

· 论 著 ·

液相色谱 – 串联质谱法测定食源性中毒患者血浆中米酵菌酸

徐小民, 陈苒, 黄百芬, 韩见龙

浙江省疾病预防控制中心, 浙江 杭州 310051

摘要: **目的** 建立快速测定血浆中米酵菌酸的液相色谱 – 串联质谱法, 为相关食源性中毒事件的病因学鉴定提供技术支持。**方法** 血浆样品经乙腈沉淀蛋白、水稀释、PAX 阴离子交换固相萃取小柱净化后, 采用 XBridge™ BEH C₁₈ 色谱柱分离, 0.01 % (v/v) 氨水 – 甲醇为流动相梯度洗脱, 采用液相色谱 – 串联质谱法检测血浆中米酵菌酸含量。**结果** 血浆中米酵菌酸在 1 ~ 400 ng/mL 浓度范围内线性关系良好, 相关系数为 0.999 3, 线性回归方程为 $y=16\ 509x+3\ 134.3$ 。方法检出限为 0.5 ng/mL, 定量限为 1 ng/mL。在 1 (定量限)、10 (10 倍定量限)、200 ng/mL (线性范围中间点) 3 个浓度水平下, 加标平均回收率为 76.0% ~ 96.7%, 相对标准偏差为 5.2% ~ 12.8%。检测 2 例食源性中毒患者血浆中米酵菌酸含量分别为 394 ng/mL 和 92.3 ng/mL。**结论** 通过优化样品前处理和色谱分离条件, 采用液相色谱 – 串联质谱法可以实现血浆中米酵菌酸快速准确的定性和定量分析, 满足实际样品检测的需要。

关键词: 米酵菌酸; 液相色谱 – 串联质谱法; PAX 阴离子交换柱净化; 血浆

中图分类号: R115 文献标识码: A 文章编号: 2096-5087 (2019) 12-1205-05

Determination of bongkreikic acid in plasma of food poisoning patients by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

XU Xiao-min, CHEN Qing, HUANG Bai-fen, HAN Jian-long

Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: **Objective** To quickly determine bongkreikic acid (BKA) in plasma qualitatively and quantitatively by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), and to provide technical support for etiological identification of food poisoning events. **Methods** The plasma sample was protein precipitated with acetonitrile, diluted with water and purified with anion exchange solid phase extraction cartridge of PAX. The sample extract was separated by an XBridge™ BEH C₁₈ chromatographic column. Gradient elution was conducted with the mobile phase of 0.01 % (v/v) ammonia and methanol. Then BKA was detected by LC–MS/MS. **Results** The equation of linear regression was $y=16\ 509x+3\ 134.3$. Good linear relationship was obtained for BKA at a range from 1 to 400 ng/mL in plasma, with the correlation coefficient of 0.999 3. The limit of detection (LOD) was 0.5 ng/mL and the limit of quantitation (LOQ) was 1 ng/mL. The average recoveries were 76.0%–96.7% with relative standard deviations (RSDs, $n=6$) of 5.2%–12.8% at three spiking levels of 1 (LOQ), 10 (10 times of LOQ) and 200 ng/mL (medium of linear range). The concentrations of BKA in plasma obtained from two patients suffering from food poisoning were 394 and 92.3 ng/mL. **Conclusion** The optimized sample pretreatment and chromatographic separation conditions can achieve rapid, accurate, qualitative and quantitative analysis of BKA in plasma.

Key words: Bongkreikic acid; Liquid chromatography–tandem mass spectrometry; PAX anion exchange purification; Plasma

DOI: 10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.12.004

基金项目: 浙江省基础公益类科技计划 (LGF18H260007); 浙江省食品安全检测技术中心 (2015DZ002)

作者简介: 徐小民, 博士, 副主任技师, 主要从事食品安全理化检验工作

通信作者: 徐小民, E-mail: chemxuxm@163.com

米酵菌酸是椰毒假单胞菌的主要毒性代谢产物,容易污染吊浆粿、糍粿、醋凉粉等发酵米面制品以及变质银耳,我国和印度尼西亚都曾发生因误食米酵菌酸污染的食物造成的群体性中毒事件,死亡率达 40% 以上^[1-3]。米酵菌酸中毒潜伏期为 0.5 ~ 12 h,主要表现为恶心呕吐、腹痛腹胀、乏力等中毒症状,重症者出现血尿、肾、肝、脑等实质性多脏器损害^[1-2,4]。米酵菌酸食源性中毒的病因学鉴定主要采用生物法和化学仪器法。生物法包括动物毒性试验法和椰毒假单胞菌鉴定法,不需要昂贵的仪器,但耗时较长。化学仪器法包括高效液相色谱法和液相色谱-串联质谱法^[3-4],能直接检测米酵菌酸含量,为中毒的剂量-效应关系研究提供基础数据^[5-8],目前文献报道的样品基质只有银耳、发酵米面制品等^[3,7],而血浆等生物样品的米酵菌酸检测方法却鲜有报道。液相色谱-串联质谱法因高灵敏度和高选择性,广泛应用于复杂基质痕量污染物检测^[9-11],本研究采用液相色谱-串联质谱法检测因食用变质黑木耳中毒患者血浆米酵菌酸含量,通过优化样品前处理和色谱分离条件,实现快速准确的定性和定量分析,为相关中毒事件的病因学鉴定提供参考。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 LCMS-8060 液相色谱-串联四极杆质谱仪(日本岛津公司);超纯水装置(美国 Millipore 公司);米酵菌酸标准溶液(1 mg/mL,加拿大 Toronto Research Chemicals 公司);甲醇和乙腈(HPLC 级,美国 Fisher Scientific 公司);甲酸(HPLC 级,美国 ROE Scientific 公司);氨水[29.6% (v/v),美国 Fisher Scientific 公司];超纯水(美国 Millipore 公司);阴离子交换固相萃取小柱(PAX,60 mg/3 mL,天津博纳艾杰尔科技公司)。阳性血浆来源于 2 例米酵菌酸中毒患者在医院生化检测后剩余的样本。

1.2 液相色谱-串联质谱条件 XBridge™ BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 2.5 μm, 美国 Waters 公司),柱温 30 ℃;进样体积 5.0 μL;流动相:A 为 0.01% (v/v) 氨水溶液,B 为甲醇;流速 0.35 mL/min;梯度洗脱程序:0~3.0 min, 20% B~90% B; 3.0~4.0 min, 90% B; 4.0~4.5 min, 90% B~20% B; 4.5~8.0 min, 20% B。洗针溶剂:80% 甲醇溶液,用于清洗进样针内外壁,避免残留。

电喷雾离子源负离子模式(ESI⁻);离子源接口电压:4.5 kV;雾化气:氮气,3.0 L/min;干燥气:氮气,10 L/min;加热气:空气,10 L/min;碰撞气:

氩气;脱溶剂管温度:250 ℃;加热块温度:350 ℃;接口温度:250 ℃;多反应监测模式(MRM):485.2 > 441.2 (14 eV, 定量离子对),485.2 > 397.2 (18 eV)。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理 取血浆 0.6 mL 于 2 mL 塑料离心管中,加入 1 mL 乙腈,涡旋混匀 10 s,14 000 r/min 离心 2 min,转移上清液于 5 mL 塑料离心管中,加入 1 mL 水,涡流混匀 5 s。将混匀后的提取液定量转移到 PAX 固相萃取小柱(使用前依次用 2 mL 甲醇和水活化),待快流干时依次用 2 mL 水和 2 mL 甲醇淋洗除杂,弃去所有淋洗液,用 1.5 mL 1% 甲酸/甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,混匀,过 0.22 μm 滤膜后采用液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3.2 标准溶液的配制 用甲醇逐级稀释米酵菌酸标准溶液(1 mg/mL),配制成浓度分别为 0.1 μg/mL 和 1 μg/mL 的标准中间液。按样品处理过程折算,准确吸取适量标准中间液,用甲醇配制成浓度为 1 ~ 400 ng/mL 的标准系列溶液(相当于血浆中的浓度),用液相色谱-串联质谱仪测定。

1.3.3 基质效应测定 在最优化条件下,分别将 5、20、200 ng/mL 3 个浓度水平的米酵菌酸添加到空白血浆中,按 1.3.1 步骤进行样品前处理后采用液相色谱-串联质谱仪测定。基质效应 = (血浆提取净化后的基质中仪器测定峰面积 / 纯溶剂中仪器测定峰面积) × 100%,计算结果等于 100% 时表示无基质效应, < 100% 表示基质抑制效应, > 100% 表示基质增强效应。

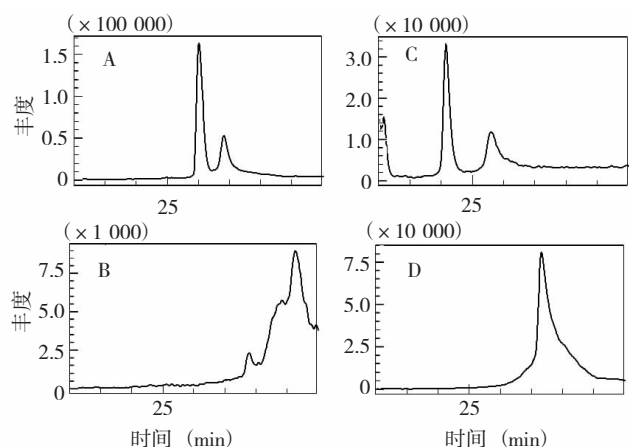
1.3.4 回收率和精密度试验 将 1 (定量限)、10 (10 倍定量限)、200 ng/mL (线性范围中间点) 3 个浓度水平的米酵菌酸添加到空白血浆中,按 1.3.1 步骤进行样品前处理后采用液相色谱-串联质谱仪测定,每个水平进行 6 次平行试验,检测日内回收率和精密度;连续测定 3 d,检测日间回收率和精密度。

1.3.5 疑似米酵菌酸中毒患者样品检测 在一起疑似因食用变质黑木耳引起的食源性中毒事件中,患者表现出米酵菌酸中毒的典型症状,采用本方法检测症状严重和较轻的 2 例患者血浆中的米酵菌酸含量。

2 结果

2.1 液相色谱条件的优化 米酵菌酸是含有 3 个羧基基团的长链脂肪酸,分别选择 0.01% 氨水-甲醇、5 mmol/L 甲酸-甲醇、0.01% 氨水-乙腈和 5 mmol/L 甲酸-乙腈 4 组流动相分离,采用 5 mmol/L 甲酸作

为水相,无论采用乙腈还是甲醇作为有机相均无法得到理想的色谱峰;采用 0.01%氨水作为水相、乙腈和甲醇作为有机相时均能得到对称尖锐的色谱峰,但用甲醇分离的信号响应值要比用乙腈分离的高 4 倍,本研究选用 0.01%氨水-甲醇作为流动相分离血浆中的米酵菌酸,此条件下流动相 pH 值小于 11,小于 XBridge™ BEH C₁₈ 柱的最高耐受 pH 值 12。见图 1。

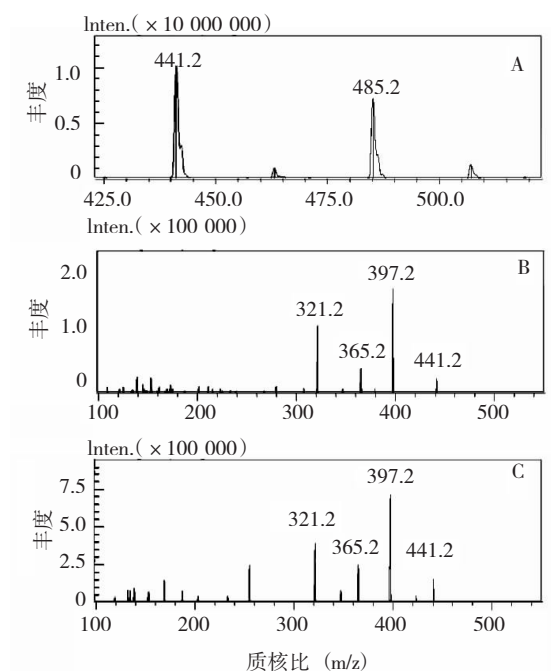


注: A 为 0.01%氨水-甲醇; B 为 5 mmol/L 甲酸-甲醇; C 为 0.01%氨水-乙腈; D 为 5 mmol/L 甲酸-乙腈。

图 1 不同流动相条件分离米酵菌酸色谱图

2.2 质谱条件的优化 一级质谱 (MS^1) 母离子 $[M-H]$ 为 m/z 485.2,碰撞能量为 20 eV 时,二级质谱 (MS^2) 主要碎片离子 $[M-H] - CO_2$ 、 $[M-H] - CO_2 - CO_2$ 、 $[M-H] - CO_2 - CO_2 - CH_3OH$ 、 $[M-H] - CO_2 - CO_2 - CH_3OH - CO_2$ 分别为 m/z 441.2、397.2、365.2 和 321.2,主要来源于丢失二氧化碳或甲醇。根

据各碎片离子 MRM 模式下的响应值,确定 485.2 > 441.2 (14 eV) 为定量离子对,485.2 > 397.2 (18 eV) 为定性离子对。见图 2。



注: A 为溶剂中米酵菌酸一级质谱全扫描图; B 为二级质谱离子扫描图; C 为患者高浓度血浆样品提取液中二级质谱离子扫描图。

图 2 米酵菌酸质谱扫描图

2.3 样品提取方法 在 10 ng/mL 的加标水平下,0.6 mL 血浆直接上样和采用乙腈沉淀蛋白后水稀释上样的 PAX 柱净化回收率 ($n=3$),血浆采用乙腈沉淀蛋白后上样过柱的回收率和精密度明显优于直接上样的结果。见表 1。

表 1 米酵菌酸在不同上样条件下 PAX 净化回收率和精密度

上样方式	加标浓度 (ng/mL)	测定值 1 (ng/mL)	测定值 2 (ng/mL)	测定值 3 (ng/mL)	平均值 (ng/mL)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
直接上样	10.0	6.65	5.91	8.41	6.99	69.9	18.4
乙腈沉淀蛋白后上样	10.0	10.02	9.65	9.06	9.58	95.8	5.1

2.4 净化条件的优化 分别观察 0.5%、1%、2% 甲酸 / 甲醇对 PAX 柱中吸附的米酵菌酸的洗脱效果,要达到 95% 以上的洗脱效果时,洗脱液用量分别为 3 mL、1.5 mL 和 1 mL,即 2% 甲酸 / 甲醇的洗脱液用量最小,但液相色谱分离时所用的流动相为 0.01% 氨水-甲醇,溶剂效应会使米酵菌酸的色谱峰展宽。本研究选择 1% 甲酸 / 甲醇洗脱,用量为 1.5 mL,不会造成后续色谱分离时的溶剂效应,较少的洗脱液用量

也可以避免用到氮吹等费时的浓缩步骤。

2.5 基质效应 在 5、20、200 ng/mL 3 个浓度水平下,基质效应在 91.7% ~ 103.8% 之间。

2.6 方法的线性范围、检出限和定量限 以定量离子对峰面积为纵坐标,标准溶液质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。在血浆样品 1 ~ 400 ng/mL 的浓度范围内,线性关系良好,相关系数为 0.999 3,线性回归方程为 $y = 16\,509x + 3\,134.3$ 。

为保证检出限水平下也能看到明显的定性离子对的色谱峰,以定性离子对响应值为3倍噪音的样品添加浓度作为方法检出限,以定量离子对响应值为10倍噪音的样品添加浓度作为方法定量限,则血浆中米酵菌酸的检出限为0.5 ng/mL,定量限为1 ng/mL。

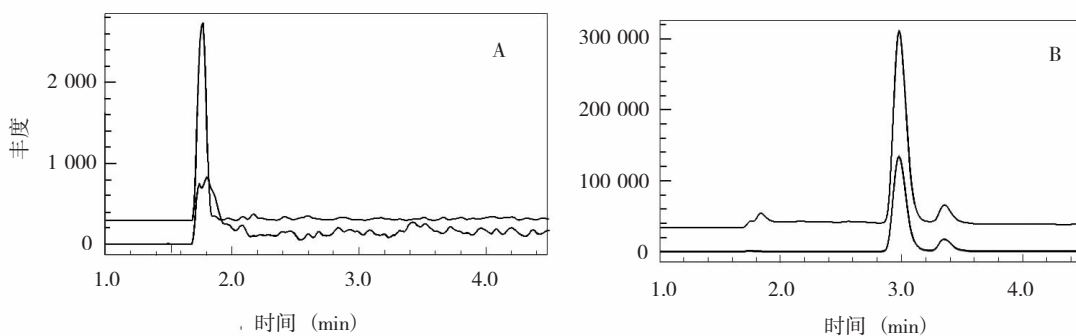
2.7 方法的回收率和精密度 在1、10、200 ng/mL 3个浓度水平下,日内平均回收率为78.3%~96.0%,相对标准偏差为5.2%~11.5%;日间平均回收率为76.0%~96.7%,相对标准偏差为5.5%~12.8%。见表2。

2.8 中毒患者样品检测 症状严重和较轻患者的血浆样品中的米酵菌酸含量分别为394 ng/mL和

表2 血浆中米酵菌酸的平均回收率和精密度(%, n=6)

加标浓度 (ng/mL)	日内		日间	
	回收率	相对标准偏差	回收率	相对标准偏差
1	78.3	11.5	76.0	12.8
10	95.6	6.7	96.7	6.9
200	96.0	5.2	95.3	5.5

92.3 ng/mL。典型样品和空白血浆中米酵菌酸的MRM色谱图见图3,在保留时间为3.02 min的快速分离条件下,未见明显干扰峰(右边小峰为米酵菌酸的异构体峰)。高浓度血浆样品提取液显示了与米酵菌酸标准溶液较为一致的二级质谱碎片离子(图2),进一步确证了中毒病因。



注: A 为空白血浆; B 为样品。

图3 米酵菌酸MRM色谱图

3 讨论

本研究通过优化样品提取和净化等前处理条件、液相色谱流动相和质谱检测条件,建立了快速测定血浆中米酵菌酸的液相色谱-串联质谱法。

血浆中含有大量蛋白质、多肽和氨基酸,此类基质在PAX小柱净化时,会与米酵菌酸竞争吸附离子交换点位,造成回收率偏低。净化前采用乙腈沉淀蛋白后上样,可以有效提高米酵菌酸的过柱回收率。

聚合物基质的PAX固相萃取小柱能有效净化复杂基质中含羧酸基团的被测物^[12-13],周鹏^[3]采用PAX小柱实现了银耳中米酵菌酸的有效净化,但需要用3 mL的0.5%甲酸/甲醇洗脱被测物,为保证较低的检出限,需要用氮吹等耗时的方法来浓缩。项目组经过洗脱液中甲酸的比例,用1 mL 1%甲酸/75%乙腈/甲醇洗脱PAX小柱中吸附的氟乙酸^[13],避免了氮吹浓缩步骤。本研究通过优化PAX小柱净化时洗脱液中甲酸浓度和洗脱液用量,最终选择1.5 mL的1%甲酸/甲醇洗脱被测物,此洗脱液可以不用氮吹直接进样检测,简化了操作步骤,保证了检测结果

的准确性和重现性。

米酵菌酸既包含疏水的长链烷基基团,又包含亲水的3个羧酸基团,具有两性化合物的特征。本研究发现,相对于酸性流动相分离,采用碱性流动相分离时能改善色谱峰的拖尾现象,获得更理想的色谱分离结果,且采用甲醇作为有机相能得到更高的灵敏度。

基质效应是影响复杂基质质谱定量检测准确性的最关键因素^[14-17],一般多采用固相萃取等方法来净化样品基质^[18-20],达到降低基质效应的目的。本研究采用具有阴离子交换功能的PAX小柱来净化血浆基质中的米酵菌酸,在5、20、200 ng/mL 3个浓度水平下,基质效应在91.7%~103.8%之间,说明本方法优化后的提取、净化、色谱分离以及质谱检测条件,可以有效控制基质效应,使纯溶剂标准校正血浆中米酵菌酸成为可能,避免了烦琐的基质匹配校正曲线的制作,简化了操作步骤。

在血浆样品1~400 ng/mL的浓度范围内,本方法线性关系良好,检出限为0.5 ng/mL,具有较好的回收率和重现性。根据样本检测结果,确证中毒患者血浆中存在较高浓度的米酵菌酸,本方法准确、灵

敏、快速且简便,可以满足实际样品检测的需要。

参考文献

- [1] MOEBIUS N, ROSS C, SCHERLACH K, et al. Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli* [J]. *Chem Biol*, 2012, 19 (9): 1164–1174.
- [2] MATSUMOTO K, SUYAMA M, FUJITA S, et al. Efficient total synthesis of bongkrekic acid and apoptosis inhibitory activity of its analogues [J]. *Chem Eur J*, 2015, 21 (32): 11590–11602.
- [3] 周鹏. 超高效液相色谱串联质谱法测定银耳中米酵菌酸 [J]. *食品研究与开发*, 2015, 36 (22): 123–126.
- [4] FALCONER T M, KERN S E, BRZEZINSKI J L, et al. Identification of the potent toxin bongkrekic acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak [J]. *Forensic Sci Int*, 2017, 270: e5–e11.
- [5] 周帼萍, 梁泉, 黄庭轩, 等. 云南省文山州广南县吊浆粳食物中毒事件的病原学分析 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29 (1): 71–75.
- [6] 郭铃. 椰毒假单胞菌食物中毒实验室检测 [J]. *现代预防医学*, 2007, 34 (6): 1145–1147.
- [7] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器测定食品中米酵菌酸残留 [J]. *食品科学*, 2016, 37 (24): 247–251.
- [8] 申慧慧, 陈军辉, 徐秀丽, 等. 海产贝类脂溶性贝毒素的高效液相色谱-串联质谱分析方法及其食用安全性评价 [J]. *分析化学*, 2018, 46 (6): 985–992.
- [9] 高何刚, 杜赛, 王瑞, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中氯霉素和甲硝唑残留 [J]. *预防医学*, 2017, 29 (9): 969–972.
- [10] 张晓艺, 张秀尧, 蔡欣欣, 等. 超高效液相色谱联用三重四极杆质谱法同时测定蜂蜜中氯霉素、甲硝唑和林可霉素 [J]. *预防医学*, 2019, 31 (2): 212–216.
- [11] 许娇娇, 黄百芬, 周健, 等. 直接稀释-超高效液相色谱-串联质谱法快速测定谷物及其制品中16种真菌毒素 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2017, 29 (6): 708–715.
- [12] 王宗义, 杨定忠, 冀梦瑶, 等. 高效液相色谱-串联质谱检测牛奶中的甲状腺素 [J]. *色谱*, 2013, 31 (3): 270–274.
- [13] XU X M, CAI Z X, ZHANG J S, et al. Analysis of monofluoroacetic acid in urine by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry and preparation of the positive sample by the bio-conversion from monofluoroacetamide to monofluoroacetic acid in vitro [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1027: 131–138.
- [14] 沈斐, 许燕娟, 姜晟, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水华样品中微囊藻毒素及其基质效应的消除 [J]. *色谱*, 2017, 35 (7): 772–777.
- [15] 刘晓云, 陈笑艳, 钟大放. 液相色谱-串联质谱生物分析方法的基质效应和对策 [J]. *质谱学报*, 2017, 38 (4): 388–399.
- [16] DESFONTAINE V, CAPETTI F, NICOLI R, et al. Systematic evaluation of matrix effects in supercritical fluid chromatography versus liquid chromatography coupled to mass spectrometry for biological samples [J]. *J Chromatogr B*, 2018, 1079: 51–61.
- [17] XU X M, YU X W, LU M, et al. Study of the matrix effects of tetrodotoxin and its content in cooked seafood by liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38 (19): 3374–3382.
- [18] 张程, 严天旸, 陈川, 等. 氟固相萃取辅助的生物分子质谱分析新方法 [J]. *分析化学*, 2017, 45 (12): 1857–1864.
- [19] 黄原飞, 娄晓祎, 周哲, 等. 分子印迹聚合物固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中11种氨基糖苷类药物残留 [J]. *分析化学*, 2018, 46 (3): 454–461.
- [20] 栾玉静, 王瑞花, 董颖, 等. 固相萃取-液相色谱-质谱法检验人全血中的地塞米松 [J]. *中国法医学杂志*, 2017, 32 (3): 297–299.

收稿日期: 2019-07-24 修回日期: 2019-08-16 本文编辑: 徐文璐

欢迎广大卫生健康科技工作者向《预防医学》投稿

www.zjfyxzz.com