准确性较差，HPLC法易受糠醛类物质的干扰，气相色谱-质谱联用法需要对样品进行衍生化，操作较繁琐。化橘红药材中富含多糖、黄酮、香豆素、挥发油等成分，基质复杂，而液相色谱-质谱联用法分离能力强、检测限低、灵敏度高，适用于复杂基质中展青霉素的检测[11]。因此，本研究采用高效液相色谱-串联三重四极杆质谱联用（HPLC-MS/MS）法测定化橘红中展青霉素的含量，以期为化橘红外源性有害物质残留控制的研究提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

LCMS-8050型超快速HPLC-MS/MS仪（包括LC-30AD型二元泵、SIL-30AC型自动进样器、CTO-40C型柱温箱等）购自日本Shimadzu公司；AG245型十万分之一电子分析天平购自瑞士Mettler-Toledo公司；Milli-Q超纯水处理系统购自德国Merck Millipore公司；T25型高速匀浆仪购自德国IKA公司；ST16型高速离心机购自美国Thermo Fisher Scientific公司；N-EVAP型氮吹仪购自美国Organomation公司。

1.2 主要药品与试剂

展青霉素对照品溶液（批号S056149，质量浓度100 μg/mL）、SHIMSEN 228型固相净化柱（适用于展青霉素，批号S19121306）均购自日本Shimadzu公司；果胶酶（批号SLBT6394）购自美国Sigma公司；无水硫酸镁-无水醋酸钠（4∶1，*m*/*m*）混合粉末（批号623831112A）购自美国Waters公司；乙酸、乙腈均为色谱纯，水为超纯水。20批化橘红药材饮片收自3个产地，均经广州市药品检验所侯惠婵主任中药师鉴定为真品（样品信息见表1）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为岛津Shim-pack XR-ODS（3.0 mm×75 mm，2.2 μm）；流动相为水（A）-乙腈（B），梯度洗脱（0～5 min，5%B；5～5.1 min，5%B→40%B；5.1～6.5 min，40%B；6.5～6.6 min，40%B→95%B；6.6～10 min，95%B；10～10.1 min，95%B→5%B）；流速为0.3 mL/min；柱温为25 ℃；进样量为5 μL。

表1 20批化橘红样品信息

序号	规格	收集地	批号	产地	基原
1	鲜切片	广州市香雪制药股份有限公司	201804022D	广东化州	化州柚
2	鲜切片	广州市香雪制药股份有限公司	HP-180401-A2	广东化州	化州柚
3	鲜切片	广州市香雪制药股份有限公司	HP-180402-A2	广东化州	化州柚
4	鲜切片	广州市香雪制药股份有限公司	HP-180501-A2	广东化州	化州柚
5	鲜切片	广州市香雪制药股份有限公司	HP-150509H5-B3	广东化州	化州柚
6	润切片	广州清平中药材市场	－	广西陆川	化州柚
7	润切片	化州化橘红药材发展有限公司	20200210	广东化州	化州柚
8	润切片	化州化橘红药材发展有限公司	20190516	广东化州	化州柚
9	润切丝	化州市化橘红收藏店	201904	广东化州	化州柚
10	润切丝	化州化橘红药材发展有限公司	20200808	广东化州	化州柚
11	润切丝	广州今典精方药业有限公司	1806011	广东化州	化州柚
12	润切丝	广州今典精方药业有限公司	1808011	广东化州	化州柚
13	润切丝	广州今典精方药业有限公司	181201	广东化州	化州柚
14	润切丝	广州市清平中药材市场	－	广东化州	化州柚
15	润切丝	玉林本草堂中药饮片有限公司	171101	广东化州	柚
16	润切丝	成都康美药业生产有限公司	180100451	广东化州	柚
17	润切丝	四川新荷花中药饮片股份有限公司	1806123	广东化州	柚
18	润切丝	安徽药知源中药饮片有限公司	180301	广东化州	柚
19	润切丝	云南向辉药业有限公司	P20180848	四川金堂	柚
20	润切丝	广东省药材公司中药饮片厂	H3217912	广东化州	柚

－：无批号

2.2 质谱条件

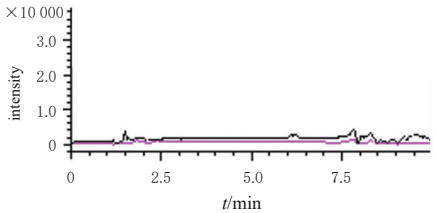
采用电喷雾离子源（electron spray ionization，ESI），以负离子模式进行分析；脱溶剂管温度为526 ℃，加热模块温度为400 ℃，接口温度为300 ℃；雾化气流速为3 L/min，干燥气流速为10 L/min，加热气流速为10 L/min。采用多反应监测（multiple reaction monitoring，MRM）模式，选择质荷比（*m*/*z*）153.3→80.9、*m*/*z* 153.3→109.2的离子对为检测离子对，碰撞电压分别为14、13 V。

2.3 对照品溶液的制备

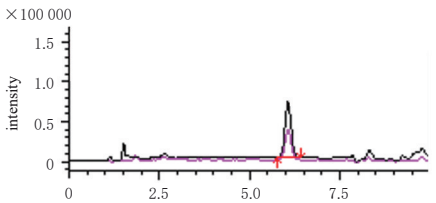
精密量取展青霉素对照品溶液1 mL，置于10 mL容量瓶中，加乙腈稀释至刻度，制成质量浓度为10 μg/mL的溶液，作为展青霉素对照品贮备液。精密量取该贮备液1 mL，置于10 mL容量瓶中，用2%乙腈（用乙酸调节pH值至2）稀释至刻度，制成质量浓度为1 000 ng/mL的对照品溶液，即得。

2.4 供试品溶液的制备

取化橘红样品粉末（过二号筛）约4 g，精密称定，置于具塞离心管中，加水30 mL溶散，加果胶酶75 μL，混匀，40 ℃下放置2 h，精密加入乙腈60 mL，高速匀浆2 min（转速10 000 r/min），离心10 min（转速4 000 r/min）。取上清液20 mL，加入无水硫酸镁-无水醋酸钠（4∶1，*m*/*m*）混合粉末1.5 g，充分振摇2 min，离心10 min（转速4 000 r/min）。取上清液9 mL通过固相净化柱，收集净化液，混匀。精密量取5 mL，置带刻度试管中，加入乙酸50 μL，40 ℃条件下用氮气吹至近干，以2%乙腈溶液（用乙酸调节pH值至2）定容至1 mL，涡旋混匀，用微孔滤膜（0.22 μm）滤过，取续滤液，即得。其总离子流图见图1A。



A. 供试品溶液



B. 基质对照品溶液（质量浓度为100 ng/mL）

图1　化橘红中展青霉素含量测定的总离子流图

2.5　系列基质对照品溶液的制备

取空白基质样品（序号12，由预实验结果得知该样品不含展青霉素）4 g，按“2.4”项下方法处理至“40 ℃条件下用氮气吹至近干”，分别精密加入“2.3”项下展青霉素对照品溶液5、10、20、50、100、150、200 μL，再用2%乙腈溶液（用乙酸调节pH值至2）定容至1 mL，涡旋混匀，用微孔滤膜（0.22 μm）滤过，取续滤液，即得质量浓度分别为5、10、20、50、100、150、200 ng/mL的系列基质对照品溶液。其总离子流图见图1B。

2.6　线性关系考察

取“2.5”项下系列基质对照品溶液，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，记录峰面积。以峰面积（Y）对基质对照品的质量浓度（X）进行线性回归，绘制标准曲线，权重系数设为1/x，可得线性回归方程为Y=9 152.74X−12 285.2（r=0.999 6）。结果表明，展青霉素的检测质量浓度在5～200 ng/mL范围内与峰面积成良好的线性关系。

2.7　灵敏度试验

按“2.5”项下制备不同质量浓度的展青霉素基质对照品溶液，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，以信噪比（S/N）为3时测得的量作为检出限，S/N=10时测得的量作为定量限。结果显示，其定量限为6 μg/kg，检出限为3 μg/kg。

2.8　精密度试验

精密吸取“2.5”项下基质对照品溶液（质量浓度为50 ng/mL）5 μL，按“2.1”“2.2”项下条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果显示，峰面积的RSD为1.83%（n=6），表明该方法精密度良好。

2.9　重复性试验

称取同一批样品（序号12），每份约4 g，精密称定，平行6份，分别置于具塞离心管中，精密加入“2.3”项下展青霉素对照品贮备液60 μL，按“2.4”项下方法制备供试品溶液。分别精密吸取5 μL，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，记录峰面积并以外标法计算样品含量。结果显示，样品含量的RSD为5.28%（n=6），表明该方法重复性良好。

2.10　加样回收率试验

称取同一批样品（序号12），每份约4 g，精密称定，置于具塞离心管中，分别精密加入“2.3”项下展青霉素对照品贮备液12、60、120 μL，每个水平平行3份，分别作为低、中、高3个浓度水平的加样回收试验样品。按“2.4”项下方法制备供试品溶液，分别精密吸取5 μL，按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，计算加样回收率，结果见表2。

表2　展青霉素的加样回收率试验结果（n=3）

取样量/g	样品含量/ng	加入量/ng	测得量/ng	加样回收率/%	平均加样回收率/%	RSD/%
4.009 8	0	120	109.6	91.33	83.90	11.09
4.021 0	0	120	104.3	86.90		
4.024 0	0	120	88.2	73.46		
3.959 8	0	600	517.3	86.22	92.08	5.53
4.000 1	0	600	572.3	95.38		
3.994 6	0	600	567.9	94.64		
3.991 8	0	1 200	1 108.7	92.39	92.21	1.75
4.020 3	0	1 200	1 124.8	93.73		
3.979 2	0	1 200	1 086.1	90.51		

2.11　稳定性试验

取“2.10”项下的供试品溶液，分别于制备后0、2、6、12 h按“2.1”“2.2”项下条件进样测定，记录峰面积。结果显示，峰面积的RSD为5.82%（n=4），表明供试品溶液在制备后12 h内稳定性良好。

2.12　样品测定

取20批化橘红样品各适量，分别按“2.4”项下方法制备供试品溶液，按“2.1”“2.2”项下条件进样分析，记录峰面积并以外标法计算样品含量。结果显示，20批样品均未检出展青霉素。

3　讨论

3.1　流动相的选择

流动相的种类和比例会对目标化合物的离子化效率产生影响，从而影响测试方法的灵敏度。展青霉素对热稳定，在酸性条件下化学性质稳定，在碱性条件下易降解[13]。本研究考察了不同流动相系统（包括0.1%甲酸溶液-乙腈、水-乙腈、水-甲醇）对展青霉素质谱响应的影响。结果表明，流动相系统中加入甲酸后，可明显降低展青霉素的离子化效率，使仪器灵敏度显著下降，故0.1%甲酸溶液-乙腈不适合用于展青霉素的测定；而后两种流动相系统均可获得较好的质谱响应，但乙腈相对于甲醇的黏度更小，相应的系统压力也更小，故本研究选择水-乙腈作为流动相。

3.2　色谱柱的选择

展青霉素易溶于水，极性大[14]，在C_{18}色谱柱上的保留弱。鉴于此，本研究考察了Aglient ZORBAX Eclipse Plus C_{18}（2.1 mm×100 mm，1.8 μm）、Phenomenex Kinetex C_{18}（100 mm×2.1 mm，2.6 μm）、岛津Shim-pack

GIST（100 mm×2.1 mm，2 μm）、岛津 Shim-pack XR-ODS（3.0 mm×75 mm，2.2 μm）几种色谱柱对展青霉素的分离效果。结果表明，岛津 Shim-pack XR-ODS 色谱柱的碳载量高，可以增强展青霉素在色谱柱上的保留，延迟其出峰时间，使其与其他大极性杂质有效分离，避免杂质对测定的干扰和共流出峰的抑制效应，故本研究最终选择岛津 Shim-pack XR-ODS 色谱柱。

3.3 前处理方法的优化

孟瑾等[15]研究发现，对山楂样品进行果胶酶酶解处理可明显提高方法的回收率。这是由于大分子果胶质对展青霉素有包裹作用[1]，仅采用物理和化学提取方式不能完全把展青霉素提取出来，还需同时采用生物提取法，以提高提取和测定方法的准确度。同理，化橘红中含有大量果胶，因此本研究在化橘红样品粉末加水溶散后，进行了果胶酶酶解处理，以尽可能多地提取出展青霉素。

本研究对提取溶剂也进行了考察，比较了乙腈和甲醇的提取效果。结果表明，酶解后的样品经甲醇提取后的溶液颜色明显深于乙腈提取液，同时甲醇提取液在加入无水硫酸镁-无水醋酸钠（4∶1，*m*/*m*）混合粉末固相分散萃取后不分层，无法达到除去大量色素及大极性化合物的目的，最后得到的供试品溶液对展青霉素会产生明显的基质抑制效应，影响测定的准确性和灵敏度，故本研究采用乙腈作为提取溶剂。同时，本研究还考察了无水硫酸镁-无水醋酸钠（4∶1，*m*/*m*）混合粉末在 1.5 g 和 3.0 g 不同加入量条件下对净化效果和实验准确度的影响，结果表明没有明显差异，故本研究选择无水硫酸镁-无水醋酸钠（4∶1，*m*/*m*）混合粉末的加入量为 1.5 g。

展青霉素固相净化柱是一种直接通过式的杂质吸附型固相萃取柱。样品溶液直接上样后，该净化柱可将杂质吸附于柱体上，从而降低基质杂质对测定结果的影响。随着杂质斑带在柱体上的延伸，后续溶液的颜色逐渐变深而最终对样品的净化效果产生影响，因此除杂时应避免上样体积过大而出现过载现象；同时，由于溶液在柱体上有部分的吸附损失，经综合考虑，本研究最终确定上柱溶液的体积为 9 mL。此外，展青霉素在酸性环境中的稳定性较好，而其溶液蒸干后形成的薄膜则不稳定[1]。本研究将通过展青霉素固相净化柱后的净化液在 40 ℃条件下用氮气吹至近干，并在使用氮气前加入 50 μL 乙酸溶液，可增强展青霉素在整个浓缩过程中的稳定性，同时使溶液在近干状态下不容易被完全吹干，从而提高实验的可操作性。但由于化橘红中展青霉素的含量测定为痕量残留分析，且样品的前处理过程比较复杂，这造成了在低浓度加样水平的回收率差异较大。

4 结语

本研究所收集的 20 批化橘红药材饮片均未检出展青霉素，提示不管是采用产地趁鲜加工与炮制一体化技术处理的药材饮片（序号 1～5），还是采用传统闷润法炮制的药材饮片（序号 6～20），均不会造成化橘红在加工过程中受到展青霉素污染。本研究所建方法可实现对化橘红中展青霉素的快速筛查和准确定量，为化橘红的安全性研究和质量控制提供实验依据和方法。

参考文献

[1] 周玉春，杨美华，许军. 展青霉素的研究进展[J]. 贵州农业科学，2010，38（2）：112-116.

[2] GLASER N，STOPPER H. Patulin：mechanism of genotoxicity[J]. Food Chem Toxicol，2012，50（5）：1796-1801.

[3] AYED-BOUSSEMA I，ABASSI H，BOUAZIZ C，et al. Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells[J]. Environ Toxicol，2013，28（6）：299-306.

[4] HAN N F，LUO R L，LIU J Y，et al. Transcriptomic and proteomic analysis reveals mechanisms of patulin-induced cell toxicity in human embryonic kidney cells[J]. Toxins（Basel），2020，12（11）：E681.

[5] IWAHASHI H，KITAGAWA E，SUZUKI Y，et al. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORF DNA microarray and Oligo DNA microarray[J]. BMC Genomics，2007，8：95.

[6] WU T S，LIAO Y C，YU F Y，et al. Mechanism of patulin-induced apoptosis in human leukemia cells（HL-60）[J]. Toxicol Lett，2008，183（1/2/3）：105-111.

[7] ZHANG B G，LIANG H R，HUANG K，et al. Cardiotoxicity of patulin was found in H9c2 cells[J]. Toxicon，2022，207：21-30.

[8] 俞世荣，刘江，孟昭赫. 展青霉素研究进展[M]. 国外医学：卫生学分册，1996，23（1）：40-45.

[9] 黄莉，张浩，丁伟琴，等. 中药中真菌毒素污染问题[J]. 海峡药学，2009，21（6）：95-99.

[10] 李峻媛，万丽，杨美华. 真菌毒素限量标准及其在中药中的研究进展[J]. 中草药，2011，42（3）：602-609.

[11] 王亚楠，王志青，祖琳，等. 食品中展青霉素的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12（18）：7410-7416.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：一部[S]. 2020年版. 北京：中国医药科技出版社，2020：76-77.

[13] 何绍映，李如栋，陈宁周，等. 液相色谱法及液相色谱-串联质谱法测定山楂及其制品中展青霉素的结果比较与建议[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（19）：6879-6885.

[14] 李金宝. 高效液相色谱和液相色谱串联质谱技术在检测苹果制品中展青霉素的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报，2020，11（5）：1347-1353.

[15] 孟瑾，黄菲菲，吴榕，等. 高效液相色谱法测定苹果及山楂制品中的展青霉素[J]. 上海农业学报，2009，25（1）：27-31.

（收稿日期：2022-04-06　修回日期：2022-11-18）

（编辑：胡晓霖）