

高效液相色谱 - 串联质谱法测定婴儿配方羊奶粉中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素

LCMSMS-1099

摘要：本文参考 ISO 18465 : 2017 标准方法，建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用系统测定婴儿配方羊奶粉中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素含量的方法。蜡样芽胞杆菌呕吐毒素在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式进行电离，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用内标法定量，蜡样芽胞杆菌呕吐毒素在 0 ~ 10 ng/mL 浓度范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数为 0.9999，各校准点准确度在 90.0% ~ 100.5% 之间，检出限可达 0.01 ng/mL，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词：三重四极杆质谱 羊奶粉 蜡样芽胞杆菌呕吐毒素

技术特点：

- ❖ 前处理使用 QuEChERS 方法，相比传统 SPE 方法操作简单，且通量更高。
- ❖ 灵敏度高，定量下限可达 0.05 ng/mL，优于 ISO 18465 : 2017 标准方法 0.1 ng/mL。

近期，因乳粉原料疑似遭到蜡样芽胞杆菌呕吐毒素 (Cereulide) 的污染，多家知名品牌在全球范围针对旗下多批次婴儿配方乳粉开展召回，事件已波及到中国市场。蜡样芽胞杆菌呕吐毒素是一种由蜡样芽胞杆菌产生的食源性毒素，污染食品无腐败变质、无异异味，肉眼不可见、感官无法识别，属“隐形毒素”。Cereulide 为十二环肽，耐热、对蛋白酶不敏感，且对自然杀伤细胞有作用抑制，会影响免疫功能和引发急性肝衰竭。婴儿由于免疫系统未发育完全，摄入此类毒素后，易导致恶心、呕吐、胃痉挛等一系列症状，严重时可引起脱水或电解质紊乱。

目前，我国尚未对食品中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素含量设定强制性限量指标。欧洲食品安全局首次将婴儿体内蜡样芽胞杆菌毒素的急性参考剂量设定为 0.014 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重，基于该急性参考剂量，结合婴儿每日奶粉食用量、体重计算出的奶粉中毒素限量值为 0.43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，建立了测定婴儿配方羊奶粉中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素含量的方法。该方法样品前处理过程简单，且准确度高，可用于婴儿配方羊奶粉中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的监控。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-20ADXR×2	自动进样器：	SIL-20AC
柱温箱：	CTO-20AC	检测器：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.135		

1.2 分析条件

液相条件

色 谱 柱 : Shim-pack Scepter Claris C18-300 (100 mm×2.1 mm I.D., 3 μm)
(岛津(上海)实验器材有限公司, P/N: 227-31209-05)

流 动 相 : A相 -0.1% 甲酸 -10 mM 甲酸铵水溶液; B相 -0.1% 甲酸乙腈

流 速 : 0.35 mL/min

进 样 体 积 : 10 μL

柱 温 : 40°C

洗 脱 方 式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为 80%, 时间程序见表 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
7.00	Pumps	Pump B Conc.	80
8.00	Controller	Stop	

质谱条件

离 子 源 : ESI+

接 口 电 压 : 4 kV

碰 撞 气 : 氦气 (230 kPa)

雾 化 气 : 氮气 3 L/min

干 燥 气 : 氮气 10 L/min

加 热 气 : 空气 10 L/min

接 口 温 度 : 400°C

DL 管 温 度 : 250°C

加 热 模 块 温 度 : 400°C

扫 描 模 式 : 多反应监测 (MRM)

MRM 参 数 : 见表 2

驻 留 时 间 : 100 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)
蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	Cereulide	157232-64-9	1170.7>314.4*	-22	-78	-32
			1170.7>499.4	-22	-63	-32
13C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	13C6-Cereulide	1487375-69-8	1176.7>172.2*	-22	-104	-28
			1176.7>315.4	-22	-77	-20

注: * 表示定量离子对

1.3 同位素内标溶液的配制

准确量取 13C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素储备液于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈定容, 配制成 13C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素浓度为 1000 ng/mL 的同位素内标液。

1.4 标准溶液的配制

分别准确量取蜡样芽孢杆菌呕吐毒素标准中间液适量, 再加入 13C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素同位素内标液, 使用乙腈稀释, 配制成蜡样芽孢杆菌呕吐毒素浓度为 0、0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL 和 10 ng/mL, 13C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素浓度为 5 ng/mL。

1.5 样品前处理方法

准确称取样品 5 g (精确至 0.01 g), 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 水和 50 μ L 同位素内标溶液, 充分振荡, 加入 10 mL 乙腈和 QuEChERS 混合盐包 (无水硫酸镁 4 g, 氯化钠 1 g, 柠檬酸钠二水合物 1 g, 柠檬酸氢二钠水合物 0.5 g), 剧烈振荡 10 min, 在 4000 r/min 的条件下离心 6 min, 移取 1 mL 乙腈相 (上层) 过 0.22 μ m 聚四氟乙烯 (PTFE) 微孔滤膜, 将溶液装入 1.5 mL 进样小瓶中, 上机 LC-MS/MS 分析。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

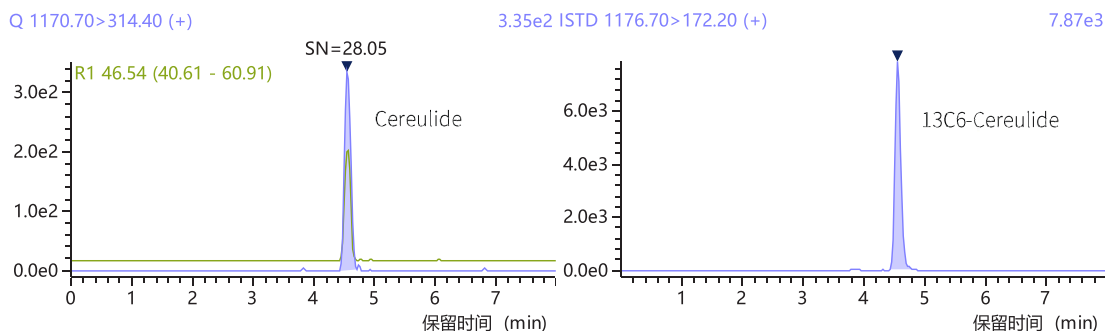


图 1 蜡样芽胞杆菌呕吐毒素 (0.05 ng/mL) 和 13C6- 蜡样芽胞杆菌呕吐毒素 (5 ng/mL) 的 MRM 图谱

2.2 线性范围与检出限

将不同浓度的蜡样芽胞杆菌呕吐毒素标准工作液, 按照 1.2 中的分析条件进行测定, 使用内标法定量。以浓度为横坐标, 峰面积比为纵坐标, 绘制校准曲线。以响应值为 3 倍噪音的浓度作为检出限, 所得校准曲线线性关系良好, 线性方程、相关系数、校准点准确度及检出限见图 2 所示。

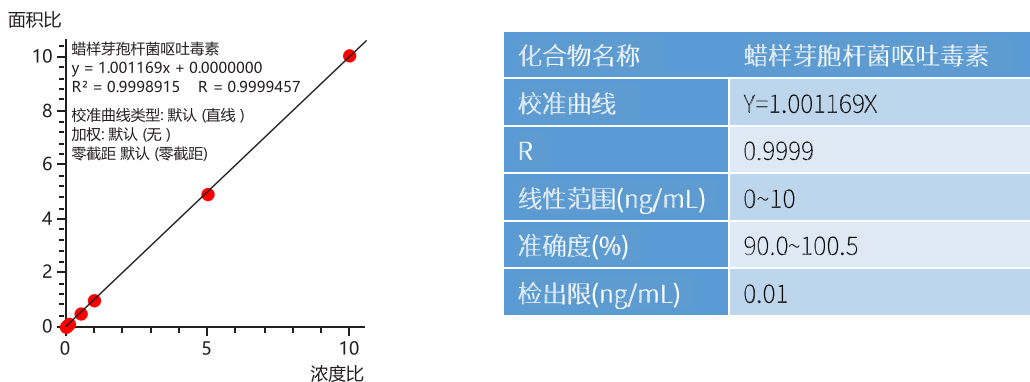


图 2 蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的校准曲线

2.3 精密度实验

对不同浓度的蜡样芽胞杆菌呕吐毒素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 3 所示。结果显示: 不同浓度样品溶液中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.10% ~ 0.21% 和 2.39% ~ 6.75% 之间, 显示仪器精密度良好。

表 3 保留时间 (R. T.) 和峰面积 (Area) 重复性结果 (n=6)

名称	Conc.(ng/mL)	RSD % (R.T.)	RSD % (Area)
蜡样芽胞杆菌呕吐毒素	0.1	0.21	6.75
	0.5	0.16	2.39
	1	0.10	2.71

2.4 加标回收率实验

准确称取某婴儿配方羊奶粉样品，按照 1.5 中的样品前处理方法提取净化后，上机测试，未检测出蜡样芽胞杆菌呕吐毒素（见图 3）。向测试样品中加入适量蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的标准储备液和 $^{13}\text{C}_6$ -蜡样芽胞杆菌呕吐毒素同位素内标液，使得蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的加标浓度分别为 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。加标样品经过前处理后，测定蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的加标回收率，加标回收率结果见表 4。由结果可知，该方法简便，且准确率高。

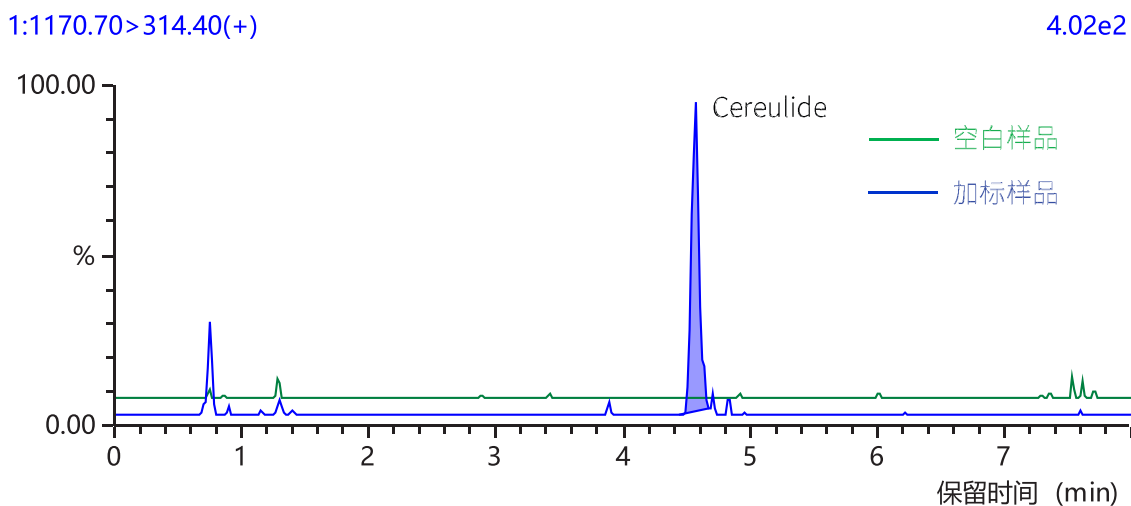


图 3 空白样品和加标样品 ($0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$) 的 MRM 重叠图谱

表 4 蜡样芽胞杆菌呕吐毒素的加标回收率结果 (n=3)

名称	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 %	相对标准偏差 RSD%
蜡样芽胞杆菌呕吐毒素	0.1	96.0	4.78
	0.3	106.6	0.97
	1	98.2	0.89

■ 结论

本文建立了一种使用岛津高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8045 测定婴儿配方羊奶粉中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素含量的方法。方法学结果表明, 本方法样品前处理操作简便, 且结果准确度高、重复性好, 可用于婴儿配方羊奶粉中蜡样芽胞杆菌呕吐毒素含量的快速测定。

岛津应用云

