

超高效液相色谱-串联质谱法测定米粉和河粉中的米酵菌酸

曾雪芳, 刘嘉飞, 王立亚, 齐春艳, 叶靖怡, 梁旭霞, 雷毅*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS)测定河粉和米粉中米酵菌酸(bongkrekic acid, BA)的含量。**方法** 试样经提取、净化、浓缩及过滤后,以0.1%甲酸水和乙腈作为流动相进行梯度洗脱,采用电喷雾离子源负模式检测,外标法定量。基于米酵菌酸色谱和质谱行为的研究,对其仪器测定条件进行优化,并对优化后的方法进行方法学验证。**结果** 米酵菌酸在1~100 µg/L浓度范围内线性良好,相关系数大于0.999。在2种基质不同加标浓度下,回收率80.6%~104.8%,相对标准偏差小于5%。米酵菌酸在2种基质中的检出限为0.1 µg/kg,定量限为0.2 µg/kg。**结论** 方法灵敏度高、专属性好、准确可靠,适用于米粉和河粉基质中米酵菌酸的测定。
关键词: 米酵菌酸;液相色谱-串联质谱法;米粉;河粉

Determination of bongkrekic acid in rice noodles and fried rice noodles by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZENG Xue-Fang, LIU Jiang-Fei, WANG Li-Ya, QI Chun-Yan, YE Jing-Yi,
LIANG Xu-Xia, LEI Yi*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of bongkrekic acid (BA) in rice noodles and fried rice noodles by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** After the samples were extracted, purified, concentrated and filtered, 0.1% formic acid water and acetonitrile were used as mobile phase for gradient elution. The samples were detected by electrospray ion source negative mode (ESI) and quantified by external standard method. Based on the study of the chromatographic and mass spectrometric behaviors of BA, the conditions of its instrumental determination were optimized, and the optimized method was validated. **Results** BA had a good linearity in the concentration range of 1–100 µg/L, and the correlation coefficient was greater than 0.999. Under the different spiked concentrations of two substrates, the recoveries were 80.6%–104.8%, with the relative standard deviations were less than 5%. The limits of detection of 2 matrices were 0.1 µg/kg, and the limits of quantification were 0.2 µg/kg. **Conclusion** This method has high sensitivity, good specificity, accuracy and reliability, which is suitable for the determination of BA in rice noodles and fried rice noodles.

基金项目: 广东省科技计划项目(2019B020208008)

Fund: Supported by Provincial Science and Technology Project of Guangdong (2019B020208008)

*通讯作者: 雷毅, 博士, 主任药师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。E-mail: LeiY04@qq.com

*Corresponding author: LEI Yi, Ph.D, Chief Pharmacist, Guangdong Institute of Food Inspection, No. 1103, Zengcha Road, Baiyun District, Guangzhou 510435, China. E-mail: LeiY04@qq.com

KEY WORDS: bongkreikic acid; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; rice noodles; fried rice noodles

1 引 言

米酵菌酸是由椰毒假单胞菌酵米面亚种产生的一种可引起食物中毒的毒素^[1], 食入后经消化道吸收、经血液散布全后可损伤人的肝脏、脑、肾及心脏等器官^[2], 严重者可致死亡。美国《食品毒理学》报道, 米酵菌酸的人体致死剂量为 1~1.5 mg^[3], 即一个体重 60 kg 的成年人(血液总量约为 4200~4800 mL), 血液中米酵菌酸的含量达到 200~300 μg/L 即可达到致死剂量。据报道, 米酵菌酸的食物中毒事件主要发生在印尼^[4,5]、中国^[6-8]和非洲的莫桑比克^[9], 食用发酵的椰浆制品(印尼)以及发酵玉米面制品、变质鲜银耳及其他变质淀粉类制品是引起中毒的主要原因^[10]。1953 年至今, 米酵菌酸导致的食物中毒在我国影响人数 2370 人, 死亡人数达到 911 人, 其中, 2018 年在广东的河源和东莞发生的米粉/河粉中毒事件致 10 人中毒, 5 人死亡。

目前, 针对米酵菌酸的检测, 常用的方法包括液相色谱法和液相色谱-串联质谱法。现行的食品安全国家标准 GB 5009.189-2016^[11]采用高效液相色谱法测定银耳及其制品、发酵米面及其制品等食品中的米酵菌酸, 方法灵敏度不足且前处理试剂消耗量大、过程繁琐耗时, 周霞等^[12,13]针对现有的标准对前处理方法进行优化以提高检测效率, 此外, 周鹏等^[14-16]采用液相色谱-串联质谱法测定银耳和婴幼儿配方米粉中的米酵菌酸以提高检测的灵敏度和特异性, 缩短分析时间。目前, 尚未有相关的研究文献涉及米粉和河粉类别的基质, 且现有的文献对米酵菌酸的质谱行为研究涉及较少。

本研究针对现行标准和研究存在的不足, 基于超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术, 建立了米粉和河粉中米酵菌酸残留量的检测方法, 探索性地开展米酵菌酸色谱和质谱行为的研究, 以期为米酵菌酸检测标准的修订提供参考。

2 材料与amp;方法

2.1 仪器与试剂

UPLC H-CLASS/XEVO TQ-SMICRO 超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); KQ-500DE 数控超声波清洗器(东莞科桥超声波设备有限公司); MULTIFUGE X3R 离心机(美国 Thermo 公司); SUPELCO VISIPREP 24™ DL 固相萃取装置(德国 Merk 公司); AUTO EVA-60 自动氮吹仪(美国 Reeko 公司)。

米酵菌酸标准品(纯度 97.2%, 美国 Sigma-Alorich 公

司); 甲醇(HPLC 级, 德国 Merk 公司); 甲酸(HPLC 级, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙酸铵(HPLC 级, 美国 Thermo 公司); 甲酸铵(HPLC 级, 上海麦克林生化科技有限公司); 甲酸(LC/MS 级, 美国 Thermo 公司); 乙腈(LC/MS 级, 德国 Merk 公司); 氨水(分析纯, 上海试剂有限公司); 实验用水为一级水。

混合型阴离子交换柱: 60 mg, 3 mL 或相当者, 使用前分别用 5 mL 甲醇和 5 mL 水淋洗, 并保持柱体湿润。

2.2 使用方法

2.2.1 色谱条件

色谱柱: ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 柱温: 40 °C; 进样量: 1 μL; 流速: 0.3 μL/min; 流动相: 0.1%甲酸水溶液(A)和乙腈(B), 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 米酵菌酸的测定梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program of bongkreikic acid

时间/min	A/%	B/%
0.00	70	30
1.00	70	30
4.00	5	95
5.00	5	95
5.10	70	30
7.00	70	30

2.2.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI); 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 扫描方式: 负离子模式; 毛细管电压: 3.0 kV; 干燥气温度: 550 °C; 干燥气流量: 1000 L/h; 锥孔气流量: 50 L/h; 其他质谱参数见表 2。

表 2 米酵菌酸质谱参数
Table 2 Chromatogram parameters of bongkreikic acid

化合物	母离子(m/z)	子离子(m/z)	锥孔电压/V	碰撞能量/V
米酵菌酸	485.3	397.2*	30	18
		441.3	30	10

注: *为定量离子。

2.2.3 标准工作曲线配制

1.0 mg/mL 米酵菌酸标准溶液: 准确移取 0.1 mL 标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 配制成 1 mg/L 的标准溶液中间液, 分别移取适量的标准溶液中间液用 50%乙腈

水稀释定容,配制成浓度为1、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的标准工作溶液。

2.2.4 样品前处理方法

(1) 样品提取

样品经粉碎后,准确称取5.00 g于50 mL离心管中,加入15 mL甲醇-氨水溶液(80 mL甲醇,加入1.0 mL氨水,加水定容到100 mL)室温下置于暗处浸泡1 h后,超声提取30 min,8500 r/min离心5 min,取上清液,待净化。

(2) 样品净化

混合型阴离子交换柱经活化后,将上清液全部转移到已活化的固相萃取柱中,依次用5 mL水和5 mL甲醇淋洗,真空抽干后,用6 mL 2%甲酸-甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,于40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮吹至近干,加入1 mL初始流动相定容,涡旋溶解,0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的优化

3.1.1 扫描方式的选择

米酵菌酸的分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7$,是含有3分子游离羧基的长链不饱和脂肪酸(图1),容易丢失质子而带上负电荷,因此选用负离子模式进行检测。

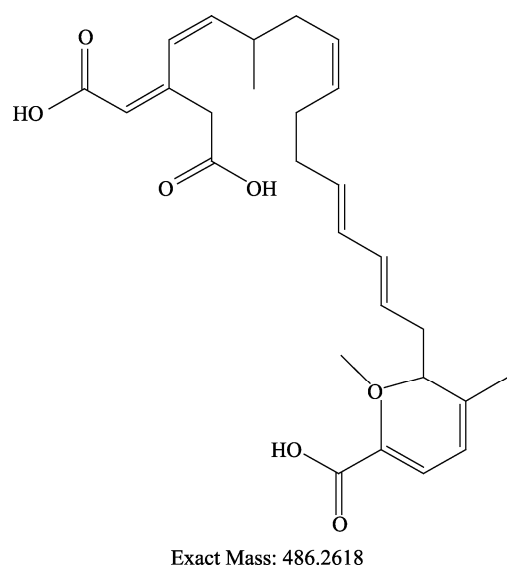


图1 米酵菌酸的化学结构

Fig.1 Chemical structure of bongkrekic acid

3.1.2 定性、定量离子对的选择

米酵菌酸通过“MS Scan”模式扫描得到的一级质谱图见图2a, m/z 485.2为米酵菌酸失去1个质子形成的分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 441.1为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 失去中性小分子 CO_2 形成的碎片离子。米酵菌酸通过“Daughters”模式扫描得到的二级质谱图见图2b,主要的碎片离子为 m/z 441.3和 m/z 397.2,两者的丰度较大且稳定性较好,分别为 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 失去一分子

CO_2 和两分子 CO_2 而形成,米酵菌酸含有3个游离羧基,仅依靠质谱手段难以确证2个碎片离子的准确结构。

采用“MRM”模式在 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 441.3和 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 397.2下对多份米粉和河粉样品进行监测,相同条件下,离子对 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 441.3更易受基质的干扰,且碎片离子 m/z 441.3在未施加碰撞电压时(“MS Scan”模式)即存在,表明其可能是米酵菌酸在离子化过程中由于受热等外界条件的影响形成的降解产物,将其选为定量离子可能影响定量的准确度。离子对 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 397.2的响应虽然较 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 441.3稍差,但灵敏度可以满足检验要求,且其受基质干扰程度较小,因此将 m/z 397.2定为定量离子, m/z 441.3定为定性离子。

3.1.3 毛细管电压的优化

以定量离子对 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 397.2的响应(峰面积)为指标,对质谱毛细管电压进行优化,结果发现随着毛细管电压的增加,响应增强,最终确定毛细管电压为3.0 kV。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 流动相组成的优化

基于相关的文献报道,在相同的梯度条件下,以乙腈作为有机相,比较了不同组成的水相(0.1%氨水溶液,10 mmol/L乙酸铵溶液,5 mmol/L甲酸铵+0.1%甲酸溶液,0.1%甲酸溶液)对米酵菌酸色谱行为和质谱行为的影响。

从色谱行为分析(图3),在碱性流动相中(图3a-b),米酵菌酸保留减弱,出峰时间早,峰形轻微拖尾。流动相中添加甲酸(图3c-d),即在酸性流动相中,米酵菌酸保留增强,出峰时间推迟,峰形对称性更好。由于米酵菌酸的分子结构中含有3个游离羧基,酸性流动相抑制了米酵菌酸的电离,使其以分子形式存在,在反相固定相中的保留增强,且减少了与固定相中残存硅醇基的结合,有助于改善峰形。

从质谱行为分析,文献报道中均提出“碱性流动相促进米酵菌酸电离,增强米酵菌酸响应”^[16]、“甲酸抑制米酵菌酸的电离,灵敏度较低”^[14],但实验结果表明,流动相中添加甲酸,米酵菌酸的质谱响应增强(峰面积增大)。通过比较酸性流动相(0.1%甲酸)和碱性流动相(0.1%氨水)下米酵菌酸的一级全扫描质谱图可以发现,负离子模式下,米酵菌酸在酸性流动相(图4)中主要以 m/z 485.2548 $[\text{M}-\text{H}]^-$,理论值485.2539和 m/z 441.2649 $[\text{M}-\text{COO}-\text{H}]^-$,理论值441.2641)存在,在碱性流动相(图5)中则主要以 m/z 220.1278、 m/z 441.2647和 m/z 485.2543存在,其中 m/z 220.1278为双电荷离子,且其与 m/z 441和 m/z 485的主要二级碎片离子基本相同,推测 m/z 220.1278为米酵菌酸失去2个质子和一分子 CO_2 形成的双电荷离子 $[\text{M}-\text{COO}-2\text{H}]^{2-}$ (理论值220.1281)。 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 的响应较 $[\text{M}-\text{COO}-2\text{H}]^{2-}$ 和 $[\text{M}-\text{COO}-\text{H}]^-$ 更低,提示在碱性流动相中,米酵菌酸更易以电离状态存在,导致其更易受高温等外界

条件(离子源中)的影响而脱去 CO_2 形成 $[\text{M}-\text{COO}-\text{H}]^-$, 甚至形成双电荷的 $[\text{M}-\text{COO}-2\text{H}]^{2-}$, 即碱性条件下 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 并非最合适的母离子。基于上述实验事实, 当监测离子对为 m/z 485.3 $\rightarrow m/z$ 397.2、 m/z 441.3 时, 酸性流动相比碱性流动相质谱响应更高, 综合洗脱和峰形等色谱行为, 选择 0.1% 甲酸作为水相。

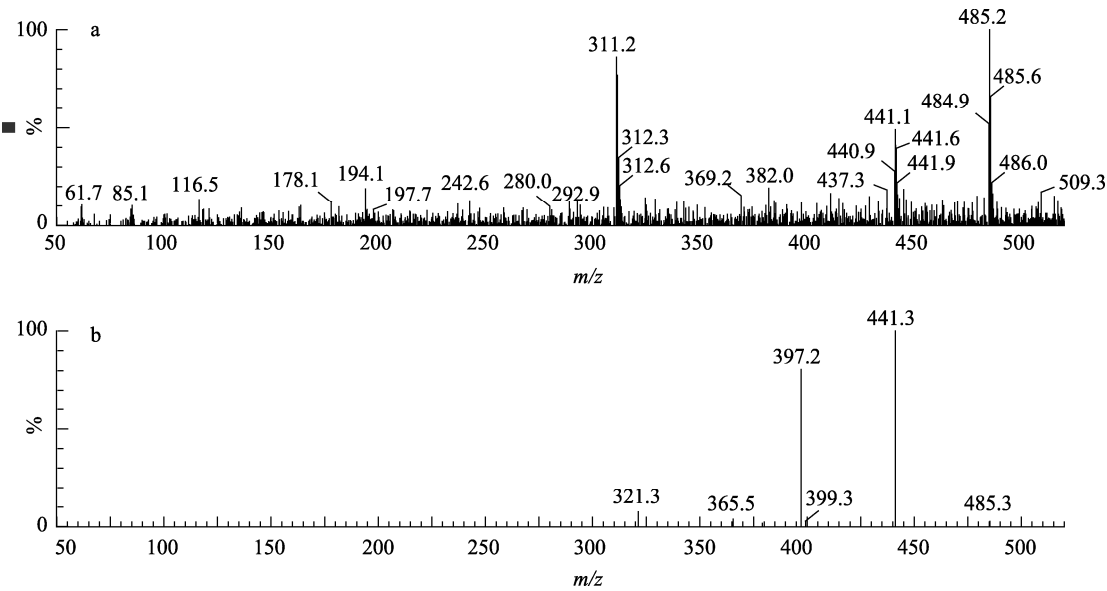
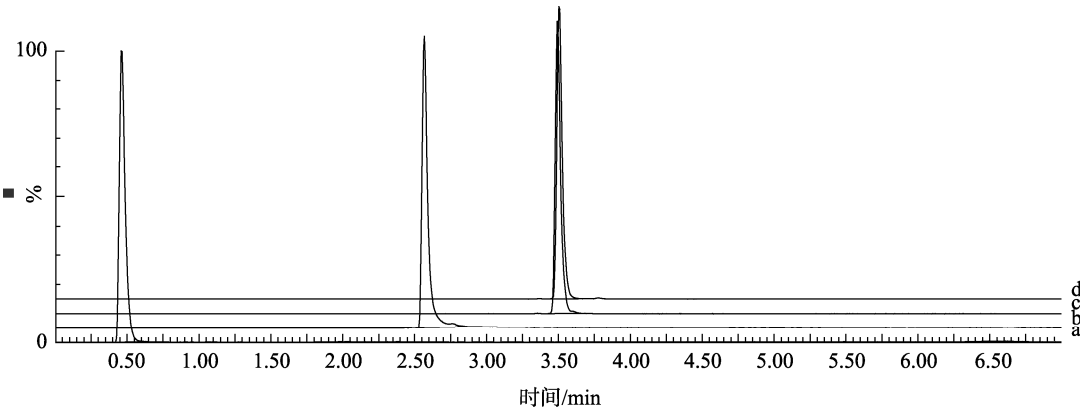


图 2 a: 米酵菌酸一级全扫描质谱图(扫描范围 50~650 m/z); b: 米酵菌酸二级质谱图(碰撞能 15 V)
Fig.2 a: Fullscan mass spectrum of bongkreikic acid (scanning range was 50~650 m/z); b: Daughters scan mass spectrum of bongkreikic acid (collision energy was 15 V)



注: a: 0.1%氨水; b: 10 mmol/L 乙酸铵; c: 5 mmol/L 甲酸铵+0.1%甲酸; d: 0.1%甲酸。
图 3 不同组成的水相对米酵菌酸色谱行为的影响

Fig.3 Effect of different compositions of mobile phase on the chromatographic behavior of bongkreikic acid

STD50ppb-NH3H2O-3#241 RT: 0.50 AV: 1 SB: 360.09-0.39 , 0.77-1.24 NL: 2.42E7
T: FTMS-p ESI Full ms [100.0000-600.0000]

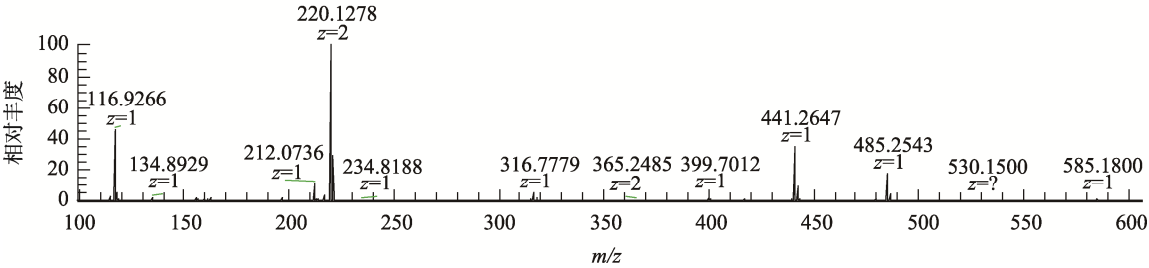


图 4 米酵菌酸一级全扫描高分辨质谱图(0.1%甲酸)
Fig. 4 Fullscan high resolution mass spectrum of bongkreikic acid in 0.1% formic acid

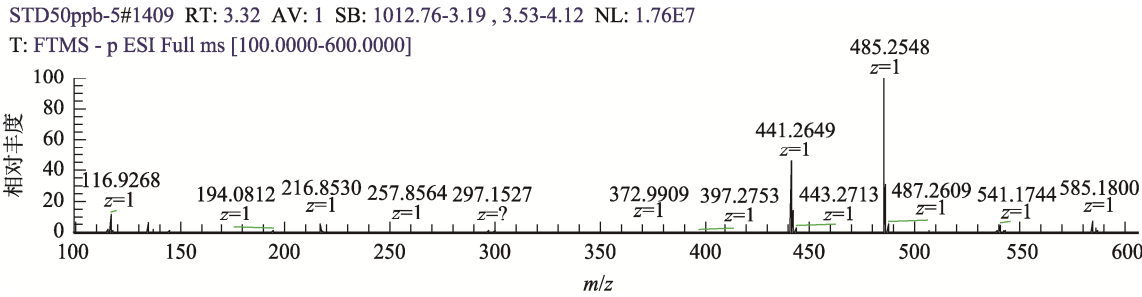


图 5 米酵菌酸一级全扫描高分辨质谱图(0.1%氨水)
Fig. 5 Fullscan high resolution mass spectrum of bongkreic acid in 0.1% ammonia

3.2.2 流动相梯度的优化

实验考察了不同梯度洗脱程序对米酵菌酸色谱和质谱行为的影响,结果表明,不同的梯度洗脱程序对米酵菌酸的质谱响应影响差异不大,但会显著影响米酵菌酸的保留,结合实际样品的进样分析,优化梯度洗脱程序(表 1),使得基质中的干扰对米酵菌酸的影响降至最低,且尽可能缩短分析时间,提高效率。

3.3 前处理方法优化

实验比较了上清液(“2.2.4(1)样品提取”)是否经过旋蒸对米酵菌酸回收率的影响,结果发现,上清液直接净化以及上清液于 60 °C 水浴旋至约 3 mL 后再净化(依据 GB 5009.189-2016)2 种方式下米酵菌酸的回收率无明显差异(前者平均回收率 87.3%, 后者平均回收率 86.6%),因此在实际工作中,可以根据提取溶剂的体积决定是否需要旋蒸以减少净化步骤的耗时。

3.4 基质效应考察

分别以初始比例流动相和米粉、河粉空白样品溶液(空白样品按照 2.2.4 处理所得)作为溶剂配制米酵菌酸的标准溶液和基质溶液,比较两者的平均响应值(基质效应=标准溶液响应值/基质溶液响应值×100%),结果表明米粉和河粉基质对米酵菌酸的测定几乎不存在基质效应(表 3)。

表 3 米酵菌酸的基质效应(米粉、河粉)结果
Table 3 Results of Matrix effect

基质	米酵菌酸响应值(平均峰面积, n=6)		基质效应/%
	标准溶液	基质溶液	
米粉	1196	1231	102.9
河粉	1034	959	92.7

3.5 方法学验证

3.5.1 检出限、定量限与线性范围

米酵菌酸在 1~100 µg/L 浓度范围内线性良好,相关系数大于 0.999。

本方法米粉和河粉中米酵菌酸的检出限为 0.1 µg/kg,

定量限为 0.2 µg/kg, 定量限浓度水平 6 次平行测定的平均回收率为 98.0%, RSD% 为 3.7%。

3.5.2 方法回收率与精密度

本研究对米粉和河粉基质进行 3 水平的添加回收率实验和精密度实验,结果(表 4)表明方法的准确度和精密度良好。

表 4 米酵菌酸回收率结果(n=6)
Table 4 Results of recovery (n=6)

基质	添加水平(µg/kg)	回收率范围%	RSD%
米粉	0.2	92.2~104.8	4.9
	1	81.6~91.4	3.9
	2	83.2~91.9	3.3
河粉	0.2	91.5~101.1	3.7
	1	80.6~84.6	2.1
	2	81.9~90.7	3.9

4 结 论

本研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法用于米粉和河粉中米酵菌酸的含量测定。与国标方法相比,采用液质联用法可以提高定性的准确度以及检测的灵敏度,缩短分析时间。基于灵敏度的提高可以调整前处理过程的取样量与提取溶剂用量,大大减少了试剂消耗量,提高了检测效率。本研究通过对米酵菌酸的色谱和质谱行为的探索性研究,发现与 ESI 负模式检测的一般规律不同,在酸性流动相(0.1%甲酸)中,米酵菌酸的质谱响应更强,与其他采用碱性流动相的同类型文献相比,本研究建立的方法可以进一步提高检测灵敏度。此外,在酸性流动相中米酵菌酸的峰型更佳,且保留较强,更易于通过调整色谱条件使其与基质中的干扰物质有效分离,减少基质效应。本研究建立的方法适用于米粉和河粉基质中米酵菌酸的测定,方法灵敏度、精密度和准确度均较好,为米酵菌酸国家标准方法增加液相色谱-质谱/质谱法提供参考依据。

参考文献

[1] Garcia RA, Hotchkiss JH, Steinkraus KH. The effect of lipids on

- bongkrekeic (bongkrek) acid toxin production by *Burkholderia cocovenenans* in coconut media [J]. Food Addit Contam, 1999, 16(2): 63–69.
- [2] Liu X. Microbiology risk assessment in China: current situation and challenges [EB/OL]. [2002-07-24]. <http://foodrisk.org/default/assets/File/IRAC-event-Liu.pdf>
- [3] Deshpande SS. Bongkrek toxins. In: Handbook of food toxicology [M]. New York: Marcel Decker, 2002.
- [4] *Burkholderia cocovenenans* foodborne illness-Indonesia [EB/OL]. <http://www.promedmail.org>.
- [5] Suspected tempe poisoning, 1 killed and 3 treated [EB/OL]. [2013-02-15]. <http://news.okezone.com/read/2013/02/15/513/762277/diduga-keracunan-tempe-1-orang-tewas-3-dirawat>.
- [6] Meng Z, Li Z, Jin J, et al. Studies on fermented corn flour poisoning in rural areas of China. I. Epidemiology, clinical manifestations, and pathology [J]. Biomed Environ Sci, 1998, 1(1): 101–104.
- [7] Ramzy A. 5 die from food poisoning from southern Chinese snack [EB/OL]. [2017-07-04]. http://sinosphere.blogs.nytimes.com/2014/07/04/5-die-in-food-poisoning-from-southern-chinesesnack/?_r=0.
- [8] Shen Y, Liu J, Huang Z. Epidemiological analysis of food poisoning due to contamination of fermented flour with *Pseudomonas cocovenenans* subsp. farino fermentans in Guangxi [J]. China Trop Med, 2007, 7(5): 814–815.
- [9] Gudo ES, Cook K, Kasper AM, et al. Description of a mass poisoning in a rural district in mozambique: The First documented bongkrekeic acid poisoning in Africa [J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(9): 1400–1406.
- [10] Mehruba A, Amelia K, Alaina R, et al. Bongkrekeic acid—A review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. J Med Toxicol, 2017, (13): 173–179.
- [11] GB 5009.189-2016 食品安全国家标准 食品中米酵菌酸的测定[S]. GB 5009.189-2016 National food safety standard-Determination of yeast acid in food [S].
- [12] 周霞, 陈万勤, 傅红雪, 等. 全自动固相萃取-超高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸含量[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(8): 159–160, 182.
- Zhou X, Chen WQ, Fu HX, et al. Fast determination of bongkrekeic acid in food by auto solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography [J]. J Anhui Agric Sci, 2018, 46(8): 159–160, 182.
- [13] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器结合固相萃取法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. 食品科学, 2016, 24(37): 247–251.
- Li HY, Jin YF, Huang HZ, et al. Fast Determination of bongkrekeic acid in foods using mixed-mode weak anion exchange solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) [J]. Food Sci, 2016, 24(37): 247–251.
- [14] 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): 123–125.
- Zhou P. Determination of bongkrekeic acid in tremella fuciformis berk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2015, 36(22): 123–125.
- [15] 苏肯明, 梁达清. 液相色谱-串联质谱法测定银耳中的米酵菌酸[J]. 广东化工, 2014, 41(282): 168–169.
- Su KM, Liang DQ. Determination of bongkrekeic acid in *Tremella fuciformis* by LC-MS/MS [J]. Guangzhou Chem Ind Technol, 2014, 41(282): 168–169.
- [16] 李红娜, 袁飞, 张辰阳, 等. 液相色谱和飞行时间质谱联用检测米酵菌酸[J]. 食品工业, 2018, 39(7): 319–323
- Li HN, Yuan F, Zhang CY, et al. The research of detection bongkrekeic acid (BA) by LC-ESI-TOF technology [J]. Food Ind, 2018, 39(7): 319–323.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



曾雪芳, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全检测技术。
E-mail: 947919642@qq.com

雷毅, 博士, 主任药师, 主要研究方向为食品安全与质量分析。
E-mail: Leiy04@qq.com