

液相色谱-串联质谱法测定白酒中紫杉醇和三尖杉宁碱含量

游菁菁, 张 聪, 高海荣, 陈章捷*, 刘亿婕, 陈 亮, 王秀云, 程 琳

(福建省食品药品质量检验研究院, 福州 350000)

摘 要: **目的** 建立液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)检测白酒中红豆杉特征组分紫杉醇和三尖杉宁碱含量的方法。**方法** 样品经甲醇-水(7:3, V/V)提取液提取, 采用水(A)和甲醇(B)作为流动相进行梯度洗脱, 外标法定量, 质谱采用电喷雾电离正模式(positive electrospray ionization, ESI+)和多离子检测模式(multiple reactions monitoring, MRM)对紫杉醇和三尖杉宁碱的定量离子、定性离子进行监测。**结果** 在 50~1000 ng/L 范围内, 紫杉醇和三尖杉宁碱呈良好的线性关系, 相关系数 r^2 不小于 0.995, 方法的检出限为 2.5 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 8.3 $\mu\text{g/kg}$ 。紫杉醇和三尖杉宁碱在 2.5、7.5、25.0 $\mu\text{g/kg}$ 3 个水平下加标回收率为 96.4%~115.6%, 相对标准偏差不得超过 2.53% ($n=6$)。用该方法检测市售红豆杉果实酒、红豆杉树皮酒, 均检测出紫杉醇和三尖杉宁碱。**结论** 该方法便捷、高效、准确、灵敏, 可用于测定非法添加红豆杉保健酒中紫杉醇和三尖杉宁碱含量。

关键词: 红豆杉; 紫杉醇; 三尖杉宁碱; 液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of taxol and cephalomannine in white spirit by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

YOU Jing-Jing, ZHANG Cong, GAO Hai-Rong, CHEN Zhang-Jie*, LIU Yi-Jie, CHEN Liang, WANG Xiu-Yun, CHENG Lin

(Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of taxus characteristic components taxol and cephalomannine in white spirit by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Methods** Samples were extracted with methanol-water (7:3, V/V) solution. Gradient elution was carried out by using water (A) and methanol (B) as mobile phase, and external standard method was used for quantitative analysis. Positive electrospray ionization (ESI+) and multiple reactions monitoring (MRM) mode were used to monitor the quantitative and qualitative ions of paclitaxel and harringtonine. **Results** The calibration curves showed a good linearity in the range of 50-1000 ng/L and the correlation coefficients r^2 were no less than 0.995. The detection limit for the taxol and cephalomannine was 2.5 $\mu\text{g/kg}$, and the limit of quantitation for the taxol and cephalomannine was 8.3 $\mu\text{g/kg}$. The recoveries were ranged from 96.4%-115.6% for the taxol and cephalomannine with 3 spiked levels of 2.5, 7.5 and 25.0 $\mu\text{g/kg}$. and the relative standard deviations (RSDs) were less than 2.53% ($n=6$). Taxol and cephalomannine were

基金项目: 福建省科技计划项目(2018Y0086)

Fund: Supported by the Science and Technology Planning Project of Fujian Province (2018Y0086)

*通讯作者: 陈章捷, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全质量检测。E-mail: chenhangj@163.com

*Corresponding author: CHEN Zhang-Jie, Master, Senior Engineer. Fujian Institute for Food and Drug Quality Control, Fuzhou 350000, China. E-mail: chenhangj@163.com

detected in taxus fruit wine and taxus bark wine sold in the market by this method. **Conclusion** The proposed method is convenient, efficient, accurate and sensitive, which is suitable for detecting taxol and cephalomannine in illegally added taxus health wine.

KEY WORDS: taxus; taxol; cephalomannine; white spirit; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

1 引言

红豆杉(*Taxusbaccata*L.)又名紫杉、赤柏松、紫柏松,植物分类为裸子植物亚门,松杉纲,紫杉目,红豆杉科。红豆杉属常绿乔木,是世界上公认的濒临灭绝天然抗癌植物。紫杉醇(taxol)是由 Wani 等^[1]于 1971 年首次从短叶红豆杉中分离出来,具有独特的抗肿瘤机制^[2,3]。1992 年美国 FDA 批准了紫杉醇用于对晚期卵巢癌的治疗,1994 年又批准了对乳腺癌的治疗。近年来研究表明紫杉醇对卵巢癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、肺癌、胰腺癌、白血病以及黑色素瘤等恶性肿瘤都具有良好的疗效^[4-6]。三尖杉宁碱和紫杉醇同为红豆杉中的紫杉烷类化合物,具有较强的抗肿瘤活性^[7,8]。

红豆杉具有一定毒性,研究表明红豆杉主要成分紫杉醇可引起过敏反应、有心脏毒性、骨髓抑制、肝脏损失、神经毒性、癫痫和消化系统毒性等^[9,10]。《卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知》(卫法监发[2002]5 号)^[11]中,已将红豆杉列入《保健食品禁用物品名单》,禁止红豆杉作为保健食品和食品原料使用。2006 年卫生部发布第 2 号公告^[12],严禁食品生产经营单位生产和经营含红豆杉的食品。由于红豆杉的抗癌特性在民间有较高的知名度,出于经济利益或者是缺乏常识,市场上仍存在部分生产经营单位违法生产和销售以红豆杉为原料的相关食品,如以红豆杉果、树皮等为原料,白酒等为酒基,制作所谓“红豆杉酒”“红豆杉保健酒”。淘宝等网售平台仍可见“红豆杉酒”售卖。这些“保健酒”直接服用毒性大,长期大量食用可能导致中毒,表现为头昏、瞳孔放大、恶心、呕吐、弥散性腹痛、肌无力等,严重者出现心动缓慢、心脏骤停或死亡^[13]。

红豆杉含有许多紫杉烷类化合物,其中紫杉醇与三尖杉宁碱的含量较高^[14,15],可作为红豆杉成分检测的特征化合物。目前关于红豆杉成分的检测方法报道中,仅有用高效液相色谱法同时测定红豆杉中紫杉醇和三尖杉宁碱的方法^[14,16],暂无用液质联用同时测定紫杉醇和三尖杉宁碱的方法,也无任何非法添加红豆杉食品的鉴定方法。本文建立液相色谱串联质谱法测定白酒中紫杉醇和三尖杉宁碱含量的方法,可弥补非法添加红豆杉食品鉴定方法的空缺,为市场监管和执法稽查提供了固定证据的有力手段,为违法行为的调查、定性和惩处提供了科学依据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

2.1.1 实验仪器

ACQUITY UPLC I-CLASS/XEVO TQ-S 三重四级杆液相质谱联用仪(美国 Waters 公司); XSE204 电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司); Milli-Q 纯水系统(美国 Millipore 公司); CR21N 高速冷冻离心机(日本日立公司)。

2.1.2 试剂与材料

紫杉醇对照品(纯度 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 三尖杉宁碱对照品(纯度 97.0%, 加拿大 TRC 公司); 甲醇、乙腈(色谱纯, 德国默克公司); 甲酸(色谱纯, 上海阿拉丁公司); 实验用水为纯净水。

ACQUITY UPLC R BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司); ZORBAX Elicpse Plus C₈ Rapid Resolution HD 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm, 美国安捷伦公司)

白酒购买于本地超市;“红豆杉酒”样品为网售平台购买。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

混合标准溶液的配制: 分别精密称取紫杉醇和三尖杉宁碱对照品各约 10 mg, 用甲醇溶解, 定容于 10 mL 容量瓶中, 配制浓度为 1000 mg/L 标准贮备液, 4℃保存。取贮备液用甲醇: 水(7:3, V/V)溶液逐级稀释成 5 个浓度梯度(50、100、200、500、1000 ng/L)的混合标准曲线。

2.2.2 样品前处理

称取 2g (精确至 0.01 g)的白酒样品, 用甲醇: 水(7:3, V/V)定容于 100 mL 容量瓶中, 摇匀, 8000 r/min 离心, 10 min, 取上清液上机检测。

2.2.3 液相色谱-串联质谱条件

(1)液相色谱条件

ACQUITY UPLC R BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm), 流动相: 水(A)-甲醇(B), 流速: 0.2 mL/min, 进样体积: 1 μL, 柱温: 30℃。液相色谱梯度洗脱程序见表 1。

(2)质谱条件

离子源: 电喷雾电离正模式(positive electrospray ionization, ESI⁺), 毛细管电压: 2.76 kV; 离子源温度: 150℃; 脱溶剂气温度: 500℃; 脱溶剂气流量 950 L/h。

扫描模式: 多离子检测模式(multiple reactions monitoring, MRM)。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution schedule

时间/min	A/%	B/%
0.00	30	70
1.00	30	70
3.00	10	90
4.00	10	90
4.01	30	70
6.00	30	70

3 结果与分析

3.1 质谱条件优化

分别将紫杉醇和三尖杉宁碱的标准溶液配制成 50μg/L 浓度的标准溶液, 在正离子模式下进行全扫描, 紫杉醇及三尖杉宁碱均可形成稳定的 [M+Na]⁺ 峰, 以 [M+Na]⁺ 峰为母离子, 给予一定的碰撞能量, 进行子离子扫描, 选取信号最强的 2 个子离子分别作为定性和定量离子, 并优化母离子电压和碰撞电压。此条件下 2 种物质的灵敏度好, 响应值高。紫杉醇和三尖杉宁碱质谱参数优化结果见表 2。紫杉醇和三尖杉宁碱标准物质的多反应监测图见图 1、样品的多反应监测图见图 2。

表 2 紫杉醇和三尖杉宁碱质谱参数
Table 2 Chromatogram parameters of taxol and cephalomannine residues

编号	化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	电压/V	碰撞能量/V
1	紫杉醇	876.1	308.0*	55	30
		876.1	531.0	55	32
2	三尖杉宁碱	854.1	286.0*	38	30
		854.1	531.0	38	30

注: *为定量离子

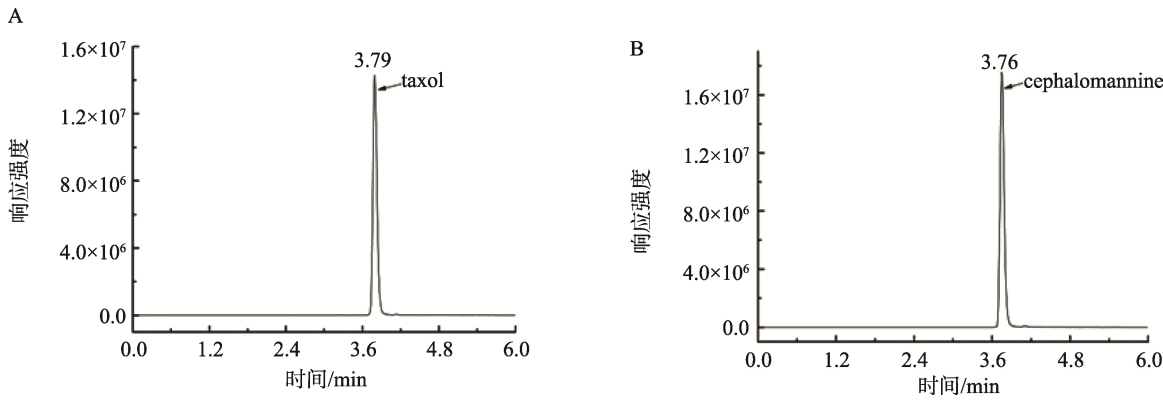


图 1 紫杉醇(A)与三尖杉宁碱(B)标准溶液的多反应监测色谱图
Fig.1 MRM chromatogram of taxol(A) and cephalomannine (B) standard solution

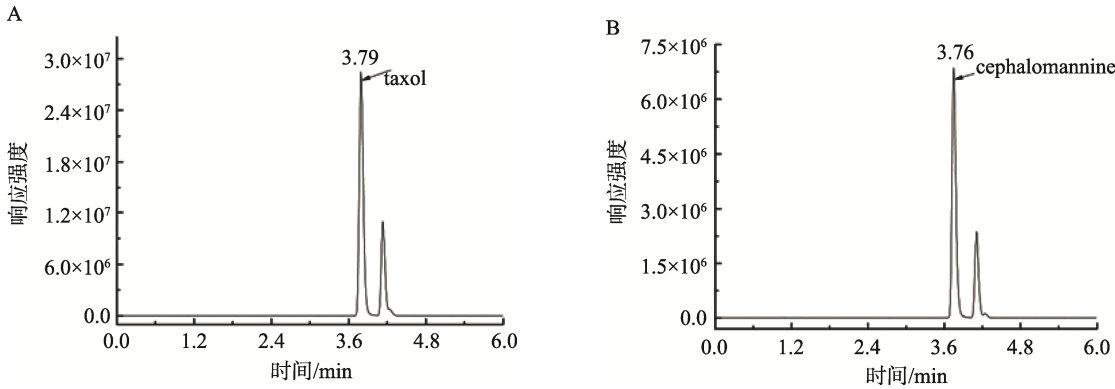


图 2 样品中紫杉醇(A)与三尖杉宁碱(B)的多反应监测色谱图
Fig.2 MRM chromatogram of taxol (A) and cephalomannine (B) in sample

3.2 色谱条件优化

3.2.1 色谱柱的选择

比较了两种短柱: ACQUITY UPLC R BEH C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)和 ZORBAX Elicpse Plus C₈ Rapid Resolution HD 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm), 实验表明, ACQUITY UPLC R BEH C₁₈ 色谱柱的峰型较好, 响应值更高。

3.2.2 流动相的选择

分别考察了使用甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.1%甲酸、乙腈-0.1%甲酸为流动相情况下, 2 种化合物的响应情况, 发现峰型都较好, 但甲醇-水为流动相时响应值最高。因此, 本研究选择了甲醇-水为流动相。

3.3 前处理条件优化

3.3.1 样品稀释溶剂优化

分别考察了水、甲醇-水和乙腈-水为样品稀释溶剂, 上机检测发现以甲醇-水为稀释溶液效果较好, 目标成分响应值最高。再分别比较了甲醇-水不同比例(3:7、4:6、5:5、6:4、7:3、8:2, V:V)的混合稀释液, 发现甲醇-水(7:3)稀释效果较好, 目标成分响应值最高, 最后选用甲醇-水(7:3)为稀释液。

3.3.2 净化条件优化

实验中发现, 采用 0.22 μm 有机滤膜过滤时, 目标成分会被滤膜吸附, 紫杉醇化合物损失较大, 三尖杉宁碱少量损失。所以本实验上机前不过滤膜, 仅采用离心方式沉

淀杂质, 减少干扰。

3.4 方法的线性范围及检出限

紫杉醇与三尖杉宁碱标准品在 50~1000 ng/L 范围, 按照上述色谱和质谱条件进行检测, 采用外标法定量, 2 种物质的曲线方程及相关系数见表 3。可知 2 种物质的相关系数均大于 0.990, 线性关系良好。在阴性白酒样品中添加低浓度标准物质, 上机检测, 以 3 倍信噪比(S/N=3)为检出限(limit of detection, LOD), 以 10 倍信噪比(S/N=10)为定量限(limits of quantification, LOQ), 得出紫杉醇与三尖杉宁碱方法的检出限为 2.5 μg/kg, 定量限为 8.3 μg/kg, 说明方法的灵敏度较好, 且远小于实际样品测定值, 完全可满足实际检测需要。

3.5 回收率及精密度实验

以空白白酒为样品, 在 2.5、7.5、25.0 μg/kg3 个水平下进行加标回收实验。每个加标水平做 6 组平行, 结果见表 4。结果显示, 2 种化合物的平均回收率为 96.4% ~ 115.6%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 1.05% ~ 2.53%, 方法的准确性和重复性满足实验室检验质量控制要求^[17]。

3.6 实际样品测定

用本方法对网络上购买的 9 份“红豆杉酒”样品进行检测, 9 份样品全部有检出 2 种物质, 结果见表 5。

表 3 紫杉醇和三尖杉宁碱的线性范围、线性方程、相关系数、检出限和定量限
Table 3 Linear ranges, linear equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of thetaxol and cephalomannine residues

化合物	线性范围/(ng/L)	线性方程	相关系数 r^2
紫杉醇	50~1000	$Y=8.9348X-16.3659$	0.998
三尖杉宁碱	50~1000	$Y=17.042X-51.1608$	0.995

表 4 紫杉醇和三尖杉宁碱的回收率和相对标准偏差(%)
Table 4 Recoveryrates and RSDs of taxoland cephalomannine (%)

化合物	添加量 2.5 μg/kg		添加量 7.5 μg/kg		添加量 25.0 μg/kg	
	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
紫杉醇	96.4	1.95	103.2	1.32	109.6	1.05
三尖杉宁碱	108.0	2.53	111.2	1.87	115.6	2.11

表 5 样品中紫杉醇和三尖杉宁碱的含量
Table 5 The contents oftaxolandcephalomannine in the samples

样品	紫杉醇/(mg/kg)	三尖杉宁碱/(mg/kg)
红豆杉果酒 1 号	10.37	1.816
红豆杉果酒 2 号	1.995	0.1733
红豆杉果酒 3 号	5.405	0.4858
红豆杉果酒 4 号	6.909	0.5537

续表 5

样品	紫杉醇/(mg/kg)	三尖杉宁碱/(mg/kg)
红豆杉果酒 5 号	7.784	0.6355
红豆杉果酒 6 号	9.822	0.7350
红豆杉果酒 7 号	3.483	0.2609
红豆杉果酒 8 号	5.402	0.4618
红豆杉树皮酒	14.973	4.781

4 结论与讨论

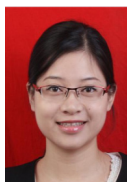
本研究建立了白酒中红豆杉特征组分紫杉醇和三尖杉宁碱的高效液相色谱-串联质谱法,该方法简单、快速,精密度和灵敏度均符合食品检测实验室质量控制规范。通过检测市场上购买的红豆杉保健酒样品,紫杉醇和三尖杉宁碱全部检出,且含量较高。检测结果表明市场中售卖的红豆杉酒存在较大食品安全风险。而该方法的建立为市场上非法添加红豆杉的“保健酒”鉴定和违法行为的执法稽查提供了技术支撑,通过对可疑红豆杉保健酒开展监测和分析,也为食品安全监管部门制定食品安全监测计划提供了靶向依据,有利于遏制红豆杉被误用、滥用或违规使用的势头。

参考文献

- [1] Wani MC, Taylor HL, Wall MC, *et al.* Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novalantileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* [J]. *J Am Chem Soc*, 1971, (93): 2325–2327.
- [2] 王炯, 陈涵, 王章东, 等. 豆杉的药理作用及毒性小考[J]. *西部中医药*, 2017, (4): 139–142.
- Wang J, Chen H, Wang ZD, *et al.* Study on the toxicity and pharmacological action of Chinese yew [J]. *West J Tradit Chin Med*, 2017, (4): 139–142.
- [3] 刘先芳, 梁敬钰, 孙建博. 杉醇: 具有里程碑意义的天然抗癌药物[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2017, 19(6): 941–948.
- Liu XF, Liang JY, Sun JB. Paclitaxel: A landmark natural anticancer drug [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2017, 19(6): 941–948.
- [4] 张静. 植物红豆杉的抗癌药用价值研究[J]. *中国药业*, 2014, 23(1): 1–3.
- Zhang J. Medicinal value of anti-cancer plant *Taxus chinensis* [J]. *China Pharm*, 2014, 23(1): 1–3.
- [5] Navia OA, Garden H, Cusidó RM, *et al.* Taxol and baccatin III production in suspension cultures of *Taxus baccata* and *Taxus wallichiana* in an airlift bioreactor [J]. *J Plant Physiol*, 2002, 159(1): 97–102.
- [6] Pandurangan P, Namasivayam SKR. Anti-oxidative and anti-tumor activity of biomass extract of mycoprotein *Fusarium venenatum* [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2013, 7(23): 1697–1702.
- [7] 佟晓杰, 方唯硕, 周金云, 等. 东北红豆杉枝叶化学成分的研究[J]. *药学报*, 1994, 29(1): 55–60.
- Tong XJ, Fang WS, Zhou JY, *et al.* Studies on the chemical constituents of leaves and twigs of *Taxus cuspidate* [J]. *Acta Pharma Sin*, 1994, 29(1): 55–60.
- [8] 姜毅, 金晓英, 陈建民. 7-表-10-去乙酰基三尖杉宁碱的 HPLC 分析方法及其溴化产物的抗癌活性研究[J]. *复旦学报(自然科学版)*, 2004, 43(4): 621–627.
- Jian Y, Jin XY, Chen JM. Study on 7-Epi-10-deacetylcephalomannine: HPLC assay and its brominated products as potent antitumor agents [J]. *J Fudan Univ(Nat Sci Ed)*, 2004, 43(4): 621–627.
- [9] 赵丽杰, 吴红杰. 抗肿瘤药紫杉醇的不良反应及临床合理用药分析[J]. *中国医药指南*, 2018, 16(9): 140–141.
- Zhao LJ, Wu HJ. Analysis on adverse reactions caused by antitumor drug taxol and clinical rational drug use [J]. *Guid China Med*, 2018, 16(9): 140–141.
- [10] 刘爱华. 抗肿瘤药紫杉醇的临床应用及不良反应[J]. *中国伤残医学*, 2013, 21(8): 273–274.
- Liu AH. The adverse reactions and rational clinical use of the antitumor drug taxol [J]. *Chin J Trauma Disabil Med*, 2013, 21(8): 273–274.
- [11] 中华人民共和国卫生健康委员会. 卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知[Z]. 2002-02-28.
- National Health Commission of the People's Republic of China. Notice of the Ministry of Health on further standardizing the management of health food raw materials [Z]. 2002-02-28.
- [12] 中华人民共和国卫生健康委员会. 中华人民共和国卫生部公告2006年第2号[Z]. 2006-02-08.
- National Health Commission of the People's Republic of China. No. 2 of 2006 by the Ministry of Health of the People's Republic of China [Z]. 2006-02-08.
- [13] 周美珍, 张永强, 李文举, 等. 国产紫杉醇治疗 40 例中晚期恶性肿瘤[J]. *中国癌症杂志*, 2000, 10(1): 73–74.
- Zhou MZ, Zhang YQ, Li WJ, *et al.* Domestic paclitaxel in the treatment of 40 cases with advanced malignance [J]. *China Onol*, 2000, 10(1): 73–74.
- [14] 杨星星, 王仁才, 张家银, 等. 南方红豆杉枝叶与果实中 6 种紫杉烷类化合物含量分析[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2016, (5): 549–553.
- Yang XX, Wang RC, Zhang JY, *et al.* Content analysis on 6 kinds of taxanes in branches, leaves and fruits of *Taxus chinensis* var. *Mairei* [J]. *J Hunan Agric Univ(Nat Sci Ed)*, 2016, (5): 549–553.
- [15] 王楷婷, 李春英, 倪玉娇, 等. 红豆杉的化学成分、药理作用和临床应用[J]. *黑龙江医药*, 2017, 30(6): 1196–1198.
- Wan KT, Li CY, Ni YJ, *et al.* Chemical compositions, pharmacological effects and clinical application of *Taxus chinensis* [J]. *Heilongjiang Med J*, 2017, 30(6): 1196–1198.
- [16] 赵俊宏, 李文锋, 樊燕鸽, 等. 新乡红豆杉中多种紫杉烷类化合物的反相高效液相色谱分析[J]. *化学研究*, 2011, 22(3): 8–10.
- Zhao JH, Li WF, Fan YG, *et al.* Analysis of taxanes in Chinese yew planted in Xinxiang by reverse-phase high-performance liquid chromatography [J]. *Chem Res*, 2011, 22(3): 8–10.
- [17] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范食品理化检测[S].
- GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



游菁菁, 硕士, 主管药师, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: 627870816@qq.com



陈章捷, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全质量检测。
E-mail: chenzhangjie@163.com