

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241126001

引用格式: 李文廷, 叶沛, 刘玲, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中雷公藤和乌头类 10 种植物毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 84-92.

LI WT, YE P, LIU L, *et al.* Simultaneous determination of 10 kinds of phytotoxins of tripterygium wilfordii and aconitum in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 84-92. (in Chinese with English abstract).

超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中 雷公藤和乌头类 10 种植物毒素

李文廷^{1#}, 叶沛^{1,2#}, 刘玲^{1,2}, 申颖¹, 李洁¹, 陶蓉蓉^{1,2}, 余俊娥^{3*}, 蒋孟圆^{4*}

(1. 昆明市疾病预防控制中心, 昆明 650228; 2. 昆明医科大学公共卫生学院, 昆明 650500;

3. 昆明市寻甸县疾病预防控制中心, 昆明 655215; 4. 云南民族大学民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 昆明 650504)

摘要: 目的 建立超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中雷公藤类、乌头类 10 种植物毒素的方法。

方法 样品采用 1%甲酸水-70%乙腈水溶液涡旋提取, 经高速离心后, 取上清液加入适量 N-丙基乙二胺 (primary secondary amine, PSA), 振荡混匀, 过 0.22 μm 滤膜, 上机测定分析, 采取基质工作曲线, 外标法定量。**结果** 10 种植物毒素的检出限为 0.03~1.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。10 种植物毒素在一定的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.999。3 种不同浓度加标水平下, 植物毒素的平均加标回收率范围为 89.5%~113.8%, 相对标准偏差为 0.5%~8.7%。**结论** 该测定方法操作便捷、灵敏度高, 准确性强, 为应急事件中植物毒素快速筛查提供技术支持, 适用于实验室对蜂蜜样品特别是批量样品中多种植物毒素的同时测定分析。

关键词: 植物毒素; 雷公藤类毒素; 乌头类毒素; 蜂蜜; 超高效液相色谱-串联质谱法

Simultaneous determination of 10 kinds of phytotoxins of tripterygium wilfordii and aconitum in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LI Wen-Ting^{1#}, YE Pei^{1,2#}, LIU Ling^{1,2}, SHEN Ying¹, LI Jie¹, TAO Rong-Rong^{1,2},
YU Jun-E^{3*}, JIANG Meng-Yuan^{4*}

(1. Kunming Center for Disease Control and Prevention, Kunming 650228, China; 2. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 3. Xundian County Center for Disease Control and Prevention, Kunming 655215, China; 4. Key Laboratory of Chemistry in Ethnic Medicinal Resources, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan Minzu University, Kunming 650504, China)

收稿日期: 2024-11-26

基金项目: 云南省基础研究计划项目(202401AT070040); 昆明市科技计划项目(昆科计字 2024-1-NS-0034); 昆明市卫生科技人才培养项目[2022-SW(带头)-16]

#李文廷和叶沛为共同第一作者

第一作者: 李文廷(1982—), 男, 硕士, 副主任技师, 主要研究方向为真菌毒素和植物毒素的防控。E-mail: lwt0883@qq.com

叶沛(2000—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为植物毒素防控。E-mail: 343942217@qq.com

*通信作者: 余俊娥(1986—), 女, 主管医师, 主要研究方向为疾病预防控制。E-mail: 493626157@qq.com

蒋孟圆(1983—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为药物检测分析。E-mail: jmy0778@163.com

ABSTRACT: Objective To establish a method for the simultaneous determination of 10 kinds of phytotoxins, including tripterygium wilfordii and aconite in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** The samples were extracted by vortexing with 1% formic acid water-70% acetonitrile water solution. After high-speed centrifuged, added appropriate amount of primary secondary amine (PSA) to the supernatant, and shaken and mixed evenly, passed through 0.22 μm filter membrane, then determined and analyzed by the instrument. The matrix working curve was used for quantification by the external standard method. **Results** The limits of detection of 10 kinds of phytotoxins were 0.03–1.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The 10 kinds of phytotoxins showed good linearity in a certain range of mass concentration with the correlation coefficients were all greater than 0.999. The average recovery rates of toxins ranged from 89.5% to 113.8% at 3 kinds of different concentration spiked levels, and the relative standard deviations of 0.5%–8.7%. **Conclusion** The method is convenient, sensitive and accurate, and provides technical support for rapid screening of phytotoxins in emergencies. It is suitable for simultaneous determination of various phytotoxins in honey samples, especially in batch samples.

KEY WORDS: phytotoxin; tripterygium wilfordii toxoid; aconitum toxoid; honey; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引 言

蜂蜜是一种深受广大人民群众喜爱的天然甜味剂, 含有丰富的营养物质, 如葡萄糖、抗坏血酸、类胡萝卜素和葡萄糖氧化酶等, 不仅为机体提供能量, 还具有抗炎和抗氧化功能^[1-2]。然而, 蜜蜂在采集花蜜过程中极有可能将部分有毒植物毒素带入蜂蜜中, 从而存在引发食物中毒应急事件的风险。若误食有毒蜂蜜可能会造成腹痛腹泻、恶心呕吐等症状, 严重者甚至会导致休克或死亡^[3], 其中毒症状及严重程度与蜂蜜中所含毒素的种类息息相关。

蜂蜜中常见的植物毒素有雷公藤类、马桑类、乌头类及其代谢产物等毒素。雷公藤作为一种传统的中药材, 适当摄入具有良好的保健功能^[4-5], 过量摄入易对肝肾等内脏系统造成严重损害^[6-7], 还可能引起女性生理期紊乱甚至不孕以及男性生殖障碍等症^[8-10]。误食马桑类植物通常会导致兴奋、痉挛等症^[11-12]。乌头类毒素是常存在于乌头属植物中的生物碱, 适当的摄入可为机体带来良好的调理作用, 例如祛风除湿、抗炎镇痛、抗肿瘤等功能^[13], 一旦摄入过量则会造成消化系统、神经系统以及心血管系统等器官严重损害^[13]。2004—2020 年, 云南省蜂蜜中毒事件共 19 起, 其中 84 人发病, 27 人死亡, 死亡率高达 32.14%^[14-15], 野生蜂蜜中毒的死亡率在 20% 以上^[16]。

目前, GB 14963—2011《食品安全国家标准 蜂蜜》中明确规定: 蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露应安全无毒, 不得来源于雷公藤、博落回、狼毒等有毒蜜源植物。但是, 目前针对蜂蜜中植物毒素的检测方法尚无相应的国家标准, 检测方法主要有高效液相色谱法^[17-19]、液相色谱-串联质谱法^[20-25]及液相色谱-串联飞行时间质谱法^[26-29]。高效液相色谱法易受样品中各种基质的干扰; 目前大部分的研究均采用高效液相色谱-串联质谱法, 其检测方便, 灵敏度高, 准

确度好, 适用于多种毒素的同时检测。

近年来, 主要偏向于研究蜂蜜中农药残留、抗生素以及营养成分等的测定^[30-33], 蜂蜜中植物毒素的测定则多数为吡咯里西啶类生物碱, 有关雷公藤类和乌头类毒素的测定相对较少^[26,34-35], 云南由于其独特的气候条件赋予了植物王国称号, 同时也增加了蜂蜜中存在多种植物毒素的风险, 结合云南常见引发食物中毒事件的植物毒素, 蜂蜜中所含雷公藤和乌头类毒素亦不容忽视^[36-37], 本研究通过蜂蜜样品前处理条件、质谱参数及色谱条件的优化, 并对方法进行验证, 以期建立科学、高效、准确的同时检测蜂蜜中 10 种植物毒素的测定方法, 旨在保障蜂蜜的食用安全以及实现快速应对公共卫生应急中毒事件中植物毒素的快速筛查, 为植物毒素中毒事件的防控及医疗诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 样品信息

蜂蜜样品购自超市、农贸市场、商店及网络商店, 共计 61 件, 产地为云南 22 件, 江西 12 件, 福建 2 件, 湖南 1 件, 湖北 2 件, 广西 2 件, 浙江 2 件, 上海 1 件, 山东 1 件, 河北 1 件, 产地不详 15 件, 散装为 12 件, 预包装 49 件。

1.2 仪器

QTRAP 4500 质谱仪(美国 AB SCIEX 公司); 1290 Infinity II 型高效液相色谱(美国 Agilent Technologies 公司); Multi Reax Fu 多位试管振荡器(德国 Heidolph 公司); Allegra X-30R Centrifuge 高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); XS205DU 十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm , 美国 Waters 公司)。

1.3 试剂

甲醇、乙腈[纯度 $\geq 99.9\%$, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 甲酸(色谱纯, 美国 ROE SCIENTIFIC INC 公司); Bondesil C₁₈ 散装净化剂、N-丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)净化剂(美国 Agilent 公司)。

雷公藤吉碱、雷公藤春碱(纯度 $\geq 95\%$)、雷公藤次碱、雷公藤定碱、雷酚内酯、雷公藤内酯酮、雷公藤甲素、乌头碱(纯度 $\geq 98\%$)(乐美天医药/德斯特生物公司); 马桑宁、新乌头碱、次乌头碱(纯度 $\geq 98\%$)(武汉天植生物技术有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 色谱条件

色谱柱: BEH C₁₈ 柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.7 μ m); 流动相: A 相为甲醇, B 相为 0.1%甲酸水溶液; 柱温: 40 $^{\circ}$ C; 流速 0.3 mL/min; 进样体积: 5 μ L。

1.4.2 质谱条件

电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)正离子模式(ESI+)扫描; 多反应监测(multiple reaction monitoring MRM)模式检测; 离子源温度为 550 $^{\circ}$ C; 离子喷雾电压 5500 V。

1.4.3 标准溶液制备

分别用甲醇溶解 10 种固体标准物质得标准储备液, 根据各植物毒素的响应强度用 15%甲醇水溶液稀释得混合标准使用液, 采用未检出目标化合物的蜂蜜样品配制基质标准工作系列浓度。

1.4.4 样品处理

精确称取蜂蜜样品 1.0 g 于 10 mL 离心管中, 加入 10 mL 1%甲酸水-70%乙腈水溶液涡旋提取 20 min, 离心机 8000 r/min 离心 5 min, 取上清液 3 mL, 加入 10 mg PSA, 振荡混匀, 经 0.22 μ m 滤膜过滤, 备测。

1.5 数据处理

仪器数据处理分析软件为 MultiQuant 3.0, 再采用 Excel 2016 进行数据整理和分析, 实验重复 3 次测定, 结果用平均值 \pm 标准偏差表示。

2 结果与分析

2.1 质谱参数的优化

采用针泵恒流注入方式注入 10 种植物毒素的单标溶液进行质谱参数确认。ESI+扫描, 利用 Q1 MS 扫描模式寻找一级质谱母离子, 通过 Product Ion Scan (MS2)扫描模式寻找二级质谱碎片离子信息, 选择响应程度稳定和最强的前 2 个碎片离子分别作为定量定性离子, 最后用 MRM 扫描模式优化质谱参数去簇电压及碰撞能量, 详见表 1。

表 1 10 种植物毒素质谱参数

Table 1 Mass spectrum parameters of 10 kinds of phytotoxins

化合物名称	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	去簇 电压/V	碰撞 能量/V
雷公藤吉碱	858.2	206.0 [*] /686.3	200	47/46
雷公藤甲素	361.3	145.2 [*] /157.1	115	36/37
雷公藤春碱	874.3	846.4 [*] /856.3	160	34/36
雷酚内酯	313.3	225.2 [*] /253.1	110	29/28
雷公藤定碱	884.3	856.2 [*] /866.2	140	35/37
雷公藤次碱	868.3	686.2 [*] /850.2	200	45/38
雷公藤内酯酮	359.2	155.2 [*] /128.1	105	50/43
新乌头碱	632.3	572.3 [*] /354.1	130	44/52
乌头碱	646.3	586.5 [*] /526.3	125	44/51
次乌头碱	616.6	556.3 [*] /524.2	120	41/48

注: *为定量离子。

2.2 色谱条件的优化

10 种植物毒素易溶于甲醇和乙腈, 通过对流动相组成和配比的考察, B 相为纯水时目标色谱峰的响应强度较低甚至部分目标峰未出现, 加入甲酸后能显著提高目标峰的响应强度, A 相为乙腈时各植物毒素的响应强度差别太大, 如图 1 所示, 色谱峰分离度欠缺, 而在甲醇的洗脱下可获得较佳的响应值和分离效果, 因此确定流动相为甲醇-0.1%甲酸水并进行梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~2.0 min, 10%~15% A; 2.0~3.0 min, 15%~25% A; 3.0~4.0 min, 25% A; 4.0~4.1 min, 25%~45% A; 4.1~5.0 min, 45%~80% A; 5.0~6.8 min, 80%~95% A; 6.8~6.9 min, 95%~100% A; 6.9~8.5 min, 100% A; 8.5~8.6 min, 100%~10% A; 8.6~10.0 min, 10% A; 分离效果如图 2 所示, 植物毒素离子色谱图见图 3。

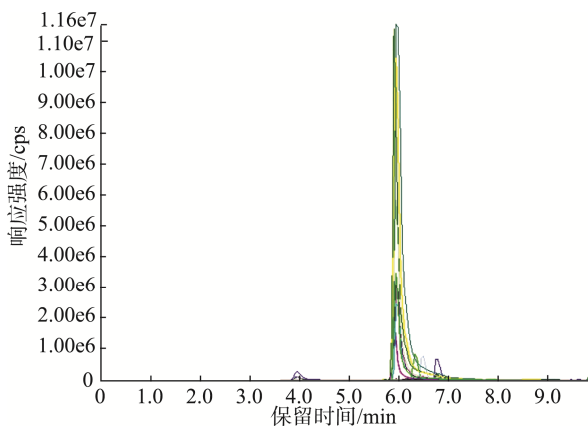


图 1 乙腈-0.1%甲酸水条件下的总离子色谱图
Fig.1 Total ion chromatogram with acetonitrile-0.1% formic acid in water

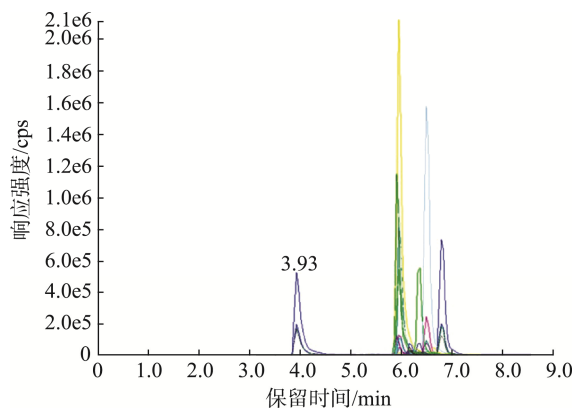


图 2 甲醇-0.1%甲酸水条件下的总离子色谱图
Fig.2 Total ion chromatogram of methanol-0.1% formic acid in water

2.3 样品提取条件考察

2.3.1 甲醇水和乙腈水提取剂考察

通过不同比例的甲醇水溶液及乙腈水溶液对目标化合物进行提取条件考察, 采用 50%以上浓度的乙腈水溶液进行毒素提取时, 离心后有机相和水相分层情况良好, 但马桑宁的提取率均低于 70%, 而未出现分层的甲醇水和 30%乙腈水提取溶液所得马桑宁提取率均在合理范围内

(如表 2、3), 推测马桑宁主要存在于水相中, 因此, 后续实验中可针对马桑宁进行单独实验。除此之外, 由于不同比例的甲醇溶液及 30%乙腈水溶液经提取离心后均不分层, 进样时其中的糖分可能对色谱柱及最终结果产生影响, 因此不适用于蜂蜜中 10 种雷公藤毒素的提取。

通过不同比例乙腈水提取液的提取效果分析, 如表 3 所示, 100%乙腈水对 10 种毒素的提取率大部分均在 80% 以下; 80% 乙腈水对雷公藤次碱的提取率高达 122.86%±0.07%; 50%乙腈水仅对 4 种毒素提取效果较好, 结合成本考虑, 最终选择 70%乙腈水作为最佳提取试剂。

为了更好地确保实验结果的准确性, 本研究还对 70%乙腈水的提取体积进行了考察, 结果如图 4 所示。3 mL 提取试剂由于体积较少, 可能存在提取不充分的情况, 仅对 5 种毒素的提取效果较为理想。随着提取试剂体积分量的逐步增加, 10 种毒素的提取效果也在逐渐优化, 5 mL 的提取试剂仅对雷公藤春碱、雷公藤定碱、新乌头碱 3 种毒素的提取效果不佳, 8 mL 的提取试剂仅对雷公藤春碱的提取率较差, 而 10 mL 和 15 mL 的提取试剂所得 10 种毒素的提取率则均在 80%~120%范围内。而 20 mL 提取试剂时所得提取效果则有所欠佳, 因此, 选择 10 mL 作为提取试剂最佳体积。

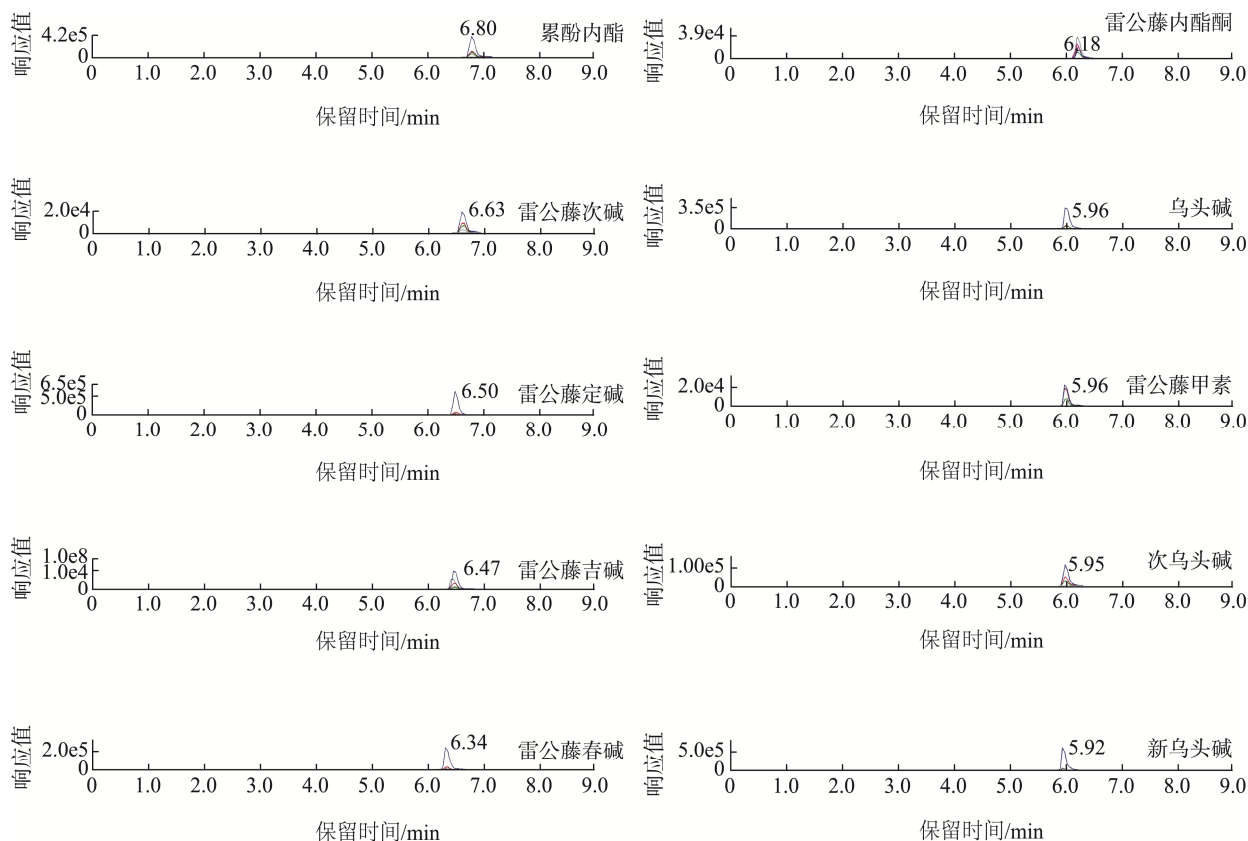


图 3 植物毒素离子色谱图
Fig.3 Ion chromatogram of various phytotoxins

表 2 甲醇水提取剂对回收率的影响(%)
Table 2 Effects of methanol water extractant on recovery rate (%)

甲醇浓度/%	雷公藤吉碱	雷公藤甲素	雷公藤春碱	累酚内酯	雷公藤定碱	雷公藤次碱	雷公藤内酯酮	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
30	114.37±1.72	65.76±7.01	77.43±5.40	73.03±4.72	76.58±2.82	72.94±3.59	95.50±1.68	71.86±1.17	67.37±4.53	73.35±5.37
50	78.46±7.83	109.40±0.59	75.03±1.48	82.67±0.45	76.86±8.39	86.39±1.56	55.83±9.04	65.80±0.34	69.92±9.62	69.30±1.65
70	102.23±1.87	90.64±1.76	106.49±1.52	74.88±1.88	105.02±3.06	75.06±2.85	74.74±6.98	57.06±4.12	56.46±3.36	58.03±3.47
80	78.03±6.59	63.39±2.35	79.24±9.41	80.09±4.76	81.27±2.55	59.83±6.66	84.42±0.83	70.00±3.79	71.01±9.46	70.31±8.25
90	65.12±7.18	62.81±8.45	74.89±4.52	82.72±2.94	77.67±8.67	93.47±2.56	94.75±2.80	64.40±1.75	62.60±5.69	68.47±3.60
100	74.3±0.32	67.79±3.79	71.44±6.62	78.09±2.38	76.43±5.98	69.07±2.48	85.86±5.47	65.67±1.86	68.06±8.26	71.11±5.44

表 3 乙腈水提取剂对回收率的影响(%)
Table 3 Effects of acetonitrile water extractant on recovery rate (%)

乙腈浓度/%	雷公藤吉碱	雷公藤甲素	雷公藤春碱	累酚内酯	雷公藤定碱	雷公藤次碱	雷公藤内酯酮	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
30	96.64±1.00	90.44±3.47	83.18±1.08	77.42±8.53	77.27±3.22	73.24±8.36	80.66±4.29	79.70±9.71	76.36±9.64	75.06±5.34
50	84.25±0.33	58.35±0.79	81.80±4.88	80.42±8.01	83.35±2.95	65.01±3.55	70.33±1.55	70.26±2.03	66.64±7.63	76.06±2.34
70	104.02±3.16	87.30±6.45	109.21±6.21	109.78±8.97	110.78±2.07	108.16±5.72	118.23±5.48	96.26±3.29	85.70±3.39	94.44±8.65
80	102.39±2.90	82.55±2.65	101.46±5.45	98.70±0.23	105.11±2.03	122.86±0.07	98.25±2.89	91.94±1.13	86.14±3.31	98.24±4.40
90	85.35±0.62	96.26±0.44	92.17±0.69	94.61±5.39	94.66±8.99	96.70±1.72	89.40±5.34	98.99±6.43	79.70±3.12	98.75±0.91
100	48.05±3.15	39.12±3.20	44.83±0.79	46.02±1.14	48.05±3.39	86.31±1.43	47.60±3.15	44.33±8.85	42.57±6.31	42.25±1.86

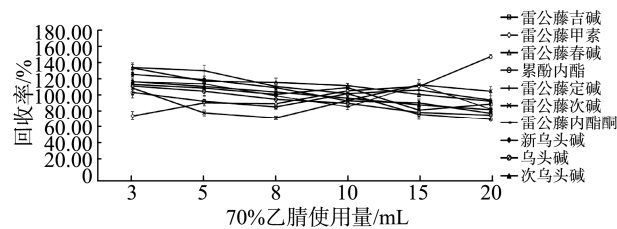


图 4 70%乙腈水提取体积对回收率影响的考察

Fig.4 Effects of extraction volume of 70% acetonitrile water on recovery rate

2.3.2 甲酸水提取剂考察

考虑蜂蜜中植物毒素大多为偏弱碱性的生物碱,使用弱酸性溶液能更容易提取。通过对不同体积分数甲酸水进行考察,结果如图 5 所示,0.1%、0.2%、0.5% 3 种体积分数的甲酸水对 10 种毒素的总体提取效果均不理想,其中均有部分毒素的提取率超出 120%,不符合实验室检测标准。剩下 4 种体积分数的甲酸水,其对 10 种毒素的总体

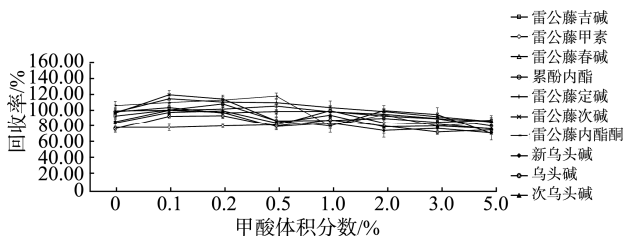


图 5 不同体积分数的甲酸水提取剂对回收率的影响

Fig.5 Effects of different volume fractions of formic acid aqueous extractant on recovery rate

提取率则随着甲酸水体积分数的增加而呈现出下降的趋势,因此,最终选择 1%的甲酸水-70%乙腈水作为提取剂。

2.3.3 加水量提取条件考察

由于蜂蜜样品具有较高的水溶性,先用水进行蜂蜜样品溶解促使具有较高分散性,再添加乙腈来进行目标化合物的提取。通过不同水量的加入进行加标回收实验分析,考察最佳的加水量,如表 4 所示,加水量的变化对 3 种乌头类生物碱的提取率未产生较大影响,均未有较好的提取效果,3 种乌头类生物碱提取率范围为 29.20%±1.27%~53.92%±2.09%,3 种乌头类生物碱可能溶于水相时较难提取到有机相中;对雷公藤毒素均具有较强的基质增强效应,提取率范围为 92.41%±4.06%~266.14%±3.95%,随着添加水量的增加,样品表现出的基质效应增强越加突出,添加 0.5 mL 水量时平均提取率为 87.28%,添加 4.0 mL 水量时的平均提取率为 154.02%。通过不同添加水量对植物毒素提取率的考察,通过添加水量的变化进行蜂蜜中植物毒素的提取未能达到良好的提取效果,采用直接配制好的乙腈水溶液进行提取。

2.4 样品盐析剂考察

部分蜂蜜样品在离心后仍可能存在乳化离心后分层不理想的现象,通过加入氯化钠盐析剂可以使有机相和水相比较好分层,方便样品的后续处理。通过对加入不同量的氯化钠进行加标回收率的考察,从图 6 可知,氯化钠的加入对 3 种乌头类生物碱的损失较大,回收率范围仅为 24.79%~33.09%;对雷公藤内酯酮均存在基质增强效应,

表 4 样品加水量对回收率的影响(%)
Table 4 Effects of sample water addition on recovery rate (%)

加水量 /mL	雷公藤吉碱	雷公藤甲素	雷公藤春碱	累积酚内酯	雷公藤定碱	雷公藤次碱	雷公藤内酯酮	新乌头碱	乌头碱	次乌头碱
0.5	105.43±2.07	100.40±2.79	103.02±3.87	100.64±2.53	109.02±1.79	129.25±1.25	128.58±3.12	32.61±4.07	33.25±0.87	30.59±0.86
1.0	111.55±3.05	141.25±6.46	110.41±0.04	120.67±3.46	116.56±3.98	112.12±2.64	132.93±0.48	29.66±1.55	34.03±0.02	29.20±1.27
1.5	116.29±2.80	92.41±4.06	110.34±4.16	117.56±2.39	119.41±2.11	144.96±1.01	206.06±6.09	34.50±1.71	40.02±1.65	33.93±0.72
2.0	130.86±2.13	158.73±5.42	121.25±3.04	131.67±4.08	130.29±5.28	138.84±2.32	158.79±2.85	31.94±4.11	39.22±1.47	34.66±0.75
2.5	109.82±3.68	148.30±15.57	129.43±4.39	140.82±3.42	151.93±7.19	130.49±0.67	163.18±2.97	36.99±1.36	43.02±3.21	39.54±2.47
3.0	150.53±3.61	133.60±1.32	142.98±6.38	177.06±4.32	151.86±6.19	170.43±1.30	266.14±3.95	39.37±0.94	45.62±2.41	44.29±0.14
4.0	190.87±2.31	193.64±8.46	183.85±6.30	210.67±4.33	197.16±4.47	189.05±2.36	219.37±1.36	49.36±1.44	53.92±0.09	53.28±2.09

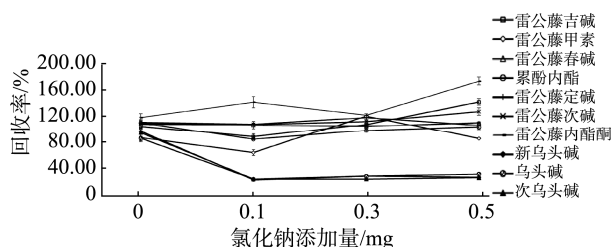


图 6 样品盐析剂对回收率的影响

Fig.6 Effects of sample salting-out agent on recovery rate

且随着氯化钠添加量的增多, 其基质增强效应越发凸显, 因此进行蜂蜜样品植物毒素的提取可不加盐析剂, 直接采用 0.22 μm 滤膜过滤即可。

2.5 净化剂考察

PSA 和 C₁₈ 作为常用的两种吸附剂, 具有吸附样品基质中多种杂质的功能, 能够得到准确提取。本研究对 PSA 和 C₁₈ 剂量分别进行了考察, 结果如图 7 和图 8 所示, 其中, 5、40、80 mg PSA 和 5、10、20、40 mg C₁₈ 均对部分毒素的提取率过高或较低, 不符合实验室检测标准。另外, 与 C₁₈ 相比, PSA 吸附色素及糖类的效果更好, 更适用于蜂蜜中各类杂质的吸附, 因此, 最终采用 PSA 作为吸附剂。10、20、100 mg PSA 相比, 10 mg PSA 所得 10 种毒素的提取率更接近于 100%, 更符合检测要求, 因此最终选择 10 mg PSA 作为吸附剂。

2.6 基质效应考察

目标植物毒素在离子化反应过程中受到样品基质影响, 响应信号可发生抑制或增强的现象叫做基质效应。

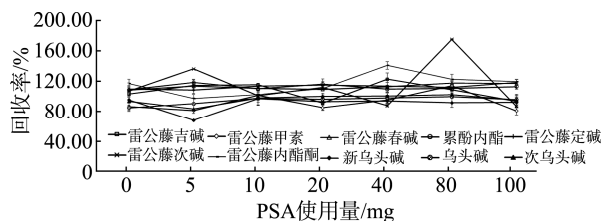


图 7 PSA 剂量对回收率影响的考察

Fig.7 Effects of PSA dosage on recovery rate

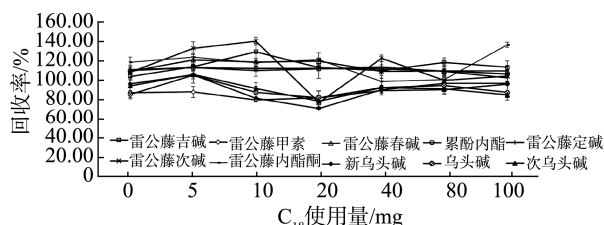


图 8 C₁₈ 剂量对回收率的影响

Fig.8 Effects of C₁₈ dosage on recovery rate

将检测样品中有样品基质的响应信号与不含样品基质的响应信号比较, 响应信号减小则为基质抑制效应, 反之则为基质增强效应。按照样品前处理条件分别处理加入 C₁₈ 净化剂和 PSA 净化剂以及未加净化剂的蜂蜜样品基质, 样品基质处理前及纯溶剂均加入等量的 10 种植物毒素混合标准溶液, 测定分析后计算样品基质中各植物毒素与纯溶剂中目标植物毒素的峰面积比值, 比值越接近 100%则表示无基质效应。由图 9 可知, 加入 C₁₈ 后, 对雷公藤吉碱和雷公藤次碱均存在明显的基质增强效应, 对雷公藤甲素存在明显基质抑制效应, 而未加吸附剂和加入 PSA 吸附剂的样品则未出现明显的基质增强和抑制效应, 二者相比较, 加入 PSA 吸附剂的样品呈现出的基质增强或抑制效应更弱, 因此, 可加入适量 PSA 吸附剂进行实验检测。

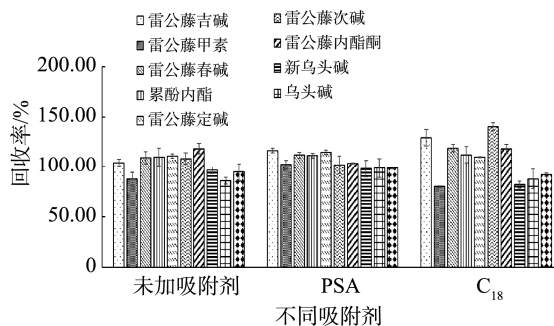


图 9 10 种植物毒素的基质效应

Fig.9 Matrix effects of 10 kinds of plant toxins

2.7 方法学考察

用配制好的系列质量浓度混合标准溶液, 采取优化

好的质谱参数、色谱条件进行标准曲线测定,以标准物质质量浓度为横坐标(X , $\mu\text{g/L}$),各组分对应峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得到线性范围和相关系数。以 3 倍信噪比(S/N)和 10 倍(S/N)分别计算各植物毒素的方法检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantity, LOQ)。从表 5 结果可知,相关系数 $r>0.999$,10 种植物毒素在给定的浓度范围内有良好的线性关系。LODs 范围为 0.03~1.90 $\mu\text{g/kg}$, LOQs 范围为 0.1~6.2 $\mu\text{g/kg}$, 满足实验要求。

2.8 方法的回收率与精密度

随机选取蜂蜜样品进行加标回收实验,各称取 1.0 g,加入低、中、高 3 个浓度水平的各植物毒素标准溶液,按照上述条件处理及上机测定,通过外标法定量计算加标回

收率,每个加标样品平行测定 6 次,计算相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)。由表 6 可知,10 种植物毒素的平均加标回收率均在 89.5%~113.8%之间,相对标准偏差为 0.5%~8.7% ($n=6$)。实验数据表明,该方法具有良好的稳定性与准确性,适用于蜂蜜样品中植物毒素的测定分析。

2.9 实际样品测定

采用建立的方法对 61 件蜂蜜样品进行了检测分析,其中乌头碱检出 1 件,含量为 4.76 $\mu\text{g/kg}$,检出率 1.64%,蜂蜜中毒事件多发于每年的 6—8 月份,高发期为 8 月,此时正值雷公藤类和乌头类开花泌蜜季节^[38],其余样品及其他检测项目都小于检出限均为未检出,说明市场所售蜂蜜产品有安全保障。

表 5 10 种植物毒素的线性方程、相关系数、LODs 和 LOQs
Table 5 Linear equations, correlation coefficients, LODs and LOQs of 10 kinds of phytotoxicants

化合物	线性范围/ $(\mu\text{g/L})$	线性回归方程	相关系数(r)	LODs/ $(\mu\text{g/kg})$	LOQs/ $(\mu\text{g/kg})$
雷公藤吉碱	0.2~1000.0	$Y=303.38563X+41.08662$	0.9996	0.30	1.1
雷公藤甲素	1.0~1000.0	$Y=330.30177X+1324.24776$	0.9992	1.90	6.2
雷公藤春碱	0.2~500.0	$Y=3296.86408X+1555.43423$	0.9993	0.10	0.4
雷酚内酯	0.2~1000.0	$Y=6565.91124X+29564.82308$	0.9996	0.80	2.8
雷公藤定碱	0.5~200.0	$Y=6920.95617X+47422.85632$	0.9994	0.03	0.1
雷公藤次碱	0.5~500.0	$Y=316.71257X+188.56740$	0.9997	0.40	1.5
雷公藤内酯酮	0.5~1000.0	$Y=198.86728X+774.13931$	0.9999	0.50	1.5
新乌头碱	1.0~80.0	$Y=13147.33472X+9721.72214$	0.9994	0.09	0.3
乌头碱	0.2~1000.0	$Y=6098.23494X+4131.39673$	0.9993	0.07	0.2
次乌头碱	0.2~200.0	$Y=22185.38550X+4408.65197$	0.9999	0.04	0.1

表 6 10 种植物毒素加标回收率与精密度($n=6$)
Table 6 Recoveries and precision of 10 kinds of phytotoxicants ($n=6$)

化合物名称	加标水平/ $(\mu\text{g/kg})$	平均加标回收率/%	RSDs/%	化合物名称	加标水平/ $(\mu\text{g/kg})$	平均加标回收率/%	RSDs/%
雷公藤吉碱	0.5	106.6	3.8	雷公藤次碱	0.5	108.2	6.7
	2.5	113.0	4.6		2.0	91.7	2.8
	10.0	94.4	2.3		10.0	89.7	3.4
雷公藤甲素	2.0	101.2	5.3	雷公藤内酯酮	1.0	102.6	8.7
	5.0	113.8	4.7		3.0	112.1	4.0
	20.0	99.9	5.1		10.0	102.1	4.9
雷公藤春碱	0.5	93.7	2.7	新乌头碱	0.5	94.4	1.8
	2.0	107.7	4.0		2.0	101.4	3.3
	5.0	97.1	2.6		10.0	99.6	3.1
雷酚内酯	1.0	94.4	5.3	乌头碱	0.5	90.1	2.9
	1.5	104.3	3.3		2.0	90.9	5.4
	5.0	91.7	4.4		10.0	93.4	3.7
雷公藤定碱	0.5	93.6	5.8	次乌头碱	0.5	89.5	3.2
	2.0	92.9	4.2		2.0	101.7	7.2
	10.0	97.9	0.5		10.0	90.8	3.9

3 结论

植物毒素种类多样,对人体的危害也各不相同,在多毒素存在的情况下毒性有叠加的风险。蜂蜜在采花粉或采蜜、加工环节均有被植物毒素污染的风险,且存在多种植物毒素污染可能性,目前国家还未制定植物毒素相关检测标准方法,但通过实际样品的测定分析,已有低浓度水平的植物毒素检出,因此需要加强蜂蜜中植物毒素的监测,保障国家的食品安全。该优化的方法前处理简单便捷,具有较高的回收率及较好的重现性,满足日常的实验室检测需求,为蜂蜜质量安全监管提供技术支持,为蜂蜜产业的发展保驾护航。

参考文献

- [1] 曹炜,卢珂,陈卫军,等.不同种类蜂蜜抗氧化活性的研究[J].食品科学,2005(8):352-356.
CAO W, LU K, CHEN WJ, et al. Study on antioxidation effects of different honeys [J]. Food Science, 2005(8): 352-356.
- [2] 朱文振,范营营,谢绍华,等.蜂蜜抗炎作用的研究进展[J].食品工业科技,2023,45(14):426-434.
ZHU WZ, FAN YY, XIE SH, et al. Research progress of the anti-inflammatory effects of honey [J]. Science and Technology of Food Industry, 2023, 45(14): 426-434.
- [3] 韦环,刘珈玲,廖强.超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱高分辨质谱法快速筛查及测定蜂蜜中20种植物源毒性成分[J].食品工业科技,2021,42(17):285-293.
WEI H, LIU JL, LIAO Q. Rapid Screening and determination of 20 plant-derived toxins in honey by UPLC-Q-exactive quadrupole-electrostatic field trap high resolution mass spectrometry [J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 285-293.
- [4] 段苏然,周一冉,宋纯艳,等. QuEChERS-超高效液相色谱-质谱联用法检测蜂蜜中雷公藤甲素和雷公藤红素及其热稳定性研究[J].食品安全质量检测学报,2021,12(13):5170-5176.
DUAN SR, ZHOU YR, SONG CY, et al. Determination of triptolide and celastrol in honey by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and research on their thermostability [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(13): 5170-5176.
- [5] LV H, JIANG L, ZHU M, et al. The genus *Tripterygium*: A phytochemistry and pharmacological review [J]. Fitoterapia, 2019, 137: 104190.
- [6] 宋晓笛,高畅.雷公藤的药理作用、毒性及减毒策略研究进展[J].赣南医学院学报,2023,43(10):987-992,1004.
SONG XD, GAO C. Progress on pharmacology, toxicity and attenuated strategies of *Tripterygium wilfordii* [J]. Journal of Gannan Medical University, 2023, 43(10): 987-992, 1004.
- [7] LI M, LUO Q, CHEN X, et al. Screening of major hepatotoxic components of *Tripterygium wilfordii* based on hepatotoxic injury patterns [J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2023, 23(1): 9.
- [8] 屈亚雪,丁樱,韩姗姗,等.“壮水之主”法减轻雷公藤多苷所致女性生殖损伤的思路探讨[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(10):210-216.
QU YX, DING Y, HAN SS, et al. Exploration of “Strengthening Kidney Yin” method to alleviate female reproductive damage caused by glycosides of *tripterygium wilfordii* polyglycoside [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2024, 30(10): 210-216.
- [9] MA J, SUN B, TE LG, et al. A dietary supplement *Jinghuosuo* ameliorates reproductive damage induced by *tripterygium glycosides* [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2024, 30(4): 330-338.
- [10] GE JC, QIAN Q, GAO YH, et al. Toxic effects of *Tripterygium glycoside* tablets on the reproductive system of male rats by metabolomics, cytotoxicity, and molecular docking [J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154813.
- [11] FIELDS BA, REEVE J, BARTHOLOMAEUS A, et al. Human pharmacokinetic study of *tutin* in honey; A plant-derived neurotoxin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 72: 234-241.
- [12] 刘琳,朱姝,付萍,等.2010—2020年中国有毒野果中毒事件监测资料分析[J].中国食品卫生杂志,2023,35(6):928-933.
LIU L, ZHU S, FU P, et al. Analysis of the monitoring situation of poisonous wild fruit poisoning in China from 2010 to 2020 [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(6): 928-933.
- [13] 张珊,杨涵,陈顺琴,等.乌头属中药的毒性及毒代动力学研究进展[J].中华中医药学刊,2023,42(8):232-236.
ZHANG S, YANG H, CHEN SQ, et al. Research progress on toxicity and toxicokinetics of Chinese drugs of *aconitum* [J]. Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine, 2023, 42(8): 232-236.
- [14] 林燕,贾豫晨,彭霞.云南省食用蜂蛹中毒与食用蜂蜜中毒的相关性研究[J].实用预防医学,2022,29(9):1025-1027.
LIN Y, JIA YC, PENG X. Correlation of poisonings due to bee pupa consumption with poisonings owing to honey consumption in Yunnan Province [J]. Practical Preventive Medicine, 2022, 29(9): 1025-1027.
- [15] 王瑞生.重庆地区有毒蜜源植物雷公藤的调查研究[J].蜜蜂杂志,2022,42(11):23-26.
WANG RS. Investigation on *Tripterygium wilfordii*, a poisonous honey source plant in Chongqing [J]. Journal of Bee, 2022, 42(11): 23-26.
- [16] 郑亚杰,刘秀斌,林莉,等.蜂蜜中植物源性毒性成分的研究进展[J].食品科学,2019,40(3):307-316.
ZHEN YJ, LIU XB, LIN L, et al. Plant-derived toxins in honey: A review [J]. Food Science, 2019, 40(3): 307-316.
- [17] HUNGERFORD NL, CARTER SJ, ANUJ SR, et al. Analysis of pyrrolizidine alkaloids in queensland honey: Using low temperature chromatography to resolve stereoisomers and identify botanical sources by UHPLC-MS/MS [J]. Toxins (Basel), 2019, 11(12): 726.
- [18] 陈静,徐荣霞,林健. HPLC 梯度洗脱法测定雷公藤多苷片中甲素的含量[J].中国处方药,2024,22(9):44-46.
CHEN J, XU RX, LIN J. Using HPLC with gradient elution to detect triptolide content in *Tripterygium glycosides* tablets [J]. Journal of China Prescription Drug, 2024, 22(9): 44-46.
- [19] 周国梁,宿树兰,尚尔鑫,等. RP-UPLC-PDA 法同时测定不同产地雷公藤饮片中6个活性成分[J].药物分析杂志,2024,44(7):1137-1144.
ZHOU GL, SU SL, SHANG ERX, et al. Determination of six active components in *Tripterygium radix* from different habitats by RP-UPLC-PDA [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2024, 44(7): 1137-1144.
- [20] 曾辉,邓楠,刘川,等.液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中雷公藤甲素的不确定度评定[J].食品安全导刊,2023(19):62-65,70.
ZENG H, DENG N, LIU C, et al. Evaluation of uncertainty in determination of triptolide in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2023(19): 62-65, 70.

- [21] 杜凤君, 徐敦明, 张志刚, 等. QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时分析蜂蜜中 33 种生物碱[J]. 分析科学学报, 2019, 35(6): 817-823. DU FJ, XU DM, ZHANG ZG, *et al.* Simultaneous determination of 33 kinds alkaloids in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Analytical Science, 2019, 35(6): 817-823.
- [22] 刘先军, 冯家力, 曾栋, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 18 种生物碱及风险评估[J]. 分析测试学报, 2023, 42(11): 1517-1523. LIU XJ, FENG JL, ZENG D, *et al.* Risk assessment and determination of 18 alkaloids in honey by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2023, 42(11): 1517-1523.
- [23] DZUMAN Z, JONATOVA P, STRANSKA-ZACHARIASOVA M, *et al.* Development of a new LC-MS method for accurate and sensitive determination of 33 pyrrolizidine and 21 tropane alkaloids in plant-based food matrices [J]. Analytical And Bioanalytical Chemistry, 2020, 412(26): 7155-7167.
- [24] RONCADA P, ISANI G, PELOSO M, *et al.* Pyrrolizidine alkaloids from monofloral and multifloral Italian honey [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2023, 20(7): 5410.
- [25] 王静, 王彤, 刘航, 等. LC-MS/MS 法测定大鼠血浆中雷公藤甲素浓度及其药代动力学研究[J]. 临床合理用药, 2024, 17(11): 153-156. WANG J, WANG T, LIU H, *et al.* Determination of triptolide in rat plasma by LC-MS/MS and its pharmacokinetics [J]. Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use, 2024, 17(11): 153-156.
- [26] AYDIN AA, LETZEL T. Simultaneous investigation of sesquiterpenes, pyrrolizidine alkaloids and N-oxides in butterbur (*Petasites hybridus*) with an offline 2D-combination of HPLC-UV and LC-MMI-ToF-MS [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2013, 85: 74-82.
- [27] JEONG WT, LIM HB. Determination and chemical profiling of toxic pyrrolizidine alkaloids in botanical samples with UPLC-Q-TOFMS [J]. Chromatographia, 2019, 82(11): 1653-1664.
- [28] MARTINELLO M, BORIN A, STELLA R, *et al.* Development and validation of a QuEChERS method coupled to liquid chromatography and high resolution mass spectrometry to determine pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey [J]. Food Chemistry, 2017, 234: 295-302.
- [29] SMYRSKA-WIELEBA N, WOJTANOWSKI KK, MROCZEK T. Comparative HILIC/ESI-QTOF-MS and HPTLC studies of pyrrolizidine alkaloids in flowers of *Tussilago farfara* and roots of *Arnebia euchroma* [J]. Phytochemistry Letters, 2017, 20: 339-349.
- [30] 陈晓丹. 液相色谱-质谱/质谱法测定蜂蜜中氯霉素残留量的研究[J]. 食品安全导刊, 2024(35): 34-36. CHEN XD. Study on the determination of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2024(35): 34-36.
- [31] 祁朝阳, 黄学者, 祖铁红, 等. 五氟苯基溴衍生-气相色谱-电子俘获检测法和气相色谱质谱法测定蜂蜜中二氯喹啉酸[J]. 分析实验室, 2024, 43(12): 1735-1740. QI ZY, HUANG XZ, ZU TH, *et al.* Determination of quinclorac in honey by pentafluorobenzyl bromide derivatization-gas chromatography-electron capture detection and gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2024, 43(12): 1735-1740.
- [32] 孙婷, 沈鹭英, 何金麟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中 10 种氨基糖苷类药物[J]. 分析测试学报, 2024, 43(7): 1046-1051, 1057. SUN T, SHEN LY, HE JL, *et al.* Detection of 10 aminoglycosides drugs in honey by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2024, 43(7): 1046-1051, 1057.
- [33] 杨琦, 房忠芳, 孟虎, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法快速检测蜂蜜中 10 种氨基甲酸酯类农药残留[J]. 化学分析计量, 2024, 33(11): 85-90. YANG Q, FANG ZF, MENG H, *et al.* Rapid determination of 10 carbamate pesticide residues in honey by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chemical Analysis and Meterage, 2024, 33(11): 85-90.
- [34] CASADO N, MORANTE-ZARCERO S, SIERRA I. Miniaturized analytical strategy based on μ -SPEed for monitoring the occurrence of pyrrolizidine and tropane alkaloids in honey [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(1): 819-832.
- [35] 张帅, 孟娟, 张晶, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定蜂蜜中的多类植物毒素[J]. 农产品质量与安全, 2021(6): 25-30. ZHANG S, MENG J, ZHANG J, *et al.* Simultaneous analysis of multiple phytotoxins in honey using UPLC-MS/MS [J]. Quality and Safety of Agro-products, 2021(6): 25-30.
- [36] 孙明月, 黄小芹, 陈汝梅, 等. 超高效液相色谱-四级杆-飞行时间质谱法快速筛查一起蜂蜜中毒事件中中毒性成分[J]. 实用预防医学, 2023, 30(10): 1274-1276. SUN MY, HUANG XQ, CHEN RM, *et al.* Rapid screening of toxic components in a honey poisoning incident by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry [J]. Practical Preventive Medicine, 2023, 30(10): 1274-1276.
- [37] 肖甜, 王燕, 杨帆, 等. 基于 CiteSpace 的蜂蜜安全性研究现状与热点分析[J]. 食品工业科技, 2024, 45(13): 389-401. XIAO T, WANG Y, YANG F, *et al.* Current status and hotspot analysis of honey safety research based on CiteSpace [J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(13): 389-401.
- [38] 周文才, 林黎, 韦小平. 贵州省有毒蜜粉源植物与蜂蜜中毒事件调查[J]. 中国蜂业, 2017, 68(11): 38-39. ZHOU WC, LIN L, WEI XP. Investigation on poisonous honey pollen plants and honey poisoning events in Guizhou Province [J]. Apiculture of China, 2017, 68(11): 38-39.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)