

QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法 同时测定三七中 26 种真菌毒素

王少敏¹ 杜春晓¹ 刘贤贤¹ 刘冠萍² 毛丹¹ 梁云飞² 黄晓静¹ 朱小凤² 陈钊¹ 季申¹

(1 上海市食品药品检验所, 上海, 201203; 2 广西梧州制药(集团)股份有限公司, 梧州, 543002)

摘要 目的: 采用改良 QuEChERS 前处理技术, 建立了超快速液相色谱-串联质谱(Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, UHPLC-MS/MS) 检测中药三七中 26 种真菌毒素含量的分析方法。方法: 样品用 QuEChERS 方法进行前处理, 经 15% 甲酸乙腈溶液提取, 用混合净化填料净化除杂, 采用基质匹配标准曲线结合同位素内标法进行定量分析。结果: 在低、中、高 3 个添加水平下, 26 种真菌毒素的平均加标回收率为 80.1%~116.2% ($n=5$), 平均回收率范围为 26 种真菌毒素在各自的线性范围内线性关系良好, 相关系数(r^2) ≥ 0.99 , 检出限和定量限分别为 0.05~6.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.2~20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论: 该法简单、快速、实用性强, 适用于三七中 26 种真菌毒素的定量分析。

关键词 QuEChERS; 真菌毒素; 超高效液相色谱-串联质谱法; 三七; 同时测定; 黄曲霉毒素; 赭曲霉毒素; 恩镰孢菌素

Simultaneous Determination of 26 Mycotoxins in Notoginseng Radix et Rhizoma by QuEChERS-

Ultra-High-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

Wang Shaomin¹, Du Chunxiao¹, Liu Xianxian¹, Liu Guanping², Mao Dan¹, Liang Yunfei²,

Huang Xiaojing¹, Zhu Xiaofeng², Chen Ke¹, Ji Shen¹

(1 Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 2 Guangxi Wuzhou

Pharmaceutical (Group) Co., Ltd, Wuzhou 543002, China)

Abstract Objective: To establish a method for the simultaneous determination of 26 kinds of mycotoxins in traditional Chinese medicine Notoginseng Radix et Rhizoma using a QuEChERS pretreatment procedure coupled with ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). **Methods:** The samples were pretreated with QuEChERS method, extracted with 15% formic acid in acetonitrile, purified by mixed absorbents, as well as analyzed by UHPLC-MS/MS. Matrix-matched calibration curves and internal standards were used for accurate quantification. **Results:** Satisfactory recoveries at low, medium and high spiked levels were ranged from 80.1% to 116.2% ($n=5$). Good linear relationships were obtained and the correlation coefficients(r^2) were greater than 0.99. The limits of detection(LODs, $S/N=3$) and quantification(LOQs, $S/N=10$) ranged from 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 6.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and from 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ to 20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. **Conclusion:** The proposed method is simple, rapid and valuable, which can be a powerful tool for quantitative analysis of the 26 mycotoxins in Notoginseng Radix et Rhizoma.

Key Words QuEChERS; Mycotoxins; Ultra-High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; Notoginseng Radix et Rhizoma; Simultaneous Determination; aflatoxins; Ochratoxins; Enniatins

中图分类号: R284.1 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.04.003

近年来, 中药中真菌毒素安全性问题引起了国内外的高度重视。真菌毒素是真菌的有毒代谢产物, 可通过直接摄取、吸入以及皮肤接触进入人体及牲畜体内, 引起严重的慢性毒性, 包括肝、肾毒性、致癌性、致突变性及致畸性等。研究较多且感染范围较广的真菌毒素主要包括黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮、单端孢霉烯族类等^[1-2], 近年来新的真菌毒素种类也在不断被发现, 如恩镰孢菌素类^[3]。

目前单个或单类真菌毒素检测方法较为成熟^[4-5], 主要采用免疫亲和净化前处理方法联合液相色谱或液质联用检测技术。而真菌毒素高通量检测, 由于不同真菌毒素产自不同真菌的代谢途径, 化学结构不同, 理化性质差异大, 且含量低, 通常为 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 级别的痕量检测, 检测难度较大。目前主要采用灵敏度高、专属性强的液质联用技术进行检测, 液相串联三重四级杆质谱(LC-MS/MS)技术可采用多反应监测模式, 通过采集母离子与对应子离子对,

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603292); 科技部重点研发专项(2017YFC1700800); 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-GX-09)

作者简介: 王少敏(1978.06—), 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 中药安全性, E-mail: wangshaomin2008@163.com

通信作者: 季申(1963.08—), 女, 主任药师, 研究方向: 中药质量控制和安全性检测技术研究, E-mail: jishen2013@163.com

有效排除干扰,同时灵敏度高于其他全扫描高分辨质谱,是目前最常用的真菌毒素高通量检测方法。前处理方面主要采用固相萃取柱、分散固相萃取方法进行净化富集,其中 QuEChERS 方法以其多种净化填料组合高效去除多种杂质,且操作简便快速的特点,成为目前应用较多的方法。

目前高通量真菌毒素方法率先在食品领域中研究,研究基质多为食品与饲料^[6-10]。近年来研究发现中药在种植、加工、流通与贮存中均存在感染真菌毒素的风险。但中药基质富含各种次生代谢产物,基质干扰更多,无法直接套用食品方法。三七是一味重要的传统中药,可“散瘀止血,消肿定痛”,既具缩短出血和凝血时间又兼具抗血小板凝聚和溶栓的作用,被临床和日常保健大量应用^[11-12]。但三七种植在温暖潮湿的南方,在种植、贮存及运输中易霉变,为进一步研究三七真菌毒素的安全性,本课题组以三七为基质,利用 QuEChERS 前处理技术^[13]并进行改良,联合液质技术首次建立了三七中 26 种真菌毒素检测方法。可同时检测黄曲霉毒素类、赭曲霉毒素类、伏马毒素类、单端孢霉烯类、青霉素类及恩镰孢菌素类多种真菌毒素,且操作简便,准确,快速、为探索其他中药基质中真菌毒素高通量检测方法提供了借鉴。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪(型号:Nexera X2-LCMS8060,供应商:日本岛津公司);高速离心机(型号:5810R,供应商:德国 Eppendorf 公司);组织粉碎机(型号:Genogrinder 1500,美国 SPEX 公司);氮吹仪(型号:N-EVAPTM-112,供应商:美国 Organomation 公司);分析天平(型号:Statomarius CP225D,供应商:美国梅特勒-托利多仪器有限公司);Milli-Q 纯水仪(型号:Milli-Q,供应商:美国密理博公司),VA22MFD 超声仪(型号:VA22MFD,德国 WIGGENS 公司)。

1.2 试剂 甲醇、乙腈、甲酸、甲酸铵、醋酸铵(色谱纯,购于德国 Merck 公司);无水硫酸镁、氯化钠(分析纯,购于上海凌峰化学试剂有限公司),C18、GCB、PSA 净化填料均购于天津博纳艾杰尔公司;真菌毒素标准品、同位素内标¹³C₁₅-脱氧雪腐镰刀菌烯醇(1 mg/L)、¹³C₁₈-玉米赤霉酮(1 mg/L)(纯度均大于 98%,均购于美国 Sigma 公司)。

1.3 分析样品 实验用三七样品分别取自广西省百色市、云南省红河自治州石屏县三七种植基地各 18 批,依次编号为广西 01,广西 02……广西 18,云

南 01、云南 02……云南 18。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS 色谱质谱条件 色谱条件:采用粒径为 2.7 μm 的安捷伦 Poroshell 120 EC-C₁₈ 的色谱柱(规格:150 mm×3.0 mm);采用正负离子 2 种采集模式。正离子模式:流动性 A 相为甲醇, B 相为 0.5% 甲酸-2 mmol/L 甲酸铵水溶液,梯度洗脱条件:0~2 min:20% A,2~15 min:20% A~100% A;15~18 min:100% A;负离子模式:A 相为乙腈, B 相为水,梯度洗脱条件:0~2 min:10% A,2~15 min:10% B~100% A。流速 0.45 mL/min,进样量:5 μL。

质谱条件:ESI 源,多反应监测模式(MRM),正、负 2 种模式进行扫描,相关参数为:离子源接口温度:300 ℃,接口电压:4 000 V,雾化气流速:3.0 L/min;干燥气流量:10.0 L/min,加热气流量:10.0 L/min;26 种毒素的质谱参数见表 1,总离子流图见图 1。

表 1 26 种真菌毒素质谱参数

真菌毒素	母离子	定量离子	碰撞电压 (eV)	定性离子	碰撞电压 (eV)
黄曲霉毒素 B ₁ (AFB ₁)	313.0	241.0	-38	285.1	-25
黄曲霉毒素 B ₂ (AFB ₂)	315.1	287.1	-35	259.1	-40
黄曲霉毒素 G ₁ (AFG ₁)	329.1	243.1	-35	215.1	-35
黄曲霉毒素 G ₂ (AFG ₂)	331.1	245.1	-40	313.1	-33
黄曲霉毒素 M ₁ (AFM ₁)	329.1	273.1	-25	259.2	-25
黄曲霉毒素 M ₂ (AFM ₂)	331.1	273.1	-23	259.3	-23
赭曲霉毒素 A (OTA)	404.1	239.0	-23	102.1	-66
赭曲霉毒素 B (OTB)	370.0	205.0	-22	103.0	-14
赭曲霉毒素 C (OTC)	432.1	239.1	-28	358.0	-18
伏马毒素 B ₁ (FB ₁)	722.4	334.3	-41	352.3	-37
伏马毒素 B ₂ (FB ₂)	706.4	336.3	-37	318.3	-39
伏马毒素 B ₃ (FB ₃)	706.6	336.3	-36	688.5	-30
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)	297.1	249.1	-12	231.1	-14
T-2 毒素 (T2)	484.3	305.1	-16	245.1	-16
HT-2 毒素 (HT-2)	442.2	263.1	-18	215.3	-16
恩镰孢菌素 A (ENNA)	699.5	210.2	-20	228.2	-20
恩镰孢菌素 A ₁ (ENNA ₁)	685.5	210.2	-30	228.2	-32
恩镰孢菌素 B (ENNB)	657.3	196.1	-30	214.2	-32
恩镰孢菌素 B ₁ (ENNB ₁)	671.5	196.1	-32	210.1	-30
桔青霉素 (CIT)	251.2	233.1	-17	205.1	-26
¹³ C ₁₅ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (¹³ C ₁₅ -DON)	312.2	263.1	-14	216.3	-18
玉米赤霉酮 (ZAN)	319.1	205.3	24	275.1	22
玉米赤霉烯酮 (ZEN)	317.1	174.9	20	130.8	29
α-玉米赤霉醇 (α-ZAL)	321.1	277.1	23	303.4	21
α-玉米赤霉烯醇 (α-ZEL)	319.1	173.8	27	275.1	22
β-玉米赤霉醇 (β-ZAL)	321.1	303.4	22	277.1	22
β-玉米赤霉烯醇 (β-ZEL)	319.1	275.1	22	160.1	32
¹³ C ₁₈ -玉米赤霉烯酮 (¹³ C ₁₈ -ZEN)	335.1	290.4	19	185.1	25

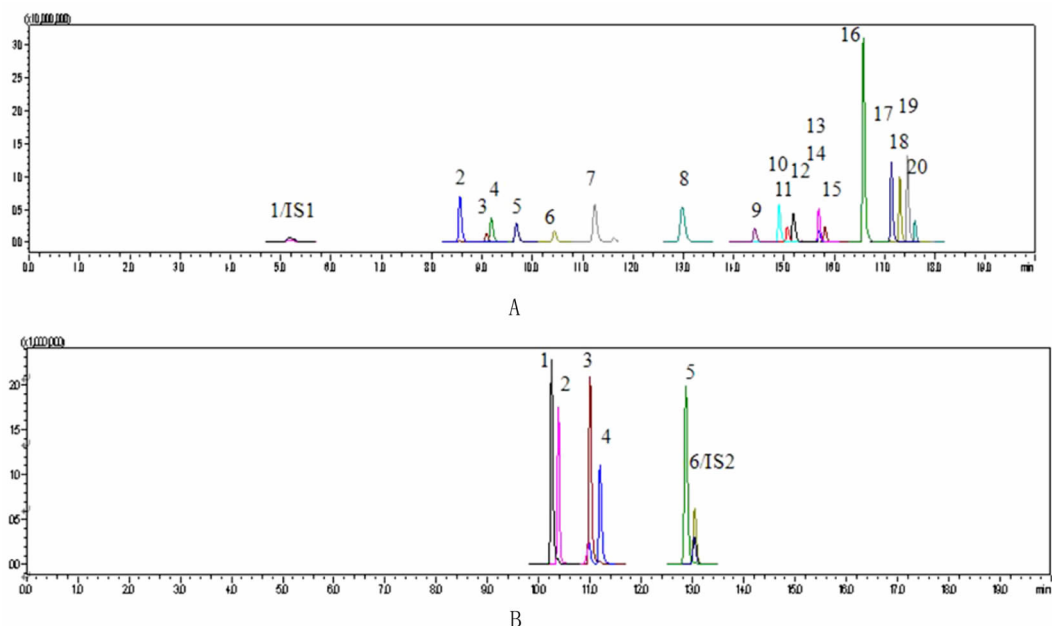


图1 26种真菌毒素和2种同位素内标的总离子流图

注:A. 正离子模式总离子流图,出峰顺序:1. DON, IS1. $^{13}\text{C}_{15}$ -DON, 2. AFM₂, 3. AFG₂, 4. AFM₁, 5. AFG₁, 6. AFB₂, 7. AFB₁, 8. CIT, 9. HT-2, 10. FB₁, 11. OTB, 12. T-2, 13. FB₃, 14. FB₂, 15. OTA, 16. OTC, 17. ENNB, 8. ENNB₁, 19. ENNA, 20. ENNA₁; B. 负离子模式总离子流图,出峰顺序: 1. β -ZAL, 2. β -ZEL, 3. α -ZAL, 4. α -ZEL, 5. ZAN, 6. ZEN, IS2. $^{13}\text{C}_{18}$ -ZEN

2.2 对照品溶液的制备 取26种真菌毒素标准品,分别用乙腈稀释成浓度为每1 L含100 mg的单个标准贮备液,再用乙腈配制成每1 L含1 mg的混合标准工作液。再取 $^{13}\text{C}_{15}$ -脱氧雪腐镰刀菌烯醇、 $^{13}\text{C}_{18}$ -玉米赤霉酮2种同位素内标标准品,用乙腈配制成质量浓度为每1 L含20 μg 的混合内标标准工作液。

2.3 供试品溶液的制备 称取三七粉末(过三号筛)约2 g,置50 mL离心管中,加入10 μL 混合内标溶液,放置1 h待内标溶液挥干,加水15 mL放置5 min,加15%甲酸乙腈溶液10 mL匀浆2 min,加硫酸镁氯化钠混合盐包5 g(4:1),震荡30 min,离心,吸取上清液6 mL至离心管中,加入1.5 g混合净化填料(GCB: PSA: C18: $\text{MgSO}_4 = 30: 150: 300: 900$),剧烈振摇5 min,离心,取上清液2 mL于40 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹至约近干,加入20%甲醇溶液稀释至1 mL,涡旋混匀,过0.22 μm 微孔滤膜,取续滤液,即得。

2.4 专属性考察 取经预先测定,不含上述真菌毒素的三七样品,按照“2.3”项下操作,制备空白供试品溶液;同时在样品中添加“2.2”项下的混合标准工作溶液,按照“2.3”项下操作,制备加标供试品溶液。试验结果表明,样品中其他成分不干扰测定。

2.5 线性关系考察 取真菌毒素未污染的三七样品,按供试品前处理方式制备空白基质溶液,将适量

的26种真菌毒素标准贮备液和10 μL 混合内标工作液混合,配制不同线性范围的系列空白基质标准溶液,建立了26种真菌毒素的标准曲线,结果见表2。26种真菌毒素在线性范围内线性关系良好,相关系数(r^2)均 ≥ 0.99 。以定性通道的3倍信噪比(S/N)确定化合物的检出限(LOD)、定量通道的10倍信噪比确定化合物的定量限(LOQ),检出限和定量限分别为0.05~6.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和0.2~20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.6 中间精密度试验 精密吸取混合对照品溶液5 μL ,连续进样6次,记录峰面积及,结果各真菌毒素的峰面积相对标准偏差(Relative Standard Deviation, RSD)均小于2%,表明仪器精密度良好。

2.7 供试品稳定性试验 精密量取同一份添加浓度为25倍定量限的加样回收试验供试品溶液,分别在0、6、12、18、24 h进样,测定峰面积, RSD均小于4.1%。试验结果表明,供试品溶液在24 h内稳定。

2.8 重复性实验 采用加样方法进行重复性试验,按“2.8”项下制备添加浓度为20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的瓜蒌皮和提取物供试品溶液,一式6份,进样分析,26种真菌毒素的重复性结果(日内精密度)见表3。

2.9 回收率实验 取各真菌毒素贮备液配制成混标(混标浓度根据26种毒素的定量限扩大25倍进行配制),分别以1倍、5倍和25倍定量限作为添加浓度进行回收实验,分别在一天和连续的5 d进行

回收实验,26 种生物毒素的平均回收率范围为 80.1% ~ 116.2%,RSD 范围为 0.2% ~ 6.6%。见表 3。

2.10 样品测定结果 采用建立的 UHPLC-MS/MS 方法对 36 份三七样品进行分析,样品测定结果见表 4。

表 2 26 种真菌毒素线性范围、相关系数、检出限及定量限

真菌毒素	线性范围(μg/L)	基质校正曲线	r ²	检测限(μg/kg)	定量限(μg/kg)
AFB ₁	0.25 ~ 125	y = 30.352 7x + 1.332 3	0.997	0.05	0.2
AFB ₂	0.25 ~ 125	y = 9.899 7x + 0.910 3	0.997	0.05	0.2
AFG ₁	0.25 ~ 125	y = 13.683 6x + 1.039 2	0.998	0.05	0.2
AFG ₂	0.25 ~ 125	y = 6.464 8x + 0.833 1	0.999	0.05	0.2
AFM ₁	0.25 ~ 125	y = 31.492 3x + 3.470 2	0.997	0.25	0.8
AFM ₂	2.5 ~ 625	y = 10.956 0x + 5.918 5	0.997	0.5	1.6
OTA	0.25 ~ 125	y = 12.827 7x - 0.709 93	0.998	0.05	0.2
OTB	0.25 ~ 125	y = 13.987 9x + 0.593 1	0.996	0.05	0.2
OTC	1.25 ~ 625	y = 6.182 1x - 8.034 5	0.995	0.05	0.2
FB ₁	6.25 ~ 3 125	y = 2.289 8x + 7.271 2	0.991	0.3	1.0
FB ₂	6.25 ~ 3 125	y = 2.272 2x + 1.464 3	0.997	0.3	1.0
FB ₃	1.25 ~ 625	y = 3.613 8x + 2.716 9	0.991	0.3	1.0
DON	6.25 ~ 3 125	y = 0.726 9x + 1.059 1	0.993	5.0	12.5
T2	1.25 ~ 625	y = 2.281 8x + 1.630 6	0.999	0.6	2.0
HT-2	6.25 ~ 3 125	y = 0.469 7x + 1.294 9	0.998	6.25	20.0
ENN A	0.25 ~ 125	y = 1.484 57x + 5.169 0	0.999	0.05	0.2
ENN A ₁	0.25 ~ 125	y = 1.435 89x + 6.309 4	0.996	0.05	0.2
ENN B	0.25 ~ 125	y = 0.720 6x + 6.287 61	0.996	0.05	0.2
ENN B ₁	0.25 ~ 125	y = 1.030 5x + 6.940 1	0.995	0.05	0.2
CIT	0.25 ~ 125	y = 0.790 6x - 0.439 4	0.993	0.25	0.8
ZAN	0.25 ~ 125	y = 3.460 4x - 1.787 4	0.999	0.25	0.8
ZEN	0.25 ~ 125	y = 0.776 2x + 3.653 81	0.998	0.05	0.2
α-ZAL	1.25 ~ 125	y = 3.373 3.6x + 3.640 4	0.999	1.25	4.0
α-ZEL	0.25 ~ 125	y = 2.382 1x + 0.129 1	0.999	0.25	1.0
β-ZAL	2.5 ~ 125	y = 4.824 0x + 3.809 4	0.998	1.25	4.0
β-ZEL	0.25 ~ 125	y = 0.757 9x + 0.881 3	0.997	0.25	0.8

表 3 26 种真菌毒素精密度的、回收率和稳定性(n = 6)

真菌毒素	日内精密度(回收率(%)/RSDi)			日间精密度(回收率(%)/RSDr)		
	低	中	高	低	中	高
AFB ₁	98.4/0.2	100.7/2.8	105.9/3.7	93.5/5.1	100.7/2.1	104.5/4.0
AFB ₂	97.9/4.1	103.7/3.2	104.9/2.7	96.8/3.7	101.1/4.7	103.2/2.8
AFG ₁	87.3/2.3	104.1/4.7	103.5/3.8	88.1/1.9	100.6/5.3	101.8/3.2
AFG ₂	92.4/1.3	106.5/0.8	100.0/4.0	92.9/5.0	101.6/3.2	97.9/6.0
AFM ₁	98.5/2.7	101.9/0.9	102.1/1.6	95.6/3.6	97.6/2.0	100.5/2.4
AFM ₂	89.3/2.6	101.7/3.2	102.5/2.8	89.6/3.9	100.6/2.9	101.6/3.2
OTA	94.5/1.6	108.6/2.1	115.8/5.0	92.0/4.9	100.0/5.6	110.0/4.9
OTB	100.3/3.6	100.1/3.9	106.7/0.7	96.3/4.3	98.1/3.3	100.5/5.7
OTC	99.9/0.3	101.2/5.2	110.0/2.7	99.0/3.7	97.6/4.7	107.2/4.4
FB ₁	84.2/4.4	89.2/3.1	82.8/1.1	85.2/6.3	81.2/2.7	81.9/3.6
FB ₂	83.5/4.4	89.5/2.3	81.1/1.3	83.7/6.0	86.4/4.4	83.3/4.9
FB ₃	89.3/3.9	84.5/3.9	83.3/4.1	84.0/4.9	81.0/4.0	80.6/4.3
DON	100.3/1.5	99.6/2.1	101.3/1.9	96.8/2.2	99.6/3.1	99.1/1.9
T2	105.1/2.6	101.3/1.5	102.4/5.3	104.7/4.5	91.4/4.9	97.9/6.0
HT-2	105.2/0.8	100.5/2.4	112.8/2.0	102.0/2.1	96.6/5.1	106.4/3.1
ENN A	104.2/2.9	98.5/1.7	113.7/2.1	100.9/4.7	95.9/3.2	109.7/5.3
ENN A ₁	102.0/3.5	99.0/1.4	110.3/5.0	102.3/4.3	95.5/4.3	107.6/6.6
ENN B	92.9/4.7	97.8/2.1	91.3/2.6	87.7/5.3	95.8/3.8	98.1/5.3
ENN B ₁	100.7/2.6	95.2/1.7	86.0/4.5	94.9/4.8	91.7/2.0	96.4/5.4

续表 3 26 种真菌毒素精密度的回收率和稳定性 (n=6)

真菌毒素	日内精密度(回收率(%))/RSDi			日间精密度(回收率(%))/RSDr		
	低	中	高	低	中	高
CIT	116.2/5.0	108.3/4.9	105.3/4.0	106.4/5.3	105.3/4.3	100.4/5.7
ZAN	95.0/2.2	99.3/0.9	101.3/1.6	100.7/3.2	96.8/2.0	100.3/3.4
ZEN	105.8/2.9	104.6/2.7	97.8/3.9	103.3/4.2	102.9/2.8	102.1/5.0
α-ZAL	104.5/3.6	107.0/4.9	102.9/1.7	103.2/4.6	100.2/4.7	109.2/2.8
α-ZEL	84.4/4.7	97.7/20.4	104.4/4.3	82.0/5.0	100.2/4.2	101.0/3.2
β-ZAL	86.8/2.6	92.8/3.2	109.5/2.9	85.0/4.3	94.7/3.3	103.8/3.9
β-ZEL	100.8/5.1	109.1/0.4	110.9/3.2	100.8/4.9	104.8/3.5	98.4/2.8

表 4 三七样品检测结果

编号	检出真菌毒素	编号	检出真菌毒素	编号	检出真菌毒素	编号	检出真菌毒素
广西 01	-	广西 10	-	云南 01	-	云南 10	-
广西 02	-	广西 11	恩镰孢菌素 B ₁ :1.1 μg/kg	云南 02	-	云南 11	-
广西 03	-	广西 12	-	云南 03	恩镰孢菌素 B ₁ :0.9 μg/kg	云南 12	-
广西 04	-	广西 13	-	云南 04	-	云南 13	-
广西 05	-	广西 14	-	云南 05	-	云南 14	-
广西 06	-	广西 15	-	云南 06	-	云南 15	-
广西 07	-	广西 16	-	云南 07	-	云南 16	-
广西 08	-	广西 17	-	云南 08	-	云南 17	伏马菌素 B ₂ :1.2 μg/kg
广西 09	-	广西 18	-	云南 09	-	云南 18	-

注:“-”为未检出

3 讨论

3.1 检测真菌毒素种类的选择 目标真菌毒素均为毒性大,食品和饲料中污染面广,关注度高的真菌毒素。黄曲霉类毒素是目前发现的毒性最强的一类真菌毒素,具有强烈的致癌性,不仅造成严重的肝损伤,引发肝癌以外,也被发现会诱导肾癌、胰腺癌和结肠癌的产生^[15]。赭曲霉类毒素具有多种慢性毒性,如致癌性、生长生殖毒性、神经毒性及免疫毒性等^[16]。玉米赤霉烯酮类毒素最主要的毒性是生长生殖毒性,长期大剂量下摄入会致癌,并具有相对突出的免疫毒性^[17]。同样,T-2 毒素、HT-2 毒素、伏马类毒素和脱氧雪腐镰刀菌烯醇都是受到广泛关注的真菌毒素^[18-20],粮谷中污染情况严重,国内外食品、药品法规都相继增加了相应的标准限度。桔青霉素急性毒性属于高毒^[21],恩镰孢菌素为近年来研究热点,饲料中普遍检出^[2]。

3.2 色谱和质谱条件的优化 目标真菌毒素种类不同,理化性质差异较大,三七基质干扰不同。通过对每种真菌毒素通过质谱全扫描确定了采集模式,并通过比较 2 种模式下基质干扰情况,确定 6 种玉米赤霉烯酮类真菌毒素在负模式下采集,其他 20 种真菌毒素均在正离子模式下采集。

流动相系统比较了甲醇和乙腈 2 种有机相系统,结果显示正离子模式下,甲醇系统中的基质干扰分离度优于乙腈系统,最终选择甲醇作为正离子扫

描模式流动相。为了改善离子化效率,提高分析灵敏度,比较了甲酸、乙酸、甲酸铵和乙酸铵等改性剂,结果乙酸和乙酸铵表现不如甲酸和甲酸铵,而甲酸铵在较高浓度下(5 mmol/L)出现抑制离子化效率的现象。经试验,在添加 0.5% 甲酸和 2 mmol/L 甲酸铵的情况下,甲酸用于提高电喷雾正模式下部分真菌毒素的离子化效率,添加甲酸铵可以改善峰形,抑制质谱电离中[M+K]⁺和[M+Na]⁺峰,获得了最好的分离效果。在负离子模式下,采用乙腈流动相能改善峰形,在保证满意的分离度前提下,缩短洗脱时间。最终,正离子模式下选择 0.5% 甲酸,2 mmol/L 甲酸铵水溶液及甲醇溶液作为流动相;负离子模式下,选择水和乙腈作为流动相。

由于三七基质中存在较多皂苷类等大极性的干扰物质,梯度洗脱中先采用较大比例的水进行杂质干扰的去除,同时为保护质谱进样环境,进样前 2 分钟采用废液切换模式。

3.3 前处理条件优化

由于为痕量分析且同时分析多种不同种类的真菌毒素,需要完全提取真菌毒素同时尽量减少基质干扰,以达到准确分析的目的,需对前处理过程中的提取效率、净化干扰杂质进行重点优化。QuEChERS 方法是一种新型的通用型前处理方法,2003 年发表运用在多种农药残留检测前处理方法,该方法具有快速、简便、廉价、有效、耐用、安全以及回收率

高的优点,可作为高通量真菌毒素检测的前处理方法^[22-24]。对提取和净化操作中的提取方式、提取溶剂、净化填料的组合和配比进行改良和优化。

3.3.1 提取方式 常规提取方式有超声提取法、液液萃取法及震荡提取法等,由于真菌毒素污染可同时出现在药材表面与内部,研究中采用了匀浆法提取,可快速达到完全提取的目的。

3.3.2 提取溶剂优化 比较了乙腈和甲醇 2 种通用型提取溶剂,甲醇相对于乙腈具有较好的溶解度,而乙腈具有更好的选择性,可以避免提取更多脂肪、色素等杂质,且乙腈的提取效率更好,因采用乙腈作为提取溶剂。

待测真菌毒素中伏马菌素类、桔青霉素、赭曲霉毒素类等毒素具有羧基集团,水剪性强,对酸敏感性。常规乙腈水系统提取条件下,上述真菌毒素的回收率低于 10%。故提取溶剂采用加入甲酸的方式,提高其稳定性,增加提取效率。通过对加入甲酸的浓度进行了考察,结果显示随着乙腈溶剂中甲酸浓度的提高,能够使赭曲霉毒素 A、赭曲霉毒素 B 和伏马菌素回收率逐渐上升,说明提取溶剂酸度对于酸敏感性毒素的提取效率影响大,经研究,发现 15% 甲酸乙腈为最合适比例,各毒素的回收率均达到 80% 以上。

3.3.3 净化填料优化 QuEChERS 法常用净化填料包括:十八烷基硅烷键合硅胶(C18)、N-丙基乙二胺(PSA)、石墨化碳碳黑(GCB)和中性氧化铝等。考察中发现中性氧化铝对改善回收率无明显影响。根据三七基质特点,本次研究中选择 PSA、GCB、MgSO₄、C₁₈作为净化材料。经试验,GCB 虽有助于除去较多的色素,但其特殊的平面结构对玉米赤霉烯酮类毒素回收率影响大,故减小其使用量。考察发现 C₁₈量不足或者过量时,HT-2、OTA 及 OTB 的回收率为 30%~60%;而 PSA 有助于除去脂肪酸等杂质,但过多 PSA 会对 FB₁、FB₂ 以及 FB₃ 的回收率有一定的影响,确定 PSA 的最佳使用量均为 150 mg,最终优化得到的填料配比为:GCB 30 mg,PSA150 mg,C18 300 mg,MgSO₄ 900 mg 时,各真菌回收率均达到 80% 以上。

3.3 回收率与精密度 目标真菌毒素回收全部满足 80%~120%,相对偏低的主要为伏马菌素类,在中、高浓度下的回收率相比低浓度下偏低,但仍达到 80% 以上。

3.4 基质效应 对样品的基质效应进行了考察:比较真菌毒素的基质校正标准曲线的斜率与纯溶剂配

制的混合标准曲线的斜率,基质效应(%)=[(基质校正标准曲线斜率/混合标准曲线的斜率)-1]×100%。结果显示大部分真菌毒素为基质抑制效应,少数真菌毒素如伏马菌素类呈现基质增强效应。部分毒素的基质效应可达 50%~80%。说明基质干扰明显,主要是 QuEChERS 前处理为通用型前处理,虽能将目标真菌毒素全部提取,但同时提取的干扰物也非常多,尽管采用了混合填料净化,但因为真菌毒素含量低,基质干扰仍较为明显,因此必须采用基质校正标准曲线进行准确定量。

伏马菌素类基质增强效应的原因可能是与真菌毒素共流出物中含有质子供体化合物,使得该类毒素均为基质增强效应。

3.5 三七检测结果分析 2 个省份种植基地生产的 36 批三七样品中仅有 3 批样品分别检出恩镰孢菌素 B、B₁ 和伏马菌素 B₂,且检出量均较低,约为 1 μg/kg。美国 2001 年颁布的《工业指南:人类食物和动物饲料中伏马菌素限值》规定玉米粉中伏马菌素的限度为 2 000 μg/kg,欧盟颁布的食品中真菌毒素限量标准(EC)No. 1881/2006 中规定伏马菌素的限度为 1 000 μg/kg。与该限度比较,三七中检出的伏马菌素 B₂ 远远低于参考限度。

有关恩镰孢菌素 B、B₁ 的毒性研究目前尚不成熟,目前研究发现是恩镰孢菌素具有细胞毒性;但需要但同时也发现恩镰孢菌素具有杀菌抗炎的功效,一定程度上属于抗菌素和抗生素^[25-27]。体外细胞实验表明 ENNB 体外对肝细胞毒性大^[29-30],但仍需进一步体内实验的验证。因此目前尚不能说明三七检出恩镰孢菌素 B、B₁ 是否具有一定的风险。待将来恩镰孢菌素毒性研究深入后再进一步评价。

本次研究采用改良 QuEChERS 前处理技术,建立了 UHPLC-MS/MS 同时检测三七中 26 种真菌毒素的方法。可快速完成中药三七中 26 种常见真菌毒素的定性和定量分析,具有操作简单、实用性强的特点,也为其他中药基质中多种真菌毒素含量的同时检测提供技术借鉴。

参考文献

- [1] 黄晓静,王少敏,毛丹,等.曲霉属真菌毒素的毒性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(5):1679-1687.
- [2] 黄晓静,王少敏,毛丹,等.镰刀菌属真菌毒素的毒性研究进展[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3117-3128.
- [3] Chain EPoCitF. Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed[J]. EFSA J,2014,12(8):3802-3975.
- [4] Turner N W, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, et al. Analytical meth-

- ods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014) [J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 901: 12-33.
- [5] 王少敏, 张甦, 陈洁, 等. UHPLC-MS/MS 测定中药材中 4 种黄曲霉毒素[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(2): 190-193.
- [6] Jia W, Chu X, Ling Y et al. Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry[J]. *J. Chromatogr. A*, 2014, 1345: 107-114.
- [7] Pizzutti IR, de Kok A, Scholten J. Development, optimization and validation of a multimethod for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2014, 129: 352-363.
- [8] 范志辰, 韩铮, 郭文博, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定不同饲料中 30 种真菌毒素[J]. *色谱*, 2017, 35(6): 627-633.
- [9] 林涛, 邵金良, 陈兴连, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定农产品中 14 种真菌类生物毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(7): 3277-3244.
- [10] 张海霞, 杨静, 刘畅, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法快速检测玉米中 7 种真菌毒素[J]. *黑龙江农业科学*, 2017, 40(7): 61-65.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 1 部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [12] 宋山峰, 韩文朝, 王晓冰, 等. 三七活血止血作用临床应用研究进展[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(31): 147-148.
- [13] 刘远晓, 关二旗, 卞科, 等. QuEChERS 法在食品有机污染物检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2017, 38(19): 294-300.
- [14] 陈建彪, 董丽娜, 刘娇, 等. QuEChERS 在食品中真菌毒素检测的研究进展[J]. *食品科学*, 2014, 35(11): 286-291.
- [15] Bhat R, Rai RV, Karim AA. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2010, 9(1): 57-81.
- [16] Heussner AH, Bingle LE. Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data[J]. *Toxins*, 2015, 7(10): 4253-4282.
- [17] Metzler M, Pfeiffer E, Hildebrand AA, et al. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2010, 3(3): 385-401.
- [18] EFSA. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed[J]. *EFSA J*, 2011, 9(12): 2481-2667.
- [19] EFSA. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed[J]. *EFSA J*, 2004, 2(6): 1-43.
- [20] Escrivá L, Font G, Manyes L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: a review[J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 78: 185-206.
- [21] Chain EPoCitF. Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed[J]. *EFSA J*, 2012, 10(3): 2605-2686.
- [22] 范妙璇, 董娇娇, 王京辉, 等. QuEChERS-超高效液相-三重四极杆串联质谱测定白茅根中 16 种真菌毒素[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(19): 3770-3775.
- [23] Zhang S, Lu J, Wang S, et al. Multi-mycotoxins analysis in Pheretima using ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry based on a modified QuEChERS method[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1035: 31-41.
- [24] Huang X, Wang S, Mao D, et al. Optimized QuEChERS Method Combined with UHPLC-MS/MS for the Simultaneous Determination of 15 Mycotoxins in Liquorice[J]. *J AOAC Int*, 2018. 101, 1-10.
- [25] Behm C, Degen GH, Föllmann W. The Fusarium toxin enniatin B exerts no genotoxic activity, but pronounced cytotoxicity in vitro[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(4): 423-430.
- [26] Jonsson M, Jestoi M, Anthoni M, et al. Fusarium mycotoxin enniatin B: Cytotoxic effects and changes in gene expression profile[J]. *Toxicol in Vitro*, 2016, 34: 309-20.
- [27] Svingen T, Lund Hansen N, Taxvig C, et al. Enniatin B and beauvericin are common in Danish cereals and show high hepatotoxicity on a high-content imaging platform[J]. *Environ Toxicol*, 2016.
- [28] German-Fattal DM. Fusafungine, an Antimicrobial with Anti-Inflammatory Properties in Respiratory Tract Infections[J]. *Clin Drug Invest*, 2001, 21(9): 653-670.
- [29] Juan C, Manyes L, Font G, et al. Evaluation of immunologic effect of Enniatin A and quantitative determination in feces, urine and serum on treated Wistar rats[J]. *Toxicon*, 2014, 87(1): 45-53.
- [30] Fichoux AS, Sibiril Y, Parent-Massin D, et al. In vitro myelotoxicity and early immunotoxicity of emerging mycotoxins beauvericin, enniatin b and moniliformin in human[J]. *Fuel & Energy Abstracts*, 2011, 205(205): S176-S177.

(2019-03-10 收稿 责任编辑: 徐颖)