

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

张秀尧, 蔡欣欣, 张晓艺, 李瑞芬

(温州市疾病预防控制中心, 浙江 温州 325001)

摘要:建立了超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定生物样品中米酵菌酸和异米酵菌酸的方法。将米酵菌酸在 2 mol/L KOH 溶液中 100 °C 加热反应 2 h 制备异米酵菌酸标准品, 并通过与对照品的质谱、色谱、紫外光谱比较而确认。血浆样品用含 0.5% 氨水的乙腈溶液-甲醇(9:1, V/V)沉淀除去血浆蛋白, 在酸性条件下用正己烷萃取净化; 尿液样品使用正己烷在酸性条件下萃取净化。选择Acquity BEH C18 色谱柱, 以 0.05% 甲酸-乙腈溶液(V/V)-0.05% 甲酸水溶液(V/V)为流动相进行洗脱, 电喷雾负离子多离子监测模式(MRM)检测, 基质加标标准曲线外标法定量。结果表明: 血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸的线性范围均为 0.05~10.0 $\mu\text{g/L}$, 相关系数大于 0.998, 平均加标回收率在 92%~106% 之间, 相对标准偏差均为 2.4%~13% ($n=6$), 方法的检出限($S/N=3$)均为 0.02 $\mu\text{g/L}$ 。该方法简单、灵敏、准确, 可用于鉴定椰毒假单胞菌引起的中毒。

关键词:米酵菌酸; 异米酵菌酸; 椰毒假单胞菌; 血浆; 尿液; 生物样品; 超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱(UPLC-MS/MS)

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2020)03-0268-10

doi: 10.7538/zpxb.2019.0006

Determination of Bongkrekic Acid and Isobongkrekic Acid in Plasma and Urine by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Mass Spectrometry

ZHANG Xiu-yao, CAI Xin-xin, ZHANG Xiao-yi, LI Rui-fen

(Wenzhou Municipal Center for Disease Control and Prevention, Wenzhou 325001, China)

Abstract: Bongkrekic acid (BA) and isobongkrekic acid (IBA) are produced by the bacterium *Burkholderia gladioli* pv. *Cocovenenans* (*B. cocovenenans*) associated with outbreaks of foodborne diseases involving coconut- and corn-based products in Indonesia, China and Mozambique. Bongkrekic acid and isobongkrekic acid are little-known mitochondrial toxins that inhibit adenine nucleotide translocase (ANT). The latency period after exposure to BA- and IBA-contaminated foods is reported to be 2-24 hours. The

收稿日期: 2019-01-03; 修回日期: 2019-03-19

作者简介: 张秀尧(1962—), 男(汉族), 浙江平阳人, 主任技师, 从事液相色谱-质谱联用技术在食品安全检测中的应用研究。

E-mail: xyzwz123@126.com

网络出版时间: 2019-07-13; 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2979.TH.20190711.1016.004.html>

symptoms of poisoning include discomfort of digestive system and nervous system. Serious patients will die from multiple organ failure, such as liver, brain and kidney. The mortality rate from past outbreaks in China was about 40%, and that in Indonesia was about 60%. The method of ultra-performance liquid chromatographic method coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) was established for determination of bongkreikic acid and isobongkreikic acid in plasma and urine. Isobongkreikic acid was prepared by treating of bongkreikic acid with 2 mol/L KOH for 2 h at 100 °C, and confirmed with the reference substance by mass spectrometry, chromatography and ultraviolet spectroscopy. The main factors including methods of sample pretreatment, separation column types, compositions of mobile phases, and instrumental conditions of mass spectrometry were optimized. The bongkreikic acid and isobongkreikic acid in plasma were ultrasonically extracted with acetonitrile-methanol (9 : 1, V/V) solution containing 0.5% (V/V) ammonia solution, and then the extract was centrifuged to remove the impurities, such as proteins. After acetonitrile and methanol in extract were removed, the analytes in the residues were extracted by hexane under pH 1.5-2.0. The bongkreikic acid and isobongkreikic acid in urine were directly extracted by hexane under pH 1.5-2.0. The chromatographic analysis was separated on an Acquity BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm × 1.7 μm) with gradient elution of using mobile phases of acetonitrile and water both containing 0.05% (V/V) formic acid. A triple quadrupole mass spectrometer, equipped with electrospray ionization (ESI) in the negative ion mode, was used to detect bongkreikic acid and isobongkreikic acid in multiple reaction monitoring (MRM) mode. Bongkreikic acid and isobongkreikic acid were quantitated by external standard of matrix working curve. The linear ranges of the analytes were from 0.05 μg/L to 10 μg/L with the correlation coefficients greater than 0.998. The limits of detection (LODs) of bongkreikic acid and isobongkreikic acid in plasma and urine were 0.02 μg/L, and the limits of quantification (LOQs) of them were 0.05 μg/L. The average recoveries were 92%-106% with the relative standard deviations of 2.4%-13%. The method is simple, sensitive and accurate, and can be used for the detection of bongkreikic acid and isobongkreikic acid in plasma and urine poisoned by *Burkholderia gladioli* pv. *Cocovenenans*.

Key words: bongkreikic acid; isobongkreikic acid; *Burkholderia gladioli* pv. *Cocovenenans*; plasma; urine; biological samples; ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry(UPLC-MS/MS)

米酵菌酸(bongkreikic acid, BA)和异米酵菌酸(isobongkreikic acid, IBA)是由椰毒假单胞菌(*Burkholderia gladioli* pv. *Cocovenenans*)产生的细菌毒素,是20位双键顺反异构体,易溶于石油醚、正己烷、乙醚、氯仿、甲醇等有机溶剂和碱性水溶液,对热、碱性条件稳定,对酸性条件、氧化剂和日光不稳定,其化学结构示于图1。米酵菌酸能抑制细胞内线粒体上腺嘌呤核苷酸移位酶(ANT)的活性,小鼠口服半数致

死量(LD₅₀)为3.16 mg/(kg · dw),人摄入1~1.5 mg就会引起死亡^[1]。椰毒假单胞菌产生米酵菌酸的同时还会产生约5%有类似毒性的异米酵菌酸^[2],其毒性约为米酵菌酸毒性的1/2~1/4^[2]。米酵菌酸在日光照射下会降解,初始阶段生成异米酵菌酸^[3]。椰毒假单胞菌中毒最早发现于印尼爪哇中部地区,是食用了椰子发酵食品发生的中毒^[4]。我国也在16个省市陆续发现了由椰毒假单胞菌引起的中毒,平均病死

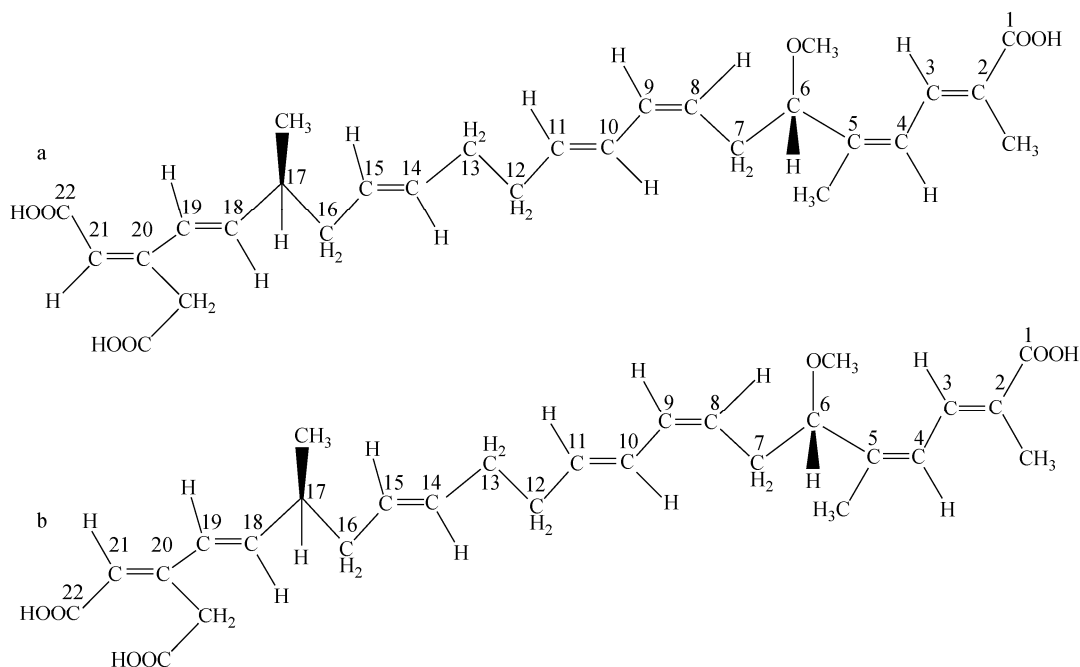


图1 米酵菌酸(a)和异米酵菌酸(b)的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of bongkreic acid (a) and isobongkreic acid (b)

率高达40%^[5]。最近,莫桑比克发生了非洲首例因饮用由玉米粉发酵制得的传统非洲饮料引起的中毒,导致200多人发病,其中75人死亡^[6-7]。引起椰毒假单胞菌中毒的食品大致有4类:椰子发酵制品、玉米等谷类发酵制品、变质银耳及薯类制品等^[1,8-9]。中毒的潜伏期多为2~24 h,首先出现消化道、神经系统等症状,严重者会因肝、脑、肾等多器官衰竭而死亡^[8-11]。因此,建立一种快速、准确测定血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸的检测方法,对鉴定由椰毒假单胞菌引起的中毒具有重要意义。

米酵菌酸的检测方法主要有高效液相色谱法、高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法。高效液相色谱法主要用于测定食品(银耳)中米酵菌酸^[3,12-15],与高效液相色谱-三重四极杆质谱联用法相比,该法选择性较弱、灵敏度较低、样品取样量较大、样品前处理较复杂,尤其对低浓度样品定性能力不够。液相色谱-质谱联用法可用于银耳、饮料样品中米酵菌酸的测定,灵敏度高、特异性强,样品经甲醇或50%乙腈溶液提取,提取液可直接进样^[6,16],也可将提取液用反相和强阴离子交换混合模式固相萃取柱净化后再进样分析^[17]。由于中毒食物中

米酵菌酸和异米酵菌酸共存,若能同时检测米酵菌酸和异米酵菌酸,将有利于判断病人中毒程度、病程的进展以及预后情况,且同时检出中毒样品中米酵菌酸和异米酵菌酸,二者间相互佐证可避免假阳性。目前,尚未见关于血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸检测的报道。

本研究拟建立超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸。尿液样品在酸性条件下经正己烷萃取净化,血浆样品先经碱性乙腈-甲醇溶液(9:1,V/V)提取,然后在酸性条件下经正己烷萃取净化,最后进行超高效液相反相色谱-三重四极杆质谱法检测,希望为鉴定椰毒假单胞菌引起的中毒提供方法参考。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

超高效液相色谱仪:美国 Waters 公司产品,由 Acquity UPLC BSM 二元溶剂管理系统、Acquity UPLC FTN 样品管理系统、Acquity UPLC PDA 检测系统和 Acquity UPLC CM-A

色谱柱管理系统组成,由 Empower 3 工作站控制;QTRAP 6500 三重四极杆/复合线性离子阱串联质谱仪:美国 AB Sciex 公司产品,由 Analyst 1.6.2 软件控制;Multi Reax 数显型多管旋涡混合器:德国 Heidolph 公司产品;3-30K 高速冷冻离心机:德国 Sigma 公司产品;24 孔 N-EVAP 氮吹仪:美国 Organomation 公司产品;Gradient A10 Mill-Q 超纯水器:法国 Millipore 公司产品。

1.2 材料与试剂

甲醇、乙腈、甲酸、正己烷和叔丁基甲醚:HPLC 溶剂级,德国 Merck 公司产品;乙酸乙酯、乙酸铵:HPLC 溶剂级,美国 Tedia 公司产品;高氯酸:上海桃浦化工厂产品;米酵菌酸标准物质:纯度 92.7%,美国 Enzo Life Sciences 公司产品,使用前用 50% 乙腈水溶液溶解,配制成米酵菌酸标准溶液(9.0 mg/L)。健康人血浆:购自温州市中心血站;尿液:由健康人提供。

1.3 实验条件

1.3.1 色谱条件 Acquity BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μ m),保护柱(2.1 mm×5 mm×1.7 μ m);流动相:A 为 0.05% 甲酸-乙腈溶液(V/V),B 为 0.05% 甲酸水溶液(V/V);梯度洗脱程序:0~3.50 min(50%~75% A),3.50~3.60 min(75%~98% A),3.60~5.50 min(98% A),5.50~5.60 min(98%~50% A),5.60~7.50 min(50% A);流速 0.300 mL/min;柱温 45 $^{\circ}$ C;进样体积 10 μ L;清洗溶剂为 0.2% 氨水-乙腈溶液(V/V),消除溶剂为 50% 乙腈溶液。

1.3.2 质谱条件 电喷雾离子源,负离子多反应监测(MRM)模式;离子化电压(IS)-4 500 V;离子源温度 300 $^{\circ}$ C;气帘气(CUR)压强 277 kPa;喷雾气(GS1)压强 345 kPa;辅助加热气压强(GS2)414 kPa;碰撞气为 Medium。米酵菌酸和异米酵菌酸的定量离子对为 m/z 485.3>441.3,去簇电压(DP)为-50 V,碰撞能量(CE)为-16 eV;定性离子对为 m/z 485.3>397.5,去簇电压为-50 V,碰撞能量为-23 eV。

运行开始时,色谱柱流出液经六通切换阀流至废液桶,2.40 min 时切换至质谱离子源,

直至 3.40 min,切换至废液。

1.4 样品前处理

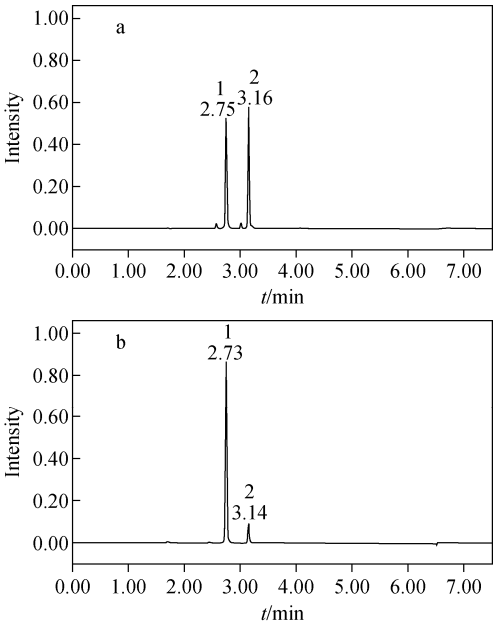
吸取 1.00 mL 尿液于 15 mL 具塞塑料离心管中,加入 0.4 mL 3% 高氯酸溶液和 4.0 mL 正己烷,置于多管旋涡混合器上以 speed 10 涡旋 8 min,以 12 000 r/min 离心 2 min,取上层清液,50 $^{\circ}$ C 氮气吹干,溶于 1.00 mL 初始流动相,涡旋 10 s,过 0.2 μ m 滤膜,待测。

吸取 1.00 mL 血浆于 5 mL Eppendroff 管中,加入 2.0 mL 含 0.5% 氨水的乙腈-甲醇溶液(9:1,V/V),涡旋 10 s,超声提取 5 min,6 $^{\circ}$ C 下以 10 000 r/min 离心 5 min,移取上清液至 15 mL 具塞塑料离心管中,50 $^{\circ}$ C 氮气吹至约 0.5 mL。分别加入 0.5 mL 水、0.4 mL 3% 高氯酸溶液和 4.0 mL 正己烷,置于多管旋涡混合器上以 speed 10 涡旋 8 min,以 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液于 10 mL 离心管,50 $^{\circ}$ C 氮气吹干,溶于 1.00 mL 初始流动相,涡旋 10 s,过 0.2 μ m 滤膜,待测。

2 结果与讨论

2.1 异米酵菌酸标准物质的制备

目前,异米酵菌酸尚无商品化的标准物质,但米酵菌酸商品化的标准物质中都含有少量异米酵菌酸。有文献报道^[2],在一定条件下,米酵菌酸可转化为异米酵菌酸,取 10 μ g 米酵菌酸标准溶液于 2 mL Eppendrof 管中,50 $^{\circ}$ C 氮气吹干,加入 100 μ L 2 mol/L KOH 水溶液,涡旋溶解,于 100 $^{\circ}$ C 加热反应 2 h 后,冷却至室温,用 1 mol/L HCl 酸化至 pH 1~2,加入 1.0 mL 正己烷涡旋萃取 3 min,离心分层,吸取上层正己烷萃取液,将下层溶液用正己烷重复萃取 2 次,合并正己烷萃取液,50 $^{\circ}$ C 氮气吹干,将残渣溶于 0.50 mL 50% 乙腈水溶液。用超高效液相色谱-二极管阵列检测器进行分离和检测,设置二极管阵列检测器(PDA)的检测波长为 200~400 nm,米酵菌酸标准溶液和转化液的色谱图示于图 2。米酵菌酸标准物质的保留时间为 2.73 min,杂质异米酵菌酸的保留时间为 3.14 min,而转化液中保留时间 2.75 min 的色谱峰为米酵菌酸,保留时间 3.16 min 的色谱峰可能为异米酵菌酸。米酵菌酸标准物质中异米酵菌酸和转化液中异米酵菌酸的紫外吸



注：1. 米酵菌酸；2. 异米酵菌酸

图 2 转化液(a)和米酵菌酸标准溶液(b)的色谱图
Fig. 2 Chromatograms of bongkreikic acid (a) and isobongkreikic acid (b)

收谱图示于图 3，二者一致，紫外光谱吸收峰均在 269.6 nm 和 237 nm 左右^[2]。用超高效液相色谱-电喷雾质谱负离子模式多离子监测触发的增强子离子扫描方式(MRM-IDA-EPI)检测,得到米酵菌酸标准物质中保留时间为 3.14 min 色谱峰(异米酵菌酸)和转化液中保留时间为 3.16 min 色谱峰(异米酵菌酸)的子离子扫描图,示于图 4,二者一致,由此可以确定转化液中保留时间为 3.16 min 的色谱峰为异米酵菌酸。再将转化液色谱图中米酵菌酸和

异米酵菌酸与米酵菌酸标准溶液色谱图中米酵菌酸比较定量(267 nm),计算得到转化液中含有 2.25 μg 米酵菌酸和 2.50 μg 异米酵菌酸,异米酵菌酸的转化率为 25%。通过向转化液中加入适量米酵菌酸标准溶液,用 50%乙腈水溶液配制成浓度为 1.0 mg/L 的米酵菌酸和异米酵菌酸混合标准溶液。

2.2 样品前处理优化

2.2.1 血浆提取剂的选择 由于血浆样品含有蛋白等杂质,实验分别考察了 3%高氯酸、甲醇、乙腈和 0.1%氨水-乙腈溶液作为提取剂和蛋白沉淀剂的效果。结果表明,仅 0.1%氨水-乙腈溶液具有较高的回收率。由于乙腈作为蛋白沉淀剂时,可使蛋白沉淀成团状,导致待测物被包裹,在乙腈中加入少量甲醇,蛋白沉淀成疏松的颗粒状,有利于提取待测物,故选择乙腈-甲醇溶液(9 : 1,V/V)进行实验,并加入浓度分别为 0.1%、0.3%、0.5%、0.7%、1.0%的氨水。结果表明,含 0.5%氨水的乙腈-甲醇溶液(9 : 1,V/V)的信号响应值最高,米酵菌酸和异米酵菌酸的提取回收率约为 75%。因此,选择含 0.5%氨水的乙腈-甲醇溶液作为血浆样品提取剂。

2.2.2 萃取剂的选择 米酵菌酸和异米酵菌酸均为脂溶性酸性化合物,可在酸性条件下被三氯甲烷萃取^[12],但由于三氯甲烷毒性大、对环境不友好,本研究不予采用。在 pH 1.5~2.0 的条件下,分别用正己烷、乙酸乙酯和叔丁基甲醚萃取尿液和血浆的加标样品(米酵菌酸和异米酵菌酸加标浓度均为 5 μg/L)。结果表

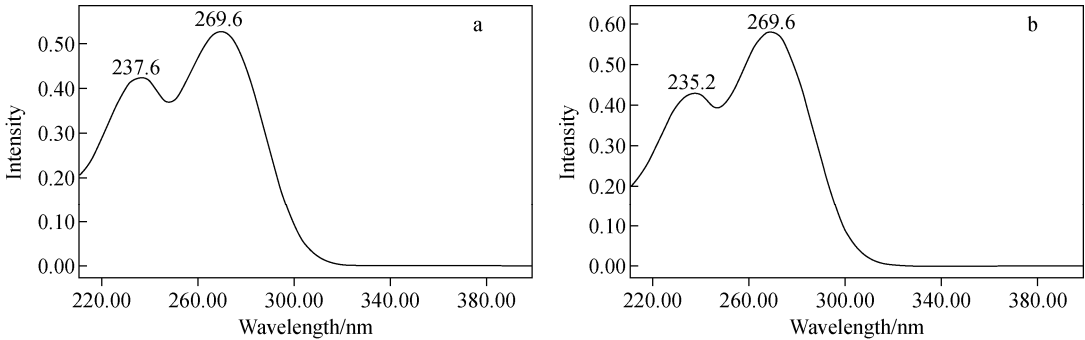


图 3 米酵菌酸标准物质(a)和转化液(b)中异米酵菌酸的紫外吸收光谱图
Fig. 3 Ultraviolet absorption spectra of isobongkreikic acid in bongkreikic acid standard solution (a) and reaction solution (b)

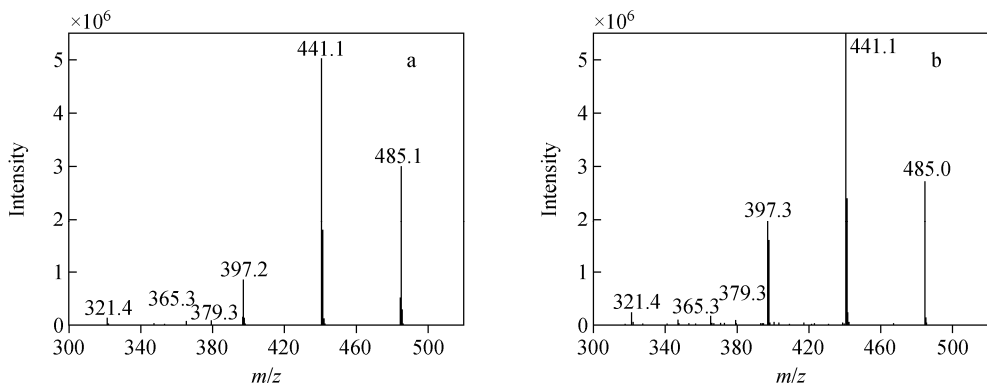


图 4 米醇菌酸标准物质(a)和转化液(b)中异米醇菌酸的子离子扫描谱图

Fig. 4 Product ion scan spectra of isobongkreic acid in bongkreic acid standard solution (a) and reaction solution (b)

明,乙酸乙酯的萃取率为 0;叔丁基甲醚的萃取率约为 20%;正己烷的萃取率最高,尿液中米醇菌酸和异米醇菌酸的萃取率约为 80%,血浆中米醇菌酸和异米醇菌酸的萃取率分别为 80%和 73%。故本研究采用正己烷作为萃取剂。

2.2.3 提取液 pH 的影响 分别用高氯酸或氨水将 7 份尿液样品调至 pH 1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、4.0 和 5.0,再加入米醇菌酸和异米醇菌酸标准溶液(均为 5 $\mu\text{g/L}$),用 4.0 mL 正己烷进行萃取和测定。结果表明,在 pH 1.5~2.0 范围内,质谱响应值达到平台且最高,示于图 5。因此,将 pH 1.5~2.0 作为正己烷的萃取条件。

2.2.4 萃取次数 在 pH 1.5~2.0 条件下,用 4.0 mL 正己烷将 1.0 mL 尿液和血浆加标

样品(加标浓度均为 5 $\mu\text{g/L}$)萃取 3 次,计算每次萃取率。结果表明,1 次正己烷萃取米醇菌酸和异米醇菌酸的萃取率约为 98%,实验最终采用 4.0 mL 正己烷萃取 1 次。

2.2.5 萃取时间 在 pH 1.5~2.0 条件下,用正己烷萃取尿液和血浆加标样品(加标浓度均为 5.0 $\mu\text{g/L}$),萃取时间为 2、4、6、8、10 min,然后进行测定。结果表明,萃取 8~10 min 时,米醇菌酸和异米醇菌酸的质谱响应值达到平台且最高,因此选择萃取时间 8 min。

2.3 超高效液相色谱条件优化

使用质谱负离子电喷雾电离源检测时,常用的流动相有乙腈-水、甲醇-水体系。实验结果表明,使用这两种流动相,米醇菌酸和异米醇菌酸的色谱峰严重变形、峰形展宽。有文献报道,液相色谱法分离米醇菌酸多采用酸性流动相^[3,12-15],液相色谱-质谱联用法分离米醇菌酸多采用酸性流动相^[6]和中性流动相^[16-17]。本实验采用 Acquity BEH C18 色谱柱(2.1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 1.7 μm),分别比较了酸性(乙腈-0.1%甲酸水溶液)、中性(乙腈-10 mmol/L 乙酸铵水溶液)和碱性(乙腈-0.05%氨水)流动相。结果表明,采用酸性流动相时,质谱响应值最高,故选择酸性流动相进行后续优化。

实验还比较了 BEH C18(2.1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 1.7 μm)、BEH Phenyl(2.1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 1.7 μm)和 Cortecs C18⁺(2.1 mm $\times$ 50 mm $\times$ 1.6 μm)色谱柱的分离效果,结果表明,BEH C18 色谱柱对米醇菌酸和异米醇菌酸的色谱峰形和分

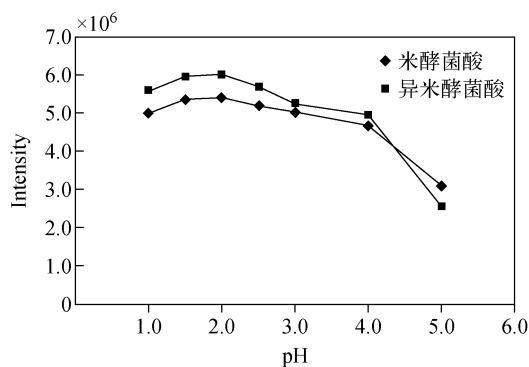


图 5 pH 值对正己烷萃取米醇菌酸和异米醇菌酸的影响

Fig. 5 Effect of pH on bongkreic acid and isobongkreic acid extracted by hexane

离度、质谱响应值最优,故初步选定 BEH C18 (2.1 mm×50 mm×1.7 μm)色谱柱作为分离柱。测定血浆样品时,发现米醇菌酸附近有基质干扰峰,会影响低浓度米醇菌酸的准确定量,通过增加色谱柱的长度,使用 BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm)能将血浆基质干扰成分分离,故最终选用 BEH C18 色谱柱(2.1 mm×100 mm×1.7 μm)作为分离柱。

通过比较乙腈和甲醇两种流动相发现,无论是色谱峰形还是质谱响应值,乙腈作为流动相均优于甲醇,因此选用乙腈作为流动相。流动相中甲酸浓度对米醇菌酸和异米醇菌酸的质谱响应影响很大,实验比较了 0.025%、0.05% 和 0.1% 的甲酸浓度对测定的影响。结果表明,随着甲酸浓度的降低,米醇菌酸和异米醇菌酸的响应值升高,由于实际样品测定时需要流动相具有一定的缓冲容量以保持色谱峰保留时间和质谱响应的稳定,因此,最终选择 0.05% 甲酸-乙腈溶液-0.05% 甲酸水溶液作为流动相。最后,对梯度洗脱程序、柱温等分离条件进行优化,优化后的色谱条件见 1.3.1 节。

2.4 质谱条件优化

米醇菌酸和异米醇菌酸为长链脂肪三元羧酸,故在电喷雾负离子检测方式下进行质谱条件优化。Q1 扫描时出现 $[M-H]^-$ 峰,以 $[M-H]^-$ 作为母离子进行碰撞解离,通过子离子扫描得到目标化合物碎片离子信息,特征碎片离子为 m/z 441.3 和 m/z 397.5,分别为 $[M-H-CO_2]^-$ 和 $[M-H-2CO_2]^-$ 。然后对去簇电压、碰撞能量等参数进行优化,使分子离子对的信号达到最强,选择每种待测物响应最高的两对分子离子对,以响应较强的子离子作为定量离子,另一作为定性离子。因为米醇菌酸和异米醇菌酸为顺反异构体,故二者具有相同的分子离子对。然后设定合适的峰驻留时间,使色谱峰的采样点数在 15~20 之间,得到较好的定量重复性。优化后的质谱条件见 1.3.2 节。

2.5 方法性能分析

2.5.1 标准曲线、检出限和定量限 分别向 6 份空白血浆和空白尿液样品中加入适量的米醇菌酸和异米醇菌酸混合标准溶液,使待测物浓度分别为 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 μg/L,

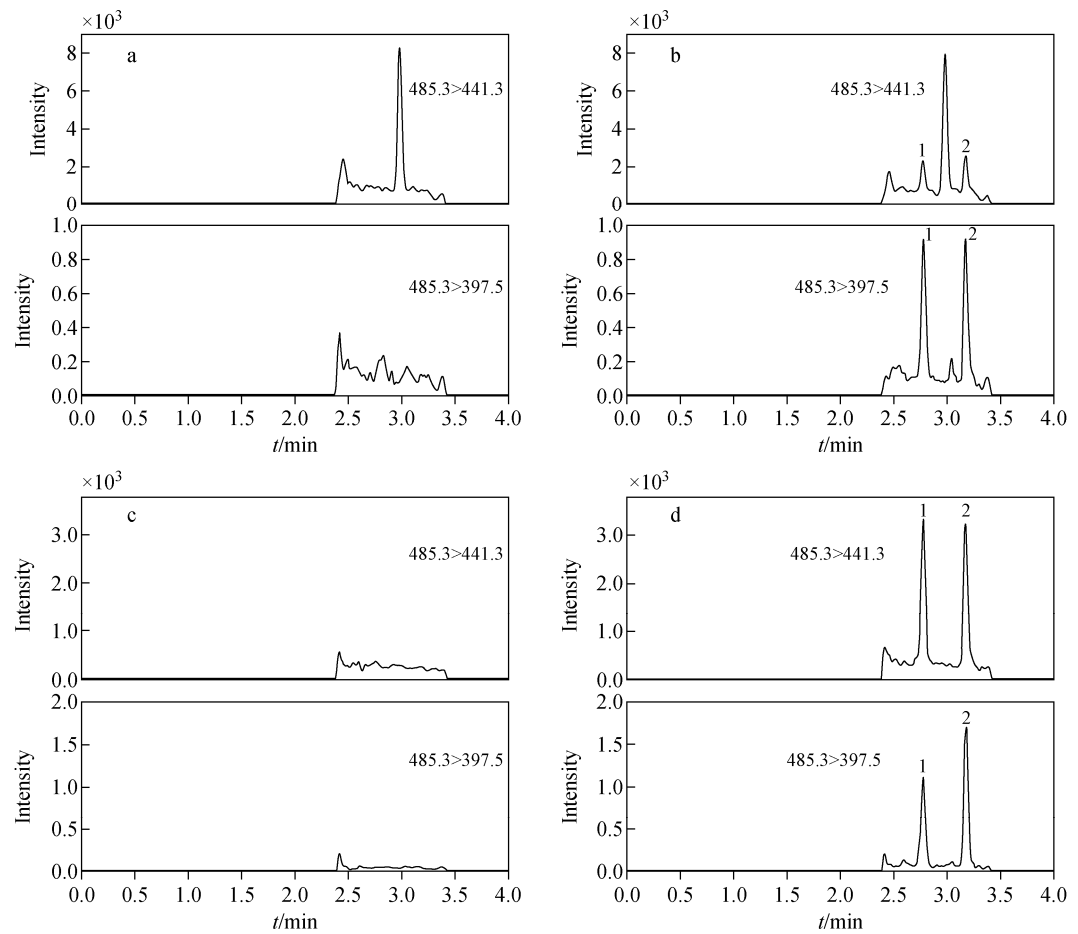
按 1.4 节条件进行样品前处理,采用 MultiQuant 定量软件进行数据处理,以定量离子对峰面积(y)对标准系列浓度(x , μg/L)进行回归(权重取 $1/x$)结果表明:尿液中米醇菌酸和异米醇菌酸的回归方程分别为 $y=1.823 \times 10^5 x - 1\ 857$ 和 $y=1.913 \times 10^5 x - 2\ 754$;血浆中米醇菌酸和异米醇菌酸的回归方程分别为 $y=1.382 \times 10^5 x - 1\ 368$ 和 $y=1.431 \times 10^5 x - 2\ 018$;线性范围均为 0.05~10.0 μg/L;相关系数均优于 0.998,线性关系良好。

分别向空白血浆和尿液样品中加入低浓度的米醇菌酸和异米醇菌酸,以分子离子对的 $S/N \geq 3$ 时的样品浓度作为检出限(LOD),以 $S/N \geq 10$ 时的样品浓度作为定量限(LOQ),测得血浆、尿液中米醇菌酸、异米醇菌酸的检出限和定量限分别为 0.02 μg/L 和 0.05 μg/L。血浆和尿液定量限水平加标样品的色谱图示于图 6。

2.5.2 方法的精密度和加标回收实验 向空白血浆和尿液样品中分别添加不同浓度的米醇菌酸和异米醇菌酸标准溶液,混匀后放置 60 min,再按 1.4 节条件进行操作,其回收率和精密度结果列于表 1。血浆和尿液中米醇菌酸和异米醇菌酸的加标回收率均在 92%~106% 之间,相对标准偏差为 2.4%~13%,符合痕量分析的要求。

2.5.3 基质效应 取空白血浆和尿液样品,按本研究方法处理得到空白残渣,加入 1.0 mL 5 μg/L 的米醇菌酸和异米醇菌酸混合标准溶液,制成基质配制标准溶液(均为 5 μg/L),测得米醇菌酸和异米醇菌酸的色谱峰面积,除以溶剂标准溶液(在 995 μL 初始流动相中加入 5 μL 1.0 mg/L 的米醇菌酸和异米醇菌酸的混合标准溶液制得 1.0 mL 5 μg/L 的米醇菌酸和异米醇菌酸溶剂标准溶液)中各自色谱峰面积以评估样品的基质效应^[18],平行测定 3 次。结果表明,血浆和尿液中米醇菌酸和异米醇菌酸的基质抑制效应均在 101%~104% 范围内,没有明显的基质效应。

2.5.4 提取回收率 向空白血浆样品中加标 5 μg/L 的米醇菌酸和异米醇菌酸,按 1.4 节条件进行样品前处理,测定得到米醇菌酸和异米醇菌酸的色谱峰面积,除以米醇菌酸和异米醇



注:a. 空白血浆;b. 空白血浆加标 0.05 μg/L 米醇菌酸和异米醇菌酸;c. 空白尿液;
d. 空白尿液加标 0.05 μg/L 米醇菌酸和异米醇菌酸;1. 米醇菌酸;2. 异米醇菌酸

图 6 米醇菌酸和异米醇菌酸 UPLC-MS/MS 色谱图

Fig. 6 UPLC-MS/MS chromatograms of bongkreic acid and isobongkreic acid

表 1 血浆和尿液中米醇菌酸和异米醇菌酸的加标回收率和精密度 (n=6)

Table 1 Recoveries and RSDs of bongkreic acid and isobongkreic acid in plasma and urine samples (n=6)

化合物 Compounds	样品 Samples	添加浓度 Spiked level/(μg/kg)	测定值 Found/(μg/kg)	平均回收率 Recoveries/%	相对标准偏差 RSDs/%
米醇菌酸	血浆	0.05	0.047	94	7.3
		1.0	0.98	98	7.3
		4.0	3.82	96	3.8
		8.0	7.48	94	5.2
	尿液	0.05	0.045	90	13
		1.0	0.098	98	5.7
		4.0	4.18	104	4.9
		8.0	8.04	100	2.4
异米醇菌酸	血浆	0.05	0.047	94	6.7

续表 1

化合物 Compounds	样品 Samples	添加浓度 Spiked level/($\mu\text{g/kg}$)	测定值 Found/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率 Recoveries/%	相对标准偏差 RSDs/%
尿液		1.0	0.96	96	5.3
		4.0	4.01	100	7.2
		8.0	7.78	97	6.8
		0.05	0.046	92	11
		1.0	0.096	96	5.7
		4.0	4.22	106	5.4
		8.0	7.69	96	2.5

菌酸的基质配制标准溶液(均为 5 $\mu\text{g/L}$)中各自色谱峰面积以评估样品的提取回收率^[18],平行测定 3 次。结果表明,血浆样品中米酵菌酸和异米酵菌酸的平均提取回收率分别为 60%(变异系数 4.2%)和 54%(变异系数 4.8%),用同样的方法测得尿液样品中米酵菌酸和异米酵菌酸的平均提取回收率均为 80%(变异系数分别为 4.9%和 5.3%)。由于提取回收率均不小于 80%,因此不能采用基质配制标准曲线外标法定量,应采用基质加标标准曲线(基质工作曲线)外标法定量,以期能够校正样品处理时米酵菌酸和异米酵菌酸的损失。

3 结论

本研究建立了超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱法(UPLC-MS/MS)测定血浆和尿液中米酵菌酸和异米酵菌酸。通过对样品处理、色谱分离、质谱检测条件进行优化,得到了较高的检测灵敏度。方法学验证结果表明,该方法简单、灵敏度高、准确度高,可用于椰毒假单胞菌引起中毒生物样品的快速检测。

参考文献:

[1] ANWAR M, KASPER A, STECK A R, SCHIER J G. Bongkreki acid-a review of a lesser-known mitochondrial toxin[J]. J Med Toxicol, 2017, 13: 173-179.

[2] LAUQUIN G J M, DUPLAA A M, KLEIN G, ROUSSEAU A, VIGNAIS P V. Isobongkreki acid, a new inhibitor of mitochondrial ADP-ATP transport: radioactive labeling and chemical and

biological properties[J]. Biochemistry, 1976, 15 (11): 2 323-2 327.

[3] VORAGEN A G J, DEKOK H A M, KELHOLT A J, SCHOLS H A, DJIEN K S. Determination of bongkreki acid and toxoflavin by high pressure liquid chromatography[J]. Food Chem, 1982, 9: 167-174.

[4] NUGTEREN D H, BERENDS W. Investigations on bongkreki acid, the toxine from Pseudomonas cocovenenans [J]. Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 1957, 76(1): 13-27.

[5] 王静,刘秀梅. 椰毒假单胞菌酵米面亚种及米酵菌酸的研究进展[J]. 中国食品卫生杂志,1996, 8(2):42-45.

WANG Jing, LIU Xiumei. Advances in studies on Pseudomonas cocovenenans subsp. farinofermentans and bongkreki acid[J]. Chinse Journal of Food Hygiene, 1996, 8(2): 41-45 (in Chinese).

[6] FALCONER T M, KERN S E, BRZEZINSKI J L, TURNER J A, BOYD B L, LITZAU J J. Identification of the potent toxin bongkreki acid in a traditional African beverage linked to a fatal outbreak[J]. Forensic Sci Int, 2017, (270): e5-e11.

[7] GUDO E S, COOK K, KASPER A M, VERGARA A, SALOMC, OLIVEIRA F, ISMAEL H, SAEZE C, MOSSE C, FERNANDES Q, VIEGAS S O, BALTAZAR C S, DOYLE T J, YARD E, STECK A, SERRET M, FALCONER T M, KERN S E. , BRZEZINSKI J L, TURNER J A, BOYD B L, JANI I V. Description of a mass poisoning in a rural district in Mozambique; the first documented bongkreki acid poisoning in

- Africa[J]. Clin Infect Dis, 2018, 66(9): 1 400-1 406.
- [8] 刘秀梅. 我国椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒流行趋势浅析[J]. 中华预防医学杂志, 1996, 30(6): 372-374.
- LIU Xiumei. Prevalence trend of food poisoning by pseudomonas cocovenenans subsp farinofermentans in China[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 1996, 30(6): 372-374 (in Chinese).
- [9] 李晓琰, 杨祖顺, 国译丹, 周慧新, 范璐, 李瑛. 椰毒假单胞菌酵米面亚种食物中毒的病原分离鉴定[J]. 中国食品卫生杂志, 2016, 28(1): 36-39.
- LI Xiaoli, YANG Zushun, GUO Yidan, ZHOU Huixin, FAN Lu, LI Ying. Isolation and identification of Pseudomonas cocovenenans subsp. Farino fermentans from food poisoning accident Chinse[J]. Journal of Food Hygiene, 2016, 28(1): 36-39(in Chinese).
- [10] 刘莹, 金立鹏, 王尊哲. 米酵菌酸的研究进展[J]. 潍坊医学院学报, 2003, 25(2): 153.
- LIU Ying, JIN Lipeng, WANG Zunzhe. Research progress of bongkreki acid[J]. Acta Academiae Medicinae Weifang, 2003, 25(2): 153(in Chinese).
- [11] FRANÇAIS A, LEYVAPÉREZ A, ETXEBARRIA-JARDI G, PENA J, LEY S V. Total synthesis of iso- and bongkreki acids: natural antibiotics displaying potent antiapoptotic properties [J]. Chem Eur J, 2011, 17(1): 329-343.
- [12] GB 5009.189—2016 食品中米酵菌酸的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [13] 李红艳, 金燕飞, 黄海智, 翁晨辉, 胡玉霞. 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 Hongyan, JIN Yanfei, HUANG Haizhi, WENG Chenhui, HU Yuxia. 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 Science, 2016, 37(24): 247-251 (in Chinese).
- [14] 苏永恒, 张伟, 张榕杰, 银恭举. 固相萃取-高效液相色谱法测定食品中米酵菌酸含量[J]. 中国卫生工程学, 2017, 16(4): 438-439.
- SU Yongheng, ZHANG Wei, ZHANG Rongjie, YIN Gongju. Determination of bongkreki acid in food by solid extraction-high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2017, 16(4): 438-439 (in Chinese).
- [15] 周霞, 陈万勤, 傅红雪, 徐潇颖, 罗金文. 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.
- ZHOU Xia, CHEN Wanqin, FU Hongxue, XU Xiaoying, LUO Jinwen. Fast determination of bongkreki acid in food by auto solid phase extraction-ultra high performance liquid chromatography[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2018, 46(8): 159-160(in Chinese).
- [16] 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]. 广州化工, 2014, 41(16): 168-169.
- SU Kenming, LIANG Daqing. Determination of bongkreki acid in tremella fuciformis by LC-MS/MS[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2014, 41(16): 168-169(in Chinese).
- [17] 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 Peng. Determination of bongkreki acid in Tremella fuciformis Berk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Research and Development, 2015, 36(22): 123-126(in Chinese).
- [18] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS[J]. Anal Chem, 2003, 75(13): 3 019-3 030.