

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.03.021

# 高效液相色谱串联质谱法同时测定红曲米中 10 种真菌毒素含量

朱伟堃,井改革,赵蕊蕊,毕天琛,赵丹彤,王素香,刘延娟

(山东省菏泽市食品药品检验检测研究院,山东 菏泽 274000)

**摘要:**目的 建立同时测定红曲米中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 G1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素 G2、伏马毒素 B1、伏马毒素 B2、T-2 毒素、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮 10 种真菌毒素含量的高效液相色谱串联质谱法。方法 样品中依次加入含 1% 乙酸的 80% 乙腈溶液、80% 甲醇溶液,剧烈振荡提取,采用固相萃取柱净化富集;色谱柱为 Acquity UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.1 mm, 1.8 μm),流动相 A 为 0.01% 甲酸,流动相 B 为含 0.1% 甲酸的乙腈-甲醇(1:1, V/V)溶液(梯度洗脱),柱温为 40℃,流速为 0.3 mL/min,进样量为 10 μL;采用电喷雾离子源、多反应监测及正负离子模式扫描。结果 10 种真菌毒素在各自线性范围内关系均良好( $r>0.990$ );检测限为 0.05~2.67 μg/kg,定量限为 0.16~8.00 μg/kg;低、中、高浓度样品加样回收溶液的平均加样回收率为 67.35%~104.76%,RSD 为 1.44%~5.64%( $n=9$ )。结论 该方法操作简便快捷、可操作性强,适用于红曲米中 10 种真菌毒素的含量测定。

**关键词:**红曲米;真菌毒素;高效液相色谱串联质谱法;含量测定

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2023)03-0089-05

## Simultaneous Determination of 10 Mycotoxins in Semen Oryzae Cum Monasco by HPLC-MS/MS

ZHU Weikun, JING Gaige, ZHAO Ruirui, BI Tianchen, ZHAO Dantong, WANG Suxiang, LIU Yanjuan

(Heze Institute for Food and Drug Control, Heze, Shandong, China 274000)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of aflatoxin B1 (AFB1), aflatoxin G1 (AFG1), aflatoxin B2 (AFB2), aflatoxin G2 (AFG2), fumonisin B1 (FB1), fumonisin B2 (FB2), T-2 toxin (T-2), vomitoxin (DON), ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEN) in Semen Oryzae Cum Monasco. **Methods** The 80% acetonitrile solution (containing 1% acetic acid) and 80% methanol solution were added into the sample in turn, then the solution was shaken violently to extract, and the concentrated liquid supernatant was purified by the solid-phase extraction column. The chromatographic column was Acquity UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> column (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm), the mobile phase A was 0.01% formic acid, the mobile phase B was acetonitrile containing 0.1% formic acid-methanol solution (1:1, V/V), with gradient elution, the column temperature was 40℃, the flow rate was 0.3 mL/min, and the injection volume was 10 μL. The samples were detected by the electrospray ionization in the positive/negative ion modes and the multiple reaction monitoring mode. **Results** The above 10 mycotoxins had a good linear relationship with the peak area within their respective mass concentration range ( $r>0.990$ ). The limit of detection (LOD) of the above 10 mycotoxins was in the range of 0.05~2.67 μg/kg, their limit of quantitation (LOQ) was in the range of 0.16~8.00 μg/kg. The average recovery of the above 10 mycotoxins in the low-, medium- and high-concentration sample solution was in the range of 64.35%~104.76%, with the RSDs of 1.44%~5.64% ( $n=9$ ). **Conclusion** The method is simple, rapid and operable, which is suitable for the determination of 10 mycotoxins in Semen Oryzae Cum Monasco.

**Key words:** Semen Oryzae Cum Monasco; mycotoxins; HPLC-MS/MS; content determination

红曲米又名赤曲、红米、福米等,是我国传统药食两用的代表中药<sup>[1]</sup>。红曲米是以蒸至半熟的粳米为原

料,接种曲霉科真菌紫色红曲霉 *Monascus purpureus* Went. 等菌种,经发酵而成<sup>[2]</sup>。研究表明,红曲米发酵过

第一作者:朱伟堃,女,硕士研究生,主管中药师,研究方向为药品质量控制,(电子信箱)450836450@qq.com。

42(8):783-786.  
[10] 李永贵,冷佳蔚,张锡霞,等. HPLC 法同时测定眼内灌注液中醋酸钠与枸橼酸钠的含量[J]. 药学研究,2016,35(6):331-333.  
[11] 东洁,张寅生,郭正光,等. 液相色谱-质谱串联技术在尿液枸橼酸含量测定中的应用[J]. 中华医学杂志,2017,97(44):3471-3474.  
[12] 樊蓉,张纯,关皓月,等. HPLC 测定封管用枸橼酸钠注射液 中枸橼酸盐的含量[J]. 药学实践杂志,2008,26(5):

354-356.  
[13] 张悦杨,程智,石玲子. 输血用枸橼酸钠注射液 3 种含量测定方法的比较[J]. 华西药学杂志,2018,33(4):417-420.  
[14] 周庆武,纪标,李玲玲,等. 高效液相色谱法测定无菌溶液剂 A 中总枸橼酸盐含量[J]. 中国药业,2007,16(13):22-23.  
[15] 吴蓉,范胜莲. 高效液相色谱法测定山楂药材和小儿麦枣咀嚼片中枸橼酸盐含量[J]. 中国药业,2019,28(20):20-23.  
(收稿日期:2022-04-12;修回日期:2022-09-15)

程中会产生莫纳可林类(如洛伐他汀等)、甾醇类、红曲色素等多种代谢产物,这些代谢产物具有预防心血管疾病、抗肿瘤、调脂等药理活性<sup>[3-5]</sup>,广泛应用于医药、发酵食品、食品添加剂等领域。红曲米作为富含淀粉的发酵类谷物,红曲米的原料、发酵过程、贮存运输过程等均面临着被真菌毒素污染的风险。粮谷类<sup>[6-7]</sup>及淀粉基质的中药材及其炮制品<sup>[8-9]</sup>中黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、呕吐毒素(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)、伏马毒素、T-2毒素(T-2)等真菌毒素易超出限量标准。通风干燥的条件下,薏苡仁中黄曲霉毒素B1(AFB1)和黄曲霉毒素B2(AFB2)含量会大幅增加;高温高湿及通风干燥的条件下,薏苡仁中ZEN含量迅速增加<sup>[10]</sup>。真菌毒素具有较强致癌、致畸及肝肾毒性<sup>[11-12]</sup>,有必要建立高效、准确的检测方法以筛查红曲米中的真菌毒素,确保食用和药用安全。目前,对红曲米中真菌毒素的研究较少,且多集中于桔霉素和赭曲霉毒素等<sup>[1,13]</sup>。2020年版《中国药典(四部)》中列出了真菌毒素单独或联合测定的分析方法<sup>[8]</sup>。但中药基质复杂,不同基质样品会导致其分析方法不同<sup>[14]</sup>。参考《中国药典(四部)》方法<sup>[8]</sup>,本研究中采用固相萃取柱净化,建立了同时测定红曲米中 AFB1, AFB2, T-2, DON, ZEN 及黄曲霉毒素 G1 (AFG1)、黄曲霉毒素 G2 (AFG2)、伏马毒素 B1 (FB1)、伏马毒素 B2 (FB2)、赭曲霉毒素 A (OTA) 10 种真菌毒素含量的高效液相色谱谱串联质谱(HPLC-MS/MS)法,为红曲米中真菌毒素的检测提供了参考。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

20AD 型高效液相色谱仪(日本岛津公司), API4000 型电喷雾三重四极杆质谱仪(美国 Finnigan 公司);XS105 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.01 mg);PRD-S-Q277 型超声波清洗器(杭州超声波有限公司,功率为 600 W,频率为 42 kHz);HY-4 型调速多用振荡器(金坛市江南仪器厂);3K15 型离心机(德国 Sigma 公司);TTL-DC II 型氮吹仪(北京同泰联科技发展有限公司);Milli-Q 型超纯水仪(美国 Merk Millipore 公司)。

### 1.2 试剂

10 种真菌毒素混合对照品溶液(天津阿尔塔科技有限公司,批号为 S076583, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, T-2, DON, OTA, ZEN 的质量浓度分别为 0.04, 0.02, 0.04, 0.02, 0.4, 0.4, 0.4, 10.0, 0.04, 0.1 μg/mL, 纯度为 99.9%, 99.3%, 99.0%, 98.4%, 99.0%, 98.5%, 99.0%, 99.9%, 99.9%, 99.9%);真菌毒素六合一免疫亲和柱(北京华安麦科生物技术有限

公司,批号为 O0924AZNOTF,规格 6 mL,柱容量 AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 为 300 ng, FB1 和 FB2 为 5 000 ng, T-2 为 1 000 ng, DON 为 2 000 ng, OTA 为 100 ng, ZEN 为 1 000 ng);甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,购于美国 Merk 公司;氯化钾、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、吐温 20、冰醋酸均为分析纯,购于天津科密欧化学试剂有限公司;玻璃纤维滤纸(英国 Whatman 公司,型号 934-AH,孔径 1.5 μm);12 批红曲米及其炮制品(市售,编号 1-3 和编号 7-9 为红曲米饮片,编号 4-6 为红曲米药材,编号 10-12 为红曲米炭;编号 1-6 和编号 10-11 产地为福建,编号 7-9 产地为安徽,编号 12 产地为河北),经山东省菏泽市食品药品检验检测研究院赵丹彤副主任药师鉴定为正品。

## 2 方法与结果

### 2.1 检测条件

#### 2.1.1 色谱条件

色谱柱:Acquity UPLC HSS T3 C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 2.1 mm, 1.8 μm);柱温:40 ℃;流速:0.3 mL/min;进样量:10 μL;流动相:A 为 0.01% 甲酸,B 为含 0.1% 甲酸的乙腈-甲醇(1:1, V/V),梯度洗脱(0~2.0 min 时 5%B, 2.0~2.1 min 时 5%B → 40%B, 2.1~7.0 min 时 40%B → 55%B, 7.0~10.0 min 时 55%B → 90%B, 10.0~10.5 min 时 90%B → 5%B, 10.5~13.0 min 时 5%B)。

#### 2.1.2 质谱条件

采用电喷雾离子源(ESI),多反应监测、正负离子模式扫描;雾化气:氮气;雾化气流速:10.0 L/min;离子源温度:300 ℃;脱溶剂气温度:300 ℃;加热模块温度:400 ℃;碰撞气:氩气。质谱采集参数见表 1。

表 1 10 种真菌毒素质谱采集参数

Tab. 1 Mass spectrometry acquisition parameters of 10 mycotoxins

| 真菌毒素            | ESI 模式 | 母离子( <i>m/z</i> ) | 子离子( <i>m/z</i> )          | 碰撞电压(V) |
|-----------------|--------|-------------------|----------------------------|---------|
| 黄曲霉毒素 B1 (AFB1) | +      | 313.1             | 241.0 <sup>*</sup> , 285.1 | 50, 40  |
| 黄曲霉毒素 B2 (AFB2) | +      | 315.1             | 259.1 <sup>*</sup> , 287.1 | 35, 40  |
| 黄曲霉毒素 G1 (AFG1) | +      | 329.1             | 243.1 <sup>*</sup> , 311.1 | 35, 30  |
| 黄曲霉毒素 G2 (AFG2) | +      | 331.1             | 313.1, 245.1 <sup>*</sup>  | 33, 40  |
| 伏马毒素 B1 (FB1)   | +      | 722.3             | 352.4, 334.4 <sup>*</sup>  | 49, 53  |
| 伏马毒素 B2 (FB2)   | +      | 706.4             | 336.1 <sup>*</sup> , 318.4 | 49, 52  |
| T-2 毒素 (T-2)    | +      | 489.2             | 245.3, 387.2 <sup>*</sup>  | 36, 29  |
| 赭曲霉毒素 A (OTA)   | +      | 404.1             | 239.0 <sup>*</sup> , 102.1 | 34, 93  |
| 呕吐毒素 (DON)      | +      | 297.1             | 249.1, 231.1 <sup>*</sup>  | 17, 18  |
| 玉米赤霉烯酮 (ZEN)    | -      | 317.2             | 175.1 <sup>*</sup> , 131.2 | 32, 38  |

注:*m/z* 指质荷比,\*为定量离子。

Note: *m/z* refers to mass-to-charge ratio, and \* refers to quantitative ion.

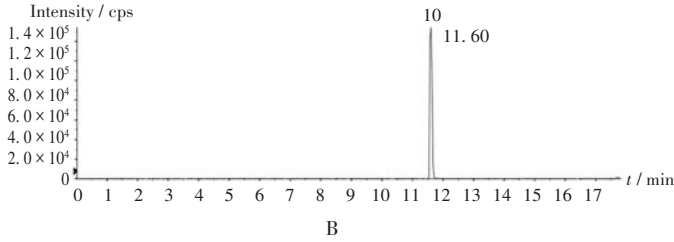
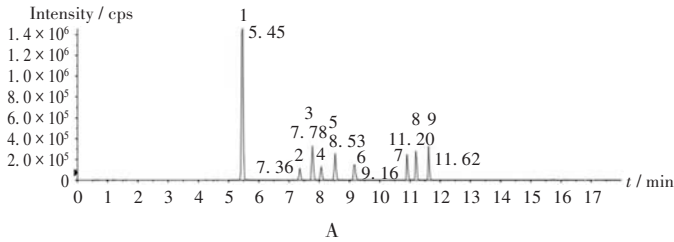
2.2 溶液制备

样品前处理:精密称取样品粉末 6.25 g(过 2 号筛),精密加入 80% 乙腈溶液(含 1% 乙酸)25 mL,摇床剧烈振荡(转速为 250 r/min)20 min,离心(转速为 4 000 r/min)5 min,移取上清液;向残渣中精密加入 80% 甲醇溶液 25 mL,摇床剧烈振荡(转速为 250 r/min)20 min,离心(转速为 4 000 r/min)5 min,移取上清液,合并 2 次上清液,混匀,精密量取 5 mL,加入 35 mL 稀释液(NaCl 8 g, KCl 0.2 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.16 g),混匀,用玻璃纤维滤纸滤过。精密量取滤液 32 mL,缓缓通过已处理好的免疫亲和柱,依次用 0.1% 吐温 20 水溶液、水各 10 mL 洗脱,待液体排干后,用 3 mL 含 2% 甲酸的甲醇溶液洗脱。洗脱方式为先上样 2 mL,堵住亲和柱下方出口,静置 3 min,收集洗脱液;再上样 1 mL,堵住亲和柱下方出口,静置 3 min,收集洗脱液。合并 2 次洗脱液,50 °C 下用氮吹仪吹干。

混合对照品溶液:分别精密量取上述 10 种真菌毒素混合对照品溶液 25, 50, 125, 250, 500  $\mu\text{L}$ ,分别置 5 mL 容量瓶中,加 50% 甲醇稀释并定容,摇匀,即得混合对照品溶液 1-5。

空白基质溶液:经前期测定结果显示,样品(编号为 8 号)未检出 10 种真菌毒素,取 5 份作为空白基质,按样品前处理方法处理空白样品,精密量取混合对照品溶液 1-5 各 2 mL,混匀,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过,取续滤液,分别为空白基质溶液 1-5。

供试品溶液:取样品,按样品前处理方法处理,精密加入 50% 甲醇溶液 2 mL,混匀,用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜滤过,取续滤液,即得。



1. DON 2. AFG2 3. AFG1 4. AFB2 5. AFB1 6. FB1  
7. FB2 8. T-2 9. OTA 10. ZEN

A. 正离子模式 B. 负离子模式

图1 10种真菌毒素典型总离子流图

1. DON 2. AFG2 3. AFG1 4. AFB2 5. AFB1 6. FB1 7. FB2  
8. T-2 9. OTA 10. ZEN

A. Positive ion mode B. Negative ion mode

Fig. 1 Typical total ion chromatograms of 10 mycotoxins

2.3 方法学考察

线性关系考察:取 2.2 项下空白基质溶液 1-5,按 2.1 项下检测条件进样检测,典型总离子流图见图 1,提取离子对色谱图见图 2。以 10 种真菌毒素的峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X,  $\mu\text{g/mL}$ )为横坐标,进行线性回归。详见表 2。

检测限和定量限确定:取 2.2 项下空白基质溶液逐级稀释,按 3 倍信噪比(S/N)计算检测限、10 倍 S/N 计算定量限。结果见表 2。

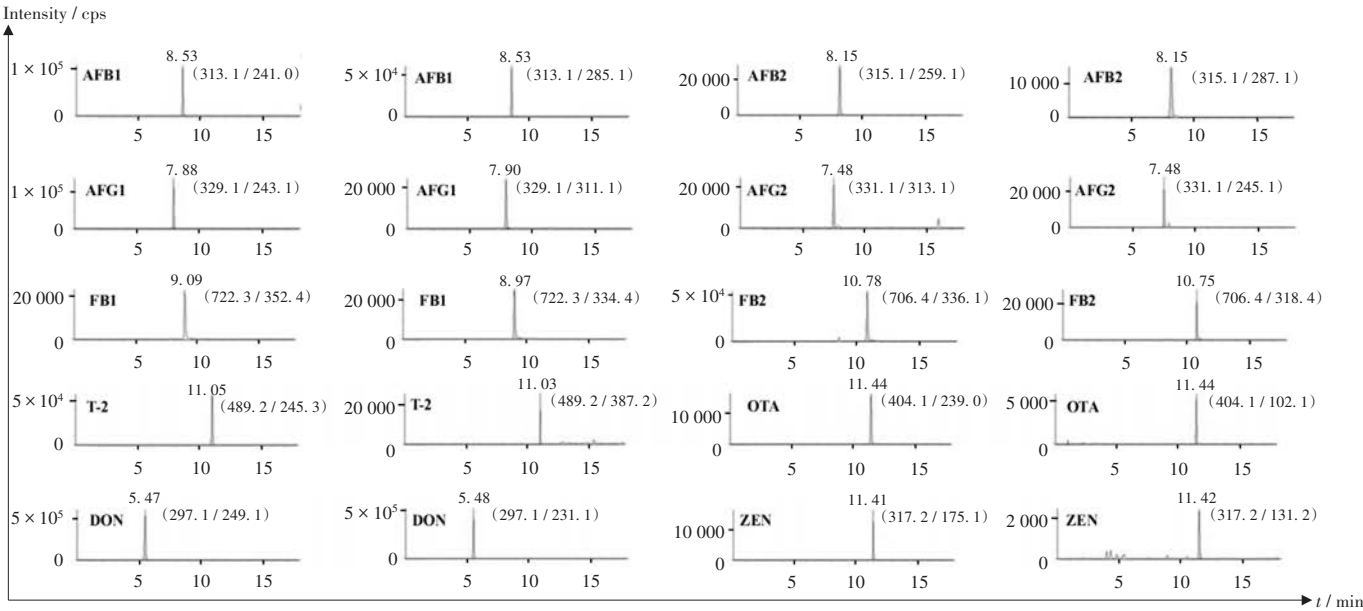


图2 10种真菌毒素提取离子对高效液相色谱串联质谱色谱图

Fig. 2 HPLC-MS/MS chromatograms of extracted ion pairs of 10 mycotoxins



表2 10种真菌毒素线性关系考察与检测限及定量限确定结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOD and LOQ of 10 mycotoxins

| 目标物  | 回归方程                                       | <i>r</i> | 线性范围<br>(ng/mL) | 检测限<br>(μg/kg) | 定量限<br>(μg/kg) |
|------|--------------------------------------------|----------|-----------------|----------------|----------------|
| AFB1 | $Y = 20\,782.555\,74\,X + 594.257\,21$     | 0.994 9  | 0.200~4.000     | 0.27           | 0.80           |
| AFB2 | $Y = 17\,104.401\,87\,X + 1\,694.564\,55$  | 0.998 4  | 0.099~1.990     | 0.07           | 0.20           |
| AFG1 | $Y = 27\,154.380\,36\,X + 1\,394.336\,41$  | 0.996 1  | 0.198~3.960     | 0.09           | 0.27           |
| AFG2 | $Y = 11\,820.510\,20\,X + -1\,131.719\,97$ | 0.995 6  | 0.098~1.970     | 0.27           | 0.80           |
| FB1  | $Y = 1\,014.592\,72\,X + 3\,322.089\,50$   | 0.997 3  | 1.98~39.600     | 2.67           | 8.00           |
| FB2  | $Y = 1\,992.137\,97\,X + 2\,968.985\,36$   | 0.995 6  | 1.97~39.400     | 0.89           | 2.68           |
| T-2  | $Y = 1\,685.174\,25\,X + 3\,261.312\,16$   | 0.993 9  | 1.98~39.600     | 2.67           | 8.00           |
| OTA  | $Y = 562.255\,25\,X + 15\,028.198\,80$     | 0.995 0  | 0.200~4.000     | 0.05           | 0.16           |
| DON  | $Y = 27\,404.062\,51\,X + 611.604\,88$     | 0.998 2  | 49.9~999.0      | 0.33           | 1.00           |
| ZEN  | $Y = 4\,235.571\,95\,X + 107.344\,79$      | 0.999 1  | 0.500~9.990     | 0.67           | 2.00           |

加样回收试验:精密称取空白基质适量,分别加入2.2项下10种真菌毒素混合对照品溶液0.25,0.625,2.5 mL,制成低、中、高3个浓度的样品加样回收试验溶液,按2.1项下方法对样品进行前处理,各平行3次,结果10种真菌毒素的平均加样回收率均在60%~120%之间,相对标准偏差(*RSD*)均低于6.00%(*n* = 9),表明方法准确度良好。详见表3。

表3 10种真菌毒素加样回收试验结果(% ,*n* = 9)

Tab. 3 Results of the recovery test of 10 mycotoxins (% ,*n* = 9)

| 真菌<br>毒素 | 低浓度       |            | 中浓度       |            | 高浓度       |            | $\bar{X}$ | <i>RSD</i> |
|----------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
|          | $\bar{X}$ | <i>RSD</i> | $\bar{X}$ | <i>RSD</i> | $\bar{X}$ | <i>RSD</i> |           |            |
| AFB1     | 64.62     | 4.50       | 67.11     | 2.83       | 70.32     | 2.37       | 67.35     | 4.24       |
| AFB2     | 85.73     | 2.36       | 91.34     | 1.82       | 90.11     | 2.36       | 89.06     | 3.31       |
| AFG1     | 66.12     | 4.78       | 72.23     | 2.91       | 73.61     | 2.72       | 70.65     | 5.64       |
| AFG2     | 80.14     | 2.76       | 84.62     | 1.69       | 86.52     | 1.20       | 83.76     | 3.91       |
| FB1      | 80.95     | 3.11       | 84.90     | 2.31       | 88.41     | 2.19       | 84.75     | 4.40       |
| FB2      | 107.81    | 1.96       | 99.49     | 1.72       | 107.00    | 1.53       | 104.76    | 4.38       |
| T-2      | 99.24     | 2.04       | 97.39     | 1.99       | 102.89    | 2.59       | 99.84     | 2.80       |
| OTA      | 93.15     | 1.70       | 95.01     | 2.41       | 92.39     | 2.64       | 93.52     | 1.44       |
| DON      | 103.26    | 2.17       | 101.16    | 1.81       | 108.73    | 2.00       | 104.38    | 3.74       |
| ZEN      | 84.05     | 3.02       | 88.18     | 1.45       | 90.26     | 2.90       | 87.50     | 3.61       |

重复性试验:取加样回收试验项下中浓度样品加样回收试验溶液,平行制备6份,按2.1项下检测条件进样检测。结果AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, T-2, OTA, DON, ZEN的平均含量及*RSD*分别为2.75, 1.87, 2.87, 1.65, 33.60, 38.92, 38.29, 3.79, 1 007.23, 8.83 μg/kg, *RSD*分别为4.89%, 3.76%, 3.20%, 3.80%, 1.49%, 1.95%, 1.81%, 4.25%, 1.53%, 1.51%, 表明方法重复性良好。

精密度试验:取2.2项下空白基质溶液3,按2.1项

下检测条件连续进样5次,结果10种真菌毒素峰面积的*RSD*在0.30%~1.97%(*n* = 5)间,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取加样回收试验项下中浓度加样加回收试验溶液,于室温下放置0,6,12,18,24 h时按2.1项下检测条件进样检测,记录10种真菌毒素的峰面积。结果AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, FB1, FB2, T-2, OTA, DON, ZEN峰面积的*RSD*均小于4.0%,分别为2.06%, 1.83%, 2.98%, 1.10%, 2.57%, 2.06%, 1.76%, 2.17%, 3.00%, 2.99%(*n* = 5),表明待测样品溶液在24 h内稳定性良好。

2.4 样品含量测定

取12批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行2份,按2.1项下检测条件进样测定,采用空白基质溶液匹配标准曲线,计算10种真菌毒素的含量。结果12批样品中AFB2, AFG1, FB1, T-2, DON, OTA 6种真菌毒素均未检出, AFB1, AFG2, FB2, ZEN的检出情况见表4。

表4 12批样品中真菌毒素含量测定结果(μg/kg, *n* = 2)

Tab. 4 Results of the content determination of mycotoxins in the 12 batches of samples (μg/kg, *n* = 2)

| 样品编号 | AFB1  | AFG2  | FB2   | ZEN   |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 1    | 0.58* |       | 1.40* | 7.71  |
| 2    | 0.69* |       | 0.57* | 7.50  |
| 3    | 0.76* |       |       | 5.31  |
| 4    | 0.96  | 0.60* |       | 8.68  |
| 5    | 0.90  |       | 4.28  | 5.26  |
| 6    | 0.34* | 0.55* | 2.05* | 8.19  |
| 7    |       |       |       | 2.49  |
| 8    |       |       |       |       |
| 9    |       | 0.62* |       | 4.45  |
| 10   |       | 0.48* | 0.22* | 1.91* |
| 11   |       |       |       | 3.42  |
| 12   |       |       |       | 2.11  |

注:\*为含量低于定量限。

Note:\* refers to the content was lower than the LOQ.

3 讨论

3.1 色谱与质谱条件优化

2020年版《中国药典(四部)》中,多种真菌毒素的测定方法均以0.01%甲酸为流动相A,以乙腈-甲醇(1:1, *V/V*)为流动相B,梯度洗脱<sup>[8]</sup>。但该条件下AFG2的响应值过低,且DON出峰时间过早,峰形较差。经反复试验,最终确定以0.01%甲酸为流动相A,以含0.1%甲酸的乙腈-甲醇(1:1, *V/V*)为流动相B,梯度洗脱,可获得满意结果。

按2020年版《中国药典(四部)》多种真菌毒素的测定方法提供的质谱条件进行检测,发现OTA在原负离子模式下响应值过低,不利于检测,后参考药典中单独测定OTA的质谱条件,正离子模式下OTA的响应值显著提高,可获得较好的检测结果。

### 3.2 样品前处理方法优化

提取液中加入一定量的盐,并使提取液pH保持中性或偏酸性,可提取完全真菌毒素<sup>[14]</sup>。预试验中,采用原标准中70%甲醇进行提取,发现OTA, DON, ZEN等的提取效率较低,参考文献[14-16]和2020年版《中国药典(四部)》中ZEN的提取溶剂,采用偏酸性溶液进行提取,可获得较高回收率。

在通过固相萃取柱净化时,供试品溶液颜色较深,仅用水无法有效脱去样品中的色素,影响检测结果,采用0.1%吐温20水溶液可显著提高洗脱效率,并减少色素杂峰的影响。

### 3.3 基质效应考察

取2.2项下50%甲醇配制的系列混合对照品溶液和空白基质溶液,分别按2.1项下检测条件检测,并绘制标准曲线。通过比较基质/溶剂2种标准曲线的斜率比值来判断某种真菌毒素的基质效应是增强还是减弱。斜率比值大于1为基质效应增强,斜率比值小于1为基质效应减弱。结果AFG1和AFG2的基质效应不明显, AFB1, ZEN, DON呈基质减弱效应, OTA, AFB2, T-2, FB1, FB2均呈基质增强效应。可见,超过60%的真菌毒素均受基质效应的影响,故最终确定以空白基质配制标准曲线,以抵消基质效应的影响。

### 3.4 样品检测结果分析

由检测结果可知,虽有部分样品检出,但均符合2020年版《中国药典》(一部)中的规定,薏苡仁中AFB1不得过5 μg/kg, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2总量不得过10 μg/kg, ZEN不得过500 μg/kg<sup>[17]</sup>, 谷物及其制品中ZEN的限量标准不得过60 μg/kg<sup>[18]</sup>, 12批样品中ZEN的残留量均符合限量要求。我国尚未制订伏马毒素限量标准,参考欧盟标准中对婴幼儿玉米制品中伏马毒素的总量(含FB1+FB2)不得过200 μg/kg<sup>[19]</sup>, 12批样品均符合要求。

红曲米及其炮制品受真菌毒素污染的风险较小,但

步深入研究。本研究中建立的方法可同时测定红曲米中10种真菌毒素,为红曲米及其炮制品加工、运输、贮藏过程中的真菌毒素污染风险评估和监测提供技术支持。

### 参考文献

- [1] 齐方圆,任丹,黄紫研,等. 16个产地红曲中洛伐他汀及桔霉素测定[J]. 中成药,2021,43(4):948-953.
- [2] 山东省食品药品监督管理局. 山东省中药材标准(2012年版)[M]. 济南:山东科学技术出版社,2012:110-111.
- [3] 蒋沅岐,董玉洁,周福军,等. 红曲的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. 中草药,2021,52(23):7379-7388.
- [4] 杨树玲,陈冬,孔维宝,等. 红曲霉发酵制品中的代谢产物及其生理活性研究进展[J]. 生物学通报,2019,54(9):1-5.
- [5] 张星星,毛清黎,孙俊,等. 高效液相色谱法测定红曲发酵食品中洛伐他汀的研究[J]. 中国酿造,2020,39(5):193-196.
- [6] 孙伟华,杨欢,曹赵云,等. 基于分散固相萃取液相色谱-串联质谱法测定大米中8种真菌毒素[J]. 分析测试学报,2017,36(1):47-53.
- [7] 赖先文,张荷,刘承兰. 稻米中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(22):386-391.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:525-527.
- [9] 毛丹,张魁,陈钊,等. LC-MS-MS法测定4种中药中的呕吐毒素[J]. 中国药师,2014,17(4):578-581.
- [10] 王晓红,豆金彦,肖正国. 不同储藏条件下薏苡仁中真菌毒素含量变化的研究[J]. 西部中医药,2018,31(8):20-23.
- [11] 肖全伟,吴文林,刘玲利. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法测定小麦中的8种真菌毒素[J]. 四川农业大学学报,2018,36(5):584-591.
- [12] 万青,肖凌,聂晶,等. 固相萃取-液质联用法测定藤茶中11种真菌毒素[J]. 医药导报,2021,40(7):920-926.
- [13] 李铭慧,张丽君,李莎. 毛细管电泳法检测薏苡仁和红曲米中真菌毒素[J]. 医药导报,2021,46(2):335-340.
- [14] 董姣姣,范妙璇,陈炼明,等. 中药饮片真菌毒素前处理方法进展[J]. 世界中医药,2018,13(12):3239-3245.
- [15] 韦芳,廖晓芳,刘晓菲,等. 中药材等复杂基质中真菌毒素检测的前处理技术研究新进展[J]. 中国中药杂志,2018,43(17):3431-3443.
- [16] 唐振涛,于刚,刘菲,等. 超高效液相色谱-三重四级杆质谱同时检测苦荞中10种真菌毒素[J]. 安徽农业科学,2021,49(1):188-193.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:393-394.
- [18] GB 2761-2017,食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
- [19] 李正翔,陈小龙,曹赵云,等. 液相色谱-串联质谱法测定粮谷中的伏马毒素[J]. 分析测试学报,2014,33(2):167-172.

(收稿日期:2022-03-24;修回日期:2022-09-08)

本栏目

重庆药友制药有限责任公司

协办

也可能是本研究中收集的样品量较少、覆盖范围较小,今后将扩大样品收集范围,进一