

附件 2：9305 中药中真菌毒素测定指导原则（第一次）

9305 中药中真菌毒素测定指导原则

真菌毒素（Mycotoxin）是真菌产生的毒性产物。~~真菌毒素对人体具有毒性，如黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮和展青霉素等，应得到严格的控制。由于中药材的生长、种植及储存过程存在微生物污染的风险，在失控的情况下，可能被真菌及其产生的毒素污染，为实现对中药中真菌毒素的准确测定，制定本指导原则。~~

基本原则

~~一、中药中真菌毒素的分类~~

~~真菌毒素由各种各样的真菌菌核所产生的。如，黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、杂色曲霉毒素主要由曲霉属真菌产生；伏马菌素、T-2 毒素、呕吐毒素（脱氧雪腐镰刀菌烯醇）、玉米赤霉烯酮与主要由镰刀菌属相关的真菌产生；展青霉素、桔青霉素、霉酚酸与主要由青霉属真菌产生相关的主要；田麦角碱、麦角生碱、麦角克碱等麦角碱类真菌毒素与主要由麦角菌属真菌产生；链格孢酚、链格孢酚甲醚、腾毒素等链格孢霉类真菌毒素主要由与链格孢属真菌产生。~~

此外，植物对真菌毒素进行糖苷结合等代谢产生隐蔽型真菌毒素。隐蔽型真菌毒素进入人体或动物体内后，经代谢生成原型真菌毒素，可产生同等或更高毒性，如玉米赤霉烯酮-14-葡萄糖苷和脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷。

由于中药材的生长、种植及储存在种植、加工、贮存及流通等过程存在微生物污染的被真菌及其产生的毒素污染的风险，在失控的情况下，可能被真菌及其产生的毒素污染，为实现对中药中真菌毒素的准确测定，制定本指导原则。

基本原则

~~二、监控品种~~一、识别中药中真菌毒素污染的风险并进行监控

由于各类真菌毒素的发生毒性产生的机理不同，容易受真菌毒素污染的对象也有所不同。因此，应选取容易受真菌毒素污染的中药品种进行相应毒素检测方法的开发。种子类、块茎类药材应注意黄曲霉毒素的检测监控，如柏子仁、莲子、延胡索等；养殖动物类药材应注意黄曲霉毒素、呕吐毒素、伏马菌素的检测监控，

如土鳖虫、九香虫等；根及根茎类、香辛果实种子类药材应注意赭曲霉毒素、伏马菌素及链格孢霉类真菌毒素的~~检测~~监控，如黄芪、甘草、肉豆蔻等；与粮谷类基质相似的药材应注意呕吐毒素、玉米赤霉烯酮类、麦角碱类真菌毒素的~~检测~~监控，如麦芽、淡豆豉、薏苡仁等；酸性果实类药材应注意展青霉素的~~检测~~监控，如枸杞子、乌梅、山楂等。

使用发酵工艺生产加工的药材应注意开展相应真菌毒素的控制，如红曲应注意桔青霉素的~~检测~~监控。由易受真菌毒素污染药材品种加工的中药饮片~~及~~、中药配方颗粒和提取物亦应注意相关真菌毒素的~~检测~~监控。处方中含有易受真菌毒素污染的药材或以生药粉投料的中成药品种应注意相关真菌毒素的~~检测~~监控，并关注贮存期间真菌毒素污染水平的动态变化。

三、~~测定方法~~及应用策略

1. ~~测定方法~~

二、根据~~不同测定需求~~采用适当的测定方法

真菌毒素的前处理方法包括液液萃取、固相萃取、免疫亲和层析等多种方式，可根据真菌毒素的理化性质、待测样品的基质类型特点等进行前处理方法的研究开发。

真菌毒素的测定方法主要有液相色谱法、~~液相色谱质谱联用法~~液相色谱-质谱联用法（包括液相色谱-串联三重四极杆质谱法、液相色谱-串联高分辨质谱法等）、薄层色谱法、酶联免疫法、胶体金免疫层析法等。

液相色谱~~法~~通常联合免疫亲和净化等样品前处理方法，准确性高、重现性好、灵敏、专属，可用于单个（类）真菌毒素的定量检测。~~液相色谱-串联质谱法~~液相色谱-质谱联用法可实现对多成分同时定性定量检测，灵敏度高、准确、专属性强，可用于多个（类）真菌毒素的定性定量检测和广谱筛查。薄层色谱法专属性相对较差，灵敏度较低，操作较为繁琐，可用于单个真菌毒素的初筛。酶联免疫法和胶体金免疫层析法均属于快速检测方法，灵敏度高，其中酶联免疫法具有批量分析优势，胶体金免疫层析法操作简便快捷，但两种方法均~~灵敏度高，但缺乏柱层析分离步骤，准确度较差~~，存在一定的假阳性与假阴性概率，目前主要用于真菌毒素现场快筛。

在建立中药中真菌毒素的测定方法时，应符合分析方法验证指导原则（指导

原则 9101)。

2. 应用策略

~~检测单个(类)真菌毒素时,则可直接采用适宜的方法定性、定量,如液相色谱-质谱联用法、高效液相色谱法等。也可采用酶联免疫法对多个样品中单个毒素进行筛查,但需对不同中药基质单独研究样品前处理方法,并进行方法学考察,以控制假阳性、假阴性。~~

~~同时定量检测多个(类)真菌毒素时,通常选用液相色谱-串联三重四级杆质谱联用法。~~

~~广谱筛查时,宜选用高~~

~~通量且定性准确的方法,如液相色谱-质谱联用法(包括液相色谱-串联高分辨质谱法、液相色谱-串联三重四级杆质谱法等),快速锁定目标,再对筛查结果采用专属、准确的方法进行定量,如液相色谱-串联三重四级杆质谱联用法、高效液相色谱法等。~~

~~当高效液相色谱法、酶联免疫法等检测结果为阳性或可疑时,可采用液相色谱-质谱联用法进行确证。~~

~~采用液相色谱-质谱联用法时,对于复杂基质,干扰严重时,可针对性建立前处理方法或采用基质匹配标准曲线消除基质效应。~~

四、限值拟定

三、科学制定真菌毒素限量

黄曲霉毒素类真菌毒素的限量,可按照中药有害残留物限量**制定**指导原则(指导原则9302)中相关规定进行**制订制定**。对于其他毒性较强毒素的限量**拟定制定**,如赭曲霉毒素、呕吐毒素、伏马菌素、桔青霉素,可参照中药有害残留物限量**制定**指导原则(指导原则9302)中相关规定,并参考**国家安全标准-食品中真菌毒素限量(GB 2761)**及**各国药典等**国内外相关限量标准,同时结合具体中药品种中真菌毒素检出情况,**分别合理制定制订单个具体毒素的**限量。**对于**具有同时污染特性的同类**多种**毒素,也可**制订制定该类毒素的**总和限量标准。

基本内容

一、单个(类)真菌毒素测定

红色字体为删除内容,蓝色字体为增订内容

包括单个真菌毒素的测定或单类真菌毒素中多个成分测定。

1. 测定方法

应选择准确、专属的方法，方法检测灵敏度应满足~~限度~~~~限量~~~~标准~~要求。首选高效液相色谱法或液相色谱-质谱联用法。

高效液相色谱法可采用荧光检测器或者~~二极管阵列~~~~紫外-可见~~~~分光~~检测器，应根据待测真菌毒素的理化性质选择适宜的固定相和流动相，多成分测定时可采用流动相梯度洗脱，以达到良好分离效果。固定相常用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂，可根据情况选择小粒径或较长的色谱柱以提高分离度。常用的流动相为不同比例的甲醇-水溶液和乙腈-水溶液。如桔青霉素可以乙腈-水（35:65）（用磷酸调节 pH 值至 2.3）为流动相，荧光检测器（激发波长 331nm，发射波长 500nm）进行测定。

液相色谱-质谱联用法可采用液相色谱-串联三重四极杆质谱进行测定。应选择多对特征性的离子对通道，注意待测毒素在质谱中的采集模式，以提高离子化效率，并对质谱检测参数进行优化达到最佳。如桔青霉素可以含 0.4%甲酸和~~2mM~~~~2mmol/L~~ 甲酸铵的甲醇为流动相 A，含 0.4%甲酸和~~2mM~~~~2mmol/L~~ 甲酸铵水溶液为流动相 B，按下列梯度洗脱：0~2min，20%A；2~12 min，20%→80%A；12~13 min，80%A→20%A；电喷雾离子源（ESI）正离子模式下选择质荷比（ m/z ）251.2→233.1 作为定量离子对，（ m/z ）251.2→205.1 作为定性离子对进行检测。

2. 对照品溶液的制备

应根据各种真菌毒素的理化性质，以保证溶解性和稳定性为原则，选择合适的溶剂溶解并配制合适的浓度作为贮备液。贮备液通常贮存于零下 20℃ 以下温度的冷冻环境，并定期考察稳定性。常用的溶剂为甲醇、乙腈。临用前需采用合适的溶剂将贮备液稀释成适宜浓度的~~工作~~~~标准曲线~~~~对照品~~溶液，一般选用与供试品溶液中相似比例的有机溶剂进行配制，如桔青霉素可采用 70%甲醇~~溶液~~配制。

采用液相色谱-质谱联用法时，~~可根据样品实际情况，一般应~~采用空白基质溶液（即不含待测真菌毒素的同类型样品按供试品溶液制备方法制得的溶液）进行~~对照品溶液~~配制。若待测毒素基质效应在±20%以内，可采用合适的溶剂配制~~对照品溶液~~。

3. 供试品溶液的制备

真菌毒素待测样品应置于阴凉干燥处保存，并尽快测定。真菌毒素在样品中的污染存在不均匀性，测定时按药材和饮片取样法（通则 0211）取样，并将样品全部粉碎后充分混匀。

应采用快速、简单、高效的提取方式进行待测真菌毒素的提取，常见的提取方式有振摇、超声以及高速匀浆等。提取液一般需进一步净化富集，如采用免疫亲和柱或者 HLB 固相萃取小柱对待测真菌毒素进行吸附与洗脱，其中免疫亲和柱可专属性吸附待测真菌毒素，净化效果较好，宜作为首选；HLB 固相萃取小柱需通过调整洗脱溶剂极性，分段进行待测物的洗脱与收集。其他类型净化柱可用于吸附样液中的脂类、蛋白类等杂质，操作简便，但净化效果相对较差，需进一步考察。如桔青霉素可采用 70% 甲醇溶液进行提取，提取液再分别采用相应的免疫亲和柱进行净化。

4. 样品测定与结果判断

真菌毒素的测定一般采用标准曲线法，当供试品色谱中出现与对照品保留时间相同的色谱峰时（当采用二极管阵列检测器时，其紫外-可见吸收光谱与对照品光谱也应匹配），可基本判断检出相应的毒素，通过标准曲线计算相应的含量。

样品测定一般需同时进行添加回收实验和灵敏度实验准确度和灵敏度考察，其中加样回收率一般应在 70%~120% 之间，在满足重复性要求的情况下，部分真菌毒素回收率可放宽至 60%~130%，其它相关要求可参考分析方法验证指导原则（指导原则 9101）。如有可能，应使用有证标准物质进行质量控制。中药基质复杂，提取效率各不相同，必要时可选择同位素内标进行校正，同时应对内标物的浓度进行考察。

当液相色谱法、酶联免疫法等检测结果为阳性或可疑时，可采用液相色谱-质谱联用法进行确证。采用液相色谱-串联三重四级杆质谱联用法时，供试品色谱中如检出与对照品保留时间相同的色谱峰，并且所选择的多对子离子的质荷比一致，供试品溶液的定性离子相对丰度比与浓度相当的对照品溶液的定性离子相对丰度比进行比较时，并且在扣除背景后的质谱图中，所选择的 2 对监测离子对均出现，供试品溶液的监测离子对峰面积比与浓度相当的对照品溶液的监测离子对峰面积比进行比较时，相对偏差不超过下列规定的范围，则可判定样品中存在该真菌毒素组分：相对比例>50%，允许±20%偏差；相对比例 20%~50%，

允许 $\pm 25\%$ 偏差；相对比例 $10\% \sim 20\%$ ，允许 $\pm 30\%$ 偏差；相对比例 $\leq 10\%$ ，允许 $\pm 50\%$ 偏差。

采用液相色谱-串联高分辨质谱法时，供试品色谱中如检出与对照品保留时间相同的色谱峰，并且与对照品母离子和碎片离子精确质荷比偏差不超过百万分之五（精确质荷比小于 200 的偏差小于 1mDa），则可判定样品中存在该真菌毒素。

二、高通量真菌毒素测定

包括不同种类真菌毒素的多成分测定或高通量筛查。

1. 检测方法

应选择可同时测定多种化学成分、灵敏、准确、专属的方法。首选液相色谱-质谱联用法，如液相色谱-串联三重四极杆质谱法或液相色谱-串联高分辨质谱法。

根据待测真菌毒素的离子化效率，选择合适的离子采集模式，可使用正负离子两种采集模式结合的方式。根据待测真菌毒素的理化性质，在选择适宜的固定相、流动相及梯度时，以保证良好的分离效果。为提高待测真菌毒素的响应强度，可添加甲酸、甲酸铵、乙酸、乙酸铵等促离子化试剂，但应对添加浓度进行优化。应对质谱检测参数进行优化达到最佳。

采用三重串联四极杆质谱作为检测器时，可选择多对特征性的离子对通道，经过多种中药基质考察后，选取干扰较少的离子对通道，并针对性优化设定最佳去簇电压和碰撞能量等重要质谱参数。采用高分辨质谱作为检测器时，应先建立待测真菌毒素的完整碎片信息的谱库。如进行真菌毒素高通量筛查时可以采用正负离子采集模式。正离子模式参考流动相及洗脱梯度：以 0.4%甲酸溶液为流动相 A，以甲醇为流动相 B；按下列梯度洗脱：0~11 分钟-min，A：80%→45%；11~15 分钟-min，A：45%→0%；15~21 分钟-min，0%→80%。负离子模式参考流动相及洗脱梯度：以水为流动相 A，乙腈为流动相 B，0~13 分钟-min，A：90%→40%；13~15 分钟-min，A：40%→0%；15~18 分钟-min，0%→90%。部分真菌毒素的监测离子对、碰撞电压及检出限参考值见下表。

表 部分真菌毒素的质谱监测离子对、碰撞电压及检出限参考值

编号	中文名	英文名	母离子	子离子	CE(V)	参考检出 限参考值 ($\mu\text{g/kg}$) *
----	-----	-----	-----	-----	-------	--

红色字体为删除内容，蓝色字体为增订内容

1	黄曲霉毒素 B ₁	Aflatoxin B ₁	313.1	241.0	50	0.5
			313.1	285.1	40	
2	黄曲霉毒素 B ₂	Aflatoxin B ₂	315.1	287.1	35	0.5
			315.1	259.1	40	
3	黄曲霉毒素 G ₁	Aflatoxin G ₁	329.1	243.1	35	0.5
			329.1	311.1	45	
4	黄曲霉毒素 G ₂	Aflatoxin G ₂	331.1	245.1	40	0.5
			331.1	313.1	38	
5	黄曲霉毒素 M ₁	Aflatoxin M ₁	329.1	273.1	33	0.5
			329.1	259.2	33	
6	黄曲霉毒素 M ₂	Aflatoxin M ₂	331.1	273.1	47	3.1 25
			331.1	259.3	47	
7	赭曲霉毒素 A	Ochratoxin A	404.1	239	34	0.5
			404.1	102.1	93	
8	赭曲霉毒素 B	Ochratoxin B	370.0	205.2	47	0.5
			370.0	324.4	18	
9	赭曲霉毒素 C	Ochratoxin C	432.1	239.1	37	0.5
			432.1	358	23	
10	伏马毒素 B ₁	Fumonisin B ₁	722.4	334.3	55	3.1 25
			722.4	352.3	49	
11	伏马毒素 B ₂	Fumonisin B ₂	706.4	336.3	49	3.1 25
			706.4	318.3	52	
12	伏马毒素 B ₃	Fumonisin B ₃	706.6	336.3	47	12.5
			706.6	688.5	47	
13	去环氧-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deepoxy-deoxynivalenol	281.1	215.1	18	12.5
			281.1	233.1	16	
14	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	Deoxynivalenol	297.1	249.1	17	6.2 5
			297.1	231.1	18	
15	田麦角碱	Agroclavine	239.1	183.1	33	0.5
			239.1	168.2	36	
16	麦角克碱	Ergocristine	610.3	268.1	40	0.5
			610.3	223.1	40	
17	链格孢酚	Alternariol	259.0	213.0	36	3.1 25
			259.0	185.2	45	
18	链格孢酚甲基醚	Alternariol-methyl ether	273.1	230.1	40	12.5
			273.1	199.2	40	
19	桔青霉素	Citrinin	251.2	233.1	25	0.5
			251.2	205.1	35	
20	黄绿青霉素	Citreoviridin	403.2	139.0	30	3.1 25
			403.2	297.1	20	
21	蛇形菌素	Diacetoxyscirpenol	384.2	307.3	15	0.5
			384.2	229.1	20	
22	镰刀菌烯酮	Fusarenon X	355.1	247.0	30	3.1 25
			355.1	175.1	20	

红色字体为删除内容，蓝色字体为增订内容

23	HT-2 毒素	HT-2 toxin	442.2	263.1	17	6.25
			442.2	215.1	19	
24	T-2 毒素	T-2-toxin	484.3	305.1	19	0.625
			484.3	245.1	18	
25	杂色曲霉素	Sterigmatocystin	325.1	281.1	48	0.5
			325.1	310.1	35	
26	霉酚酸	Mycophenolic Acid	321.3	207.1	25	0.5
			321.3	302.9	12	
27	展青霉素	Patulin	153.0	109.0	-10	12.5
			153.0	81.0	-18	
28	α -玉米赤霉醇	α -zearalanol	321.1	277.1	-30	1.25
			321.1	303.4	-28	
29	α -玉米赤霉烯醇	α -zearalenol	319.1	173.8	-30	0.5
			319.1	160.2	-46	
30	β -玉米赤霉醇	β -zearalanol	321.1	303.4	-31	1.25
			321.1	259.1	-34	
31	β -玉米赤霉烯醇	β -zearalenol	319.1	275.1	-29	0.5
			319.1	160.1	-40	
32	玉米赤霉酮	Zearalanone	319.1	205.3	-29	0.5
			319.1	233.3	-29	
33	玉米赤霉烯酮	Zearalenone	317.1	174.9	-32	0.5
			317.1	131.2	-38	

*：不同基质、不同仪器的检出限有差异，表中所列检出限仅供参考

2. 对照品溶液的制备

可参考单毒素测定项下对照品溶液的制备方法配制单个真菌毒素对照品的贮备液，通常贮存于零下 20℃ 以下温度的冷冻环境，并定期考察稳定性。根据 ~~不同真菌毒素的理化性质及稳定性试验考察结果，置冰箱冷藏或冷冻保存。~~

混合对照品溶液一般应于临用前配制。

测定时可根据样品实际情况，采用空白基质溶液（即不含待测真菌毒素的同种样品按供试品溶液制备方法制得的溶液）~~进行~~配制对照品溶液。

3. 供试品溶液的制备

不同真菌毒素结构和理化性质各不相同，且污染量属于痕量范围，而中药材基质成分复杂，可能产生明显的基质效应影响筛查方法的准确度与灵敏度。应对提取和净化过程进行深入细致的研究。

提取方法应考虑到总体提取效率及提取溶剂对待测真菌毒素稳定性的影响；净化方法可选用固相萃取或分散固相萃取技术进行，可根据中药基质的特性采用不同净化填料。如可采用适当浓度的乙腈溶液或其他缓冲液体系进行提取，采用

N-丙基乙二胺、石墨碳黑、硅胶和 C₁₈ 等混合填料净化。

4. 内标物质的选择

由于中药基质复杂，不同基质样品提取效率各不相同。必要时可选择同位素内标对基质效应进行校正。同时应对内标物的浓度进行考察。

5. 样品测定与结果判断

参考“单个（类）真菌毒素测定”项下。液相色谱-串联三重四极杆质谱法或液相色谱-串联高分辨质谱法可作为阳性样品互相验证方法。

三、注意事项

采用液相色谱法检测过程中，应尽量在每针进样后以高比例有机相冲洗色谱柱，在色谱柱前加预柱或保护柱，以延长色谱柱寿命。

~~应注意高效~~液相色谱法测定时，出现基质干扰或含量较低难以采用~~高效~~液相色谱法准确测定时，应采用液相色谱-质谱联用法测定。在未检出真菌毒素的情况下，也应注意假阴性情况，结合方法检出限，综合判断，必要情况下应通过灵敏度更高的方法进行检测。

液相色谱-质谱联用方法作为定性确证方法，可采用多种不同原理的质谱作为检测技术，但均应保证结果的准确可靠。

采用液相色谱-质谱联用法检测时，应注意真菌毒素适宜的进样浓度，避免交叉污染或对系统造成残留污染，注意采用空白试剂、空白基质、标准物质等进行过程质量控制。

进行真菌毒素检测时，应注意人员的安全防护，并防止污染环境。

起草单位：上海市食品药品检验研究院

复核单位：山东省食品药品检验研究院、天津市药品检验研究院、浙江清华长三角研究院

主要起草人及联系方式：王少敏，021-38839900-26607，上海市浦东新区张衡路 1500 号，上海市食品药品检验研究院