

免疫亲和柱净化 UPLC-MS-MS 测定天麻药材中 黄曲霉毒素的含量

陈思颖¹, 朱迪¹, 王永林^{1,2}, 兰波¹, 熊荻菲菲¹, 王爱民^{1,2*}

(1. 贵阳医学院药学院, 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004;

2. 贵州省药物制剂重点实验室, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 研究建立了免疫亲和柱净化 UPLC-MS-MS 测定天麻药材中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的含量测定方法。方法: 采用甲醇溶液超声提取、玻璃纤维滤纸滤过、黄曲霉毒素亲和免疫柱净化的方法对天麻药材样品进行处理, 以超高压相色谱-三重四级杆串联质谱仪(UPLC-MS-MS)对黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 含量进行研究并测定。结果: 被测定的 4 种黄曲霉毒素分别在选定的范围内线性关系良好, 精密度、重复性、准确度均良好, 利用标准参考物质对本方法的验证结果良好, 采用所建立的方法对 30 批不同产地天麻药材中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 含量进行了测定, 结果均未检出。结论: 该方法科学、可行、方便、快速, 适用于对天麻药材中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 进行含量测定。

[关键词] 免疫亲和柱; 超高压相色谱-三重四级杆串联质谱; 天麻; 黄曲霉毒素

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)01-0051-05

[doi] 10.11653/syjf2014010051

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20131017.1135.004.html>

[网络出版时间] 2013-10-17 11:35

UPLC-MS-MS Analysis of Aflatoxins in *Gastrodia elata* by Immunoaffinity Column Cleanup

CHEN Si-ying¹, ZHU Di¹, WANG Yong-lin^{1,2}, LAN Bo¹, XIONG Di-fei-fei¹, WANG Ai-min^{1,2*}

(1. School of Pharmacy, Guiyang Medical College, Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicines and Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Guiyang 550004, China;

2. Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** The research aimed to establish a UPLC-MS-MS method for the determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in *Gastrodia elata*. **Method:** The samples, *G. elata* herbs, were extracted by ultrasonic with methanol, filtered by glass fiber filter paper and purified by immuno affinity columns (IAC). Aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in *G. elata* were researched by UPLC-MS-MS. **Result:** The linear relationships of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ were good in the scopes of selected concentration. The precision, repeatability and the accuracy were all satisfactory. There was a good result in using the reference material to validate this method. The method is used to determine the concentrations of the four aflatoxins in 30 batches of *G. elata* herbs and none were detected. **Conclusion:** The method is scientific, convenient and rapid to take. It can be applied into the determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in *G. elata* herbs. And it provides objective references to help to evaluate the quality of *G. elata* herbs accurately and comprehensively.

[Key words] immune affinity column; UPLC-MS-MS; *Gastrodia elata*; aflatoxins

[收稿日期] 20130513(010)

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2011BAI13B04); 贵州省科技重大专项(黔科合重大专项字[2011]6005); 贵阳市科技重大专项(筑科合同[2011401]社 6-1 号); 贵州省中药现代化科技产业研究开发专项(黔科合中药字[2011]5081 号)

[第一作者] 陈思颖, 硕士研究生, 从事药物分析与中药新制剂研究, Tel:13595120710, E-mail:chensiyang520@hotmail.com

[通讯作者] * 王爱民, 教授, 从事中药新药的研究开发, Tel:0851-6908899, E-mail:gywam100@163.com

黄曲霉毒素 aflatoxins 是一组化学结构类似的化合物,由黄曲霉菌 *Aspergillus flavus* Link 和寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus* Speare 等产生的一类有毒的次生代谢产物,基本结构为二呋喃香豆素的衍生物。目前已鉴定出 17 种衍生物,最重要的为黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 和 M₁ 等 10 多种化合物^[1-2]。黄曲霉毒素是一种毒性极强的剧毒物质,对人及动物肝脏组织有破坏作用,已被世界卫生组织(WHO)癌症研究机构划定为 I 类致癌物,是目前已知的三大致癌物质之一。由于黄曲霉毒素不溶于水,并且耐热性很高,不易被破坏^[3,4],所以建立一个科学、客观、系统的符合现代技术要求的中药材中黄曲霉毒素的评价体系很有必要。据文献报道,现今应用比较广泛的黄曲霉毒素测定方法主要有:薄层色谱法(TLC)、酶联免疫法(ELISA)、高效液相色谱法(HPLC)等。TLC 法简单、分析成本较低,但样品处理繁琐、灵敏度较低,仅适用于定性检测;ELISA 法操作简单较为安全、灵敏度高,但测定结果受试剂盒差异、实验温度、仪器灵敏度等条件影响较大,重复性差,而且中药材中存在较多与黄曲霉毒素结构类似的香豆素类化合物,因此出现假阳性率高,难以达到相关技术要求;荧光检测 HPLC 法通常采用加碘柱后衍生法,操作较为繁琐^[4-13]。针对以上现状,本研究拟建立操作更简便、专属性更强、灵敏度更高的免疫亲和柱净化 UPLC-MS-MS 测定天麻中黄曲霉毒素的方法^[14-15]。

天麻为兰科多年生草本植物天麻 *Gastrodia elata* Bl. 的干燥块茎,有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络的功效,药用历史悠久,为《中国药典》2010 年版一部所收载^[5]。鉴于天麻自身的药用价值以及黄曲霉毒素的危害性,本研究收集 2003 ~ 2012 年产天麻药材,建立其黄曲霉毒素含量测定的方法,考察天麻在运输贮存过程中是否易受到黄曲霉毒素的污染,进一步对黄曲霉毒素可能造成的危害进行防控,保证临床用药的安全。

1 材料

超高效液相色谱-TQD 串联质谱仪(美国 Waters 公司, ACQUITY 系统, MassLynxV4.1 工作站,电喷雾电离源),AE240 型 1/10 万电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),超声清洗仪(中国跃进医用化学器械厂),超纯水机(四川沃特科技发展有限公司),MTN-2800D 型氮吹浓缩装置(天津奥特塞恩斯仪器公司),ZH-2 型涡旋混合器(天津药典标准仪器厂)。

黄曲霉毒素混合标准溶液 [SUPELCO Analytical, 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 质量浓度分别为 0.995, 0.298, 1.011, 0.299 mg·L⁻¹, 纯度 ≥ 99%, 溶剂苯-乙腈(98:2)]; 黄曲霉毒素标准参考物质“玉米细粉” [corn naturally contaminated with aflatoxin, Trilogy Analytical Laboratory, AFB₁, 17.7 μg·kg⁻¹(1 sd range 16.7 ~ 21.3; 2 sd range 14.4 ~ 23.6; 3 sd range 12.1 ~ 25.9), AFB₂, 1.3 μg·kg⁻¹, AFG₁: ND, AFG₂: ND, Lot # A-C-270, 2010.08-2015.07], 免疫亲和柱(PriboLab 公司, PriboFast® IAC-011-3), 玻璃纤维滤纸(PriboLab 公司, 1.5 μm × 110 mm), 乙腈(色谱纯, 德国 MERCK 公司), 甲醇(色谱纯, 天津科密欧化学试剂有限公司), 甲酸(色谱纯, 美国 TEDIA 公司), 纯净水(广州屈臣氏食品饮料有限公司), 氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 天麻药材 30 批分别从贵州、云南等省收集, 由贵阳医学院药学院药用植物与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl.。

2 方法与结果

2.1 标准系列溶液的制备 精密量取黄曲霉毒素混合标准溶液 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 得黄曲霉毒素储备液(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 质量浓度分别为 0.049 8, 0.014 9, 0.050 6, 0.015 0 mg·L⁻¹)。分别吸取储备液 20, 40, 100, 200, 400, 1 000 μL, 于 50 °C 下空气吹干, 用初始流动相溶解并稀释至 1 mL, 即得标准系列溶液。

2.2 供试品溶液制备 取天麻(过 40 目筛)样品 5 g, 精密称定, 加入氯化钠 1 g, 置于锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇溶液 25 mL, 超声提取 30 min, 精密量取上清液 15 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 用玻璃纤维滤纸滤过, 量取续滤液 20.0 mL, 通过免疫层析亲和柱, 流速 3 mL·min⁻¹, 用水 20 mL 洗脱, 洗脱液弃去, 使空气进入柱子, 将水挤出柱子, 再用适量甲醇洗脱, 收集洗脱液, 于 50 °C 下空气吹干, 用初始流动相溶解并稀释至 2 mL, 即得。

2.3 测定方法

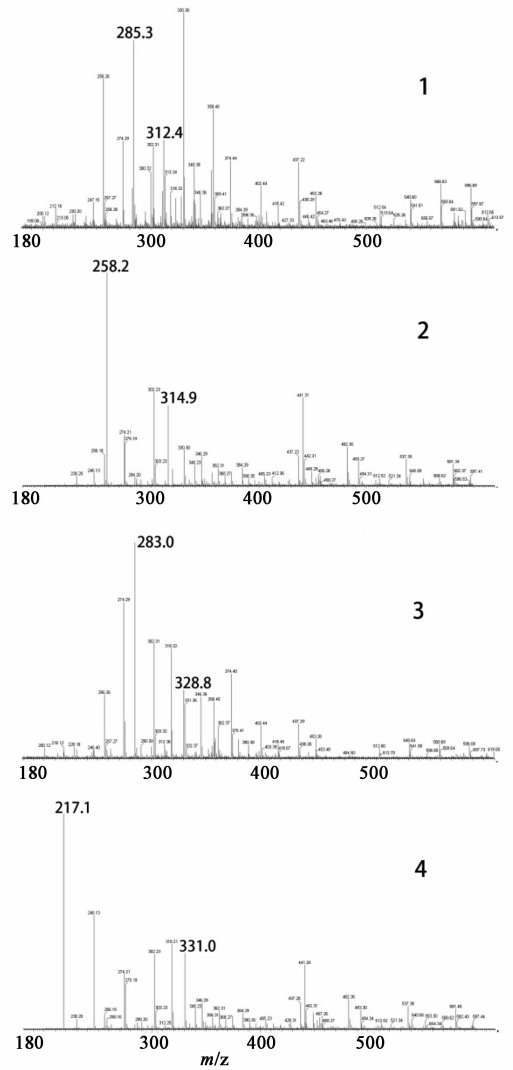
2.3.1 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm); 流动相 A 0.1% 甲酸-水溶液, 流动相 B 乙腈-甲醇-甲酸(50:50:0.1), 流速 0.3 mL·min⁻¹, 进样体积 5 μL, 梯度洗脱(0 ~ 2 min, 50% ~ 100% B; 2 ~ 3 min, 100% B)。

表 1 天麻样品信息

No.	批号	品名	产地
1	200309	人工天麻	安徽
2	200309	人工天麻	湖北兴山
3	200311	人工天麻	贵州大方
4	200401	人工天麻	贵州毕节
5	200402	人工天麻	浙江
6	200403	人工天麻	贵州贵阳乌当
7	200502	人工天麻	安徽
8	20050403	人工天麻	贵州贵阳
9	20050419	人工天麻	四川圣仁
10	20060901	人工天麻	云南金茂
11	20061009	人工天麻	贵州贵阳
12	20061012	人工天麻	河南
13	200701	人工天麻	陕西汉中
14	20070301	野生天麻	吉林长白山
15	20070302	人工天麻	河北安国
16	20080720	人工天麻	河北安国
17	200808	人工天麻	安徽亳州
18	20081205	人工天麻	陕西汉中
19	20090130	野生特级冬天麻	云南昭通
20	20090130	野生特级春天麻	云南昭通
21	20090802	野生一级天麻	西藏波密
22	20100802	三级天麻	西藏林芝
23	20100805	野生血金麻	云南香格里拉县
24	20100806	野生天麻	云南虎跳峡镇
25	20111031	野生冬麻	江西井冈山
26	20111031	野生天麻	四川青川
27	20111101	野生天麻	辽宁天华山
28	20121101	野生特级天麻	重庆武陵山区
29	200120515	人工天麻	四川南江
30	200120527	人工天麻	贵州黎平

2.3.2 质谱条件 比较正、负离子扫描方式对黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 进行扫描,结果显示正离子扫描质谱信号明显高于负离子扫描。通过二级质谱分析(子离子扫描)得到各自的离子碎片信息为, AFB₁ 定量离子 (m/z) 为 312.4 和 285.3, AFB₂ 定量离子 (m/z) 为 314.9 和 258.2, AFG₁ 定量离子 (m/z) 为 328.8, 283.0, AFG₂ 定量离子 (m/z) 为 331.0, 217.1。碎片离子信息见图 1。

毛细管电压 3 kV, 离子源温度 120 ℃, 去溶剂



1. 黄曲霉毒素 B₁; 2. 黄曲霉毒素 B₂;
3. 黄曲霉毒素 G₁; 4. 黄曲霉毒素 G₂

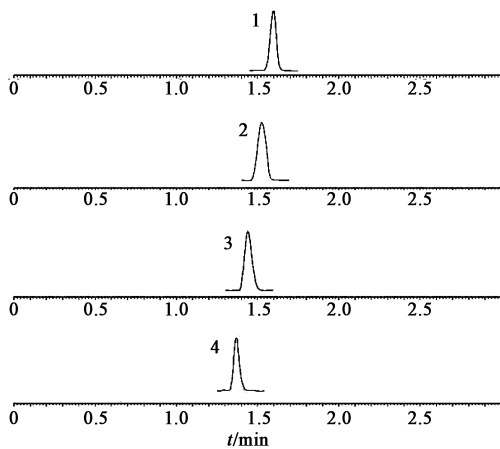
图 1 黄曲霉毒素二级质谱

气温度 350 ℃, 喷雾气 N₂, 流速 650 L·h⁻¹, 反吹气 N₂, 流速 50 L·h⁻¹, 碰撞气 Ar, 流速 0.16 mL·min⁻¹, 扫描方式为多反应离子监测模式(MRM)。

参考有关文献^[12]和质谱信息,黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的保留时间分别为 1.60, 1.53, 1.44, 1.37 min, 见图 2。

2.4 线性关系考察 分别精密吸取 2.1 项下黄曲霉毒素混合标准溶液 10 μL, 注入液质联用仪。按 2.3 项条件测定标准系列溶液的含量。以色谱峰峰面积(Y)为纵坐标, 质量浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线并进行线性回归。结果表明本方法在一定浓度范围内线性关系良好, 结果见表 2。

2.5 检出限 按 2.3 项下仪器条件, 测定仪器对黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的检出限。结果, S/N 为 3



1. 黄曲霉毒素 B₁; 2. 黄曲霉毒素 B₂;
3. 黄曲霉毒素 G₁; 4. 黄曲霉毒素 G₂

图 2 黄曲霉毒素 LC-MS-MS

表 2 黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 线性关系考察

成分	线性回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
AFB ₁	$Y = 17.9394X + 14.2232$	0.9995	0.995 ~ 49.75
AFB ₂	$Y = 11.5042X + 6.0165$	0.9962	0.298 ~ 14.90
AFG ₁	$Y = 4.9113X + 3.4091$	0.9984	1.011 ~ 50.55
AFG ₂	$Y = 3.8586X - 0.3106$	0.9994	0.299 ~ 14.95

时,黄曲霉毒素、的检出限分别为 0.0417, 0.0125, 0.0417, 0.0625 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.6 精密度试验 通过预实验,选取未检出黄曲霉毒素的天麻样品为精密度试验对象。取天麻样品 5 g,精密称定,精密加入黄曲霉毒素混标溶液(黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 质量浓度分别为 9.95, 2.98, 10.11, 2.99 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 1 mL,按 2.2 项下方法制备样品,并按 2.3 项下仪器条件连续测定 6 次,结果结果黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的 RSD 分别为 6.8%, 6.5%, 6.0%, 13.5%, 表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取 2.6 项下天麻样品 6 份,每份 5 g,精密称定,分别精密加入黄曲霉毒素混标溶液(浓度同 2.6 项下) 1 mL,按 2.2 项下供试品溶液的制备方法制备样品,分别测定,结果黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的含量分别为 17.6, 4.31, 17.3, 5.52 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 分别为 7.5%, 18.3%, 5.9%, 10.8%, 表明该方法重复性较良好。

2.8 回收率试验 取 2.6 项下天麻样品 9 份,每份 5 g,每 3 份为 1 组,精密称定,每组分别加入低、中、高浓度黄曲霉毒素标准溶液适量,按 2.2 项下方法制备样品,分别测定。结果表明,4 种黄曲霉毒素含量在不同范围内回收率良好,表明该本方法准确度

良好,见表 3。

表 3 黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 回收率试验

化合物	加入量/ ng	实测值/ng			平均回收率/ %	RSD/ %
		1	2	3		
AFB ₁	19.9	23.07	18.41	20.88	104.4	11.2
	39.8	44.08	48.38	44.91	115.0	5.0
	79.6	75.61	81.58	89.34	103.2	8.4
AFB ₂	5.96	6.35	5.67	5.89	100.2	5.8
	11.92	8.05	11.7	9.29	81.2	19.2
	23.84	23.47	19.27	24.14	93.5	11.8
AFG ₁	20.22	26.33	30.42	21.46	128.9	17.2
	40.44	38.51	41.65	50.23	107.5	14
	80.88	86.17	80.3	75.08	99.5	6.9
AFG ₂	5.98	6.2	5.56	6.37	101.1	7.0
	11.96	11.31	10.98	11.13	93.1	1.5
	23.92	23.78	19.02	18.59	85.5	14.1

2.9 稳定性试验 取 2.6 项下天麻样品 5 g,精密称定,分别精密加入黄曲霉毒素混标溶液(浓度同 2.6 项下) 1 mL,按 2.2 项下方法制备样品,并按 2.3 项下仪器条件分别于 0, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 下测定,结果黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的 RSD 分别为 1.5%, 2.3%, 1.9%, 3.3%, 表明该方法稳定性良好。

2.10 利用标准参考物质对本方法的验证分析 为了进一步验证方法的准确性、可靠性,笔者对黄曲霉毒素标准参考物质“玉米细粉”(corn naturally contaminated with aflatoxin)中黄曲霉毒素含量进行测定。取黄曲霉毒素标准参考物质 5 g,精密称定,按 2.2 项下方法制备样品,并按 2.3 项下仪器条件测定并计算黄曲霉毒素含量。实验结果表明黄曲霉毒素测定值与标准值相近,证明该方法的准确、可靠,结果见表 4。

表 4 标准参考物质中的黄曲霉毒素含量测定($n = 2$) $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$

名称	标准参考值	实测值
AFB ₁	17.7	18.0
AFB ₂	1.30	1.12
AFG ₁	ND	ND
AFG ₂	ND	ND

2.11 样品测定 分别取各批天麻药材 5 g(过 40 目筛),精密称定,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.3 项下条件测定并计算黄曲霉毒素的含量,结果 30 批天麻药材中均未检出黄曲霉毒素。

3 讨论

本研究建立了免疫亲和柱净化 UPLC-MS-MS 测定天麻药材中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 含量的方法,操作简便,不需要衍生化,专属性强、灵敏度高,能在两分钟内完成测定,并且利用标准样品对本方法验证结果良好。对比国家标准^[9]规定,研究建立的方法除黄曲霉毒素 G₂ 检出限接近的 0.05 ng·g⁻¹外,黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁ 检出限均低于国标规定(分别为 0.2, 0.05, 0.2 ng·g⁻¹)。

研究收集 2003 至 2012 年间产天麻药材 30 批,结果均未检出黄曲霉毒素,表明天麻在运输贮存过程中不易受到黄曲霉毒素的污染,临床用药安全。

[参考文献]

- [1] 欧阳佩,徐新军. 中药中黄曲霉毒素分析方法进展[J]. 现代食品与药品杂志, 2007, 17(3):12.
- [2] 陈建明,张雪辉,杨美华,等. 中药中黄曲霉毒素检测概况[J]. 中草药, 2006, 37(3):463.
- [3] 王磊,侯玉泽,胡晓飞,等. 黄曲霉毒素的危害及检测方法研究进展[J]. 河南农业科学, 2010(2):123.
- [4] 徐超一,刘岩,韩深,等. 进出口中成药中黄曲霉毒素检测方法的研究[J]. 检验检疫科学, 2005, 15(6):36.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:54.
- [6] 张学辉. 中药中黄曲霉毒素检测方法研究及模式识别在中药领域中的应用[D]. 北京:中国协和医科大学, 2004.

- [7] 鲍蕾. 黄曲霉毒素的生物累积及其检测技术质量控制标准体系的研究[D]. 青岛:中国海洋大学, 2009.
- [8] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 5009.23-2006 食品中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂ 的测定[S]. 2006.
- [9] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 18979-2003. 食品中黄曲霉毒素的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法[S]. 2003.
- [10] 付成平,欧阳华学,刘瑜. 柱前衍生化高效液相色谱法测定中草药提取物中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 西南农业学报, 2009, 22(2):522.
- [11] 胡一晨,万丽,范成杰,等. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后光化学衍生化法检测中药及染菌中药制剂中间体的黄曲霉毒素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10):116.
- [12] 杨晶,栾国华,刘哲. 应用 LC-MS/MS 检测中药材中黄曲霉毒素残留量方法研究[J]. 中国药师, 2011, 14(7):929.
- [13] 张春艳,周孝治,陈菊芳,等. 光化学衍生-高效液相色谱法测定黄曲霉毒素含量[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2010, 36(5):569.
- [14] 魏文峰,王昶,张树明,等. 串联质谱技术在中药化学成分分析中的应用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(14):351.
- [15] 牟仁祥,曹赵云,金连登,等. 免疫亲和柱净化-液相色谱质谱法对粮谷中 T-2 与 HT-2 毒素的测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(3):368.

[责任编辑 顾雪竹]