

# 干玉米粒和大豆中多类别多组分 真菌毒素的测定

使用 Agilent Captiva EMR 真菌毒素通过式净化和  
LC/MS/MS 检测

## 作者

Limian Zhao 和 Hui Zhao  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

本应用简报介绍了用于分析干玉米粒和大豆中多类别多组分真菌毒素的方法的开发和验证。该方法采用 QuEChERS 萃取，然后使用 Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱进行增强型脂质去除 (EMR) 混合模式通过式净化，最后进行 LC/MS/MS 检测。该方法的样品前处理过程简单、高效，且 LC/MS/MS 检测灵敏度出色。Captiva EMR 真菌毒素小柱专门针对有籽干饲料和其他复杂加工食品基质中的真菌毒素分析进行开发和优化。将该方法与传统溶剂萃取方法和另一种用于多类别多组分真菌毒素分析的商业化工作流程进行了比较。

## 前言

真菌毒素是由多种真菌产生的有毒化合物，无论是在农作物生长过程中还是储存期间，许多农产品以及加工食品和饲料上都可能生长这些真菌<sup>[1]</sup>。食用被真菌毒素污染的食物或饲料可能引起严重的公共健康问题。许多监管机构都规定了食品和饲料中真菌毒素的最大残留限量 (MRLs)，以便密切监测和控制膳食暴露<sup>[2-4]</sup>。

目前的真菌毒素分析方法主要基于 LC/MS/MS 检测，因为 LC/MS/MS 检测具有极高的灵敏度和选择性。常见的真菌毒素包括许多高度敏感的化合物，这些化合物在一般的样品前处理技术中往往容易损失。因此，在分析多种食品和饲料样品基质中的多类别多组分真菌毒素时，样品前处理方法主要依赖于直接溶剂/水混合萃取，并使用大量同位素标记内标 (ISTD)，这种方法也称为稳定同位素稀释分析 (SIDA)<sup>[5]</sup>。这种简单可靠的方法已在多个实验室进行了交叉验证，并广泛应用于许多真菌毒素检测实验室。然而，该方法在很大程度上依赖于使用同位素 ISTD 进行样品基质校正并确保仪器检测选择性。复杂食品或饲料样品萃取后未进一步纯化基质共萃取物。将样品粗提物进样至 LC/MS/MS 系统会导致严重的流路和 MS 离子源污染，以及残留问题，还会导致仪器需要频繁停机来进行清洁维护。

在真菌毒素分析中，还有一种用于食品样品前处理的方法是 QuEChERS 萃取之后进行分散 SPE (dSPE) 净化<sup>[6,7]</sup>。但是，dSPE 净化不能高效地去除基质，还会导致敏感真菌毒素的损失，例如伏马菌素。经 QuEChERS 萃取后，使用 Captiva EMR-Lipid 通过式净化对脂肪食品基质中的真菌毒素进行分析<sup>[8,9]</sup>，结果表明，该方法的真菌毒素回收率在可接受范围内，脂肪基质净化效率高。但对于更复杂的基质，有必要进行全面的基质净化以去除除脂质和脂肪以外的其他基质共萃取物。

Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱专门针对食品和饲料中的多类别多组分真菌毒素分析进行开发和优化，能够在 QuEChERS 萃取之后提供全面的混合模式通过式净化，而不影响目标物回收率。本研究的目的是开发和验证一种多类别多组分真菌毒素分析方法，该方法使用 QuEChERS 萃取、Captiva EMR 真菌毒素通过式净化以及 Agilent 6475 三重四极杆 LC/MS 来检测和定量分析干玉米和大豆中的真菌毒素。

## 实验部分

### 化学品与试剂

原始真菌毒素储备液由安捷伦科技公司提供，包括大麻真菌毒素混合物 (部件号 TOX-CBS-MIX1)；黄曲霉毒素 M1 (部件号 TOX-UNI-AFLAM1) 和 M2 (部件号 TOX-UNI-AFLAM2)；脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (部件号 TOX-UNI-DON)；伏马菌素 B1 (部件号 TOX-UNI-FUMOB1) 和 B2 (部件号 TOX-UNI-FUMOB2)；HT-2 (部件号 TOX-UNI-HT2)；T-2 (部件号 TOX-UNI-T2)；玉米赤霉烯酮 (部件号 TOX-UNI-ZON)。其他原始真菌毒素标准品储备液和稳定标记的 ISTD 储备液购自 Romer Labs (Newark, DE, U.S.)。甲醇 (MeOH)、乙腈 (ACN) 和异丙醇 (IPA) 购自 VWR International (Radnor, PA, U.S.)。甲酸、甲酸铵和氟化铵购自 MilliporeSigma (Burlington, MA, U.S.)。

### 溶液与标准品

用 1:1 的乙腈:水稀释各标准品储备液或真菌毒素加标溶液 I，以制备两种真菌毒素加标溶液 (I 和 II)。由于不同储备液的浓度不同，并且根据 LC/MS/MS 响应对各标样加标体积进行了调整，因此混合标样加标溶液中各目标物浓度也不同。然后使用这两种标样加标溶液和乙腈:水 (1:1) 制备校准曲线标准溶液，涵盖从仪器定量限 (LOQ) 至仪器定量上限 (HLOQ) 的宽动态范围 (500x)。对于预加标质量控制 (QC) 样品，将标准溶液以 4 种浓度加标至预称重的样品中，这 4 种浓度包括方法定量限 1 (LOQ<sub>m1</sub>) 和 2 (LOQ<sub>m2</sub>)、中浓度和高浓度。各标样加标溶液中各目标物浓度、LOQ<sub>i</sub> (cal. STD 1) 和 HLOQ<sub>i</sub> (cal. STD 9) 下的校准标样溶液、4 种浓度的预加标 QC 样品见表 1。

使用 1:1 乙腈:水稀释各 ISTD 储备液，制备同位素 ISTD 加标溶液，DON-<sup>13</sup>C<sub>15</sub> 的浓度为 1000 ng/mL，AB1-<sup>13</sup>C<sub>24</sub> 的浓度为 8 ng/mL，3-ADON-<sup>13</sup>C<sub>17</sub> 的浓度为 1000 ng/mL，T2-<sup>13</sup>C<sub>24</sub> 的浓度为 500 ng/mL，FB1-<sup>13</sup>C<sub>34</sub> 的浓度为 2000 ng/mL。所有标准品均在 4 °C 下储存，使用时间不超过两周。

表 1. 真菌毒素标准溶液和 QC 样品

目标物 (缩写)	标准溶液 (ng/mL)				预加标 QC 样品 (ng/g)			
	STD 加标 I	STD 加标 II	HLOQ <sub>i</sub>	LOQ <sub>i</sub>	QC-高浓度	QC-中浓度	QC-LOQ <sub>m2</sub>	QC-LOQ <sub>m1</sub>
脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)	3750	150	75	0.15	375	75	15	1.5
镰刀菌烯酮 X (FS-X)	3750	150	75	0.15	375	75	15	1.5
新茄病镰刀菌烯醇 (NEO)	2500	100	50	0.1	250	50	10	1
黄曲霉毒素 M2 (AM2)	375	15	7.5	0.015	37.5	7.5	1.5	0.15
3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-ADON)	2500	100	50	0.1	250	50	10	1
15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-ADON)	3750	150	75	0.15	375	75	15	1.5
黄曲霉毒素 G2 (AG2)	25	1	0.5	0.001	2.5	0.5	0.1	0.01
黄曲霉毒素 M1 (AM1)	375	15	7.5	0.015	37.5	7.5	1.5	0.15
黄曲霉毒素 G1 (AG1)	100	4	2	0.004	10	2	0.4	0.04
黄曲霉毒素 B2 (AB2)	25	1	0.5	0.001	2.5	0.5	0.1	0.01
黄曲霉毒素 B1 (AB1)	100	4	2	0.004	10	2	0.4	0.04
二乙酰氧基镰草镰刀菌醇 (DAS)	2500	100	50	0.1	100	20	4	0.4
HT-2	3750	150	75	0.15	375	75	15	1.5
伏马菌素 B1 (FB1)	1000	40	20	0.04	100	20	4	0.4
T2	1000	40	20	0.04	100	20	4	0.4
伏马菌素 B3 (FB3)	1000	40	20	0.04	100	20	4	0.4
赭曲霉毒素 A (OTA)	1000	40	20	0.04	100	20	4	0.4
玉米赤霉烯酮 (ZON)	937.5	37.5	18.75	0.0375	93.75	18.75	3.75	0.375
杂色曲霉毒素 (STC)	250	10	10	0.01	25	5	1	0.1
环匹阿尼酸 (CPA)	500	20	20	0.02	50	10	2	0.2
伏马菌素 B2 (FB2)	1000	40	40	0.04	100	20	4	0.4

在 245 mL 乙腈中加入 5 mL 甲酸，制备含 2% 甲酸的乙腈萃取溶剂，并于室温下储存。在 100 mL 水中加入 1 mL 甲酸，制备含 1% 甲酸的水溶液。LC 流动相 A 为含 10 mM 甲酸铵、0.05 mM 氟化铵和 0.1% 甲酸的水溶液，流动相 B 为 MeOH。

### 设备与材料

研究使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统进行，该液相色谱系统包括 Agilent 1290 Infinity II 二元泵 (G4220A)、Agilent 1290 Infinity II 高性能自动进样器 (G4226A) 和 Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G1316C)。将 LC 系统与 Agilent 6475 三重四极杆 LC/MS 系统 (G6475AA) 联用。采用 Agilent MassHunter Workstation 软件 12.0 版进行数据采集和分析。

使用 Agilent ZORBAX 超高压快速高分离度 (RRHD) Eclipse Plus C18 色谱柱 (2.1 × 100 mm, 1.8 μm; 部件号 959758-902) 和 Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18 (2.1 mm, 1.8 μm, 压力上限 1200 bar) UHPLC 保护柱 (部件号 821725-901) 进行色谱分离。

用于样品前处理的其他仪器包括：

- Centra CL3R 离心机 (Thermo IEC, MA, U.S.)
- Geno/Grinder (Metuchen, NJ, U.S.)
- Multi Reax 试管振荡器 (Heidolph, Schwabach, Germany)
- 移液管和重复用移液器 (Eppendorf, NY, U.S.)
- 安捷伦正压 48 孔处理装置 (PPM-48; 部件号 5191-4101)
- 超声清洗池 (VWR, PA, U.S.)

所用样品前处理及其他消耗品包括：

- Agilent Bond Elut QuEChERS EN 萃取试剂盒，EN 15662 方法，缓冲盐，陶瓷均质子 (部件号 5982-5650CH)

- Captiva EMR 真菌毒素小柱，3 mL 小柱，300 mg (部件号 5610-2233)

### LC/MS/MS 仪器条件

表 2、3 和 4 列出了 LC 泵条件、LC Multisampler 条件和 MS 采集条件。

### LC 泵条件

表 2. LC/MS/MS 的 LC 泵条件

参数	设置
流动相 A	含 10 mM 甲酸铵、0.05 mM 氟化铵和 0.1% 甲酸的水溶液
流动相 B	MeOH
梯度	时间 (min)    A%    B%    流速 (mL/min)
	0.00            75    25    0.25
	0.50            75    25    0.25
	7.00            0     100   0.25
	8.00            75    25    0.25
8.50            0     100   0.25	
停止时间	11.0 min
后运行时间	2.5 min

表 4. 真菌毒素目标物和 ISTDs 的 MS 采集条件

目标物	RT (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速器电压 (V)	极性
DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	2.42	312.2	110	263.1 123.9	4 76	5	正
DON	2.45	297.1	90	231.1 203.0	10 10	5	正
FS-X	3.12	355.0	166	277.0 247.0	10 10	5	正
NEO	3.33	400.1	166	305.0 215.1	10 18	5	正
AM2	3.9	331.3	143	285.2 273.1	20 25	4	正
3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	3.93	356.2	113	83.0 44.9	80 76	5	正
3-ADON	3.99	339.1	166	279.0 231.1	10 10	5	正
15-ADON	4.01	356.0	166	321.1 260.9	10 10	5	正
AG2	4.16	331.1	160	313.0 245.0	30 34	4	正
AM1	4.19	329.1	143	273.1 259.0	21 25	4	正
AG1	4.41	329.1	150	243.0 199.6	28 48	4	正
AB2	4.6	315.1	160	287.0 259.0	28 32	4	正
AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	4.77	330.1	175	301.1 255.0	26 40	4	正
AB1	4.81	313.1	160	285.0 241.0	24 44	2	正
DAS	5.13	384.2	166	307.1 247.0	8 12	4	正

### LC Multisampler 条件

表 3. LC/MS/MS 的 LC Multisampler 程序

参数	设置
进样程序	吸取 3.00 µL 水 吸取 8.00 µL 样品 进样针清洗 吸取 5.00 µL 水 从空气中取 3.00 µL 混合三次 进样
多重清洗	步骤    溶剂    时间 (s)    针座反冲洗    进样针清洗
	1        IPA      10        启用        启用
	2        ACN     10        启用        启用
	3        水      10        启用        启用
起始条件	水        NA        启用        启用

### 液相色谱柱温箱

恒温 40 ± 0.8 °C

### 质谱仪参数设置

ESI 离子源设置包括干燥气 150 °C，11 L/min；鞘气 350 °C，11 L/min；雾化器气体 40 psi；毛细管电压 2000 V（正离子）和 3000 V（负离子）；喷嘴电压 0 V（正离子）和 1500 V（负离子）。

目标物	RT (min)	母离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)	碰撞池加速器电压 (V)	极性
HT-2	5.81	442.2	100	263.0 214.9	12 12	4	正
FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	5.84	756.5	180	738.7 374.4	36 37	4	正
FB1	5.87	722.4	180	704.3 352.3	32 40	4	正
T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	6.19	508.4	110	322.2 229.1	10 20	4	正
T2	6.23	484.2	110	305.1 215.0	12 20	4	正
FB3	6.25	706.4	180	336.2 318.2	40 44	4	正
OTA	6.35	404.1	120	358.1 238.9	14 26	3	正
ZON	6.43	317.1	190	187.0 175.0	26 26	3	负
STC	6.48	325.1	165	310.0 281.0	26 44	4	正
CPA	6.61	337.1	130	196.0 182.0	24 20	5	正
FB2	6.61	706.4	180	688.4 354.6	32 40	4	正

图 1 为采用开发的 LC/MS/MS 方法获得的 LOQ<sub>i</sub> 水平下的各目标物色谱图。

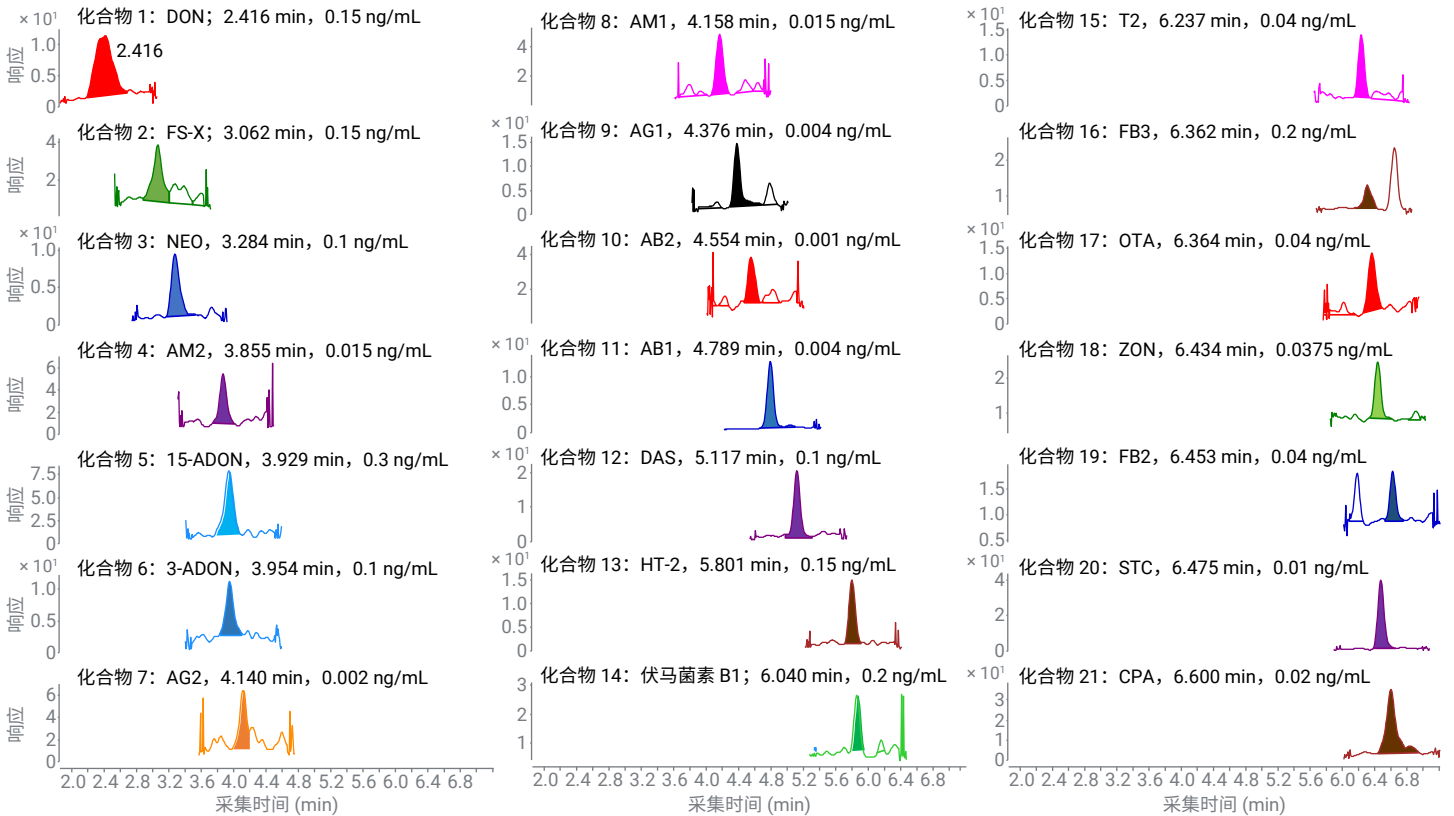


图 1. LOQ<sub>i</sub> 水平下的真菌毒素 MRM 色谱图

## 样品前处理

干玉米粒和大豆样品购自当地超市。使用机械研磨机将干性样品研磨成细粉。

称取 2 g 样品粉末，置于 50 mL 萃取用离心管中，然后用真菌毒素标准加标溶液对所有预加标 QC 样品进行适当加标。加标后，将样品涡旋 10–15 秒。然后按照图 2 所述的样品前处理流程对样品进行前处理。整个样品前处理流程中引入的稀释倍数为 10。

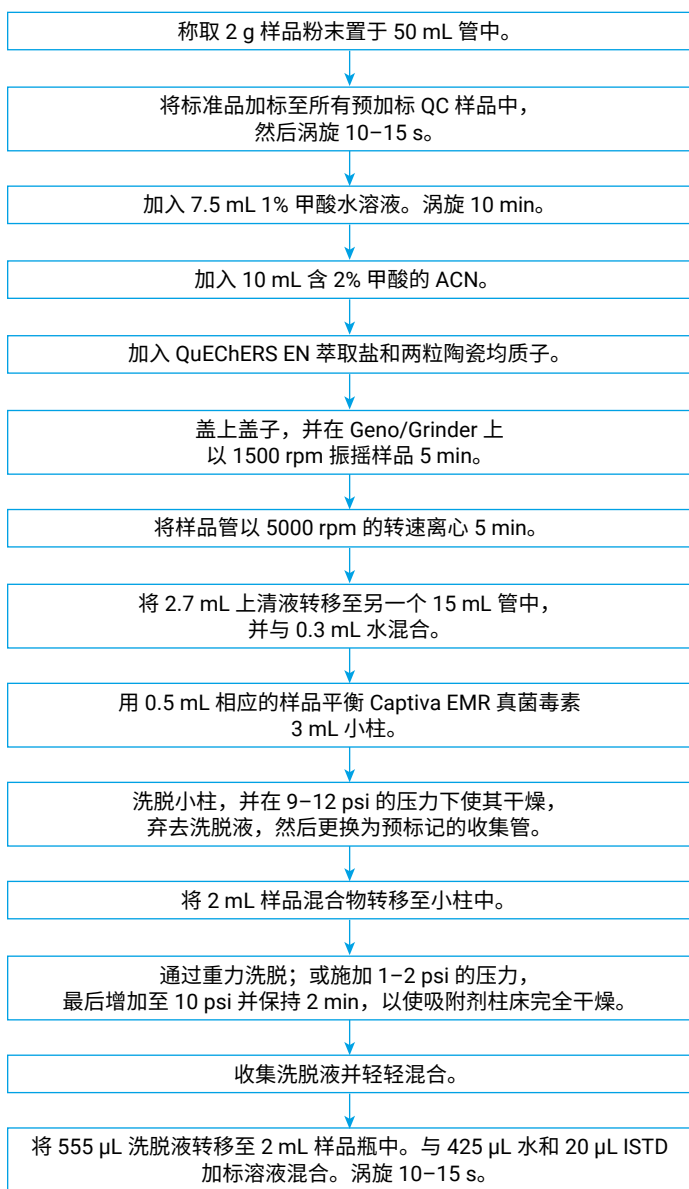


图 2. 用于玉米和大豆粉末中真菌毒素分析的样品前处理程序

## 方法性能评估

根据目标物回收率、重现性以及基质去除率，对使用 Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱的 EMR 混合模式通过式净化方法进行了评估。使用预加标 QCs 与相应浓度的基质匹配后加标 QCs 对目标物回收率和重现性进行了研究。通过比较按照不同方法处理的样品的色谱背景来考察基质去除率。将分析结果与其他两种现有方法的结果进行了比较，包括稳定同位素稀释分析 (SIDA)<sup>[9]</sup>，以及 QuEChERS 萃取后再进行 SPE 和 dSPE 净化。方法定量基于加标了同位素 ISTDs 的纯标准品校准曲线。考虑到同位素 ISTDs 的成本较高，使用了 5 种同位素 ISTDs，并在样品前处理结束时加标。然后通过校准研究、方法 LOQ、准确度和精密度对方法进行了全面验证。由于对目标物 LOQs 的要求不同，因此制备了 4 种浓度水平的预加标 QC 样品，每种浓度 4 个重复样。此外，制备了基质空白 (5 个重复样)，用于定量基质对照中的目标物。这对目标物的准确度评估很重要，因为基质对结果的影响是不可避免的。表 1 列出了预加标 QC 样品浓度。

## 结果与讨论

### EMR 混合模式通过式净化

Agilent Captiva EMR 小柱采用混合模式通过式净化，能够在传统 QuEChERS 萃取之后全面去除基质，这是一种简单而高效的基质净化程序，能够去除包括碳水化合物、有机酸、色素、脂肪和脂质以及其他疏水性和亲水性基质共萃取物在内的基质干扰物。Captiva EMR 真菌毒素小柱专为分析复杂的干种子、加工食品或饲料基质中的多类别多组分真菌毒素而开发。该小柱经过专门优化，可防止在样品净化过程中损失高度敏感的真菌毒素化合物（例如伏马菌素和黄曲霉毒素）。

与 QuEChERS 萃取后使用另一种基质净化方法（使用典型的市售 SPE 小柱以及针对真菌毒素分析的专用 dSPE）相比，EMR 混合模式通过式净化简化了基质净化程序，不仅所需的净化步骤更少（一次净化与两次净化），而且简化了净化流程（省去了 dSPE 管开盖和加盖、涡旋、离心和多次样品转移等步骤）。该方法提供了相当的基质去除效率，而且还提高了敏

感真菌毒素（包括伏马菌素、OTA 和 CPA）的回收率。图 3 所示为 QuEChERS 萃取后进行样品净化的真菌毒素回收率。与另一种依次使用 SPE + dSPE 净化的方法相比，EMR 混合模式通过式净化显著提高了敏感真菌毒素的回收率。尤其是对于 FB1、FB2 和 FB3。使用其他净化方法会导致这些目标物几乎完全损失，而 EMR 通过式净化的回收率可达 90% 以上。

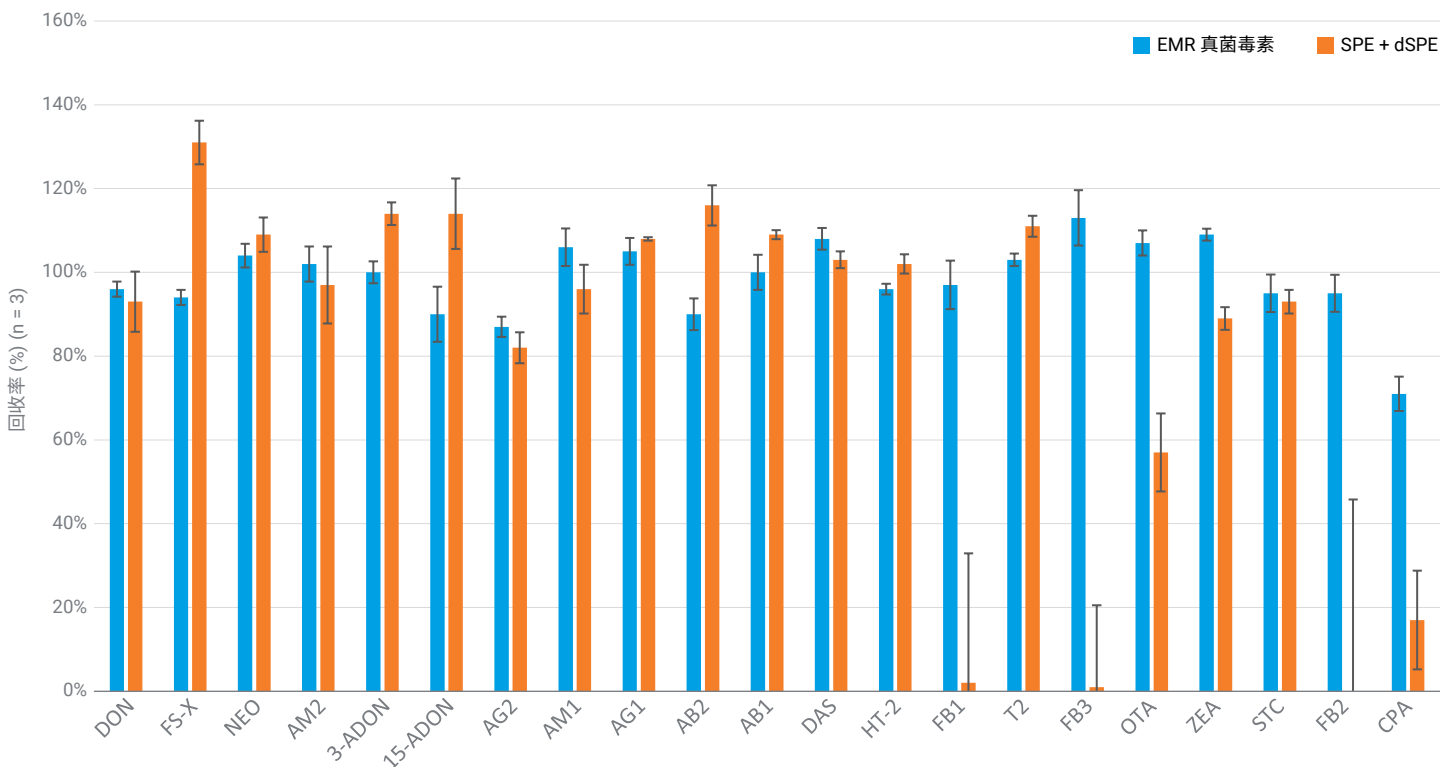


图 3. QuEChERS 萃取后不同净化方法的真菌毒素回收率对比：Agilent Captiva EMR 真菌毒素通过式净化（蓝色）与 SPE + dSPE 净化（橙色）

与 SIDA 方法（使用 1:1 乙腈:水进行样品萃取，然后进行针头过滤器过滤）相比，QuEChERS 萃取后使用 EMR 通过式净化为 LC/MS/MS 进样提供了更干净的最终样品。图 4 比较了采用两种不同方法制备的最终样品的净化度。本次评估使用了发

酵玉米，因为它是一种比普通玉米粒更具挑战性的基质。结果表明，使用 QuEChERS 萃取后进行 EMR 通过式净化去除了 90% 以上的基质共萃取物，显著减少了 LC/MS/MS 进样时进入检测系统的基质共萃取物。

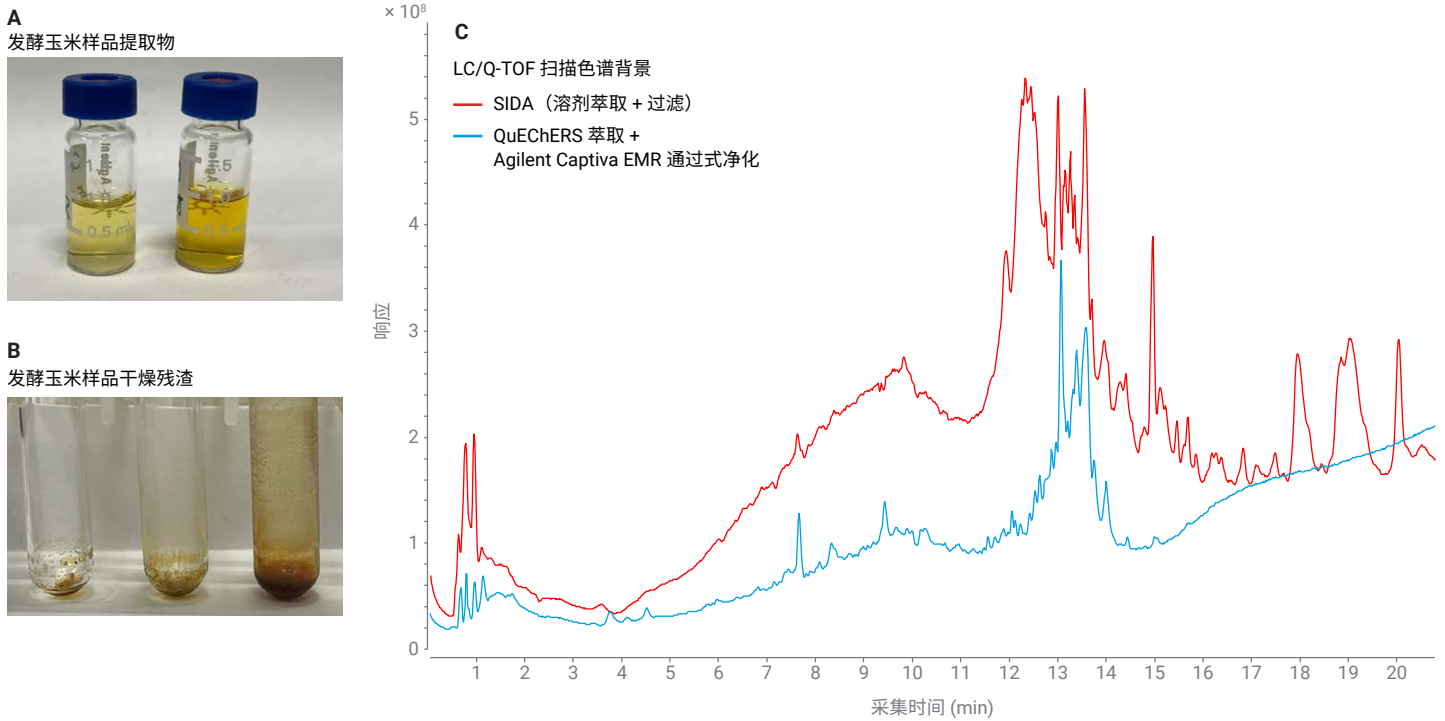


图 4. SIDA 方法和依次使用 QuEChERS 萃取及 Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱通过式净化的方法之间的发酵玉米粉末基质净化度对比。(A) 使用 SIDA 方法（右）和新方法（左）得到的最终样品提取物；(B) 通过 SIDA 方法（右）、QuEChERS 萃取（中）和 QuEChERS 萃取及随后 EMR 通过式净化（左）处理的样品的干燥残渣；(C) 通过 SIDA 方法（红色）和 EMR 方法（蓝色）处理的样品的 LC/Q-TOF 扫描背景

## 方法准确度与精密度

使用预加标 QC-LOQ<sub>m</sub>2、QC-中浓度和 QC-高浓度玉米样品，根据目标物的回收率和重现性评估了所开发方法的回收率和重现性。向玉米样品中预加标真菌毒素标准品，然后执行样品前处理程序。同样，玉米基质空白样品也按照相同的程序处理，直至最后一步，即 LC/MS/MS 检测前用水稀释。随后在稀释步骤中适当添加真菌毒素标准品进行后加标，使其与预

加标 QC 样品中目标物的理论浓度一致。然后，在 LC/MS/MS 上分析预加标和后加标样品，并使用目标物响应计算目标物的回收率和重现性。图 5 所示的结果表明，通过使用本研究开发的方法，在三个加标浓度下（各 4 个重复样），所有真菌毒素的目标物回收率在 80%–111% 范围内，且 %RSD 在 0.4%–12.5% 范围内。

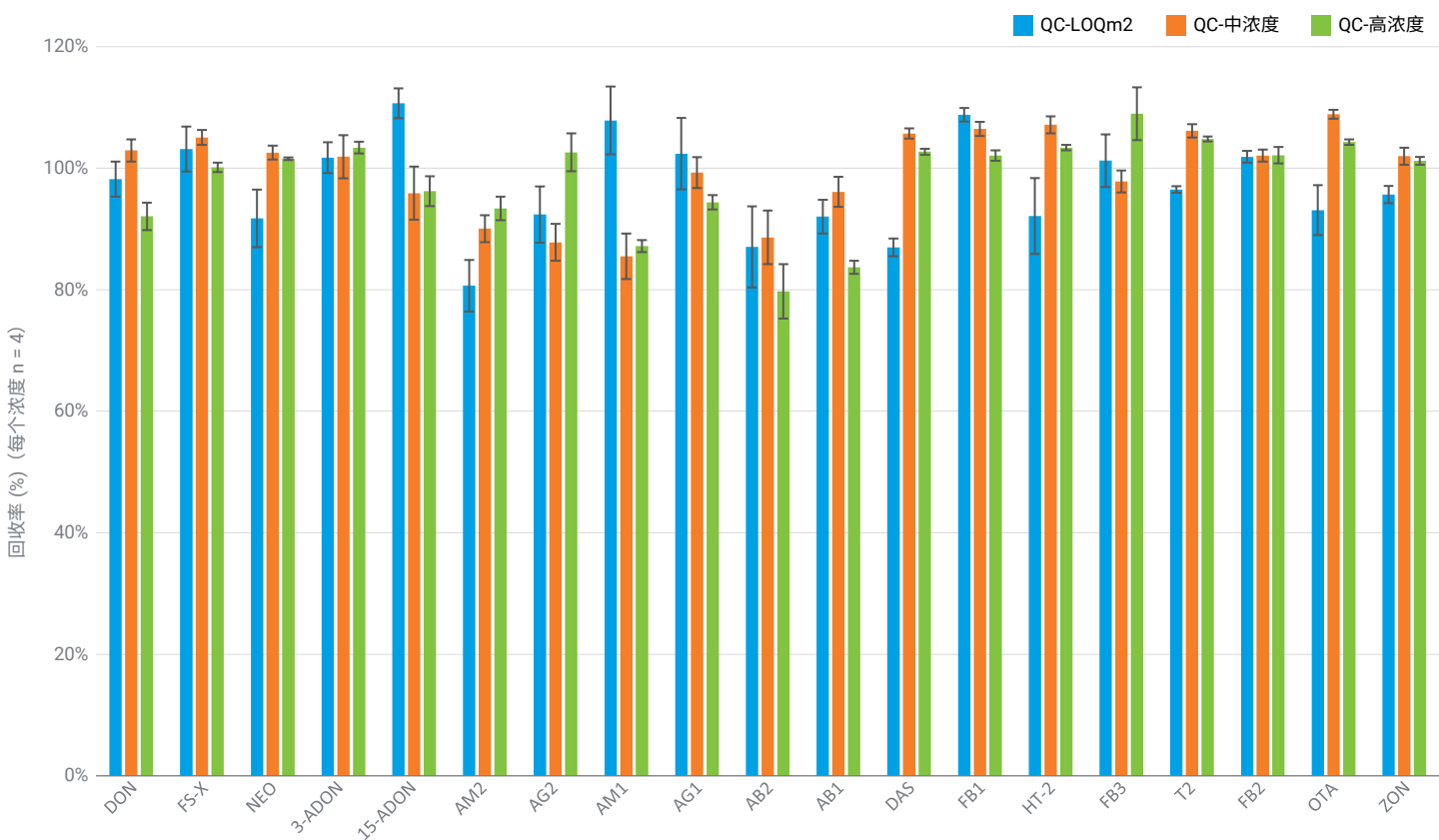


图 5. 经过 QuEChERS 萃取，随后使用 Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱的 EMR 混合模式进行净化所处理的干玉米样品的真菌毒素回收率

## 完整方法验证

**方法校准：**方法定量根据每种分析物的响应和校准曲线来推算样品中分析物的浓度。在许多食品安全检测中，通常建议使用基质匹配校准曲线来校正样品基质效应。另一种方法是使用具有同位素 ISTD 的纯标准品校准曲线对样品基质中的目标物进行定量。使用纯校准标准品可简化多种食品基质中的此类分析，节省了针对每种样品基质制备基质匹配校准曲线所需的时间和精力。使用预加标 ISTDs（尤其是同位素 ISTDs）可追踪样品前处理过程中基质效应和回收率引起的目标物结果偏差。如果该方法表现出优异的目标物回收率和重现性，则可在样品萃取后再添加同位素 ISTD，这样做可以减少 ISTDs 用量，特别是考虑到同位素 ISTD 的成本较高。然而，后一种方法需

要使用更多的同位素 ISTDs，无论是从各目标物相应的同位素 ISTDs 的数量还是加标浓度和体积来看都是如此。对于目标物分析，使用的相应同位素 ISTD 越多，定量结果越出色。但在大多数情况下，并不是每种目标物都能获得市售的相应同位素 ISTD，而且在实际操作中还需要认真考虑同位素 ISTD 的高成本，尤其是在进行多组分目标物分析时。在许多情况下，对于没有相应同位素 ISTD 的目标物定量分析必须采取折衷方案。

在本研究中，方法定量基于使用同位素 ISTDs 的纯标准品校准曲线。鉴于同位素 ISTD 储备液的成本较高，考虑到不同的真菌毒素类别和保留时间分布，选用了五种同位素 ISTDs。图 6 为 500 倍动态范围内代表性真菌毒素的校准曲线，可以看出线性良好。总体而言，使用线性回归和  $1/x^2$  权重，

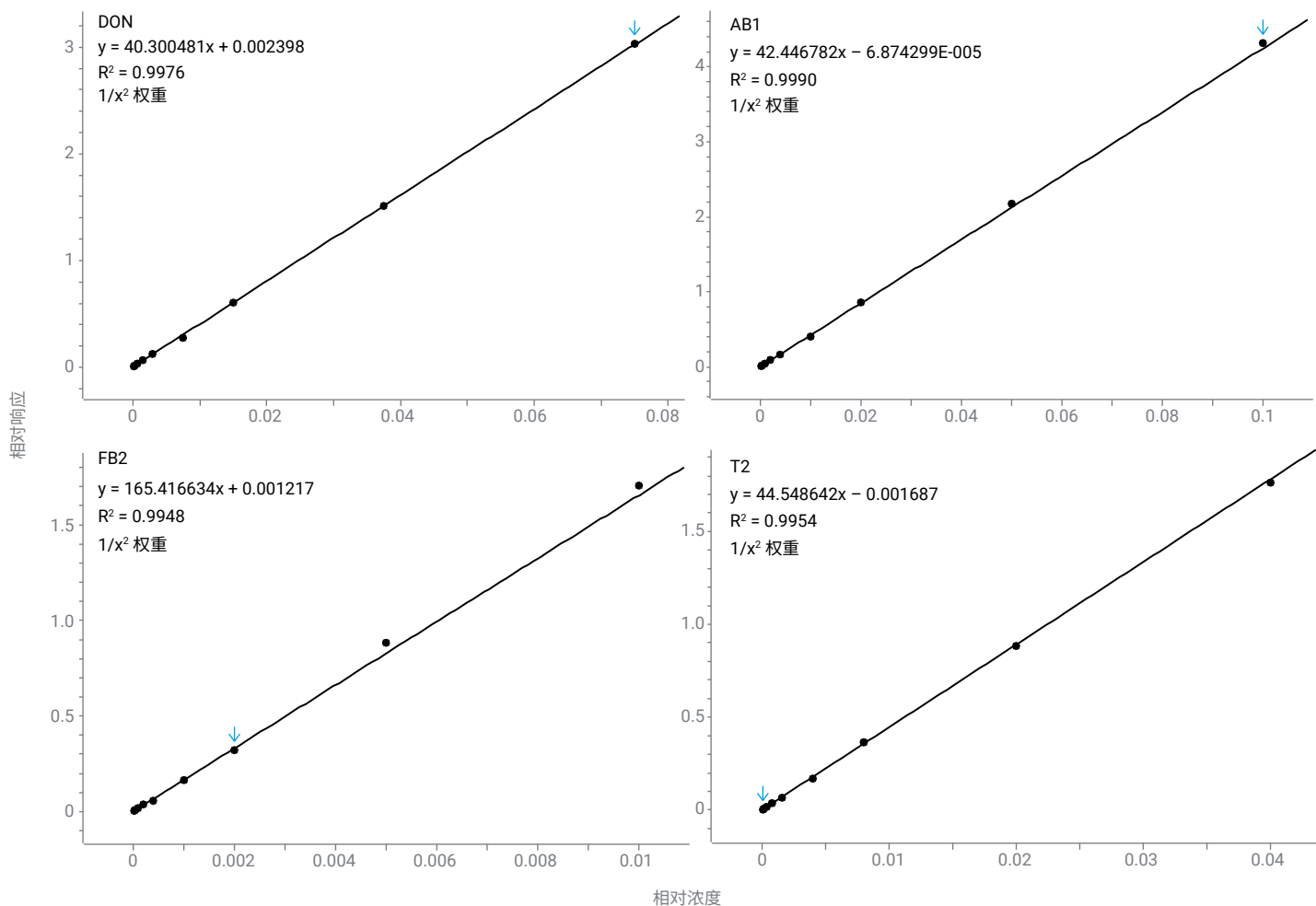


图 6. 使用同位素 ISTD 得到的代表性真菌毒素的校准曲线（纯标准品）

除 15-ADON、AG2、FB1 和 FB3 外，所有目标物在 LOQ<sub>i</sub> 至 HLOQ<sub>i</sub> 的 500 倍动态范围内均获得了出色的线性，R<sup>2</sup> > 0.99。对于 15-ADON 和 AG2，由于灵敏度不足，提高了 LOQ<sub>i</sub>，动态范围为自 LOQ<sub>i</sub> 起 250 倍。对于 FB1 和 FB3，LOQ<sub>i</sub> 进一步提高，动态范围为自 LOQ<sub>i</sub> 起 100 倍。

**目标物定量方法验证：**表 5 显示了干玉米和大豆样品真菌毒素定量分析的方法验证结果，包括方法 LOQ (LOQ<sub>m</sub>)、所用的 ISTD、校准曲线动态范围、以及所报告的 2 至 3 个浓度水平的预加标 QC 样品定量的准确度和精密度。

影响方法定量结果的两个因素是目标物没有相应的同位素 ISTD 以及基质空白中本身存在目标物。由于只有五种目标物具有相应的同位素 ISTD，因此其余 16 种目标物必须使用非匹配的同位素 ISTD。对于不同的样品基质，目标物使用的非匹配 ISTD 可能不同，因为在不同样品基质中，非匹配 ISTD 对目标物的校正效果可能不同。因此，样品测试批次中应始终包

括校准曲线标准品，因为用于定量的 ISTD 改变时，需要重新计算校准标准品，即使每个样品分析批次不需要运行纯校准标准品。

对于具有相应同位素 ISTD 的五种目标物，准确度的可接受标准为 70%–120%，且 RSD ≤ 20%。对于使用非匹配同位素 ISTD 的其余目标物，准确度的可接受标准为 65%–135%，且 RSD ≤ 25%。准确度结果表明，所有未达到可接受标准的目标物均为缺乏相应同位素 ISTD 的目标物。对于玉米基质，五种同位素 ISTDs 涵盖除 AB2 外的所有目标物，得到了可接受的回收率结果。对于大豆基质，五种同位素 ISTDs 涵盖除 HT-2、FB3 和 OTA 外的所有目标物，得到了可接受的准确度结果。不过，该方法对两种基质中的所有目标物均实现了 < 20% 的 RSD，证明具有出色的方法重现性。对于不符合准确度可接受标准的少数目标物，使用其相应的同位素 ISTD 肯定可以改善定量准确度。

表 5. 干玉米粒和大豆中真菌毒素定量分析的方法验证结果

真菌毒素	纯标准品校准曲线 动态范围 (ng/mL)	干玉米粒					干大豆				
		ISTD	LOQ <sub>m</sub> (ng/g)	预加标 QC (每个浓度 n = 4)			ISTD	LOQ <sub>m</sub> (ng/g)	预加标 QC (每个浓度 n = 4)		
				浓度 (ng/g)	平均准确度 (%)	RSD (%)			浓度 (ng/g)	平均准确度 (%)	RSD (%)
DON	0.15–75	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	75	75*	99	8	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	15	15	101	10
				–	–	–			75	104	2
				375	102	5			375	100	3
FS-X	0.15–75	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	75	75*	95	5	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	75	75*	91	6
				–	–	–			–	–	–
				375	114	1			375	118	3
NEO	0.1–50	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	50	50*	85	3	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1	1	100	11
				–	–	–			10	98	5
				250	87	1			250	105	2
AM2	0.015–7.5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	99	5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	102	4
				7.5	90	7			7.5	109	4
				37.5	97	1			37.5	116	2
3-ADON	0.1–50	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	50	50*	110	3	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	10	10	76	6
				–	–	–			50	96	1
				250	96	3			250	93	4
15-ADON	0.3–75	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	75	75*	97	6	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	75	75*	87	8
				–	–	–			–	–	–
				375	92	10			375	84	12
AG2	0.002–0.5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.1	0.1	92	2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.1	0.1	93	4
				0.5	88	5			0.5	88	5
				2.5	105	1			2.5	73	4

真菌毒素	纯标准品校准曲线 动态范围 (ng/mL)	干玉米粒					干大豆				
		ISTD	LOQ <sub>m</sub> (ng/g)	预加标 QC (每个浓度 n = 4)			ISTD	LOQ <sub>m</sub> (ng/g)	预加标 QC (每个浓度 n = 4)		
				浓度 (ng/g)	平均准确度 (%)	RSD (%)			浓度 (ng/g)	平均准确度 (%)	RSD (%)
AM1	0.015-7.5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	110	6	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	86	16
				7.5	99	8			7.5	80	8
				37.5	104	2			37.5	83	3
AG1	0.004-2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	106	2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	114	12
				2	89	3			2	113	4
				10	98	1			10	114	1
AB2	0.001-0.5	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	0.1	0.1	42	11	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.01	0.01	110	10
				0.5	54	7			0.1	88	12
				2.5	48	11			2.5	98	4
AB1	0.004-2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.04	0.04	100	13	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.04	0.04	100	7
				0.4	103	5			0.4	89	5
				10	88	1			10	87	1
DAS	0.1-50	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	50	50*	110	3	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1	1	115	4
				-	-	-			10	99	7
				250	108	1			250	116	3
HT-2	0.15-75	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	97	11	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	15	15	193	4
				15	90	5			75	193	4
				375	79	4			375	205	2
FB1	0.2-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	20	20*	120	3	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	0.4	0.4	85	9
				-	-	-			20	72	5
				100	106	5			100	73	3
T2	0.04-20	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	20	20*	92	2	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	80	16
				-	-	-			4	87	14
				100	96	1			100	97	2
FB3	0.2-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	20	20*	95	2	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	20	20	167	7
				-	-	-			-	-	-
				100	96	1			100	157	5
OTA	0.04-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	0.4	0.4	112	18	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	170	6
				4	115	9			4	192	4
				100	95	4			100	168	1
ZON	0.0375-18.75	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	3.75	3.75	122	6	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.375	0.375	122	11
				18.75	83	5			3.75	120	9
				93.75	83	3			93.75	116	2
STC	0.01-5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.1	0.1	80	6	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	0.1	0.1	83	5
				1	105	4			1	94	6
				25	109	2			25	90	2
CPA	0.02-10	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	2	2	89	2	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	2	2	113	8
				10	92	4			10	117	5
				50	98	2			50	108	4
FB2	0.04-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	4	4	121	10	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	4	4	82	14
				20	86	4			20	94	4
				100	86	4			100	92	2

\* 由于基质空白中检测到目标物，因此 LOQ<sub>m</sub> 较高且报告的浓度水平数量减少。

红色结果表示由于目标物缺少相应的同位素 ISTD 导致的异常值

## 结论

本研究开发并验证了一种用于分析干玉米粒和大豆中 21 种真菌毒素的简单、快速且可靠的方法，该方法首先使用 QuEChERS 萃取，随后通过 Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱的 EMR 混合模式进行净化，最后进行 LC/MS/MS 检测。该方法在基质去除率方面显著优于 SIDA 方法，并且与其他基质净化方法（采用推荐用于多组分真菌毒素分析的其他市售 SPE 和 dSPE 产品）相比，具有更出色的真菌毒素回收率。该方法简化了样品净化流程，能够节省时间和人力，从而提高整体实验室分析效率。

## 参考文献

1. Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
2. U.S. Food and Drug Administration, Compliance Program Guidance Manual, Chapter 7: Molecular Biology and Natural Toxins, Mycotoxins in Domestic and Imported Foods. **2016** (CP 7307.001) <https://www.fda.gov/media/140749/download?attachment> (accessed 05-14-2024)
3. U.S. Department of Agriculture. Laboratory Approval Program – Mycotoxins. Revised **2023**. Doc. No. LAP-PR.07. [https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/LAP\\_PR\\_07\\_230208\\_LAP%20Mycotoxins.pdf](https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/LAP_PR_07_230208_LAP%20Mycotoxins.pdf) (accessed 2024-05-14)
4. European Commission Regulation No. 401/2006 of February 23, **2006**. Laying Down the Methods of Sampling and Analysis for the Official Control of the Levels of Mycotoxins in Foodstuffs.
5. Zhang, K.; Schaab, M. R.; Southwood, G.; Tor, E. R.; Aston, L. S.; Song, W.; Eitzer, B.; Majumdar, S.; Lapainis, T.; Mai, H.; et al. A Collaborative Study: Determination of Mycotoxins in Corn, Peanut Butter, and Wheat Flour Using Stable Isotope Dilution Assay (SIDA) and Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 7138–7152. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04872
6. Gonzalez-Jartín, J. M.; Rodríguez-Cañás, I.; Amparo, A.; Sainz, M. J.; Vieytes, M. R.; Gomes, A.; Ramos, I.; Botana, L. M. Multianalyte Method for the Determination of Regulated, Emerging and Modified Mycotoxins in Milk: QuEChERS Extraction Followed by UHPLC-MS/MS Analysis. *Food Chem.* **2021**, *356*, 129647. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.129647
7. Koesukwiwat, U.; Sanguankaew, K.; Leepipatpiboon, N. Evaluation of a Modified QuEChERS Method for Analysis of Mycotoxins in Rice. *Food Chem.* **2014**, *153*, 44–51. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.029
8. Lucas, D. 使用 Captiva EMR-Lipid 样品净化产品和 LC/MS/MS 分析花生酱中的真菌毒素, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-0366ZHCN, **2019**
9. Lucas, D. 使用 Captiva EMR-Lipid 净化产品和 LC/MS/MS 分析婴儿配方奶中的真菌毒素, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5994-0365ZHCN, **2019**

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)

DE17867428

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, 2024  
2024年6月1日, 中国出版  
5994-7373ZHCN