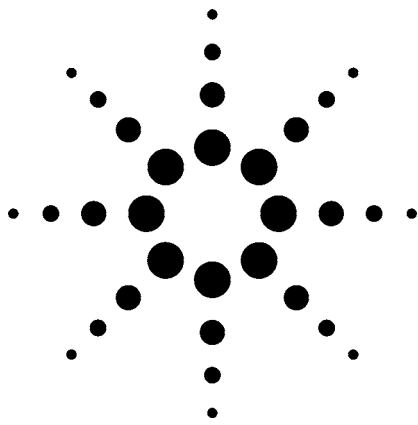


采用 LC/TOF-MS 快速分析真菌粗提物中的次级代谢产物 – 真菌鉴定的新方法



应用

食品

作者

Hamide Z. Şenyuva
Ankara Test and Analysis Laboratory
Scientific and Technological Research Council of Turkey
Ankara 06330
Turkey

John Gilbert
Central Science Laboratory
Sand Hutton
York YO41 1LZ
UK

摘要

本文开发了 LC/TOF-MS 研究真菌次级代谢产物的新方法。生长于培养基中的真菌经溶剂提取后直接进行 LC/TOF-MS 分析。通过检索对比数据库中 465 种次级代谢产物，能容易地鉴定霉菌毒素及其它感兴趣的化合物。该方法的方法学验证采用在培养基中添加 20 种霉菌毒素标准物，然后再鉴定其溶剂粗提物中的这些毒素的方法。随后，使用来自于菌种保藏机构的 7 种不同真菌在三种不同的培养基上进行 7-14 天的培养，能鉴定预测的代谢产物。

引言

从食品安全的角度考虑需要鉴定从农产品中分离出来的霉菌（真菌），因为它们可能是食品中霉菌毒素污染的潜在来源。鉴定真菌的传统方法以经典的真菌学为基础，包括真菌在不同培养基上的培养和随后依据形态学和生长行为特征进行的分类。然而，这种分类鉴定耗时且带有一定的主观性，并依赖于真菌学家的经验和技艺。此外，这种分类对实际次级代谢产物谱仅提供参考性证据，因为这些判断是以前人研究的特定种类真菌的次级代谢为基础。这种经验方法由于同种真菌既可能产生毒素又可能不产生毒素这一事实的存在而使人更加困惑，也就是说有些真菌容易产生霉菌毒素，而另外一些与其无差异的同种真菌从遗传上就不能产生毒素。因此，仅靠对真菌物种进行分类不能真正判断霉菌毒素的产生。

过去，直接分析真菌培养基以确定是否存在霉菌毒素必然包括“目标”分析，不可避免地假定能找到那种毒素，而 LC/TOF-MS 提供了一种可能的新方法用于研究真菌产生毒素的行为。即使从基质中有效提取出的毒素表现出较大的极性差别，TOF-MS 的特异性意味着不需要再进行任何样品纯化。而且，也不需要目标分析，因为仪器能测定在液相色谱分离中检测到的任何组分分子离子的精确质量数，这些组分可以通过检索数据库中相关次级代谢产物的精确质量数得以鉴定。



Agilent Technologies

本文介绍从培养真菌中提取次级代谢产物的合适条件和随后进行LC/TOF-MS分析的条件。方法学验证采用在各种培养基中添加黄曲霉毒素、赭曲霉毒素A、单端孢霉烯、玉米赤霉烯酮和腐马素毒素，从低浓度基质中提取具有良好的回收率，随后通过检索比较数据库中465种次级代谢产物进行鉴定。本方法已应用于从培养物收藏单位获得的一种青霉菌和6种曲霉菌的代谢物鉴定，其次级代谢产物已与预测的毒素谱进行了比较。

实验部分

所有分析工作均使用Agilent 6210 TOF-MS与Agilent 1200系列HPLC联用完成。霉菌毒素和其它真菌代谢物的分离也采用HPLC系统完成（包括真空脱气机、自动调温进样器、二元泵和DAD检测器），色谱柱为反相C18柱（ZORBAX Eclipse XDB 100 x 2.1 mm, 1.8 μm ）。TOF-MS配置了双喷雾器电喷雾源、可以连续导入内标参比标样。仪器的扫描范围对所有样品均为 m/z 100 ~ 1,000，扫描速度在9,429 transient/scan下为1 cycle/sec。此质量范围能够涵盖两个内标参比标样产生的离子，即 m/z 121.0508和922.0097。进样体积5 μL 。

HPLC分析使用的流动相为乙腈和2 mM的乙酸铵的1%甲酸水溶液，流速为0.3 mL/min。梯度洗脱从15%乙腈开始经20分钟增加到100%乙腈。色谱柱采用100%乙腈冲洗5 min，每次进样前平衡5 min。紫外光谱采用二极管阵列检测器获得，每0.4秒从200 nm扫描到700 nm，分辨率为4 nm。TOF-MS的优化条件列于表1。采集的数据采用具有精确质量数应用功能的Analyst-QS软件处理。465种霉菌毒素和其他真菌代谢物数据库根据参考文献数据采用Excel创建[1,2]，这样创建的文件容易用于Agilent软件的检索功能。

表1. LC/MS-TOF在ESI正离子模式下的操作条件

参数	
毛细管电压	3000 V
喷雾器压力	40 psig
干燥气	10 L/min
干燥气温度	300 °C
碰撞电压	150 V
锥孔体电压	60 V
OCT* RF	250 V
OCT* DC	37.5 V
质量范围(m/z)	100–1000
标准质量	121.050873; 922.009798

* 八极杆

真菌提取

已鉴定的*A. paraciticus* (NRRL 2999)分离菌来自USDA菌种保藏机构，分离菌*A. flavus*, (200198), *A. ochraceus* (200700)、*A. oryzae* (200828)、*A. niger* (200807)、*A. fumigatus* (200418)和*P. citrinum* (501862)来自TÜBITAK Mamara研究中心的菌种保藏部门。将真菌接种到分别装有麦芽提取物琼脂(MEA)、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)、和酵母提取物蔗糖琼脂(YES)培养基的陪替氏培养皿中。在25 °C下培养7至14天，可以在培养基表面观察到典型的真菌菌落大量繁殖生长。取样采用软木塞钻孔器垂直切下两个直径6 mm包含真菌菌丝体和其下培养基的塞状样品。将塞状样品转移至5 mL的一次性旋盖瓶中。提取条件在文献方法[3,4]的基础上进行改进。一个样品依次采用2 mL含1%甲酸的乙酸乙酯和2 mL异丙醇提取两次；另一个样品依次采用2 mL含1%甲酸的乙酸乙酯和2 mL乙腈提取两次，随后旋涡混合1 min并进行总计30 min的超声振荡。提取物过滤后用氮气吹干。两个样品的残余物溶于1 mL甲醇，超声振荡10 min，经0.2 μL 一次性过滤器过滤后用于HPLC分析。

结果与讨论

LC/TOF-MS 条件优化

最重要的仪器参数，包括毛细管电压、喷雾器压力、干燥气、气体温度和锥孔体电压最初采用自动调谐达到最大灵敏度。然而，碰撞电压也需要优化以提供更多的结构信息，因此常常需要采用折衷方案。本文在不改变其他条件的前提下，通过将碰撞电压由 55 V 逐步增大到 250 V 来进行优化。确定能够产生裂解的最小碰撞电压为 150 V。

整个过程的验证采用 20 种商品化标物（黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁ 和 G₂、黄曲霉毒素 M₁、赭曲霉毒素 A、玉米赤霉烯酮、4-脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、蛇形菌素、镰刀菌酮 X、新茄病镰刀菌烯醇、伏马菌素 B₁、B₂ 和 B₃、雪腐镰刀菌烯醇、HT-2 毒素、T-2 毒素和曲酸）和内标物（苯甲酮）混合物。采用 ESI 正离子模式，每个成分均得到质子化分子离子的精确质量数、保留时间和紫外光谱。

真菌代谢物精确质量数数据库的构建

创建一个 Excel 电子数据表，包含 465 种霉菌毒素和真菌代谢物中每种成分的精确质量数及相应的实验分子式^[1,2]。理论上化合物的单一同位素精确质量数根据其分子式使用 Excel 电子数据表（Agilent TOF 自带的，称为“分子式数据库生成器”）计算得出并转换成 csv (comma-separated values) 格式供 Agilent TOF 数据自动分析软件使用。每次样品测定完后 LC/TOF-MS 仪器自动检索 csv 文件并生成报告给出从数据库中检索到的化合物。数据分析方法是用数据分析编辑器创建的。编辑器允许选择加合物（例如，与正离子 H⁺、NH₄⁺、Na⁺ 等）和中性丢失进行自动检索，也可以进行质量精度和保留时间限度、报告选项和其它检索与测定标准。通常不需要保留时间，除非明确其可增加鉴定的可信度。

我们使用添加了 20 种霉菌毒素混合标物的各种培养基作为样品测定保留时间。反复进样 10 次以确定这些

成分保留时间的重现性。鉴定采用的标准需满足如下要求：M+1 离子精确质量数的质量精度为 ± 5 ppm；保留时间匹配为 ± 0.2 min（有标样可用）；最小峰高计数，即化合物的阈值为 1000 计数（或信噪比为 $\sim 10:1$ ，或 0.06% 相对量）；如果存在预测的成分，则应与预测的加合物和中性碎片丢失有良好的 consistency（在 ± 5 ppm 以内）。

方法验证和分析

根据上述测定标准，当在培养基中添加 25 – 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的标物时所有 20 种标物均能正确鉴定，分析按上述要求进行。

方法用于测定已鉴定真菌的代谢物

上述技术已应用于各种培养基培养的已鉴定真菌代谢物的测定，而非只是简单地通过添加培养基进行理论上的考察。一种青霉菌种和 6 种曲霉菌种在三种不同的培养基上进行培养后，使用上述简单的溶剂萃取法进行提取，粗提物直接采用 LC/TOF-MS 进行分析。图 1 所示的是 *A. flavus* 提取物的总离子流色谱图，结果表明检测到大约 20 种成分。在 8.9 min 的色谱峰进行数据库检索时采用测定的精确质量 m/z 313.0712。按 M+H⁺ 离子推算与黄曲霉毒素 B₁ 一致，与数据库中黄曲霉毒素 B₁ 的精确质量数相比，质量匹配仅差 0.2 ppm。

软件使用分子特征(MFE)算法去掉所有非真实离子峰并将真实离子分组组成“分子特征”。这些分子特征能够根据他们相互间的关系进行鉴定并推导其加合物、二聚体、三聚体及其同位素（表示为 +1、+2 等）等。将保留时间为 8.9 min 的色谱峰鉴定为黄曲霉毒素 B₁ 所依据的分子特征和各离子测定的精确质量数总结于表 2。选择一个分子特征，软件将计算其可能的实验分子式并给出预测的分子式相应的同位素组成的得分；结果列于表 2。得分为 100 的分子式就是黄曲霉毒素 B₁。随后此分子式被自动转化，采用 NIST、ChemIndex 和 Medline 进行网络连接搜索。如图 2 所示，在 NIST 中的检索结果给出黄曲霉毒素 B₁ 的分子式和结构。

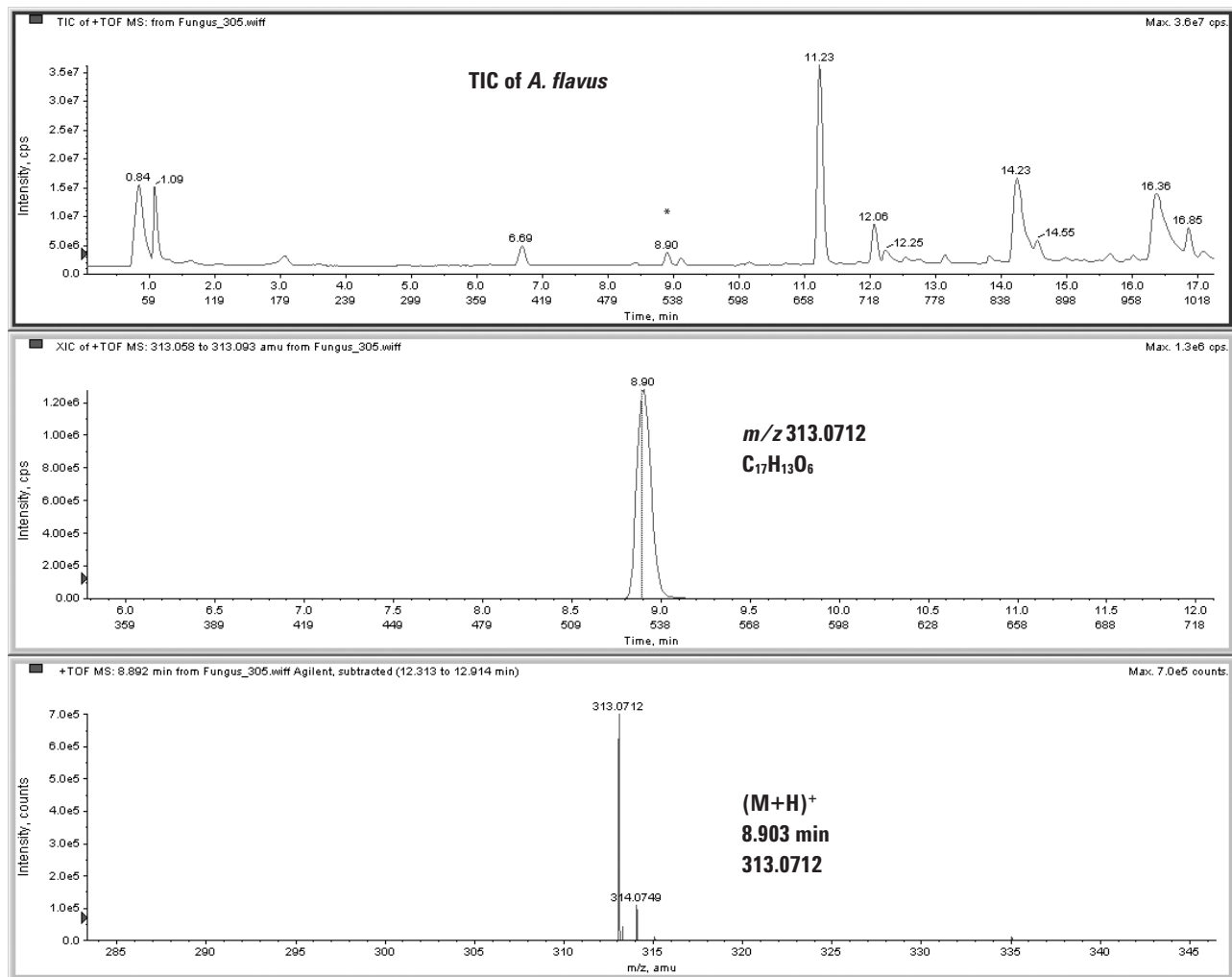


图 1. *A. flavus* 提取物的 LC/TOF-MS 分析图解说明:

- (a) 总离子流色谱图(TIC), 带 * 峰对应与黄曲霉毒素 B₁,
- (b) 针对黄曲霉毒素 B₁ 的提取离子流色谱图, 从 m/z 313.058 到 m/z 313.093;
- (c) 表明精确质量的全扫描质谱, 黄曲霉毒素 B₁ 的 M+1 离子质量误差为 0.2 ppm。

表2. 在 ESI+ LC/MS-TOF 中观察到的保留时间为 8.90 min 处的典型峰簇, m/z 313.0706

MFE


Feature #27 (RT = 8.903)

Species	RT	m/z	Mass	Abundance	Width
M	8.903		312.0633	5541933	0.088
M+H	8.903	313.0706	312.0633	4035186	0.09
M+H+1	8.903	314.0744		622147	0.088
M+H+2	8.902	315.0766		74349	0.09
M+H+3	8.906	316.0795		7943	0.085
M+Na	8.904	335.0529	312.0637	86580	0.094
M+Na+1	8.904	336.0563		15898	0.097
M+Na+2	8.916	337.0593		1848	0.091
2M+H	8.906	625.1357	312.0642	741	0.049
2M+Na	8.902	647.1164	312.0636	226965	0.061
2M+Na+1	8.902	648.1202		65639	0.063
2M+Na+2	8.900	649.1228		14941	0.065
2M+Na+3	8.899	650.1256		2677	0.058
2M+Na+4	8.897	651.1290		257	0.048

MFE

Composition's

chemical formula	dm(Da)	dm(ppm)	dm(ppm)	DBE	Score
C ₁₇ H ₁₂ O ₆	0.0001	0.2	0.2	12	100
C ₁₈ H ₈ N ₄ O ₂	0.0014	4.5	4.5	17	77
C ₁₄ H ₄ N ₁₀	-0.0013	-4.2	4.2	18	68
C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₈ S	-0.0006	-1.9	1.9	3	58
C ₁₃ H ₈ N ₆ O ₄	-0.0026	-8.4	8.4	13	55



NIST
National Institute of Standards and Technology

Standard Reference
Data Program

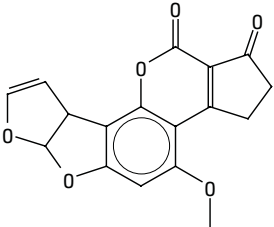
Data
Gateway

Online
Database

Chemistry
WebBook

Aflatoxin B₁

- **Formula:** C₁₇H₁₂O₆
- **Molecular weight:** 312.27
- **IUPAC International Chemical Identifier:**
 - InChI=1/C17H12O6/c1-20-10-6-11-14(8-4-5-21-17(8)22-11)15-13(10)7-2-3-9(18)12(7)16(19)23-15/h4-6,8,17H,2-3H2,1H3
- **CAS Registry Number:** 1162-65-8



- **Chemical structure:**

图2. 在 NIST 数据库中检索实验分子式的检索结果 (Medline 和 ChemIndex 数据库的检索结果相同, 此处未列出)。注意分子量不能在这些数据库中检索, 因为它们通常是“平均”分子量而非单一同位素分子量

作为 *A. flavus* 的次级代谢产物，除了鉴定黄曲霉毒素 B₁，也发现该真菌产生了黄曲霉毒素 B₂、B₃ 和 G₁，这与该真菌已知的代谢行为一致。表 3 给出 5 ppm 质量精度内数据库检索的结果，并将一些相应于其他已知化合物的精确质量数一起作为筛选结果表示出来。曲酸和甲氧基柄曲霉素匹配好，两者均为已知的真菌代谢产物，也可以预期能从 *A. flavus* 中找到。匹配好的还有肉桂酸，但不是已知的代谢物。

当将该新方法应用于从菌种保藏机构获得且在三种不同基质中培养的总计 7 种不同真菌的初步研究时，得到了表 4 所示的结果。在大多数情况下找到了预测的代谢产物，这增强了方法学的可信度。一些初步的研究结果表明没有检测到预测的霉菌毒素而发现了未预料到的代谢产物。识别错培养物的可能性或检测到以前未见报道的代谢物的可能性是存在的。虽然这说明了该方法的能力，但这些研究结果需要进一步更深入的研究。

表 3. *A. flavus* 提取物的自动霉菌毒素检索结果（提出的化合物列表按保留时间升序排列误差在 5 ppm 以内。苯甲酮用作内标）

Mass Value = 142.03					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	*Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₆ H ₆ O ₄	Kojic acid	142.03	-0.10	-0.7	-
Mass Value = 148.05					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₉ H ₈ O ₂	Cinnamic acid	148.05	-0.08	-0.5	-
Mass Value = 328.06					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₁₇ H ₁₂ O ₇	Aflatoxin G ₁	328.06	1.01	1.4	-0.05
Mass Value = 354.07					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	*Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₁₉ H ₁₄ O ₇	5-Methoxysterigmatocystin	354.07	0.99	2.8	-
Mass Value = 312.06					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	*Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₁₇ H ₁₂ O ₆	Aflatoxin B ₁	312.06	-0.05	-0.2	-0.11
Mass Value = 312.06					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	*Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Aflatoxin B ₂	314.08	0.06	0.2	0.06
Mass Value = 338.08					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	*Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₁₉ H ₁₄ O ₆	Methylsterigmatocystin	338.08	-0.16	-0.5	-
Mass Value = 182.07					
Formula	Compound	Mass	Error (mDa)	*Error (ppm)	Ret. Time Error
C ₁₃ H ₁₀ O	Benzophenone	182.07	0.73	4.0	-0.15

表 4. 在 MEA、YES 和 PDA 中培养的来自菌种保藏机构真菌的检测到和预测代谢产物的对比

代谢产物	真菌						
	<i>P. citrinum</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. paraciticus</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. ochraseus</i>
AFB1		* √	* √				
AFB2		* √	* √				
AFB3		* √	*				
AFG1		* √	* √				
AFG2		*	* √				
KA	* √	* √	* √		*	*	
MST		* √	√				
5-MST		√					√
OTA				* √			*
RO-A					√		
FU-B					* √		
MA				* √			
AA		*					√
Nig				* √			
Ter							√
Cit	*						

√ – LC/TOF-MS 检测到的代谢物；* – 预测存在的代谢物

关键词:

- | | | | |
|-------|---------------------------------|------|-------------|
| AFB1 | 黄曲霉毒素 B ₁ 等 | FU-B | 烟曲霉文乙 |
| KA | 曲酸 | MA | 畸形素 (肽类) |
| MST | 甲基杂色曲霉毒素 | AA | 曲霉酸 |
| 5-MST | 5-甲氧基杂色曲霉毒素 | Nig | Nigragillin |
| OTA | 赭曲霉毒素 A | Ter | 土曲菌酮 |
| RO-A | 酪青霉毒素 A
(isofumigaclavine A) | Cit | 桔青霉素 |

展望

将 LC/TOF-MS 的精确质量数测定与数据库检索结合使用是新的通用鉴定技术中的一个强有力的工具，能够用于目标物的分析。在真菌代谢物领域，已展现其通过一系列代谢物筛选真菌的潜力，目前尚无其它专门方法可用。本文提供了一种新的可能的用于以代谢物产生为基础的真菌分类和用于以食品安全为目的的农产品中霉菌毒素的快速筛选的方法。尽管 LC/TOF-MS 能给出一些判断，但在检测到文献未报道的代谢产物时需要采用液相色谱/四级杆 – 飞行时间串联质谱联用系统(LC/QTOF-MS)进一步进行结构推导。

结论

本文建立了一种简单快速的 LC/TOF-MS 方法用于测定各种培养条件下真菌的次级代谢产物谱。该方法通过在固体培养物中添加典型代谢物进行验证，表明具有良好的回收率且通过检索对比代谢物数据库中精确质量数进行鉴定。一系列来自菌种保藏机构的已鉴定真菌的研究结果表明预测的毒素能够很容易地被检测出来。

参考文献

1. R. J. Cole and R. H. Cox. (1981) Handbook of Toxic Fungal Metabolites, Academic Press Inc. (New York).
2. J. C. Frisvad and U. Thrane (1987) "Standardized High-Performance Liquid Chromatography of 182 Mycotoxins and Other Fungal Metabolites Based on Alkylphenone Retention Indices and UV-VIS Spectra (diode array detection)," *Journal of Chromatography A*, 404:195–214.
3. J. Smedsgaard (1997) "Micro-Scale Extraction Procedure for Standardized Screening of Fungal Metabolite Production in Cultures," *Journal of Chromatography A*, 760: 264–270.
4. J. Stroka, M. Petz, U. Joerissen, and E. Anklam, (1999) "Investigation of Various Extractants for the Analysis of Aflatoxin B₁ in Different Food and Feed Matrices," *Food Additives & Contaminants*, 16: 331–338.

更多信息

欲了解本公司产品和服务的更多信息，请访问本公司网站：www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本材料中的错误与设备、性能或本品的使用有关的意外伤害或由此造成的损坏不负任何责任。

本文中的信息，说明和指标，如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司。2007

2007年7月中国印刷
5989-6820CHCN