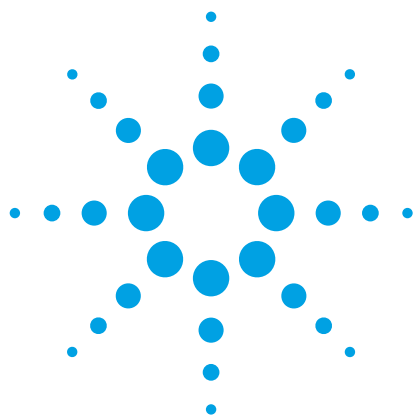




改良的 QuEChERS 与 UHPLC-ESI/三重四极杆质谱联用同时测定芝麻酱中的 26 种真菌毒素

应用简报

食品

作者

Ying Liu、Shen Han、Pei-Yue Wang、
Jing Han 和 Jin-Hua Wang
北京出入境检验检疫局检验检疫技术中心
中国北京

Meiling Lu、Shan Zhou
安捷伦科技（中国）有限公司
中国北京

摘要

本应用简报介绍了一种定量测定芝麻酱中 26 种真菌毒素的方法，该方法基于 Liu 等人发表的论文 [1]。首先使用实验室开发的改良 QuEChERS 方案对样品进行萃取和净化，然后用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统串联 Agilent 6460 三重四极杆质谱仪对所得的溶液进行分离和检测。本文开发的方法经过基质匹配外标校准，具有非常出色的线性动态范围，相关系数达到 0.995 或更高。利用该方法检测了 26 种真菌毒素，其定量限 (LOQ) 几乎均低于当前中国、欧盟及其他监管机构规定的相应最大残留水平 (MRL)。加标实验表明，大多数回收率都在 60% - 120% 的范围内，各种分析物的 RSD 均低于 15%。本研究开发的方法具有极高的灵敏度、选择性和准确度，并且具有较高的通量，适用于对实际样品中的真菌毒素进行目标物筛查。



Agilent Technologies

前言

各种农产品（包括原材料和加工后的食品）容易受到真菌毒素的污染，在适宜的气候条件下，真菌毒素主要由曲霉属、青霉属、镰刀菌属以及许多其他真菌物种分泌产生。这些真菌毒素多数都含有剧毒，甚至具有致癌性 [2,3]。目前，真菌毒素已受到许多机构的监管，尤其是在主要农产品（例如，谷物、玉米、牛奶和食用油）中 [4]。食品中真菌毒素的常规监测需要采用极其灵敏且可靠的方法。

过去十年间，高效液相色谱与质谱尤其是串联质谱的联用系统 (HPLC-MS/MS) 通过与免疫亲和净化 (IAC) 或固相萃取 (SPE) 相结合，已被应用于真菌毒素的检测中。QuEChERS 是一种更通用的萃取和净化方法，该方法已被扩展至分析一些常见食品基质（例如，小麦、面粉、谷物、葡萄酒等）中的真菌毒素 [5-7]。然而，芝麻酱作为另一种更加复杂的食品基质，尚未得到深入分析。芝麻酱主要由芝麻和花生制成，容易受到多类真菌毒素的污染，从而可能导致人类健康风险的增加。这种酱富含脂肪、碳水化合物、蛋白质和天然色素，因此很难净化。本研究的目的是通过结合通用的 QuEChERS 方法与超高效液相色谱/质谱串联系统 (UHPLC-MS/MS)，开发出一种可靠的方法，对芝麻酱中的 26 种常见真菌毒素进行高通量测定。

实验部分

材料和试剂

真菌毒素标准化合物：新茄病镰刀菌烯醇 (NEO)、呕吐毒素 (DON)、3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-ADON)、15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-ADON)、黄曲霉毒素 B1 (AFB1)、黄曲霉毒素 B2 (AFB2)、黄曲霉毒素 G1 (AFG1)、黄曲霉毒素 G2 (AFG2)、黄曲霉毒素 M1 (AFM1)、黄曲霉毒素 M2 (AFM2)、T2 毒素、HT-2 毒素、伏马菌素 B1 (FB1)、杂色曲霉素 (ST)、疣孢青霉原 (VER)、赭曲霉毒素 A (OTA) 和玉米烯酮 (ZEN) 购自 Alexis Corporation；4,5-二乙酰氧基镰草镰刀菌醇 (DAS)、镰刀菌烯酮-X (FUS-X)、脱环氧-呕吐毒素 (DOM-1)、胶霉毒素 (GLT)、烟曲霉素 (FUM)、伏马菌素 B2 (FB2)、伏马菌素 B3 (FB3)、霉酚酸 (MPA) 和蕈青霉素 (PAX) 购自 Romer Lab。一些试剂（例如甲醇、乙腈、甲酸、乙酸铵和水）为 HPLC 级。其他试剂均为分析纯级并购自本地供应商。定制的 QuEChERS 萃取（EN15662 方法）试剂盒和分散净化管均购自安捷伦科技公司。

样品萃取和净化

称取样品 (2.5 g) 加入 50 mL 离心管中，并采用两种不同的溶液依次对样品萃取 30 分钟：20 mL 含 0.1% 甲酸的 80% 乙腈水溶液和 5 mL 含 0.1% 甲酸的 20% 乙腈水溶液。在每次萃取后，均对样品瓶进行离心，并收集上清液。然后将两次收集的上清液混合在一起，并使用安捷伦 QuEChERS 萃取试剂盒（部件号 5982-5650CH）通过立即涡旋振荡 1 分钟后在 8000 rpm 下离心 5 min 以进行盐析。然后将上清液转移至洁净的样品瓶中，并使用 20 mL 正己烷进行萃取，除去脂质。将保留在下层的分析物转移至包含 150 mg C18 和 900 mg 硫酸镁的安捷伦 dSPE 净化管（部件号 5982-4956CH）中。涡旋振荡浑浊溶液 1 min，然后进行离心。将所得上清液倒入洁净的分散管中，该分散管依次用 5 mL 乙腈清洗两次。然后将流过的溶液与清洗溶液混合，并使用旋转蒸发器在 40 °C 下将其蒸干。最后，将残渣依次溶解于 1.5 mL 甲醇和 1.0 mL 水中。将得到的溶液通过 0.22 µm 滤膜，以便采用 UHPLC-MS/MS 进一步分析。

LC/MS 条件

表 1. 仪器条件

LC 条件	
仪器	内置脱气机的 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统
自动进样器	Agilent 1290 Infinity 自动进样器，带温控功能
柱温	Agilent 1290 Infinity 柱温箱
色谱柱	Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18, 2.1 × 50 mm, 1.8 µm
柱温	40 °C
流动相	A) 0.1% 甲酸（正）和纯水（负） B) 0.1% 甲酸的乙醇溶液（正）和纯甲醇（负）
流速	0.4 mL/min
进样量	3 µL
后运行时间	2 min
梯度洗脱曲线	0 – 8 min, %B 由 30% 增加至 35%; 8 – 8.5 min, %B 由 35% 增加值 50%; 8.5 – 15 min, %B 由 50% 增加至 80%（正）; 0 – 3 min, %B 保持在 10%; 3 – 3.1 min, %B 由 10% 增加至 15%; 3.1 – 4.5 min, %B 由 15% 增加至 20%; 4.5 – 8.0 min, %B 由 20% 增加至 30%; 8.0 – 8.5 min, %B 由 30% 增加至 45%; 8.5 – 14.0 min, %B 由 45% 增加至 90%（负）
ESI-MS/MS 条件	
仪器	配备安捷伦喷射流电喷雾离子源的 Agilent 6460 三重四极杆液质联用系统
干燥气温度	300 °C (+)/350 °C (-)
干燥气流速	6 L/min(+)/10 L/min (-)
雾化气压力	45 psi (±)
鞘气温度	350 °C (±)
鞘气流速	12 L/min(+)/7 L/min (-)
毛细管电压	3500 V (±)
喷嘴电压	0 (+)/2000 V (-)
扫描模式	多反应监测

结果与讨论

UHPLC-MS/MS 条件的优化

首先将标准化合物进样至质谱仪以确定 MS 采集参数，见表 2。将真菌毒素分为两组，一组在正离子化模式下进行分析，另一组在负离子化模式下进行分析。如图 1 所示，在优化的 UHPLC 条

件下，分别在正离子化模式和负离子化模式下进行分析的两组真菌毒素均得到了完全的基线分离。这一分离结果避免了分析物的相互干扰，并且还降低了基质本身的干扰效应。与必须采用折中的 HPLC 条件（流动相、梯度曲线）的极性切换方法相比，将真菌毒素分为正离子化和负离子化两组单独进行分析能够使这 26 种真菌毒素获得更高的灵敏度。

表 2. 用于检测 26 种真菌毒素的 MRM 参数

CPD	RT (min)	母离子	碎裂电压 (V)	定量离子 (CE/V)	定性离子 (CE/V)	电离模式
NEO	1.07	400.2	70	214.8(10)	185(15)	正
AFM2	2.34	331.1	140	285.1(21)	273.1(20)	正
AFG2	3.03	331.2	160	313.1(23)	245.1(30)	正
AFM1	3.33	329.1	140	273.1(23)	259.1(22)	正
AFG1	3.96	329.2	150	311.1(20)	243.1(25)	正
AFB2	5.07	315.2	160	285.1(22)	241.1(38)	正
GLT	6.09	327.1	80	263.0(4)	245.0(12)	正
AFB1	6.45	313.2	160	285.1(22)	241.1(38)	正
DAS	7.17	384.2	75	307.1(5)	228.8(10)	正
HT-2	9.97	447.2	135	345.2(14)	285.0(16)	正
FB1	10.63	722.4	180	352.3(36)	334.3(42)	正
T2	11.07	484.3	125	305.3(8)	215.2(14)	正
FB3	11.58	706.5	120	354.0(30)	336.2(40)	正
ST	11.92	325.0	150	310.0(20)	281.0(36)	正
FB2	12.28	706.5	180	336.3(38)	318.3(40)	正
FUM	13.68	459.2	75	215.0(17)	130.9(23)	正
DON	2.60	295.2	90	265.2(4)	138.1(10)	负
DOM-1	4.93	279.1	70	248.9(1)	230.9(3)	负
FUS-X	5.22	353.2	80	263.1(4)	186.9(20)	负
3-ADON	7.24	337.1	90	217.1(8)	173.1(2)	负
15-ADON	7.43	337.1	100	188.9(8)	150.2(8)	负
MPA	8.75	319.1	150	274.9(3)	242.8(22)	负
ZEN	11.72	317.1	190	175.0(25)	130.8(33)	负
OTA	12.36	402.1	120	358.0(12)	211.0(22)	负
VER	12.54	510.2	110	306.2(10)	167.2(12)	负
PAX	13.31	434.2	90	376.1(8)	358.1(12)	负

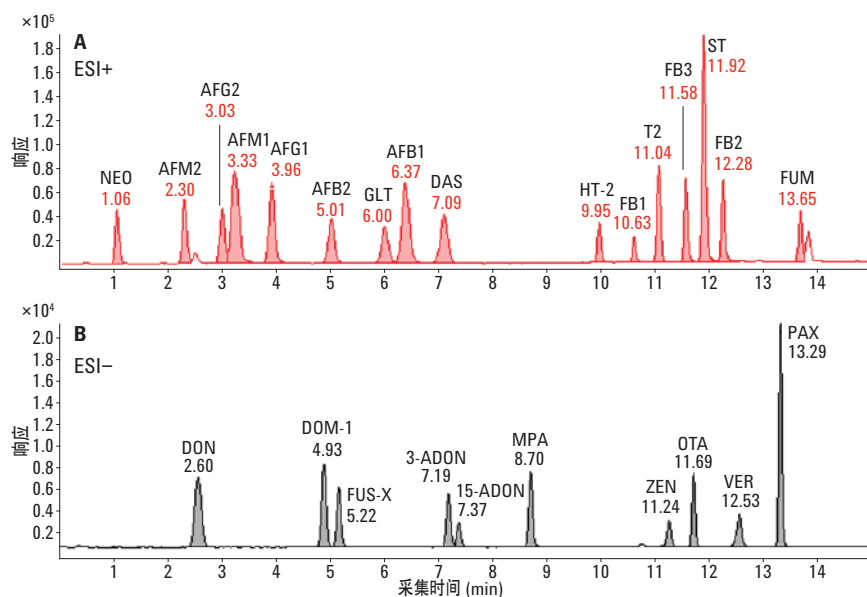


图 1. 在优化的 UHPLC-MS/MS 条件下分离两组真菌毒素。在正离子化模式下分析 16 种化合物 (A), 另外 10 种化合物在负离子化模式下进行分析 (B)

QuEChERS 萃取溶剂的选择

根据以前的报道 [8,9], 首先研究酸化的 70% 和 90% 乙腈水溶液 (溶剂 1 和 2) 对加标样品中真菌毒素的萃取效率。萃取液未经净化, 直接用于 UHPLC-MS/MS 分析。如图 2 所示, 采用溶剂 1 和溶剂 2 得到的回收率在 50% - 120% 范围内的化合物总数分别为 13 个和 14 个, 其中包括黄曲霉毒素、DAS、T2、PAX 等化合物。然而, 其他化合物的回收率均超出该范围, HT-2、ST、GLT 和 DON 尤其如此。这可能是由于这些化合物的极性存在巨大差异。因此, 为了改善萃取效率, 我们采用梯度萃取方案, 首先使用 80% 的乙腈水溶液进行萃取, 然后采用 20% 的乙腈水溶液进行萃取。使用溶剂 3、4 和 5 时, 得到的回收率在 50% - 120% 范围内的化合物数量分别为 15 个、22 个和 22 个。采用溶剂 5 时, 更多化合物的回收率将在 70% - 120% 的范围内。因此, 本文选择采用溶剂 5 的两步梯度萃取法进行萃取。

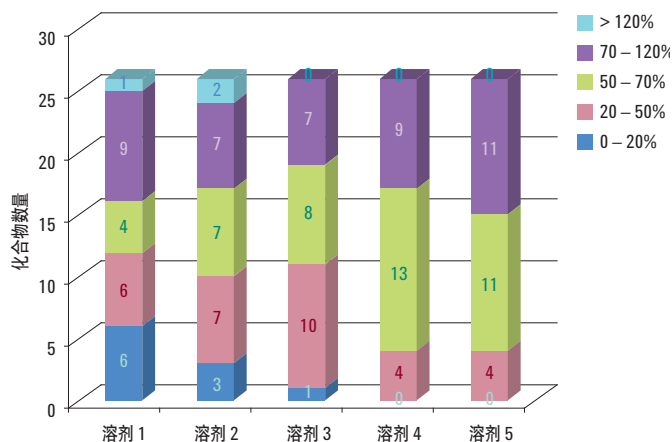


图 2. 化合物数量与使用五种不同萃取溶剂得到的指定范围内的回收率:

溶剂 1) 15 mL 70 % ACN- H_2O + 0.1 % FA

溶剂 2) 15 mL 90% ACN- H_2O + 0.1 % FA

溶剂 3) 10 mL 80 % ACN- H_2O + 5 mL 20 % ACN- H_2O + 0.1 % FA

溶剂 4) 15 mL 80 % ACN- H_2O + 5 mL 20 % ACN- H_2O + 0.1 % FA

溶剂 5) 20 mL 80 % ACN- H_2O + 5 mL 20 % ACN- H_2O + 0.1 % FA

QuEChERS 净化吸附剂的选择

由于样品主要具有脂类的性质，因此在脱脂步骤之后才能进行进一步净化。我们发现，加入 20 mL 正己烷并涡旋振荡 10 min 能够高效去除油脂。采用包含 150 mg C18 和 900 mg 硫酸镁的安捷伦 SPE 分散管以及额外加入 PSA 和 PSA/石墨化炭黑 (GCB) 组合的相同 SPE 分散管进行进一步净化。如图 3 所示，采用安捷伦定制的 C18 管时，26 种化合物中的 24 种显示出 50% - 120% 的回收率（测定值为 61.2% - 115.9%），仅 HT-2 和 ST 的回收率低于 50%。相比之下，添加 PSA 或 PSA/GCB 后显著降低了一些化合物（例如，HT-2、FB、ST、ZEN、OTA、VER、PAX 等）的回收率，全部化合物中大约有 45% 得到了合理的回收率值 (50% - 120%)（图 3）。因此，直接采用安捷伦定制的 C18 SPE 分散管对脱脂后的样品进行净化。

基质效应

采用优化的 QuEChERS 方法，我们进一步考察了基质效应是否显著，以及是否需要采用特定的校准方法进行定量分析。我们比较了空白基质和洁净溶剂中加标的标准化化合物的 MRM 响应。对于采用正离子方法的化合物，基质对 AFG2 信号的增强效应最严重，增强百分比达到 50.4%，其次是其他 AF（图 4）。此外，FB1 和 FB3 的信号分别增强了 8.5% 和 34.5%。采用正离子方法检测的

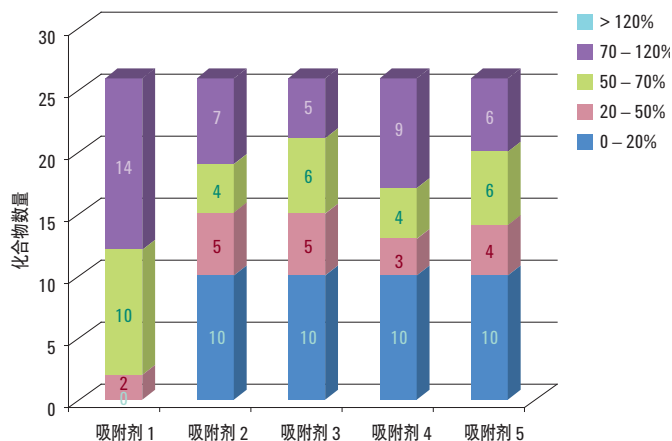


图 3. 化合物数量与使用五种不同净化吸附剂得到的指定范围内的回收率：

吸附剂 1) 150 mg C18

吸附剂 2) 150 mg C18 + 50 mg PSA

吸附剂 3) 150 mg C18 + 200 mg PSA

吸附剂 4) 150 mg C18 + 50 mg PSA + 20 mg GCB

吸附剂 5) 150 mg C18 + 200 mg PSA + 20 mg GCB

其他化合物则受到基质抑制，抑制因子的范围为 3.5% - 90.7%。在负离子方法中，90% 的化合物均受到 62.6% 或更程度的抑制，仅 OTA 受到轻微抑制 (15.4%)（图 4）。由于缺少同位素标记的标准化化合物，因此本文采用基质匹配外标校准法，避免出现定量偏差。

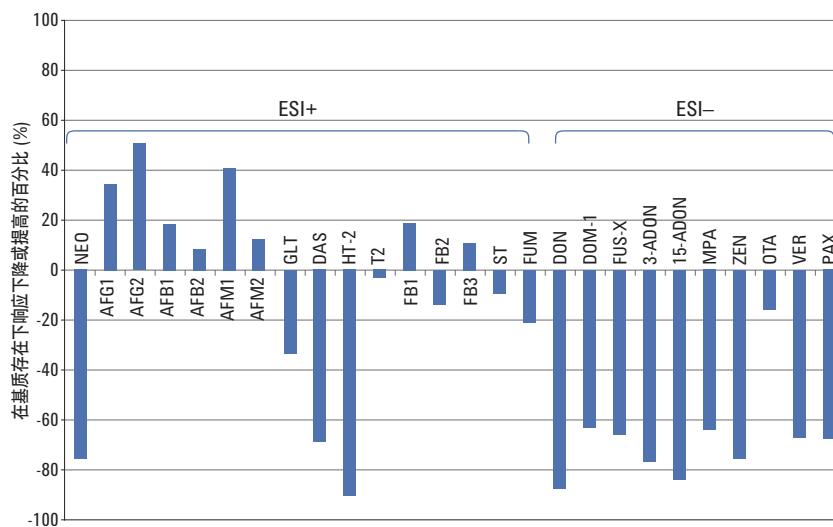


图 4. 基质存在条件下 MRM 的响应变化与在标准溶剂中 MRM 的响应变化的比较；百分比增大表明存在基质增强效应，而百分比下降则表明存在基质抑制效应

方法验证

线性

标准曲线溶液采用空白基质进行配制，其中真菌毒素的浓度分别为 0.5、1、2、5、10、25、50、100、200、300、400 和 500 ng/mL。在考察的整个浓度范围内，获得了良好的线性关系，线性回归系数 (R^2) 达到 0.995 或更高，如表 3 所示。

表 3. 方法的检测限 (LOD)、定量限 (LOQ) 和校准方程

CPD	LOD (ng/mL) 3 S/N	LOQ (ng/mL) 10 S/N	线性方程	R^2	线性范围 (ng/mL)
NEO	1.28	3.83		0.9975	5 – 500
AFM2	0.15	0.46	$Y = 380.831470x - 6148.332713$	0.9994	0.5 – 50
AFG2	0.10	0.29	$Y = 3770.076774x + 7619.686379$	0.9987	0.5 – 50
AFM1	0.05	0.14	$Y = 3389.314337x + 3604.677956$	0.9992	0.5 – 50
AFG1	0.13	0.38	$Y = 6783.627614x + 5300.422070$	0.9979	0.5 – 50
AFB2	0.14	0.41	$Y = 3327.160443x + 1200.109051$	0.9983	0.5 – 50
GLT	3.95	11.9	$Y = 5546.655580x + 4.116544$	0.9991	25 – 500
AFB1	0.07	0.21	$Y = 4916.135923x - 242.634875$	0.9991	0.5 – 50
DAS	0.08	0.24	$Y = 1108.0438858x - 8130.929299$	0.9981	5 – 500
HT-2	1.66	4.97	$Y = 2719.293653x + 41280.602530$	0.9985	5 – 500
FB1	0.23	0.70	$Y = 236.852106x - 3123.861876$	0.9992	5 – 500
T2	0.10	0.31	$Y = 2411.295594x + 70542.978660$	0.9978	5 – 500
FB3	0.17	0.50	$Y = 1174.535695x + 8046.769182$	0.9994	5 – 500
ST	0.05	0.15	$Y = 4470.085632x + 85183.182429$	0.9984	5 – 500
FB2	0.17	0.50	$Y = 4861.838810x + 80850.952376$	0.9983	5 – 500
FUM	4.32	12.9	$Y = 5608.519625x + 105839.123757$	0.9995	25 – 500
DON	6.94	20.8	$Y = 52.160185x - 819.847770$	0.9992	25 – 500
DOM-1	1.28	3.85	$Y = 373.373396x - 3825.938174$	0.9992	25 – 500
FUS-X	2.80	8.39	$Y = 128.820806x - 1564.337340$	0.9970	25 – 500
3-ADON	2.33	7.00	$Y = 179.599728x - 3510.676535$	0.9948	25 – 500
15-ADON	7.25	21.7	$Y = 30.224230x - 317.701780$	0.9992	25 – 500
MPA	1.27	3.81	$Y = 469.797341x - 3923.228345$	0.9992	25 – 500
ZEN	1.03	3.10	$Y = 414.474804x - 1603.879798$	0.9971	10 – 500
OTA	0.25	0.74	$Y = 1610.057794x + 483.939368$	0.9987	1 – 50
VER	2.92	8.77	$Y = 24.953195x - 215.639821$	0.9990	25 – 500
PAX	0.06	0.11	$Y = 863.998752x - 6907.946499$	0.9991	0.5 – 50

LOD 和 LOQ

LOD 基于最低校准浓度下采集的 MRM 色谱图以 3 倍信噪比进行计算，而 LOQ 则采用相同的色谱图以 10 倍或更高信噪比来计算。如表 3 所示，样品的 LOQ 范围为 0.11 ng/mL (PAX) 至 21.7 ng/mL (15-ADON)，其相当于样品中的浓度分别为 0.11 ng/g 和 21.7 ng/g。该方法具有极高的灵敏度，能够测量芝麻酱这类复杂食品基质中的痕量真菌毒素。

回收率和精密度

整个研究过程中均采用基质匹配外标校准方法。为验证其性能，将三种浓度的真菌毒素加标至空白基质中，并对每种浓度的样品重复进样三次。黄曲霉毒素的浓度分别设置为 2.0、4.0 和 8.0 ng/g；所有其他类别真菌毒素的加标浓度范围为 100 至 400 ng/g。对加标样品进行萃取、脱脂和净化，然后采用 UHPLC-MS/MS 方法进行分析。如图 5 所示，除了两个较高浓度下的 FB2 和 PAX 以及最低浓度下的 ST 之外，95% 样品的回收率值均在 60% - 120% 的范围内。所有 RSD 均低于 15%，大多数 RSD 值（总数中的 96%）低于 10%。这表明该方法高度可靠。

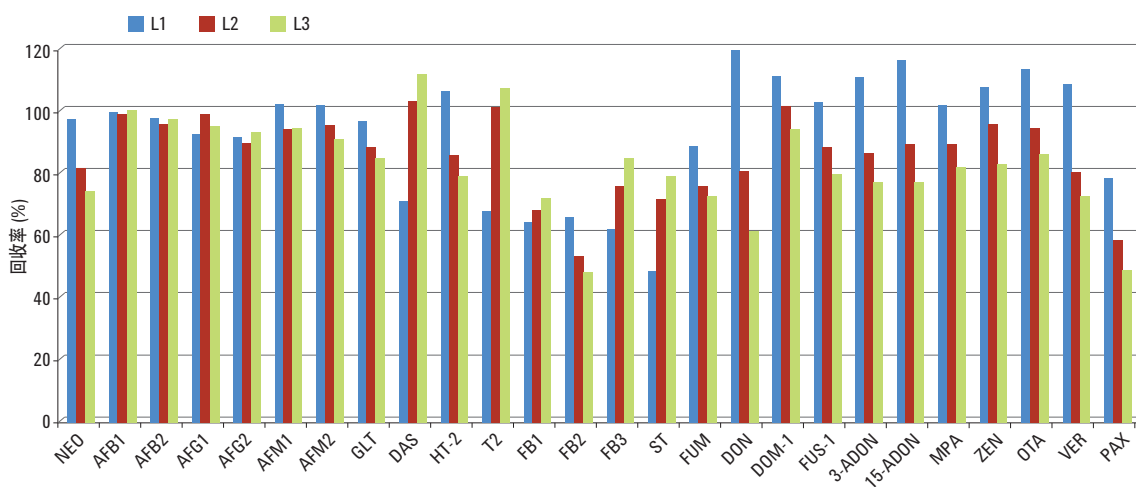


图 5. 使用基质匹配外标校准法进行定量分析，在三种不同浓度下加标至空白基质中的真菌毒素的回收率

方法应用

使用所开发的方法对 30 个样品进行筛查，这 30 个样品包括从本地杂货店随机购买的 20 种芝麻酱和 10 种花生酱。总共检出了十种真菌毒素，其中包括 AFB1、AFB2、AFG1、AFG2、FB1、FB2、FB3、ST、DON 和 OTA。各种检出的真菌毒素的测定范围如图 6 所示。图 6 中还标记了中等浓度和阳性样品的数量。在 20 种芝麻酱中，我们发现所有样品均含有 FB（FB1、FB2 和 FB3），其浓度范围为 6.8 至 29.3 ng/g；三个样品被 ST 污染，ST 的其浓度范围为 1.5 至 5.1 ng/g；还发现两个样品中含有浓度分别为 253.7 ng/g 和 3.2 ng/g 的 DON 和 OTA；四个样品被 AF（AFB1、AFB2、AFG1 和 AFG2）污染，AF 的浓度范围为 0.8 至 12.3 ng/g。在检出的 AF 中，AFB1 的浓度明显高于其他化合物 (6.6 ng/g)，并且在被黄曲霉毒素污染的样品中，其中 25% 所含的黄曲霉毒素浓度高于欧盟法规规定的 MRL [7] (B1 小于 2.0 ng/g，AF 之和小于 4.0 ng/g)。

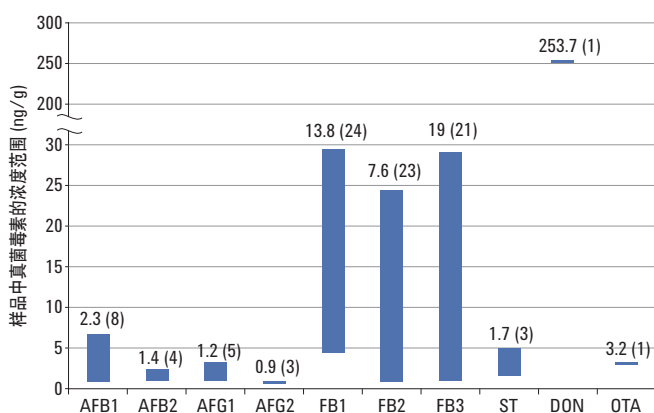


图 6. 在 30 个实际样品中检出的真菌毒素的浓度分布；每个柱状图上的数字表示浓度中值以及在所有 30 个样品中阳性样品的数量；注：计算中不包括低于 LOD 的样品

该方法还被扩展用于分析花生酱。结果发现，10 个花生酱样品全部被 AF 和 FB 污染，AF 和 FB 的浓度范围分别为 2.4 至 4.6 ng/g 和 6.9 至 20.1 ng/g。花生酱中的其他真菌毒素均低于本方法的 LOD。

上述筛查结果证明，AF 和 FB 是芝麻酱和花生酱中最常见的污染物。然而，这些真菌毒素无法通过 SPE 或 IAC 前处理进行同时分析，因为它们的化学结构和极性存在显著差异。本方法提供了一种采用 QuEChERS 的通用萃取和纯化方法，从而简化了多种真菌毒素的分析过程。

结论

本文开发了一种通用的 QuEChERS 方法，采用该方法与经过优化的 UHPLC-MS/MS 方法相结合对芝麻酱中 26 种常见的真菌毒素进行了定量分析。本研究开发的方法表明，通常情况下 LOQ 均低于当前大多数食品基质中适用的最低 MRL。该方法具有高灵敏度、高选择性、高准确度和高通量的优势，已经成功应用于芝麻酱的真菌毒素筛查中，并且还被扩展用于如花生酱等类似的食物基质。

参考文献

1. Y. Liu, *et al. J. Chromatogr. B*, **970** 68-76 (2014)
2. European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the FoodChain, *EFSA J.* **8** 1626 (2010)
3. D.L. Sudakin. *Toxicol. Lett.* **143** 97 (2003)
4. 欧盟委员会法规 (EC) No. 1881/2006
5. I. Sospedra, *et al. J. Chromatogr. A* **1217** 1437 (2010)
6. M. Zachariasovaa, *et al. Anal. Chim. Acta* **662** 51 (2010)
7. R. R. Rasmussen, *et al. Anal. Bioanal. Chem.* **397** 765 (2010)
8. M. C. Spanjer, P. M. Rensen, J. M. Scholten. *Food Addit. Contam.* **25** 472 (2008)
9. E. Varga, *et al. Anal. Bioanal. Chem.* **405** 5087 (2013)

更多信息

这些数据仅代表典型的结果。有关我们的产品与服务的详细信息，请访问我们的网站 www.agilent.com。

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

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。

本文中的信息、说明和技术指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2015

2015 年 1 月 5 日，中国出版

5991-5347CHCN



Agilent Technologies