

LC-MS/MS 检测食品中的白僵菌素和恩镰孢菌素

LCMSMS-903

摘要：本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的分析方法。5种毒素在0.1 µg/L~85.0 µg/L浓度范围内线性良好，相关系数 r 在0.999以上。在高、中、低三个浓度下，化合物的保留时间和峰面积的RSD%分别在0.03%~0.07%和0.55%~3.98%之间，仪器精密度良好。加标浓度为70 µg/kg的样品，5种毒素的回收率在98.8%~109.8%之间，且重复性良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的准确定量检测。

关键词：三重四极杆液质联用仪 食品 白僵菌素 恩镰孢菌素

技术特点：

- ❖ 一针法可同时分析食品中的白僵菌素和恩镰孢菌素。
- ❖ 建立了一种食品中白僵菌素和恩镰孢菌素高灵敏度检测的LC-MS/MS分析方法。

恩镰孢菌素 (Enniatins, ENNs) 和白僵菌素 (Beauvericin, BEA) 是近年来被报道的新型真菌毒素，也是镰刀菌属产生的次级代谢产物，主要污染谷物、水果及其相关制品等。常见的恩镰孢菌素有恩镰孢菌素 A (ENA)、恩镰孢菌素 A1 (ENA1)、恩镰孢菌素 B (ENB) 和恩镰孢菌素 B1 (ENB1)。研究调查表明，ENNs 和 BEA 对人和动物具有遗传毒性和细胞毒性，而且还有可能与其他生物毒素产生协同毒害作用，具体表现形式有激素紊乱、免疫抑制等。

我国尚未制定食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的标准检测方法，因此建立一种简单、快速、灵敏、准确的检测方法具有重要意义。本文使用水和乙腈的混合溶液提取，经 SPE 柱净化浓缩后，结合超高效液相色谱分离 - 串联质谱，建立了检测食品中的 ENA、ENA1、ENB、ENB1 和 BEA 的检测方法。该方法简单、结果可靠，灵敏度高，可为食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的污染检测提供技术支撑。

实验部分

1.1 仪器

本实验采用岛津 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	自动进样器：	SIL-30ACMP
输液泵：	LC-30AD×2	质谱仪：	LCMS-8050
柱温箱：	CTO-30A	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.114
在线脱气机：	DGU-20A ₅		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：	BEH C18 (100 mm×.2.1 mm I.D, 1.7 µm)	流速：	0.3 mL/min
流动相：	A相 -5 mM 乙酸铵水溶液，B相 - 乙腈	进样体积：	3 µL
柱温：	30°C		
洗脱方式：	梯度洗脱，初始浓度为 B 相 55%， 时间程序见表 1		

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	55
6.00	Pumps	Pump B Conc.	100
8.50	Pumps	Pump B Conc.	100
9.50	Pumps	Pump B Conc.	55
11.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：	ESI, 正离子模式	DL 管温度：	250℃
接口电压：	1.0 kV	加热模块温度：	400℃
雾化气：	氮气 3.0 L/min	接口温度：	300℃
干燥气：	氮气 10 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
加热气：	空气 10 L/min	MRM 参数：	见表 2
碰撞气：	氦气 (230kPa)		

表 2 MRM 参数

No.	中文名称	英文缩写	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	白僵菌素	BEA	26048-05-5	801.4	244.2*	-40.0	-35.0	-25.0
					262.1	-40.0	-33.0	-12.0
2	恩镰孢菌素 A	ENA	2503-13-1	699.5	210.2*	-20.0	-40.0	-21.0
					228.2	-20.0	-32.0	-22.0
3	恩镰孢菌素 A1	ENA1	4530-21-6	685.4	210.1*	-34.0	-32.0	-21.0
					228.1	-34.0	-34.0	-22.0
4	恩镰孢菌素 B	ENB	917-13-5	657.4	196.1*	-32.0	-31.0	-19.0
					214.1	-32.0	-33.0	-22.0
5	恩镰孢菌素 B1	ENB1	19914-20-6	671.4	196.1*	-34.0	-31.0	-20.0
					210.1	-34.0	-31.0	-22.0

* 表示定量离子

■ 样品前处理和标准溶液配制

2.1 样品前处理

称取 5 g 试样 (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 乙腈 - 乙酸 - 水 (84+1+15, 体积比) 提取液, 涡旋振荡提取 30 min, 8000 r/min 离心 5 min。移取上清液 5 mL, 加入 10 mL 水进行稀释, 待净化。

准确移取 5 mL 稀释液上样至预先用 5 mL 乙腈和 5 mL 水活化过的 HLB 柱 (200 mg, 6 mL), 5 mL 40% 乙腈 - 水溶液清洗后, 2 mL 乙腈分两次洗脱, 收集全部洗脱液后在 40℃ 下氮气吹干。加入 1 mL 乙腈溶解残留物, 涡旋混匀 10 s, 用 0.22 μm 滤膜过滤后进样。

2.2 系列标准溶液配制

分别准确移取 100 ng/mL 的混合标准工作溶液 10 μ L、50 μ L、100 μ L、500 μ L、1 mL、2 mL、4 mL、8.5 mL 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度，混匀。标准系列工作液的浓度分别为 0.1、0.5、1、5、10、20、40、85 ng/mL 的系列标准溶液，临用现配。

■ 结果与讨论

3.1 白僵菌素和恩镰孢菌素标准溶液谱图

配制 0.01 ng/mL 的白僵菌素和恩镰孢菌素混合标准溶液，上机分析，得到 5 种化合物标准溶液的 MRM 色谱图如下图 1，色谱峰形良好，通道无干扰。

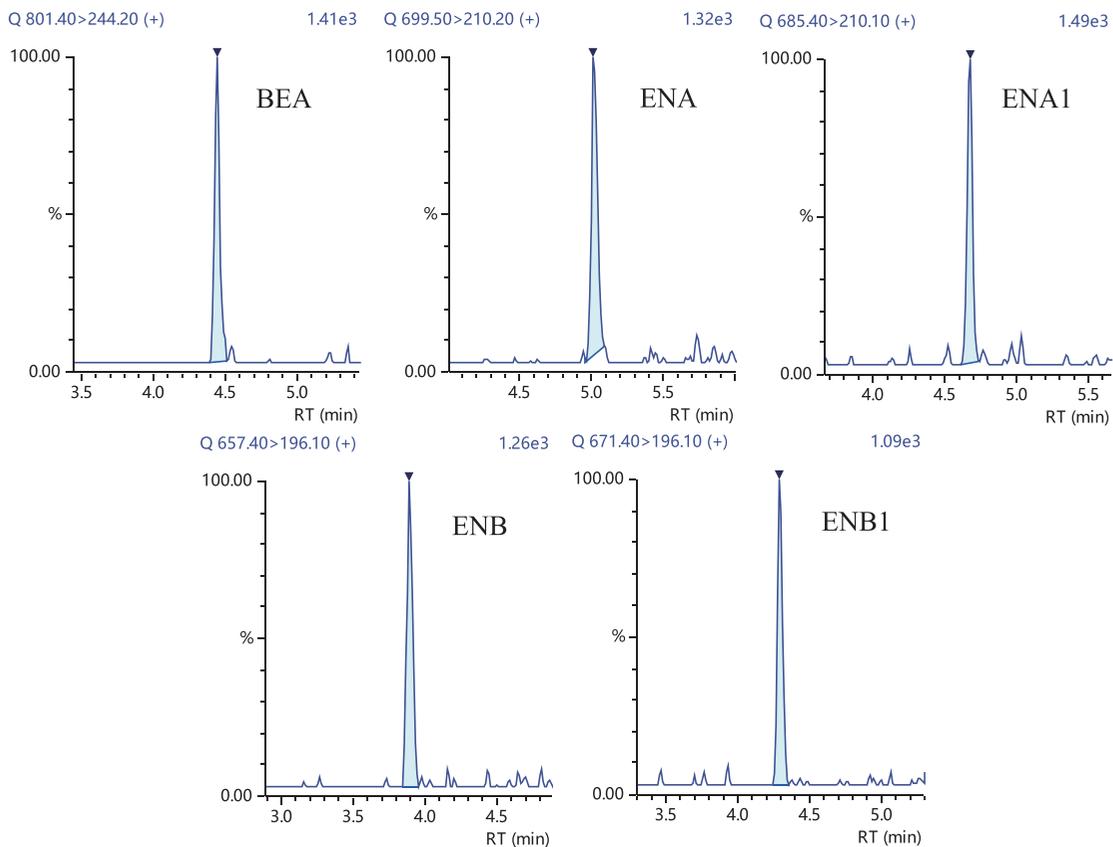


图 1 0.01 ng/mL 的白僵菌素和恩镰孢菌素混合标准溶液 MRM 色谱图

3.2 校准曲线和检出限

将配制的系列标准溶液进样，以定量离子峰面积比为纵坐标，浓度为横坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。根据 0.1 μ g/L 标样数据，以 3 倍信噪比计算白僵菌素和恩镰孢菌素的仪器检出限，各化合物检出限以及线性相关系数如表 3 所示。

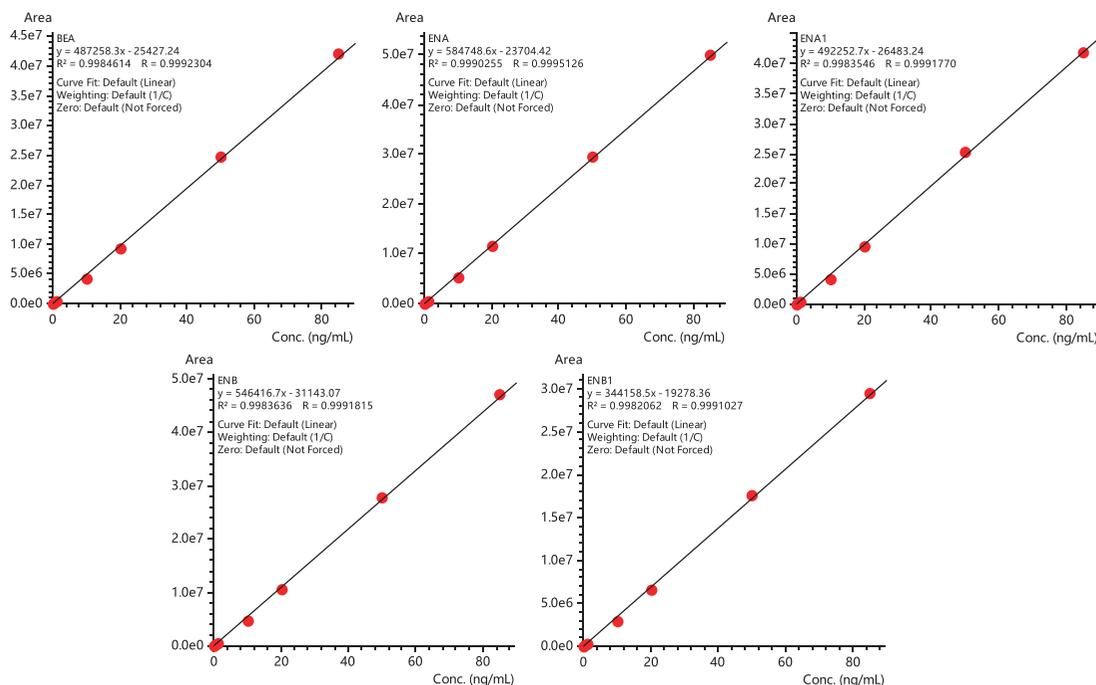


图 2 白僵菌素和恩镰孢菌素的标准曲线

表 3 白僵菌素和恩镰孢菌素校准曲线及检测限、定量限

编号	化合物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检测限 (ng/L)	定量限 (ng/L)
1	白僵菌素	$Y = (487258)X + (-25427.2)$	0.9992	86.0-130.4	1.11	3.38
2	恩镰孢菌素 A	$Y = (584749)X + (-23704.4)$	0.9995	87.7-127.7	1.36	4.13
3	恩镰孢菌素 A1	$Y = (492253)X + (-26483.2)$	0.9992	84.9-128.2	1.23	3.73
4	恩镰孢菌素 B	$Y = (546417)X + (-31143.1)$	0.9992	85.1-128.3	0.59	1.80
5	恩镰孢菌素 B1	$Y = (344158)X + (-19278.4)$	0.9991	84.7-133.8	1.66	5.04

3.3 重复性实验

取 0.1、1 和 50 $\mu\text{g/L}$ 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的重复性，测定结果见表 4。

表 4 白僵菌素和恩镰孢菌素保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

编号	化合物	RSD% (0.1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (1 $\mu\text{g/L}$)		RSD% (50 $\mu\text{g/L}$)	
		R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
1	白僵菌素	0.05	3.12	0.03	3.30	0.04	1.21
2	恩镰孢菌素 A	0.04	2.70	0.03	1.49	0.04	1.07
3	恩镰孢菌素 A1	0.03	1.91	0.04	0.93	0.04	0.55
4	恩镰孢菌素 B	0.06	2.68	0.04	1.76	0.04	0.80
5	恩镰孢菌素 B1	0.07	3.98	0.04	1.58	0.03	0.51

3.4 加标回收率

取玉米粉 5 g，加入混标工作液，使加标浓度为 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，样品经提取及净化后，按照 1.2 中的分析条件测定 5 种毒素的加标回收率，平均测定 3 次，具体结果见表 5。由结果可知，该方法灵敏度高，准确率高，可以满足白僵菌素和恩镰孢菌素的快速检测。

表 5 白僵菌素和恩镰孢菌素的加标回收率及相对标准偏差结果

编号	化合物	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				平均回收率 %	RSD%
		空白	加标 1	加标 2	加标 3		
1	白僵菌素	2.07	68.7	67.2	71.5	98.8	3.16
2	恩镰孢菌素 A	<LLOQ	66.1	71.1	72.8	100.0	4.98
3	恩镰孢菌素 A1	<LLOQ	69.3	70.4	77.4	103.4	6.07
4	恩镰孢菌素 B	<LLOQ	77.4	75.3	77.9	109.8	1.79
5	恩镰孢菌素 B1	<LLOQ	71.1	71.3	76.6	104.3	4.27

注：<LLOQ 表示低于定量下限

■ 结论

本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的方法。5 种毒素在 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ~85.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度范围内线性良好，相关系数 r 在 0.999 以上。在 0.1、1 和 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 三个浓度下，连续六针进样，化合物的保留时间和峰面积的 RSD% 分别在 0.03%~0.07% 和 0.55%~3.98% 之间，仪器精密度良好。加标浓度为 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品，5 种毒素的回收率在 98.8%~109.8% 之间，且重复性良好。该方法灵敏度高，分析时间短，结果准确，可用于食品中白僵菌素和恩镰孢菌素的准确定量检测。

岛津应用云

