

中图分类号: R932; R284.1; R286.0  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.11.015

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)11-0072-06



# 超高效液相色谱串联质谱法快速筛查土鳖虫及其中药制剂中 23 种真菌毒素\*

胡 珀<sup>1</sup>, 贾云云<sup>1</sup>, 李 佳<sup>1</sup>, 王 萍<sup>1</sup>, 王 玉<sup>1△</sup>, 赵祥杰<sup>2</sup>

(1. 江苏省淮安市食品药品检验所, 江苏 淮安 223001; 2. 淮阴工学院, 江苏 淮安 223001)

**摘要:**目的 建立快速筛查土鳖虫及其中药制剂中 23 种真菌毒素的 EMR - Lipid QuEChERS 前处理结合超高效液相色谱串联质谱 (UPLC - MS / MS) 法。方法 采用 EMR - Lipid QuEChERS 净化包对样品进行前处理。色谱柱为 Waters Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> 柱 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为乙腈 - 水 (梯度洗脱), 流速为 0.3 mL / min, 柱温为 30 °C, 自动进样器温度为 10 °C, 进样量为 2 μL; 以多反应监测 (MRM)、电喷雾离子化 (ESI)、正离子和负离子模式同时检测, 雾化电压为 5 500 V (正离子模式) 和 4 500 V (负离子模式), 离子传输温度为 500 °C。结果 单个样品中 23 种真菌毒素的提取、净化和检测分析可在 60 min 内完成。23 种真菌毒素在各自质量浓度范围内与其响应值峰面积线性关系良好 ( $r \geq 0.999 0$ ); 检测限为 0.1 ~ 21.8 μg / kg, 定量限为 0.4 ~ 72.5 μg / kg; 重复性、稳定性试验结果的 RSD 均不超过 10% ( $n = 6$ ); 平均回收率为 71.14% ~ 100.71%, RSD 为 1.64% ~ 9.23% ( $n = 18$ )。共有 10 批样品检出了真菌毒素, 包括 4 批土鳖虫药材或饮片及 6 批含土鳖虫中药制剂, 其中 4 批样品的黄曲霉毒素超出限量标准。结论 该方法操作简便快速、结果准确, 可用于土鳖虫及其中药制剂中 23 种真菌毒素的快速筛查。

**关键词:**超高效液相色谱串联质谱法; 土鳖虫; 中药制剂; 真菌毒素

## Rapid Screening of 23 Mycotoxins in Eupolyphaga Steleophaga and Its Chinese Medicinal Preparations by UPLC - MS / MS

HU Po<sup>1</sup>, JIA Yunyun<sup>1</sup>, LI Jia<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>, WANG Yu<sup>1</sup>, ZHAO Xiangjie<sup>2</sup>

(1. Huai'an Institute for Food and Drug Control, Huai'an, Jiangsu, China 223001; 2. Huaiyin Institute of Technology, Huai'an, Jiangsu, China 223001)

**Abstract: Objective** To establish an EMR - Lipid QuEChERS pretreatment combined with ultra - performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC - MS / MS) method for rapid screening of 23 mycotoxins in Eupolyphaga Steleophaga and its Chinese medicinal preparations. **Methods** EMR - Lipid QuEChERS purification kit was used for sample pretreatment. The chromatographic column was Waters Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), the mobile phase was acetonitrile - water (gradient elution), the flow rate was 0.3 mL / min, the column temperature was 30 °C, the automatic sampler temperature was 10 °C, and the injection volume was 2 μL. Multiple reaction monitoring (MRM), electric spray ionization (ESI), positive ion and negative ion modes were used for simultaneous detection, the atomization voltage was 5 500 V (positive ion mode) and 4 500 V (negative ion mode), and the ion transfer temperature was 500 °C. **Results** The extraction, purification, and detection analysis of 23 mycotoxins in a single sample could be completed within 60 min. The 23 mycotoxins showed good linearity within their respective concentration range ( $r \geq 0.999 0$ ). The limit of detection (LOD) was in the range of 0.1 - 21.8 μg / kg, and the limit of quantification (LOQ) was in the range of 0.4 - 72.5 μg / kg. The RSDs of repeatability and stability test results should not exceed 10% ( $n = 6$ ). The average recoveries of 23 mycotoxins were in the range of 71.14% - 100.71%, with RSDs of 1.64% - 9.23% ( $n = 18$ ). Ten batches of samples have detected mycotoxins, including four batches of Eupolyphaga Steleophaga medicinal materials or decoction pieces and six batches of traditional Chinese medicine preparations containing Eupolyphaga Steleophaga, of which four batches of samples had aflatoxin exceeding the limit standard. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which can be used for rapid screening of 23 mycotoxins in Eupolyphaga Steleophaga and its Chinese medicinal preparations.

**Key words:** UPLC - MS / MS; Eupolyphaga Steleophaga; Chinese medicinal preparations; mycotoxins

土鳖虫为我国传统动物类药材, 在临床应用广泛<sup>[1]</sup>, 2020年版《中国药典(一部)》中共收载 34 种含土鳖虫的成方制剂, 剂型以胶囊剂(11 种)为主, 服用方式

基本为口服, 制备方法大部分以粉碎成细粉(包括最细粉、极细粉)直接入药, 临床主要用于跌打损伤<sup>[2]</sup>。现有药用土鳖虫绝大多数为人工养殖<sup>[3]</sup>, 由于养殖环境差,

\*基金项目: 江苏省市场监督管理局科技计划项目 [KJ2022048]。

第一作者: 胡珀, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为食品、药品和化妆品质量控制, (电子信箱) 335757547@qq.com。

△通信作者: 王玉, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为药品质量控制, (电子信箱) 461294171@qq.com。

真菌通过土壤、空气、雨滴、饲料传播,使药材遭受污染<sup>[4]</sup>。收获的药材和污染霉菌在干燥、安全的储藏条件下是活的,只是呼吸缓慢,当条件适宜时会活跃生长、繁殖,并积累真菌毒素等次生代谢物<sup>[5]</sup>。土鳖虫易污染真菌毒素的原因有未及时烫透、晒干,加工前未停食 1 d,腹内残留食物过多,梅雨天气易返潮,背部坚硬外壳,腹内水分不易蒸发<sup>[6]</sup>。目前已知的真菌毒素有 300 余种<sup>[7]</sup>,其中常见的易对人体产生危害的真菌毒素有黄曲霉毒素、单端孢霉烯族类毒素、玉米赤霉烯酮、交链孢毒素等<sup>[8]</sup>。部分真菌毒素已被证实具有致癌、致畸、致突变作用,对人类健康造成了很大威胁<sup>[9]</sup>。2020 年版《中国药典(一部)》在 2015 年版基础上增加了土鳖虫药材和饮片的黄曲霉毒素检查项,而含土鳖虫中药制剂暂无黄曲霉毒素检查要求<sup>[10]</sup>。在含土鳖虫中药制剂日常检验的同时进行黄曲霉毒素风险项探索性研究发现,有黄曲霉毒素超标的情形。但关于含土鳖虫等动物类中药制剂质量安全问题的研究鲜有报道。增强型脂质去除填料 EMR - Lipid 是一种改良的 QuEChERS 技术,能高选择性地去除基质中的脂类杂质,与传统 QuEChERS 法相比更适用于脂肪、蛋白质含量较高的样品,方法稳定,重复性好<sup>[11]</sup>。本研究中通过 QuEChERS EMR - Lipid 法净化,建立了检测土鳖虫药材或饮片及其中药制剂中 23 种真菌毒素的超高效液相色谱串联质谱(UPLC - MS/MS)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate3000 型超高效液相色谱仪(美国 Thermo Fisher 公司);QTRAP 4500 型三重四极杆质谱仪、Analyst 采集软件、MultiQuant 3. 0. 2 分析软件(美国 Sciex 公司);XS205DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0. 01 mg);T25 easy clean 型均质分散机(德国 IKA 公司);Milli - Q 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

1.2 试剂

23 种真菌毒素混合对照品溶液(青岛普瑞邦生物工程有限公,批号为 2C00B28,质量浓度见表 1);甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵(色谱纯,德国 Merck 公司);无水硫酸镁、氯化钠、无水乙酸钠(色谱纯,美国 Sigma - Aldrich 公司);实验用水为 Milli - Q 超纯水;EMR - Lipid QuEChERS 净化包(安捷伦科技 < 中国 > 有限公司);土鳖虫饮片(样品信息见表 2);土鳖虫药材(亳州市同善堂中药材有限责任公司,批号为 221202,产地为山东),经江苏省淮安市食品药品检验所陈小红主任中药师鉴定为正品;参松养心胶囊(北京以岭药业有限公司,批号为 2103019);养正消积胶囊(批号为 A2111001),通心络胶囊(批号为 A2010020),均购自石家庄以岭药业股

份有限公司;腰痛宁胶囊(颈复康药业集团有限公司,批号为 120409);中风回春丸(广州白云山敬修堂药业股份有限公司,批号为 P01008);大七厘散(厦门中药厂有限公司,批号为 211102)。

表 1 23 种真菌毒素的质量浓度(μg / mL)

Tab. 1 Mass concentrations of 23 mycotoxins (μg / mL)

| 真菌毒素                 | 质量浓度  | 真菌毒素            | 质量浓度   | 真菌毒素      | 质量浓度  |
|----------------------|-------|-----------------|--------|-----------|-------|
| 黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> | 2. 01 | 二乙酰氧草镰刀菌烯醇      | 5. 01  | α- 玉米赤霉烯醇 | 2. 01 |
| 黄曲霉毒素 B <sub>2</sub> | 2. 00 | 15- 乙酰蛇形菌素      | 5. 00  | β- 玉米赤霉烯醇 | 2. 07 |
| 黄曲霉毒素 G <sub>1</sub> | 2. 03 | 新茄病镰刀菌烯醇        | 10. 10 | β- 玉米赤霉烯醇 | 2. 01 |
| 黄曲霉毒素 G <sub>2</sub> | 2. 00 | 脱氧雪腐镰刀菌烯醇       | 10. 01 | 交链孢酚      | 2. 00 |
| 黄曲霉毒素 M <sub>1</sub> | 2. 00 | 3- 乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 | 10. 00 | 交链孢霉甲基醚   | 2. 01 |
| 黄曲霉毒素 M <sub>2</sub> | 2. 00 | 玉米赤霉酮           | 2. 00  | 交链孢霉烯     | 2. 01 |
| T- 2 毒素              | 2. 00 | 玉米赤霉烯酮          | 2. 02  | 交链孢毒素 I   | 2. 00 |
| HT- 2 毒素             | 5. 00 | α- 玉米赤霉醇        | 2. 01  |           |       |

表 2 土鳖虫饮片样品信息

Tab. 2 Sample information of Eupolyphaga Steleophaga decoction piece

| 批号     | 产地 | 厂家       | 批号      | 产地 | 厂家             |
|--------|----|----------|---------|----|----------------|
| 202209 | 山东 | 安国市东方红药材 | 2210001 | 山东 | 亳州市城南区药业有限责任公司 |
| 202210 | 安徽 | 贸易有限公司   | 220701  | 江苏 | 江苏承开中药有限公司     |

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC® BEH C<sub>18</sub> 柱(100 mm × 2. 1 mm, 1. 7 μm);流动相:乙腈(A) - 水(B),梯度洗脱(0 ~ 2 min 时 95%B, 2 ~ 15 min 时 95%B → 40%B, 15 ~ 18 min 时 40%B, 18 ~ 18. 1 min 时 40%B → 95%B, 18. 1 ~ 20 min 时 95%B);流速:0. 3 mL / min;柱温:30 °C;自动进样器温度:10 °C;进样量:2 μL。

2.2.2 质谱条件

检测模式:以多反应监测(MRM),电喷雾离子化(ESI),正、负离子模式同时检测;雾化电压:5 500 V(正离子模式),4 500 V(负离子模式);离子传输温度:500 °C。23 种真菌毒素对照品质谱分析参数见表 3。

2.2 溶液制备

供试品溶液:分别取土鳖虫饮片、土鳖虫药材或含土鳖虫中药制剂样品粉末各 5 g,精密称定,置 50 mL 离心管中,加 20 mL 80% 乙腈溶液,均质 2 min,离心(转速为 10 000 r / min)5 min,精密量取上清液 4 mL 并转移至 EMR - Lipid QuEChERS 净化包中,涡旋,混匀,离心(转速为 10 000 r / min)5 min,取净化液,滤过,待测。

基质混合对照品溶液:取未检出真菌毒素的土鳖虫空白基质样品 5 g,同供试品溶液处理方法处理至“离心(转速为 10 000 r / min)5 min,取净化液,滤过”,取净化液作为空白基质溶液,精密加入 23 种真菌毒素混合

表 3 23 种真菌毒素对照品质谱分析参数

| Tab.3 Mass spectrometry analysis parameters of 23 mycotoxins |                     |       |       |             |                        |
|--------------------------------------------------------------|---------------------|-------|-------|-------------|------------------------|
| 真菌毒素                                                         | reference standards |       |       | 去簇电压<br>(V) | 碰撞能量<br>(eV)           |
|                                                              | 母离子                 | 定量离子  | 定性离子  |             |                        |
| 黄曲霉毒素B <sub>1</sub>                                          | 313.1               | 285.1 | 241.1 | 95          | 32 <sup>*</sup> /50    |
| 黄曲霉毒素B <sub>2</sub>                                          | 315.1               | 287.1 | 259.1 | 113         | 35 <sup>*</sup> /41    |
| 黄曲霉毒素G <sub>1</sub>                                          | 323.1               | 243.2 | 214.9 | 110         | 33 <sup>*</sup> /43    |
| 黄曲霉毒素G <sub>2</sub>                                          | 331.1               | 245.1 | 189.1 | 115         | 39 <sup>*</sup> /54    |
| 黄曲霉毒素M <sub>1</sub>                                          | 323.0               | 273.1 | 258.9 | 106         | 31 <sup>*</sup> /33    |
| 黄曲霉毒素M <sub>2</sub>                                          | 331.1               | 273.1 | 285.1 | 87          | 31 <sup>*</sup> /31    |
| T-2毒素                                                        | 484.2               | 305.3 | 185.1 | 40          | 18 <sup>*</sup> /31    |
| HT-2毒素                                                       | 442.1               | 263.1 | 215.0 | 46          | 17 <sup>*</sup> /16    |
| 二乙酰糖草镰刀菌烯醇                                                   | 384.2               | 307.2 | 105.1 | 40          | 15 <sup>*</sup> /60    |
| 15-乙酰蛇形菌素                                                    | 342.1               | 265.1 | 107.0 | 36          | 13 <sup>*</sup> /21    |
| 新茄病镰刀菌烯醇                                                     | 400.2               | 305.2 | 185.1 | 70          | 17 <sup>*</sup> /27    |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇                                                    | 235.0               | 265.2 | 138.1 | -68         | -16 <sup>*</sup> / -23 |
| 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇                                               | 337.0               | 307.0 | 173.0 | -70         | -14 <sup>*</sup> / -13 |
| 玉米赤霉酮                                                        | 319.2               | 275.2 | 205.1 | -112        | -26 <sup>*</sup> / -30 |
| 玉米赤霉烯酮                                                       | 317.1               | 175.0 | 131.1 | -112        | -31 <sup>*</sup> / -34 |
| α-玉米赤霉醇                                                      | 321.2               | 277.2 | 303.2 | -112        | -28 <sup>*</sup> / -25 |
| α-玉米赤霉烯醇                                                     | 319.2               | 160.1 | 130.0 | -110        | -36 <sup>*</sup> / -40 |
| β-玉米赤霉醇                                                      | 321.2               | 277.2 | 303.2 | -112        | -28 <sup>*</sup> / -25 |
| β-玉米赤霉烯醇                                                     | 319.2               | 160.1 | 130.0 | -110        | -36 <sup>*</sup> / -40 |
| 交链孢酚                                                         | 257.0               | 212.9 | 146.9 | -70         | -34 <sup>*</sup> / -43 |
| 交链孢霉甲基醚                                                      | 271.0               | 228.0 | 213.0 | -90         | -30 <sup>*</sup> / -38 |
| 交链孢霉烯                                                        | 231.0               | 203.0 | 161.0 | -150        | -44 <sup>*</sup> / -49 |
| 交链孢毒素 I                                                      | 351.0               | 263.0 | 269.0 | -90         | -31 <sup>*</sup> / -30 |

注:\*为定量离子。

Note:\* refers to quantitative ions.

对照品溶液,根据每种化合物在UPLC-MS/MS仪器的响应值不同,将23种目标化合物稀释为不同质量浓度的混合标准工作溶液,配制成基质混合对照品溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下空白基质溶液、基质混合对照品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,记录总离子流图。结果空白样品无干扰,表明方法专属性良好。详见图1。

线性关系考察:取2.2项下不同质量浓度的基质混合对照品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,以各真菌毒素的质量浓度(*X*, ng/mL)为横坐标、响应值峰面积(*Y*)为纵坐标进行线性回归。结果见表4,表明23种真菌毒素在各自质量浓度范围内与其响应值峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取2.2项下基质混合对照品溶液各适量,按2.1项下试验条件进样测定,以3倍信噪比(*S/N*)的响应值峰面积为检测限,以10倍*S/N*的

响应值峰面积为定量限。结果见表4。

重复性试验:取样品粉末5 g,精密称定,平行6份,加23种真菌毒素混合对照品溶液40 μL,按2.2项下方法制备基质混合对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录响应值峰面积。结果23种真菌毒素峰面积的*RSD* ≤ 10% (*n* = 6),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.2项下基质混合对照品溶液适量,分别于放置0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按2.1项下试验条件进样测定,记录响应值峰面积。结果23种真菌毒素峰面积的*RSD* ≤ 10% (*n* = 6),表明基质混合对照品溶液中23种真菌毒素放置24 h内稳定性良好。

加样回收试验:取未检出真菌毒素的空白基质样品粉末5 g,精密称定,共18份,按低、中、高浓度水平分别精密加入真菌毒素混合对照品溶液,各6份,按2.2项下方法制备基质混合对照品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表4,表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取5批土鳖虫药材或饮片及6批含土鳖虫中药制剂各适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下试验条件进样测定,记录响应值峰面积,并计算含量。结果共检出10种真菌毒素,其中5批土鳖虫药材或饮片检出阳性样品4批(阳性率80.00%),6批含土鳖虫中药制剂中检出阳性样品6批(阳性率100.00%)。详见表5。

3 讨论

3.1 样品前处理方法优化

检测真菌毒素的动物性中药材样品处理方法包括提取和净化2个步骤。提取方法主要有均质提取法、振荡提取法、超声提取法、搅拌提取法等,其中均质提取法优点突出,能快速分散样品,使目标化合物在短时间内溶于提取液中,制得更均一的混合溶液,提取时间较其他方法大大缩短<sup>[12]</sup>。净化方法主要有以下5种。

1)过亲水亲油平衡(HLB)柱。填料主要包含硅胶、十八烷基硅烷键合硅胶(C<sub>18</sub>)、硅酸镁等,选择性吸附和洗脱,是目前国际上较常用的检测真菌毒素样品的处理方法,适用于简单基质,但净化时间长,目标化合物易在淋洗步骤中损失,造成数据不准确<sup>[13]</sup>。2)过免疫亲和柱。既可单独净化得到一种或一类毒素,如黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮及其衍生物、赭曲霉毒素A,也可同时净化得到几类毒素,但净化效果易受样品基质、pH、溶剂等因素的影响,且价格高昂,净化时间长<sup>[14]</sup>。3)固相净化柱。已商品化的真菌毒素固相净化柱也是实验室常用的前处理方法,填料包含活性炭、硅胶、氧化铝、极性或非极性材料、离子吸附树脂等,其原理是过柱后将干扰物等截留在柱内,样液中的毒素不被吸附而直接

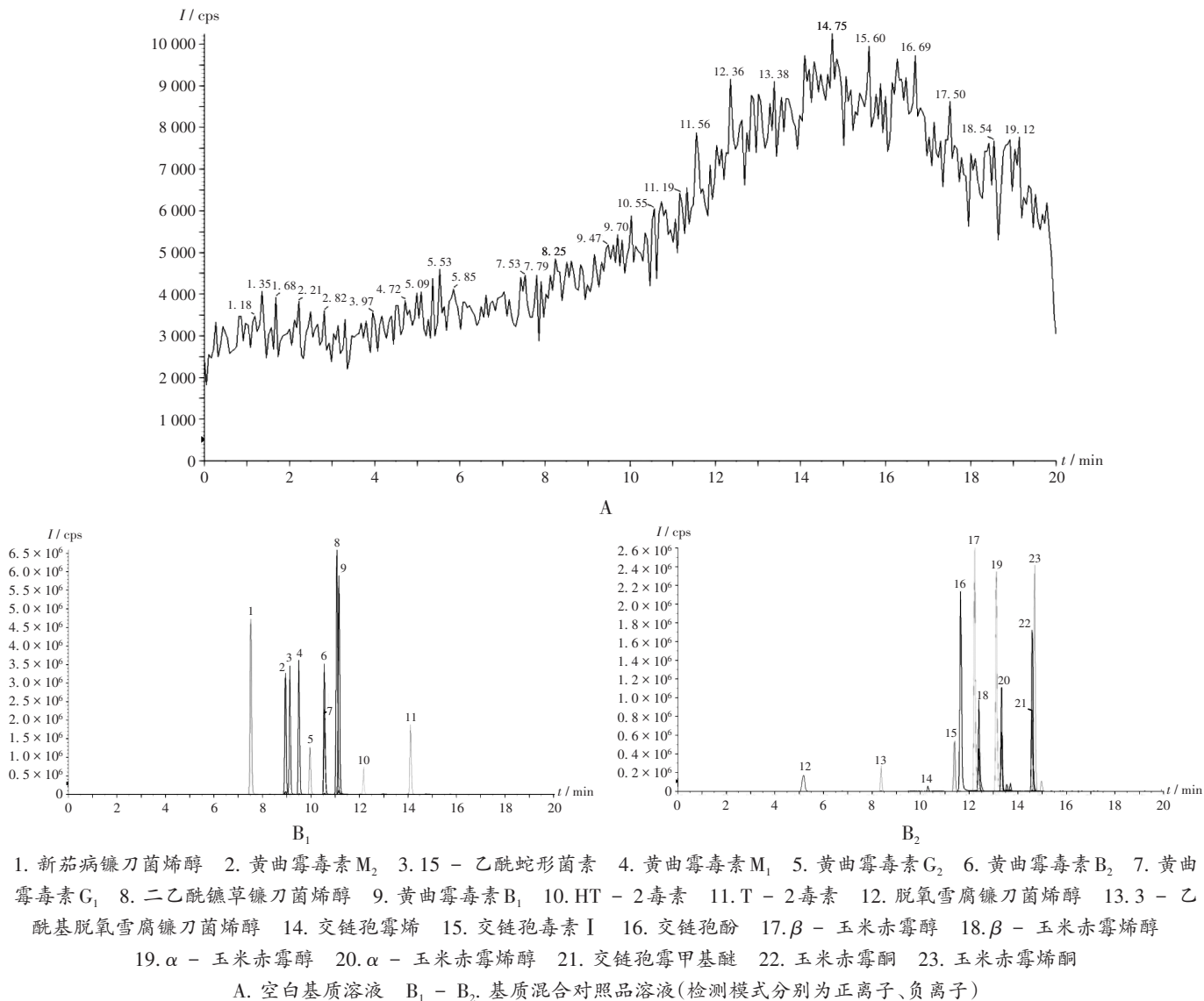


图1 专属性试验总离子流图

1. Neosolaniol 2. Aflatoxin M<sub>2</sub> 3. 15 - Acetoxyscirpenol 4. Aflatoxin M<sub>1</sub> 5. Aflatoxin G<sub>2</sub> 6. Aflatoxin B<sub>2</sub> 7. Aflatoxin G<sub>1</sub> 8. Diacetoxyscirpenol 9. Aflatoxin B<sub>1</sub> 10. HT - 2 toxin 11. T - 2 toxin 12. Deoxynivalenol 13. 3 - Acetyldeoxynivalenol 14. Altenuene 15. Altertoxin I 16. Alternariol 17.  $\beta$  - Zearalanol 18.  $\beta$  - Zearalenol 19.  $\alpha$  - Zearalanol 20.  $\alpha$  - Zearalenol 21. Alternariol monomethyl ether 22. Zearalanone 23. Zearalenone

A. Blank matrix solutions B<sub>1</sub> - B<sub>2</sub>. Matrix mixed reference solution (detection modes are positive ions and negative ions, respectively)

Fig. 1 TIC chromatograms of the specificity test

通过,与免疫亲和柱和固相萃取柱的原理相反<sup>[15]</sup>。4)采用QuEChERS净化包净化。通过购置商品化提取净化包或自制不同配比的无水硫酸镁、N-丙基乙二胺(PSA)、C<sub>18</sub>、氯化钠等材料进行样品净化处理,时间较短,操作简便,但目标物易被吸附,重复性不佳<sup>[16]</sup>。5)采用EMR材料。EMR是一种新型净化材料,结合了体积排阻与疏水相互作用,可专门吸附脂质中C<sub>5</sub>及以上的碳链,在不影响目标物回收率的情况下对脂质有非常强的选择吸附性,可很大限度地降低基质的干扰,方法灵敏度更高<sup>[11]</sup>。

由于动物类中药材基质复杂且目标真菌毒素高达23种,故免疫亲和柱不适用于本方法,故购置MFC100固相净化柱(青岛普瑞邦生物工程有限公司),MycoSpin

净化柱(美国Romer公司),Captiva EMR-Lipid净化柱、EMR-Lipid QuEChERS净化包(安捷伦科技<中国>有限公司)和自制不同配比的QuEChERS净化包进行加样回收试验。结果传统样品处理方法的加样回收率低,采用EMR-Lipid QuEChERS净化可吸附杂质、脂类和蛋白质,适用于多真菌毒素的净化,净化时间短,加样回收率在可接受范围,故选择EMR-Lipid QuEChERS净化包对样品进行前处理。

### 3.2 真菌毒素限量标准

2020年版《中国药典(一部)》在前几版药典标准的基础上,对易发霉变质的蜂房、土鳖虫等5个中药材品种增加黄曲霉毒素的限量要求,限度在品种项下;薏苡

表 4 23 种真菌毒素线性关系考察、检测限与定量限确定、加样回收试验结果  
Tab. 4 Results of the linear relation test, LOD, LOQ and the recovery test of 23 mycotoxins

| 真菌毒素                 | 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) | 加样回收试验                |                    |                |
|----------------------|------------------------------------------|----------|-------------------|------------------|------------------|-----------------------|--------------------|----------------|
|                      |                                          |          |                   |                  |                  | 添加量(μg / kg)          | 平均回收率(%)           | RSD(%)         |
| 黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> | <i>Y</i> = 51 306.9 <i>X</i> + 10 932.01 | 0.999 9  | 0.20~20.10        | 0.2              | 0.7              | 4.0/8.0/16.1          | 83.68/94.82/98.43  | 6.52/5.73/1.91 |
| 黄曲霉毒素 B <sub>2</sub> | <i>Y</i> = 36 999.4 <i>X</i> + 214.04    | 0.999 9  | 0.10~10.00        | 0.1              | 0.4              | 2.0/4.0/8.0           | 85.03/83.31/86.89  | 6.68/8.01/4.73 |
| 黄曲霉毒素 G <sub>1</sub> | <i>Y</i> = 19 554.1 <i>X</i> + 9 658.77  | 0.999 4  | 0.20~20.30        | 0.2              | 0.7              | 4.1/8.1/16.2          | 85.54/93.22/96.77  | 6.63/3.01/2.98 |
| 黄曲霉毒素 G <sub>2</sub> | <i>Y</i> = 13 268.9 <i>X</i> - 4 791.92  | 0.999 6  | 0.50~30.00        | 0.5              | 1.6              | 10.0/20.0/40.0        | 88.91/91.76/98.64  | 7.92/8.36/2.74 |
| 黄曲霉毒素 M <sub>1</sub> | <i>Y</i> = 21 753.5 <i>X</i> + 6 318.56  | 0.999 5  | 0.20~20.00        | 0.2              | 0.6              | 4.0/8.0/16.0          | 92.91/94.64/96.43  | 4.62/5.61/4.78 |
| 黄曲霉毒素 M <sub>2</sub> | <i>Y</i> = 26 274.1 <i>X</i> + 12 852.44 | 0.999 3  | 0.20~20.00        | 0.2              | 0.7              | 4.0/8.0/16.0          | 89.76/89.41/91.52  | 5.82/6.41/4.07 |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇            | <i>Y</i> = 2 852.9 <i>X</i> - 34 552.3   | 0.999 9  | 25.03~1 501.50    | 21.8             | 72.5             | 500.5/1 001.0/2 002.0 | 71.14/87.33/93.26  | 4.99/5.13/3.52 |
| 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇       | <i>Y</i> = 1 597.4 <i>X</i> - 5 823.67   | 0.999 4  | 10.00~500.00      | 12.1             | 40.4             | 200.0/400.0/800.0     | 87.82/93.74/92.29  | 6.71/5.87/2.91 |
| T-2 毒素               | <i>Y</i> = 11 044.5 <i>X</i> + 719.51    | 0.999 0  | 0.20~20.00        | 0.2              | 0.7              | 4.0/8.0/16.0          | 89.92/94.76/93.89  | 3.22/9.23/8.04 |
| HT-2 毒素              | <i>Y</i> = 1 587.6 <i>X</i> + 1 146.75   | 0.999 7  | 2.50~75.00        | 2.5              | 8.4              | 25.0/50.0/100.0       | 82.81/89.03/88.44  | 2.75/4.57/3.28 |
| 二乙酰镰刀菌烯醇             | <i>Y</i> = 20 789.6 <i>X</i> + 19 272.08 | 0.999 1  | 0.50~50.10        | 0.5              | 1.6              | 10.0/20.0/40.1        | 93.54/95.27/93.11  | 1.84/5.45/4.28 |
| 15-乙酰蛇形菌素            | <i>Y</i> = 8 711.1 <i>X</i> + 4 235.10   | 0.999 4  | 1.25~75.00        | 1.5              | 5.1              | 25.0/50.0/100.0       | 80.73/91.56/88.12  | 4.91/6.53/6.99 |
| 新茄病镰刀菌烯醇             | <i>Y</i> = 7 551.1 <i>X</i> + 8 234.51   | 0.999 4  | 1.01~101.00       | 1.0              | 3.2              | 20.2/40.4/80.8        | 85.71/91.76/93.94  | 8.22/5.03/4.29 |
| 玉米赤霉酮                | <i>Y</i> = 20 464.8 <i>X</i> + 25 760.59 | 0.999 6  | 0.50~30.00        | 0.6              | 2.1              | 10.0/20.0/40.0        | 100.71/91.92/93.74 | 3.82/7.28/3.79 |
| 玉米赤霉烯酮               | <i>Y</i> = 22 418.6 <i>X</i> + 754.89    | 0.999 9  | 0.20~20.20        | 0.2              | 0.7              | 4.0/8.1/16.2          | 89.54/96.27/93.41  | 8.21/4.32/2.96 |
| α-玉米赤霉醇              | <i>Y</i> = 22 462.6 <i>X</i> + 9 744.21  | 0.999 3  | 0.50~30.15        | 0.6              | 2.0              | 10.1/20.1/40.2        | 96.14/94.53/95.77  | 3.02/4.61/2.86 |
| α-玉米赤霉烯醇             | <i>Y</i> = 6 059.2 <i>X</i> + 1 192.19   | 0.999 0  | 0.50~30.15        | 0.5              | 1.7              | 10.1/20.1/40.2        | 94.91/97.04/96.85  | 2.81/1.64/1.85 |
| β-玉米赤霉醇              | <i>Y</i> = 25 019.5 <i>X</i> + 5 530.49  | 0.999 1  | 0.52~31.05        | 0.6              | 2.1              | 10.4/20.7/41.4        | 96.83/96.59/97.14  | 4.41/3.44/1.92 |
| β-玉米赤霉烯醇             | <i>Y</i> = 5 384.9 <i>X</i> - 1 918.41   | 0.999 5  | 0.50~30.15        | 0.6              | 1.9              | 10.1/20.1/40.2        | 76.23/79.02/90.63  | 3.77/7.59/3.11 |
| 交链孢酚                 | <i>Y</i> = 27 631.3 <i>X</i> + 24 192.91 | 0.999 8  | 1.00~50.00        | 1.1              | 3.8              | 10.0/20.0/40.0        | 97.61/98.22/91.27  | 1.88/2.82/5.74 |
| 交链孢霉甲基醚              | <i>Y</i> = 8 784.5 <i>X</i> + 9 800.43   | 0.999 4  | 1.01~50.25        | 1.1              | 3.7              | 10.1/20.1/40.2        | 96.24/97.12/91.88  | 2.52/2.03/4.24 |
| 交链孢霉烯                | <i>Y</i> = 253.3 <i>X</i> - 72.61        | 0.999 2  | 5.03~301.50       | 6.0              | 20.1             | 100.5/201.0/402.0     | 98.92/97.54/95.23  | 3.75/6.56/3.16 |
| 交链孢毒素 I              | <i>Y</i> = 3 274.6 <i>X</i> + 2 589.19   | 0.999 0  | 1.00~50.00        | 1.2              | 3.9              | 10.0/20.0/40.0        | 94.62/97.31/90.04  | 2.04/2.42/4.46 |

表 5 样品含量测定结果(μg / kg)  
Tab. 5 Results of the content determination of 23 mycotoxins in samples (μg / kg)

| 真菌毒素                 | 土鳖虫药材 / 饮片 |        |         |        |        | 含土鳖虫中药制剂 |          |        |        |        |          |
|----------------------|------------|--------|---------|--------|--------|----------|----------|--------|--------|--------|----------|
|                      | 202209     | 202210 | 2210001 | 220701 | 221202 | 2103019  | A2010020 | 120409 | P01008 | 211102 | A2111001 |
| 黄曲霉毒素 B <sub>1</sub> | —          | —      | 56.56   | —      | —      | —        | 9.57     | —      | —      | 3.74   | —        |
| 黄曲霉毒素 B <sub>2</sub> | —          | —      | 9.84    | —      | —      | —        | —        | —      | —      | 5.52   | 1.98     |
| 黄曲霉毒素 G <sub>1</sub> | 14.56      | —      | 27.33   | —      | 1.07   | —        | 3.24     | —      | —      | —      | —        |
| 黄曲霉毒素 G <sub>2</sub> | —          | —      | 2.82    | —      | —      | —        | —        | —      | —      | —      | —        |
| 黄曲霉毒素 M <sub>1</sub> | —          | —      | 1.41    | —      | —      | —        | —        | —      | —      | —      | —        |
| 玉米赤霉烯酮               | 22.99      | 13.00  | 11.01   | —      | 11.95  | 5.50     | —        | 1.56   | —      | —      | —        |
| α-玉米赤霉烯醇             | 13.38      | 7.58   | —       | —      | 2.65   | —        | —        | —      | 9.76   | —      | —        |
| β-玉米赤霉烯醇             | 7.52       | —      | —       | —      | —      | —        | —        | —      | 13.74  | —      | —        |
| 交链孢酚                 | 8.02       | —      | —       | —      | —      | 17.48    | 16.03    | 30.76  | 16.37  | —      | 9.86     |
| 交链孢霉甲基醚              | —          | —      | —       | —      | —      | 19.06    | 11.78    | 12.93  | 9.86   | —      | 7.28     |

注：— 为未检出。  
Note:— refers to not detected.

仁增加玉米赤霉烯酮的限量要求,每 1 000 g 含玉米赤霉烯酮不得过 500 μg。《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761 — 2017)详细规定了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、呕吐毒素、赭曲霉毒素 A 及玉米赤霉烯酮的限量

指标,同时规定了 10 类食品共 40 个限量指标,除特殊膳食食用食品外,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 限量 5~20 μg / kg,呕吐毒素在谷物及其制品中限量 1 000 μg / kg,赭曲霉毒素 A 限量 2~10 μg / kg,玉米赤霉烯酮限量 60 μg / kg<sup>[17]</sup>。我

国在中药中真菌毒素的限量制订研究方面基础薄弱,风险评估技术较缺失。建议参照食品领域已有的风险评估方法,结合中药中真菌毒素的监测数据及人群暴露量,尽快开展中药限量标准研究。

### 3.3 测定方法比较

李媛等<sup>[18]</sup>建立了同时测定6种含土鳖虫成方制剂中9种真菌毒素的QuEChERS结合超高效液相色谱-质谱(UPLC-MS)法,样品用自制QuEChERS包进行前处理,经10%甲酸乙腈提取,用PSA和无水硫酸镁进行净化。本研究中样品经20 mL 80%乙腈水溶液提取,离心后上清液用EMR-Lipid QuEChERS净化包净化,前处理方法更简单,结果更稳定,建立的方法包含了文献<sup>[18]</sup>中的6种真菌毒素的测定方法。结果除黄曲霉毒素B<sub>1</sub>和黄曲霉毒素B<sub>2</sub>的平均回收率略低于文献<sup>[18]</sup>外,黄曲霉毒素G<sub>1</sub>、黄曲霉毒素G<sub>2</sub>、T-2毒素、玉米赤霉烯酮的平均回收率均高于文献<sup>[18]</sup>,且检测限和定量限较低,方法更灵敏。

### 3.4 样品含量测定结果分析

2020年版《中国药典(一部)》规定,黄曲霉毒素B<sub>1</sub>不得高于5 μg/kg,黄曲霉毒素总量不得超过10 μg/kg。由表5可知,共有10批样品中检出了真菌毒素,其中4批样品黄曲霉毒素超出限量标准;玉米赤霉烯酮有检出,但检出量远低于限量标准;交链孢酚和交链孢霉甲基醚在6批样品中检出,是由链格孢属真菌产生的有毒次级代谢产物,有基因毒性、致裂性、致突变性、雌激素和雄激素效应等<sup>[19]</sup>,对人类和动物的健康构成了严重威胁,我国尚未制订相关限量标准,鉴于其毒性、污染范围及对人体的潜在危害,将链格孢毒素确定为“新兴真菌毒素”。

### 3.5 方法评价

本研究中建立的方法操作简便快速、结果准确,可用于土鳖虫及含土鳖虫中药制剂中真菌毒素的快速筛查。土鳖虫及含土鳖虫中药制剂感染真菌毒素的风险较大,应为土鳖虫及其中药制剂建立更完善的真菌毒素残留限量标准。

真菌毒素的产生与周围环境的温度、相对湿度、基质、pH值密切相关。动物药基质以蛋白质、脂肪、核酸等大分子为主,基质营养丰富,易霉变。目前,多数动物药并未明确规定冷藏、防潮等贮藏条件,霉变的样品在市场上多见。有研究表明,适宜的干燥程度和较低的贮藏温度可有效控制霉菌生长<sup>[4]</sup>,需进一步研究霉菌在不同条件下的生长规律,以控制污染,为土鳖虫药材、土鳖虫饮片及其中药制剂的安全使用提供保障。

### 参考文献

[1] 刘洋,宋亚刚,赵日开,等. 2020年版《中国药典》动物药应用

特点分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(14):218-224.

- [2] 王晶,徐硕,徐文峰,等.《中华人民共和国药典》(2020年版)中含土鳖虫成方制剂的归纳分析[J]. 临床药物治疗杂志,2022,20(8):66-69.
- [3] 杨丽,杨伍,苏学秀,等.土鳖虫研究概述[J]. 中国药物经济学,2023,18(5):116-118.
- [4] 王羿.不同饲喂方式干燥温度及储藏方式对土鳖虫药材品质的影响[D]. 南京:南京农业大学,2021.
- [5] 吴红涛.玉米储藏过程中主要真菌毒素变化规律研究[D]. 郑州:河南工业大学,2022.
- [6] 漆凤梅,饶小勇,何雁,等.中药饮片真菌污染现状与分析[J]. 江西中医药大学学报,2023,35(5):123-128.
- [7] 吴润松,叶聪,胡绮萍,等.中药材真菌毒素污染检测研究进展[J]. 广东化工,2024,51(4):76-79.
- [8] 温慧娇,廖芷晴,靳贵英.真菌毒素检测方法进展[J]. 中国药品标准,2023,24(5):465-475.
- [9] 袁迪,洪滨,张珊,等.食品中黄曲霉毒素样品前处理及检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2023,14(24):124-131.
- [10] 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,2020:19-20.
- [11] 周娜.QuEChERS EMR-Lipid技术结合气相色谱-热能分析仪法测定动物源性食品中7种亚硝胺类化合物[J]. 福建分析测试,2022,31(5):11-16.
- [12] 董蛟蛟,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.
- [13] 张丹,刘柏林,赵紫微,等.PRiME HLB柱净化-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定果蔬制品中5种新型真菌毒素[J]. 分析化学,2023,51(8):1343-1357.
- [14] 孟春杨,吴玉田,邹璐,等.免疫亲和柱净化-超高效液相色谱串联质谱法同时测定火锅底料中的5种真菌毒素[J]. 食品科技,2024,49(2):334-339.
- [15] 孙卫明,王权帅.多功能净化柱-超高效液相色谱-串联质谱法测定挂面、方便面中4种真菌毒素[J]. 中国卫生检验杂志,2021,31(6):662-665.
- [16] 苏碧玲,谢维平,欧阳燕玲,等.QuEChERS净化-超高效液相色谱-串联质谱法测定粮食制品中4种真菌毒素[J]. 中国食品卫生杂志,2018,30(1):34-37.
- [17] 食品安全标准与监测评估司.《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761—2017)及《食品安全国家标准 食品中污染物限量》(GB 2762—2017)解读[EB/OL]. (2017-04-14)[2024-05-17]. <http://www.nhc.gov.cn/sp/s3594/201704/ee3109697fa24ee4bb7a1030c924f406.shtml>.
- [18] 李媛,张楠,张亚锋,等.QuEChERS结合UHPLC-MS同时测定土鳖虫及其成方制剂中9种真菌毒素含量[J]. 中国现代中药,2022,24(1):142-146.
- [19] 李红花,宋福行.交链孢酚和交链孢酚单甲醚生物合成调控研究进展[J]. 中国食品学报,2022,22(7):328-334.

(收稿日期:2024-05-23;修回日期:2024-12-19)