

## 使用 Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统分析食品基质中的真菌毒素



图 1. 集成到液相色谱堆栈的 Agilent Ultivo

### 作者

Theresa Sosienski<sup>1</sup>,  
Dan-Hui Dorothy Yang<sup>1</sup>,  
Mark Sartain<sup>1</sup>,  
Christian Hegmanns<sup>2</sup>,  
Joni Stevens

<sup>1</sup>安捷伦科技有限公司  
Santa Clara, CA

<sup>2</sup>安捷伦科技有限公司  
Waldbronn, Germany

### 摘要

本应用简报介绍了一种高灵敏度和高精度方法，使用 Agilent Ultivo 三重四极杆质谱仪分析玉米和花生基质中的 12 种真菌毒素，以及黑胡椒基质中的 5 种真菌毒素。Ultivo LC/MS 专为节省实验室空间，同时保持高通量分析所需的性能而设计。所有真菌毒素均可在低于欧盟委员会法规 (EC) No. 1881/2006 和 No. 105/2010 规定的每种基质最高浓度下定量。在 Ultivo 系统上获得了优异的方法精度，最低定量限下的相对标准偏差 (%RSD) < 10%。将基质干扰净化、色谱分析和新开发的三重四极杆相结合，可灵敏、精确地检测真菌毒素。

## 前言

真菌毒素是由各种作物上生长的真菌产生的。在一定浓度和组合情况下，人类和牲畜可通过食用受污染的作物而受到真菌毒素的危害；因此，需要对食品中的真菌毒素含量进行监管，以最大程度减小摄入风险<sup>[1]</sup>。为确保有害浓度的真菌毒素不进入食品供应，监管机构已确定最高浓度 (ML)，从某些婴儿食品中的 0.1 ppb 到某些动物饲料中的 ppm 级水平。很有必要对各种食品基质中低于 ML 浓度的真菌毒素含量进行准确定量分析，因为每种基质组成都会造成不同的挑战。

[Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS](#) 专门设计用于解决环境和食品安全分析实验室所面临的众多挑战。Ultivo 采用的创新技术有助于减小其总体占用面积，同时性能可与传统系统相媲美 (图 1)。Cyclone Ion Guide 气旋离子导轨、Vortex Collision Cell 涡流碰撞室和双曲面四极杆等创新产品，能最大程度提高小体积仪器的定量分析性能。这些创新增强了仪器的可靠性和稳定性，从而延长了正常运行时间。VacShield 真空盾和轻松更换检测器组件减少了系统维护所需的时间和专业知识，使非专业质谱用户也可轻松操作和维护。Agilent MassHunter 软件套装简化了数据采集、方法设置、数据分析和报告。该软件缩短了从采集到报告的时间，从而提高了实验室分析效率和可信度。

本应用简报展示了使用新款 Ultivo 三重四极杆 LC/MS 对三种常见受监管食品中最多 12 种受监管真菌毒素进行灵敏而精确的定量分析。

## 实验部分

### 试剂与化学品

本应用中使用的所有试剂均为 HPLC 或 LC/MS 级。乙腈购自 Honeywell (Morristown, NJ, USA)，超纯水产自配有 LC-Pak Polisher 和 0.22  $\mu\text{m}$  膜式终端过滤器滤芯的 Milli-Q Integral 水纯化系统 (EMD Millipore, Billerica, MA, USA)。甲酸 (FA) 和甲酸铵购自 Fluka (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)，氟化铵购自 Aldrich (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)。化学标准品购自 Sigma-Aldrich 或 Cayman Chemical。

### 样品前处理

玉米粉、花生和黑胡椒碎购自当地杂货店。称取 5 g 玉米粉、5 g 花生碎 (在搅拌机中磨碎，冷冻待分析) 或 2 g 黑胡椒碎，置于 50 mL 聚丙烯管中，用 10 mL 乙腈和 10 mL 含 0.2% FA 的超纯水进行萃取，然后使用旋转摇床 (Heidolph Hei-MIX Multi reax, 545-10000-00) 振摇 30 分钟。将 Agilent QuEChERS EN 萃取盐 (部件号 5982-5650) 加入萃取物中，将试管再振摇 2 分钟，然后以 4500 rpm 的转速离心 5 分钟 (Sorvall Heraeus, Labofuge 400K)。使用安捷伦通用分散式固相萃取

试剂盒 (部件号 5982-0029) 对黑胡椒萃取物进行额外的净化步骤。然后，用 0.4 mL 超纯水稀释 1.6 mL 所有萃取物，并用 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱 (部件号 5190-1003) 进行净化。在分析之前，按照萃取物/超纯水 30:70 的比例对加标黑胡椒萃取液进行稀释。图 2 显示了样品前处理的流程图。

### 仪器

Agilent 1290 Infinity II UHPLC

- Agilent 1290 Infinity 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler, 配备冷却装置 (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)

Agilent Ultivo 三重四极杆液质联用系统

- 安捷伦喷射流电喷雾离子源

### 方法

表 1 汇总了 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 条件。表 2 汇总了 Ultivo 三重四极杆参数和安捷伦喷射流 ESI 离子源参数。采用正离子模式和动态多反应监测 (dMRM) 进行分析。采用具有 Quant-My-Way 功能的 Agilent MassHunter 定量分析软件 B.09 对数据进行评估。

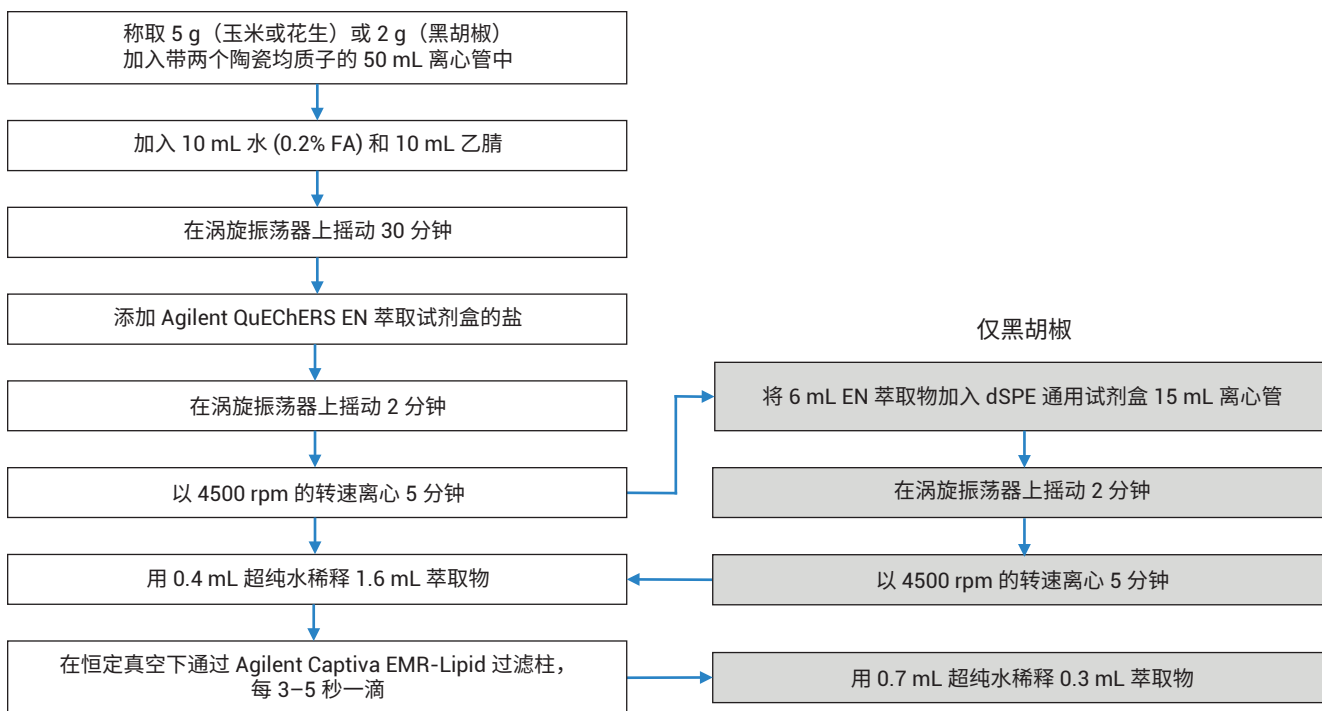


图 2. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 分析玉米、花生和黑胡椒中真菌毒素的样品前处理步骤

表 1. Agilent 1290 Infinity II UHPLC 参数

参数	值												
色谱柱	Agilent Eclipse Plus C18 3.0 × 150 mm, 1.8 μm (部件号 959759-302)												
柱温	45 °C												
进样量	2 μL 玉米、花生, 10 μL 黑胡椒												
流动相	A) 0.5 mmol/L 氟化铵 + 5 mmol/L 甲酸铵 + 0.1% 甲酸的水溶液 B) 0.5 mmol/L 氟化铵 + 5 mmol/L 甲酸铵 + 0.1% 甲酸的甲醇溶液												
流速	0.45 mL/min												
梯度	<table border="1"> <thead> <tr> <th>时间</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>0.5</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>7.5</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9.0</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>9.1</td> <td>30</td> </tr> </tbody> </table>	时间	%B	0	30	0.5	30	7.5	100	9.0	100	9.1	30
时间	%B												
0	30												
0.5	30												
7.5	100												
9.0	100												
9.1	30												
停止时间	9.1 min												
后运行时间	1.9 min												

表 2. Agilent Ultivo 三重四极杆和安捷伦喷射流离子源参数

参数	值
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	8 L/min
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	12 L/min
雾化器压力	30 psi
毛细管电压	3300 V (+)
喷嘴电压	0 V (+)
循环时间	500 ms

## 结果与讨论

### 真菌毒素最大监管浓度

真菌毒素有多种监管浓度，具体取决于特定真菌毒素、被分析基质、监管机构和目标消费者。本研究使用欧盟法规 No. 1881/2006 和 No. 105/2010 作为基准。因为与其他地区监管机构相比，欧盟规定的真菌毒素最高浓度 (ML) 通常最低。非监管化合物或不包括在基质中，或根据表 4 中确定的当前关注浓度进行估算。

表 3. dMRM 模式下真菌毒素检测的离子对

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	RT (min)	RT 窗口 (min)	碎裂电压 (V)	CE (V)	极性
黄曲霉毒素 B1 (AB1)	313.3	285.1	5.9	1	190	20	正
黄曲霉毒素 B1 (AB1)	313.3	241.1	5.9	1	190	40	正
黄曲霉毒素 B2 (AB2)	315.1	287.1	5.7	1	190	24	正
黄曲霉毒素 B2 (AB2)	315.1	259.1	5.7	1	190	28	正
黄曲霉毒素 G1 (AG1)	329.1	311.1	5.3	1	180	20	正
黄曲霉毒素 G1 (AG1)	329.1	243.1	5.3	1	180	28	正
黄曲霉毒素 G2 (AG2)	331.1	313.1	5.1	1	190	24	正
黄曲霉毒素 G2 (AG2)	331.1	115	5.1	1	190	80	正
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)	297.1	249.2	3.0	1	120	4	正
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)	297.1	77	3.0	1	120	80	正
伏马菌素 B1 (FB1)	722.4	352.3	6.6	1	240	36	正
伏马菌素 B1 (FB1)	722.4	334.3	6.6	1	240	40	正
伏马菌素 B2 (FB2)	706.4	336.3	7.4	1	240	36	正
伏马菌素 B2 (FB2)	706.4	318.4	7.4	1	240	40	正
伏马菌素 B3 (FB3)	706.4	336.3	7.0	1	240	36	正
伏马菌素 B3 (FB3)	706.4	318.4	7.0	1	240	36	正
HT-2 毒素 (HT-2)	442.2	263.2	6.8	1	120	4	正
HT-2 毒素 (HT-2)	442.2	215.1	6.8	1	120	4	正
赭曲霉毒素 A (OTA)	404.1	239	7.6	1	140	20	正
赭曲霉毒素 A (OTA)	404.1	221	7.6	1	140	36	正
T-2 毒素 (T-2)	484.2	215.2	7.3	1	140	12	正
T-2 毒素 (T-2)	484.2	185.1	7.3	1	140	4	正
玉米赤霉烯酮 (ZEA)	319.2	301.2	7.7	1	120	4	正
玉米赤霉烯酮 (ZEA)	319.2	185.1	7.7	1	120	24	正

表 4. 本研究中真菌毒素的 ML。采用欧盟法规指令 No. 1881/2006 和 No. 105/2010 作为对照。本研究中所有的规定 ML 均小于等于 EU ML

真菌毒素	欧盟真菌毒素 ML <sup>[2,3]</sup>			本研究使用的指定 ML	
	玉米 (ppb)	花生 (ppb)	黑胡椒 (ppb)	玉米和花生 (ppb)	黑胡椒 (ppb)
黄曲霉毒素 B1	2	2	5	2	5
黄曲霉毒素 B2	黄曲霉毒素总和: 4 ppb	黄曲霉毒素总和: 4 ppb	黄曲霉毒素总和: 10 ppb	2	5
黄曲霉毒素 G1				2	5
黄曲霉毒素 G2				2	5
赭曲霉毒素 A	3	无	15	3	15
伏马菌素 B1	B1 和 B2 总和: 1000 ppb	无	无	500	不包含
伏马菌素 B2			无	500	不包含
伏马菌素 B3	无	无	无	500	不包含
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	750	无	无	75	不包含
玉米赤霉烯酮	100	无	无	100	不包含
T-2 毒素	无	无	无	100	不包含
HT-2 毒素	无	无	无	500	不包含

## 方法回收率

该方法的萃取流程简单高效。Agilent Captiva EMR-Lipid 试剂盒提供一个快速步骤，可将基质组分与目标化合物完全分离。该方法证明了每种基质中所有化合物都有良好回收率，每种化合物在 ML 下的回收率均达到 60%–110% (表 5)。

表 5. 研究玉米、花生和黑胡椒基质中 ML 下的每种真菌毒素的回收率 (%). 在 1/2 ML 下评估伏马菌素化合物

真菌毒素	真菌毒素回收率 (%)		
	玉米	花生	黑胡椒
黄曲霉毒素 B1	107	105	90
黄曲霉毒素 B2	110	109	97
黄曲霉毒素 G1	109	108	102
黄曲霉毒素 G2	110	96	104
赭曲霉毒素 A	83	83	109
伏马菌素 B1	60	65	-
伏马菌素 B2	67	77	-
伏马菌素 B3	90	61	-
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	111	72	-
玉米赤霉烯酮	98	90	-
T-2 毒素	105	104	-
HT-2 毒素	108	102	-

## 方法灵敏度

图 3 显示了使用本方法分析的 12 种真菌毒素具有优异的信号响应，展示了玉米基质中在 ML 下的色谱图。评估了浓度范围从指定 ML 的 1/20 到指定 ML 10 倍的真菌毒素标准品。将八种浓度加标至基质萃取物中，进行定量限 (LOQ) 和 %RSD

分析。信号响应的增强可使每种基质中的大多数真菌毒素达到指定 ML 1/20 的定量限。图 4 显示所有真菌毒素的 LOQ 至少为指定 ML 的 1/5。LOQ 定义为六次重复进样中有四次精度为 80%–120%，信噪比 (S/N) 大于 10。

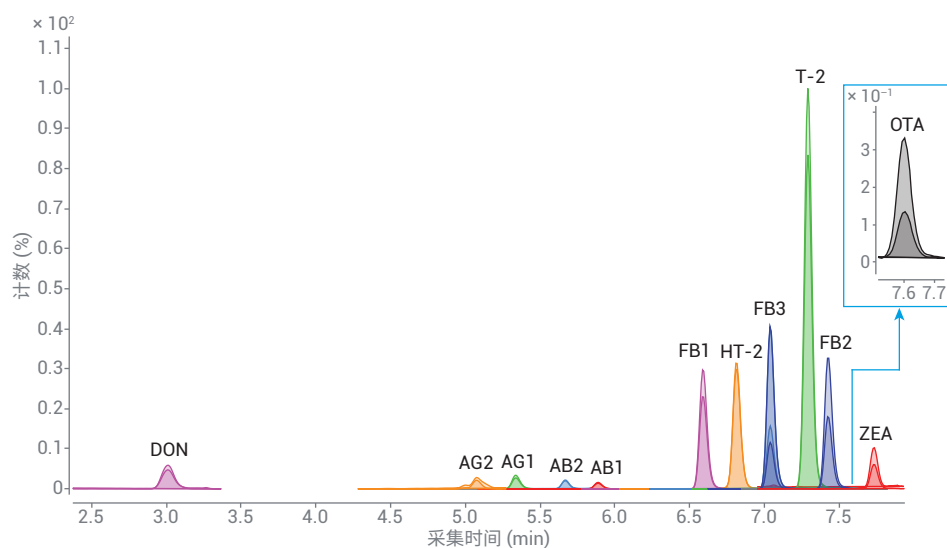


图 3. 玉米基质中指定 ML 下真菌毒素的复合 dMRM 色谱图

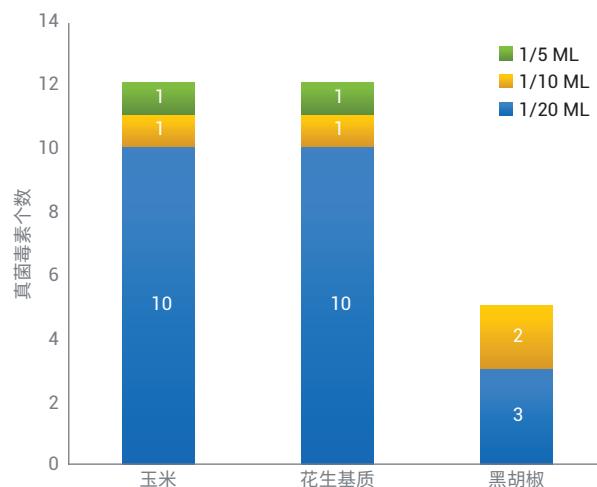


图 4. 每种基质中研究的所有真菌毒素的 LOQ。所有真菌毒素都可以在指定 ML 的几分之一下得到准确定量

## 方法精度和线性

在每种基质中研究的所有化合物均获得了出色的精度。图 5 显示了在每种基质中的 LOQ 下六次重复进样的真菌毒素 %RSD。所有化合物在每种基质中的 %RSD 均小于 10%，多数化合物的 %RSD 小于 5%。在玉米和花生基质中以 200 ppt、在黑胡椒基质中以 500 ppt 重复进样黄曲霉毒素 B1（相当于低于 ML 的 10 倍）的放大视图中，突出显示了该方法的出色精度（图 6）。

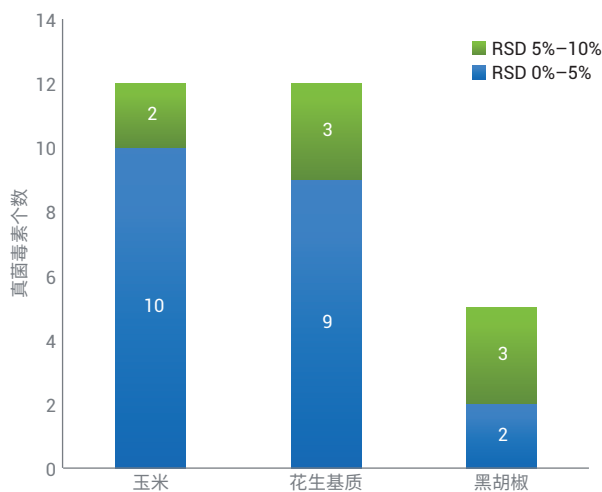


图 5. 真菌毒素在所有三种基质中均获得了优异的精度，LOQ 下所有 %RSD < 10%

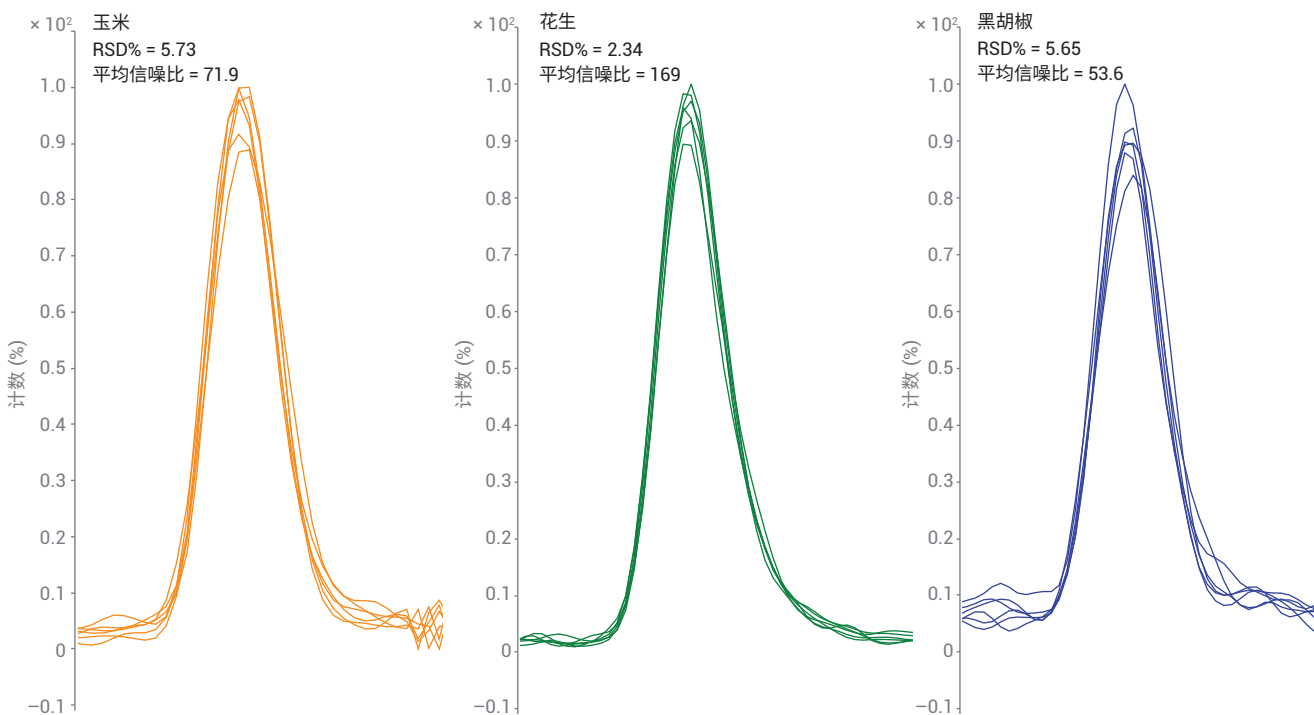


图 6. 所有基质中浓度为 ML 1/10 的黄曲霉毒素 B1（200 ppt 或 500 ppt）的六次重复进样，表现出优异精度

所有化合物均表现出优异的线性。对每种化合物分析六至八个校准浓度，范围为 ML 的 1/20 至 10 倍，结果证明所有基质中所有化合物的  $R^2$  值  $\geq 0.99$ 。图 7 展示了花生基质中六种选定化合物优异线性的示例。

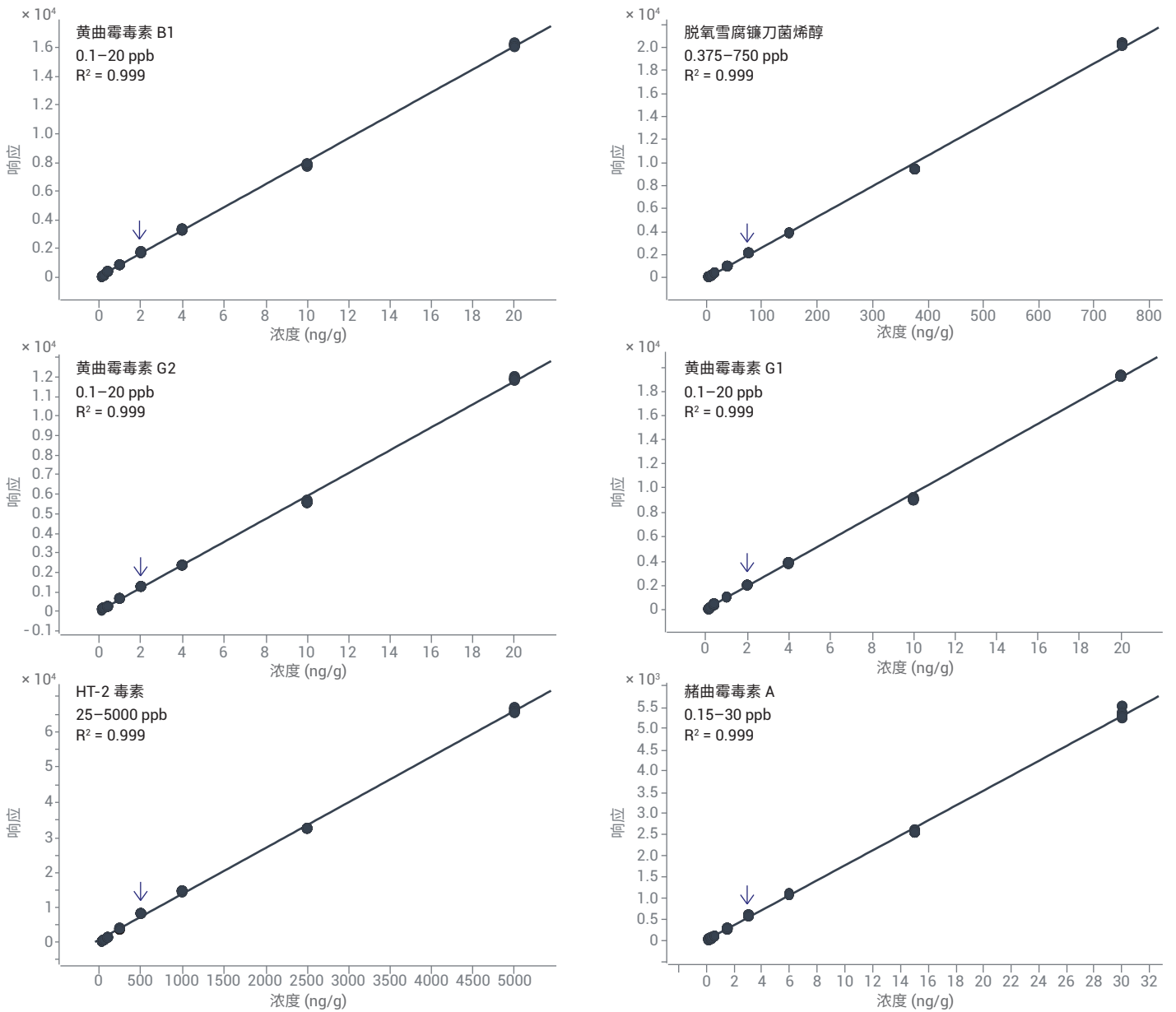


图 7. 花生基质中选定化合物的校准曲线。线性拟合，无需加权。箭头表示 ML

## 结论

Agilent Ultivo 三重四极杆 LC/MS 是一款创新质谱仪，可以最大程度降低对实验室工作空间的需求，还可减少维护挑战，使高通量实验室获得高效工作环境。Ultivo 是一款体积小而功能强大的工具，能够对多种食品基质中远低于规定 ML 的常见受监管真菌毒素进行准确而灵敏的检测。Agilent MassHunter 软件提供了一种采集和报告 LC/MS 数据简便易用的一体式工具。

## 参考文献

1. Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews* **2003**, 16(3), 497-516.2003
2. Commission Regulation (EC) No 1881/2006. Setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 19 December **2006**, L 364/5-24
3. Commission Regulation (EU) No 105/2010. Amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards ochratoxin A. *Official Journal of the European Union*, 5 February **2010**, L 35/7-8
4. Determination of Mycotoxins in Peanuts with Enhanced Matrix Removal—Lipid by LC/MS/MS (利用增强型脂质去除产品 EMR-Lipid 对花生中的真菌毒素进行 LC/MS/MS 测定)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-7381

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://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](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

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

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

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 (中国) 有限公司, 2019  
2019 年 7 月 2 日, 中国出版  
5991-8962ZHCN