

中药材薏苡仁中 10 种真菌毒素的测定

SGL-LC/MS-039

摘要：本研究建立了中药材薏苡仁中 10 种真菌毒素同时测定的 LS-MS/MS 检测方法。参照 2020 版《中国药典》通则 2351 中的多种真菌毒素测定法，采用岛津的 SHIMSEN Styra HLB 产品对薏苡仁样品进行净化，Shim-pack GISS-HP C18 [Metal free column] 色谱柱进行分离，岛津串联质谱 LCMS-8050 检测分析。对薏苡仁空白样品进行高、中、低浓度（以黄曲霉毒素 B₁ 计，分别为 0.4 ng/g、1.0 ng/g、2.0 ng/g）加标后，按照上述前处理方法处理后上机，各添加浓度平行 3 份样品考察回收率，结果显示，加标回收率为 61.3%-97.4%，回收率高，满足药典要求。该方法可为中药材中 10 种真菌毒素同时测定提供参考。

关键词：SHIMSEN Styra HLB 薏苡仁 中药 真菌毒素 LC-MSMS

1. 实验部分

1.1 实验仪器及耗材

仪器配置：Shimadzu LC-30A 与 LCMS-8050 联用系统；

色谱柱：Shim-pack GISS-HP C18 [Metal free column] (100×2.1 mm, 1.9 μm; P/N: 227-30922-02)；

固相萃取小柱：SHIMSEN Styra HLB 60 mg/3 mL (P/N: 380-00855-03)；

混标溶液：SHIMSEN 10 种真菌毒素混标溶液（货号：380-03538）

SHIMSEN Arc Disc HPTFE 针式过滤器（P/N: 380-00341-05）；

LC/MS 认证样品瓶 LabTotal Vial（P/N: 227-34001-01）；

SHIMSEN Pipet 移液枪：SHIMSEN Pipet PMII-10（P/N: 380-00751-02）；

SHIMSEN Pipet PMII-100（P/N: 380-00751-04）；

SHIMSEN Pipet PMII-1000（P/N: 380-00751-06）。

1.2 分析条件

UHPLC 条件

色谱柱：Shim-pack GISS-HP C18 [Metal free column] (100×2.1 mm, 1.9 μm; P/N: 227-30922-02)

流速：0.3 mL/min

进样量：5 μL

柱温：50 °C

流动相：A：0.01%甲酸水溶液 B：乙腈-甲醇（1：1）

梯度洗脱程序如下：

时间 (Min)	0	2	2.1	7	10	10.5	16
A (%)	95	95	60	45	10	95	95
B (%)	5	5	40	55	90	5	5

质谱条件

离子化模式: ESI, 正负离子同时扫描

扫描模式: 多反应监测(MRM)

碰撞气: 氩气

加热气: 空气 3.0 L/min

雾化气: 氮气 2.5 L/min

干燥气: 氮气 3.0 L/min

接口温度: 400℃

DL 温度: 150 ℃

加热模块温度: 500 ℃

各化合物 MRM 参数见下表

No.	中文名	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
1	黄曲霉毒素 B ₁	313.0>241.0	-22	-40	-24
		313.0>285.1	-22	-25	-19
2	黄曲霉毒素 B ₂	315.0>259.0	-22	-30	-27
		315.0>287.1	-22	-27	-19
3	黄曲霉毒素 G ₁	329.0>243.1	-22	-29	-25
		329.0>311.0	-22	-22	-30
4	黄曲霉毒素 G ₂	331.0>245.1	-22	-31	-25
		331.0>313.1	-22	-26	-20
5	伏马毒素 B ₁	722.3>352.3	-26	-37	-24
		722.3>334.3	-26	-41	-22
6	伏马毒素 B ₂	706.3>336.3	-26	-39	-23
		706.3>318.3	-26	-41	-22
7	T-2 毒素	489.1>387.1	-18	-24	-18
		489.1>245.1	-18	-30	-25
8	呕吐毒素	297.0>249.1	-21	-12	-17
		297.0>231.1	-21	-15	-23
9	赭曲霉毒素 A	402.0>211.0	12	28	14
		402.0>358.1	12	21	13
10	玉米赤霉烯酮	317.1>175.1	16	24	12
		317.1>131.0	16	30	26

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 毒素混合对照品溶液 (SHIMSEN 10 种真菌毒素混标溶液, 货号: 380-03538) 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。

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 B ₁	50.0	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
黄曲霉毒素 B ₂	25.0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
黄曲霉毒素 G ₁	50.0	0.2	0.4	1.0	2.0	4.0
黄曲霉毒素 G ₂	25.0	0.1	0.2	0.5	1.0	2.0
伏马毒素 B ₁	500.0	2.0	4.0	10.0	20.0	40.0
伏马毒素 B ₂	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 样品前处理

1.4.1 样品提取

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, 待净化。

1.4.2 样品净化

SHIMSEN Styra HLB 60 mg/3 mL

3 mL 甲醇、3 mL 水活化, 弃去流出液; 3 mL 上述待净化液上样, 直至有适量空气通过, 收集流出液; 3 mL 甲醇洗脱, 收集流出液; 合并两次洗脱液, 于 40°C 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。净化流程图见图 1。

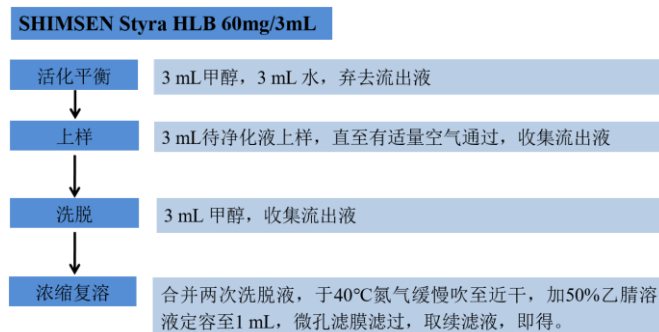


图 1 样品净化流程图

1.5 基质混合对照品溶液的制备

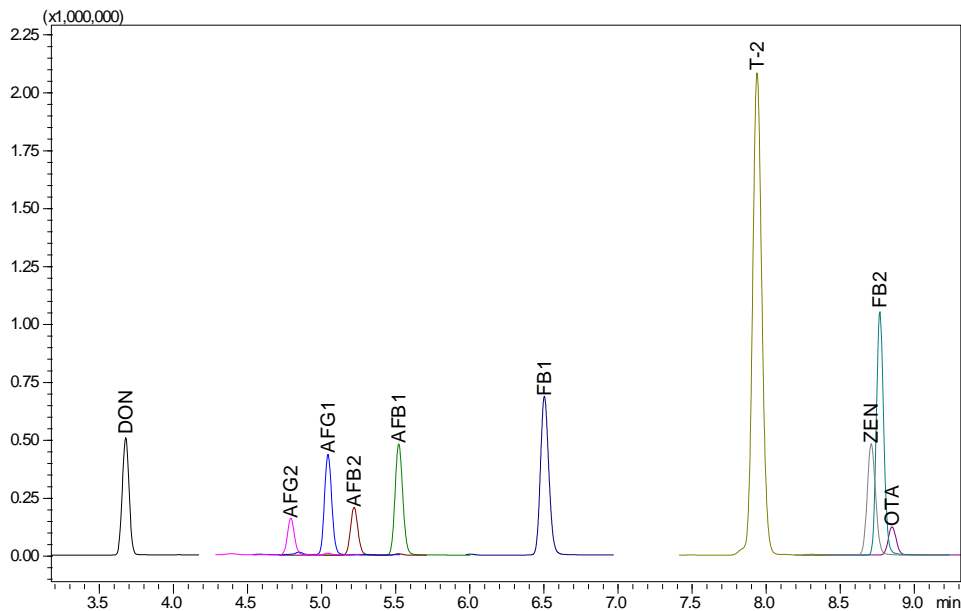
取空白基质样品 5 g，同供试品溶液的制备方法处理至“40℃条件下用氮气吹至近干”，分别精密加入上述系列对照品溶液（1.3）1.0 mL，涡旋混匀，用微孔滤膜滤过（0.22 μm）滤过，取续滤液，即得。

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。

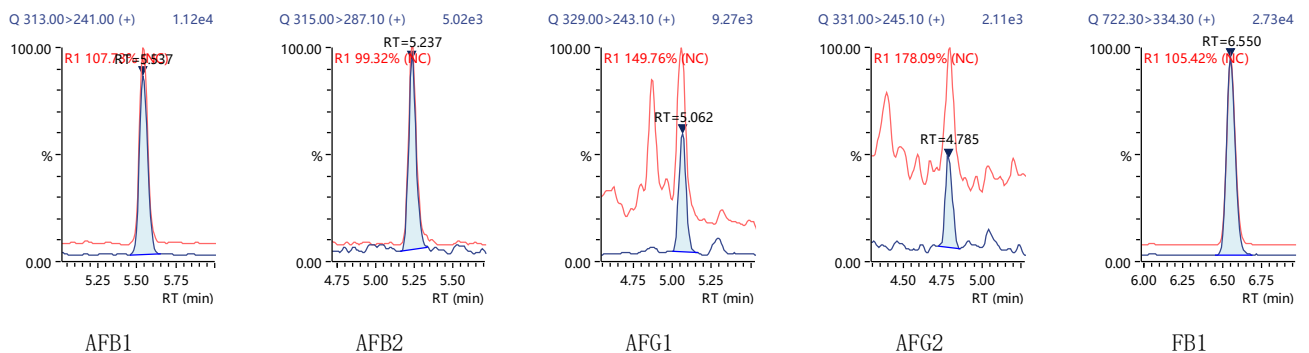
2. 结果及讨论

2.1 混合对照品溶液色谱图



10 种真菌毒素混合对照品溶液的 MRM 色谱图（以黄曲霉毒素 B₁ 计浓度为 4.0 ng/mL）

2.2 薏苡仁基质混合对照品溶液色谱图



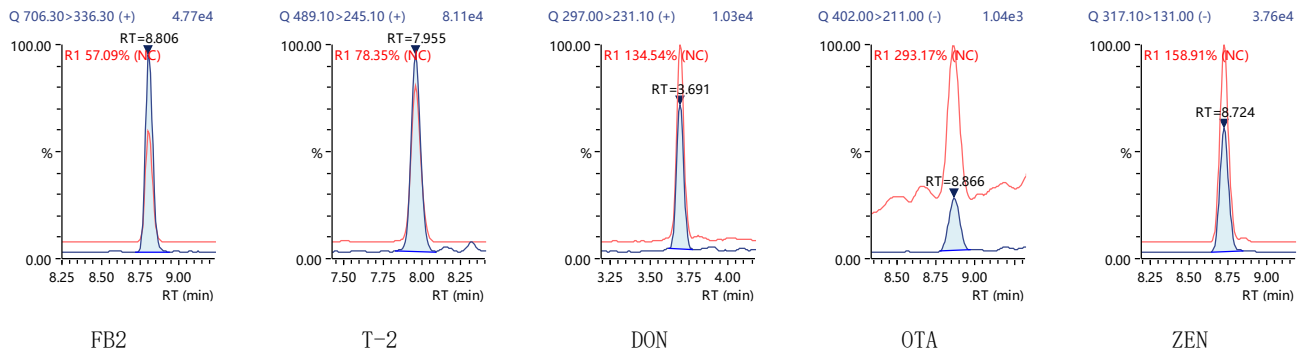


图 2.10 10 种真菌毒素薏苡仁基质混合对照品溶液的 MRM 色谱图（以黄曲霉毒素 B₁ 计浓度为 0.2 ng/mL）

2.3 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 1. 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(%)
1	黄曲霉毒素 B ₁	0.2-4.0	$Y = (208888)X + (2734.77)$	0.9989	96.3-104.8
2	黄曲霉毒素 B ₂	0.1-2.0	$Y = (179612)X + (-423.753)$	0.9984	96.6-107.1
3	黄曲霉毒素 G ₁	0.2-4.0	$Y = (151059)X + (1254.93)$	0.9999	98.4-100.9
4	黄曲霉毒素 G ₂	0.1-2.0	$Y = (59929.1)X + (-163.131)$	0.9990	94.6-103.5
5	伏马毒素 B ₁	2.0-40.0	$Y = (34742.4)X + (13141.8)$	0.9997	97.2-102.3
6	伏马毒素 B ₂	2.0-40.0	$Y = (58100.7)X + (9768.76)$	0.9998	98.5-102.7
7	T-2 毒素	2.0-40.0	$Y = (129557)X + (-3247.95)$	0.9995	97.5-103.9
8	呕吐毒素	50.0-1000.0	$Y = (487.223)X + (-864.673)$	0.9997	98.1-103.1
9	赭曲霉毒素 A	0.2-4.0	$Y = (27624.9)X + (-53.1886)$	0.9975	95.8-108.9
10	玉米赤霉烯酮	0.5-10.0	$Y = (60428.0)X + (126715)$	0.9974	93.4-108.2

2.4 薏苡仁中 10 种真菌毒素的 LC-MS/MS 检测添加回收结果

对薏苡仁空白样品进行高、中、低浓度（以黄曲霉毒素 B₁ 计，分别为 0.4 ng/g、1.0 ng/g、2.0 ng/g）加标后，按照上述前处理方法处理后上机，各添加浓度平行 3 份样品考察回收率，结果显示，加标回收率为 61.3%-97.4%。

序号	目标物	添加浓度 (ng/g)	平均回收率 (%,n=3)	添加浓度 (ng/g)	平均回收率 (%,n=3)	添加浓度 (ng/g)	平均回收率 (%,n=3)
1	黄曲霉毒素 B ₁	0.4	80.2	1	83.8	2	75.3
2	黄曲霉毒素 B ₂	0.2	79.7	0.5	82.8	1	79.0

3	黄曲霉毒素 G ₁	0.4	80.9	1	84.1	2	72.6
4	黄曲霉毒素 G ₂	0.2	74.1	0.5	85.0	1	75.8
5	伏马毒素 B ₁	4	67.9	10	79.3	20	77.8
6	伏马毒素 B ₂	4	61.3	10	72.9	20	71.3
7	T-2 毒素	4	87.1	10	94.0	20	90.3
8	呕吐毒素	100	89.1	250	97.4	500	95.9
9	赭曲霉毒素 A	0.4	69.4	1	70.0	2	66.0
10	玉米赤霉烯酮	1	61.9	2.5	86.2	5	77.8

3. 结论

本研究建立了中药材薏苡仁中 10 种真菌毒素同时测定的 LS-MS/MS 检测方法。参照 2020 版《中国药典》通则 2351 中的多种真菌毒素测定法,采用岛津的 SHIMSEN Styra HLB 产品对薏苡仁样品进行净化, Shim-pack GISS-HP C18 [Metal free column] 色谱柱进行分离, 岛津串联质谱 LCMS-8050 检测分析。对薏苡仁空白样品进行高、中、低浓度 (以黄曲霉毒素 B₁ 计, 分别为 0.4 ng/g、1.0 ng/g、2.0 ng/g) 加标后, 按照上述前处理方法处理后上机, 各添加浓度平行 3 份样品考察回收率, 结果显示, 加标回收率为 61.3%-97.4%, 回收率高, 满足药典要求。该方法可为中药材中 10 种真菌毒素同时测定提供参考。