

# 本土化SCIEX Triple Quad™ 5500+系统测定中药材中桔青霉素的检测方案

## Quantitative Analysis of Citrinin in Traditional Chinese Medicine by Localize SCIEX Triple Quad™ 5500+ System

雷敏, 龙志敏, 郭立海

Lei Min, Long Zhimin, Guo Lihai

SCIEX, 中国

**Key words:** Quantitation, Citrinin, Traditional Chinese Medicine, Mycotoxins, Localize SCIEX Triple Quad™ 5500+ System

### 引言

桔青霉素是青霉属、曲霉属、红曲霉属中的丝状霉菌代谢产生的一种真菌毒素, 有研究表明, 桔青霉素可造成人和动物肾脏、肝脏、肠道和生殖系统的损伤, 甚至还可以导致畸形、肿瘤, 诱发突变<sup>[1,2,3]</sup>。《中国药典》9305中药中真菌毒素测定指导原则(第一次)征求意见稿<sup>[4]</sup>中提到中药材在种植、加工、储存及流通等过程中存在被真菌及其产生的毒素污染的风险, 为实现对中药中真菌毒素的准确测定, 制定本指导原则。除已收录入2020年版《中国药典》2351真菌毒素测定法中的7类11种真菌毒素测定法外, 该指导原则其中一项, 增订桔青霉素高效液相色谱法与液相色谱串联-质谱法两种检测方法。本方案针对桔青霉素高效液相色谱串联质谱法建立液质方法和前处理方法, 为中药中桔青霉素检测提供参考。

### 本文中实验方法特点

本方法采用桔青霉素免疫亲和柱对中药中的桔青霉素进行提取, 使用本土化SCIEX Triple Quad™ 5500+系统进行定量, 方法特点如下:

- 1、使用本土化SCIEX Triple Quad™ 5500+系统, 结合Phenomenex Luna Omega Polar C18色谱柱, 建立8 min 色谱梯度, 实现高通量定量分析。

- 2、方法灵敏度高(定量下限LOQ: 0.02 ng/mL, 相当于中药的含量为0.08 μg/kg); 标准溶液线性范围广(0.02~20 ng/mL); 低浓度重现性好(6针RSD仅4.27%), 表明仪器和方法重现性好。
- 3、该方案中采用桔青霉素免疫亲和柱对中药进行前处理, 三个不同浓度提取回收率在91-105%, 满足药典对回收率的要求; 不同浓度的共9份样品回收率RSD仅5.30%, 表明不同浓度回收率结果一致, 且仪器的重复性好; 前处理流程简单易操作。
- 4、该方案中包含的液质条件和前处理提取方法, 为中药中测定桔青霉素提供参考。

### 实验方法

#### 1. 样本制备

以白术为代表样品, 前处理流程如下:

称中药白术粉末2 g, 加入10 ml 70%甲醇, 涡旋1分钟, 超声20 min, 4750 rpm离心10 min; 按照桔青霉素免疫亲和柱操作说明进行处理, 取上清液5 ml 加入35 ml 磷酸缓冲液(pH=7.5)稀释, 涡旋混匀; 取以上20 ml 稀释液上桔青霉素免疫亲和柱, 最后用2 ml 甲醇洗脱后, LC-MS/MS进样测定。

其中, 离心机为BECKMAN COULTER (型号: Avanti J-15R centrifuge);

磷酸缓冲液(pH=7.5): 取0.688 ml 磷酸, 加水定容至1000 ml, 用2 mol/L NaOH溶液调pH至7.5。

## 2. 仪器设备



图1. ExionLC™ 2.0系统和本土化SCIEX LC-MS/MS系统

## 3. 液相条件

液相: SCIEX ExionLC™ 2.0系统

色谱柱: Phenomenex Luna Omega Polar C18 (2.1 × 100 mm, 3 μm)

流动相A相: H<sub>2</sub>O(含 0.2%甲酸 +0.5 mmol/L 甲酸铵)

B相: ACN(含 0.2%甲酸 +0.5 mmol/L 甲酸铵)

流速: 0.5 mL/min

柱温: 40 °C

梯度洗脱程序如表1:

表1. 液相梯度条件

时间 ( min )	A%	B%
0	75	25
4.5	35	65
5.0	5	95
6.0	5	95
6.1	75	25
8.0	75	25

## 4. 质谱条件

SCIEX Triple Quad™ 5500+系统

数据采集方法: MRM (多反应监测)

离子源: ESI+源

离子源参数:

气帘气CUR: 35psi

IS电压: 3500V

源温度 TEM: 500°C

雾化气Gas1: 50psi

辅助气Gas2: 50psi

碰撞气 CAD: Medium

多反应监测离子通道如表2

表2. MRM离子对信息

化合物	母离子 Q1(m/z)	子离子 Q3 ( m/z )	DP (V)	CE (V)
Citrinin 1 ( 定量 )	251.1	233.1	95	25
Citrinin 2 ( 定性 )	251.1	205.1	95	37

## 实验结果

### 灵敏度和线性考察

参照附件2.9305中药中真菌毒素测定指导原则(第一次)公示稿<sup>[4]</sup>中说明,若待测毒素基质效应在±20%以内,可采用合适的溶剂配制对照品溶液。本实验经确认,桔青霉素的基质效应小于20%,因此采用甲醇为溶剂制备标曲溶液。

空白溶剂、0.02 ng/mL和20 ng/mL 标液样品典型谱图见图2。从图2可以看出,空白溶剂中两个MRM离子通道均无干扰,方法专属性好,特异性高。LOQ 可低至0.02 ng/mL,表明仪器灵敏度高。该色谱条件下,色谱峰峰形良好。

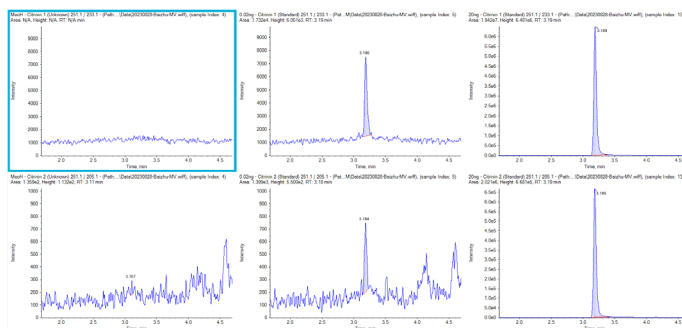


图2. 典型色谱图(从左到右,分别为空白溶剂、0.02 ng/mL和20 ng/mL基质加标样品;上、下两张谱图分别为定量和定性离子对通道)

以甲醇作为溶剂配制不同浓度的标准溶液，最终配制浓度分别为0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 10, 20 ng/mL，进LC-MS/MS系统进行分析。不同浓度的峰面积及线性回归方程见图3。从图3可见，0.02 ~20 ng/mL的浓度范围内，线性相关系数0.9998，表明该方法线性关系良好。以下结果均以定量离子对进行展示。

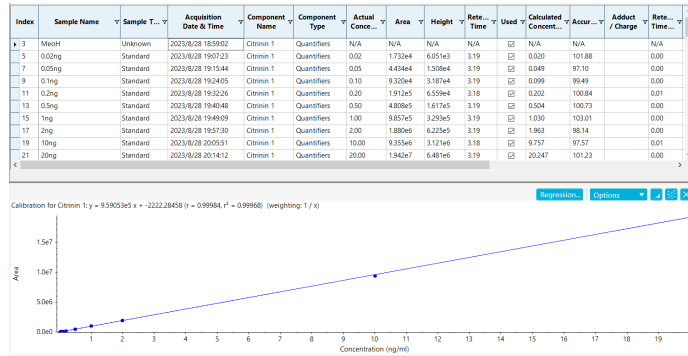


图3. 标准曲线和线性回归方程，线性相关系数 0.9998

### 重现性

为考察低浓度的重现性，将0.05 ng/mL标液重复进样6次，计算RSD，以定量离子对展示RSD结果。6针样品(图4)连续采集，精密密度 (RSD) 为4.27%，远满足方法学中对重复性要求，表明仪器和方法的重现性好。

### 提取回收率考察

参照实验方法1中样本制备过程，称量3份白术粉末，分别加



图4. 0.05 ng/ml浓度连续进样6针色谱图，峰面积、保留时间及RSD结果列表

入标准溶液配制成最终进样浓度为0.1, 0.2, 2 ng/ml三个不同浓度(相当于中药的含量分别为0.4, 0.8和8 μg/kg)，每个浓度平行制备3份，后续处理按照样本制备过程进行前处理，该样本做为前加标样本。

同时，称量1份白术粉末，同样按照样本制备过程进行前处理，该样本作为空白基质样本；以空白基质样本作为溶剂，分别配制成最终进样浓度为0.1, 0.2, 2 ng/ml三个不同浓度，每个浓度进样3次，该样本做为后加标样本。

使用前加标样本的峰面积除以后加标样本的平均峰面积，计算提取回收率。提取回收率结果 (表4) 可知，三个不同浓度的提取回收率在91-105%之间，9份提取回收率结果RSD为5.30%，表明不同浓度的提取回收率结果基本一致，且满足方法学要求。

表4. 3个不同浓度的提取回收率结果

加标浓度 (μg/kg)	后加标样品峰面积 (均值)	前加标样品峰面积	提取回收率 (%)
0.4	1.11E+05	1.16E+05	104.5
		1.14E+05	103.2
		1.15E+05	103.8
0.8	2.07E+05	2.17E+05	104.6
		2.07E+05	99.9
		2.10E+05	101.4
8	1.86E+06	1.77E+06	95.1
		1.69E+06	91.0
		1.73E+06	92.8

### 结论

本方法采用桔青霉素免疫亲和柱对中药中的桔青霉素进行提取，使用本土化SCIEX Triple Quad™ 5500+系统进行定量。该方法中空白溶剂无干扰，专属性好，特异性高；LOQ低至0.02 ng/ml，表明仪器灵敏度高；线性范围为0.02 -20 ng/ml，线性范围宽，线性关系良好；低浓度6针RSD仅4.27%，表明仪器和方法的重现性和稳定性好；8分钟梯度方法，检测通量高。前处理流程简单，易操作。该方案中包含的液质条件和前处理方法，为中药中桔青霉素的定量提供参考。

## 参考文献

1. Frank HK. Citrinin. Z Ernaehrungswiss, 1992,31(3):164
2. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. Production of citrinin by various species of Monascus. Biotechnol Lett, 1995,17(3):291
3. LI Yan, QIU Feng, etc. LC-MS/MS determination of citrinin in traditional Chinese Medicines. Chin J Pharm Anal 2011,31(9)
4. 附件 2: 9305 中药中真菌毒素测定指导原则 (第一次)

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息, 请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标, 也包括相关的标识、标志的所有权, 归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2023 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-15742-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院  
1号楼5层  
电话: 010-5808-1388  
传真: 010-5808-1390  
全国咨询电话: 800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
上海市长宁区福泉北路518号  
1座502室  
电话: 021-2419-7201  
传真: 021-2419-7333  
官网: [sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州办公室  
广州国际生物岛星岛环北路1号  
B2栋501、502单元  
电话: 020-8842-4017

官方微信: [SCIEX-China](#)