

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定米粉中的米酵菌酸

LCMSMS-517

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-8045 联用测定米粉中米酵菌酸含量的方法。米酵菌酸在优化后的色谱及质谱条件下，采用负离子模式进行电离，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用基质匹配外标法定量，米酵菌酸在 0.1 ng/mL ~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.999 以上，各校准点准确度在 94.2%~105.5% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词： 三重四极杆质谱 米粉 米酵菌酸

米酵菌酸 (Bongkrekic Acid) 是一种由椰毒假单胞菌酵米面亚种产生可引起食物中毒的毒素，是变质淀粉类制品，发酵玉米面制品及变质银耳引起食物中毒的主要原因。该毒素耐热性极强，即使 100 °C 的开水煮沸或用高压锅蒸煮仍不能破坏其毒性，进食后经消化道吸收、经血液散布全身后可损伤人的肝脏、脑、肾及心脏等器官，严重者可致死亡。近年来，在我国已发生多起由米酵菌酸引起的食物中毒事件，其中 2018 年在广东东莞和河源发生的米粉中毒事件，以及 2020 年在黑龙江鸡西市发生“酸汤子”食物中毒事件，均已造成多人死亡。

目前，米酵菌酸常用测定的方法有液相色谱法和液相色谱 - 串联质谱联用法。现行的食品安全国家标准《GB 5009.189-2016 食品中米酵菌酸的测定》，采用高效液相色谱法测定银耳及其制品、发酵米面及其制品等食品中的米酵菌酸，方法灵敏度低，且前处理有机试剂消耗量大，过程繁琐耗时。液相色谱 - 串联质谱联用法具有很高的灵敏度和选择性，适合于复杂基体中的痕量物质分析，且准确度高。本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，建立了米粉中米酵菌酸含量的测定方法。该方法稳定、灵敏度高，适用于米粉中米酵菌酸的快速检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质谱联用系统。具体配置为：

系统控制器：CBM-20A

脱气机：DGU-20A_{5R}

输液泵：LC-30AD×2

自动进样器：SIL-30AC

柱温箱：CTO-20A

检测器：LCMS-8045

色谱工作站：LabSolutions Ver. 5.96

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm, P/N:227-30048-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -5 mM 乙酸铵 +0.1% 甲酸水溶液 B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：40 °C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 40%，时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	40
4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5.10	Pumps	Pump B Conc.	40
7.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：ESI，负离子模式

脱溶剂管温度：200 °C

离子源接口电压：-3.0 kV

加热模块温度：400 °C

雾化气：氮气 3.0 L/min

接口温度：300 °C

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：氩气

驻留时间：150 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
米酵菌酸	bongkrekic acid	11076-19-0	485.3>441.3*	14	12	28
			485.3>397.3	14	20	24

注：* 表示定量离子对

1.3 样品前处理方法

称取 5.00 g 试样（精确至 0.01 g）置于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管中，加入 15 mL 80% 甲醇水溶液（含 0.5% 甲酸，v/v）。混匀，室温下避光浸泡 1 h，置于超声波振荡器中超声提取 30 min。再以 6000 r/min，离心 20 min，取上清液 1 mL 过 0.22 μm 微孔有机滤膜后进行 LC-MS/MS 分析。

1.4 混合标准溶液的配制

取空白试样，按 1.3 中前处理方法操作后，获得空白基质溶液。取适量 1 μg/mL 的米酵菌酸的标准中间溶液，使用空白基质溶液进行稀释，配制成浓度为 0.1 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 和 20 ng/mL 的基质匹配标准系列工作液，供液相色谱 - 串联质谱仪测定。以定量离子峰面积为纵坐标，对应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

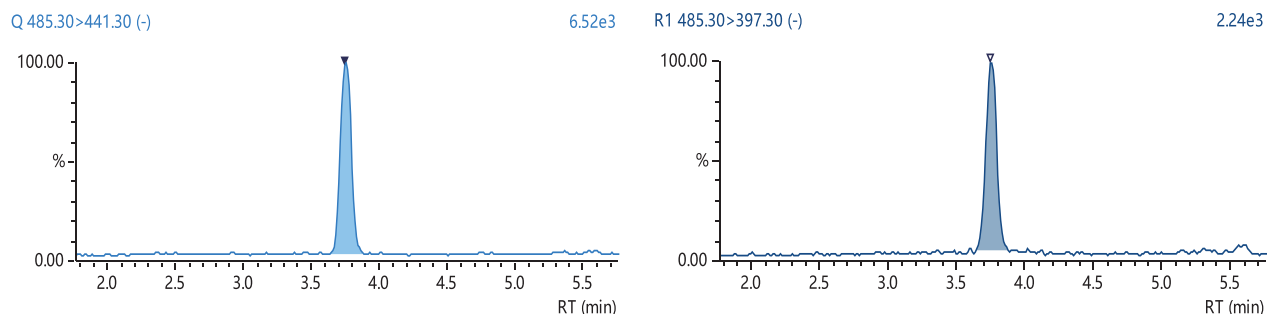


图 1 米酵菌酸标准样品 MRM 图谱 (1 ng/mL)

2.2 线性范围与检出限

将 0.1 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 和 20 ng/mL 不同浓度的米酵菌酸基质标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，使用外标法定量。以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好，线性方程及相关系数见表 3。

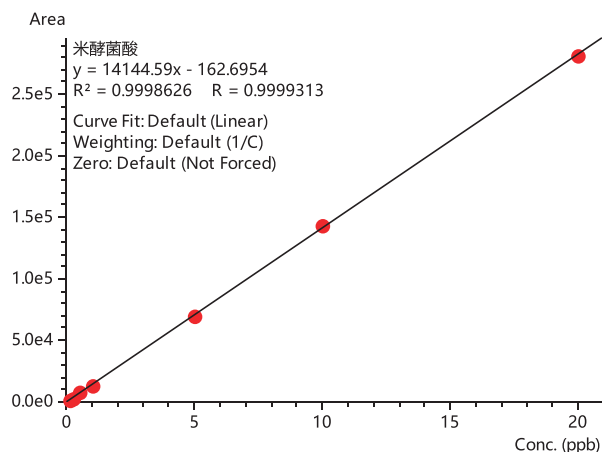


图 2 米酵菌酸的校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

化合物名称	校准曲线	r	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	检出限 (ng/mL)
米酵菌酸	Y=14144.59X-162.70	0.9999	0.1~20	94.2~105.5	0.03

2.3 精密度实验

对 1.0 ng/mL、2.5 ng/mL 和 5.0 ng/mL 不同浓度的米酵菌酸基质标准工作液连续测定 6 次，考察仪器的精密度，保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示：不同浓度样品中米酵菌酸保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.09% ~ 0.12% 和 0.57% ~ 3.06% 之间，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

Conc.(ng/mL)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
1.0	0.12	3.06
2.5	0.09	2.16
5.0	0.09	0.57

2.4 回收率实验

称取空白米粉样品，加入少量米酵菌酸标准溶液，使加标浓度分别为 2 μg/kg，10 μg/kg 和 20 μg/kg。按照 1.3 样品前处理方法提取净化后，测定米酵菌酸的加标回收率。空白米粉样品 MRM 色谱图如 3 所示，2 μg/kg 加标样品 MRM 色谱图如 4 所示，加标回收率结果见表 5。由结果可知，该方法灵敏度高，且准确率好。

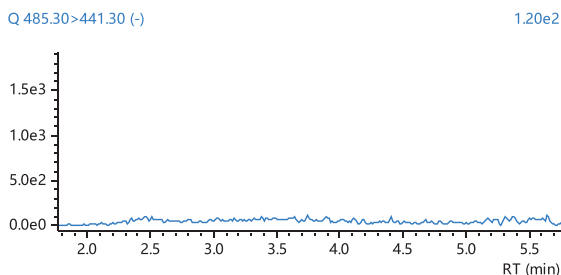


图 3 空白米粉样品 MRM 图谱

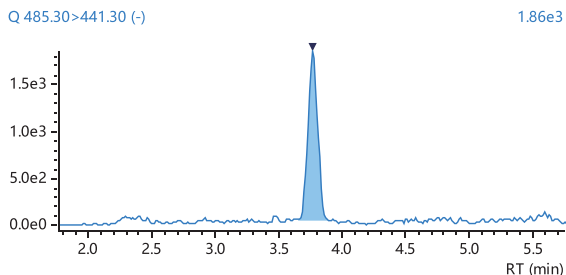


图 4 米酵菌酸的加标样品 MRM 图谱 (2 μg/kg)

表 5 米酵菌酸的加标回收率结果 (n=3)

名称	加标水平 (µg/kg)	平均回收率 %
米酵菌酸	2	94.0
	10	104.8
	20	102.2

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定米粉中米酵菌酸含量的方法。米酵菌酸在 4 min 内出峰，且峰形良好。使用基质匹配外标法定量，米酵菌酸在 0.1 ng/mL ~20 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线线性相关系数在 0.999 以上，各校准点准确度在 94.2%~105.5% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。方法学结果表明，本方法操作快速，精密度高，回收率好，可用于米粉中米酵菌酸的快速测定。

岛津应用云

