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-1110

摘要： 本文使用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8045RX，参照《食品安全国家标准 食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的测定（送审稿）》建立了婴幼儿配方奶粉中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素含量的检测方法。前处理采用乙腈提取，HLB 小柱净化，内标法定量，在 0.01~50 μg/L 浓度范围内线性关系良好，相关系数 r 在 0.999 以上。高、中、低三个浓度的标准溶液，连续 6 次进样，目标化合物的峰面积 RSD 在 0.82%~4.00% 之间，保留时间 RSD 在 0.05 %-0.07% 之间，仪器精密度良好。在基质加标回收率测试中，不同加标量的回收率在 103.1% ~107.9% 之间。方法同时考察了目标化合物在仪器上的长期进样稳定性，0.1 μg/L 基质标样 120 针连续进样，外标峰面积及其与内标峰面积比值的相对标准偏差在分别为 6.31% 和 6.21%，方法长期稳定性良好。

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：

- ❖ 以 2 μL 进样量可获得明显优于参考标准中 5 μL 所达到的分析效果，体现系统和方法具有良好的稳定性和更高的灵敏度。
- ❖ 0.1 μg/L 基质标样连续进样 120 针，蜡样芽孢杆菌呕吐毒素峰面积及其与内标峰面积比值的相对标准偏差均不大于 6.31%，方法长期稳定性良好。

蜡样芽孢杆菌呕吐毒素（Cereulide）是由蜡样芽孢杆菌部分毒株分泌的一种环肽型毒素，其化学结构为十二环肽，具有耐酸、耐碱、耐热及抗蛋白酶降解的显著稳定性。该毒素主要作用于自然杀伤细胞，通过抑制其活性干扰机体免疫功能，并可直接诱发急性肝衰竭及严重呕吐等毒性反应，是婴幼儿配方奶粉中备受关注的一种高风险食源性毒素。

2025 年底以来，多款国际知名品牌的婴幼儿配方奶粉相继检出蜡样芽孢杆菌呕吐毒素，引发全球多家乳企启动预防性召回，使该毒素的食品安全风险再度进入公众视野。

本方案参考《食品安全国家标准 食品中蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的测定（送审稿）》，采用 LCMS-8045RX 建立了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、特异性良好，可为相关检测人员与行业从业者提供技术参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用超高效液相色谱系统和三重四极杆质谱 LCMS-8045RX，具体配置为：

输液泵： LC-40B X3	系统控制器： SCL-40
自动进样器： SIL-40C X3	三重四极杆质谱仪： LCMS-8045RX
柱温箱： CTO-40C	
色谱工作站： LabSolutions Ver. 5.135；LabSolutions Insight Ver. 4.2	

1.2 分析条件

液相色谱条件

色　谱　柱：Shim-pack Scepter Claris 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: 227-31209-02）

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

流　　速：0.35 mL/min

进 样 体 积：2 μL　　柱　　温：40℃

洗 脱 方 式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 80%，洗脱程序见表 1。

表 1　梯度洗脱时间程序

时间 (min)	单元	Command	Value
5.00	泵	B.Conc	100.0
6.00	泵	B.Conc	100.0
6.10	泵	B.Conc	80.0
8.00	控制器	stop	

质谱条件

离　子　源：ESI+

雾 化 气 流 速：3.0 L/min

加 热 气 流 速：15.0 L/min

干 燥 气 流 速：3.0 L/min

接 口 电 压：1 kV

加 热 块 温 度：400℃

D L　温　度：250℃

接 口 温 度：400℃

聚 焦 电 压：2 kV

M R M 参 数：见表 2

表 2　MRM 参数

No.	化合物	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bais(V)	CE(V)	Q3 Pre Bais(V)
1	蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	157232-64-9	1170.80	172.10*	-34	-100	-17
				357.20	-34	-69	-23
				314.10	-34	-78	-30
2	$^{13}C_6$- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	1487375-69-8	1176.80	172.10*	-34	-100	-16
				358.20	-34	-73	-23
				315.00	-34	-80	-30

注：* 表示定量离子

1.3 标准曲线溶液配制

分别吸取蜡样芽孢杆菌呕吐毒素标准使用液（0.1 mg/L）1 μL、2 μL、5 μL、10 μL、50μL、100 μL、200 μL、500 μL、1 000 μL、2 000 μL、5 000 μL 于 10 mL 容量瓶中，再分别加入 200 μL 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素内标使用液（0.1 mg/L），加乙腈定容至刻度，混匀。蜡样芽孢杆菌呕吐毒素标准系列工作液的浓度分别为 0.01 μg/L、0.02 μg/L、0.05 μg/L、0.1μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、2.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L、20.0 μg/L 和 50.0 μg/L，^{13}C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素内标溶液的浓度为 2.0 μg/L。

1.4 样品前处理

试样前处理参考标准送审稿 5.2 进行，具体步骤如下：

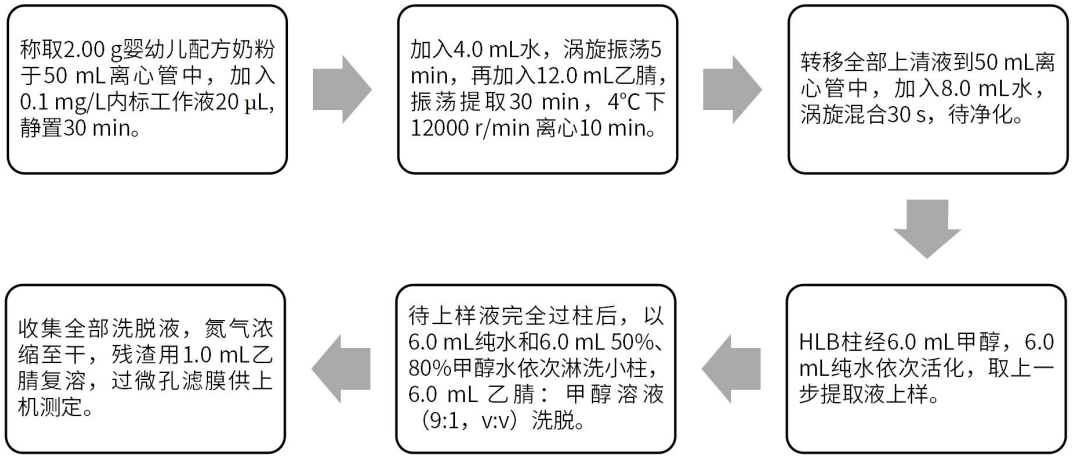


图 1　前处理操作流程图

■ 结果与讨论

2.1 灵敏度和专属性

0.02 μg/L 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素及内标 ^{13}C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素的 MRM 色谱图如图 2 所示。与基质空白样品相比，化合物保留时间处无干扰。

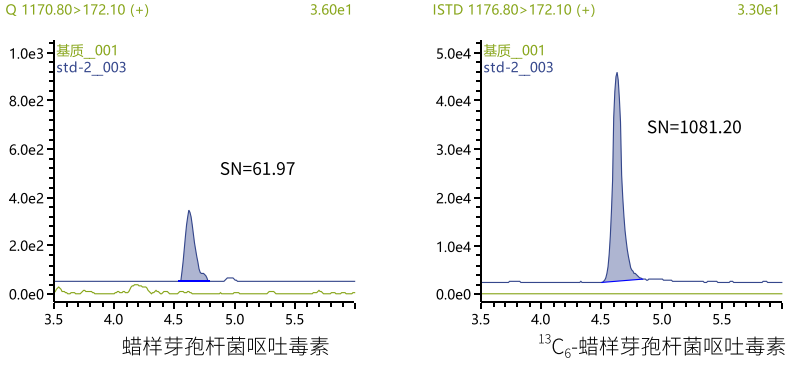
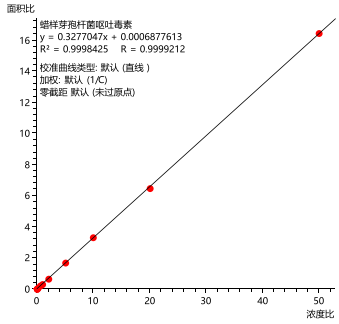


图 2　化合物的 MRM 色谱图

（蜡样芽孢杆菌呕吐毒素：0.02 μg/L，13C6- 蜡样芽孢杆菌呕吐毒素：2 μg/L）

2.2 校准曲线

将配制的一系列的基质标准工作溶液上机分析，采用内标法定量。以浓度比为横坐标，峰面积比为纵坐标，绘制校准曲线，目标化合物的线性范围、相关系数 r、仪器检出限（根据线性最低浓度点计算）见图 3 所示。



线性范围（μg/L）	0.01~50
回归方程	y=0.3277047x+0.0006877613
相关系数 R	0.9999
准确度	94.46%~108.98%
检测限（μg/L）	0.001
定量限（μg/L）	0.003

图 3　校准曲线及相关信息

2.3 精密度

取浓度为 0.1、1 和 10 μg/L 标准品溶液，连续进样 6 次，考察仪器的精密度，测定结果见表 3。低中高浓度下，目标化合物的峰面积 RSD 在 0.82%~4.00% 之间，保留时间 RSD 在 0.05 %- 0.07% 之间，仪器精密度良好。

表 3　低、中、高浓度精密度 (%，n=6)

化合物	RSD%（0.1 μg/L）		RSD%（1 μg/L）		RSD%（10 μg/L）	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	0.06	4.00	0.07	3.04	0.05	0.82

2.4 加标回收率

选择经过检测不含目标物的婴幼儿配方奶粉样品，进行 0.05、0.5、5 μg/kg 含量加标回收试验，按照前述前处理方式处理，上机测定，以校准曲线内标法定量，计算回收率。蜡样芽孢杆菌呕吐毒素回收率在 103.1% ~ 107.9% 之间，具体结果见表 4。

表 4　加标实验结果（n=3）

化合物	样品测定浓度 μg/kg	加标量 0.05 μg/kg		加标量 0.5 μg/kg		加标量 5 μg/kg	
		回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%	回收率 %	RSD%
蜡样芽孢杆菌呕吐毒素	N.D.	103.1	4.42	104.7	0.90	107.9	1.04

2.5 长期稳定性

取适量标准工作溶液，用空白基质溶液配成浓度为 0.1 μg/L（内标浓度为 2 μg/L）的样品，连续进样 120 针，测试本方法的长期稳定性，蜡样芽孢杆菌呕吐毒素峰面积及其与内标峰面积比值的相对标准偏差分别为 6.31% 和 6.21%，方法长期稳定性良好，具体见图 4。

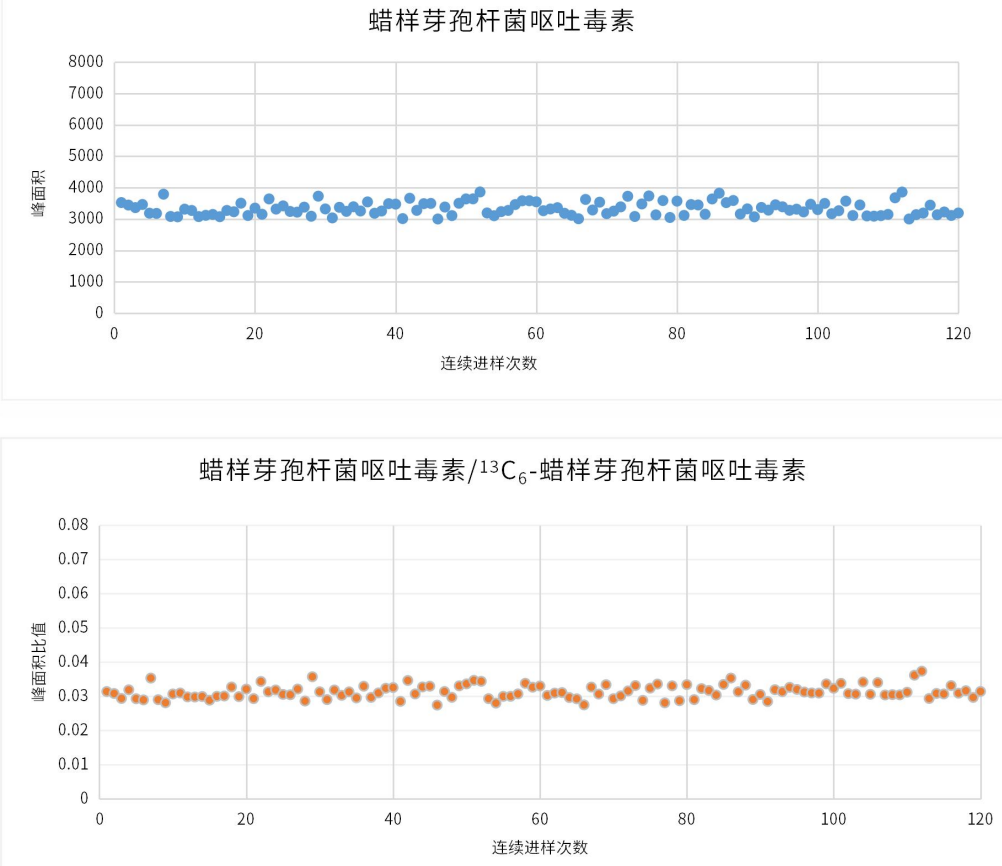


图 4　0.1 μg/L 基质标样连续进样峰面积

结论

本文使用岛津三重四极杆质谱 LCMS-8045RX，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（送审稿）》，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，且稳定性好，可供相关人员参考。

岛津应用云

岛津企业管理（中国）有限公司 –分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center

Email: dr_jin@shimadzu.com.cn　Tel: 86(21)34193983　http://www.shimadzu.com.cn