

LC-MS/MS 法测定婴幼儿配方奶粉中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的含量

LCMSMS-1090

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用仪测定婴幼儿配方奶粉中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的方法。前处理采用乙腈对婴幼儿配方奶粉提取两次，并过亲水亲脂共平衡小柱净化。采用内标法进行定量测试，校准曲线线性范围为 0.01-50 $\mu\text{g/L}$ ，线性相关系数 R 为 0.999。精密度测试，对同一样品重复进样 6 次，峰面积 RSD 为 1.47%，精密度良好。进行基质加标回收率测试，回收率在 96.2%-106.0% 之间，符合标准要求。

关键词： 三重四极杆液质联用仪 婴幼儿配方奶粉 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素

技术特点：

- ❖ 线性范围为 0.01-50 $\mu\text{g/L}$ 优于标准，进样体积仅 2 μL ，低于标准规定的 5 μL ，可减少基质污染。
- ❖ LabSolutions Insight 支持离子丰度比的国标参数自动匹配，并能对超标样品进行批量识别。

蜡样芽孢杆菌呕吐毒素（Cereulide）是一种由蜡样芽孢杆菌产生的食源性毒素，常见于乳制品和淀粉类食物中。蜡样芽孢杆菌呕吐毒素为一种小分子环状肽，分子量为 1.2 kDa，具有较强的耐热性和耐酸耐酶性，常规的食物加工方式以及杀菌均无法使其失活，患者在摄入 0.5-6 h 内产生恶心、呕吐等症状，少数严重可造成肝损伤和衰竭等急性症状。

目前我国未对食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素含量设定强制性限量指标，仅对蜡样芽孢杆菌数量在部分预包装食品中做了限量要求，如《食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量 GB 31607-2021》中对热

处理、部分或未经热处理的散装食品中要求蜡样芽孢杆菌限量值为不大于 10000 MPN/g（ML）。

近期多个品牌的奶粉因可能含有蜡样芽孢杆菌毒素而被全球召回，国家市场监督管理总局对此高度重视，国务院食安办、市场监管总局表示将持续强化监管，保障婴幼儿配方奶粉质量安全。岛津参考《食品安全国家标准 食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的测定（初稿）》，使用 LCMS-8050RX 建立了检测婴幼儿配方奶粉中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的分析方法。该方法灵敏度高、特异性好，可为相关从业者参考。

实验部分

1.1 仪器

使用岛津超快速液相色谱仪 LC-40B X3 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050RX 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	SCL-40	柱温箱：	CTO-40C
输液泵：	LC-40B X3	质谱仪：	LCMS-8050RX
自动进样器：	SIL-40C X3	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.135
数据解析软件：	LabSolutions Insight Ver. 5.0.99.0		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱： Shim-pack Scepter C18-300（100 mm×2.1 mm I.D., 1.9 μm ）
（岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-31203-05）

流动相： A 相 -0.1% 甲酸 -2 mol/L 乙酸铵水溶液，B 相 -0.1% 甲酸乙腈

柱温： 40 $^{\circ}\text{C}$ 流速： 0.35 mL/min

洗脱方式： 梯度洗脱，初始浓度为 B 相 80%，进样体积： 2 μL

洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	100
6.00	Pumps	Pump B Conc.	100
6.50	Pumps	Pump B Conc.	80
8.00	Pumps	Pump B Conc.	80
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源：	ESI+	接口温度：	350℃
接口电压：	4.5 kV	DL管温度：	250℃
聚焦电压：	2.0 kV	加热模块温度：	400℃
雾化气：	氮气 3.0 L/min	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
干燥气：	氮气 3.0 L/min	MRM参数：	见表 2
加热气：	空气 15.0 L/min	碰撞气：	氩气 (270 kPa)

表 2 MRM 参数

No.	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	157232-64-9	1171.60	172.00*	-33	-96	-31
				314.10	-33	-73	-33
				357.10	-33	-66	-39
2	¹³ C ₆ -蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	1487375-69-8	1176.60	172.00*	-22	-92	-16
				314.50	-34	-75	-20
				358.20	-34	-72	-24

注：* 表示定量离子对

■ 样品前处理和标准溶液配制

2.1 样品前处理

前处理所用试液，参考《食品安全国家标准 食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的测定（初稿）》中 3.2 部分进行配置。标准溶液储备液及工作液，参考标准文稿 3.4 进行配置。固相萃取小柱为 SHIMSEN Styra HLB SPE 小柱（200 mg/6 mL，PN: 380-00855-10）。

试样前处理参考标准文稿 5.1 进行，市售婴幼儿配方奶粉，准确称取 1.0 g 于 15 mL 具塞离心管中，加入内标工作液（0.1 mg/L）20 μL，静置 30 min 后，加入 5 mL 乙腈，1500 r/min 涡旋振荡 30 s，室温超声混匀 30 min，4℃下 12000 r/min 离心 10 min。收集上清液到 15 mL 具塞离心管中，重复提取一次，在提取液中加入 5 mL 水，涡旋混匀，1500 r/min 涡旋振荡 30 s。

取前述 HLB 小柱，对样品提取液如图 1 流程进行净化。

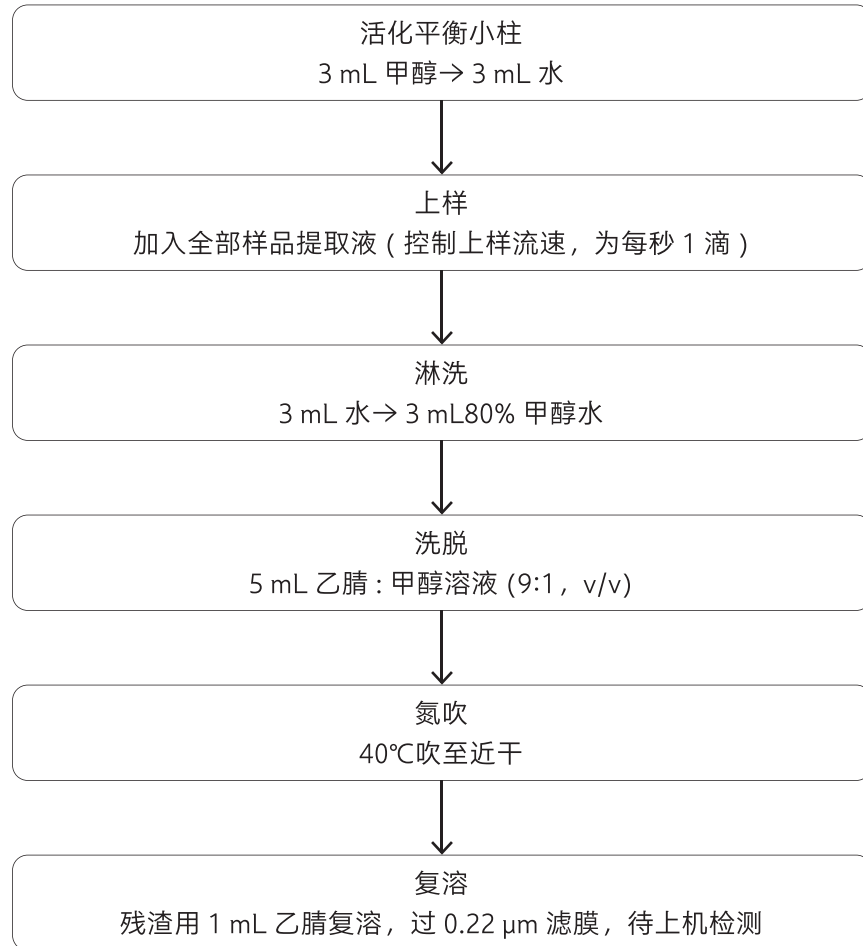


图 1 SPE 样品净化流程图

2.2 系列标准品溶液配制

准确量取制备好的蜡样芽孢杆菌呕吐毒素标准工作液 (0.1 mg/L), 1 μL、5 μL、10 μL、50 μL、100 μL、200 μL、500 μL、1000 μL、2000 μL、5000 μL 分别于 10 mL 容量瓶中, 加入 200 μL 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素内标工作液 (0.1 mg/L), 用乙腈定容, 配置浓度分别为 0.01 μg/L、0.05 μg/L、0.1 μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L、10 μg/L、20 μg/L 和 50 μg/L 的标准系列工作液。

■ 结果与讨论

3.1 定性结果与色谱图

使用 LabSolutions Insight 定性判定时, 离子丰度比最大允许偏差可以自定义, 也可以选择自动匹配国标参数。该功能贴合我国法规标准要求, 减化了实验人员操作。

在审核界面中, 可清晰对比多个样品的定性判定结果。若色谱峰的保留时间或离子丰度比超出预设标准范围, 则该峰不会以颜色填充, 而是以空心显示, 直观提示未通过定性判定。

此外还提供标记功能, 在标记中可设置保留时间、离子丰度比和浓度限量值等限量范围, 当目标化合物浓度超过限量范围上限时, 将会红色条突出显示; 低于限量范围下限时, 将会以蓝色条突出显示, 直观提示超限样品, 如图 2。本方法测试样品符合标准文稿 5.5 要求。

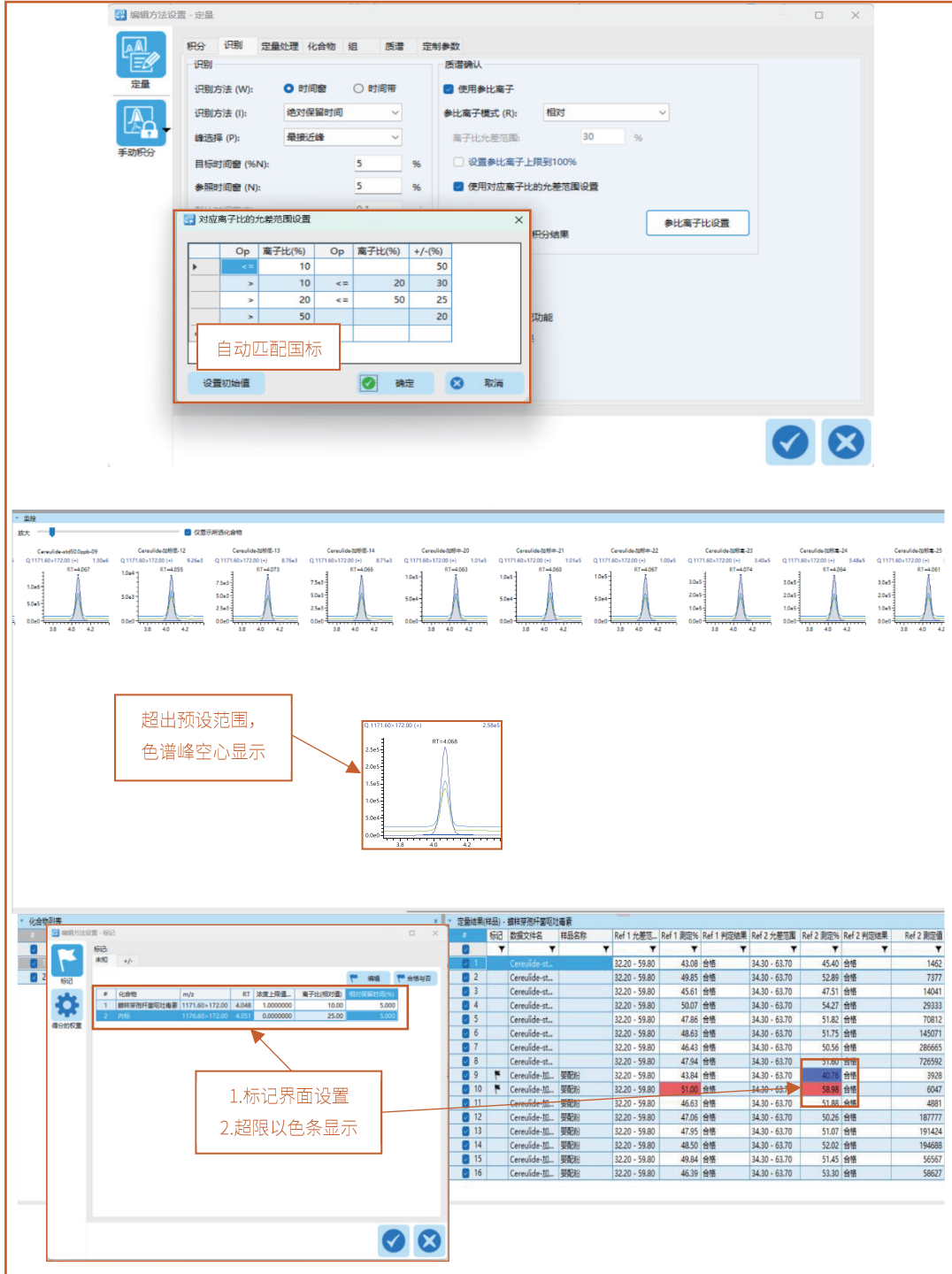


图 2 离子丰度比设置及审核界面

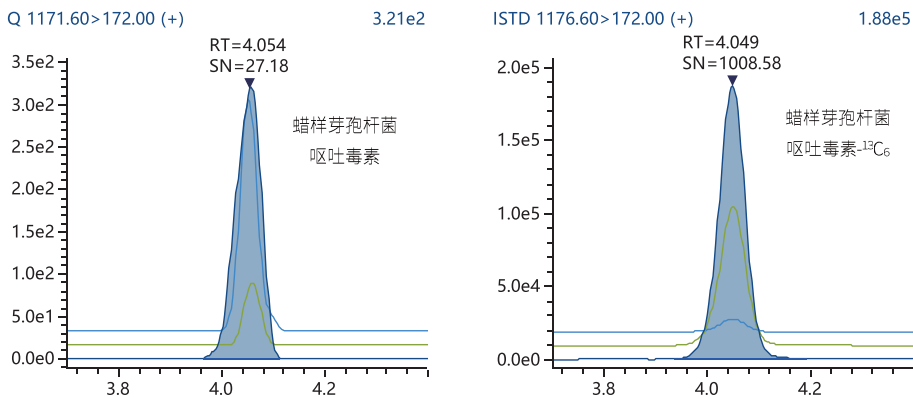


图3 化合物 MRM 色谱图
(蜡样芽孢杆菌呕吐毒素: 0.01 μg/L, 内标 - 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素-¹³C₆: 20 μg/L)

3.2 校准曲线、检出限和定量限

将配制的系列标准溶液进样分析, 以分析物与内标物的离子峰面积比值为纵坐标, 分析物浓度与内标物浓度比值为横坐标, 绘制校准曲线。根据校准曲线级别 1 浓度标样数据, 以 3 倍信噪比计算蜡样芽孢杆菌的方法检出限、10 倍信噪比计算定量限, 化合物检出限、定量限以及线性相关系数如表 3 所示。

表 3 化合物校准曲线信息

化合物	线性范围 (μg/L)	相关系数 R	检出限 (μg/L)	定量限 (μg/L)
蜡样芽孢杆菌 呕吐毒素	0.01~50	0.999	0.001	0.004

3.3 重复性实验

取 0.1 μg/L 标准工作溶液, 连续进样 6 次, 考察仪器的重复性, 保留时间 RSD 为 0.07%, 峰面积 RSD 为 1.46%。

3.4 加标回收率

精确称取未检出蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的市售婴幼儿配方奶粉样品 1.0 g, 分别加入低中高三个浓度的混合标准工作溶液, 使得添加浓度依次为 0.1、5 和 20 μg/kg。样品经提取及净化后, 按照 1.2 中的分析条件测定蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的加标回收率, 平行测定 3 次, 具体结果见表 4。平均回收率在 96.2%-106.0% 之间, RSD 在 0.8%-3.8% 之间, 由结果可知, 该方法灵敏度高, 准确率高, 可以满足蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的检测。

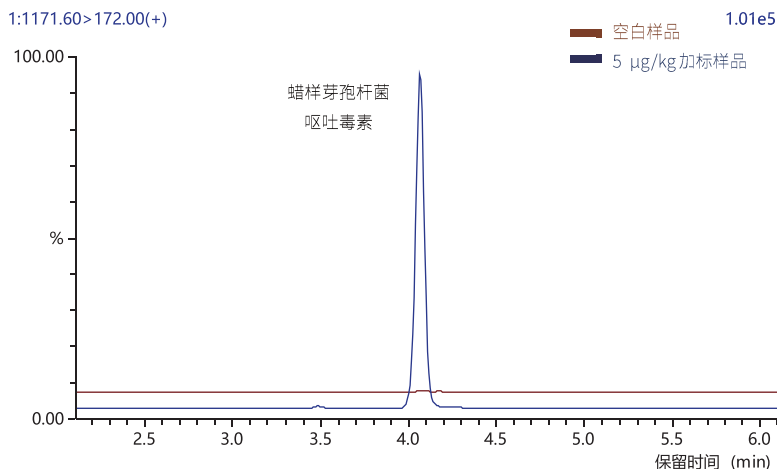


图 4 样品和加标回收样品 MRM 色谱图

表 4 化合物加标回收信息 (n=3)

序号	化合物	样品浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	添加浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 RSD%
1	蜡样芽孢杆菌 呕吐毒素	N.D	0.1	106.0	3.8
			5	104.0	0.8
			20	96.2	0.8

注：…结果为 N.D. (Not Detected, 表示低于方法检测限)

■ 结论

本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用仪测定婴幼儿配方奶粉中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的方法。方法线性关系良好，精密度测试结果符合要求，基质加标回收率理想，适用于食品相关检测工作。

岛津应用云

