

ICS 点击此处添加 ICS 号

CCS 点击此处添加 CCS 号

T/FDSA

中国食品药品企业质量安全促进会团体标准

T/FDSA XXXX—XXXX

中药材中黄曲霉毒素的测定 液相色谱串联 质谱法

Determination of aflatoxin in Chinese herbal medicine
High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

中国食品药品企业质量安全促进会 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 原理 1

4 试剂和材料 1

5 仪器和设备 2

6 实验方法 3

 6.1 样品制备 3

 6.2 样品提取 3

 6.3 样品净化 3

 6.4 仪器参数与测定条件 4

 6.5 仪器测定 5

 6.6 定性和阳性样品确认 5

7 结果计算 6

8 精密度 6

9 检出限与定量限 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国食品药品企业质量安全促进会提出并归口。

本文件起草单位：南京江北新区生物医药公共服务平台。

本文件主要起草人：。

本文件为首次发布。

中药材中黄曲霉毒素的测定 液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2（以下简称 AFT B1、AFT B2、AFT G1 和 AFT G2）的测定方法。

本标准适用于柏子仁、决明子、陈皮、莲子、薏苡仁、地龙、蜈蚣、马钱子、蝉蜕、松香、当归等动植物类中药材及饮片中 AFT B1、AFT B2、AFT G1 和 AFT G2 的高效液相色谱-串联质谱法测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和实验方法

3 原理

用甲醇-水溶液提取试样中的 AFT B1、AFT B2、AFT G1 和 AFT G2，固相净化柱法或免疫磁珠法净化，净化液浓缩、定容和过滤后经液相色谱分离，高效液相色谱-串联质谱检测，同位素内标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯；

4.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯；

4.1.3 乙酸铵（CH₃COONH₄）：色谱纯；

4.1.4 氯化钠（NaCl）；

4.1.5 磷酸氢二钠（Na₂HPO₄）；

4.1.6 磷酸二氢钾（KH₂PO₄）；

4.1.7 氯化钾（KCl）；

4.1.8 盐酸（HCl）。

4.2 试剂配制

4.2.1 磷酸盐缓冲溶液（PBS 溶液）：称取 8.0 g 氯化钠、1.2 g 磷酸氢二钠、0.2 g 磷酸二氢钾、0.2 g 氯化钾，加水 900 ml 使溶解，用盐酸调节 pH 值至 7.0 ± 0.1 ，加水稀释至 1000 ml，混匀。

4.2.2 乙酸铵溶液（5 mmol/L）：称取 0.39 g 乙酸铵，用水溶解后加水稀释至 1000 ml，混匀。

4.2.3 乙腈+甲醇溶液（50：50）：取 500 ml 乙腈加入 500 ml 甲醇，混匀。

4.3 标准物质

4.3.1 AFT B1 标准品（ $C_{17}H_{12}O_6$ ，CAS：1162-65-8）：纯度 $\geq 98\%$ ，浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$ ，或其他经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.3.2 AFT B2 标准品（ $C_{17}H_{14}O_6$ ，CAS：7220-81-7）：纯度 $\geq 98\%$ ，浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$ ，或其他经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.3.3 AFT G1 标准品（ $C_{17}H_{12}O_7$ ，CAS：1165-39-5）：纯度 $\geq 98\%$ ，浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$ ，或其他经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.3.4 AFT G2 标准品（ $C_{17}H_{14}O_7$ ，CAS：7241-98-7）：纯度 $\geq 98\%$ ，浓度为 25 $\mu\text{g/ml}$ ，或其他经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.3.5 同位素内标混合标准溶液 $^{13}C_{17}$ -AFT B1（ $C_{17}H_{12}O_6$ ，CAS：157449-45-0）、 $^{13}C_{17}$ -AFT B2（ $C_{17}H_{14}O_6$ ，CAS：157470-98-9）、 $^{13}C_{17}$ -AFT G1（ $C_{17}H_{12}O_7$ ，CAS：157444-07-9）和 $^{13}C_{17}$ -AFT G2（ $C_{17}H_{14}O_7$ ，CAS：157462-49-7）：纯度 $\geq 98\%$ ，浓度为 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

4.4 标准溶液的配制

4.4.1 混合标准工作液（2.5 $\mu\text{g/ml}$ ）：分别移取 25 $\mu\text{g/ml}$ AFT B1（4.3.1）、AFT B2（4.3.2）、AFT G1（4.3.3）和 AFT G2（4.3.4）各 1 ml 至 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容。此溶液浓度约为 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 。该溶液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。有效期 3 个月。

4.4.2 混合标准工作液（100 ng/ml）：准确移取混合标准工作液（4.4.1）400 μl 至 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容。此溶液浓度为 100 ng/ml。该溶液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。有效期 1 个月。

4.4.3 混合同位素内标工作液（50 ng/ml）：准确移取同位素内标混合标准溶液（4.3.5）1 ml 至 10 ml 容量瓶中，用甲醇定容至 10 ml。在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下避光保存。有效期 1 个月。

4.4.4 标准系列工作溶液：准确移取混合标准工作液（4.4.2）20 μl 、50 μl 、100 μl 、200 μl 、500 μl 、1000 μl 至 10 ml 容量瓶中，分别加入 200 μl 混合同位素内标工作液（4.4.3），用初始流动相定容至刻度，配制浓度点为 0.2 ng/ml、0.5 ng/ml、1 ng/ml、2 ng/ml、5 ng/ml、10 ng/ml 的系列标准溶液。

5 仪器和设备

5.1 高速粉碎机；

5.2 分析天平：感量为 0.1 mg；

5.3 涡旋振荡器；

- 5.4 离心机：转速 ≥ 4000 r/min；
- 5.5 pH 计；
- 5.6 固相萃取装置（带真空泵）；
- 5.7 黄曲霉毒素专用型固相净化柱（以下简称固相净化柱）；
- 5.8 磁棒和磁棒套或含有磁棒套的全自动净化仪；
- 5.9 高效液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源；
- 5.10 微孔滤头：带 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜；
- 5.11 筛网：二号筛；
- 5.12 超声波清洗机；
- 5.13 匀浆仪；
- 5.14 玻璃纤维滤纸。

6 实验方法

警示：整个分析操作过程应在指定区域内进行。该区域应避光（直射阳光）、具备相对独立的操作台和废弃物存放装置。在整个实验过程中，操作者应按照接触剧毒物的要求采取相应的保护措施。

6.1 样品制备

取出具有代表性的样品适量，用高速粉碎机粉碎至全部过筛网，使其粒径小于 $850\ \mu\text{m}$ ，充分混合均匀，储存于洁净的样品袋中密封保存，供检测用。

6.2 样品提取

准确称取 5 g 试样（精确到 0.01 g）于 50 ml 离心管中，加入 50 μl 混合同位素内标工作液（4.4.3）振荡混合后静置 30 min，加入 25 ml 70% 甲醇溶液，涡旋混匀，超声 15 min，在 4000 r/min 下离心 10 min（或均质后玻璃纤维滤纸过滤），上清液（或滤液）用固相净化柱或免疫磁珠法净化。

6.3 样品净化

6.3.1 免疫磁珠法净化

移取 10 ml 上清液（或滤液）于 50 ml 离心管中，加入 8 ml 磷酸盐缓冲溶液（PBS 溶液）（4.2.1），加入 10 mg 黄曲霉毒素免疫磁珠，涡旋振荡反应 5 min，磁吸分离，磁珠转移至 10 ml 离心管中，加入 1 ml 甲醇（4.1.2）涡旋振荡洗脱 1 min，磁吸分离，收集洗脱的净化液，经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后到进样瓶中，供高效液相色谱-串联质谱仪测定。

注 1：使用不同厂商的免疫磁珠时在操作方面可能有所不同，应按照其使用说明要求进行操作。

注 2：全自动免疫磁珠净化仪可优化操作参数后使用。

6.3.2 黄曲霉毒素固相净化柱和免疫磁珠同时使用（针对松香、当归、荆芥等复杂基质）

6.3.2.1 固相净化柱法

移取 10 ml 上清液（或滤液），按固相净化柱操作说明进行净化，收集全部净化液。

6.3.2.2 免疫磁珠法

移取全部上述净化液，加入 8 ml 磷酸盐缓冲溶液（PBS），混匀，按 6.3.1 处理。

6.4 仪器参数与测定条件

6.4.1 液相色谱参考条件：

- a) 色谱柱：C18 柱（柱长 100 mm，柱内径 2.1 mm，填料粒径 1.7 μm，或相当者）；
- b) 流动相：A 相：5 mmol/L 乙酸铵溶液（4.2.2）；B 相：乙腈-甲醇溶液（50+50，4.2.3）；梯度洗脱程序见表 1；
- c) 流速：0.3 ml/min；
- d) 柱温：40 °C；
- e) 进样量：10 μl。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	68	32
0.5	68	32
3.0	55	45
4.0	55	45
4.2	0	100
4.8	0	100
5.0	68	32
7.0	68	32

6.4.2 质谱参考条件：

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- b) 监测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 离子源控制条件：参见表 2；
- d) 离子选择参数：参见表 3。

表 2 离子源控制条件

电离方式	ESI ⁺
毛细管电压（V）	1800
喷雾电压（V）	5500

离子源温度（℃）	550
气帘气压力（psi）	35
离子源辅助气 1 压力（psi）	50
离子源辅助气 2 压力（psi）	60

表 3 离子选择参数表

序号	Compounds	Parent ion	Daughter ion	CE（eV）	DP
1	AFT B1	313.1	241.0*	57	92
			285.1	31	64
2	AFT B2	315.1	259.1*	43	44
			287.1	37	52
3	AFT G1	329.1	243.1*	37	104
			311.1	29	74
4	AFT G2	331.0	313.1*	35	110
			245.1	38	100
5	¹³ C17-AFT B1	330.0	255.0	51	60
			301.0	34	60
6	¹³ C17-AFT B2	332.0	303.0	35	60
			273.0	42	60
7	¹³ C17-AFT G1	346.0	257.0	36	60
			299.0	36	60
8	¹³ C17-AFT G2	348.0	259.0	42	60
			301.0	39	60

注：*定量离子

6.5 仪器测定

进样之前色谱柱需要平衡至少 15 min，重复进标准溶液，当峰面积变化±10%以内，保留时间±5%以内，方可正式开始进样。

6.6 定性和阳性样品确认

试样中目标化合物色谱峰的保留时间和标准相应化合物色谱峰的保留时间相比较，变化范围应在±2.5%以内。

目标化合物选择 1 个母离子，2 个子离子，在同一检测批次，样品谱图中目标化合物监测离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液谱图中对应的监测离子的相对丰度进行比较，偏差不超过表 4 规定的范围，

则可判定为样品中存在对应的目标化合物。

表 4 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

7 结果计算

试样中 AFT B1、AFT B2、AFT G1 和 AFT G2 的含量按下式计算:

$$X = \frac{c \times V_1 \times V_3 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中 AFT B1、AFT B2、AFT G1 或 AFT G2 的含量, 单位为微克每千克 (μg/kg);

c——进样溶液中 AFT B1、AFT B2、AFT G1 或 AFT G2 按照内标法由标准曲线计算出的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/ml);

V₁——试样提取液体积, 单位为毫升 (ml);

V₂——用于净化分取的样品体积, 单位为毫升 (ml);

V₃——样品经净化洗脱后的最终定容体积, 单位为毫升 (ml);

1000——换算系数;

m——试样的称样量, 单位为克 (g)。

计算结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算数平均值的 20%。

9 检出限与定量限

本方法 AFT B1、AFT B2、AFT G1 和 AFT G2 的检出限为 0.04 μg/kg, AFT B1、AFT B2、AFT G1 和 AFT G2 定量限为 0.1 μg/kg。

附 录

串联质谱法图谱

1. 黄曲霉毒素 B1离子扫描图见图1。

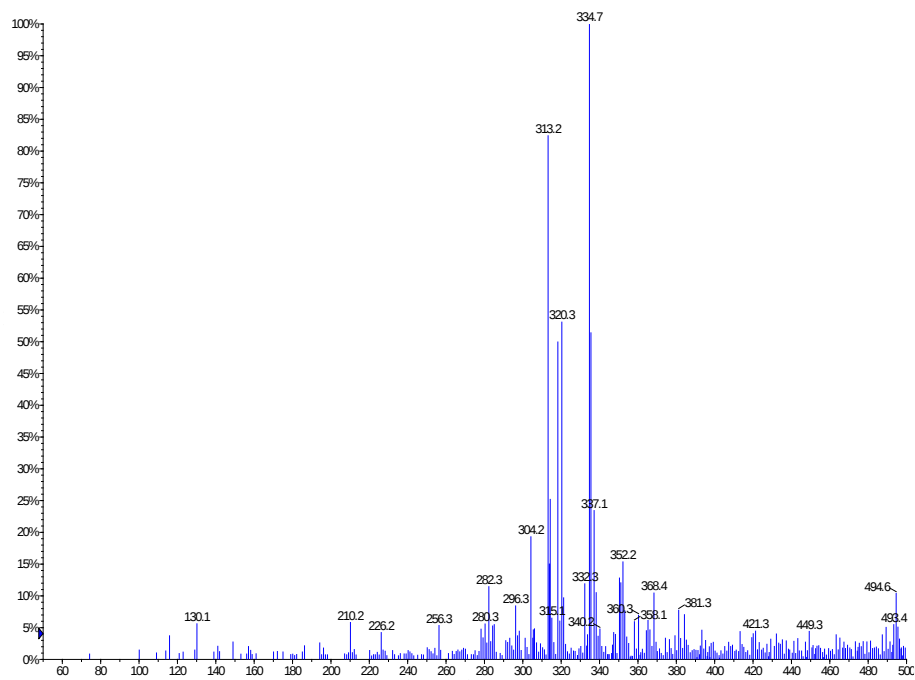


图 1 黄曲霉毒素 B1 离子扫描图

2. 黄曲霉毒素 B2离子扫描图见图2。

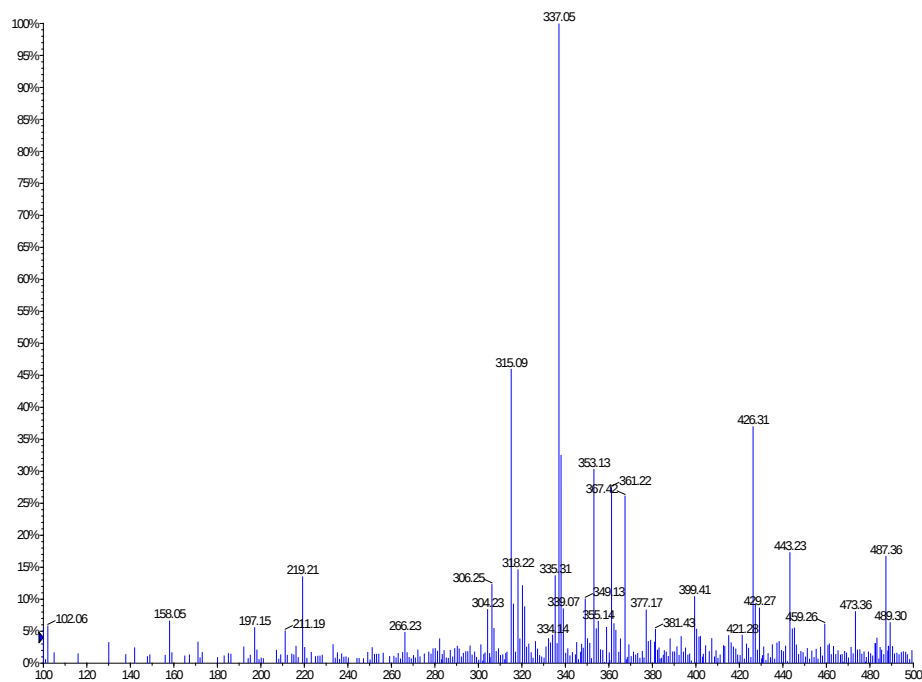


图 2 黄曲霉毒素 B2 离子扫描图

3. 黄曲霉毒素 G1 离子扫描图见图 3。

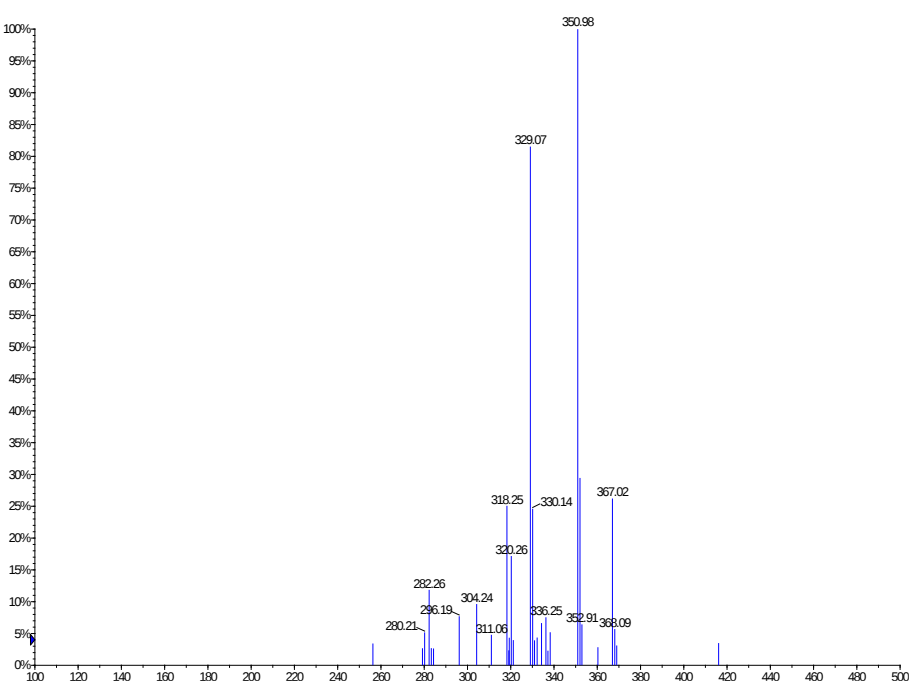


图 3 黄曲霉毒素 G1 离子扫描图

4. 黄曲霉毒素 G2离子扫描图见图4。

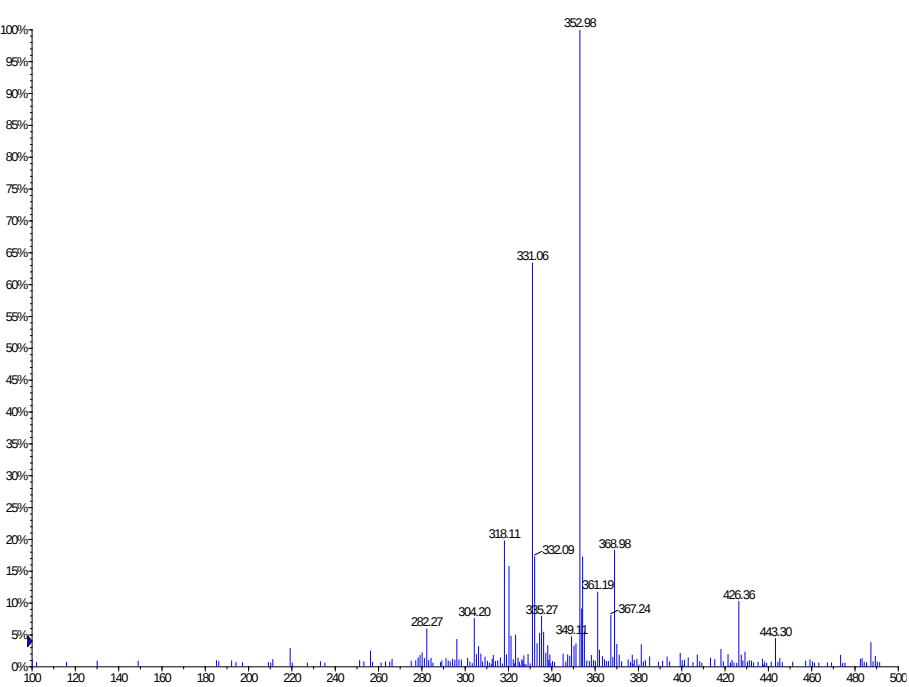


图 4 黄曲霉毒素 G2 离子扫描图

5. 黄曲霉毒素 ¹³C-B1、¹³C-B2、¹³C-G1、¹³C-G2离子扫描图见图5。

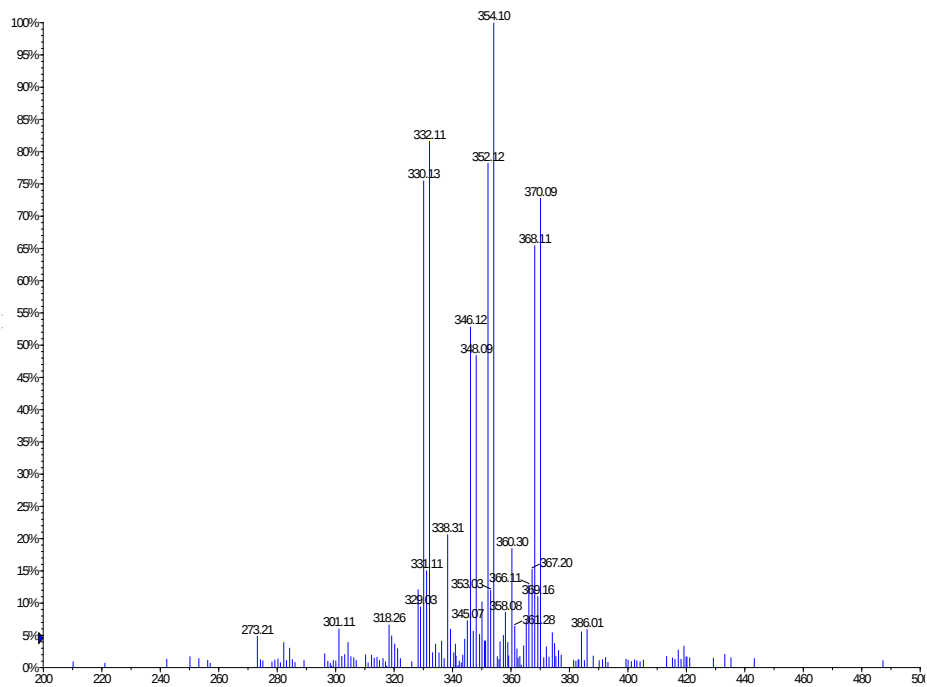


图 5 黄曲霉毒素 ¹³C-B1、¹³C-B2、¹³C-G1、¹³C-G2 离子扫描图

6. 四种黄曲霉毒素和同位素的串联质谱TIC图见图6。

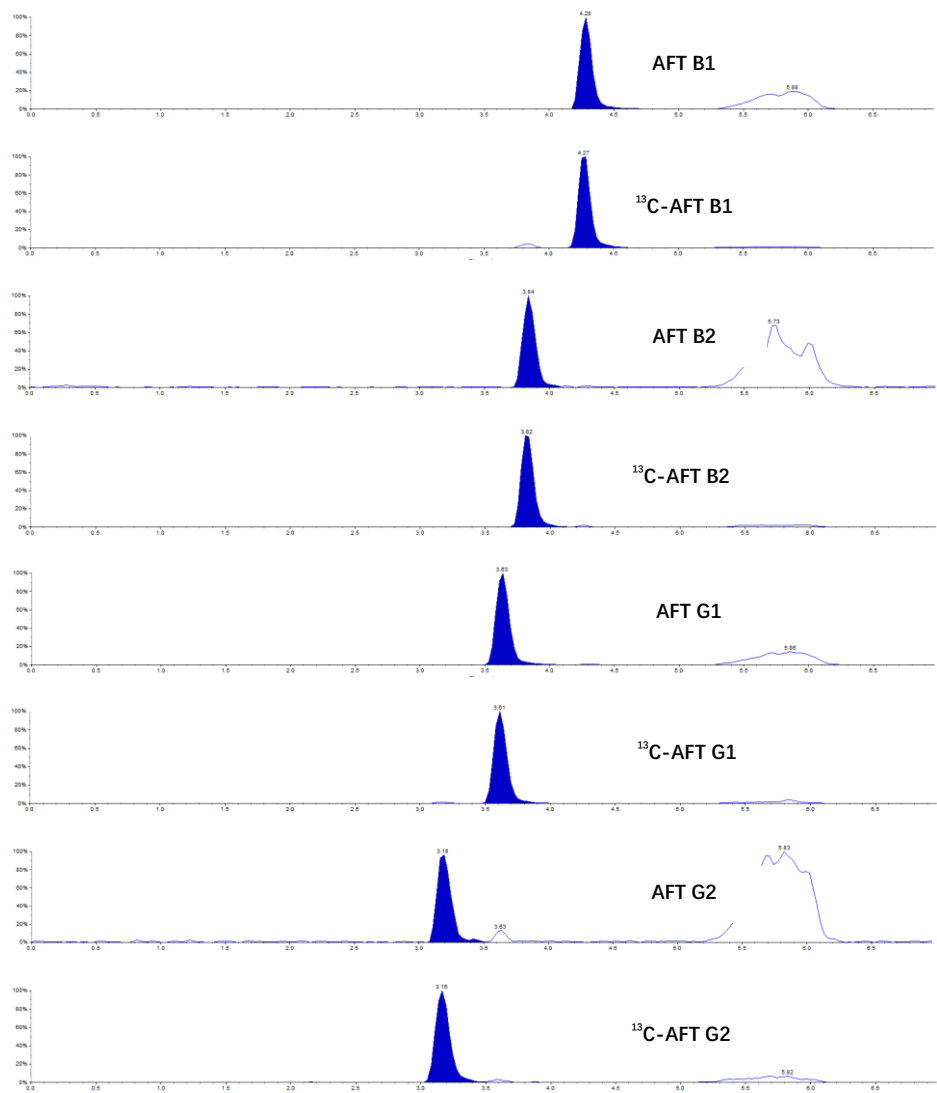


图6 四种黄曲霉毒素和同位素的串联质谱