

LCMS-8050 测定中药材薏苡仁中 10 种真菌毒素

LCMSMS-497

摘要： 本文采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪建立了 LC-MS/MS 法测定 2020 版《中国药典》通则 2351 中的多种真菌毒素测定法规定的 10 种真菌毒素。在 0.2~4.0 ng/mL（以黄曲霉毒素 B1 计）浓度范围内建立外标基质标准曲线，线性关系良好，相关系数 r 均大于 0.995，准确度在 93.4%~108.9% 之间。精密度实验中，10 种真菌毒素的保留时间和峰面积重复性的相对标准偏差在 0.02%-0.09% 和 2.23%-4.81% 之间。回收率实验考察，10 种真菌毒素的平均回收率在 61.3 -97.4 % 之间。本方法适用于中药材中多种真菌毒素的筛查测定。

关键词： 三重四极杆液相色谱质谱联用仪 中药材 薏苡仁 多种真菌毒素

中药材从种植、生产、流通的全过程周期较长，控制不当易受真菌毒素危害，再加上真菌毒素的产生与宿主基质特性密切相关，不同类型中药材会产生种类和性质各异的真菌毒素，全方位加强中药材中真菌毒素污染水平监控成为《中国药典》2020 版的重中之重。

2020 年版《中国药典》增订了 4 种真菌毒素（赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、展青霉素）和多种真菌毒素测定法；蜂房、九香虫、马钱子、土鳖虫等药材在正文品种项下增订了黄曲霉毒素检测项

目，薏苡仁增加了玉米赤霉烯酮的限量要求。品种的增加说明对药品质量标准的要求越来越高，对中药材进行真菌毒素的高效便捷检测尤为必要。

本文采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，依照 2020 版《中国药典》通则 2351 中的多种真菌毒素测定法的仪器参数、色谱条件及 10 种真菌毒素推荐离子对及样品前处理方法，建立一针进样同时测定中药材中 10 种真菌毒素的 LC-MS/MS 方法。该方法灵敏度高，重复性好，可用于中药材中多种真菌毒素的快速筛查。

■ 实验条件

1.1 仪器

本实验采用岛津 LCMS-8050 超高效液相色谱三重四极杆质谱联用系统，具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A5R

输液泵：LC-30AD × 2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20AC

质谱仪：LCMS-8050

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.98

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS-HP C18 [Metal free column](2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.9 μm, 岛津（上海）实验器材有限公司，PN：227-30922-02)

流动相：A 相 -0.01 % 甲酸水溶液，B 相 - 乙腈 - 甲醇溶液（1:1, v/v)

流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：50°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 5%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	处理命令	值
2.00	泵	B. Conc	5
2.10	泵	B. Conc	40
7.00	泵	B. Conc	55
10.00	泵	B. Conc	90
10.50	泵	B. Conc	5
16.00	控制器	Stop	

质谱条件

质谱仪: LCMS-8050	脱溶剂管温度: 150°C
离子源: ESI (+/-)	加热模块温度: 500°C
雾化气: 氮气 2.5 L/min	接口温度: 400°C
干燥气: 氮气 3.0 L/min	扫描模式: MRM
加热气: 空气 3.0 L/min	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

No.	中文名	英文名 (缩写)	保留时间 (min)	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
1	黄曲霉毒素 B1	Aflatoxin B1 (AFB1)	5.51	313.0>241.0	-22	-40	-24
				313.0>285.1	-22	-25	-19
2	黄曲霉毒素 B2	Aflatoxin B2 (AFB2)	5.22	315.0>259.0	-22	-30	-27
				315.0>287.1	-22	-27	-19
3	黄曲霉毒素 G1	Aflatoxin G1 (AFG1)	5.04	329.0>243.1	-22	-29	-25
				329.0>311.0	-22	-22	-30
4	黄曲霉毒素 G2	Aflatoxin G2 (AFG2)	4.79	331.0>245.1	-22	-31	-25
				331.0>313.1	-22	-26	-20
5	伏马毒素 B1	Fumonisin B1(FB1)	6.48	722.3>352.3	-26	-37	-24
				722.3>334.3	-26	-41	-22
6	伏马毒素 B2	Fumonisin B2(FB2)	8.74	706.3>336.3	-26	-39	-23
				706.3>318.3	-26	-41	-22
7	T-2 毒素	T-2 toxin(T-2)	7.92	489.1>387.1	-18	-24	-18
				489.1>245.1	-18	-30	-25
8	呕吐毒素	Deoxynivalenol(DON)	3.69	297.0>249.1	-21	-12	-17
				297.0>231.1	-21	-15	-23
9	赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A(OTA)	8.83	402.0>211.0	12	28	14
				402.0>358.1	12	21	13
10	玉米赤霉烯酮	Zearalenone(ZEN)	8.70	317.1>175.1	16	24	12
				317.1>131.0	16	30	26

注: 表格中多对监测离子对供定量和定性分析选择使用。

1.3 对照品溶液的制备

精密量取黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、伏马毒素 B1、伏马毒素 B2 及 T-2 毒素对照品溶液适量，加 50% 乙腈溶液制成下表所述浓度的混标贮备溶液；再用 50% 乙腈溶液稀释成下表所述浓度的系列混合对照品溶液。

表 3 混合对照品溶液浓度表

单位 (ng/ml)	混标贮备溶液	系列混合对照品溶液				
		1	2	3	4	5
黄曲霉毒素 B1	50.0	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
黄曲霉毒素 B2	25.0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
黄曲霉毒素 G1	50.0	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
黄曲霉毒素 G2	25.0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
伏马毒素 B1	500.0	2.0	4.0	10.0	20.0	40.0
伏马毒素 B2	500.0	2.0	4.0	10.0	20.0	40.0
T-2 毒素	500.0	2.0	4.0	10.0	20.0	40.0
呕吐毒素	12500.0	50.0	100.0	250.0	500.0	1000.0
赭曲霉毒素 A	50.0	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
玉米赤霉烯酮	125.0	0.5	1.0	2.5	5.0	10.0

1.4 供试品溶液的配制

取供试品粉末约 5 g (过二号筛)，精密称定，精密加入 70% 甲醇溶液 50 mL，超声处理 30 分钟，离心，精密量取上清液 10 mL，用水稀释至 20 mL，摇匀。精密量取 3 mL，缓慢通过已经处理好的 HLB 柱 [规格：3 mL (60 mg)，依次用甲醇和水各 3 mL 洗脱] (SHIMSEN Styra HLB 60mg/3mL，岛津 (上海) 实验器材有限公司，PN：380-00855-03)，直至有适量空气通过，收集洗脱液；随后用 3 mL 甲醇洗脱，收集洗脱液，合并两次洗脱液，于 40℃ 氮气缓慢吹至近干，加 50% 乙腈溶液定容至 1 mL，用微孔滤膜 (0.22 μm) 滤过，取续滤液，即得。

1.5 基质混合对照品溶液的制备

取空白基质样品 5 g，同供试品溶液的制备方法处理至“40℃ 条件下用氮气吹至近干”，分别精密加入上述系列对照品溶液 1.0 mL，涡旋混匀，用微孔滤膜滤过 (0.22 μm) 滤过，取续滤液，即得。

1.6 测定法

分别精密吸取上述系列基质混合对照品溶液各 5 μL，注入高效液相色谱 - 质谱仪，测定峰面积，以峰面积为纵坐标，进样浓度为横坐标，绘制标准曲线。另精密吸取上述供试品溶液 5 μL，注入高效液相色谱 - 质谱仪，测定峰面积，从标准曲线上读出供试品中相当于黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 G2、赭曲霉毒素 A、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素 B1、伏马毒素 B2 及 T-2 毒素的浓度，计算，即得。

■ 结果与讨论

2.1 薏苡仁基质混合对照品溶液色谱图

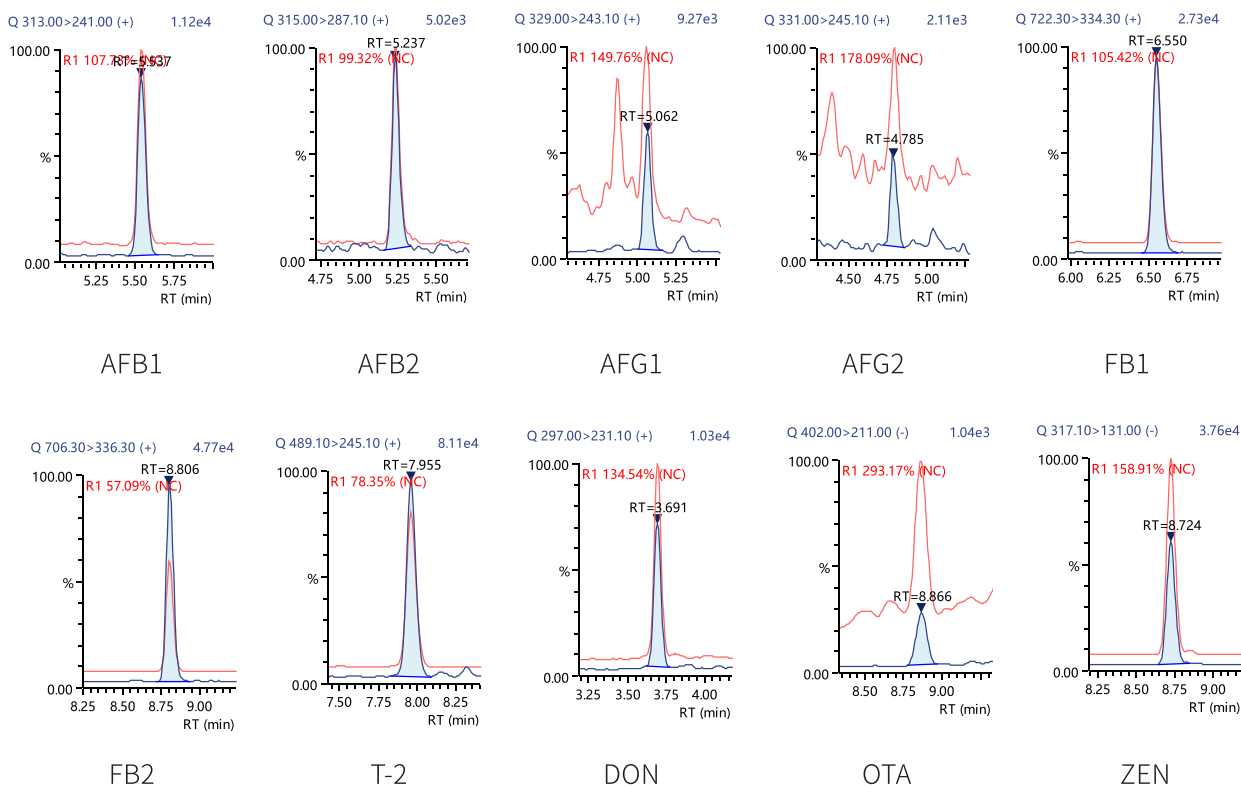


图1 10种真菌毒素薏苡仁基质混合对照品溶液的MRM色谱图(以黄曲霉毒素B1计浓度为0.2 ng/mL)

2.2 标准曲线

将0.2、0.4、1.0、2.0、4.0 ng/mL系列薏苡仁基质混合对照品溶液(以黄曲霉毒素B1计)进样分析,以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制校准曲线,结果见表4。薏苡仁基质中10种真菌毒素线性相关性良好, r 均大于0.995,准确度在93.4%~108.9%之间。

表4 标准曲线结果

No.	中文名称	线性范围 (ng/mL)	标准曲线	相关系数(r)	准确度(%)	定量限(ng/mL)
1	黄曲霉毒素B1	0.2-4.0	$Y = (208888)X + (2734.77)$	0.9989	96.3-104.8	0.02
2	黄曲霉毒素B2	0.1-2.0	$Y = (179612)X + (-423.753)$	0.9984	96.6-107.1	0.02
3	黄曲霉毒素G1	0.2-4.0	$Y = (151059)X + (1254.93)$	0.9999	98.4-100.9	0.05
4	黄曲霉毒素G2	0.1-2.0	$Y = (59929.1)X + (-163.131)$	0.9990	94.6-103.5	0.05
5	伏马毒素B1	2.0-40.0	$Y = (34742.4)X + (13141.8)$	0.9997	97.2-102.3	0.10
6	伏马毒素B2	2.0-40.0	$Y = (58100.7)X + (9768.76)$	0.9998	98.5-102.7	0.10
7	T-2毒素	2.0-40.0	$Y = (129557)X + (-3247.95)$	0.9995	97.5-103.9	0.18
8	呕吐毒素	50.0-1000.0	$Y = (487.223)X + (-864.673)$	0.9997	98.1-103.1	5.65
9	赭曲霉毒素A	0.2-4.0	$Y = (27624.9)X + (-53.1886)$	0.9975	95.8-108.9	0.05
10	玉米赤霉烯酮	0.5-10.0	$Y = (60428.0)X + (126715)$	0.9974	93.4-108.2	0.05

2.3 精密度考察

取薏苡仁基质混合对照品溶液 0.2 ng/mL (以黄曲霉毒素 B1 计)，注入液相色谱串联质谱仪，连续分析 6 次，计算目标化合物的保留时间和峰面积相对标准偏差 (RSD%)，具体结果见表 5。目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差在 0.02%-0.09% 和 2.23%-4.81% 之间，结果表明该仪器具有良好精密度。

表 5 精密度考察结果 (n=6)

No.	中文名	浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD(%)	峰面积 RSD(%)
1	黄曲霉毒素 B1	0.2	0.05	3.35
2	黄曲霉毒素 B2	0.1	0.06	3.31
3	黄曲霉毒素 G1	0.2	0.07	3.42
4	黄曲霉毒素 G2	0.1	0.09	4.55
5	伏马毒素 B1	2.0	0.04	3.51
6	伏马毒素 B2	2.0	0.04	2.23
7	T-2 毒素	2.0	0.03	3.18
8	呕吐毒素	50.0	0.02	4.21
9	赭曲霉毒素 A	0.2	0.03	4.81
10	玉米赤霉烯酮	0.5	0.03	3.35

2.4 回收率考察

取薏苡仁供试品，按低、中、高三水平进行加标，分别精密加入 1.3 项下的混标贮备溶液 40, 100, 200 μ L，各水平平行制备 3 份，按 1.4 项下供试品溶液的配制进行样品前处理，回收率测定结果见表 6。结果表明，10 种真菌毒素平均回收率在 61.3 -97.4 % 之间。

表 5 精密度考察结果 (n=6)

No.	中文名	平均回收率 (%)		
		低	中	高
1	黄曲霉毒素 B1	80.2	83.8	75.3
2	黄曲霉毒素 B2	79.7	82.8	79.0
3	黄曲霉毒素 G1	80.9	84.1	72.6
4	黄曲霉毒素 G2	74.1	85.0	75.8
5	伏马毒素 B1	67.9	79.3	77.8
6	伏马毒素 B2	61.3	72.9	71.3
7	T-2 毒素	87.1	94.0	90.3
8	呕吐毒素	89.1	97.4	95.9
9	赭曲霉毒素 A	69.4	70.0	66.0
10	玉米赤霉烯酮	61.9	86.2	77.8

2.5 实际样品测定

取市售薏苡仁药材，按 1.4 供试品溶液的制备进行样品前处理，按照 1.2 分析条件进样分析。采用外标校准曲线法定量，定量结果如下表。按照薏苡仁品种项下真菌毒素限量要求，样品符合要求。

表 7 薏苡仁供试品测定结果

No.	化合物	检出量 (µg/kg)	限量 (µg/kg)
1	黄曲霉毒素 B1	N.D.	
2	黄曲霉毒素 B2	N.D.	AFB1 ≤ 5, Total ≤ 10
3	黄曲霉毒素 G1	N.D.	
4	黄曲霉毒素 G2	N.D.	
5	伏马毒素 B1	96.4	-
6	伏马毒素 B2	14.4	-
7	T-2 毒素	N.D.	-
8	呕吐毒素	133.7	-
9	赭曲霉毒素 A	N.D.	-
10	玉米赤霉烯酮	326.6	500

N.D.= Not Detected

■ 结论

本文参照 2020 版《中国药典》通则 2351 中的《多种真菌毒素测定法》，利用 LCMS-8050 三重四极杆液质联用仪建立了 10 种真菌毒素的 LC-MS/MS 快速筛查方法。该方法在 0.2~4.0 ng/mL（以黄曲霉毒素 B1 计）浓度范围内线性关系良好，相关系数 r 均大于 0.995。精密度实验中，10 种真菌毒素的保留时间和峰面积重复性的相对标准偏差在 0.02%-0.09% 和 2.23%-4.81% 之间，仪器精密度良好。加标回收率考察结果显示，10 种真菌毒素的平均回收率在 61.3 -97.4 % 之间，该方法的回收率结果良好。该方法灵敏度高，重复性好，可用于中药材中多种真菌毒素的筛查测定。

岛津应用云

