

# Determination of Aflatoxin B1 in Chinese Herbal Medicines by Supercritical Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Using Coix Lacryma Cryptogram as an Example

Kun Dong\*

Zhangjiakou Food and Drug Inspection Center, Zhangjiakou, Hebei, 075000, China

## Abstract

This method was developed for the determination of aflatoxin B1 in Chinese herbal medicines, such as Coix lacryma, by supercritical chromatography-tandem mass spectrometry (SC-MS/MS). The samples were crushed and extracted using a 70% methanol solution and eluted with methanol after adsorption of AFB1 on an immunoaffinity column. The separation was performed on a Shim-packUC-XRPC18 column (150 mm×4.6 mm, 3 μm) with a gradient elution using critical CO<sub>2</sub>-methanol as the mobile phase. Multiple reaction monitoring (MRM) was performed using electrospray ionization ion source positive mode. The correlation coefficients of aflatoxin B1 were 0.9999 in the range of 0.3ng/mL~30ng/mL with good linearity; the average spiked recoveries were 89.7%~100.9%, respectively; the limit of quantification of the method was 0.5μg/kg. This method is simple, safe and accurate for the determination of aflatoxin residues in Coix lacryma.

## Keywords

supercritical chromatography-tandem mass spectrometry; supercritical CO<sub>2</sub>; aflatoxin B1; Chinese herbal medicine

# 超临界色谱-串联质谱法测定以薏苡仁为例的中药材中黄曲霉毒素 B1

董琨\*

张家口市食品药品检验中心, 中国·河北 张家口 075000

## 摘要

论文采用超临界色谱-串联质谱法对以薏苡仁为例的中药材中黄曲霉毒素 B1 进行测定。将样品粉碎后使用 70% 甲醇溶液进行提取, 经免疫亲和柱对 AFB1 吸附后, 用甲醇进行洗脱。以临界 CO<sub>2</sub>-甲醇为流动相梯度洗脱, 经 Shim-packUC-XRPC18 色谱柱 (150mm×4.6mm, 3 μm) 分离。采用电喷雾离子源正离子模式, 多反应监测 (MRM) 进行检测。黄曲霉毒素 B1 在 0.3ng/mL~30ng/mL 范围内相关系数分别为 0.9999, 线性关系良好; 平均加标回收率分别为 89.7%~100.9%; 方法的定量限浓度为 0.5 μg/kg。本方法简单、安全、准确, 可用于检测薏苡仁中黄曲霉毒素的残留量。

## 关键词

超临界色谱-串联质谱法; 超临界 CO<sub>2</sub>; 黄曲霉毒素 B1; 中药材

## 1 引言

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AFT) 是由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉 (*A.parasiticus*) 和模式曲菌 (*A.nomius*) 等在合适的温度和湿度条件下产生的真菌毒素, 对人畜有强烈的致病性、致癌性<sup>[1]</sup>。常见的有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 等。天然污染的黄曲霉毒素以黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 为主,

AFB<sub>1</sub> 是二氢呋喃氧杂萜邻酮的衍生物, 含双呋喃环和氧杂萜邻酮 (香豆素), 具有极强的急性毒性和致癌性, 肝脏是其主要靶器官<sup>[2]</sup>。其中, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的毒性和致癌性最强, 其毒性比氰化钾高, 也是目前最强的化学致癌物。

薏苡仁为禾本科植物薏苡的干燥成熟种仁。秋季果实成熟时采割植株, 晒干, 打下果实, 再晒干, 除去外壳、黄褐色种皮和杂质, 收集种仁。其因存储过程中吸潮或处理不当而产生黄曲霉毒素。黄曲霉毒素难溶于水, 对光、热都较为稳定, 一般的晒、洗、煎煮都难以破坏其结构, 一旦受到黄

【作者简介】董琨 (1983-), 女, 主管药师, 本科学历, 从事食品药品检验及新方法的开发研究。

曲霉毒素污染, 很难消除, 从而影响药材的质量, 严重者会威胁到患者的生命安全<sup>[3]</sup>。《中国药典》(2020年版)规定薏苡仁中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的限量指标为每 1000g 含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 不得过 5 $\mu$ g<sup>[4]</sup>。

本方法采用超临界色谱-串联质谱法, 对以薏苡仁中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 进行测定, 样品只需简单前处理后, 经超临界色谱分离和质谱检测。与传统检验方法相比较, 超临界色谱-串联质谱法具有快速、安全、准确等优点。

## 2 仪器与试剂

### 2.1 仪器

岛津 NexeraUC 型超临界色谱系统串联岛津 8060 型串联质谱仪(日本岛津公司); CPA225D 型十万分之一精密电子天平(赛多利斯集团); 离心机; Millipore 超纯水机(美国 Millipore 公司); C9860A 型超声波清洗仪(天津科贝尔光电技术有限公司, 250W, 50KHz)。

### 2.2 标准物质与试剂

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (含量 100 $\mu$ g/mL) (来源为 Prabolab)。甲醇(Fisher Scientific 试剂公司, 色谱纯), 氯化钠(科密欧试剂公司, 分析纯); 免疫亲和柱(来源为 Prabolab); 水为 Milli-Q 纯化系统制备。

## 3 方法与结果

### 3.1 溶液的制备

#### 3.1.1 对照品储备液的制备

精密量取黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 标准溶液 1000 $\mu$ L 至 50mL 容量瓶中, 分别加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成每 1mL 含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 2 $\mu$ g 的标准储备液。

#### 3.1.2 供试品溶液的制备

参照《中国药典》(2020年版)四部“黄曲霉毒素测定法”供试品溶液制备方法<sup>[5]</sup>。取薏苡仁粉末(过二号筛)约 15g, 精密称定, 置于 100mL 离心管中, 加入氯化钠 3g, 精密加入 70% 甲醇溶液 75mL, 高速涡旋 10min, 离心 5min (离心速度 9000r/min), 精密量取上清液 15mL, 置 50mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 量取续滤液 20.0mL, 通过免疫亲和柱, 流速每分钟 3mL, 用水 20mL 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, 置 2mL 量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 用微

孔滤膜(0.22 $\mu$ m)滤过, 即得。

### 3.2 色谱条件

(1) 色谱柱: Shim-pack UC-X RP C<sub>18</sub> 色谱柱(150mm × 4.6mm, 3 $\mu$ m);

(2) 流动相: 以超临界 CO<sub>2</sub> 为流动相 A, 以甲醇为流动相 B, 进行梯度洗脱(0~7min, 2%B → 30%B; 7~8min, 30%B; 8.1~10min, 2%B) 洗脱时背压 A 为 15MPa, 背压 B 为 40MPa, 流速: 2mL/min, 柱温: 40℃; 进样量: 5 $\mu$ L。

(3) 质谱补偿液: 甲醇, 补偿液流速: 0.1mL/min。

在上述色谱条件下, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的色谱图见图 1。

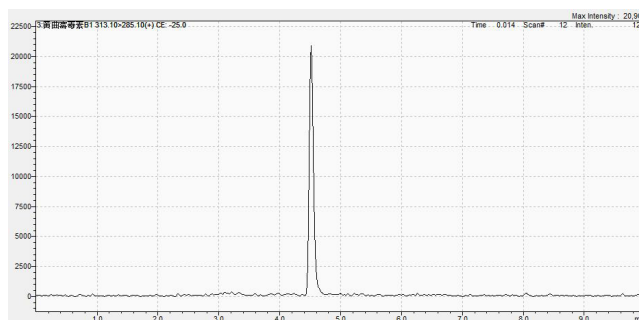


图 1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的 SFC-MS/MS 色谱图

### 3.3 质谱条件

正离子检测模式; 离子源: ESI 源; 离子源温度: 400℃; 脱溶剂管温度: 200℃; 加热模块温度: 400℃; 雾化气流量: 3L/min; 加热气流量: 15L/min; 干燥气流量: 5L/min; 其他质谱参数见表 1。

表 1 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 质谱参数

NO	名称	Precursor m/z	Product m/z	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	313.10	241.10	-16.0	-39.0	-26.0
			285.10*	-12.0	-25.0	-30.0

注: \* 表示定量离子; Precursor- 前体离子; Product- 产物离子; Pre Bias- 预四级杆偏转电压; CE- 碰撞电压。

### 3.4 检测限和定量限

按色谱条件, 用标准溶液稀释的方法进样测定。结果当 S/N=3 时, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检测限为 0.10ng; 当 S/N=10 时, 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的定量限为 0.30ng。

### 3.5 线性关系考察

精密吸取“2.1.1”项下标准储备液 0 $\mu$ L、3 $\mu$ L、9 $\mu$ L、30 $\mu$ L、90 $\mu$ L、300 $\mu$ L, 置 10mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 配制一系列标准曲线工作液(0ng/mL、0.3ng/mL、0.9ng/mL、3ng/mL、9ng/mL、30ng/mL)。分别精密吸取上述系

列标准曲线工作液 5 $\mu$ L, 按“2.2”项下色谱条件进行分析, 以标准溶液的质量浓度 (ng/mL) 为横坐标 (X), 色谱峰的峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程, 其线性范围、回归方程和相关系数 (n=6) 结果见表 2。可见该方法在试验范围内线性关系良好。

表 2 黄曲霉 B<sub>1</sub> 线性关系测定结果

成分	线性范围 ( $\mu$ g/mL)	回归方程	r
AFB <sub>1</sub>	0.000300 ~ 0.030000	$Y=123520X+4250.32$	0.9999938

### 3.6 精密度和回收率

取不含黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的薏苡仁为本底, 共 18 份, 分别精密吸取“2.5”项下的浓度为 3ng/mL、9ng/mL、30ng/mL 的对照品标准曲线工作液 2.5mL 于空白本底表面, 混匀, 按指定步骤处理样品, 分析并测定其精密度和回收率, 结果见表 3。

表 3 样品回收率及精密度测定结果 (n=6)

	添加浓度 ( $\mu$ g/kg)	平均测定浓度 ( $\mu$ g/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
AFB <sub>1</sub>	0.5	0.448	89.7	1.9
	1.5	1.474	98.4	1.9
	5	5.042	100.9	1.4

### 3.7 样品测定结果

应用本实验方法对 10 份薏苡仁进行了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的

测定, 仅有 1 批检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 检出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的残留量为 0.58 $\mu$ g/kg。

## 4 结论

本方法检测过程主要采用超临界 CO<sub>2</sub>, 引入少量甲醇为改性剂, 减少了对实验人员的伤害及环境的污染, 检出限、回收率及精密度均满足现行国家标准要求。试验证明, 采用本方法测定中药材薏苡仁中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 具有快速、灵敏、安全、环保等特点, 适用于薏苡仁中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的定量检测。以此为例, 采用本实验方法对应用于中药材中检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 起到重要借鉴意义。

## 参考文献

- [1] 谢刚, 王松雪, 张艳. 超高效液相色谱法快速检测粮食中黄曲霉毒素的含量 [J]. 分析化学研究报告, 2013(02):223-228.
- [2] 张晶晶. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测 [J]. 按摩与康复医学, 2013(12):117-118.
- [3] 蒋孟圆, 胡林, 杨青松, 等. 18 批中药材中黄曲霉毒素的检测分析 [J]. 环境化学, 2018(10):2326-2328.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020 年版一部) [S]. 2020.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (2020 年版四部) [S]. 2020.