

HPLC-MS/MS法测定中药桃仁中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁*

王少敏, 许勇, 毛丹, 郑荣, 王柯, 季申**

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要 目的: 建立中药桃仁中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁的 HPLC-MS/MS测定方法。方法: 样品经有机溶剂提取及免疫亲和柱净化后, 以高效液相色谱-串联三重四极杆质谱进行分析测定。采用 Phenomenex SB-C₁₈ (2.0 mm × 50 mm, 4 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-10 mmol L⁻¹ 醋酸铵溶液, 梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min⁻¹; 质谱条件为电喷雾离子源 (ESI源), 正离子模式检测, 扫描方式为多反应监测 (MRM), 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁的定量分析离子分别为 m/z 331.1⁺ 313.1、 m/z 329.1⁺ 243.1、 m/z 315.0⁺ 287.1、 m/z 313.1⁺ 241.0。结果: 黄曲霉毒素 G₂、B₂进样量在 0.375~30 pg 范围内与峰面积呈良好的线性关系, 黄曲霉毒素 G₁、B₁进样量在 1.25~100 pg 范围内与峰面积呈良好的线性关系, $r > 0.999$ 回收率在 88.5%~103.9% 之间。结论: 本法灵敏、快速、准确, 专属性强, 可用于中药桃仁中黄曲霉毒素的测定。

关键词: 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁; 高效液相色谱-4质谱; 桃仁; 中药

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0907-05

HPLC-MS/MS determination of aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁ in *Persicae Semen**

WANG Shao-min, XU Yong, MAO Dan, ZHENG Rong, WANG Ke, JI Shen**

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

Abstract Objective To establish an HPLC-MS/MS method for determination of aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁ in *Persicae Semen*. **Methods** Aflatoxins were extracted by 70% methanol, purified by an immunoaffinity column and then separation was carried on a Kromasil C₁₈ (2.0 mm × 50 mm, 4 μm) column with a mobile phase of methanol-10 mmol L⁻¹ formic ammonate (by a gradient program) at a rate of 0.5 mL·min⁻¹. Aflatoxins were analysed by HPLC-triple quadrupole MS with an ESI ion source in MRM mode; the ion combinations of m/z 331.1⁺ 313.1, m/z 329.1⁺ 243.1, m/z 315.0⁺ 287.1, m/z 313.1⁺ 241.0 were used to qualify aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁, respectively. **Results** Good linear relationships were obtained within the ranges of 0.375-30 pg for aflatoxin G₂ and B₂, and 1.25-100 pg for aflatoxin G₁ and B₁. The recoveries were between 88.5% - 103.9%. **Conclusion** The method is sensitive, rapid, accurate and specific for the determination of aflatoxins in traditional Chinese medicine *Persicae Semen*.

Key words aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁; HPLC-MS/MS; *Persicae Semen*; traditional Chinese medicine

桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch或山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch 的干燥成熟种子, 具有活血祛瘀、润肠通便的作用。按照用药部位来划分, 桃仁属于种子类药材, 易产生霉变现象, 是 2010 年版中国药典中规定需检测黄曲霉毒素的中药品种之一。目前, 我国关于黄曲霉毒素的检测集中于食品, 多采用薄层色谱法^[1]、高效液相色谱法^[1]、酶联免疫试剂盒法^[2]。

中药中黄曲霉毒素检测起步相对较晚, 文献报道主要应用 HPLC 结合荧光检测的方法^[3-5]。上述方法中薄层色谱法定量准确度差, 灵敏度低; 高效液相色谱法需衍生化以后测定, 操作烦琐; 酶联免疫试剂盒法虽灵敏度高, 但重复性和专属性差, 假阳性率高。因黄曲霉毒素检测属于痕量检测, 中药的基质相对复杂, 部分中成药及中药材在检测过程中甚至出现假阳性结果^[5]。因此对于中药中黄

* 国家科技重大专项课题项目 (2009ZX09502-024)

** 通讯作者 Tel: (021) 50798195 E-mail: jishen2006@yahoo.com.cn

曲霉毒素的检测, 需要引入 HPLC-MS/MS 技术建立具有灵敏度高, 专属性强, 可以排除假阳性的方法。

本文以桃仁为样品, 建立了采用快速高效液相-三重四极杆质谱仪检测中药中黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 的含量测定方法。结果显示该方法操作简便, 灵敏度高, 专属性强。

1 仪器与试剂

美国应用生物系统 API 5500 型三重四极杆串联质谱仪, 配有电喷雾离子化源 (ESI 源) 和 Analyst 1.5.1 数据处理系统; 美国安捷伦公司 Agilent 1200 高效液相色谱仪; 德国 KAT25 digital ULTRA-TURRAX 高速均质器; Eppendorf 5810R 台式离心机; 氮气吹干仪 (N-EVAPTM 112 型, 美国 Organomation Associates Inc 公司); 分析天平 (BS2202/TE-612-L/CP225D 型电子天平, 德国 Sartorius 公司)。

黄曲霉毒素原液 (美国 SUPELCO 公司提供, Lot LB 33367, 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 浓度分别为 0.3 μg·mL⁻¹、1.0 μg·mL⁻¹、0.3 μg·mL⁻¹、1.0 μg·mL⁻¹); 黄曲霉毒素免疫亲和柱 (AflaTest[®] P, 美国 VICAM 公司); 甲醇为色谱纯, 由 Burdick-Jackson 公司提供; 氯化钠为分析纯; 试验用水为超纯水。

样品: 桃仁 (批号: 091101; 产地: 山西), 购自上海华宇药业有限公司, 经上海市食品药品检验所中药室吴赵云副主任药师鉴定为桃 *Prunus persica* (L.) Bastsch 的干燥成熟种子。

2 溶液的配制

2.1 黄曲霉毒素储备溶液 取黄曲霉毒素原液适量, 加 75% 甲醇制成黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 浓度分别为 30 ng·mL⁻¹、100 ng·mL⁻¹、30 ng·mL⁻¹、100 ng·mL⁻¹ 的溶液, 即得。

2.2 供试品溶液 根据文献 [3-4], 确定供试品溶液的制备方法为: 取桃仁样品粉末 (过 2 号筛) 15 g 精密称定, 加入氯化钠 3 g 70% 甲醇 75 mL, 高速搅拌 2 min (搅拌速度大于 12500 r·min⁻¹), 离心 5 min (离心速度 4000 r·min⁻¹), 精密吸取上清液 15 mL, 用水稀释至 50 mL, 摇匀, 离心 5 min (4000 r·min⁻¹), 上清液用玻璃纤维滤纸滤过, 取续滤液 20 mL, 通过免疫亲和柱 (流速 3 mL·min⁻¹), 随后用水 20 mL 洗脱 (流速 6 mL·min⁻¹), 洗脱液弃去, 再用甲醇 1.5 mL 洗脱 (流速 1 mL·min⁻¹), 收集甲醇洗脱液, 用水稀释至 2 mL, 摇匀, 取 10 μL 注入液相色谱-串联质谱系统检测。

3 LC-MS/MS 条件

3.1 色谱条件 色谱柱: Phenomenex SB-C₁₈ 柱 (2.0 mm × 50 mm, 4 μm); 流动相: 甲醇 (A) - 10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵溶液 (B), 梯度洗脱 (0 ~ 4.5 min, 70% A → 15% A; 4.5 ~ 6 min, 15% → 0 A; 6 ~ 6.5 min, 0 A → 70% A; 6.5 ~ 10 min, 70% A); 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 柱温: 25 °C; 进样量: 10 μL。

3.2 质谱条件 离子源为 ESI 源; 正离子模式检测; 扫描方式为多反应监测 (MRM); 电喷雾电压: 5.5 kV; 离子源温度: 550 °C。用于定性、定量分子的离子对和相关质谱参数见表 1。

表 1 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁ 的质谱参数

Tab 1 Mass spectrometry parameters for aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁

黄曲霉毒素 (aflatoxin)	保留时间 (retention time) / min	定量通道 (quantitative transition m/z)	碰撞能量 (collision energy CE) / eV	定性通道 (qualitative transition m/z)	碰撞能量 (collision energy, CE) / eV
G ₂	3.63	331.1 ⁺ → 313.1	33	331.1 ⁺ → 245.1	40
G ₁	3.94	329.1 ⁺ → 243.1	35	329.1 ⁺ → 311.1	30
B ₂	4.17	315.0 ⁺ → 287.1	35	315.0 ⁺ → 259.1	40
B ₁	4.42	313.1 ⁺ → 241.0	50	313.1 ⁺ → 285.0	40

4 结果

4.1 线性关系考察 将“2.1”项下黄曲霉毒素储备溶液用 70% 甲醇适当稀释后制得 6 个不同浓度的黄曲霉毒素工作溶液。取样品 15 g 6 份, 按“2.2”项下所述方法制备桃仁供试品溶液, 并于 40 °C 氮吹至干, 分别精密加入上述系列黄曲霉毒

素工作溶液 2 mL, 涡旋混匀, 即得系列基质标准曲线溶液。精密吸取各基质标准曲线溶液 10 μL, 进样分析, 记录各待测组分色谱峰面积, 以各成分的进样量 X (pg) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标, 进行回归分析, 结果见表 2, 对照品色谱图见图 1-A。

表 2 黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁的线性回归方程和相关系数

Tab 2 Linear regression equations and correlation coefficients of aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁

黄曲霉毒素 (aflatoxin)	线性范围 (linear range) /pg	线性回归方程 (equation of linear regression)	相关系数 (correlation coefficient)	权重系数 (weight coefficient)
G ₂	0.375~30	$Y = 1.89 \times 10^4 X - 762$	0.9977	1/K
G ₁	1.25~100	$Y = 3.03 \times 10^4 X - 5.41 \times 10^3$	0.9998	1/K
B ₂	0.375~30	$Y = 3.70 \times 10^4 X - 1.76 \times 10^3$	0.9996	1/K
B ₁	1.25~100	$Y = 3.57 \times 10^4 X - 5.10 \times 10^3$	0.9996	1/K

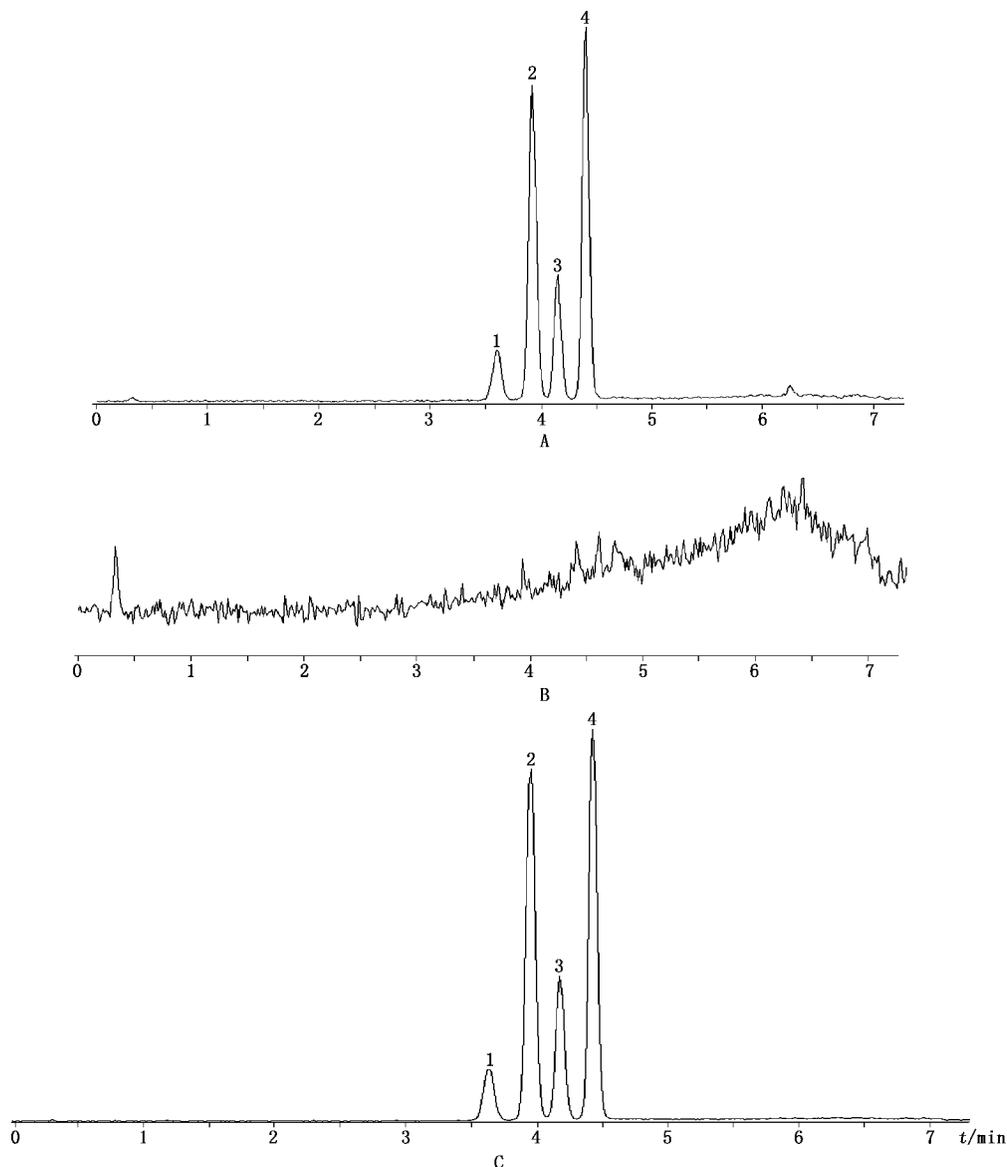


图 1 黄曲霉毒素(A)、桃仁空白(B)及桃仁加黄曲霉毒素(C)总离子流色谱图

Fig 1 TIC chromatograms of aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁(A), blank Persicae Semen(B), and Persicae Semen spiked aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁(C)

1 黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂) 2 黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁) 3. 黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂) 4 黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁)

4.2 精密度试验 取基质标准曲线溶液,连续进样6次,结果黄曲霉毒素 G₂、G₁、B₂、B₁峰面积的 RSD 分别为 0.9%、1.0%、1.0%、1.4%,精密度良好。

4.3 方法专属性 取经预先测定,不含黄曲霉毒素

G₂、G₁、B₂、B₁的桃仁样品(桃仁空白),按照“2.2”项下方法制备桃仁空白供试品溶液,进样,色谱图见图 1-B;同时在桃仁空白 15 g 中添加“2.1”项下黄曲霉毒素储备溶液 0.5 mL,按照“2.2”项下方法制备

桃仁加黄曲霉毒素供试品溶液, 进样, 色谱图见图 1-C。试验结果表明, 桃仁中其他成分不干扰上述 4 个黄曲霉毒素的测定。

4.4 重复性试验 取桃仁样品粉末(过 2 号筛) 15 g 共 6 份, 精密称定, 分别加入“2.1”项下黄曲霉毒素储备溶液 0.5 mL, 按照“2.2”项下方法制备加样供试溶液, 进样分析。结果黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 的加样回收结果的 RSD 分别为 2.5%, 1.9%, 0.9%, 2.6%, 表明重复性良好。

4.5 稳定性试验 取“4.4”项下加样供试溶液, 分别在 0 4 8 12 24 48 h 进样分析, 记录峰面积。结果表明, 供试品溶液在 0~48 h 内, 黄曲霉毒素 G_2 、

G_1 、 B_2 、 B_1 的 RSD ($n=6$) 分别为 4.8%, 4.8%, 4.1%, 2.8%, 均基本稳定。

4.6 回收率试验 取未检出黄曲霉毒素的桃仁粉末(过 2 号筛) 15 g 共 9 份, 以 3 份为一组, 每组分别以低、中、高 3 个添加水平精密加入“2.1”项下黄曲霉毒素储备溶液各 0.15、0.3、0.5 mL (其中黄曲霉毒素 G_2 、 B_2 的加入量分别为 4.5、9、15 ng, 黄曲霉毒素 G_1 、 B_1 的加入量分别为 15、30、50 ng), 按照“2.2”项下方法制备回收率试验用供试溶液。依法测定, 计算回收率及相应 RSD 值, 结果表明, 本方法回收率试验结果良好, 见表 3。

表 3 不同添加水平的回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 3 Recoveries of the assay on different levels

黄曲霉毒素 (aflatoxin)	低水平 (low level)		中水平 (middle level)		高水平 (high level)	
	回收率 (recovery) %	RSD %	回收率 (recovery)	RSD %	回收率 (recovery)	RSD %
G_2	92.78	2.0	89.52	2.3	88.53	2.0
G_1	103.93	1.7	100.12	0.4	103.52	1.8
B_2	101.50	0.5	101.61	4.8	101.28	0.5
B_1	97.25	0.7	95.10	0.8	95.64	0.7

4.7 检测限及定量限 倍比稀释低添加水平的回收率试验用供试溶液, 进样分析, 测得黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 的检测限 (信噪比 3:1) 分别为 0.029、0.012、0.009、0.005 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 定量限 (信噪比 10:1) 分别为 0.095、0.041、0.031、0.017 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

4.8 样品测定 按拟订方法测定中药桃仁样品, 结果未检出黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 。

5 讨论

5.1 在色谱条件优化中曾分别考察了 ① 甲醇-水, ② 甲醇-0.1% 甲酸, ③ 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 醋酸铵, ④ 甲醇-10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵 4 种流动相体系, 结果表明加入醋酸铵的流动相体系能更好地保证各黄曲霉毒素成分在色谱系统中的稳定性和质谱的离子化效果。试验中还考察了 ① 20 °C、② 30 °C、③ 35 °C、④ 40 °C 不同柱温, 结果表明柱温变化对分离度影响不大, 故本文选择室温 25 °C。

5.2 考察了电喷雾电离源 (ESI) 的正、负离子模式和大气压电离源 (APCI) 源, 结果表明使用 ESI 源的负离子模式下, 4 个黄曲霉毒素成分的响应值远远高于大气压电离源。在每个黄曲霉毒素成分的二级质谱中各挑选了响应较强, 且杂质干扰小的 2 对离子对作为定量与定性离子对。分别对毛细管出口电压、碰撞池能量等质谱参数进行了优化, 最终确

定黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 质谱条件如“3.2”项所述。

5.3 黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 中 B_1 的毒性最大, 目前欧洲药典、美国药典及中国农业部行业标准中对黄曲霉毒素的含量限度规定均为: 黄曲霉毒素 B_1 不得大于 2 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 的总量不得大于 4 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本文建立的 HPLC-MS/MS 方法的检测限为: 黄曲霉毒素 G_2 为 0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 黄曲霉毒素 G_1 、 B_2 、 B_1 均为 0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 远远小于上述规定, 比相关文献报道^[3-5] 的检测限亦低 1 个数量级, 灵敏度大大提高。且本法以一级全扫描质谱图中所得到的化合物的准分子离子作为各自的母离子, 以其峰强度较强的二级碎片离子作为各自的定性离子, 2 对专属离子对同时定性, 进一步增加了专属性, 防止了假阳性的误判。

5.4 基质效应对质谱测定结果的准确性具有较大的影响。根据基质对检测信号响应值的不同影响, 基质效应又可分为基质增强效应和减弱效应。本实验亦对此进行了研究: 取“4.1”项下以 70% 甲醇为溶剂的黄曲霉毒素工作溶液, 不加桃仁基质, 直接进样, 制备无基质标准曲线, 计算“4.6”项下加样供试溶液中的浓度和回收率, 结果黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 回收率为 70%~78%。与用桃仁基质制备的

标准曲线计算结果比较, 桃仁基质对黄曲霉毒素 G_2 、 G_1 、 B_2 、 B_1 存在基质减弱效应, 表明有基质标准添加回归计算更准确, 值得研究推广, 更有意义。

5.5 参照香港政府化验所的相关规定(回收率为 50% ~ 120%)和出口商品中农药、兽药及生物毒素检验方法标准编写的基本规范(SN/T001-1995), 规定当添加浓度小于 $1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时回收率范围应为 50% ~ 120%, 添加浓度为 $1 \sim 10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时回收率范围应为 60% ~ 120%, 则采用无基质标准曲线计算得回收率结果符合规定, 表明如果无空白基质时, 用无基质标准曲线测定样品, 准确度亦良好。后按照“4.6”项下方法制备中药材桂枝和白芍的加样供试溶液, 用无基质标准曲线计算, 其回收率分别为 67% ~ 77% 和 70% ~ 78%, 亦符合上述规定, 表明本法在中药材的黄曲霉毒素检测中具有推广意义。

参考文献

- 1 GB/T 5009 23-2006 Determination of aflatoxin B_2 , B_1 , G_2 , G_1 in food (食品中黄曲霉毒素 B_2 , B_1 , G_2 , G_1 的测定)
- 2 GB/T 5009 22-2003. Determination of aflatoxin B_1 in food (食品中黄曲霉毒素 B_1 的测定)
- 3 ZHENG Rong(郑荣), MAO Dan(毛丹), WANG Ke(王柯), et al HPLC determination of aflatoxin B_2 , B_1 , G_2 , G_1 in traditional Chinese medicine (HPLC法测定中药中黄曲霉毒素 B_2 , B_1 , G_2 , G_1 的含量). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 26(6): 610
- 4 ZHENG Rong(郑荣), MAO Dan(毛丹), WANG Shao-min(王少敏), et al HPLC determination of aflatoxin G_2 , G_1 , B_2 , B_1 in 6 traditional Chinese drugs (脑立清丸等 6 种中成药中黄曲霉毒素 G_2 , G_1 , B_2 , B_1 的测定). *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2010, 32(3): 418
- 5 ZHENG Rong(郑荣), MAO Dan(毛丹), WANG Ke(王柯), et al Determination of aflatoxin G_2 , G_1 , B_2 , B_1 in Suanzaoren by HPLC with post-column derivatization (柱后衍生-高效液相色谱法测定酸枣仁中黄曲霉毒素 G_2 , G_1 , B_2 , B_1). *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2010, 20(1): 36

(本文于 2010 年 6 月 10 日收到)

《中国药材标准名录》已出版

科学出版社于 2011 年 4 月出版了由中国食品药品检定研究院林瑞超教授主编的《中国药材标准名录》该书是在国家药监局的大力支持和全国各省、自治区、直辖市药检所积极配合下, 从 2004 年开始, 收集整理历版药典、部颁标准、地方标准等大量资料, 历时 6 年, 进行了细致归纳整理, 编写了权威、实用的中药材标准检索专业工具书。该书共收录了 4700 余种药材, 涉及 530 个科, 内容涵盖药材名、科名、拉科名、类别(动物、植物或矿物)原动植物中文名、原动植物拉丁学名、药用部位及出处等; 本书科学性强、编写简明、内容实用, 是企业、医院、中医药科技工作者必备的、权威的药材标准检索专业工具书。

当当网、卓越网、新华书店及医学书店有售。定价 298.00 元。

邮购联系人: 温晓萍; 电话: 010-64034601, 64019031; 地址: 100717 北京市东黄城根北街 16 号科学出版社 温晓萍 (请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。