

## LC-MS/MS 法测定菠萝蛋白酶中伏马毒素和赭曲霉毒素 A

房思萌, 李文娣, 张 晶, 邢文静, 白海娇, 韩晓捷\*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

**摘要:** 目的 建立菠萝蛋白酶中伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 的 LC-MS/MS 法定量分析。方法 采用 Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 2.6 μm); 以 0.2% 甲酸溶液 - 甲醇为流动相, 梯度洗脱, 体积流量: 0.3 mL/min, 柱温: 40 °C, 进样体积: 5 μL。采用电喷雾离子源 (ESI), 采集模式为多反应检测 (MRM) 正离子模式, 毛细管电压: 3.0 kV; 干燥器温度 250 °C, 鞘气温度 350 °C, 干燥气流量 7.0 L/min, 雾化气压力 30.0 psi, 鞘气流量 11.0 L/min。结果 伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 分别在 2.0~50.0、1.0~50.0、1.0~50.0、0.5~10.0 μg/kg 线性关系良好; 平均回收率分别为 98.3%、96.8%、102.6%、99.0%, RSD 值分别为 2.7%、2.7%、2.8%、2.8%。结论 方法具有良好的专属性、线性、精密度, 准确度符合要求, 可为菠萝蛋白酶的质量控制和标准建立提供依据。

**关键词:** 菠萝蛋白酶; 伏马毒素 B<sub>1</sub>; 伏马毒素 B<sub>2</sub>; 伏马毒素 B<sub>3</sub>; 赭曲霉毒素 A; LC-MS/MS

**中图分类号:** R927.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 5515(2026)03 - 0646 - 05

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.03.011

## Determination of fumonisins and ochratoxin A in bromelain by LC-MS/MS method

FANG Simeng, LI Wendi, ZHANG Jing, XING Wenjing, BAI Haijiao, HAN Xiaojie

Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China

**Abstract: Objective** To establish an LC-MS/MS method for the quantitative analysis of fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, and ochratoxin A in bromelain. **Methods** The Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> column (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm) was used, the mobile phase consisted of 0.2% formic acid solution - methanol, with gradient elution at a flow rate of 0.3 mL/min, column temperature of 40 °C, and an injection volume of 5 μL. Electrospray ionization (ESI) source was used, operating in positive ion mode with multiple reaction monitoring (MRM). The capillary voltage was set at 3.0 kV, the dryer temperature was 250 °C, nebulizer gas temperature was 350 °C, dry gas flow rate was 7.0 L/min, nebulizer gas pressure was 30.0 psi, and nebulizer gas flow rate was 11.0 L/min. **Results** Fumonisins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub>, as well as ochratoxin A, showed good linear relationships in the ranges of 2.0 — 50.0, 1.0 — 50.0, 1.0 — 50.0, and 0.5 — 10.0 μg/kg, respectively. Their average recovery rates were 98.3%, 96.8%, 102.6%, and 99.0%, with the RSD values of 2.7%, 2.7%, 2.8%, and 2.8%, respectively. **Conclusion** The method has good specificity, linearity, precision, and accuracy that meets the requirements, which can provide a basis for quality control and standard establishment of bromelain.

**Key words:** bromelain; fumonisin B<sub>1</sub>; fumonisin B<sub>2</sub>; fumonisin B<sub>3</sub>; ochratoxin A; LC-MS/MS

菠萝蛋白酶是从菠萝皮、茎、芯中提取的一类蛋白水解酶的总称, 属于半胱氨酸酶家族。该酶能催化蛋白质分子中肽键裂解, 使蛋白质、肽、脂和酰胺等物质分解, 具有抗炎、消水肿作用<sup>[1-2]</sup>。由于菠萝在种植、采收、贮存、加工过程中易受真菌污染, 其提取物中可能残留真菌毒素。部分真菌毒素具有致畸、致癌和致突变性, 还可能引起肝肾毒性、免疫毒性和神经毒性等危害<sup>[3]</sup>。伏马毒素属于镰刀

菌毒素, 常见类型包括伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>3</sub> 等。动物实验表明, 伏马毒素具有免疫毒性、致癌性、神经毒性和肺毒性等多种毒性作用, 其中伏马毒素 B<sub>1</sub> 的毒性最强, 污染最普遍, 已被国际癌症研究机构列为 2B 类致癌物。赭曲霉毒素是继黄曲霉毒素之后又一个备受关注的霉菌毒素, 主要由曲霉属、青霉属的多种菌株产生, 是污染食品的重要真菌代谢产物。在多种赭曲霉毒素中, 赭曲霉毒素 A 的毒

收稿日期: 2025-11-28

基金项目: 2025 年国家药品抽检项目 (国药监药管[2025]1 号)

作者简介: 房思萌 (1987—), 女, 吉林延边人, 副研究员, 硕士, 主要从事药品检验研究工作。E-mail: fangsimeng521@163.com

\*通信作者: 韩晓捷 (1980—), 女, 副研究员, 主要从事生化药品和生物制品质量研究工作。E-mail: hxjtjdc@163.com

性最强、分布最广、产毒量最高，对农产品的污染最严重<sup>[4]</sup>。本研究依据《中国药典》2025 年版四部通则 2351 真菌毒素测定法<sup>[5]</sup>，采用高效液相色谱串联三重四极杆质谱（LC-MS/MS）技术对不同来源菠萝蛋白酶中伏马毒素和赭曲霉毒素 A 进行定量分析，并对所建立的方法进行系统的方法验证，以期对菠萝蛋白酶的质量控制和标准建立提供依据。

## 1 仪器与试剂

梅特勒 - 托利多 XS204 电子天平，安捷伦 1290-6475 高效液相色谱串联三重四极杆质谱，Milli-Q 超纯水仪（美国密理博公司），DNK-24W 氮吹仪（上海皓庄仪器有限公司），Allegra 64R 离心机（美国贝克曼）。

伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub> 和 B<sub>3</sub> 对照品的质量分数分别为 99.2%、100.5%、99.2%，批号 S213027，购自天津阿尔塔科技有限公司，赭曲霉毒素 A 对照品（质量分数为 99.1%，批号 2E00E19，购自青岛普瑞邦生物工程有限公司）；菠萝蛋白酶（广西南宁百会药

业集团有限公司，批号分别为 24120090、24120096、24120088；南京海鲸药业股份有限公司，批号分别为 M241104、M250304、M250305）；甲酸（质谱级，ThermoFisher），乙腈、甲醇（液质级，天津市康科德科技有限公司）。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱 - 质谱条件

Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.6 μm）；以 0.2% 甲酸溶液（A）- 甲醇（B）为流动相，梯度洗脱（0~7.0 min，流动相 A 从 70% 降至 0；7.0~7.1 min，流动相 A 从 0 增加至 70%；7.1~9.0 min，流动相 A 保持 70%），体积流量：0.3 mL/min，柱温：40 °C，进样体积：5 μL。采用电喷雾离子源（ESI），采集模式为多反应检测（MRM）正离子模式，毛细管电压：3.0 kV；干燥器温度 250 °C，鞘气温度 350 °C，干燥气流量 7.0 L/min，雾化气压力 30.0 psi，鞘气流量 11.0 L/min。监测离子对和碰撞电压（CE）见表 1。

表 1 真菌毒素的监测离子对、碰撞电压值

Table 1 Monitoring ion pairs and collision voltage values for mycotoxins

成分	模式	保留时间/min	母离子	子离子	碎裂电压/V	CE/V
伏马毒素 B <sub>1</sub>	正	4.13	722.4、722.4	352.3、334.3	180	40、45
伏马毒素 B <sub>2</sub>	正	4.57	706.4、706.4	336.3、318.3	175	40、45
伏马毒素 B <sub>3</sub>	正	4.90	706.6、706.6	336.3、688.5	180	40、45
赭曲霉毒素 A	正	5.27	404.1、404.1	239.0、102.0	110	25、85

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 空白溶剂** 水 - 乙腈（1:1）混合溶液。

**2.2.2 伏马毒素混合对照品溶液** 分别称取伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 对照品适量，精密称定，加空白溶剂使各组分的质量浓度均为 100 μg/mL。

**2.2.3 赭曲霉毒素 A 对照品溶液** 取赭曲霉毒素 A 适量，精密称定，加甲醇使其终质量浓度为 10 μg/mL。

**2.2.4 伏马毒素工作液** 精密量取伏马毒素混合对照品溶液 20 μL，加空白溶剂稀释至 1 mL，作为伏马毒素工作贮备液。精密量取伏马毒素工作贮备液 50 μL，加空白溶剂稀释至 1 mL，使伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 的终质量浓度均为 100 ng/mL。

**2.2.5 赭曲霉毒素 A 工作液** 精密量取赭曲霉毒素 A 对照品溶液 10 μL，加甲醇稀释至 2 mL，使赭曲霉毒素 A 的终质量浓度为 50 ng/mL。

**2.2.6 混合对照品溶液** 分别精密量取伏马毒素工作液和赭曲霉毒素 A 工作液各 20 μL，加空白溶剂稀释至 1 mL，即得。

**2.2.7 供试品溶液** 取菠萝蛋白酶 0.4 g，加水 2 mL，涡旋混匀，加乙腈 8 mL，涡旋 2 min，离心取上清液 5 mL，55 °C 氮吹至干，加空白溶剂 1 mL 复溶，用 0.22 μm 微孔滤膜，滤过，取续滤液，即得。

**2.2.8 空白基质溶液** 取菠萝蛋白酶 2.0 g，加水 10 mL，涡旋混匀，加乙腈 40 mL，涡旋 2 min，离心，取上清液 25 mL，55 °C 氮吹至干，加空白溶剂 5 mL 复溶，使用 0.22 μm 微孔滤膜，滤过，取续滤液，即得。

**2.2.9 基质加标溶液** 分别精密吸取伏马毒素工作液、赭曲霉毒素 A 工作液各 10 μL，以空白基质溶液为稀释剂，制成基质加标溶液（伏马毒素、赭曲霉毒素 A 质量浓度分别为 2、1 ng/mL）。

### 2.3 专属性、系统适用性试验

分别精密吸取基质加标溶液、供试品溶液各 5  $\mu\text{L}$ ，注入高效液相色谱仪-质谱仪。结果伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 在相同保留时间处无杂质干扰，相邻色谱峰之间分离度均大于 1.5，见图 1。

### 2.4 线性关系考察

分别精密吸取伏马毒素工作液 2、5、10、20、

40、100  $\mu\text{L}$  和赭曲霉毒素 A 工作液 2、4、10、20、30、40  $\mu\text{L}$ ，以空白基质溶液为稀释剂，稀释成分别含伏马毒素 10.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.2 ng/mL 和赭曲霉毒素 A 2.0、1.5、1、0.5、0.2、0.1 ng/mL 的基质混合对照品线性系列质量浓度溶液。取系列基质混合对照品溶液，注入高效液相色谱-质谱仪，测定峰面积，结果见表 2。

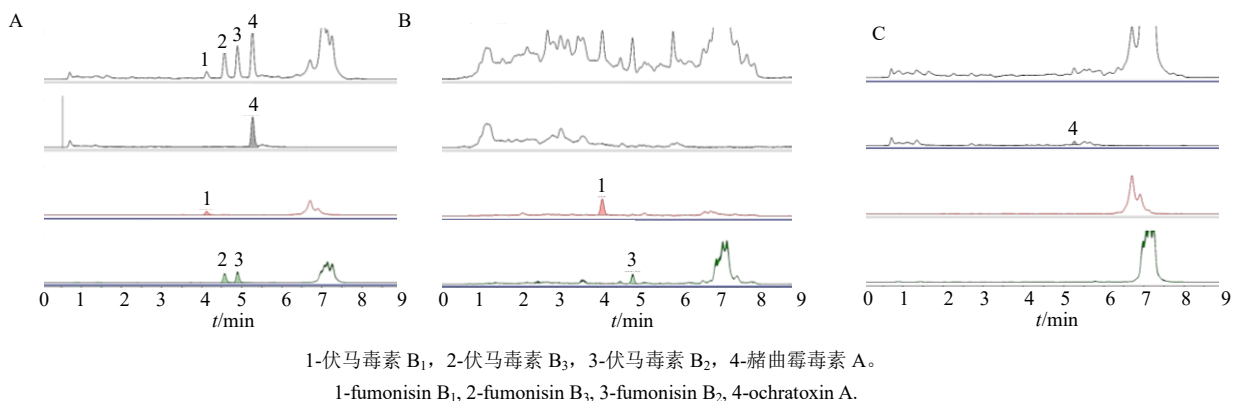


图 1 基质加标溶液中伏马毒素和赭曲霉毒素 A (A)、菠萝蛋白酶 (批号 24120090, B) 和菠萝蛋白酶 (批号 M241104, C) 的总离子流及提取离子流图

Fig. 1 Total ion current and extraction ion current diagrams of ochratoxin A and fumonisins in matrix standard sample (A), bromelain (Batch No: 24120090, B), and bromelain (Batch No: M241104, C)

表 2 伏马毒素和赭曲霉毒素 A 的标准曲线方程

Table 2 Standard curves equation for fumonisins and ochratoxin A

成分	标准曲线方程	<i>r</i>	线性范围/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
伏马毒素 B <sub>1</sub>	$Y=942.3 X-39.6$	0.999 8	2.0~50.0
伏马毒素 B <sub>2</sub>	$Y=3\ 165.3 X-200.5$	0.999 7	1.0~50.0
伏马毒素 B <sub>3</sub>	$Y=2\ 155.1 X-41.9$	0.999 9	1.0~50.0
赭曲霉毒素 A	$Y=22\ 291.7 X-356.1$	0.997 4	0.5~10.0

### 2.5 定量限与检测限测定

将基质混合对照品溶液适当稀释后，进样测定，以信噪比 10:1、3:1 分别作为定量限和检测限。伏马毒素 B<sub>1</sub> 的定量限和检测限分别为 2.0、1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，伏马毒素 B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 的定量限和检测限均为 1.0、0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，赭曲霉毒素 A 的定量限和检测限分别为 0.50、0.25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2.6 精密度试验

精密吸取伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 的混合对照品溶液 5  $\mu\text{L}$ ，连续进样 6 次，测定峰面积，结果伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 峰面积的 RSD 值分别为 1.4%、1.3%、1.5%、1.5%。

### 2.7 重复性试验

取菠萝蛋白酶 (批号 M241104) 6 份，每份取

0.4 g，精密加入 100 ng/mL 伏马毒素工作液 40  $\mu\text{L}$ ，制备供试品溶液，进样测定峰面积值，计算菠萝蛋白酶中伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 的质量分数，RSD 值分别为 2.7%、2.7%、2.8%、2.8%。

### 2.8 稳定性试验

取菠萝蛋白酶 (批号 M241104)，精密加入 100 ng/mL 伏马毒素工作液 40  $\mu\text{L}$ ，制备供试品溶液，分别在 0、2、4、8、24 h 进样测定峰面积，结果显示，伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 峰面积的 RSD 值分别 2.0%、1.8%、1.6%、1.9%。

### 2.9 回收率试验

取菠萝蛋白酶 (批号 M241104) 6 份，每份取 0.4 g，加水 2 mL，涡旋混匀，分别精密加入 100 ng/mL 伏马毒素工作液和 50 ng/mL 赭曲霉毒素 A

工作液各 40  $\mu\text{L}$ ，加乙腈 7 920  $\mu\text{L}$ ，涡旋 2 min，离心，取上清液 5 mL，55  $^{\circ}\text{C}$  氮吹至干，加空白溶剂 1 mL 复溶，用 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜，滤过，取续滤液，作为加标回收率样品溶液。进样测定各成分的峰面积值，计算回收率，结果伏马毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 和赭曲霉毒素 A 的平均回收率分别为 98.3%、96.8%、102.6%、99.0%，RSD 值分别为 2.7%、2.7%、2.8%、

2.8%。

### 2.10 样品测定

取菠萝蛋白酶样品，制备供试品溶液，进样测定，从标准曲线上计算样品中伏马毒素和赭曲霉毒素 A 的质量分数。结果 8 批菠萝蛋白酶样品中，有 4 批检出伏马毒素，为 6.3~8.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；另有 4 批检出赭曲霉毒素 A，为 0.3~0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，见表 3。

表 3 菠萝蛋白酶中伏马毒素和赭曲霉毒素 A 的测定结果

Table 3 Results of fumonisins and ochratoxin A in bromelain

批号	质量分数/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$			
	伏马毒素 B <sub>1</sub>	伏马毒素 B <sub>2</sub>	伏马毒素 B <sub>3</sub>	赭曲霉毒素 A
24120090	6.4	未检出	1.2	未检出
24120096	5.3	未检出	1.0	未检出
25010003	6.2	未检出	1.0	未检出
24120088	6.9	未检出	1.1	未检出
M241104	未检出	未检出	未检出	0.3
M250304	未检出	未检出	未检出	0.4
M250305	未检出	未检出	未检出	0.5
M250306	未检出	未检出	未检出	0.5

对于真菌毒素等有毒物质限量标准的制订应通过风险评估、综合考虑危险指数、成本-效益分析结果来确定。国际癌症研究机构将伏马毒素、赭曲霉毒素分类为人类潜在的致癌物质（2B 级）。赭曲霉毒素主要污染谷物类、小麦、花生、啤酒等多种产品。目前中国和欧盟对谷物及其制品中赭曲霉毒素设定的限度为 2~5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；伏马毒素容易污染玉米、小麦等农作物，还易污染瓜果、蔬菜等食物。中国、欧盟和美国对玉米等食品的伏马毒素设定的限度为 400~4 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，婴幼儿玉米加工食品的限度可收紧至 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[6-8]</sup>。参照各国对食品中的伏马毒素和赭曲霉毒素的限度规定，以上 8 批菠萝蛋白酶样品均符合规定。

## 3 讨论

### 3.1 真菌毒素产生的环境条件

真菌的生长、繁殖依赖于适宜的温湿度条件，其最适温度范围通常为 20~30  $^{\circ}\text{C}$ ，如曲霉菌在 30  $^{\circ}\text{C}$  左右生长最佳，而镰刀菌的最适生长温度约为 25  $^{\circ}\text{C}$ 。当处于低温环境或面临与其他真菌的激烈竞争时，真菌更容易产生真菌毒素。真菌毒素的分布表现出明显的地域性特征，热带和亚热带地区的农产品和饲料易受黄曲霉毒素和部分赭曲霉毒素污

染。由于菠萝主要产自热带地区，其气候条件特别适宜真菌的繁殖，加之在菠萝采收、加工、运输、储存过程中若操作不当，极易导致真菌毒素的污染。本研究待测样品中均有检出，推测样品可能受到真菌毒素的污染，建议企业应持续关注。

### 3.2 样品提取方式考察

在传统真菌毒素检测中，常用水与甲醇或乙腈的混合溶剂进行提取。由于菠萝蛋白酶属于蛋白质，蛋白质在有机溶剂中会发生变性并凝聚沉淀，当使用含乙腈的溶剂直接处理样品时，会导致菠萝蛋白酶迅速结团沉淀，致使样品加标回收率不理想，无法满足方法验证要求。本研究采用先加水分散样品，再加入乙腈以沉淀蛋白质的方法。蛋白质沉淀经离心去除。在优化沉淀蛋白步骤时，本研究考察了乙腈加入比例分别为 50%、67%、80%、89% 的沉淀效果。结果显示，当乙腈的加入比例为 50%、67% 时，菠萝蛋白酶结团沉淀所需时间较长，而比例提高至 80%、89% 时，菠萝蛋白酶加入乙腈后沉淀较快，考虑到乙腈的加入量较大时，对样品产生较强稀释效应，进而大幅延长后续氮吹浓缩的时间，因此最终确定乙腈加入比例为 80% 最适宜。样品溶液经氮吹近干后，使用少量溶剂进行复溶。为

兼顾不同种类真菌毒素的溶解特性,本研究选择使用水-乙腈(1:1)溶液作为复溶溶剂。

本研究建立的 LC-MS/MS 方法具有良好的专属性、线性、精密度,准确度符合要求。该筛查方法适用于菠萝蛋白酶中真菌毒素的筛查,且定量方法适用于伏马毒素和赭曲霉毒素 A 的检测,可为菠萝蛋白酶的质量控制和标准建立提供依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 吴茂玉, 马超, 乔旭光. 菠萝蛋白酶的研究及应用进展 [J]. 食品科技, 2008(8): 17-20.
- [2] 章佩芬, 郭勇, 罗焕敏. 菠萝蛋白酶的研究与应用进展 [J]. 华西药学期刊, 2002(2): 128-129.

- [3] 王莹. 酒糟蛋白饲料中三类真菌毒素的超高效液相色谱串联质谱定量分析法研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2019.
- [4] 陈轶铭, 章荣华, 童恩煜, 等. 2018—2019 年浙江省谷物及其制品中伏马毒素污染状况及居民暴露风险评估 [J]. 卫生研究, 2023, 52(5): 762-768.
- [5] 中国药典 [S]. 四部. 2025: 368.
- [6] GB2761-2017 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量 [S]. 2017.
- [7] 刘丽娜, 李海亮, 李耀磊, 等. 中药真菌毒素质量控制概况、限量标准制定及有关问题的思考 [J]. 中草药, 2023, 54(19): 6197-6207.
- [8] 刘中勇, 刘津, 张喆, 等. 粮谷类食品中伏马毒素限量标准和检测方法进展 [J]. 粮食与饲料工业, 2009(7): 45-47.

**【责任编辑 解学星】**