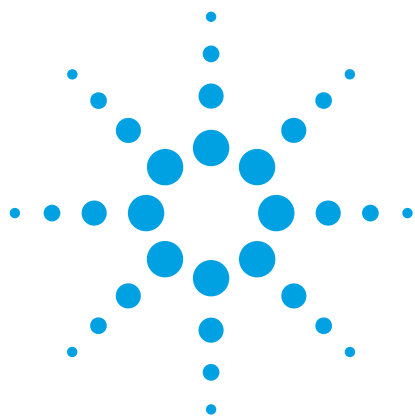




# 采用不同的样品制备方法对小麦中的单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮进行 LC/MS/MS 分析

## 应用报告

食品检测和农业

### 作者

Nick Byrd 和 Danielle Sweeney  
Campden BRI  
Gloucestershire  
英国

Thomas Glauner  
安捷伦科技有限公司  
Waldbronn  
德国

### 摘要

采用改良型 QuEChERS 和 Agilent Bond Elut Mycotoxin SPE 样品处理方法并通过 LC/MS/MS 检测单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮，获得了极佳的检测灵敏度。Bond Elut mycotoxin SPE 小柱的吸附容量高，所得的萃取物更纯净，同时检测限（LOD）和定量限（LOQ）也略有改善。当然，QuEChERS 方法经过改进后，处理速度相比以往有很大提高，所需溶剂和吸附剂量也更少。对于所有测定的真菌毒素而言，两种样品制备方法均展示了良好的线性（ $R^2 \geq 0.995$ ）。与免疫吸附这种被广泛认同的高效真菌毒素样品净化技术相比，本法测定加标小麦样品（50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ， $n = 9$ ）的回收率范围为 72-105%（ $\text{CV} \leq 11\%$ ）。本文采用了两种样品制备方法，并结合高性能的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统，不仅降低了分析成本，而且所得数据的灵敏性也符合监管方法的要求。



**Agilent Technologies**

前言

真菌毒素是一类由某些霉菌产生的有毒次级代谢产物。其中镰刀菌属尤为重要，因为它们主要广泛存在于温带地区生长的小麦、玉米、大麦和燕麦等谷粮中。一旦感染，往往会使农作物减产。根据感染品种的不同，可能会产生一系列被称作单端孢霉烯的真菌毒素。现在我们已知的单端孢霉烯毒素有 150 多种。调查显示最常见的单端孢霉烯毒素为脱氧雪腐镰刀菌烯醇，但诸如雪腐镰刀菌烯醇、镰刀菌烯酮-X、新茄镰孢菌醇、3- 和 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇、二乙酸蔗草镰刀菌烯醇（DAS）、T-2 毒素和 HT-2 毒素等其它单端孢霉烯毒素也有发现。它们均属于 A 型或 B 型单端孢霉烯毒素，且具有相同的基本化学结构。玉米赤霉烯酮不属于单端孢霉烯毒素，但是它也可由多种镰刀菌产生。

一旦摄食了单端孢霉烯毒素，动物和人类的健康就会受到威胁。他们会表现出厌食、皮肤肿痛、呕吐和腹泻等中毒症状。这类化合物也是潜在的蛋白质和 DNA 合成抑制剂，具有免疫抑制活性。欧盟委员会条例 No 1881/2006 规定了未加工和已加工的谷类粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的最大限量。后者的限量比原料规定的限量低。我们通过化学残留分析来执行这些限量规定。过去已成功利用配有电子捕获检测器或质谱检测器的气相色谱法，检测和定量了经衍生处理的样品提取物中的 A 型和 B 型单端孢霉烯毒素。最近我们又开发了采用 LC/MS/MS 同时测定 A 型和 B 型单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮的方法。

本文对小麦中 9 种单端孢霉烯毒素及玉米赤霉烯酮进行 LC/MS/MS 测定时采用的两种样品制备方法的性能进行了比较。

方法和结果

样品制备过程中采用了改进的 QuEChERS 萃取法及分散 SPE 法（d-SPE），或者使用 Bond Elut Mycotoxin SPE 小柱进行的乙腈/水萃取法（表 1）。

表 1. 在分析单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮时，采用改进的 QuEChERS 和 Bond Elut Mycotoxin SPE 方法进行样品制备的步骤

| 改进的 QuEChERS 方法                                      | Bond Elut Mycotoxin SPE 方法                           |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 5 g 研细样品                                             | 25 g 研细样品                                            |
| 1. 10 mL MeOH: ACN (85 : 15)                         | 1. 100 mL H <sub>2</sub> O: ACN (20 : 80)            |
| 2. 4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl                  | 2. 振荡 1 h                                            |
| 3. 振荡并离心                                             |                                                      |
| 取 2 mL 样品                                            | 取 8 mL 样品                                            |
| 1. 300 mg MgSO <sub>4</sub> + 100 mg PSA             | 1. Bond Elut Mycotoxin                               |
| 2. 涡旋，用 0.02 μm 滤膜过滤                                 | 2. 挥干溶剂，并用 1 mL H <sub>2</sub> O: ACN (80 : 20) 溶液复溶 |
| 3. 挥干溶剂，并用 1 mL H <sub>2</sub> O: ACN (80 : 20) 溶液复溶 | 3. 用 0.02 μm 滤膜过滤                                    |

改进的 QuEChERS 方法

向每个装有研细样品的试管中加入甲醇/乙腈溶剂，涡旋。再加入含有 4 g MgSO<sub>4</sub> 和 1 g NaCl 的 Agilent Bond Elut 无缓冲盐萃取试剂盒（部件号 5982-5550）。剧烈振荡试管，并离心。

取适量上清液转移至预先装有 PSA/MgSO<sub>4</sub>（质量比为 1 : 3）的试管中。

如果所取的上清液为 2 mL，则称取 300 mg MgSO<sub>4</sub> 和 100 mg PSA 手工制备 2 mL 空白管。之后将样品体积减小到 1 mL，使用装有 150 mg MgSO<sub>4</sub> 和 50 mg PSA 的 Bond Elut d-SPE 萃取管（部件号 5982-5022）进行操作。

Bond Elut Mycotoxin SPE 方法

在第二种样品制备方案中，我们使用了 Bond Elut Mycotoxin SPE 小柱，500 mg，3 mL（部件号 12102167）。首先将等分提取样品流经 SPE 小柱，然后收集洗脱液并浓缩。SPE 方法根据其非保留 SPE（净化剂）机理，可用于清除样品中可能干扰 ESI-MS/MS 检测的基质组分。

## 操作条件

### HPLC 条件

|      |                                                                                |
|------|--------------------------------------------------------------------------------|
| 色谱柱  | Agilent ZORBAX 快速分离高通量 Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959764-902) |
| 仪器   | Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统, Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统                         |
| 流速   | 0.25 mL/min                                                                    |
| 柱温   | 30 °C                                                                          |
| 进样体积 | 10 μL                                                                          |
| 流动相  | A: 水 + 0.2% 乙酸, 5 mM 乙酸铵<br>B: 甲醇 + 0.2% 乙酸, 5 mM 乙酸铵                          |

### MS/MS 条件

表 2 为安捷伦喷射流参数, 表 3 为 MS 条件。使用 MassHunter Optimizer 软件对 MRM transitions 和条件进行优化。根据分析中的流动相条件和流速来优化安捷伦喷射流参数。

表 2. 安捷伦喷射流参数

已设置安捷伦喷射流参数的 ESI, 可进行正/负离子的快速极性切换

|           |            |
|-----------|------------|
| 干燥气温度     | 200 °C     |
| 干燥气流量     | 8 L/min    |
| 雾化器压力     | 45 psi     |
| 鞘气温度      | 400 °C     |
| 鞘气流速      | 12 L/min   |
| 毛细管电压     | ± 3000 V   |
| 喷嘴电压      | ± 500 V    |
| Delta EMV | 500 V      |
| 分辨率       | Unit, unit |

表 3. 单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮的 MS 分析条件

| 真菌毒素             | 母离子 | 子离子 | 碎裂电压 | 碰撞能量 | 极性  |
|------------------|-----|-----|------|------|-----|
| 15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 | 356 | 321 | 95   | 5    | 正离子 |
| 15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 | 356 | 137 | 95   | 8    | 正离子 |
| 15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 | 339 | 137 | 105  | 12   | 正离子 |
| 3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇  | 397 | 337 | 95   | 4    | 负离子 |
| 3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇  | 397 | 59  | 95   | 20   | 负离子 |
| 二乙酸蔗草镰刀菌烯醇 (DAS) | 384 | 307 | 105  | 4    | 正离子 |
| 二乙酸蔗草镰刀菌烯醇 (DAS) | 384 | 247 | 105  | 6    | 正离子 |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)  | 355 | 265 | 95   | 4    | 负离子 |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)  | 355 | 59  | 95   | 20   | 负离子 |
| 镰刀菌烯酮-X          | 413 | 263 | 95   | 8    | 负离子 |
| 镰刀菌烯酮-X          | 413 | 59  | 95   | 28   | 负离子 |
| HT-2 毒素          | 442 | 263 | 105  | 4    | 正离子 |
| HT-2 毒素          | 442 | 215 | 105  | 4    | 正离子 |
| 新茄镰孢菌醇           | 400 | 215 | 95   | 16   | 正离子 |
| 新茄镰孢菌醇           | 400 | 185 | 95   | 16   | 正离子 |
| 雪腐镰刀菌烯醇          | 371 | 311 | 108  | 4    | 负离子 |
| 雪腐镰刀菌烯醇          | 371 | 281 | 108  | 8    | 负离子 |
| 雪腐镰刀菌烯醇          | 371 | 59  | 108  | 24   | 负离子 |
| T-2 毒素           | 484 | 215 | 120  | 16   | 正离子 |
| T-2 毒素           | 484 | 185 | 120  | 14   | 正离子 |
| 玉米赤霉烯酮           | 317 | 175 | 190  | 16   | 负离子 |
| 玉米赤霉烯酮           | 317 | 131 | 190  | 24   | 负离子 |
| 玉米赤霉酮            | 319 | 275 | 185  | 16   | 负离子 |
| 玉米赤霉酮            | 319 | 205 | 185  | 16   | 负离子 |

本方法采用快速连续的极性切换，在检测灵敏度最高的电离模式下完成每种真菌毒素的测量。该方法可采用配有或未配有时间分割的静态 MRM 检测，也可采用动态 MRM 检测。当采用保留时间窗为 1 min、循环时间为 500 ms 的动态 MRM 时，同时监测的

MRM 通道最多为 12 个，其最小驻留时间为 31.5 ms，最大驻留时间为 246.5 ms。500 ms 的循环时间要求每个色谱峰至少要包含 20 个数据点，以保证准确定量。图 1 为分析加标 50 ppb 真菌毒素小麦基质的色谱图。

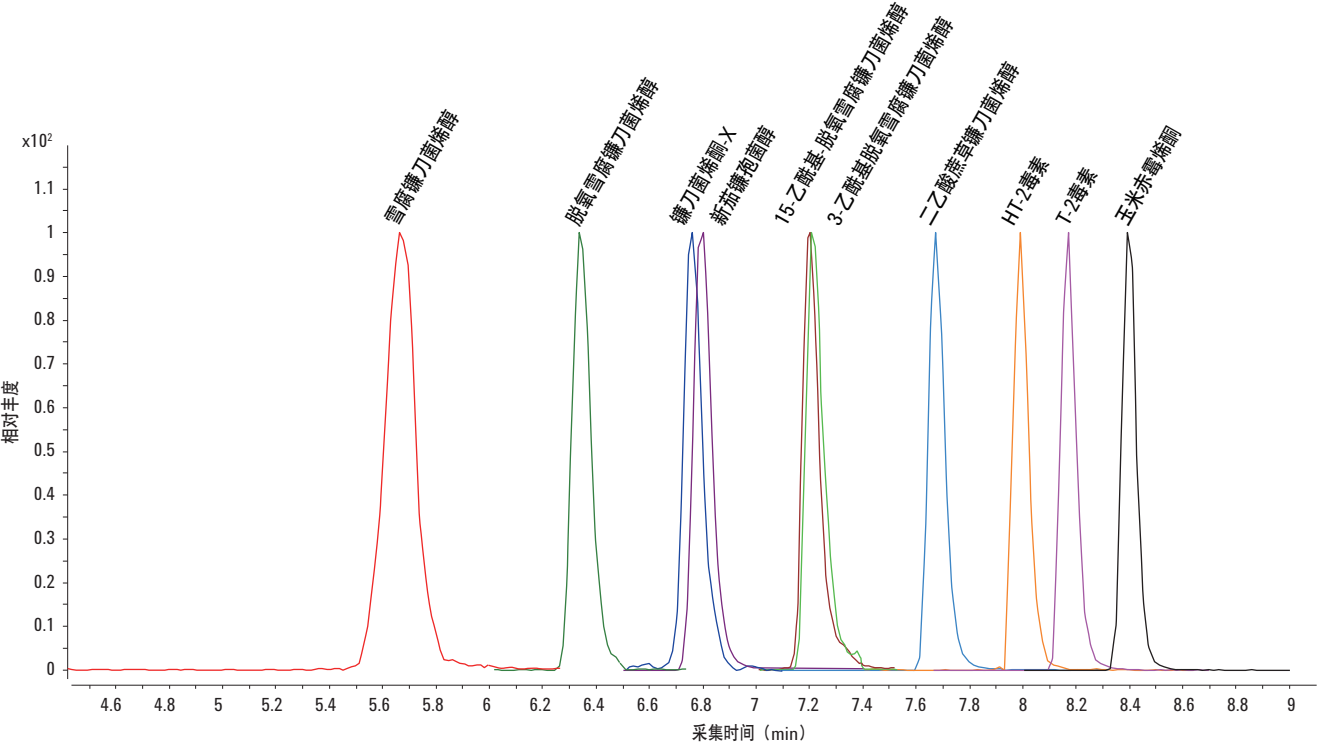


图 1. 50 ppb 小麦基质标准品：一级转换离子的标准色谱图。请注意该方法不需要对同分异构体 15-乙酰基 DON 和 3-乙酰基 DON 进行色谱分离，因为它们是通过不同的质谱极性分析进行区分的

图 2 显示了通过测定基质匹配的校准标准溶液得到的 3 种所选真菌毒素的校准曲线及其对应的色谱图。

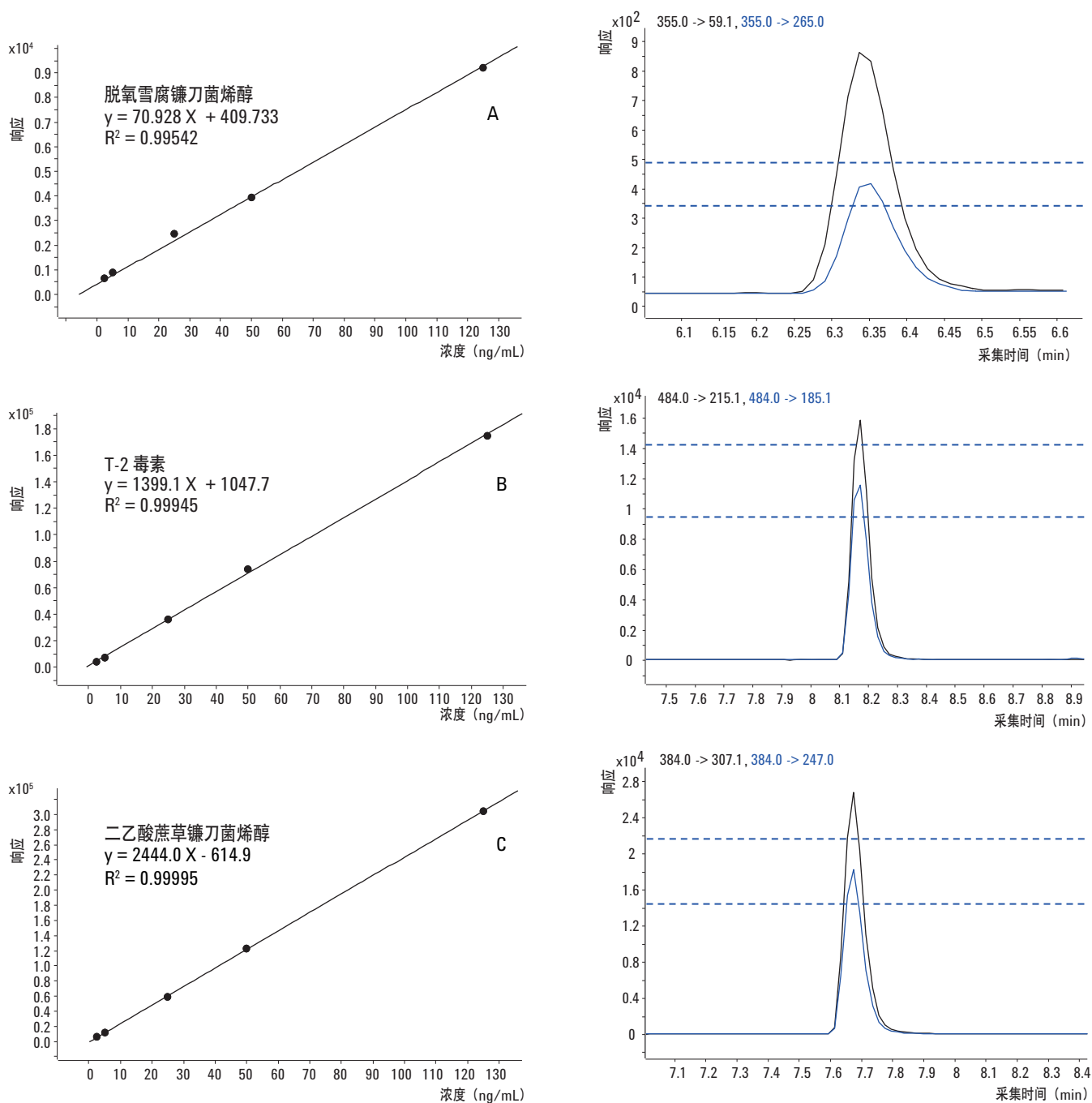


图 2. 校准曲线及其对应的色谱图。(A) 脱氧雪腐镰刀菌烯醇, (B) T-2 毒素, (C) 二乙酸蔗草镰刀菌烯醇

所有真菌毒素均具有良好的线性 ( $R^2 \geq 0.995$ )，对所有化合物和两种样品制备方法 (表 4) 而言，加标的小麦样品 ( $50 \mu\text{g/kg}$ ， $n = 9$ ) 的回收率范围为 72-105% ( $CV \leq 11\%$ )。

两种样品制备技术使所有分析物均实现了极佳的检测灵敏度，然而 BE Mycotoxin SPE 小柱具有更高的吸附容量，使提取物净化

更彻底，并可些许改善 LOD ( $S/N > 3$ ) 和 LOQ ( $S/N > 10$ )。对于所有真菌毒素而言，采用改进的 QuEChERS 方法提取的最终提取物的 LOQ 范围为  $0.003 \mu\text{g/kg}$  (二乙酸蔗草镰刀菌烯醇) 到  $1.04 \mu\text{g/kg}$  (雪腐镰刀菌烯醇)，采用 BE Mycotoxin SPE 方法的 LOQ 范围为  $0.002 \mu\text{g/kg}$  (二乙酸蔗草镰刀菌烯醇) 到  $0.66 \mu\text{g/kg}$  (15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇) (表 5)。

表 4. 比较采用改进的 QuEChERS 和套装 SPE 两种方法处理的  $50 \mu\text{g/kg}$  ( $n = 9$ ) 加标小麦样品的回收率数据

| 分析物             | 分析物保留时间 (min) | 改进的 QuEChERS<br>回收率 (%) | 改进的 QuEChERS<br>RSD (%) | BE Mycotoxin SPE<br>回收率 (%) | BE Mycotoxin SPE<br>RSD (%) |
|-----------------|---------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 雪腐镰刀菌烯醇         | 5.6           | 73                      | 7                       | 93                          | 11                          |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇       | 6.4           | 85                      | 8                       | 84                          | 11                          |
| 镰刀菌烯酮-X         | 6.8           | 81                      | 9                       | 89                          | 9                           |
| 新茄镰孢菌醇          | 6.8           | 94                      | 9                       | 77                          | 9                           |
| 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 | 7.2           | 88                      | 9                       | 72                          | 10                          |
| 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇  | 7.2           | 100                     | 9                       | 92                          | 11                          |
| 二乙酸蔗草镰刀菌烯醇      | 7.7           | 105                     | 2                       | 104                         | 3                           |
| HT-2            | 8.0           | 83                      | 8                       | 99                          | 4                           |
| T-2 毒素          | 8.2           | 83                      | 8                       | 100                         | 4                           |
| 玉米赤霉烯酮          | 8.4           | 87                      | 8                       | 79                          | 9                           |

表 5. 小麦样品中单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮的检测限和定量限

| 分析物             | 改进的 QuEChERS<br>LOD ( $\mu\text{g/kg}$ ) | 改进的 QuEChERS<br>LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ ) | BE Mycotoxin SPE<br>LOD ( $\mu\text{g/kg}$ ) | BE Mycotoxin SPE<br>LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ ) |
|-----------------|------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 雪腐镰刀菌烯醇         | 0.31                                     | 1.04                                     | 0.07                                         | 0.24                                         |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇       | 0.04                                     | 0.12                                     | 0.04                                         | 0.12                                         |
| 镰刀菌烯酮-X         | 0.09                                     | 0.3                                      | 0.08                                         | 0.26                                         |
| 新茄镰孢菌醇          | 0.13                                     | 0.4                                      | 0.03                                         | 0.1                                          |
| 15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 | 0.2                                      | 0.66                                     | 0.2                                          | 0.66                                         |
| 3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇  | 0.1                                      | 0.34                                     | 0.1                                          | 0.33                                         |
| 二乙酸蔗草镰刀菌烯醇      | 0.001                                    | 0.003                                    | 0.0006                                       | 0.002                                        |
| HT-2            | 0.05                                     | 0.17                                     | 0.03                                         | 0.1                                          |
| T-2 毒素          | 0.01                                     | 0.04                                     | 0.006                                        | 0.02                                         |
| 玉米赤霉烯酮          | 0.02                                     | 0.06                                     | 0.02                                         | 0.06                                         |

LOD = 检测限 ( $S/N > 3$ )，LOQ = 定量限 ( $S/N > 10$ )

## 结论

加标 9 单端孢霉烯毒素和玉米赤霉烯酮的小麦样品，浓度均为 50 µg/kg。通过与基质匹配的标准品比较计算来消除样品提取物中的离子抑制作用。改进的 QuEChERS 和 Bond Elut Mycotoxin SPE 两种方法均实现了分析物极佳的检测灵敏度。具有更高吸附容量的 Bond Elut mycotoxin SPE 操作可以更彻底地净化提取物，而检测限（LOD）和定量限（LOQ）也略有改善。两种样品制备技术的回收率范围为 72-105%。

然而，改进的 QuEChERS 方法仍有若干优势。该方法速度快、通量高、溶剂和吸附剂使用量少，从而显著降低了分析成本。

## 参考文献

1. F. Berthiller, R. Schuhmacher, G. Buttinger, and R. Krska (2005) Simultaneous determination of type A and B trichothecenes along with zearalenone by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Mycotoxin Res.*, 21(4): 237-240.
2. I. Sospedra, J. Blesa, J.M. Soriano, and J. Manes, (2010) Use of the modified quick easy cheap effective rugged and safe sample preparation approach for the simultaneous analysis of type A- and B-trichothecenes in wheat flour. *J. Chrom. A*, 1217: 1437-1440.

## 更多信息

这些数据代表了典型的结果。如需了解更多有关我们产品和服务的信息，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，2012  
2012 年 2 月 2 日，中国印刷  
5990-9107CHCN



**Agilent Technologies**