

高效液相色谱-质谱联用法测定薏苡仁药材中 黄曲霉毒素

诸 晨¹, 钱 勇^{2*}

(1. 上海佰年诗丹德检测技术有限公司, 上海 201314; 2. 上海诗丹德标准技术服务有限公司, 上海 201314)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-质谱联用法(hight performance liquid chromatography-mass spectrometer, HPLC-MS)测定薏苡仁中药饮片中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂的方法, 并对比不同产地薏苡仁中黄曲霉毒素含量。**方法** 样品经过免疫亲合柱处理后, 采用 HPLC-MS 进行测定。分析柱为 C₁₈ 柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相为 10 mmol/L 醋酸铵溶液-甲醇溶液, 梯度洗脱, 流速为 0.3 mL/min, 柱温为 25 °C。**结果** 黄曲霉毒素 B₁ 在 0.26~10.4 ng/mL 浓度范围内与峰面积值均呈现良好的线性关系($r^2=0.9995$), 平均加样回收率为 75.4%~123.9%, 黄曲霉毒素 B₂ 在 0.0875~3.5 ng/mL 浓度范围内与峰面积值均呈现良好的线性关系($r^2=0.9996$), 平均加样回收率为 71.1%~124.2%, 黄曲霉毒素 G₁ 在 0.295~11.89 ng/mL 浓度范围内与峰面积值均呈现良好的线性关系($r^2=0.9995$), 平均加样回收率为 78.9%~112.2%, 黄曲霉毒素 G₂ 在 0.1475~5.9 ng/mL 浓度范围内与峰面积值均呈现良好的线性关系($r^2=0.9992$), 平均加样回收率为 73.8%~123.9%。**结论** 该方法准确、可靠、专属性强, 通过精确化合物离子监测, 可准确的测定薏苡仁中黄曲霉毒素含量。

关键词: 高效液相色谱-质谱联用法; 黄曲霉毒素; 薏苡仁

Determination of aflatoxin in coix seed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry

ZHU Chen¹, QIAN Yong^{2*}

(1. Standard Testing Lab (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201314, China; 2. Shanghai Standard Technology Co., Ltd., Shanghai 201314, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in coix seed by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UPLC-MS), and compare the aflatoxin content in coix seed from different producing areas. **Methods** The samples were treated by immune affinity column, and detected by UPLC-MS. Analysis column was C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase was gradient elution with 10 mmol/L ammonium acetate solution-methanol, flow rate was 0.3 mL/min, and column temperature was 25 °C. **Results** Aflatoxin B₁ had good linear relationships in the range of 0.26-10.4 ng/mL, and the correlation coefficient was 0.9995. The average recoveries of aflatoxin B₁ were 75.4%-123.9%. Aflatoxin B₂ had good linear relationships in the range of 0.0875-3.5 ng/mL, and the correlation coefficient was 0.9996. The average recoveries of

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制(2018ZX09735006)

Fund: Supported by State Project for Essential Drug Research and Development Project (2018ZX09735006)

*通讯作者: 钱勇, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为中药和健康食品的检测及化学成分研究。E-mail: Qianyong2232@163.com

*Corresponding author: QIAN Yong, Master, Senior Engineer, Shanghai Standard Technology Co., Ltd, Building 25, #58 Xinhao Road, Shanghai 201314, China. E-mail: Qianyong2232@163.com

aflatoxin B₂ were 71.1%~124.2%. Aflatoxin G₁ had good linear relationships in the range of 0.295~11.89 ng/mL, and the correlation coefficient was 0.9995. The average recoveries of aflatoxin G₁ were 78.9%~112.2%. Aflatoxin G₂ had good linear relationships in the range of 0.1475~5.9 ng/mL, and the correlation coefficient was 0.9992. The average recoveries of aflatoxin G₂ were 73.8%~123.9%. **Conclusion** This method is accurate, reliable and specific, and can accurately determine the aflatoxin content in coix seed by precise compound ion monitoring.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-mass spectrometry; aflatoxins; coix seed

1 引言

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFT)是一类化学结构类似的化合物,均为二氢呋喃香豆素的衍生物,对人及动物的肝脏组织有很强的毒害作用,严重时可导致肝癌,其中以黄曲霉毒素B₁的毒性最强,1993年世界卫生组织(WHO)癌症研究机构划定黄曲霉毒素为一类致癌物^[1-3],是一种毒性极强的剧毒物质。其危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用,严重时可导致肝癌甚至死亡。目前已发现 AFT 20 余种,主要有黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂^[4]。

薏苡仁为禾本科植物薏苡 *Coix lacryma-jobi L.var.ma-yuen* (Roman.)Stapf 的干燥成熟种仁^[5],《本草纲目》记载薏苡仁阳明药也,能健脾,益胃。虚则补其母,故肺痿肺痛用之。筋骨之病,以治阳明为本,故拘挛筋急,风痹者用之。土能生水除湿,故泄痢水肿用之^[6]。但薏苡仁等中药在加工储存过程中,由于温度和湿度等环境影响,很容易霉变而产生如黄曲霉等真菌,这些微生物代谢从而产生黄曲霉毒素^[7-9]。随着我国中医药事业的不断发展,中药疗效在被认可、重视的同时,其安全性也受到广泛关注。黄曲霉毒素在中药材生长、采集、储藏以及加工过程中均可能污染^[10-15],已有研究表明,中药材及其制剂中黄曲霉毒素的污染不可忽视。

目前检测黄曲霉毒素多采用柱后衍生-高效液相色谱法^[16,17],该方法精确度及重现性差,检测结果与衍生化过程密切相关,在结果无法判定时,需用液相色谱质谱联用法进行验证。本研究采用高效液相色谱-质谱联用法^[18],对薏苡仁中药样品的黄曲霉毒素含量进行测定,评价薏苡仁中药材的食用安全性,以期建立准确、可靠的黄曲霉毒素检测方法。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1290 高效液相色谱仪(配二极管阵列检测器检测器, MassHunter 工作站)、Agilent 6460 三重四极杆质谱仪(安捷伦科技(中国)有限公司); METTLER TOLEDO AB104-N 电子天平(0.1 mg, 瑞士梅特勒-托利多); BJ-300 多功能药材粉碎机(德清拜杰电器有限公司); FJ-200S 均质

机(上海齐威仪器有限公司); KQ5200DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); Purelab Option S7 纯水机(威立雅 ELGA); TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂); 免疫亲合柱(上海安谱实验科技福分有限公司)。

黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂混标溶液(610001-201703, 中国食品药品检定研究院); 甲醇(色谱纯, 上海安谱实验科技福分有限公司); 醋酸铵(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

实验用薏苡仁药材均为市售品。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent Eclipse Plus C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.8 μm), 流动相: 以 10 mmol/L 醋酸铵溶液为流动相 A, 以甲醇为流动相 B; 流速: 0.3 mL/min; 柱温: 25 °C, 按表 1 中的规定进行梯度洗脱。

表 1 流动相洗脱程序

Table 1 Mobile phase elution procedure

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0~4.5	65~15	32~85
4.5~6	15~0	85~100
6~6.5	0~65	100~35
6.5~10	65	35

质谱条件: 三重四极杆串联质谱仪检测: 电喷雾离子源, 采集模式为正离子模式; 各化合物监测离子对和碰撞电压见表 2。

2.2.2 对照品溶液的制备

精密量取黄曲霉毒素混合对照品溶液(黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 的标示浓度分别为 1.04、0.35、1.18、0.594 μg/mL)适量,用 70% 甲醇稀释成含黄曲霉毒素 B₂、G₂ 浓度约为 0.04~3 ng/mL, 含黄曲霉毒素 B₁、G₁ 浓度约为 0.12~10 ng/mL 的系列对照品溶液。

2.2.3 供试药材溶液的制备^[5]

取样品粉末(过二号筛)约 0.5 g, 置于均质瓶中, 加入氯化钠 3 g, 精密加入 70% 甲醇溶液 75 mL, 高速搅拌 2 min (搅拌速度大于 11000 r/min), 离心 5 min (离心速度 2500 r/min), 精密量取上清液 15 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用

水稀释至刻度, 摆匀, 用微孔滤膜($0.45\text{ }\mu\text{m}$)滤过, 量取续滤液 20.0 mL , 通过免疫亲合柱, 流速 3 mL/min , 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, 置 2 mL 量瓶中, 并用甲醇稀释至刻度, 摆匀。

表 2 黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 对照品的检测离子对、碰撞电压参考值

Table 2 Reference values of detection ion pairs and collision voltage of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ references

编号	名称	母离子	子离子	碰撞电压/V
1	黄曲霉毒素 G ₂	331.1	313.1	33
		331.1	245.1	40
2	黄曲霉毒素 G ₁	329.1	243.1	35
		329.1	311.1	30
3	黄曲霉毒素 B ₂	315.1	259.1	35
		315.1	287.1	40
4	黄曲霉毒素 B ₁	313.1	241.0	50
		313.1	285.1	40

2.2.4 线性范围的考察

(1) 黄曲霉毒素 B₁ 标准曲线的制备

分别精密量取对照品混标溶液适量, 用 70% 甲醇分别稀释成含 0.26 、 0.52 、 1.04 、 5.72 、 10.4 ng/mL 的 5 个工作液, 按照上述色谱条件分别进样 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测定。以峰面积值(Y)为纵坐标, 对照品进样量(X)为横坐标绘制标准曲线。

(2) 黄曲霉毒素 B₂ 标准曲线的制备

分别精密量取对照品混标溶液适量, 用 70% 甲醇分别稀释成含 0.0875 、 0.175 、 0.35 、 1.925 、 3.5 ng/mL 的 5 个工作液, 按照上述色谱条件分别进样 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测定。以峰面积值(Y)为纵坐标, 对照品进样量(X)为横坐标绘制标准曲线。

(3) 黄曲霉毒素 G₁ 标准曲线的制备

分别精密量取对照品混标溶液适量, 用 70% 甲醇分别稀释成含 0.295 、 0.59 、 1.18 、 6.535 、 11.89 ng/mL 的 5 个工作液, 按照上述色谱条件分别进样 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测定。以峰面积值(Y)为纵坐标, 对照品进样量(X)为横坐标绘制标准曲线。

(4) 黄曲霉毒素 G₂ 标准曲线的制备

分别精密量取对照品混标溶液适量, 用 70% 甲醇分别稀释成含 0.1475 、 0.295 、 0.59 、 3.245 、 5.9 ng/mL 的 5 个工作液, 按照上述色谱条件分别进样 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测定。以峰面积值(Y)为纵坐标, 对照品进样量(X)为横坐标绘制标准曲线。

3 结果与分析

3.1 线性范围

由表 3 可见黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂ 在线性范围内线性良好, 相关系数均大于 0.999 。

表 3 线性范围考察($n=5$)
Table 3 Linear range investigation($n=5$)

名称	回归方程	r^2	线性范围/ ng/mL
黄曲霉毒素 B ₁	$Y=348.8830X+7.2078$	0.9995	0.26~10.4
黄曲霉毒素 B ₂	$Y=278.0351X-3.3274$	0.9996	0.0875~3.5
黄曲霉毒素 G ₁	$Y=203.6543X+7.0245$	0.9995	0.295~11.89
黄曲霉毒素 G ₂	$Y=65.0572X+0.7760$	0.9992	0.1475~5.9

3.2 精密度

取黄曲霉毒素混标工作溶液, 连续进样 6 次, 每次 $5\text{ }\mu\text{L}$, 分别测得黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 峰面积 RSD 为 0.82% 、 0.89% 、 0.96% 、 1.13% , 表明仪器的精密度好。

3.3 检出限

取黄曲霉毒素混标工作溶液适量添加到制备好空白样品溶液中, 用 70% 甲醇逐级稀释, 测得黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 检出限为 0.4 、 0.3 、 1.6 、 $1.8\text{ }\mu\text{g/kg}$ 。

3.4 重现性

精密称取同一批次已知含量药材粉末 6 份, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱质谱条件检测, 进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$, 依据线性回归方程计算黄曲霉毒素的含量, 黄曲霉毒素 B₁ 含量平均值为 $0.66\text{ }\mu\text{g/kg}$, RSD 为 1.96% 。

3.5 加标回收率

取已知含量的药材粉末 9 份, 精密称定, 分别准确加入黄曲霉毒素混标标准贮备液(B₁: 10.4 ng/mL 、B₂: 3.5 ng/mL 、G₁: 11.8 ng/mL 、G₂: 5.9 ng/mL) 1 、 2 、 3 mL 各 3 份, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱条件检测, 进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测得黄曲霉毒素加样回收率为 B₁: $75.4\% \sim 123.9\%$ 、B₂: $71.1\% \sim 124.2\%$ 、G₁: $78.9\% \sim 112.2\%$ 、G₂: $73.8\% \sim 123.9\%$ 。

3.6 不同产地的样品含量测定

取市售薏苡仁药材, 按上述供试品制备方法制得供试品溶液, 按色谱质谱条件检测, 进样量为 $5\text{ }\mu\text{L}$, 测定黄曲霉毒素的含量, 测定结果见表 4。

表 4 不同来源薏苡仁药材黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂的含量
Table 4 Contents of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in coix seed from different sources

编号	产地/贮存信息	黄曲霉毒素 B ₁ /(μg/kg)	黄曲霉毒素 B ₂ /(μg/kg)	黄曲霉毒素 G ₁ /(μg/kg)	黄曲霉毒素 G ₂ /(μg/kg)
薏苡仁 1	辽宁(贮存 1 年)	0.50	-	-	-
薏苡仁 2	河北(贮存 1 年)	-	-	-	-
薏苡仁 3	安徽(贮存 2 年)	4.0	1.0	-	-
薏苡仁 4	辽宁(贮存 1 年)	-	-	-	-
薏苡仁 5	河北(贮存 1 年)	-	-	-	-
薏苡仁 6	河北(贮存 1 年)	16	1.0	-	-
薏苡仁 7	福建(贮存 1 年)	2.0	-	-	-
薏苡仁 8	安徽(贮存 1 年)	0.50	-	-	-
薏苡仁 9	辽宁(贮存 1 年)	1.0	-	-	-
薏苡仁 10	河北(贮存 2 年)	18	1.0	-	-
薏苡仁 11	四川(贮存 1 年)	-	0.30	-	-
薏苡仁 12	河北(贮存 1 年)	3.0	-	2.0	-
薏苡仁 13	安徽(有毒变)	32	2.7	73.6	12
薏苡仁 14	辽宁(贮存 1 年)	-	-	-	-
薏苡仁 15	安徽(有毒变)	35	5.0	149	17
薏苡仁 16	辽宁(贮存 1 年)	-	-	-	-
薏苡仁 17	辽宁(贮存 1 年)	-	-	-	-
薏苡仁 18	山东(贮存 1 年)	1.9	-	2.2	-
薏苡仁 19	安徽(贮存 2 年)	2.0	-	2.0	-
薏苡仁 20	福建(贮存 3 年)	4.0	2.0	3.0	18

注: -表示未检出。

通过以上随机采购市售薏苡仁样品, 根据《中国药典》中对薏苡仁规定: 黄曲霉毒素 B₁≤5 μg/kg、黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂总量≤10 μg/kg, 样品中黄曲霉毒素检出率为 85%, 黄曲霉毒素总量最高的为 206 μg/kg。

4 结论与讨论

黄曲霉毒素的产生与贮藏时间及贮存条件有很大关系, 贮藏时间越长、贮存条件越差, 黄曲霉毒素产生的越多, 外观上霉变的薏苡仁黄曲霉毒素的污染状况最为严重。

本文通过方法学验证, 证明建立的高效液相色谱-质谱联用具有良好的线性、精密度和回收率, 准确性较高。与柱后衍生-高效液相色谱法相比, 该方法提取操作简便、快速、灵敏, 重复性好, 精密度高, 结果准确可靠, 为液质联用法检测黄曲霉毒素提供依据。

参考文献

- [1] 谢光洪, 陈承祯, 徐闯. 黄曲霉毒素检测方法的研究[J]. 饲料工业, 2007, 28(6): 53–56.
Xie GH, Chen CZ, Xu C. Research on detection method of aflatoxin [J]. Feed Ind, 2007, 28(6): 53–56.
- [2] 赵飞, 焦彦朝, 连宾, 等. 黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(5): 123–126.
Zhao F, Jiao YC, Lian B, et al. Research progress in determination methods of aflatoxins [J]. Guizhou Agric Sci, 2006, 34(5): 123–126.
- [3] Peraica M, Radic B, Pavlovic M. Toxic effects of mycotoxins in human [J]. Bull World Health Organiz, 1999, 77: 754–766.
- [4] Ventura M, Gomez A, Anaya I, et al. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2004, 1048: 25–29.
- [5] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.

- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of people's republic of China (Vol.I) [M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015.
- [6] 李时珍. 本草纲目[M]. 北京: 中国言实出版社, 2012.
- Li SZ. Compendium of materia medica [S]. Beijing: China Yan Shi Press, 2012.
- [7] 张雪辉. 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应用[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2004.
- Zhang XH. Study on aflatoxin detection in traditional Chinese medicine and application of pattern recognitionin the field of traditional Chinese medicine [D]. Beijing: Chinese Union Medical University, 2004.
- [8] 张爱婷, 石延榜, 张振凌. 中药黄曲霉毒素含量测定及限度标准的研究[J]. 光明中医, 2008, 23(11): 1668–1669.
- Zhang AT, Shi YB, Zhang ZL. Study on the content determination and limitation standard of aflatoxin in traditional Chinese medicine [J]. Guangming J Chin Med, 2008, 23(11): 1668–1669.
- [9] 刘鹏, 杜平华, 苏德模. 18种中成药黄曲霉的检测[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(5): 287–288.
- Liu P, Du PH, Su DM. Detection of 18 Chinese patent medicines *Aspergillus flavus* [J]. China J Chin Mater Med, 1999, 24(5): 287–288.
- [10] 张振凌. 中药饮片应建立黄曲霉毒素限度标准[J]. 中医药学刊, 2006, 24(11): 2025–2026.
- Zhang ZL. Discussion on the establishment of the limit standard of aflatoxin in Chinese traditional medicine pieces [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2006, 24(11): 2025–2026.
- [11] 王帆, 乙引, 杨占南, 等. 陈皮中黄曲霉毒素测定及其安全评价[J]. 广东农业科学, 2012, 39(3): 84–86.
- Wang F, Yi Y, Yang ZN. Determination of aflatoxin from citrus reticulata blanco and its safety evaluation [J]. Guangdong Agric Sci, 2012, 39(3): 84–86.
- [12] 蔡飞, 高微微, 李红玲, 等. 中药上黄曲霉毒素的污染现状与防除技术[J]. 中国中药杂志, 2010, (19): 2503–2507.
- Cai F, Gao WW, Li HL, et al. Aflatoxin contamination of Chinese herbal medicine in China and its potential management strategies [J]. China J Chin Mater Med, 2010, (19): 2503–2507.
- [13] 冯旭, 孔维军, 杨美华, 等. 中药中真菌毒素检测方法的最新研究进展[J]. 世界科学技术, 2010, (5): 1944–1952.
- Feng X, Kong WJ, Yang MH, et al. Recent progress in detection of mycotoxins in traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol, 2010, (5): 1944–1952.
- [14] 陈建民, 张雪辉, 杨美华, 等. 中药中黄曲霉毒素检测概况[C]. 全国药用植物和植物药学学术研讨会, 2005.
- Chen JM, Zhang XH, Yang MH, et al. A survey of determination of aflatoxin in Chinese materia medica [C]. National Symposium on Medicinal Plants and Phytopharmacy, 2005.
- [15] 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): 12–16.
- Ouyang P, Xu XJ. Advances in analytical methods of aflatoxin in traditional Chinese medicine [J]. J Mod Food Pharm, 2007, 17(3): 12–16.
- [16] 唐健新, 区桂娟, 苏章轩, 等. 柱后衍生-HPLC测定与分析沉香中黄曲霉毒素[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(11): 31–35.
- Tang JX, Ou GS, Su ZX, et al. Determination and analysis of aflatoxin in aloes by post-column derivatization-high performance liquid chromatography [J]. Chin J Ethnopharmacopharm, 2017, 26(11): 31–35.
- [17] 郑荣, 毛丹, 王少敏, 等. 11种中药材中黄曲霉毒素G₂、G₁、B₂、B₁的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2010, 41(5): 368–372.
- Zheng R, Mao D, Wang SM, et al. Determination of aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁ in eleven kinds of Chinese herbs by HPLC [J]. Chin J Pharmaceut, 2010, 41(5): 368–372.
- [18] 韩深, 刘萤, 吕美玲, 等. 免疫亲和萃取-超高效液相色谱-串联质谱法分离测定中成药及中药材中的5种黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2011, 29(7): 613–617.
- Han S, Liu Y, Lv ML, et al. Determination of five aflatoxins in Chinese patent medicines and medicinal herbs by immunoaffinity extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(7): 613–617.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



诸晨, 工程师, 主要研究方向为中
药和健康食品的检测及化学成分研究。

E-mail: sunny2585@163.com



钱勇, 硕士, 高级工程师, 主要研究
方向为中药和健康食品的检测及化学成分
研究。

E-mail: Qianyong2232@163.com