



# 对采用 UHPLC/MS/MS 准确定量玉米中毒枝菌素的稳定同位素稀释分析方法进行验证

## 应用简报

### 作者

Elisabeth Varga, Katharina Mayer,  
Michael Sulyok, Rainer Schuhmacher,  
Rudolf Krska 和 Franz Berthiller  
Christian Doppler 毒枝菌素代谢实验室  
与分析化学中心, 农业生物技术系  
(IFA-Tulln), 自然资源与生命科学大学,  
维也纳 (BOKU), 奥地利

Thomas Glauner  
安捷伦科技有限公司  
瓦尔德布隆, 德国

### 摘要

本文介绍了一个快速、操作简单且经济有效的分析方法, 用于定量分析谷类食品中所有 11 种受欧洲严格管制的毒枝菌素。基于 Varga 等人发表的方法 [1], 本文提供了更多实用信息, 以帮助其他实验室快速建立本方法。本方法包含两步溶剂提取程序, 采用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统进行 UHPLC 分离, 以及采用高灵敏度 Agilent 6490 iFunnel 三重四极杆液质联用系统进行串联质谱检测。分别采用  $^{13}\text{C}$  均匀标记的各毒枝菌素作为 11 种目标化合物的内标, 以此来补偿电喷雾离子化的基质效应。与其他方法不同, 本方法的提取净化成本低、耗时短。此外, 也无需繁琐地去制备基质匹配的标样。

采用玉米基质的方法验证实验表明, 所推荐的两步提取程序基本能够提取完全 (回收率 97 - 111%), 因此, 我们可以在提取后加入内标, 并且仅需很少的量。针对加标玉米提取物的进一步实验表明, 内标的使用可以使方法具有良好的准确度, 表现回收率在 88 - 105% 之间。我们通过对具有明确浓度的一些基质参考物质进行测定, 证实了方法的准确度。

所有毒枝菌素的定量限 (LOQ) 均低于欧洲法规针对谷类食品, 甚至是谷类婴儿食品要求的浓度。本方法可实现玉米中所有受管制毒枝菌素的准确定量。分析其他谷类食品也能获得相似的提取回收率和准确度。本方法适用于多种分析物, 除具有高准确度以外, 最大的优势就是它的简便性, 因此它对日常检验任务繁忙的实验室具有很大的吸引力。

## 前言

毒枝菌素是真菌的次生代谢产物，可对哺乳动物产生急性或慢性毒性。不良健康影响包括这些毒素导致的免疫抑制、肝毒性、致突变、致癌和雌激素活性 [2]。在已发现的数百种毒枝菌素中，有 11 种常常存在且有毒性，因此被认为是危害健康的主要因素。目前大约有 100 个国家都建立了相关的管理法规。在欧洲，欧委会法规 (EC) 1881/2006 及其修正案规定了以下 11 种毒枝菌素在食品中最高含量：黄曲霉毒素（黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub> 和 G<sub>2</sub> 的总和，以及单独的 AFB<sub>1</sub> 和黄曲霉毒素 M<sub>1</sub>）、伏马菌素 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub> 的总和、赭曲霉毒素 A (OTA)、棒曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌醇 (DON) 和玉米赤霉烯酮 (ZEN) [3]。黄曲霉毒素 M<sub>1</sub> 和棒曲霉毒素只分别在牛奶和苹果中才须考虑，而镰刀菌毒素 T-2 和 HT-2 却在谷物中频繁被发现，已成为备受关注的公共健康问题。最近，欧盟委员会建议 2013/165/EU 已发布，它针对谷物和谷类产品规定了指示性含量，据此，我们应该调查那些导致 T-2 和 HT-2 毒素出现的因素 [4]。俄罗斯已经开始监管谷物和谷类食品中的 T-2 毒素。

若要确保所规定的最大限量标准得到有效执行，则需要有准确可靠的分析方法。对于多种残留物和污染物分析，液相色谱联用串联质谱已被证明是一款强大的工具。结果已表明，LC/MS/MS 可实现不同商品中多种毒枝菌素的同步测定，具有高灵敏度和高选择性 [5]。然而在复杂基质中，电喷雾过程中的基质效应可能会影响定量分析的准确性，它将导致分析物信号的抑制或增强。不仅在不同的商品间，而且在同一类基质的各样品间，基质效应的大小也无法预测 [6]。

目前可采用一些不同的策略来补偿基质效应，如稀释样品、基质匹配校准、添加标样，或使用内标。鉴于稀释样品会降低分析方法的灵敏度，而基质匹配校准的使用也有问题，因为一些毒素普遍存在于数种基质中（如玉米中的 DON），并且一种商品的基质效应也会出现变化，从而使这种补偿也不能完全奏效。添加标样增加了每个样品的分析运行次数，因此时间效率较差。

对于日常检验任务繁忙的实验室，最好是能够使用性质与目标化合物几乎完全相同但又有所不同的内标。过去，内标经常是单一化合物或一组化合物的类似物。然而，当我们希望补偿基质效应时，它的价值就很有有限了，因为该效应与保留时间息息相关，而目标化合物极少与这些类似物共流出。

稳定同位素标记化合物是用于实现这一目的的理想选择，因为它们具有相同的理化性质（这意味着它们会与目标化合物共流出），而且由于它们的分子量不同，采用质谱技术仍可分辨它们。此外，它们并不存在于天然受污染的样品中。由于稳定同位素标记化合物的加入稀释了分析物同位素丰度的天然分布，故该过程通常称为稳定同位素稀释分析 (SIDA) [7]。

本文介绍了一个快速、可靠且操作简单的分析方法，采用 UHPLC/MS/MS 定量分析谷类食品中黄曲霉毒素（AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFG<sub>2</sub>）、伏马菌素（FB<sub>1</sub>、FB<sub>2</sub>）、OTA、DON 和 ZEN，以及 T-2 和 HT-2 毒素。为确保准确的定量分析，我们在分析中使用了各目标分析物的 <sup>13</sup>C 均匀标记的同系物作为内标。本方法包括一个无需进一步净化的两步萃取程序、UHPLC 分离和使用动态 MRM 的高灵敏度 MS/MS 检测。本方法顺利通过了基于玉米基质的验证，评估测定的方法性能参数包括线性、基于信噪比 (S/N) 的 LOQ，以及重现性。我们通过分析具有明确浓度的一些测试材料证实了方法的准确度。Varga 等人对所有提供的结果进行了详细发表 [1]。

## 实验部分

### 试剂与玉米样品

所有试剂和溶剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈和甲醇购自 Baker 公司 (Mallinckrodt Baker, 代芬特尔, 荷兰) 超纯水产自配置 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (EMD 密理博, 比勒利卡, 马萨诸塞州, 美国)。甲酸购自 Fluka 公司 (Fluka AG, 布克斯, 瑞士), 甲酸铵溶液 (5 M) 购自安捷伦公司 (部件号 G1946-85021)。

LC/MS 毒枝菌素试剂盒 (部件号 KIT-001) 中包括了所有使用的毒枝菌素分析标样, 购自罗默实验室诊断股份有限公司 (图尔恩, 奥地利)。该试剂盒包含未标记的和  $^{13}\text{C}$  均匀标记的伏马菌素 B<sub>1</sub> 和 B<sub>2</sub>、镰刀菌毒素 (DON、ZEN、T-2 和 HT-2 毒素)、黄曲霉毒素 (AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 和 AFG<sub>2</sub>) 和 OTA 的混合物, 以乙腈或乙腈/水 (1:1, v/v) 为溶剂。

加标实验需要未受污染的玉米样品。鉴于这个原因, 我们从田间采集玉米样品并目测检查, 应不存在霉菌。将玉米粒磨碎, 混匀, 然后采用 UHPLC/MS/MS 方法分析毒枝菌素。背景污染低于 LOD。各种玉米测试材料, 包括一些毒枝菌素的官方参考物质和核对样品材料, 购自欧盟联合研究中心 (JRC, 赫尔, 比利时)、食品分析能力评价体系 (FAPAS, 约克, 英国)、罗默实验室 (图尔恩, 奥地利), 以及土耳其安卡拉科学技术研究委员会测试分析实验室 (TÜBITAK-ATAL), 以核查方法的真实性。对样品进行前处理并采用 UHPLC/MS/MS 方法进行分析, 结果与认证值或公认值进行比较。

### 溶液与标样

将 500  $\mu\text{L}$  黄曲霉毒素混合液、50  $\mu\text{L}$  伏马菌素混合液、50  $\mu\text{L}$  镰刀菌毒素混合液和 50  $\mu\text{L}$  OTA 溶液加到 350  $\mu\text{L}$  超纯水中, 制备未标记毒枝菌素的工作溶液, 各毒素的浓度如下:

- AFB<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、AFG<sub>1</sub> 和 AFG<sub>2</sub>, 500 ng/mL
- DON, 5000 ng/mL
- FB<sub>1</sub> 和 FB<sub>2</sub>, 2500 ng/mL
- HT-2, 5000 ng/mL
- OTA, 500 ng/mL
- T-2, 500 ng/mL
- ZEN, 1500 ng/mL

将 20  $\mu\text{L}$  标记的黄曲霉毒素混合液、100  $\mu\text{L}$  标记的伏马菌素混合液、50  $\mu\text{L}$  标记的镰刀菌毒素混合液和 5  $\mu\text{L}$  标记的 OTA 溶液加到 825  $\mu\text{L}$  乙腈/水 (1:1, v/v) 中, 制备  $^{13}\text{C}$  均匀标记的毒枝菌素工作溶液, 浓度如下:

- ( $^{13}\text{C}_{17}$ )-AFB<sub>1</sub>、( $^{13}\text{C}_{17}$ )-AFB<sub>2</sub>、( $^{13}\text{C}_{17}$ )-AFG<sub>1</sub> 和 ( $^{13}\text{C}_{17}$ )-AFG<sub>2</sub>, 10 ng/mL
- ( $^{13}\text{C}_{15}$ )-DON, 500 ng/mL
- ( $^{13}\text{C}_{34}$ )-FB<sub>1</sub> 和 ( $^{13}\text{C}_{34}$ )-FB<sub>2</sub>, 500 ng/mL
- ( $^{13}\text{C}_{22}$ )-HT-2, 500 ng/mL
- ( $^{13}\text{C}_{20}$ )-OTA, 50 ng/mL
- ( $^{13}\text{C}_{24}$ )-T-2, 50 ng/mL
- ( $^{13}\text{C}_{18}$ )-ZEN, 150 ng/mL

储备液和两个工作溶液在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下贮藏。

使用乙腈/水混合溶剂 (30:70, v/v) 稀释未标记的工作溶液, 制备校准样品, 最终浓度范围为黄曲霉毒素、OTA 和 T-2 毒素 0.005 – 50 ng/mL, DON 和 HT-2 毒素 0.05 – 500 ng/mL, 伏马菌素 0.025 – 250 ng/mL, ZEN 0.015 - 150 ng/mL。将 20  $\mu$ L  $^{13}$ C 标记的标样工作溶液加入到 80  $\mu$ L 纯校准溶液中, 充分混匀。表 1 列出了进样样品中内标的终浓度。

### 样品前处理

称取 5 g ( $\pm$  0.01 g) 磨碎并混匀的玉米样品, 置于 50 mL 塑料试管中, 加入 20 mL 提取溶剂 A (乙腈/水, 80/20, v/v, 包含 0.1% 甲酸), 室温下, 样品在旋转摇床 (Edmund Bühler SM30, 黑欣根, 德国) 上提取 60 min。以 3500 rpm 的转速离心 5 min 后 (Eppendorf Centrifuge 5804 R, 汉堡, 德国), 将上清液转移到另一个 50 mL 塑料试管中, 然后向残渣中加入 20 mL 提取溶剂 B (乙腈/水, 20/80, v/v, 包含 0.1% 甲酸), 继续在旋转摇床上提取 30 min。然后在 3500 rpm 的转速下将试管离心 5 min, 并将上清液与第一次提取液合并。在合并两次提取的上清液时, 可能会产生沉淀, 因此, 再次在 3500 rpm 的转速下离心 5 min。取 80  $\mu$ L 终提取液, 转移到一个带去活玻璃内插管的 HPLC 样品瓶中, 加入 20  $\mu$ L  $^{13}$ C 标记的工作溶液, 充分混匀。即稀释了 10 倍。终溶液 10 ng/mL 的浓度相当于玉米样品中毒素浓度为 100  $\mu$ g/kg。图 1 为提取过程的框图。

为了评价基质效应, 按照上述过程提取空白玉米样品。将 25  $\mu$ L 未标记的毒枝菌素工作溶液加入 975  $\mu$ L 初始提取液中, 充分混匀。用空白提取液进一步稀释加标提取液, 得到 6 个不同的加标浓度。为了评价提取回收率和表观回收率, 以及工作范围、LOQ 和重现性, 在提取前于空白玉米样品中加入适量的未标记毒枝菌素工作溶液。按照上述过程提取样品。我们通过测定目标分析物浓度已知 (认证或公认) 的 12 个基质参考物质, 评价了方法准确度。

表 1. 进样溶液中  $^{13}$ C 标记内标的浓度

化合物	浓度 (ng/mL)	进样量 ( $\mu$ g)
$(^{13}\text{C}_{17})$ -AFB <sub>1</sub>	2	6
$(^{13}\text{C}_{17})$ -AFB <sub>2</sub>	2	6
$(^{13}\text{C}_{17})$ -AFG <sub>1</sub>	2	6
$(^{13}\text{C}_{17})$ -AFG <sub>2</sub>	2	6
$(^{13}\text{C}_{15})$ -DON	100	300
$(^{13}\text{C}_{34})$ -FB <sub>1</sub>	100	300
$(^{13}\text{C}_{34})$ -FB <sub>2</sub>	100	300
$(^{13}\text{C}_{22})$ -HT-2	100	300
$(^{13}\text{C}_{24})$ -T-2	10	30
$(^{13}\text{C}_{18})$ -ZEN	30	90
$(^{13}\text{C}_{20})$ -OTA	10	30

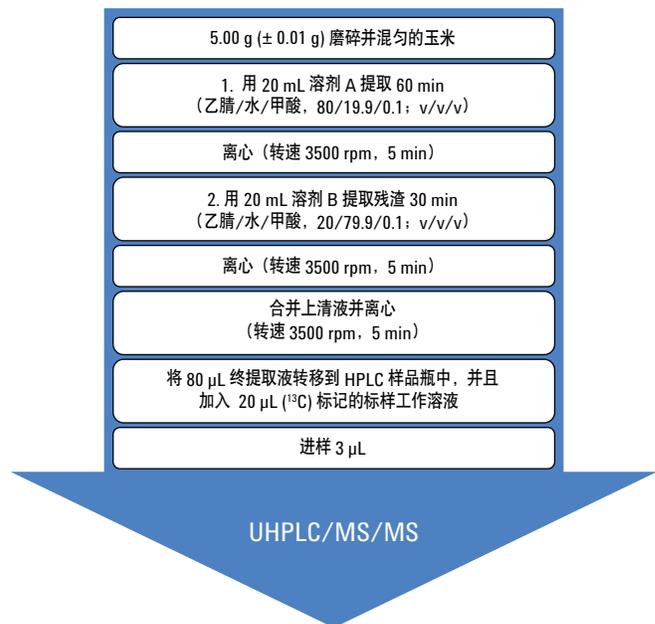


图 1. 玉米样品的样品前处理和提取程序的概览图解

## 仪器

采用 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统进行分离，该系统包括 Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity 高效自动进样器 (G4226A) 和 Agilent 1290 Infinity 柱温箱 (G1316C)。该 UHPLC 系统联用配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent G6490A 三重四极杆质谱仪。采用 Agilent MassHunter 工作站 B.06.00 软件进行数据采集和分析。

## 方法

1290 Infinity UHPLC 分析条件总结于表 2，G6490A 三重四极杆质谱分析参数列于表 3。采用正离子和负离子电喷雾离子化的动态 MRM 模式进行分析，每个目标化合物使用两个主要的离子对，<sup>13</sup>C 标记的内标使用一个离子对。采用 MassHunter Optimizer 软件和已稀释储备液的流动注射来优化原始和标记毒枝菌素的离子对和分析条件。除了 T-2 和 HT-2 毒素的分析采用 [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 离子，对于大多数分析物而言，[M+H]<sup>+</sup> 离子是丰度最高的母离子。对于 ZEN，在负离子模式下采用 [M-H]<sup>-</sup> 作为母离子可实现最高的灵敏度。所有离子对和分析条件总结于表 4。为了尽量减少基质进入雾化室的量，HPLC 流路在分析的第 1 分钟和从第 7 分钟开始到分析结束转向废液瓶。

表 2. UHPLC 参数

UHPLC 色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902), 30 °C
流动相	A: 0.1% 甲酸, 5 mM 甲酸铵水溶液 B: 0.1% 甲酸, 5 mM 甲酸铵甲醇溶液
梯度程序	Min      % B 0          30 0.5       30 8.0       100 9.5       100 9.6       30 后运行时间 2 min
流速	0.35 mL/min
进样量	3 μL
进样针清洗	采用乙腈/水 (50/50, v/v) 清洗 5 秒

表 3. Agilent G6490A 三重四极杆质谱仪参数

电离模式	配备安捷伦喷射流的正/负电喷雾离子源
扫描类型	动态多反应监测
干燥气温度	140 °C
干燥气流量	16 L/min
雾化器压力	25 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	4000 V (正离子); 3000 V (负离子)
喷嘴电压	0 V
分析周期时间	400 ms
MRM 总数	33
最大 MRM 并发数	12
最短驻留时间	39.8 ms
最长驻留时间	196.5 ms
分辨率	单位分辨率

表 4. 用于分析原始和 <sup>13</sup>C 标记毒枝菌素的 MRM 离子对和分析条件

化合物	保留时间	母离子	子离子	碰撞能量	碰撞池加速器	极性
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	4.49	313.1	285.0	21	3	正
			241.0	41	3	
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	4.24	315.1	287.0	21	3	正
			258.9	29	3	
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	3.93	329.1	243.0	25	3	正
			200.1	41	5	
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	3.65	331.1	313.0	21	3	正
			245.1	25	5	
脱氧雪腐镰刀菌醇	1.51	297.1	249.0	4	3	正
			203.0	12	3	
伏马菌素 B <sub>1</sub>	5.65	722.4	352.4	37	3	正
			334.4	37	3	
伏马菌素 B <sub>2</sub>	6.55	706.4	336.4	41	3	正
			318.3	41	3	
HT-2 毒素	5.46	442.2	263.0	9	3	正
			215.0	13	3	
赭曲霉毒素 A	6.53	404.1	238.9	25	3	正
			102.1	70	5	
T-2 毒素	6.03	484.3	305.0	8	5	正
			215.1	9	5	
玉米赤霉烯酮	6.51	317.1	272.9	17	7	负
			130.9	29	5	
( <sup>13</sup> C)-黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	4.49	330.1	301.1	21	3	正
( <sup>13</sup> C)-黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	4.24	332.2	303.0	21	3	正
( <sup>13</sup> C)-黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	3.93	346.1	212.2	41	5	正
( <sup>13</sup> C)-黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	3.65	348.1	259.1	25	5	正
( <sup>13</sup> C)-脱氧雪腐镰刀菌醇	1.51	312.2	263.1	4	3	正
( <sup>13</sup> C)-伏马菌素 B <sub>1</sub>	5.65	756.5	374.4	37	3	正
( <sup>13</sup> C)-伏马菌素 B <sub>2</sub>	6.55	740.5	358.3	41	3	正
( <sup>13</sup> C)-HT-2 毒素	5.46	464.3	278.1	9	3	正
( <sup>13</sup> C)-赭曲霉毒素 A	6.53	424.2	250.1	25	3	正
( <sup>13</sup> C)-T-2 毒素	6.03	508.3	322.1	8	5	正
( <sup>13</sup> C)-玉米赤霉烯酮	6.51	335.2	290.0	17	7	负

根据内标校准定量分析毒枝菌素。对于每种毒枝菌素，取相应的 <sup>13</sup>C 标记毒枝菌素作为内标。表观回收率，包括基质效应和提取步骤的回收率，通过比较加标玉米样品的测得浓度与理论值来计算。提取回收率通过比较表观回收率与分析提取后加标玉米提取

液的回收率来计算。LOQ 根据加标玉米样品提取液定量离子曲线的信噪比为 10，以及定性离子曲线的信噪比至少为 3 来计算。按照同样的方法计算 LOD，但是采用较小响应强度的定性离子对信噪比为 3 来计算。

## 结果与讨论

### UHPLC/MS/MS 方法开发

利用 MassHunter Optimizer 软件，在正离子和负离子模式下评价了所有化合物的离子对。对于大多数化合物， $[M+H]^+$  离子是丰度最高的母离子，而对于 ZEN，以  $[M-H]^-$  作为母离子时可以获得最高的灵敏度。对于 T-2 和 HT-2 毒素，选择  $[M+NH_4]^+$  离子作为母离子。由于 ZEN 与 OTA 和  $FB_2$  在相同的时间窗口共流出，为了能够在单次运行中完成所有化合物的分析，采用了快速极性切换模式。

使用酸化的流动相来确保稳定的保留时间，并提高伏马菌素的离子化效率。由于黄曲霉毒素  $AFG_1$  和  $AFG_2$  分别与标记的  $AFB_1$  和  $AFB_2$  享有相同的离子对，所以要优化色谱条件以实现其基线分离。本方法还可以实现  $FB_2$  和  $FB_3$  的基线分离。由于  $FB_3$  不受监管，因此并不包括在方法之中，但是，由于它是  $FB_2$  的异构体，两者经常共存，故需要将它与  $FB_2$  分开。除了本方法的运行时间很短外，我们还采用 ZORBAX UHPLC 色谱柱最大限度提高色谱分离度。增大的色谱分离度使基质效应最小化，我们可以进样  $3\ \mu\text{L}$  初始提取液，而无需进一步稀释或净化。图 2 展示了包括全部 11 种毒枝菌素及其内标的校准样品的色谱图，图 3 例举了一个污染样品中  $FB_2$  和  $FB_3$  的分离。

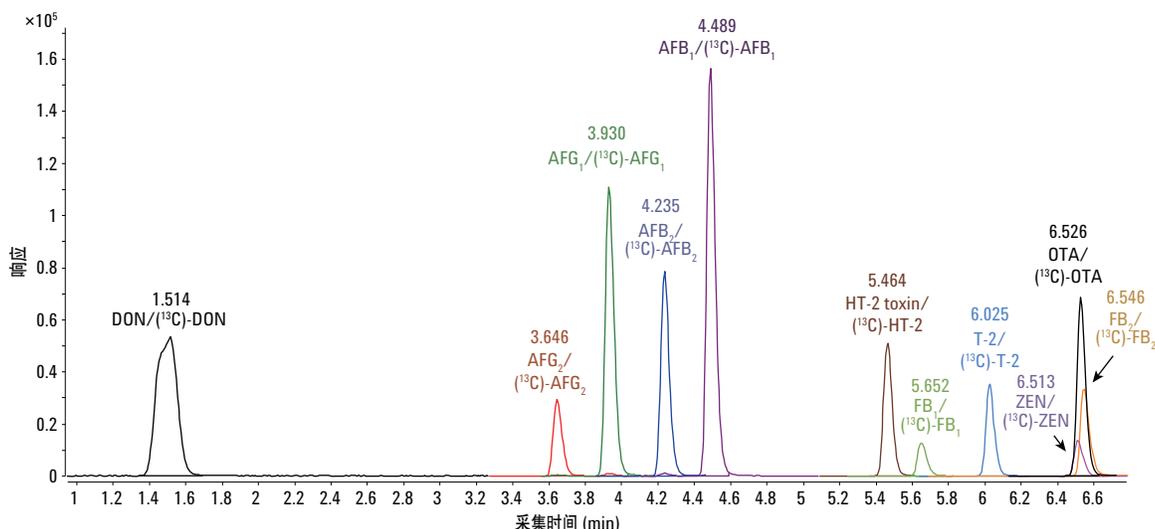


图 2. 包含所有 11 种毒枝菌素及其内标的校准样品中内标的色谱图，表明此 UHPLC 方法能实现高效分离

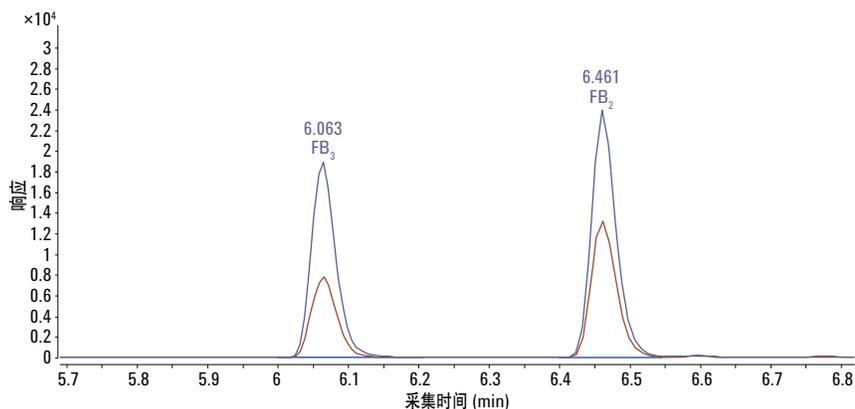


图 3. 污染玉米样品中伏马菌素  $B_3$  和伏马菌素  $B_2$  的色谱分离

## 通用提取方法的开发

从食物样品中提取毒枝菌素，时常采用酸化乙腈或高乙腈含量的乙腈/水混合溶剂，或者甚至是类似 QuEChERS 的提取方法，使用盐析步骤和净化。对于大多数目标化合物，这通常会得到高提取回收率，但伏马菌素是个例外，由于极性较强，它们对极性溶剂和极性表面具有较高的亲和力。伏马菌素的样品前处理需要更高极性的提取溶剂并要仔细优化，可以不进行净化。然而，当使用极性更高的溶剂或水含量较高的乙腈/水混合溶剂提高伏马菌素的提取回收率时，其他目标化合物如黄曲霉毒素的提取回收率就会下降。因此，采用了一个两步提取程序，首先采用乙腈/水/甲酸（80/19.9/0.1, v/v/v）提取 60 min，再采用乙腈/水/甲酸（20/79.9/0.1, v/v/v）提取 30 min。该提取策略提取回收率高（玉米样品在 97 - 111% 范围内，见表 6），即使是对于极少

进行样品稀释的伏马菌素。因此，终提取液可以直接进样到 UHPLC/MS/MS 系统进行分析，无需进一步处理。对于伏马菌素，我们观察到随着时间的推移，其纯标样溶液的信号强度有损失，这很可能是玻璃样品瓶的吸附导致的，所以应特别注意 HPLC 样品瓶和内插管的选择。基质存在时未发现这种现象。

## 方法性能表征

我们采用模型基质玉米对方法进行验证，因为大多数监管的毒枝菌素存在于玉米中，并且我们公认玉米是一个复杂的基质，可以引起严重的基质效应。使用线性工作范围、LOD 和 LOQ 来表征方法性能。图 4 展示了 DON、AFB<sub>1</sub>、OTA 和 ZEN 内标校准的典型校准曲线。

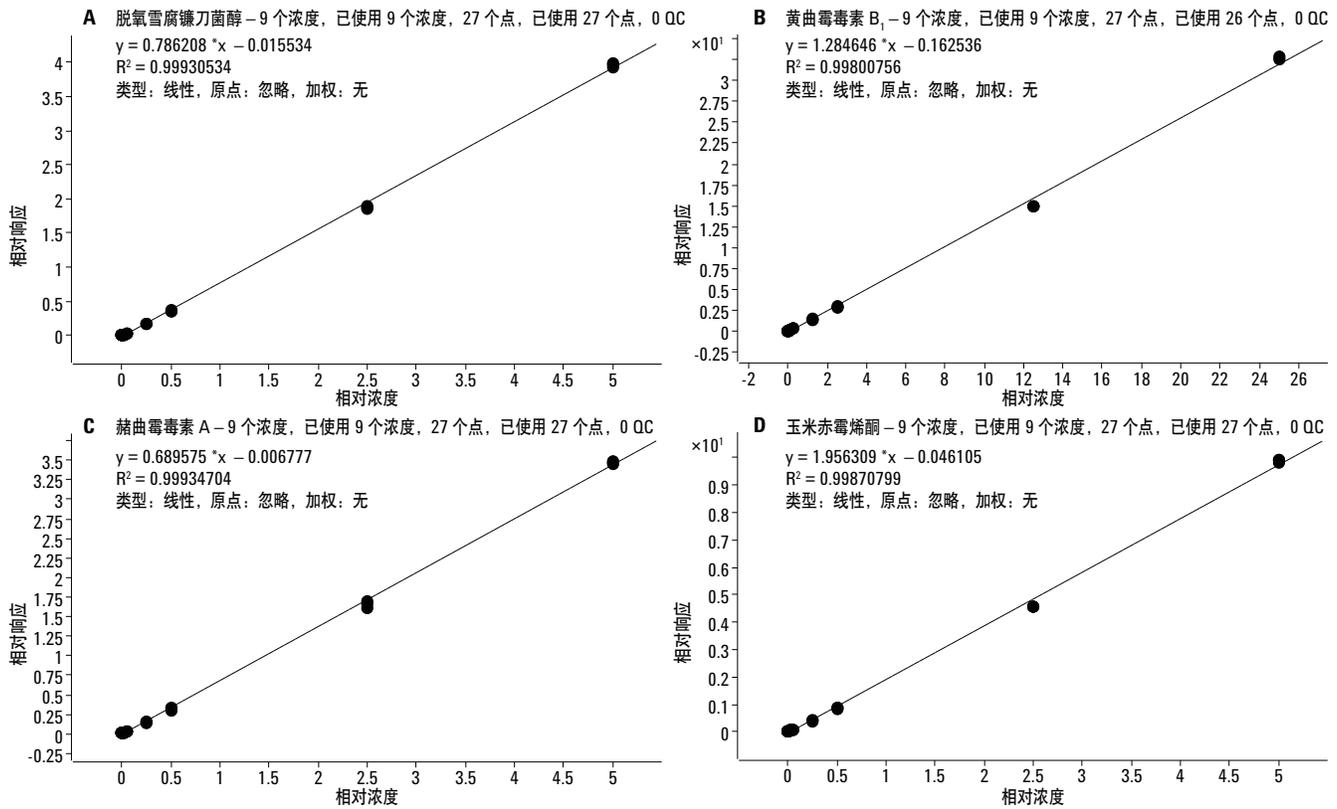


图 4. 使用纯溶剂标样对 DON (A)、AFB<sub>1</sub> (B)、OTA (C) 和 ZEN (D) 进行内标校准的校准曲线

获得的所有目标毒枝菌素的线性校准曲线都至少有三个数量级，覆盖了相关的浓度范围。每种毒枝菌素的相关浓度范围不同，这取决于当前立法规定的最大限量。本方法可对低至 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ （谷类婴儿食品中的最大限量）的  $\text{AFB}_1$  进行可靠定量，同时对于有较高最大限量规定的 DON、伏马菌素和 ZEN，方法定量上限在数百  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，因此即使在法规限度以外，我们也可以直接分析而无需进一步稀释。表 5 列出了方法的 LOQ 和线性范围。图 5 展示了  $\text{AFB}_1$  和 OTA 的色谱图，这两个化合物具有最低的法规限度，提取前加标到空白玉米中。

两种化合物最低的加标浓度是 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这远低于玉米与谷类食品规定的最高限量，相当于谷类婴儿食品中 OTA 的最高限量，以及  $\text{AFB}_1$  最高限量的 5 倍。外推得到信噪比为 10 时两种化合物的 LOQ 均为谷类婴儿食品中规定的最大限量的约 50%。对于其他所有的化合物，观察到的 LOQ 均远低于规定的最大限量或指示浓度。

表 5. 玉米基质中毒枝菌素的方法性能参数

	线性工作范围 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
黄曲霉毒素 B <sub>1</sub>	0.05–500	0.02	0.03
黄曲霉毒素 B <sub>2</sub>	0.25–500	0.04	0.06
黄曲霉毒素 G <sub>1</sub>	0.05–500	0.03	0.05
黄曲霉毒素 G <sub>2</sub>	0.25–500	0.06	0.24
脱氧雪腐镰刀菌醇	5.0–5000	1.7	3.2
伏马菌素 B <sub>1</sub>	12.5–2500	1.4	3.3
伏马菌素 B <sub>2</sub>	2.5–2500	0.8	2.2
HT-2 毒素	2.5–5000	0.6	2.0
赭曲霉毒素 A	0.25–500	0.13	0.24
T-2 毒素	0.25–500	0.06	0.18
玉米赤霉烯酮	7.5–1500	1.2	2.9

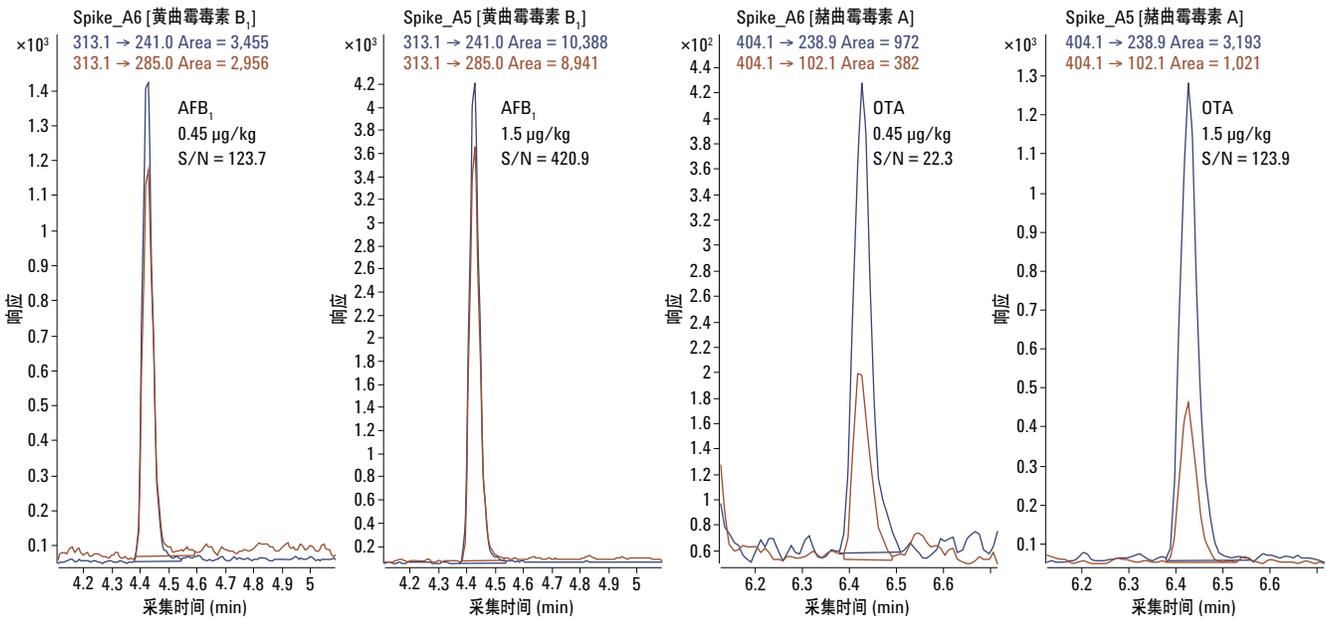


图 5. 空白玉米提取前加标  $\text{AFB}_1$  和 OTA 的色谱图，浓度接近谷类婴儿食品的法规限度（根据信号高度，采用峰间噪音算法计算定量离子对的信噪比）

采用两种不同极性的乙腈/水混合溶剂的通用提取方法，会造成样品提取液中存在相当多的基质。当根据外部校准计算提取前加标样品的表现回收率时，我们观察到基质效应使黄曲霉毒素和 DON 的回收率下降，而伏马菌素、OTA、T-2 和 HT-2 毒素的信号却得到加强。然而，如表 6 所示，当我们根据内部校准计算表现回收率时，我们可以得到具有良好 RSD 值的优异回收率。总体来说对于全部加标浓度，所有目标毒枝菌素的表现回收率在 88 - 105% 范围内。通过比较提取前加标玉米样品的表现回收率与提取后加

标样品的结果来计算提取回收率（两者均使用内部校准）。所有加标浓度的平均提取回收率在 97 - 111% 范围内，我们可以得出结论，即两步提取程序可以完全提取出玉米中的毒枝菌素，即使是伏马菌素。完全提取并且表现回收率接近 100%，这也意味着通过加入 <sup>13</sup>C 标记的内标，电喷雾离子化过程中的基质效应可以得到有效补偿。因此信号抑制只会降低方法的灵敏度，而不会影响目标毒枝菌素的准确定量。

表 6. 玉米基质中所有毒枝菌素的表现回收率 ( $R_A$ ) 和提取回收率 ( $R_E$ )，多达 6 个加标浓度 ( $n = 3$ )

	浓度 1 0.45 µg/kg		浓度 2 1.5 µg/kg		浓度 3 4.5 µg/kg		浓度 4 15 µg/kg		浓度 5 45 µg/kg		浓度 6 150 µg/kg	
	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$
AFB <sub>1</sub>	104 ± 2	108 ± 4	98 ± 1	108 ± 5	100 ± 7	104 ± 2	109 ± 4	115 ± 4	104 ± 6	106 ± 8	111 ± 7	111 ± 10
AFB <sub>2</sub>	102 ± 1	111 ± 4	96 ± 1	108 ± 2	95 ± 4	108 ± 4	101 ± 3	108 ± 6	100 ± 6	105 ± 10	102 ± 5	106 ± 10
AFG <sub>1</sub>	101 ± 4	103 ± 4	97 ± 2	106 ± 8	99 ± 6	111 ± 4	104 ± 5	114 ± 4	105 ± 1	112 ± 8	106 ± 7	110 ± 6
AFG <sub>2</sub>	107 ± 11	116 ± 16	96 ± 3	109 ± 3	95 ± 5	107 ± 6	101 ± 6	112 ± 8	100 ± 6	109 ± 8	108 ± 9	111 ± 9
T-2	97 ± 3	101 ± 9	100 ± 5	111 ± 10	92 ± 4	108 ± 3	99 ± 2	116 ± 0	100 ± 10	111 ± 14	107 ± 3	109 ± 5
OTA	99 ± 2	95 ± 5	95 ± 11	111 ± 3	85 ± 4	99 ± 6	93 ± 5	106 ± 2	92 ± 2	103 ± 5	97 ± 5	102 ± 6
	浓度 1 1.5 µg/kg		浓度 2 5 µg/kg		浓度 3 15 µg/kg		浓度 4 50 µg/kg		浓度 5 150 µg/kg		浓度 6 500 µg/kg	
	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$
FB <sub>1</sub>	< LOQ	< LOQ	99 ± 10	105 ± 13	92 ± 6	102 ± 9	96 ± 4	104 ± 2	93 ± 5	103 ± 9	102 ± 4	105 ± 4
FB <sub>2</sub>	< LOQ	< LOQ	89 ± 12	98 ± 18	82 ± 2	94 ± 5	85 ± 4	100 ± 8	88 ± 5	101 ± 12	93 ± 5	98 ± 6
ZEN	< LOQ	< LOQ	102 ± 10	111 ± 17	95 ± 13	117 ± 12	98 ± 7	110 ± 11	98 ± 8	97 ± 13	104 ± 7	107 ± 8
	浓度 1 4.5 µg/kg		浓度 2 15 µg/kg		浓度 3 45 µg/kg		浓度 4 150 µg/kg		浓度 5 450 µg/kg		浓度 6 1,500 µg/kg	
	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$	$R_A$	$R_E$
DON	114 ± 6	95 ± 8	98 ± 5	101 ± 4	92 ± 6	102 ± 6	98 ± 3	109 ± 3	94 ± 5	104 ± 7	102 ± 5	107 ± 6
HT-2	97 ± 8	108 ± 12	92 ± 6	107 ± 8	89 ± 1	106 ± 7	97 ± 4	114 ± 5	95 ± 7	107 ± 12	101 ± 6	112 ± 7

通过对具有明确分析物浓度的、含 11 种测试化合物中的 8 种的基质参考物质进行分析，证实了方法的真实性。由于没有得到含规定浓度所有测试毒枝菌素的参考材料，表 7 总结了 5 个不同测试材料的测定浓度。目前已另外分析了一些基质参考物质，结果见文献 [1]。总之，测定浓度与基质参考物质的规定值相吻合，表明该无需任何净化的两步提取程序，以及采用稳定同位素稀释的 UHPLC/MS/MS 测定，可以对谷物中的毒枝菌素进行准确定量分析。

表 7. 基质参考物质的指定值和分析得到的测定值

基质参考物质	分析物	指定值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	测定值 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )
TM_01	ZEN	$83 \pm 4.5$	$86 \pm 10$
TM_02	黄曲霉素的总和	$3.79 \pm 1.67$	$4.6 \pm 0.2$
	AFB <sub>1</sub>	$1.87 \pm 0.83$	$2.3 \pm 0.1$
	AFB <sub>2</sub>	$0.51 \pm 0.23$	$0.6 \pm 0.03$
	AFG <sub>1</sub>	$0.96 \pm 0.43$	$1.0 \pm 0.1$
	AFG <sub>2</sub>	$0.52 \pm 0.23$	$0.7 \pm 0.1$
TM_03	FB <sub>1</sub>	$1,650 \pm 53$	$1,960 \pm 198$
	FB <sub>2</sub>	$461 \pm 16$	$496 \pm 32$
TM_04	DON	$1,714 \pm 64$	$1,660 \pm 145$
TM_05	DON	$901 \pm 55$	$908 \pm 79$
	ZEN	$79 \pm 13$	$84 \pm 10$

为了证明本方法的可行性，我们将其用于分析了一个加标  $2 \mu\text{g}/\text{L}$  OTA 的红酒样品。过滤后 ( $0.2 \mu\text{m}$ , 再生纤维素)，取  $3 \mu\text{L}$  样品液直接注入 UHPLC/MS/MS 系统进行分析。测定的 OTA 浓度是  $2.01 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{L}$  ( $n = 7$ )，表明加入内标也可以补偿红酒的基质效应。图 6 展示了红酒样品中 OTA 的色谱图。

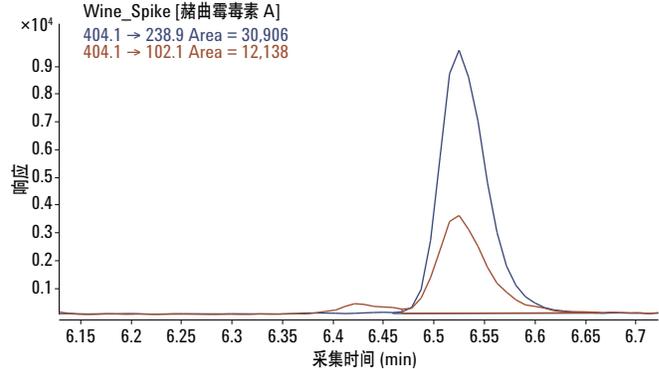


图 6. 红酒中加标 OTA 的定量和定性离子对的色谱图，其加标浓度为  $2 \mu\text{g}/\text{L}$

## 结论

本文建立了一个快速简便的 UHPLC 多目标分析方法，用于对欧洲监管的谷类食品中所有毒枝菌素进行准确定量分析。它充分利用了 1290 Infinity 液相色谱系统的低延迟体积，以及在 UHPLC 分离中可靠地操控高背压的优势，提高了色谱分离度并减少了运行时间。本方法还得益于 Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统固有的高灵敏度，这对于实现与谷类婴儿食品中 AFB<sub>1</sub> 和 OTA 法规限度一致的 LOQ 尤为重要。考虑到样品前处理中 10 倍的稀释，该方法就更加有意义。另外，采用本方法还能够在运行中实现正/负极快速切换，使我们可以利用每个化合物丰度最高的离子化模式进行分析。由于本方法可以同时分析理化性质差异显著的分析物，因此它也可以实现更多毒枝菌素的分析。

方法包括一个快速、简便且低成本的两步溶剂提取程序，可以获得良好的回收率，因此加入的 <sup>13</sup>C 标记内标可以保留在终提取液中，它们可以补偿电喷雾离子化过程中的基质效应。方法使用玉米基质成功通过了验证，所有基质效应得到了有效补偿，并提高了定量分析的准确度。玉米被认为可产生复杂的提取物，引起严重的基质效应。在玉米基质上运行良好的方法也很可能会应用到其他谷物和谷类食品分析中。

同时也采用该方法对加标 OTA 的红酒进行了分析。基质效应同样得到很好补偿，实现了红酒中 OTA 的高准确度定量分析，即使它展现出完全不同的基质特性。

该方法应用每个  $^{13}\text{C}$  标记内标增加的成本从 HT-2 和 T-2 毒素内标的 0.02 欧元到  $\text{FB}_2$  内标的 0.48 欧元不等，对于所有 11 个内标，每个样品总的追加费用少于 3.80 欧元。原始和  $^{13}\text{C}$  标记的毒枝菌素可以从罗默实验室诊断股份有限公司（图尔恩，奥地利）的 LC/MS 毒枝菌素试剂盒（部件号 KIT-001）中获得。购买该试剂盒，并采用 1290/6490 联用系统，实验室可以很容易地复制该方法，仅需应用列出的同样的分析条件。

## 参考文献

1. E. Varga, *et al.*, (2012) "Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS", *Anal. Bioanal. Chem.* 402:2675–2686
2. J.W. Bennett, M. Klich, (2003) "Mycotoxins", *Clinical Microbiol Rev.*, 16:497–516
3. Commission Regulation (EC) No. 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (including amendments as of 13 November 2012)
4. Commission Recommendation No. 2013/165/EU of 27 March 2013 on the presence of T-2 and HT-2 toxin in cereals and cereal products
5. M.C Spanjer, (2011) "Mass spectrometry in multi-mycotoxin and fungal spore analysis", chapter 4. In: S. De Saeger (ed) "Determining mycotoxins and mycotoxigenic fungi in food and feed", Woodhead Publishing, Cambridge, pp. 90–134
6. M. Sulyok, R. Krska, R. Schuhmacher, (2007) "Application of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method in multimycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects", *Food Addit. Contam.* 24:1184–1195

7. Rychlik M, Asam S (2008) Stable isotope dilution assays in mycotoxin analysis. *Anal Bioanal Chem* 390:617–628

## 更多信息

这些数据代表典型结果。有关我们的产品和服务的详细信息，请访问我们的网站：[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

[www.agilent.com/chem/cn](http://www.agilent.com/chem/cn)

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2013  
2013 年 10 月 14 日，中国印刷  
5991-2808CHCN



**Agilent Technologies**