· 卫生理化检验新技术新方法专题 实验技术 ·

液相色谱-串联质谱法鉴定米酵菌酸中毒生物标志物

徐小民[1,2,3]，安雨馨[1,2,3]，徐美佳[3]，许娇娇[1,2,3]，蔡增轩[1,2,3]，韩见龙[1,2,3]

1.浙江省疾病预防控制中心国家卫生健康委员会食品安全风险评估与标准研制特色实验室，浙江 杭州 310051；
2.浙江省疾病预防控制中心全省公共卫生检测与病原学研究重点实验室，浙江 杭州 310051；
3.浙江省疾病预防控制中心，浙江 杭州 310051

摘要：目的 探究米酵菌酸在血浆、血清和尿液中的分布与代谢特征，明确米酵菌酸中毒生物标志物，为开展病因鉴定和治疗效果评价提供依据。**方法** 血液样本离心分离血浆或血清后冷冻保存，尿液直接冷冻保存；样品复融后加内标使用液和0.5%甲酸乙腈溶液处理，离心过滤后待测。采用C_{18}色谱柱梯度洗脱，电喷雾离子源负离子多反应监测模式，设置离子对参数检测米酵菌酸。计算基质效应、线性范围、相关系数（R^2）、检出限、定量限、平均加标回收率和相对标准偏差（RSD）评价该方法。采用液相色谱-串联质谱法测定3种样本中米酵菌酸分布及质量浓度，分析其代谢特征。**结果** 米酵菌酸在血浆、血清和尿液中的基质效应分别为86.8%、88.1%和93.3%。方法学验证结果显示，米酵菌酸在0.2~100 ng/mL范围内线性关系良好，R^2为0.999，检出限和定量限分别为1.0和2.0 ng/mL，无杂峰干扰，平均加标回收率介于92.1%~104.0%之间，RSD介于2.9%~6.8%之间。12例米酵菌酸中毒患者中，8例患者中毒1~14 d内的血浆和血清中米酵菌酸质量浓度分别为168.0~967.0 ng/mL和163.0~1 017.0 ng/mL，平均质量浓度占比分别为50.3%和49.7%；其中2例患者经血浆置换后米酵菌酸质量浓度整体下降。**结论** 血浆或血清中的米酵菌酸可以作为其中毒和治疗效果评估的有效生物标志物。

关键词：米酵菌酸；食源性疾病；生物标志物；液相色谱-串联质谱法
中图分类号：R155.3 **文献标识码：**A **文章编号：**2096-5087（2026）08-0840-04

Identification of biomarkers for bongkrekic acid poisoning by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XU Xiaomin[1,2,3], AN Yuxin[1,2,3], XU Meijia[3], XU Jiaojiao[1,2,3], CAI Zengxuan[1,2,3], HAN Jianlong[1,2,3]

1.NHC Specialty Laboratory of Food Safety Risk Assessment and Standard Development, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China; 2.Zhejiang Key Laboratory of Public Health Detection and Pathogenesis Research, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China; 3.Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To explore the distribution and metabolic characteristics of bongkrekic acid in plasma, serum and urine, and to identify potential biomarkers for bongkrekic acid poisoning, so as to provide evidence for etiological identification and therapeutic effect evaluation. **Methods** Blood samples were centrifuged to separate plasma or serum and then stored frozen, while urine samples were directly frozen for preservation. After thawing, the samples were treated with internal standard working solution and 0.5% formic acid acetonitrile solution, and detected after centrifugation and filtration. A C_{18} chromatographic column with gradient elution was adopted, and electrospray ionization in negative multiple reaction monitoring mode was used with optimized ion pair parameters for the determination of bongkrekic acid. The method was evaluated in terms of matrix effect, linear range, coefficient of determination (R^2), limit of detection, limit of quantification, average spiked recovery rate, and relative standard deviation (RSD). Determination of the distribution and mass concentration of bongkrekic acid in three types of samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,

DOI：10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2026.08.019
作者简介：徐小民，博士，主任技师，主要从事食品安全理化检验和中毒病因鉴定工作
通信作者：韩见龙，E-mail：jlhan@cdc.zj.cn

and analysis of its metabolic characteristics. **Results** The matrix effects of bongkrekic acid in plasma, serum and urine were 86.8%, 88.1% and 93.3%, respectively. The results of methodological validation demonstrated that bongkrekic acid exhibited good linearity within the concentration range of 0.2-100 ng/mL, with R^2 of 0.999. The limit of detection and limit of quantification were determined to be 1.0 ng/mL and 2.0 ng/mL, respectively. No interfering peaks were observed in the chromatograms. The average spiked recovery rates ranged from 92.1% to 104.0%, with RSD ranging from 2.9% to 6.8%. Among the 12 patients with bongkrekic acid poisoning, the mass concentrations of bongkrekic acid in plasma and serum from 8 patients within 1-14 days of poisoning ranged from 168.0 to 967.0 ng/mL and from 163.0 to 1 017.0 ng/mL, respectively, with average mass concentration proportions of 50.3% and 49.7%, respectively. Among them, bongkrekic acid mass concentration decreased overall in 2 patients after plasma exchange treatment. **Conclusion** Bongkrekic acid in plasma or serum can serve as an effective biomarker for poisoning diagnosis and therapeutic effect evaluation of bongkrekic acid poisoning.

Keywords: bongkrekic acid; foodborne diseases; biomarker; liquid chromatography-tandem mass spectrometry

米酵菌酸是唐菖蒲伯克霍尔德氏菌产生的有毒代谢副产物[1-2]，成人最小中毒剂量约为0.1 mg，最小致死剂量为1~1.5 mg[3]。米酵菌酸中毒潜伏期为0.3~24 h，早期症状主要以恶心、呕吐、腹痛、腹泻等胃肠炎和乏力等神经中毒症状为主[4]。随着病情加重可发展为肾、肝和脑等实质性脏器损害[4]，死亡率为18.2%~100%[5]。米酵菌酸中毒无特效解毒剂，尽快开展血浆置换等干预措施可降低死亡率。目前，主要采用液相色谱-串联质谱法（liquid chromatography-tandem mass spectrometry，LC-MS/MS）检测血液和尿液中米酵菌酸的质量浓度[6]，但未明确其中毒病因鉴定的有效生物标志物。本文采用LC-MS/MS法检测血浆、血清和尿液3种生物基质中米酵菌酸的质量浓度，分析各生物基质中米酵菌酸的分布、质量浓度和代谢特征，明确米酵菌酸中毒的生物标志物，为开展病因鉴定和治疗效果评价提供依据。

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）；高速离心机（德国Sartorius公司）。米酵菌酸储备液（100 μg/mL，青岛普瑞邦公司）和$^{13}C_{28}$-米酵菌酸内标储备液（10 μg/mL，青岛普瑞邦公司）；甲醇和乙腈（HPLC级，美国J.T.Baker公司）；甲酸（HPLC级，美国ROE Scientific公司）。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液配制

用甲醇逐级稀释米酵菌酸储备液，配制质量浓度为0.1和1 μg/mL的标准使用溶液。用甲醇逐级稀释$^{13}C_{28}$-米酵菌酸内标储备液，配制质量浓度为0.5 μg/mL的内标使用液。移取适量标准使用溶液，用90%乙腈水溶液配制质量浓度为0.2~100 ng/mL的系列标准溶液（相当于样品含量为2~1 000 ng/mL），每毫升标准溶液中加入内标使用液20 μL。

1.2.2 样品前处理

血液样品于3 500 r/min离心5 min，离心半径为10 cm，分离血浆或血清，-18 ℃及以下温度冷冻保存；尿液样品直接冷冻保存。样品使用前恢复至室温后涡流混匀10 s。取100 μL样品于1.5 mL离心管中，加入20 μL内标使用液和880 μL 0.5%的甲酸乙腈溶液，涡流混匀30 s，于8 000 r/min离心2 min，离心半径为10 cm，取上清液，过0.22 μm滤膜后待测。

1.2.3 色谱、质谱条件

XBridge™ BEH C_{18}色谱柱（100 mm×2.1 mm，2.5 μm，美国Waters公司）；柱温为30 ℃；进样体积为2.0 μL；流动相A相为0.1%甲酸水溶液，B相为乙腈；流速为0.35 mL/min；梯度洗脱程序：0~3.0 min，30% B~90% B；3.0~5.0 min，90% B；5.0~5.5 min，90% B~30% B；5.5~8.0 min，30% B。

电喷雾离子源负离子模式（ESI⁻）；离子源接口电压为4.5 kV；雾化气为氮气，3.0 L/min；干燥气为氮气，10 L/min；加热气为空气，10 L/min；碰撞气为氩气；脱溶剂管温度为250 ℃；加热块温度为350 ℃；接口温度为250 ℃；多反应监测模式，米酵菌酸的定量离子对为485.2>441.2，碰撞能量为14 eV，定性离子对为485.2>397.2，碰撞能量为18 eV；$^{13}C_{28}$-米酵菌酸内标的定量离子对为513.2>468.2，碰撞能量为14 eV。

1.2.4 基质效应测定

将10 μL标准使用溶液（1 μg/mL）加入490 μL血浆、血清或尿液样品提取液中，混匀后测定3次。

根据纯溶剂和样品基质中米酵菌酸峰面积计算基质效应，计算公式为（样品基质中被测物的峰面积/纯溶剂中被测物的峰面积）×100%。>100% 表示基质增强效应，<100% 分别表示基质抑制效应，100% 为无基质效应。

1.3 方法学验证

以米酵菌酸质量浓度为横坐标，米酵菌酸峰面积与 $^{13}C_{28}$-米酵菌酸内标峰面积的比值为纵坐标，绘制标准曲线，计算米酵菌酸的线性范围、相关系数（R^2）。为保证检出限水平下能观察到明显的定性离子对色谱峰，以基质中响应值较弱的定性离子对 3 倍信噪比对应的样品质量浓度为检出限，以定量离子对 10 倍信噪比对应的样品质量浓度为定量限。在血浆、血清和尿液米酵菌酸阴性基质中，以定量限、线性范围中间点和线性范围高点作为 3 个加标浓度开展准确度和精密度检测，计算平均加标回收率和相对标准偏差（relative standard deviation，RSD）。

1.4 生物标志物鉴定

同一时间点采集 12 例米酵菌酸中毒患者首诊医院生化指标检测剩余的血浆、血清或尿液样品，用于分布和质量浓度分析；采集其中 2 例米酵菌酸中毒患者治疗过程中生化指标检测剩余的血浆样品，分析米酵菌酸的代谢特征，用于评估患者的治疗效果。

2 结　果

2.1 基质效应

米酵菌酸在血浆、血清和尿液中的基质效应平均值分别为 86.8%、88.1% 和 93.3%，均表现为基质抑制效应，采用同位素内标法定量校正。

2.2 方法学验证结果

在 0.2~100 ng/mL 的范围内线性回归方程为 y=0.099 2x+0.009 5，R^2 为 0.999。米酵菌酸的检出限和定量限分别为 1.0 和 2.0 ng/mL。米酵菌酸的检测时间内主峰附近未见干扰峰，方法的特异性良好。血浆、血清和尿液中米酵菌酸的平均加标回收率分别为 92.1%~101.0%、93.8%~95.4% 和 92.1%~104.0%，RSD 分别为 3.3%~5.5%、3.4%~4.8% 和 2.9%~6.8%。见表 1。

表 1　3 种加标浓度下血浆、血清和尿液中米酵菌酸的加标回收率和 RSD

Table 1　Spike recovery rates and RSD of bongkrekic acid in plasma, serum, and urine at three spiking concentrations

基质	加标浓度/（ng/mL）	加标回收率/%						平均加标回收率/%	RSD/%
		第1次	第2次	第3次	第4次	第5次	第6次		
血浆	2	103.0	97.0	98.2	92.3	106.0	107.0	101.0	5.5
	100	93.9	92.8	98.0	100.0	97.4	92.7	95.9	3.3
	1 000	88.9	92.9	90.5	91.2	98.1	91.2	92.1	3.5
血清	2	103.0	90.9	93.9	99.0	92.9	92.8	95.4	4.8
	100	91.2	90.7	92.6	98.5	93.4	96.9	93.9	3.4
	1 000	91.1	99.3	92.1	90.1	98.9	91.4	93.8	4.4
尿液	2	106.0	107.0	99.8	115.0	96.3	97.9	104.0	6.8
	100	96.5	91.8	93.6	99.9	93.3	94.6	95.0	3.0
	1 000	92.7	92.3	93.9	87.2	91.8	94.9	92.1	2.9

2.3 米酵菌酸的分布

12 例米酵菌酸中毒患者中，8 例患者中毒 1~14 d 内的血浆和血清中米酵菌酸质量浓度分别为 168.0~967.0 ng/mL 和 163.0~1 017.0 ng/mL，平均质量浓度占比分别为 50.3% 和 49.7%；4 例患者中毒 1~12 d 内血浆和尿液中米酵菌酸质量浓度分别为 85.3~1 006.0 ng/mL 和 2.1~75.4 ng/mL，平均质量浓度占比分别为 96.0% 和 4.0%。

2.4 米酵菌酸的质量浓度

12 例米酵菌酸中毒患者中，10 例患者中毒 15~120 h 内血浆中米酵菌酸的质量浓度为 183.0~1 376.0 ng/mL，可疑中毒食物为隔夜室温放置的凉皮和凉粉、室温浸泡≥2 d 的黑木耳。2 例少量食用可疑食物但无中毒症状患者血浆中米酵菌酸质量浓度分别为 3.5 和 7.9 ng/mL。

2.5 米酵菌酸的代谢特征

患者 1 中毒第 5~21 d 内进行了 5 次血浆置换，血浆中米酵菌酸质量浓度从 813.0 ng/mL 降至 8.9 ng/mL。患者 2 中毒第 4~9 d 内进行了 2 次血浆置换，血浆中米酵菌酸质量浓度从 440.0 ng/mL 降至

87.9 ng/mL，随后采用常规支持性对症治疗，中毒第17 d血浆中米酵菌酸质量浓度为79.0 ng/mL。

3 讨 论

既往研究报道，血液或尿液中米酵菌酸的检测主要采用乙腈或氨水甲醇直接提取[7-8]，提取后氮吹浓缩[9]或阴离子交换固相萃取净化[10]，最后进行LC-MS/MS检测。氮吹浓缩或固相萃取等前处理操作会增加检测时间和结果的不确定性，本文采用酸性乙腈提取和沉淀蛋白的样品前处理方法，操作简单，可在10 min内完成。血浆、血清和尿液中米酵菌酸的基质效应较低，质谱响应信号良好。采用同位素内标法定量校正，3个加标浓度下的平均加标回收率高，RSD小，说明该方法具有可重复性。

在毒理学和临床实践中，用于中毒鉴定的生物标志物主要包括接触生物标志物、效应生物标志物和易感生物标志物3大类[11]，本文主要针对接触生物标志物开展研究。研究发现，血浆和血清中米酵菌酸的质量浓度分布相近（50.3%和49.7%），说明血浆或血清中的米酵菌酸均可作为其中毒病因鉴定的有效生物标志物。按成人4 L的血液容量估算，最小中毒剂量时质量浓度约为25.0 ng/mL，最小致死剂量时质量浓度约为250.0~375.0 ng/mL。10例中毒患者15~120 h内血浆中米酵菌酸的质量浓度为183.0~1 376.0 ng/mL，接近或大于致死剂量。2例无中毒症状患者血浆中米酵菌酸质量浓度分别为3.5和7.9 ng/mL，低于最小中毒剂量，说明血浆中米酵菌酸质量浓度越高，中毒症状越明显。

作为长链脂肪酸，米酵菌酸本身化学性质稳定，且具有很强的脂溶性，中毒后容易通过血液循环储存在内脏中[12-13]，即使通过血浆置换的方法降低患者血浆中米酵菌酸的质量浓度，但储存在内脏中的米酵菌酸会逐渐释放到血液中，一段时间后血浆中米醇菌酸质量浓度又会升高。本研究发现，即使通过血浆置换治疗，患者1中毒21 d后血浆中仍能检出米酵菌酸（8.9 ng/mL）；患者2中毒17 d后，血浆中米酵菌酸质量浓度（79.0 ng/mL）仍然高于最小中毒剂量，说明中毒后血浆中米酵菌酸能在较长时间内稳定存在。

本方法样品取样量仅为0.1 mL，不需要单独采样，患者常规生化检测剩余样品就能满足LC-MS/MS检测需求；检出限为1 ng/mL，能特异性检出无中毒症状者血浆中米酵菌酸的质量浓度，灵敏度满足病因鉴定的需求；线性范围覆盖无症状、中毒和致死剂量的浓度范围，前处理只需约10 min，可实现快速、准确的定量测定。综上所述，血浆和血清中米酵菌酸质量浓度分布一致，血浆或血清中的米酵菌酸可以作为其中毒和治疗效果评估的有效生物标志物。

参考文献

[1] Li M M, Xiong K, Jin W, et al.Prediction of the ecological behavior of Burkholderia gladiolus in fresh wet rice noodles at different temperatures and its correlation with quality changes［J/OL］. Foods, 2025, 14（8）［2026-07-24］. http://doi.org/10.3390/foods14081291.

[2] Yuan M D, Han R W, Bai L, et al.Recent advances in the characterization of *Bburkholderia gladioli* pv. *cocovenenans* and its toxin production［J］.Food Rev Int, 2024, 40（3）: 867-882.

[3] Deshpande S S. Bacterial toxins, Handbook of food toxicology［M］.Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2002.

[4] Zhang H X, Guo Y C, Chen L L, et al.Epidemiology of foodborne bongkrekic acid poisoning outbreaks in China, 2010 to 2020［J/OL］.PLoS One, 2023, 18（1）［2026-07-24］.http://doi.org/10.1371/journal.pone.0279957.

[5] 韩海红，寇柏洋，马洁，等.2018年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析［J］.中国食品卫生杂志，2022，34（4）：822-829.

[6] Sun X F, Yang H Y, Zhang Y Z, et al.Study on the modification and minding mechanism of bongkrekic acid aptamers for food safety［J/OL］.Foods, 2026, 15（10）［2026-07-24］.http://doi.org/10.3390/foods15101663.

[7] Shieh Y T, Weng T I, Chen J Y, et al.Development and validation of an analytical method for determination of bongkrekic acid in biofluids for toxin monitoring［J］.J Food Drug Anal, 2025, 33（3）: 339-347.

[8] 方力，邱凤梅.稳定同位素稀释-液相色谱-串联质谱法快速检测血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸［J］.分析化学，2022，50（4）：634-642.

[9] 张秀尧，蔡欣欣，张晓艺，等.超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法测定血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸［J］.质谱学报，2020，41（3）：268-277.

[10] 徐小民，陈茼，黄百芬，等.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［J］.预防医学，2019，31（12）：1905-1909.

[11] 孙承业.中毒事件处置［M］.北京：人民卫生出版社，2013.

[12] Yang H, Zhao L J, Duan M J, et al.Bongkrekic acid poisoning associated with *Burkholderia gladioli*: a systematic review［J/OL］.Foodborne Pathog Dis, 2026［2026-07-24］.http://doi.org/10.1177/15353141251413448.

[13] Gao B, Deng H T, Wang Y H, et al.Detection methods and control measures of *Burkholderia gladioli* and its toxins: a review［J/OL］.J Food Sci, 2025, 90（2）［2026-07-24］.http://doi.org/10.1111/1750-3841.17668.

收稿日期：2026-04-27 **修回日期**：2026-07-24 **本文编辑**：刘颖颖