

中药材中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定解决方案

1. 介绍

黄曲霉毒素 (Aflatoxins, AF) 是一类由黄曲霉和寄生曲霉产生的代谢产物, 具有诱发人体致畸、致癌、致突变的作用, 主要的污染物有黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂。中药材大多以天然植物为基源, 在储存不当或因其他外界条件影响时, 易受霉菌污染产生黄曲霉毒素。因此对中药材进行黄曲霉毒素的高效便捷检测是十分有必要的。

本文参考 2020 年版《中国药典》四部通则中《2351 真菌毒素测定法 黄曲霉毒素测定法》第一法, 试样经过 70% 甲醇水提取, 提取液经稀释、离心后, 使用 Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪, 滤液自动化经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和柱净化和富集后, 目标化合物通过带有三重四级杆质谱检测器的高效液相色谱仪进行测定, 建立了中药材中黄曲霉毒素高灵敏度的前处理和分析方法, 并进行三种常见中药材 (陈皮、人参、当归) 中黄曲霉毒素的加标回收验证, 平均回收率在 84.5~101.3% 之间, RSD 小于 10%。

关键字: 全自动固相萃取; 高效液相色谱-串联质谱法; 黄曲霉毒素 B 族、G 族

2. 仪器、耗材

2.1 仪器

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

高效液相色谱 (HPLC): Agilent 1200, 质谱检测器 (MS): Agilent 6430

2.2 耗材

黄曲霉毒素免疫亲和柱;

2.3 试剂

甲醇: HPLC 级;

缓冲液: 称取 25 g 氯化钠、5 g 碳酸氢钠于水中, 加入 0.1 mL 吐温-20, 用水稀释至 1000 mL 即得淋洗缓冲液。

黄曲霉毒素混合标液: B₁、G₁ 浓度为 100 $\mu\text{g/L}$, B₂、G₂ 浓度为 30 $\mu\text{g/L}$;

黄曲霉毒素基质混合工作液:

使用 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站配制黄曲霉毒素混合基质工作液。将黄曲霉毒素混合标液 (黄曲霉毒素 B₁、G₁ 为 100 $\mu\text{g/L}$, 黄曲霉毒素 B₂、G₂ 为 30 $\mu\text{g/L}$) 直接稀释配制成黄曲霉毒素混合使用液 (黄曲霉毒素 B₁、G₁ 为 50 $\mu\text{g/L}$, 黄曲霉毒素 B₂、G₂ 为 15 $\mu\text{g/L}$), 再通过使用液配制黄曲霉毒素 B₁、G₁ 质量浓度分别为 0.0 $\mu\text{g/L}$, 0.5 $\mu\text{g/L}$, 1.0 $\mu\text{g/L}$, 2.5 $\mu\text{g/L}$, 5.0 $\mu\text{g/L}$, 10.0 $\mu\text{g/L}$, 黄曲霉毒素 B₂、G₂ 质量浓度分别为 0.0 $\mu\text{g/L}$, 0.15 $\mu\text{g/L}$, 0.3 $\mu\text{g/L}$, 0.75 $\mu\text{g/L}$, 1.5 $\mu\text{g/L}$, 3.0 $\mu\text{g/L}$ 的系列混合标准工作曲线。具体配制方法如图-1 所示。

空白基质溶液用 Auto EVA-60 浓缩仪氮吹后, 分别加入 1 mL 上述混合标准工作溶液复溶, 过 0.22 μm 的有机相滤膜后配制成基质混合工作溶液, 供液相色谱-质谱联用仪测定。

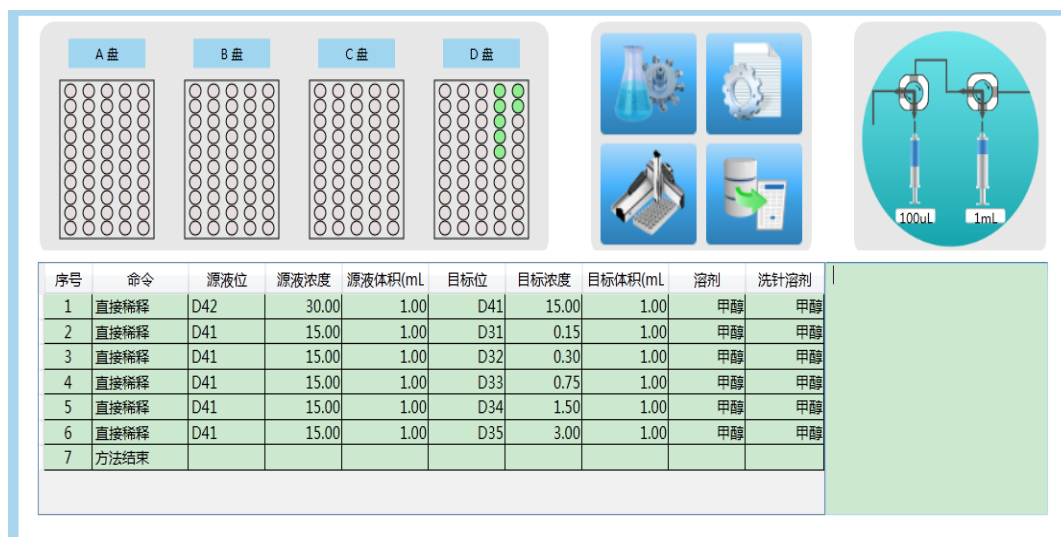


图-1 Auto Prep 200 黄曲霉毒素混合溶液配制方法

3. 样品提取与前处理

3.1 陈皮、人参、当归试样前处理

准确称取 15 g 试样于 120 mL 离心管中，加入 3 g 氯化钠及 75 mL 甲醇-水溶液(7:3, V/V)，12000 转/分钟搅拌速度下均质 2 min，离心 5 min（转速 4000 r/min）。准确量取 15 mL 上层提取液于 50 mL

容量瓶中，用水定容、摇匀后，移 30 mL 至 50 mL 离心管中，离心 10 min（转速 4000 r/min），最后准确移取 20 mL 上清液至 80 mL 玻璃上样管，待净化用。

3.2 固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科 Fotector Plus
固相萃取柱	黄曲霉毒素免疫亲和柱
淋洗	纯水或缓冲液
洗脱	甲醇

净化过程采用黄曲霉毒素免疫亲和柱进行富集净化，具体方法如下。

清洗样品通道：用甲醇清洗；

上样：采用 2 mL/min 的流速进行精确上样 20 mL；

淋洗：采用缓冲液和纯水进行淋洗小柱；

气推：用 60 mL 空气将水挤出免疫亲和柱；

洗脱：以 0.5 mL/min 的速度用甲醇进行洗脱，开始收集溶液；

气推：将柱子里溶液用空气推出，收集溶液。

将收集液用甲醇定容至 2 mL，混匀后过 0.22 μm 滤膜用液质检测。详细步骤见图-2。

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	CH ₃ OH				2.8
2	填充样品路径	水		40	2.5	1.3
3	特殊上样		有机废液	2	22	12.4
4	淋洗	缓冲液	废水	5	10	2.6
5	淋洗	水	废水	5	10	2.6
6	气推		废水	80	60	4.1
7	清洗注射泵	CH ₃ OH		60	3	0.4
8	洗脱	CH ₃ OH	收集	0.5	2	4.4
9	气推		收集	0.5	2	4.4
10	气推		收集	60	10	1
11	结束					

图-2 Fotector Plus 黄曲霉毒素的免疫亲和净化方法

4. 检测条件

4.1 HPLC-MS/MS 条件

表-2 黄曲霉毒素的液质检测条件

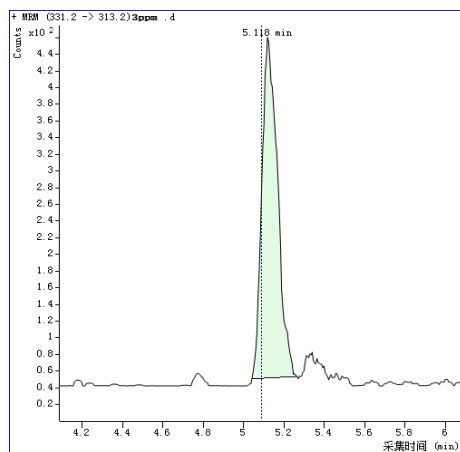
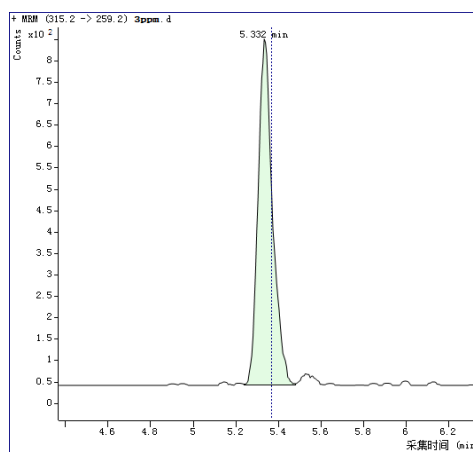
色谱柱	Waters XBridge BEH C18 2.5 μm ×2.1 mm×50 mm
流速	0.300 mL/min
流动相	A: 10 mmol/L 乙酸铵水溶液 (0.1% 甲酸), B: 甲醇
柱温	30℃
进样体积	10 μL
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350℃
簇电压	4000 V
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	起始 10%甲醇保持 1min, 4 min 内升至 50%的甲醇, 保持 2 min, 然后降至 10%, 保持 2 min。

4.2 MRM 参数:

表-3. 4 种黄曲霉毒素的串联质谱检测参数

化合物	保留时间 (min)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)
黄曲霉毒素 G ₂	5.118	331.2	313.2	25
			285.1	30
黄曲霉毒素 B ₂	5.332	315.2	259.2	30
			287.1	25
黄曲霉毒素 G ₁	5.335	329.2	243.0	25
			214.2	35
黄曲霉毒素 B ₁	5.531	313.2	285.1	20
			241.0	40

4.3 液质联用色谱图:

a. 黄曲霉毒素 G₂b. 黄曲霉毒素 B₂

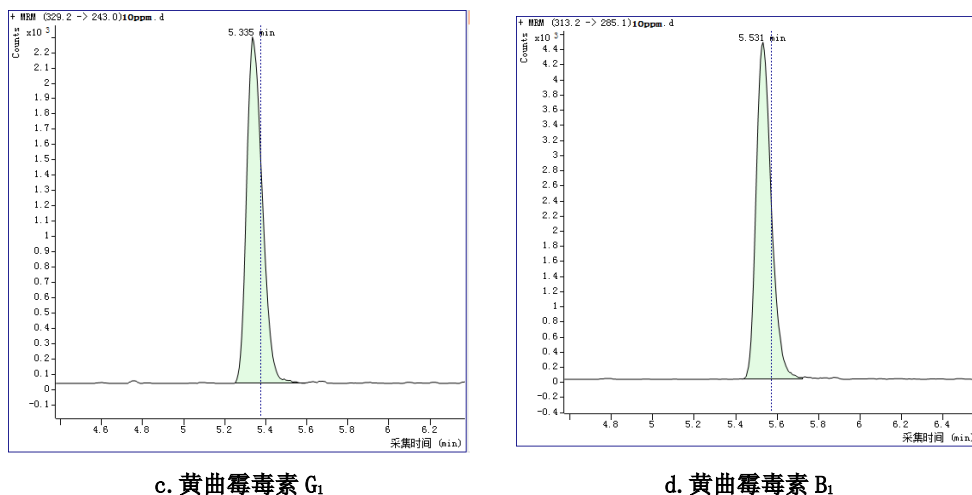


图-3 4种黄曲霉毒素标准溶液的MRM色谱图

5. 样品测试

5.1 基质标准工作曲线

选择定量离子的峰面积作为纵坐标，浓度作为横坐标，做相关曲线，曲线为线性回归，各点权重

相等，拟合出工作曲线，要求 $R^2 > 0.99$ 。

5.2 基质加标回收实验

在陈皮、人参、当归3种常见样品基质中添加水平为 $1.8 \mu\text{g/kg}$ 的黄曲霉毒素 G₂、B₂ 和 $6.0 \mu\text{g/kg}$ 的黄曲霉毒素 G₁、B₁ 进行加标回收验证，平均回收率和RSD结果见下表：

表-4 平均回收率和相对标准偏差 (n=4)

试样	检测项目	平均回收率 (%)	RSD (%)
陈皮	黄曲霉毒素 G ₂	87.4	1.4
	黄曲霉毒素 B ₂	101.3	8.1
	黄曲霉毒素 G ₁	92.9	6.3
	黄曲霉毒素 B ₁	89.6	4.1
人参	黄曲霉毒素 G ₂	98.3	9.7
	黄曲霉毒素 B ₂	91.6	2.0
	黄曲霉毒素 G ₁	88.2	2.1
	黄曲霉毒素 B ₁	90.5	3.4
当归	黄曲霉毒素 G ₂	96.8	8.4
	黄曲霉毒素 B ₂	87.1	9.6
	黄曲霉毒素 G ₁	84.5	4.8
	黄曲霉毒素 B ₁	89.7	5.5

6. 总结

6.1 提取液需加入水进行稀释、定容至 50 mL

后才可进行净化，以防止过多的有机溶剂使免疫亲

和柱失活。

6.2 在人参和当归的净化过程中,如采用 20 mL 水作为淋洗液,其加标回收率为 70~80%;而将 10 mL 的缓冲液和 10 mL 的纯水作为淋洗液时,可除去免疫亲和柱上残留的色素和基质,从而提高回收率。

7. 解决方案优势

7.1 AH-30 全自动均质器可实现自动化进行对试样的均质,解放实验人员双手,也避免有机溶剂的毒害;同时可自动化完成对刀头的清洗,多重清洗模式可最大限度降低交叉污染的可能。

7.2 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站采用高精度的双注射泵进行黄曲霉毒素混合标准曲线的配制,方法编辑时只需输入浓度、体积和位置,软件即可智能计算移取体积,仪器自动化进行配制,无需人为接触,安全可靠,智能便捷。

7.3 为避免基质效应带来误差,本实验浓缩了

6.3 进行洗脱时甲醇的过柱流速控制在 1 滴/s 为宜。洗脱效果不佳时,可采取让甲醇浸泡免疫亲和柱后再加以洗脱。

6.4 由于黄曲霉毒素在紫外光照射下不稳定,因此在实验过程中应避免紫外光和太阳光的照射。

空白试样进行制备黄曲霉毒素基质混合工作液。采用 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪能对空白试样进行水浴氮吹浓缩,氮吹针自动跟随浓缩液面下降,减少氮气消耗量,提高浓缩效率。

7.4 提取液通过 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪进行净化和富集,仪器不仅能自动化进行免疫亲和柱自动脱帽和样品上样、淋洗和洗脱等过程,还有 6 溶剂通道和 8 样品通道可选,能连续、批量处理多样品,实现高通量、自动化固相萃取过程,为批量检测助力。



全自动均质器
均质



全自动液体样品处理工作站
标曲配制



全自动平行浓缩仪
浓缩



高通量全自动固相萃取仪
净化