

LC-MS/MS快速检测面粉中恩镰孢菌素及白僵菌素

Determination of Beauvericin and Enniatins in Flour by High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

李广宁, 孙小杰, 刘冰洁, 郭立海

Li Guangning, Sun Xiaojie, Liu Bingjie, Guo Lihai

SCIEX China

Keywords: SCIEX Triple Quad; Enniatins; Beauvericin

引言

恩镰孢菌素 (ENNs) 和白僵菌素 (BEA) 是由镰刀菌属菌种产生的环酯肽类代谢产物, 主要污染大麦, 小麦, 黑麦, 玉米等谷物及其制品。有研究表明ENNs和BEA具有遗传毒性和细胞毒性, 可诱发染色体畸变, 导致肿瘤细胞增殖等。ENNs和BEA的基本结构见图1, 根据R1, R2, R3结合不同的苯基或脂肪族取代基可形成不同的毒素。

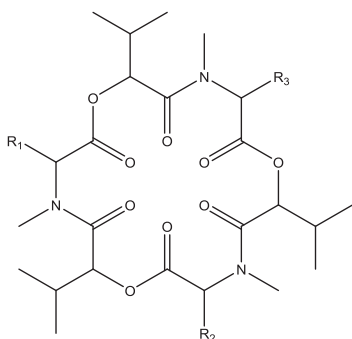


图1. 恩镰孢菌素和白僵菌素的基本结构

针对ENNs和BEA的危害, 目前我国尚未有相关国家标准检测方法, 我们在小麦粉及玉米面粉上, 采用酸化乙腈提取后净化的方法, 在SCIEX液相色谱质谱系统上开发了ENNs和BEA的检测方法, 该方法具有以下特点:

1. 分析时间短, 10分钟即可完成面粉基质中ENNs和BEA的检测。
2. 灵敏度高: 基质中ENNs和BEA的检出下限可达pg级别, 可用于谷类制品中ENNs和BEA的检测。
3. 抗基质干扰: SCIEX Turbo V™离子源具有强大的抗基质干扰能力, 减少仪器的维护频次。

仪器设备

SCIEX ExionLC™ 系统 + SCIEX Triple Quad™系统



样品处理:

准确称取固体样品5 g (精确至0.01g) 样品于50 mL离心管中, 加入50 μL BEA同位素内标工作液混合, 加入40 mL 1%甲酸水-乙腈溶液 (乙腈: 水: 甲酸=80: 19: 1), 涡旋1 min, 超声提取30 min, 离心10 min, 取上清液4 mL过HLB固相萃取柱净化。净化液经氮气吹干, 使用1 mL 50% 乙腈水溶液复溶, 上机备用。

色谱方法:

色谱柱: BEH C18 1.7 μm 100 $\times$ 2.1 mm

流动相: A: 5mM甲酸铵水溶液

B: 乙腈

梯度洗脱:

Time [min]	Flow [mL/min]	B[%]
0.00	0.3000	80
4.00	0.3000	80
6.00	0.3000	90
7.00	0.3000	98
8.00	0.3000	98
8.10	0.3000	80
10.00	0.3000	80

流速: 0.3 mL/min;

柱温: 40°C;

进样量: 2 μL

质谱方法:

扫描方式: 正模式

离子源: ESI

离子源参数:

IS电压: 5500 V

气帘气 CUR: 35 psi

雾化气 GAS1: 40 psi

辅助加热器 GAS2: 40 psi

源温度 TEM: 600°C

碰撞气 CAD: Medium

离子对列表见附表

实验结果

化合物提取离子流色谱图 (图2)

1. 灵敏度, 线性, 回归方程及回归系数

使用空白基质配置0.02~50 ng/mL标准测试液, BEA采用同位素内标¹³C45-BEA定量, 其他ENNs采用外标法定量, 相关曲线见图3, 如图所示, 所有化合物回归系数 $r > 0.999$, 方法从低浓度点到高浓度点均具有良好的准确度。不同化合物的线性及检出限值见表1。

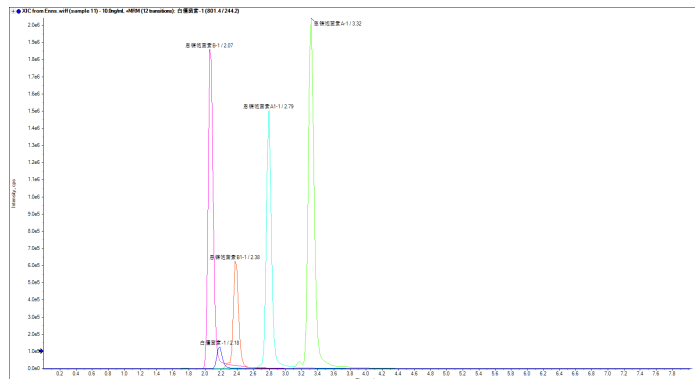


图2. ENNs及BEA的提取离子流色谱图

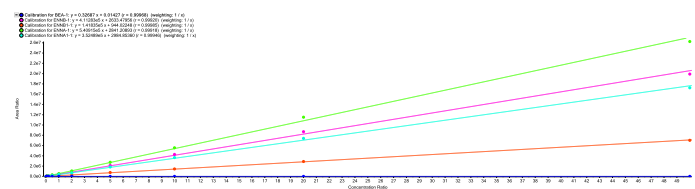


图3. ENNs及BEA的校准曲线

表1. ENNs及BEA的校准曲线及检出限值

化合物名称	回归方程	回归系数 r	检出限 (ng/mL)
ENNB	$y = 4.11283e5X + 2633.47956$	0.9992	0.001
ENNB1	$y = 1.41835e5X + 944.02248$	0.99985	0.002
ENNA	$y = 5.04915e5X + 2841.20893$	0.99918	0.01
ENNA1	$y = 3.52489e5X + 2984.8536$	0.99977	0.002
BEA	$y = 0.32687X + 0.01427$	0.99946	0.003

2. 回收率考察

使用玉米面粉空白基质加标考察方法回收, 添加浓度分别为0.5 $\mu\text{g/kg}$, 5 $\mu\text{g/kg}$ 及50 $\mu\text{g/kg}$, 进样测试, 在优化色谱方法排除相关干扰下, 相关回收率在90%~110%之间。

表2. 不同添加浓度的回收率

添加浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	测试结果 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率/%
0.5	0.54	108
5	4.79	95.8
50	53.71	107.42

总结

本实验在SCIEX Triple Quad™系统上，建立了面粉中的4种恩镰孢菌素及白僵菌素的LC-MS/MS方法，方法快速简便，灵敏度结果显示其检出限值可达到pg级别。使用玉米面粉空白基质进行不同添加水平的测试，回收在90%~110%，可满足面粉相关制品中恩镰孢菌素及白僵菌素的筛查需求。

附录：

恩镰孢菌素、白僵菌素及其同位素内标的质谱离子对参数

中文名	英文缩写	CAS No.	分子式	加合方式	Q1	Q3	DP	CE
白僵菌素	BEA	26048-05-5	$C_{45}H_{57}N_3O_9$	$[M+NH_4]^+$	801.4	244.2	50	40
						262.2	50	42
13C45-白僵菌素	13C45-BEA	-	-	$[M+NH_4]^+$	846.5	259.3	30	41
						277.2	30	45
恩镰孢菌素 B	ENNB	917-13-5	$C_{33}H_{57}N_3O_9$	$[M+NH_4]^+$	657.3	196.1	100	36
						214.1	100	40
恩镰孢菌素 B1	ENNB1	19914-20-6	$C_{34}H_{59}N_3O_9$	$[M+NH_4]^+$	671.4	196.1	90	35
						214.1	90	40
恩镰孢菌素 A	ENNA	2503-13-1	$C_{36}H_{63}N_3O_9$	$[M+NH_4]^+$	699.3	210.1	90	38
						228.1	90	42
恩镰孢菌素 A1	ENNA1	4530-21-6	$C_{35}H_{61}N_3O_9$	$[M+NH_4]^+$	685.3	210.1	80	39
						228.2	80	40

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在英国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2022 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-14660-ZH-A



SCIEX中国

北京分公司
北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话：010-5808-1388
传真：010-5808-1390

全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心
上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话：021-2419-7200
传真：021-2419-7333

官网：sciex.com.cn

广州分公司
广州市天河区珠江西路15号
珠江城1907室
电话：020-8510-0200
传真：020-3876-0835

官方微信：[SCIEX-China](#)