超高效液相色谱-串联质谱法检测中草药中赭曲霉毒素 A

薛良辰[1]，刘陆[1]，郑璇[2]，姚丽锋[1]，冯家望[1]，蔡勤仁[1]

（1.珠海出入境检验检疫局，广东珠海 519015）（2.广东出入境检验检疫局，广东广州 510623）

摘要：本研究通过优化液相色谱条件和质谱条件，并结合碳酸氢钠溶液提取稀释的方法法有效克服了基质效应的干扰，建立了中草药中赭曲霉毒素 A 的超高效液相色谱-串联质谱法快速检方法。试样经碳酸氢钠溶液提取，超声波提取，再经过免疫亲和柱净化后，用 C18 液相色谱柱分离，多级反应选择离子正离子模式检测。经方法学验证，赭曲霉毒素 A 质量浓度在 0.1~50.0 μg/L 范围内呈现良好的线性关系，r>0.99；样品在 1.0、2.0 和 10.0 μg/kg 三个添加水平下的回收率为 78.5%~98.0%；相对标准偏差为 2.6%~11.8%；方法检出限为 1.0 μg/kg。将该方法应用于实际 8 批样品的检测，结果显示 8 批样品中检出 1 批的赭曲霉毒素 A 检测结果呈阳性(7.3 μg/kg)。实际样品检测结果表明，本方法可实现中草药中赭曲霉毒素 A 灵敏、准确的定性定量分析。

关键词：赭曲霉毒素A；超高效液相色谱串联质谱；中草药

文章篇号：1673-9078(2016)8-297-303 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.10.044

Determination of Ochratoxin A in Chinese Medicinal Plants by UHPLC-MS/MS

XUE Liang-chen[1], LIU Lu[1], ZHENG Xuan[2], YAO Li-feng[1], FENG Jia-wang[1], CAI Qin-ren[1]

(1.Zhuhai Inspection & Quarantine Bureau, Zhuhai 519015, China)

(2.Guangdong Inspection & Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

Abstract: A rapid method for the determination of ochratoxin A in Chinese medicinal plants using ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was established in this study. For this method, the conditions required for liquid chromatography (LC) and mass spectrometry (MS) were optimized and the matrix effects were overcome by extraction using sodium bicarbonate solution and dilution procedure. The ultrasonic-assisted extraction of ochratoxin A from the sample was carried out using sodium bicarbonate solution, followed by an immunoaffinity column clean-up procedure. The analytes were separated on a C18 LC column and detected on a mass spectrometer operating in the positive ion multiple reaction monitoring (MRM) mode. The method used in the present study was validated. Ochratoxin A concentration showed good linearity in the range of 0.1~50.0 μg/L, with an r-value>0.99. The average recoveries ranged between 78.5% and 98.0% at spike levels of 1.0, 2.0, and 10.0 μg/kg. The relative standard deviations (RSDs) were between 2.6% and 11.8%, and the limit of detection was 1.0 μg/kg. The validated method was applied for the detection of ochratoxin A in eight batches of samples, and the results showed one positive result per batch (7.3 μg/kg). The results of the real sample test indicate that this method can be used for the sensitive and accurate determination of ochratoxin A in Chinese medicinal plants.

Key words: ochratoxin A; ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS); Chinese medicinal plants

赭曲霉毒素A（Ochratoxins A）是赭色曲霉属和几种青霉属真菌产生的一种毒素。研究表明该毒素可损害动物的肾脏和肝脏，有致畸和致癌作用，被国际癌症研究机构定位2B类致癌物。WHO/FAO食品添加剂和污染物联合专家委员会专门制定了赭曲霉毒素A的暂定每周最大耐受剂量，而欧盟则评估了普通人群膳食暴露水平，另外，国际食品法典制定了食品中赭曲霉毒素A的限量及良好操作规范，以降低赭曲霉毒素A对人体健康的危害[1]。欧盟将其在谷物产品中的最大残留限量修订为3.0 μg/kg[2]。2010年欧盟增加了香辛调味料和甘草中赭曲霉毒素A的限量，分别不能超

收稿日期：2016-08-09

基金项目：2014 年珠海市本级农业专项资金项目(2014ZH26)

作者简介：薛良辰（1982-），男，硕士研究生，研究方向：食品安全检测

通讯作者：蔡勤仁（1964-），男，博士，高级工程师，研究方向：食品安全检测

过15~30 μg/kg和20 μg/kg[1]。2011年，我国规定谷物及其制品限量指标为5.0 μg/kg[3]。我国是中草药的发源地，目前大约有12000种药用植物，中草药是中医预防治疗疾病所使用的独特药物，也是中医区别于其他医学的重要标志，中草药在我国得到了人们广泛的认同与应用。但是，中草药如果保存不当，也会产生赭曲霉毒素A[4]。如甘草、橙花、姜黄、干姜和人参等中草药中赭曲霉毒素A的污染较多，特别是甘草污染水平普遍比较高，抽样显示50%的样品含量超过5.3 μg/kg[4]。如果服用了含有赭曲霉毒素A的中草药，不但达不到治病的目的，还可能给身体健康带来严重的后果，因此建立一种快速准确的检测方法是非常有必要的。目前,国内外检测赭曲霉毒素A的方法主要高效液相色谱法(HPLC)[5~16]、也有赭曲霉毒素A的高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)的研究报道[17~18]，但鲜有利用超高效液相色谱串联质谱快速检测中草药中赭曲霉毒素的研究报道，本研究建立了中草药中赭曲霉毒素的超高效液相串联质谱快速确证方法，该方法快速准确、灵敏度高，非常适合中草药中赭曲霉毒素A的快速检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

API 5500超高效液相色谱仪串联质谱仪；Turbo Vap LV氮吹浓缩仪；IKA MS3迷你振荡器；KQ-5200DE水浴超声波仪等实验室常用设备。赭曲霉毒素A，含量99.0%；乙酸铵、甲酸、乙腈、甲醇均为色谱纯；实验用水为超纯水，碳酸氢钠，磷酸二钠，磷酸氢二氢钾，氯化钠，氯化钾均为分析纯。PBS缓冲溶液：称取0.27 g磷酸二氢钾，1.42 g磷酸氢二钠，8 g氯化钠，0.2 g氯化钾，加去离子水约800 mL充分搅拌溶解，然后加入磷酸调pH至7.0，最后定容到1000 mL。30 g/L碳酸氢钠溶液：30 g碳酸氢钠，加去离子水溶解然后定容到1000 mL。

配制标准溶液时，甲醇溶解并定容，配制成质量浓度均为100 μg/mL标准储备液，再根据需要稀释成适当浓度的标准工作液，保存于4 ℃下，有效期为6个月。

1.2 前处理方法

1.2.1 提取

准确称取2.00±0.01 g样品于100 mL比色管中，加入80 mL 30 g/L碳酸氢钠溶液，超声提取15 min，用30 g/L碳酸氢钠溶液定容到100 mL。以12000 rpm离心5 min，取5 mL上清液与30 mL PBS缓冲液充分混匀，用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清，收集滤液于干净的容器中备用。

1.2.2 净化

将上述滤液全部过免疫亲和柱，流速约为1滴~2滴/s，然后用10 mL PBS缓冲液淋洗免疫亲和柱、20 mL水分两次淋洗免疫亲和柱，流速不超过5 mL/min，再用细微的真空抽滤5~10 s。接着用1.5 mL甲醇分3次洗脱，收集洗脱液于干净的玻璃试管中，于40 ℃水浴氮气吹至近干，用0.5 mL流动相溶解残渣，上机待测。

1.3 测定方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱：shin-packXR-ODS 2.0 mm×100 mm，3.0 μm，流动相：溶剂A是5 mmol/L乙酸铵(含有0.1%甲酸)，溶剂B为乙腈，梯度洗脱，在0~0.5 min内溶剂A体积分数90%保持0.5 min，在0.5~2.0 min内溶剂A体积分数从90%线性减少到15%，然后保持1.0 min，在3.0至4.0 min内溶剂A体积分数从15%线性增加到90%，然后保持1.5 min。流速0.2 mL/min，柱温40 ℃，进样量10 μL。

1.3.2 质谱条件

离子源：电喷雾离子源(ESI)；扫描方式：正离子扫描；检测方式：多反应选择离子检测；电喷雾电压：5500 V；雾化气：22 MPa，气帘气：30 MPa，辅助加热气：60 MPa；碰撞气：Medium，四种气体均为氮气；离子源温度：500 ℃；碰撞能量、去簇电压见表1。

表1 赭曲霉毒素A部分质谱参数

Table 1 LC-MS/MS parameters for the determination of ochratoxin A (OTA)

测定物质	母离子 /(*m/z*)	特征碎片离子 /(*m/z*)	碰撞能量 /ev	去簇电压 /ev
OTA	404.2	239.1*	31	100
		358.1	19	100

注：*标注的特征碎片离子是用来进行定量分析的离子对。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的优化

对色谱柱的选择，比较了 shin-packXR-ODS2.0 mm×100 mm，3.0 μm 与 EclipsePlusC_{18} 100 mm×2.1 mm，3.5 μm。采用 shin-packXR-ODS2.0mmid×100mm，3.0 μm 液相色谱柱进行色谱分离时，该组分的出峰时间稳定、分离度和峰形较好，且耐受性更好。本研究比较了乙腈-水溶液、乙腈-乙酸铵溶液（含有 0.1%甲酸）和甲醇-乙酸铵溶液（含有 0.1%甲酸）3 种体系对

赭曲霉毒素 A 的分离效果的影响，结果发现乙腈-水溶液、乙腈-乙酸铵（含有 0.1%甲酸）体系中因为乙腈的洗脱能力较强，可以使赭曲霉毒素 A 完全分离出来，可见这 2 种体系对赭曲霉毒素 A 的分离效果良好。但是，乙腈-水溶液体系中，质谱离子化效率较低，影响质谱的灵敏度，故而不选用乙腈-水溶液作为流动相。在甲醇-乙酸铵溶液（含有 0.1%甲酸）体系中，甲醇相对乙腈的洗脱能力较弱，对赭曲霉毒素 A 的分离效果较差，并且，甲醇粘度较高导致柱压较高，影响色谱柱寿命，故而也不选用甲醇-乙酸铵溶液（含有 0.1%甲酸）作为流动相。质谱检测采用正离子模式进行检测时，通常使用有一定酸度的流动相，以使被分析物容易质子化带上正电荷，加强离子化效率，从而提高检测的灵敏度。选用乙腈-乙酸铵溶液（含有 0.1%甲酸）体系时，赭曲霉毒素 A 得到良好的分离，并且可以有效改善峰形；同时可以大大提高质谱的离子化效率，从而提高检测的灵敏度，使其有较强的质谱响应值。进一步优化了乙酸铵缓冲液的浓度，以 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液和乙腈作为流动相，流速为 0.2 mL/min 时，目标分析物的分离效果较好，色谱峰形好。为得到赭曲霉毒素 A 良好的分离效果，对 5 mmol/L 乙酸铵（A）-乙腈（B）为流动相的洗脱条件进行了优化。为了获得更好的分离效果，需采用梯度洗脱，通过实验不断调整乙腈与乙酸铵的比例。最终，确定梯度洗脱程序见 2.3.1。

2.2 质谱条件的优化

根据赭曲霉毒素A的分子质量和分子结构，选择电喷雾离子源正离子扫描模式注射进样，将1.0 μg/mL标准溶液用标准进样方式,进样量为7 μL/s，以蠕动泵连续注射入质谱仪，在正离子模式下先进行一级质谱分析（Q1扫描），得到准分子离子峰[M+1]即*m/z* 404.2，优化去簇电压。对*m/z* 404.2进行二级质谱分析，得到碎片离子信息*m/z* 239.1、358.1、341.1，优化碰撞电压,然后对离子源温度、雾化气、气帘气等进行优化。再以多反应监测（MRM）正离子模式优化去簇电压、碰撞电压、碰撞室入口及出口电压等质谱参。分别选择丰度较强的2个子离子为特征离子*m/z* 239.1、358.1，且*m/z* 239.1有最大峰度，故选择*m/z* 239.1为定量离子，选择*m/z* 358.1为定性离子。以母离子与子离子组成监测离子对，进行定性和定量分析。

2.3 样品前处理条件的选择

在实际的实验过程中，萃取溶液的选择直接关系实验回收率的高低。为了获得理想的实验回收率，增加实验结果的可靠性，所以必须选择萃取效率高而且基质干扰尽可能小的提取溶液。赭曲霉毒素A易溶于甲醇和水。根据赭曲霉毒素A溶解性能，可选用不同比例的甲醇–水作为提取溶液，也可单独选用水溶液或甲醇作为提取溶液。实验证明，田七、土茯苓等中草药样品采用甲醇–水溶液或甲醇萃取，基质干扰很大，即使使用免疫亲和柱净化，仍然无法消除基质干扰，严重影响实验结果。因此选用水溶液作为提取溶液，而赭曲霉毒素A在弱碱性条件下，溶解性会更好，所以30 g/L碳酸氢钠溶液作为最终的萃取溶剂。实验表明，中草药样品采用30 g/L碳酸氢钠溶液提取率高，并且杂质干扰小。免疫亲和柱利用抗原抗体特异性可逆结合的特性的原理, 根据抗原抗体的高选择性, 将样品提取液过免疫亲和柱, 而非目标化合物则沿柱流下，最后用洗脱液洗脱目标化合物，从复杂样品中高效提取到纯净的目标化合物。另外免疫亲和柱与C_{18}固相萃取柱进行比较，实验表明免疫亲和柱过柱时间短、操作方便，并且杂质干扰小。

2.4 方法的检测限、回收率、重复性及线性范围

表2 赭曲霉毒素 A 的标准曲线和线性范围

Table 2 Standard curve and linear range of ochratoxin A

药物	线性范围/(μg/L)	标准曲线	相关系数
赭曲霉毒素 A	0.1~50	y=5.05e+005x+-1.7e+004	1.0000

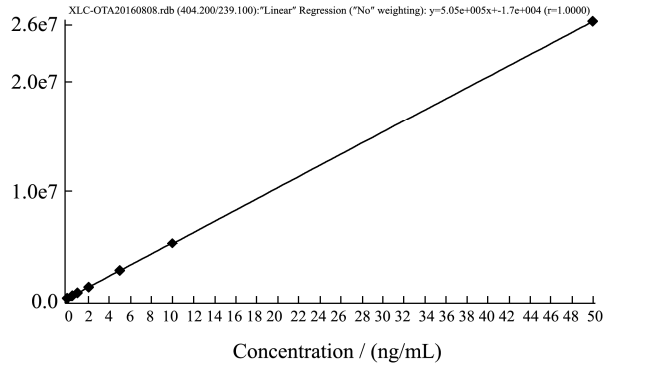


图1 标准曲线

Fig.1 Standard curve

在以上确定的测定条件下，配制标准系列(n=6), 分析化合物的浓度比为X轴，以分析化合物的峰面积比为Y轴绘制标准曲线，见图1。结果表明，赭曲霉毒素A浓度在0.1~100 μg/L范围内时，线性关系良好，其相关系数和回归方程见表2。

在空白样品中添加赭曲霉毒素A标准溶液，进行3个水平浓度添加回收试验，每个浓度做6个重复。在本

方法所确定的实验条件下，回收率和变异系数分别在78.5%~98.0%，2.6%~11.8%之间。本方法对中草药中赭曲霉毒素A的检测低限均为1.0 μg/kg。见表3，图谱见图2~11。

表3 5种空白样品的测定及基质添加回收实验结果

Table 3 Content and average spike recoveries of ochratoxin A in five blank samples (n=6)

样品名称	添加水平 /(μg/kg)	平均回收率 /%	相对标准偏差 /%
田七	1.0	78.5	11.8
	2.0	85.4	9.8
	10.0	88.7	11.2
土茯苓	1.0	82.5	10.1
	2.0	86.2	8.5
	10.0	90.0	6.3
山药	1.0	89.2	6.1
	2.0	91.6	8.5
	10.0	90.3	4.3
麦芽	1.0	92.7	5.1
	2.0	95.4	3.5
	10.0	91.8	3.3
薏米	1.0	95.2	3.6
	2.0	96.8	5.6
	10.0	98.0	2.6

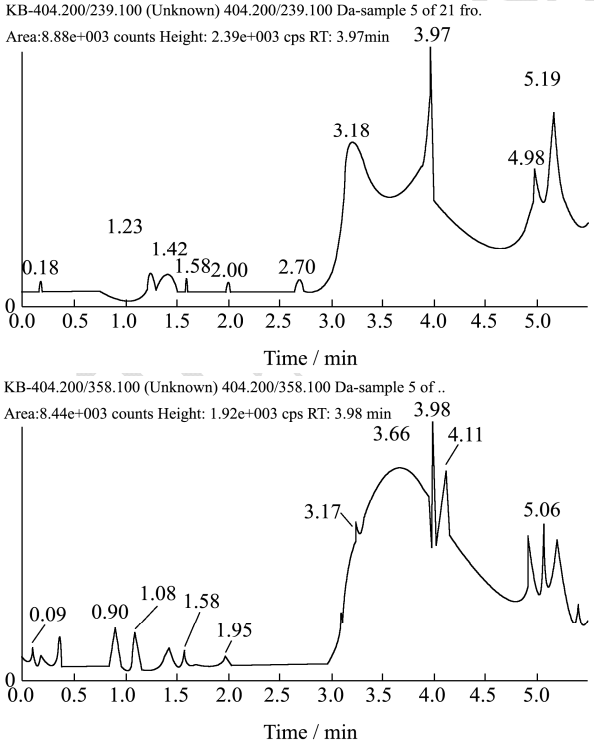


图 2 田七空白样品的重构离子色谱图

Fig.2 Reconstructed ion chromatogram of Tianqi blank samples

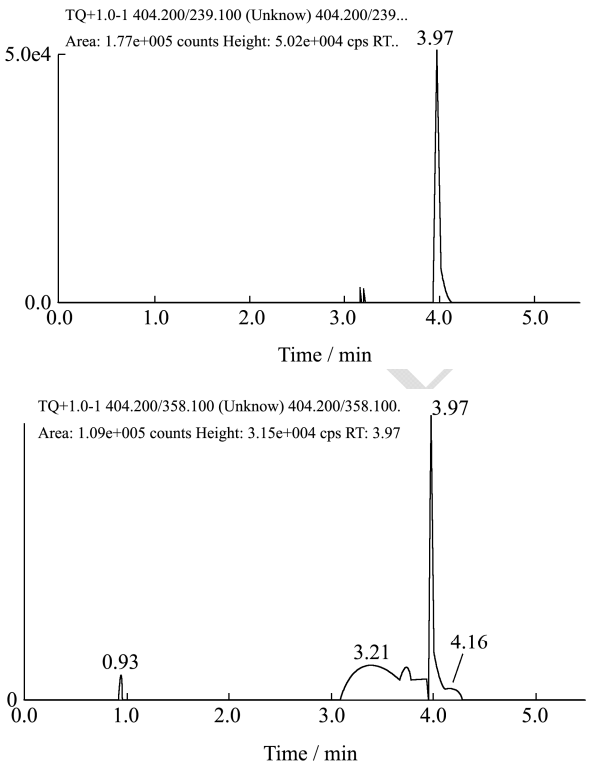


图 3 田七空白样品加标 1.0 μg/kg 的重构离子色谱图

Fig.3 Product ion spectrum of Tianqi blank extracts at a spike level of 1.0 μg/kg

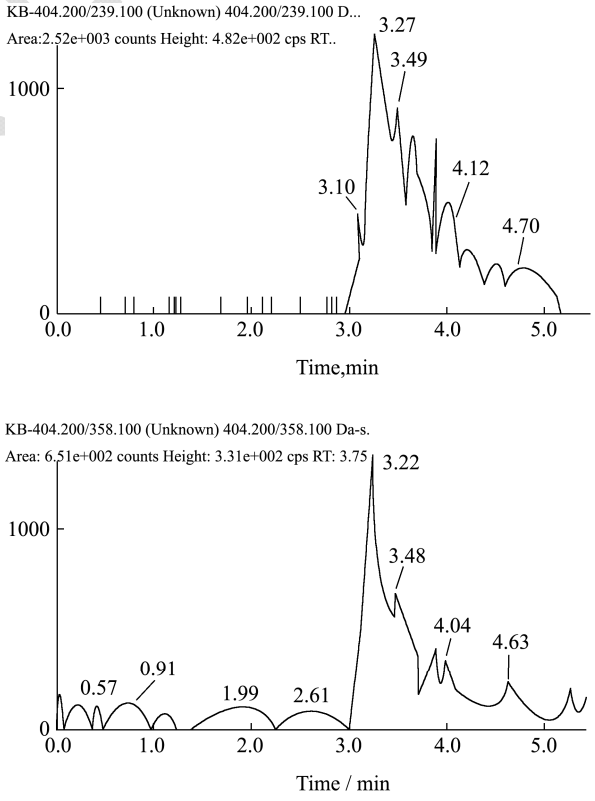
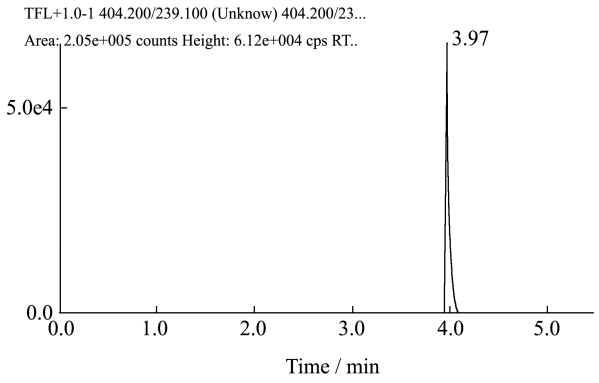


图 4 土茯苓空白样品的重构离子色谱图

Fig.4 Reconstructed ion chromatogram of Tuckahoe blank samples



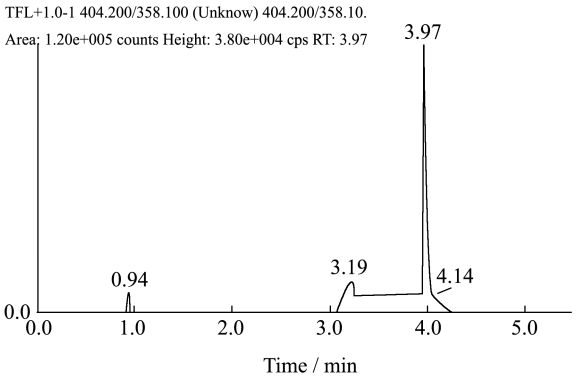
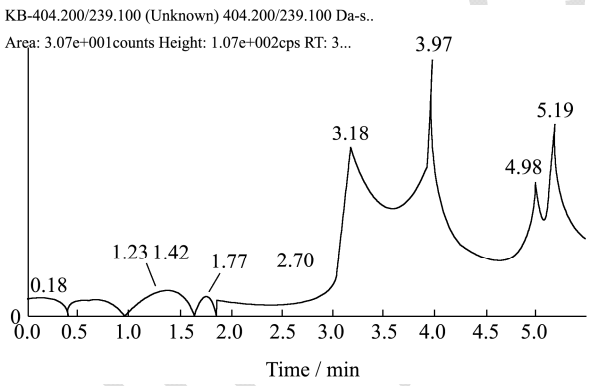


图 5 土茯苓空白样品加标 1.0 μg/kg 的重构离子色谱图

Fig.5 Product ion spectrum of Tuckahoe blank extracts at a spike level of 1.0 μg/kg



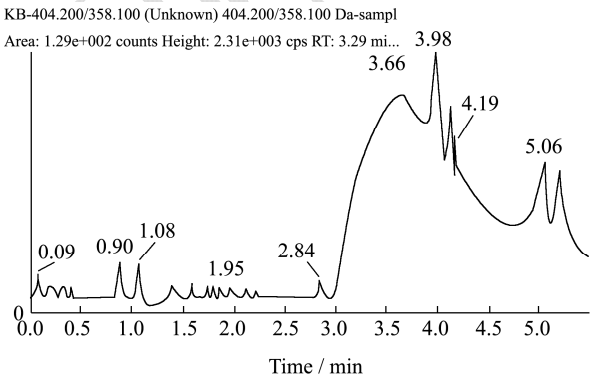
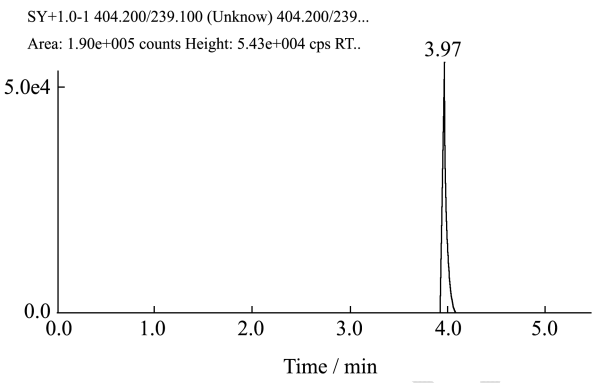


图 6 山药空白样品的重构离子色谱图

Fig.6 Reconstructed ion chromatogram of Yam blank samples



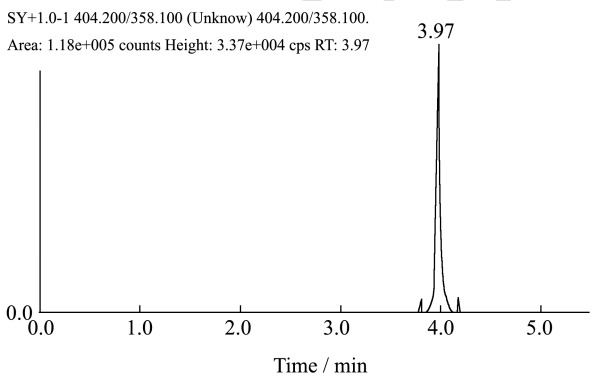
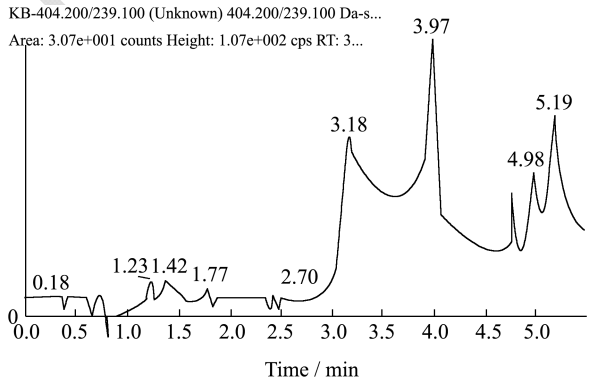


图 7 山药空白样品加标 1.0 μg/kg 的重构离子色谱图

Fig.7 Product ion spectrum of Yam blank extracts at a spike level of 1.0 μg/kg



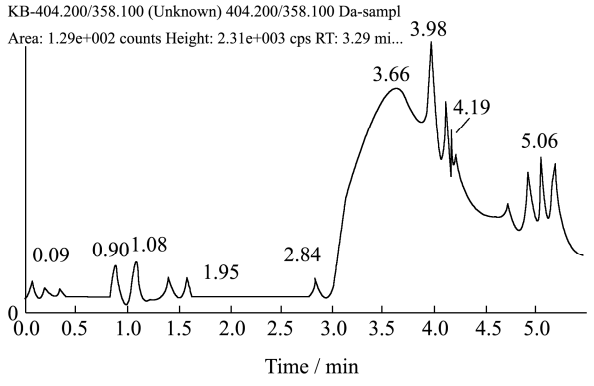


图 8 麦芽空白样品的重构离子色谱图

Fig.8 Reconstructed ion chromatogram of malt blank samples

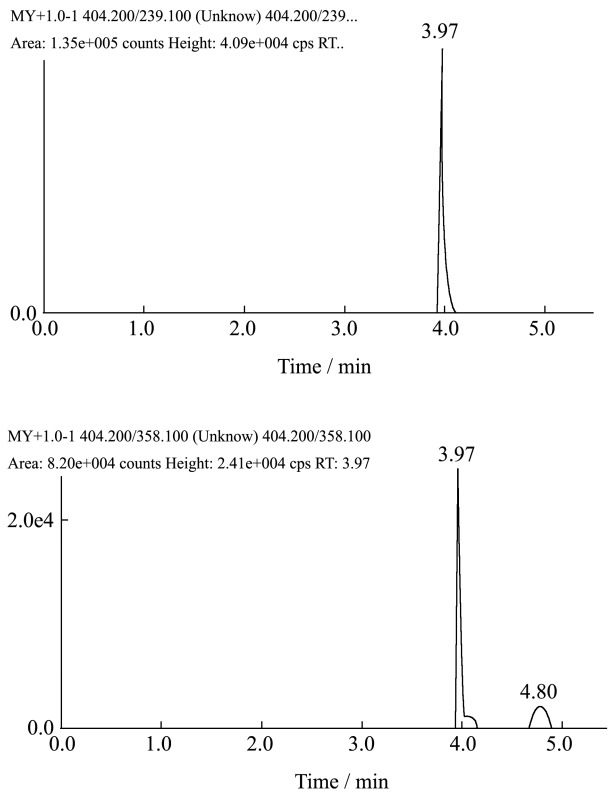


图 9 麦芽空白样品加标 1.0 μg/kg 的重构离子色谱图

Fig.9 Product ion spectrum of malt blank extracts at a spike level of 1.0 μg/kg

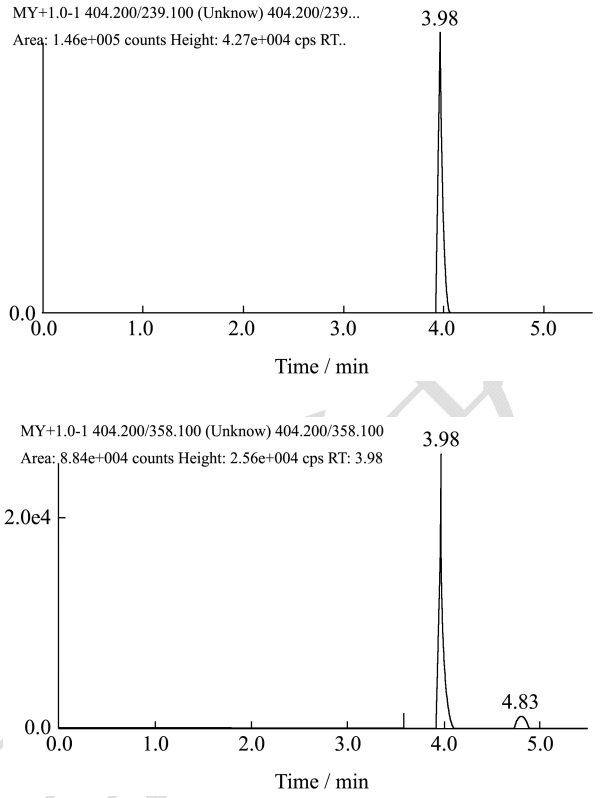


图 11 薏米空白样品加标 1.0 μg/kg 的重构离子色谱图

Fig.11 Product ion spectrum of barley blank extracts at a spike level of 1.0 μg/kg

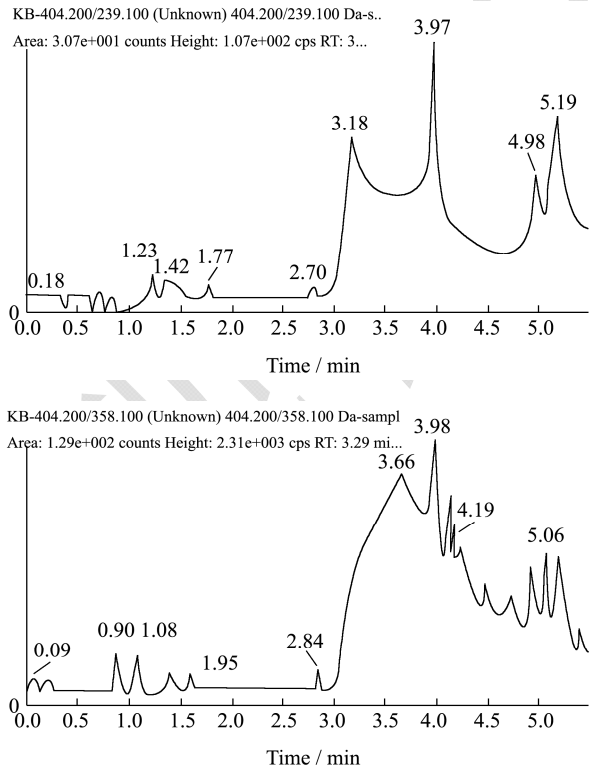


图 10 薏米空白样品的重构离子色谱图

Fig.10 Reconstructed ion chromatogram of barley blank samples

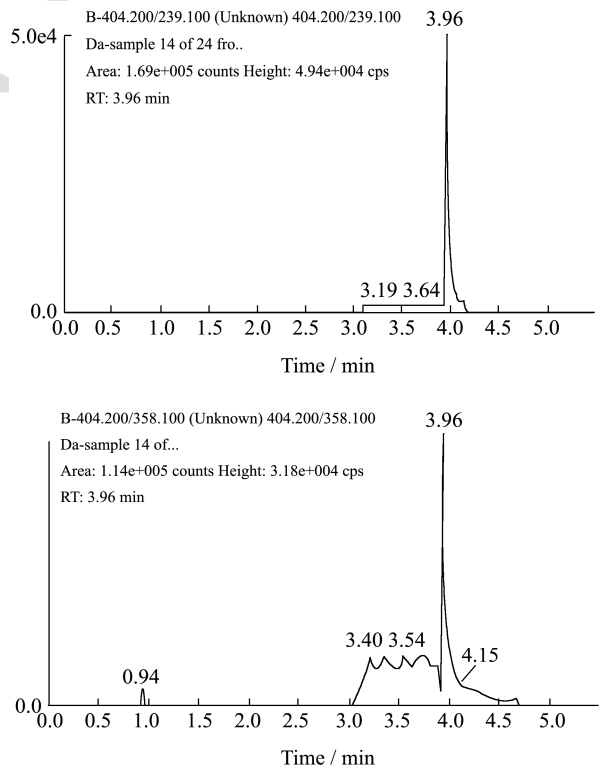


图 12 阳性可疑样品的重构离子色谱图

Fig.12 Reconstructed ion chromatograms of a suspected positive sample

2.5 样品测定结果

采用本实验建立的方法测定了市场上采购的8个常用中草药样品，分别为田七、土茯苓、山药、丹参、薏米、西洋参、百合、莲子。结果在所有被分析的样品中，田七、土茯苓、山药、薏米、西洋参、百合、莲子7个样品未发现OTA，丹参样品结果为7.3 μg/kg。

3 结论

本文建立了中草药中赭曲霉毒素A的超高效液相串联质谱快速确证方法，该方法适合中草药中赭曲霉毒素A的快速定量定性分析。目前高速匀质提取结合超声波辅助提取、免疫亲和柱净化和超高效液相串联质谱联用方法检测中草药中赭曲霉毒素A的方法报道较少。免疫亲和柱净化样品中赭曲霉毒素A，样品前处理简单，免疫亲和层析净化效果好，对赭曲霉毒素A的选择性富集强，对样品组分具有高效保留能力。在1.0~10 μg/kg的添加水平范围内的平均回收率为78.5%~98.0%；相对标准偏差为2.6%~11.8%；方法检测低限等指标满足国内外检测的相关要求。

参考文献

[1] 傅武胜,邱文倩,郑奎城,等.药食两用类食品中赭曲霉毒素A的高效液相色谱-荧光检测方法[J].食品科学,2011,32(14):298-302
FU Wu-sheng, QIU Wen-qian, ZHENG Kui-cheng, et al. Determination of ochratoxin a in edible and medicinal foods by HPLC-Fluorescence technology [J]. Food Science, 2011, 32(14): 298-302

[2] Commission Regulation (EU) No. 594/2012, Amending Regulation (EC) 1881/2006 as regards the maximum levels of the contaminants ochratoxin a, nondioxin-like PCBs and melamine in foodstuffs [S]

[3] GB 2761-2011,食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S]
GB 2761-2011, National food safety standard limits of mycotoxins in food [S]

[4] 李峻媛,万丽,杨美华.真菌毒素限量标准及其在中药中的研究进展[J].中草药,2011,42(3):602-609
LI Jun-yuan, WAN Li, YANG Mei-hua. Limit standard of mycotoxins and advances in studies on its application in Chinese materia medica [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(3): 602-609

[5] GB/T 23502-2009,中华人民共和国国标食品中赭曲霉毒素A的测定免疫亲和层析净化高效液相色谱法[S]
GB/T 23502-2009, Determination of ochratoxin A in food-high performanceliquid chromatographic method with immunoaffinity column clean-up [S]

[6] Visconti A, Pasoal M. Gianlaca centonze determination of ochratoxin A in domestic and imported beers in Italy [J]. Journal of Chromatography A, 2000, 11: 32-326

[7] Wood G M, Patel S, Entwisle A C, et al. Ochratoxin A in wheat a second intercomparison of procedures [J]. Food Addit. Contam., 1996, 13: 519-539

[8] Gizzi G, Vincent U, Vonholst C, et al. Validation of an analytical method for the determination of carbadox and olaquindox in feedstuff by liquid chromatography coupled to UV and/or diode array detection [J]. Food Addit. Contam., 2007, 24(11): 26-35

[9] 褚庆华,郭德华,王敏,等.谷物和酒类中赭曲霉毒素 A 的测定[J].中国国境卫生检疫杂志,2006,29(2):109-117
Chu Qing-hua, Guo De-hua, Wang Min, et al. Detection of ochratoxin A in cereals and wine [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2006, 29(2): 109-117

[10] 吴剑威,谭丽杰,赵润怀,等.免疫亲合柱-高效液相色谱检测中药中赭曲霉毒素[J].中草药,2011,42(8):1557-1559
WU Jian-wei, TAN Li-jie, ZHAO Run-huai, et al. Analysis of ochratoxin A in Chinese materia medica herbs by immunoaffinity column-HPLC [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2011, 42(8): 1557-1559

[11] 乐渊,刘春华,徐志,等.UPLC-MS/MS 法测定生咖啡中的赭曲霉毒素 A[J].热带农业科学,2012,32(12):87-90
LE Yuan, LIU Chun-hua, XU Zhi, et al. Detection of ochratoxin a in green coffee by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2012, 32(12): 87-90

[12] Isil A, Derya K. Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey [J]. Food Chemistry, 2014, 157: 70-76

[13] Jarmila S, Vladimir O, Frantisek M, et al. Determination of ochratoxin A in food by high performance liquid chromatography [J]. Analytical Letters, 2013, 46(10): 1495-1504

[14] Wu Xi-mei, Hu Jun, Zhu Bing-hui, et al. Aptamer-targeted magnetic nanospheres as a solid-phase extraction sorbent for determination of ochratoxin A in food samples [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(41): 7341-7346

[15] Aurelie R, Pauline B, Anais B, et al. Analysis of ochratoxin A in grapes, musts and wines by LC-MS/MS: First comparison of stable isotope dilution assay and diastereomeric dilution

assay methods [J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 818: 39-45

[16] 刘红河,康莉,毛丽莎,等.高效液相色谱-串联质谱联用法同时测定粮食中 12 种霉菌毒素[J].中国卫生检志,2014,24(5): 633-638
LIU Hong-he, KANG Li, MAO Li-sha, et al. High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry food simultaneous determination of 12 mycotoxins [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2014, 24(5):633-638

[17] 史娜,路勇,吴颖,等.高效液相色谱-串联质谱法测食品中的赭曲霉毒素 A[J].食品科学,2011,32(18):260-263
SHI Na, LU Yong, WU Ying, et al. Analysis of Ochratoxin A in foods by HPLC-MS/MS [J]. Food Science, 2011, 32(18): 260-263

现代食品科技