

高效液相色谱三重四极杆质谱联用法测定尿液中链格孢霉毒素含量

LCMSMS-371

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定尿液中 5 种链格孢霉毒素的方法。该方法在 7 min 内完成 5 种链格孢霉毒素的分析。在两个数量级的线性范围内建立校准曲线，校准曲线的相关系数均在 0.995 以上。低、中、高三水平加标实验考察前处理的回收率及重复性，各浓度平行测试 6 次，5 种目标化合物的回收率和相对标准偏差分别在 79.3 ~ 104.5% 和 3.2 ~ 12.9% 之间。该方法灵敏度高，5 种链格孢霉毒素的定量检出限均低于 0.06 $\mu\text{g/L}$ ，可应用于尿液中 5 种链格孢霉毒素的同时快速检测。

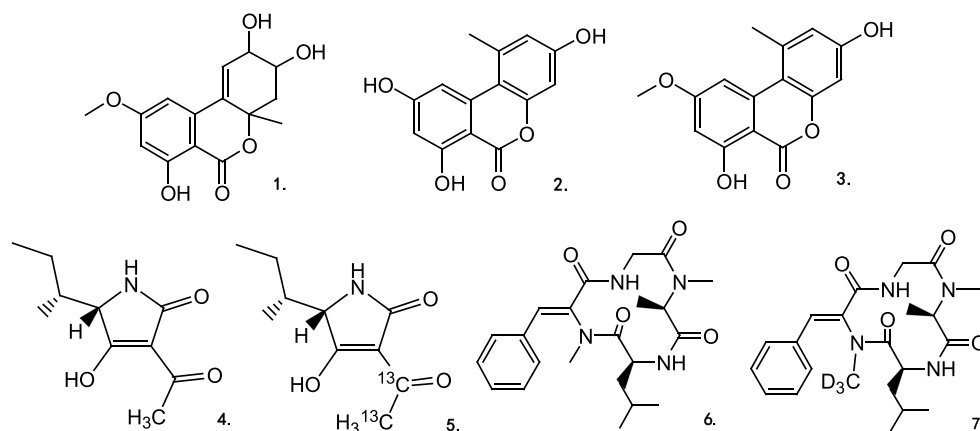
关键词： 三重四极杆质谱 链格孢霉毒素 尿液 暴露水平

链格孢霉菌 (*Alternaria*) 属于丝状真菌，是一种普遍存在于环境中的病原体和腐生菌，是低温环境下导致水果、蔬菜等农产品腐烂变质的主要微生物。链格孢霉菌产生的多种次级代谢产物链格孢霉毒素对人体具有诱变性、致癌性和致畸性等慢性或急性毒性作用。评估人体中此类毒素的暴露水平，有利于相应的限量标准和检测标准的制定完善。

目前的研究表明，AOH、AME 能以多种结合态存在于植物体内，人体也会二相代谢将其转换成醛酸化或者葡萄糖化的结合态。而结合态的标准品价格过于

高昂，10 种结合态标准品售价过百万。通过酶解将其还原，能够较准确地评估出尿液中链格孢霉毒素的暴露水平，该法经济、高效，便于后期标准的制定和推广。

目前已经有文献报道了尿液中 TeA 的检测，本文使用 β -葡萄糖苷酶酶解，同时检测尿液中 5 种链格孢霉菌 ALT、AOH、AME、TeA 和 TEN 尚属首次。目标化合物结构式见图 1。借助岛津超快速超高灵敏度液质联用仪 LCMS-8060 系统，五种目标物方法检出限均低于 0.06 $\mu\text{g/L}$ ，并成功用于尿样中链格孢霉菌的检测。供相关人员参考。



1 altenuene (ALT), 2 alternariol (AOH), 3 alternariol monomethyl ether (AME), 4 tenuazonic acid (TeA), 5 [$^{13}\text{C}_2$]-tenuazonic acid (TeA- $^{13}\text{C}_2$), 6 tentoxin (TEN), 7 [D_3]-tentoxin (TEN- D_3)

图 1 5 种链格孢霉毒素的结构式

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.93 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：HSS C18 色谱柱 2.1 mm I.D. ×100 mm L, 1.7 μm

流动相：A 相 -0.15 mM 碳酸铵水；B 相 -0.15 mM 碳酸铵甲醇

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样量：5 μL

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	泵	B.Conc.	20
4.00	泵	B.Conc.	100
5.50	泵	B.Conc.	100
5.60	泵	B.Conc.	20
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8060

接口温度：300°C

离子化模式：ESI(-)

DL 温度：250°C

加热气：空气 10.0 L/min

加热模块温度：400°C

雾化气：氮气 3.0 L/min

扫描模式：多反应监测 (MRM)

干燥气：氮气 10.0 L/min

驻留时间：50 ms

碰撞气：氩气

MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 优化参数

No.	化合物	英文名	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
1	细交链格孢菌酮酸	tenuazonic acid (TeA)	610-88-8	196.1	112.0*	10	24	10
					139.0	10	22	14
2	细交链格孢菌酮酸- ¹³ C ₂	[¹³ C ₂]-tenuazonic acid (TeA- ¹³ C ₂)	1486471-66-2	198.1	114.1*	10	25	11
					141.1	23	22	13
3	交链孢酚	alternariol (AOH)	641-38-3	257.0	147.1*	30	32	13
					159.1	29	33	15
4	交链孢烯	altenuene (ALT)	29752-43-0	291.1	186.1*	14	26	11
					214.1	14	22	13
5	腾毒素	tentoxin (TEN)	28540-82-1	413.1	214.1*	21	25	12
					271.2	21	18	18

6	腾毒素 -D ₃	[D ₃]-tentoxin (TEN-D ₃)	暂无	416.2	217.1*	12	24	13
					274.2	12	18	12
7	交链孢酚 单甲醚	alternariol monomethyl ether (AME)	26894-49-5	271.1	256.1*	13	22	16
					228.1	13	29	13

注：* 表示定量离子

1.3 标准溶液的配制

分别称取链格孢霉素标准品适量，用甲醇溶解，配制成浓度为 TeA 2000.0 µg/L、AOH 2400.0 µg/L、ALT 2400.0 µg/L、TEN 200.0 µg/L、AME 40.0 µg/L 混合标准储备液，置于 -18℃ 冰箱中保存。混合储备溶液以 20% 甲醇溶液按比例稀释，得系列浓度的标准品工作溶液。

1.4 样品前处理方法

取 1 mL 试样，加入内标，搁置 30 min 以上，加入 1 mL 缓冲液（醋酸 - 醋酸钠缓冲溶液，pH 5.2-5.3）以及 10 µL β- 葡萄糖苷酸酶，酶解 2 h，加入 0.5 mL 0.6 mol/L HCl 进行酸化，5 mL 乙酸乙酯萃取，干冰冷冻分层后，取上层，氮气吹干，加入 0.5 mL 20% 甲醇水溶液复溶，14000 r/min 离心 10 min，吸取上清液 0.4 mL，上机测定。

■ 结果与讨论

2.1 5 种链格孢霉素标准溶液的 MRM 色谱图

5 种链格孢霉素及内标混合标准溶液的 MRM 色谱图如下图 2 所示。

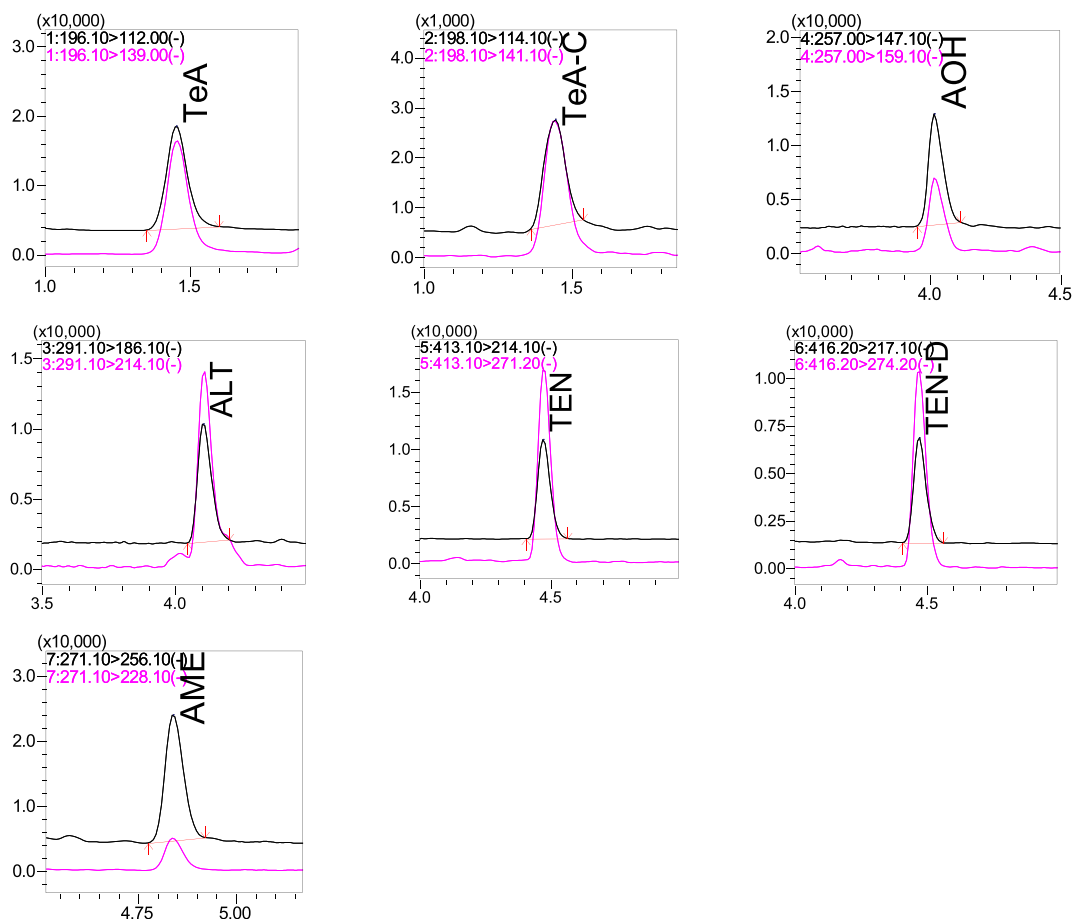


图 2 5 种链格孢霉素及内标的 MRM 色谱图

(浓度为 TeA 2.0 µg/L、AOH 2.4 µg/L、ALT 2.4 µg/L、TEN 0.2 µg/L、AME 0.04 µg/L；

内标 TeA-13C₂ 1.0 µg/L、TEN-D₃ 1.0 µg/L)

2.2 线性范围

按照 1.3 配制各浓度混合标准工作液，以标准工作溶液浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，内标法绘制标准曲线，所得校准曲线线性关系良好，均大于 0.995，准确度在 87.2~117.3% 之间。详见表 3。

表 3 校准曲线参数

序号	名称	校准曲线	线性范围 (μg/L)	相关系数 r	准确度 %	定量限 (μg/L)	检出限 (μg/L)
1	TeA	$Y = (0.99166)X + (1.8577)$	0.05~5	0.9956	92.8~117.3	0.016	0.005
2	AOH	$Y = (0.99352)X + (-0.15240)$	0.12~12	0.9978	93.5~104.1	0.019	0.006
3	ALT	$Y = (0.71843)X + (0.085063)$	0.12~12	0.9967	97.8~109.9	0.055	0.017
4	TEN	$Y = (7.53357)X + (0.093453)$	0.01~1	0.9986	87.2~106.8	0.007	0.002
5	AME	$Y = (86.8902)X + (-0.21486)$	0.002~0.2	0.9969	94.7~112.5	0.002	0.001

2.3 灵敏度实验

为考察仪器的灵敏度，将校准曲线浓度最低点混合标准工作溶液按 1.2 中的分析条件下进行测定。对浓度为 0.02 ng/mL 溶液进样分析，以 ASTM 法计算噪声，以噪声的 3 倍作为最低检出限（即 S/N=3，LOD 表示），以噪声的 10 倍作为最低定量限（即 S/N=10，LOQ 表示），则仪器对 5 种目标物的 LOD 和 LOQ 结果如表 3 所示。

2.4 基质加标实验

按照 1.4 制备样品，加标浓度如下表 4 所示，各平行测定 6 次。测试结果显示：加标回收率在 79.3 ~ 104.5% 之间，相对标准偏差在 3.2 ~ 12.9% 之间，结果见表 4。

表 4 基质加标实验结果

序号	化合物	加标浓度 (μg/L)	回收率 (%)	RSD (%)
1	TEN	0.01	95.5	7.1
		0.02	96.2	4.0
		0.05	95.7	6.9
2	ALT	0.12	100.7	5.3
		0.24	104.5	10.5
		0.50	97.4	4.2
3	AME	0.003	84.2	8.2
		0.006	81.3	6.7
		0.015	79.3	9.8
4	AOH	0.12	90.8	6.9
		0.24	94.5	12.3
		0.50	95.4	9.3
5	TeA	0.05	85.5	12.9
		0.10	82.3	8.5
		0.30	80.4	3.2

2.5 样品测定结果

尿液中加标样品色谱图如图 3（加标浓度为表 4 中级别 2 浓度）。实际尿液样本中未检测到链格孢霉毒素，如图 4。

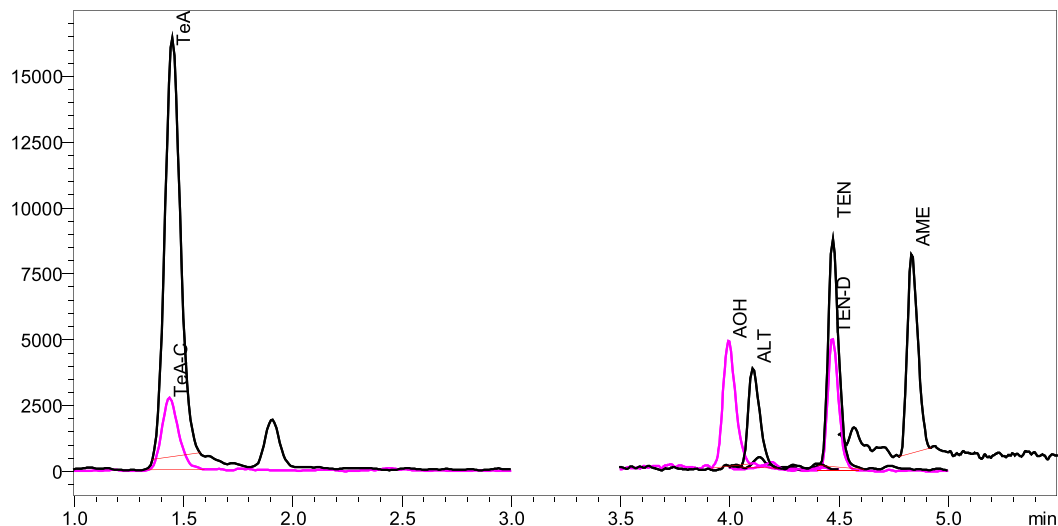


图3 加标样品色谱图

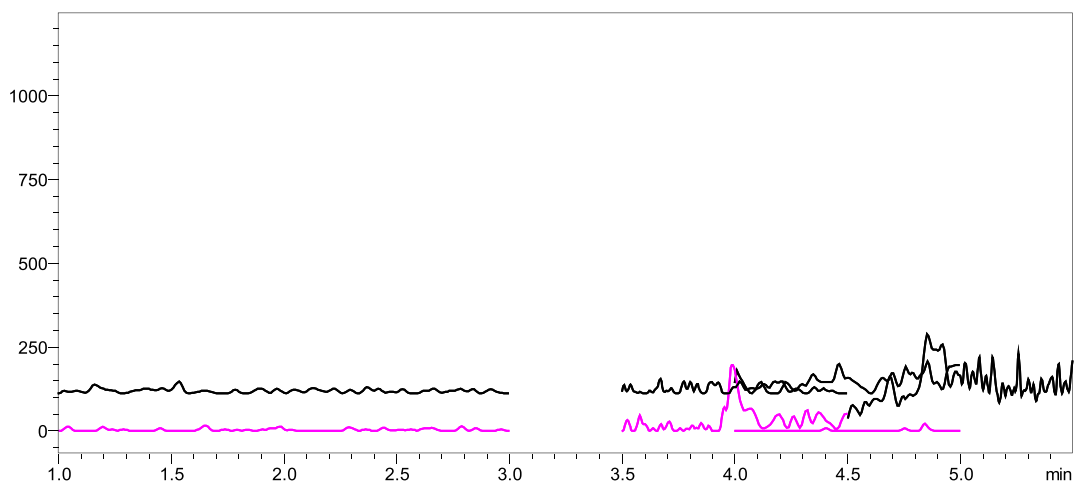


图4 空白样品色谱图

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用测定尿液中 5 种链格孢霉素的方法。该方法在 7 min 内完成 5 种链格孢霉素的分析，5 种链格孢霉素的定量检出限均低于 0.06 $\mu\text{g}/\text{L}$ ，在两个数量级的线性范围内建立校准曲线，校准曲线的相关系数均在 0.995 以上。优化的前处理方法对空白基质三水平加标实验考察前处理的回收率及重复性，各浓度平行测试 6 次，5 种目标化合物的回收率和相对标准偏差分别在 79.3 ~ 104.5% 和 3.2 ~ 12.9% 之间。该方法具有分析速度快、灵敏度高、重复性好的优势，可用于尿液中链格孢霉素的高灵敏度检测。

■ 致谢

本文系与北京市疾病预防控制中心邵兵老师课题组合作完成。

岛津应用云

