

高效液相色谱-串联质谱法快速检测银耳中的米酵菌酸

曾令浩^{1*}, 李思颖¹, 李文倩¹, 李柏衡², 岑建斌¹, 区硕俊¹

(1. 广州检验检测认证集团有限公司, 国家加工食品质量检验中心(广东), 广州 511447;

2. 广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)快速检测银耳中的米酵菌酸的方法。**方法** 样品以甲醇提取后, 超声振荡, 离心分层, 上清液用甲醇定容。使用空白基质液配置标准曲线对结果进行校正。在优化后的色谱及质谱条件下, 采用(electron spray ionization, ESI)负离子模式进行电离, 并通过多反应监测(multi-selected reaction monitoring, MRM)模式对目标化合物的定量离子和定性离子进行测定。**结果** 米酵菌酸在 0.50~50.00 µg/L 范围内线性良好, 相关系数 r 为 0.9996, 3 个浓度添加水平的平均回收率范围在 80.6%~95.6%之间, 相对标准偏差为 4.98%~7.21%。方法检出限(limit of detection, LOD)为 5.0 µg/kg, 定量限(limit of quantification, LOQ)为 15.0 µg/kg。

结论 该方法操作简便快速, 回收率高、灵敏度高、精密度好, 适合测定银耳基质中的米酵菌酸。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱; 银耳; 米酵菌酸; 外标法

Rapid determination of bongkreikic acid in *Tremella* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZENG Ling-Hao^{1*}, LI Si-Ying¹, LI Wen-Qian¹, LI Bo-Heng², CEN Jian-Bin¹, OU Shuo-Jun¹

(1. Guangzhou Inspection and Testing Certification Group Co., National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), Guangzhou 511447, China; 2. Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method of rapid determination of bongkreikic acid in *Tremella* by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The sample was extracted with methanol, then it was ultrasonically shaken and centrifuged, and the supernatant was adjusted to volume with methanol. The results were calibrated by a blank matrix configuration standard curve. Under optimized chromatographic and mass spectrometric conditions, ionization was performed using an electron spray ionization (ESI) negative ion mode, and quantitative and qualitative ions of the target compound were determined by a multi-selected reaction monitoring (MRM) mode. **Results** The linearity of bongkreikic acid was good in the range of 0.50~50.00 µg/L, and the correlation coefficient r was 0.9996. The average recovery of 3 concentration levels were 80.6%~95.6%, and the relative standard deviation was 4.98%~7.21%. The method of limit of detection (LOD) was 5.0 µg/kg, and the limit of quantification (LOQ) was 15.0 µg/kg. **Conclusion** The method is simple and rapid, it has

*通讯作者: 曾令浩, 工程师, 主要研究方向为食品检测及仪器分析。E-mail: haozishe@126.com

*Corresponding author: ZENG Ling-Hao, Engineer, National Quality Testing Center for Processed Food (Guangdong), No.1-2, Zhujiang Road, Panyu District, Guangzhou 511447, China. E-mail: haozishe@126.com

high recovery rate, high sensitivity and good precision, which is suitable for the determination of bongkreikic acid in the *Tremella*.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; *Tremella*; bongkreikic acid; external standard method

1 引言

米酵菌酸(bongkreikic acid)具有较强的毒性, 其广泛存在于发酵食品、变质银耳等食品中^[1-3]。研究表明, 米酵菌酸是一种脂溶性化合物, 纯净的米酵菌酸易溶于甲醇、乙醚等有机溶剂, 对热稳定, 对酸性条件和氧化剂不稳定。

米酵菌酸是椰毒假单胞菌酵米面亚种代谢物的一种^[4], 会损伤食用者的肝脏、脑神经细胞和肾脏^[5], 甚至损伤线粒体^[6,7]。我国国标中明确规定银耳中米酵菌酸的含量应小于 0.25 mg/kg^[8,9]。由于银耳的消费主要集中在我国东南部沿海地区, 且这些地区的人口密度较大, 因此建立一个快速、稳定的米酵菌酸污染物检测方法对于保证产品安全质量、消费者健康安全以及生产厂商的生产安全监管尤为重要。

目前测定米酵菌酸常用的检测方法有: 固相萃取-高效液相色谱法^[10-12]、固相萃取-超高效液相色谱-质谱/质谱法^[13]、液相色谱-质谱/质谱法^[14]和液相色谱-飞行时间质谱法^[15]。其中液相色谱法较质谱法灵敏度低, 虽然采用了固相萃取净化, 但对分离度要求仍然较高, 对含量较低样品无法有效检验。固相萃取净化作为前处理手段可以应用于不同仪器的检测方法中, 虽然在一定程度上能净化杂质, 但会对目标物造成一定的损失, 且操作繁琐, 检测成本高, 同时基质效应仍然明显^[13]。而液相色谱-飞行时间质谱法能对目标物进行更精确的分析, 但仪器成本较高, 难以在一般实验室应用。本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS), 结合空白基质液对结果进行校正, 且提取过程快速、简便, 无需使用固相萃取柱, 通过优化仪器参数达到较高灵敏度高, 且结合离子色谱柱分析时间短。同时方法学参数表明该方法稳定, 重复性好, 适合银耳中米酵菌素的快速检测, 为后续的相关研究工作提供了参考。

2 材料与方法

2.1 仪器及试剂

安捷伦 LC1200 高效液相色谱(美国安捷伦科技有限公司); AB SCIEX 4000 三重四极杆串联质谱仪(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司); TGL-16MH2050R 高速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); IKA MS3 漩涡混合器(德国 IKA 公司); Biotage TurboVap II 水浴氮吹仪(北京华仪通泰科技有限公司); Milli-Q 去离子水发生器(美国

Millipore 公司)。

米酵菌酸标准品(浓度为 1000 mg/L, 美国 Sigma 公司)、甲醇、乙腈、甲酸(色谱纯, 美国 Fisher 公司); 实验用水为经 Milli-Q 净化系统过滤的超纯水(电阻率为 18.2 MΩ·cm)。

2.2 标准溶液的配制

标准中间液: 分别准确移取 10 μL 1000 mg/L 的标准溶液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 配制成浓度为 1 mg/L 的标准中间液。

标准工作曲线: 分别取上述标准中间液 5、10、50、100、200、500 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用空白基质液稀释至刻度, 所得标准工作曲线浓度分别为 0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50.0 μg/L。

2.3 样品前处理

称取 1.00 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 聚四氟乙烯具塞离心管, 加入 10 mL 甲醇, 超声 20 min, 涡旋振荡 1 min, 以 10000 r/min, 离心 5 min。重复提取 2 次, 合并上清液移至氮吹管中, 在 50 °C 下浓缩至 10 mL 以下, 转移至 10 mL 容量瓶, 用甲醇定容, 过 0.45 μm 有机滤膜, 待测。

空白试验: 不取样品的情况下, 重复上述步骤, 结果作为溶剂空白对比。

2.4 仪器条件

2.4.1 色谱条件

色谱柱: Agilent poroshell EC C₁₈ (150 mm×3.0 mm, 2.7 μm); 流动相 A(含 0.1%甲酸的水溶液)-B(乙腈); 流速: 0.5 mL/min; 进样量: 10 μL; 柱温: 40 °C; 等度洗脱: 0~7.0 min: 30%A。

2.4.2 质谱条件

电离方式: 负模式电喷雾电离源(ESI⁻); 气帘气气压: 25 psi; 雾化气气压: 45 psi; 加热辅助气气压: 45 psi; 毛细管电压: -4500 V; 离子源温度: 450 °C; 扫描模式: 选择反应监测模式(multi-selected reaction monitoring, MRM)。

3 结果与分析

3.1 质谱条件的确定

米酵菌酸为长链脂肪三元羧酸, 活性基团为羧基, 元素组成只有 C、H 和 O, 在电喷雾正离子模式下没有响应, 故在电喷雾负离子模式下进行质谱条件优化。Q1 扫描时出

现 $[M-H]^-$ 峰, 以 $[M-H]^-$ 作为母离子进行诱导碰撞解离, 通过子离子扫描得到目标化合物碎片离子信息, 组成 MRM 离子对。米酵菌酸的特征碎片离子为 m/z 321.3 和 m/z 397.4, 分别为双键重排后的碎片 $[M-H-C_9H_8O_3]^-$ 和丢失 2 个羧基的碎片 $[M-H-2CO_2]^-$ 。然后对 2 组 MRM 离子对的去簇电压、碰撞能量等参数进行优化, 使分子离子对的信号达到最强, 选择待测物响应最高的两对分子离子对, 以响应较强的子离子 m/z 397.4 作为定量离子, m/z 321.3 作为定性离子。具体的离子采集参数见表 1。

表 1 米酵菌酸目标化合物的质谱采集参数
Table 1 MS/MS parameters of bongkrekic acid

母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压(DP)/V	碰撞电压(CE)/V
485.2	397.4*	-45	-26.0
485.2	321.3	-45	-27.0

注: “*”为定量离子。

3.2 色谱柱和流动相的优化

本实验研究了甲醇-水、乙腈-水和乙腈-0.1%甲酸水溶液作为流动性的峰型和响应强度。理论上流动相中加入甲酸对负模式的响应会造成一定的影响, 但结果发现, 米酵菌酸乙腈-水体系和甲醇-水体系下的色谱行为较差, 峰形不好导致响应较低, 而采用乙腈-0.1%甲酸水溶液可以获得较好色谱峰峰型, 且峰形改善后的响应并没有受到甲酸的明显抑制。因此, 本研究最终选取乙腈-0.1%甲酸水溶液为流动相。目标化合物 397.4 质量数的提取离子流图见图 1。

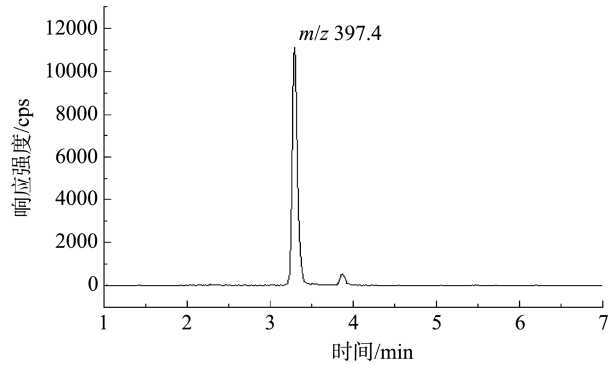


图 1 目标化合物 397.4 m/z 的色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of bongkrekic acid at 397.4 m/z

3.3 基质效应

由于银耳基质比较复杂, 同时考虑到米酵菌酸在质谱中响应较差, 因此本方法对基质效应进行了考察。用 2.3 的前处理方法对样品进行处理。得到基质溶液, 以此基质溶液按照 2.2 的方法配制标准工作曲线, 同时用甲醇配制

溶剂曲线。以米酵菌酸的基质曲线的斜率与溶剂曲线的斜率比值 K 为考察依据, 所得 K 值为 0.26, 低于 0.9, 说明基质效应明显, 采用空白基质液稀释的外标曲线进行校正后, 米酵菌酸的回收率均达到分析测定要求。

3.4 超声时间对回收率的影响

实验前期探究了提取次数对回收率的影响, 结果发现, 在一次提取 20 min 时, 回收率达到 80% 以上, 而在重复提取 2 次后, 米酵菌酸的回收率不再呈现明显变化。在此基础上探究了 1、5、10、15、20、25、30 min 不同超声时间对银耳中米酵菌素回收率的影响, 实验中往空白的银耳样品中添加 20 $\mu\text{g/kg}$ 的标准溶液。超声时间与回收率的关系, 如图 2 所示。可知 20 min 的超声时间能获得较高的回收率, 延长超声时间对增加回收率不明显。因此本实验选用 20 min 的超声时间。

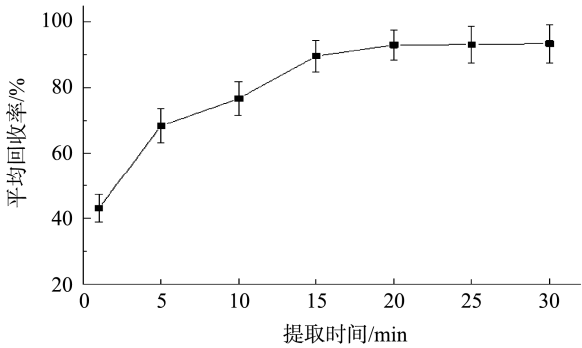


图 2 超声时间与回收率的关系图($n=3$)

Fig.2 Diagram of the relationship between ultrasonic time and recovery ($n=3$)

3.5 线性范围、检出限和定量限

按照 2.2 的标准溶液配制方法配制系列标准工作曲线于 HPLC-MS/MS 进行测定。以浓度比(目标物浓度/内标物浓度)为横坐标(X)和定量离子对峰面积比(目标物定量离子峰面积/内标物定量离子峰面积)为纵坐标(Y)进行线性回归, 米酵菌酸的拟合所得线性方程分别为 $Y=5740X+2010$, 相关系数 r 为 0.9996。结果表明米酵菌酸标准曲线在 0.50~50.00 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围内呈良好线性。分别以仪器的信噪比 3 倍测得米酵菌酸的方法的检出限为 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 和定量限为 15.0 $\mu\text{g/kg}$, 表明方法灵敏度高, 能满足日常分析测定的要求。

3.6 精密度、回收率及重复性

由于目标分析物容易受到污染和样品基质的干扰, 因此在对样品进行加标回收实验的同时, 进行空白试验, 对空白试验平行测定 6 次, 结果均没有检出, 因此对目标物先进行平行测定 6 次, 分别以 10、20、50 $\mu\text{g/kg}$ 等 3 个水平的进行加标, 每个水平分别于日内平行测定 6 次。米

酵菌酸的 3 个添加水平的平均回收率范围在 80.6%~95.6% 之间, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)在 4.98%~7.21%之间。方法学结果表明, 该方法回收率及精密度能达到分析测定的要求。具体结果见表 2。

表 2 米酵菌酸的回收率和精密度(n=6)				
Table 2 Recoveries and RSDs of bongkreki acid (n=6)				
目标物	添加水平 (μg/kg)	测得值 (μg/kg)	回收率 /%	相对标准偏差 /%
米酵菌酸	10	8.06~8.58	80.6~85.8	7.21
	20	17.1~18.3	85.5~91.5	4.98
	50	44.8~47.8	89.6~95.6	5.52

4 结 论

本研究建立了快速测定银耳中的米酵菌酸的 HPLC-MS/MS 法。以甲醇为提取溶液, 提取过程高效快速, 避免了固相萃取净化的繁琐操作。同时, 使用空白基质液稀释的标准曲线法, 对回收率和基质效应进行校正, 回收率达到日常分析测定的要求同时优化了色谱柱类型和流动相, 进一步降低了基质效应。目标化合物在 3.5 min 内出峰, 且峰形良好。方法学结果表明, 本方法操作快速高效、回收率高、精密度好, 适用于银耳基质中米酵菌酸的日常测定。

参考文献

[1] 王岗, 郭云昌, 裴晓燕. 米酵菌酸的生物合成及其机制研究进展[J]. 卫生研究, 2012, 41(2): 341-344.
Wang G, Guo YC, Pei XY. Advances in biosynthesis and mechanisms of rice fermentation bacterial acid. [J] J Hyg Res, 2012, 41(2): 341-344.

[2] 刘坤, 孟玲芝, 王圣博, 等. 米酵菌酸在食品检测中的研究新进展[J]. 吉林农业, 2018, (17): 81.
Liu K, Meng LZ, Wang SB, et al. New progress of rice fermentation bacterial acid in food detection [J]. Jinlin Agric, 2018, (17): 81.

[3] Rohm B, Scherlach K, Hertweck C. Biosynthesis of the mitochondrial adenine nucleotide translocase (atpase) inhibitor bongkreki acid in burkholderia gladioli [J]. Organ Biomol Chem, 2010, 8(7): 1520-1522.

[4] Henderson PJF, Lardy HA. Bongkreki acid-An inhibitor of the adenine nucleotide translocase of mitochondria [J]. J Biol Chem, 1970, 245(6): 1319-1326.

[5] 宋兴田, 吴洪娟, 庄宝祥. 米酵菌酸中毒小鼠肝和脑组织的形态学改变[J]. 中国医药导报, 2010, 7(26): 36-38.
Song XT, Wu HJ, Zhuang BX. Morphologic changes of intoxicated mice hepatocyte and brain tissues of bongkreki acid [J]. Chin Med Herald, 2010, 7(26): 36-38.

[6] Passam HC, Coleman JOD. The effects of atractyloside and bongkreki acid on jerusalem artichoke mitochondria in relation to adenine nucleotide translocation [J]. J Exper Botan, 1975, 26(93): 536-543.

[7] Ruprecht A, Jonathan J, King MS, et al. The molecular mechanism of transport by the mitochondrial ADP/ATP carrier [J]. Cell, 2019, 176(3): 435-447.

[8] NY/T 749-2018 绿色食品 食用菌[S].
NY/T 749-2018 Green food-Edible mushroom[S].

[9] GB 7096-2014 食品安全国家标准 食用菌及其制品[S].
GB 7096-2014 National Food Safety Standard-Edible fungi and their products [S].

[10] 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, 37(24): 247-251.
Li HY, Jin YF, Huang HZ, et al. Fast determination of bongkreki 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, 37(24): 247-251.

[11] 侯佰立. 固相萃取-高效液相色谱法快速测定食品中米酵菌酸残留[J]. 现代食品, 2019, (9): 169-172.
Hou BL. fast determination of bongkreki acid in foods using solid phase extraction-high performance liquid chromatography [J]. Mod Food, 2019, (9): 169-172.

[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 bongkreki 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] 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.
Zhou P. Determination of bongkreki acid in *Tremella fuciformis* berk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Res Dev, 2015, 36(22): 123-126.

[14] 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(16): 168-169.
Su KM, Liang DQ. Determination of bongkreki acid in *Tremella fuciformis* by LC-MS/MS [J]. Guangdong Chem Ind, 2014, 41(16): 168-169.

[15] 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 bongkreki acid (BA) by LC-ESI-TOF technology [J]. Food Ind, 2018, 39(7): 319-323.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



曾令浩, 工程师, 主要研究方向为食品检测及仪器分析。
E-mail: haozishe@126.com