

# 测定宠物食品中的多类别多组分 真菌毒素

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宠物食品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

人们经常将宠物视为家庭成员，这些宠物对主人的生活有着深远的影响。鉴于这种情感联系，以及人们对宠物健康和宠物食品安全之间联系的认识不断提高，宠物食品中的真菌毒素污染成为一个普遍关注的问题<sup>[1]</sup>。宠物干粮是迄今为止最受欢迎且消费量最大的宠物食品，其中包含各种营养均衡的成分，如肉类、鱼类、谷物和蔬菜<sup>[2]</sup>。宠物食品中的真菌毒素污染可能源于原材料，也可能来自产品生产和储存过程。宠物食品中最常见的真菌毒素包括黄曲霉毒素 (AF)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、伏马菌素 (FUM)、赭曲霉毒素 A (OTA) 和玉米赤霉烯酮 (ZON)<sup>[3,4]</sup>。因此，监测和控制宠物食品中的真菌毒素污染非常重要，需要一种可靠的分析方法测定宠物食品中的真菌毒素。

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和重现性。在先前的研究中，此方法已成功用于干玉米和大豆中的真菌毒素分析<sup>[5]</sup>。本研究的目的是验证该方法用于测定宠物食品中多组分真菌毒素的性能。

## 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 (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

标准溶液和 QC 样品的制备如先前应用简报<sup>[5]</sup>中所述。

### 仪器与材料

本研究使用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱与 Agilent 6475 三重四极杆 LC/MS (G6475AA) 的联用系统。采用 Agilent MassHunter Workstation 软件 12.0 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设备如先前应用简报<sup>[5]</sup>中所述。

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，6 mL 小柱，600 mg（部件号 5610-2234）

### LC/MS/MS 仪器条件

LC/MS/MS 仪器方法与先前研究中详述的方法相同<sup>[5]</sup>。

### 样品前处理

市售狗粮和猫粮样品购自当地超市。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 1 所述的样品前处理程序对样品进行前处理。整个样品前处理程序中引入的稀释倍数为 10。

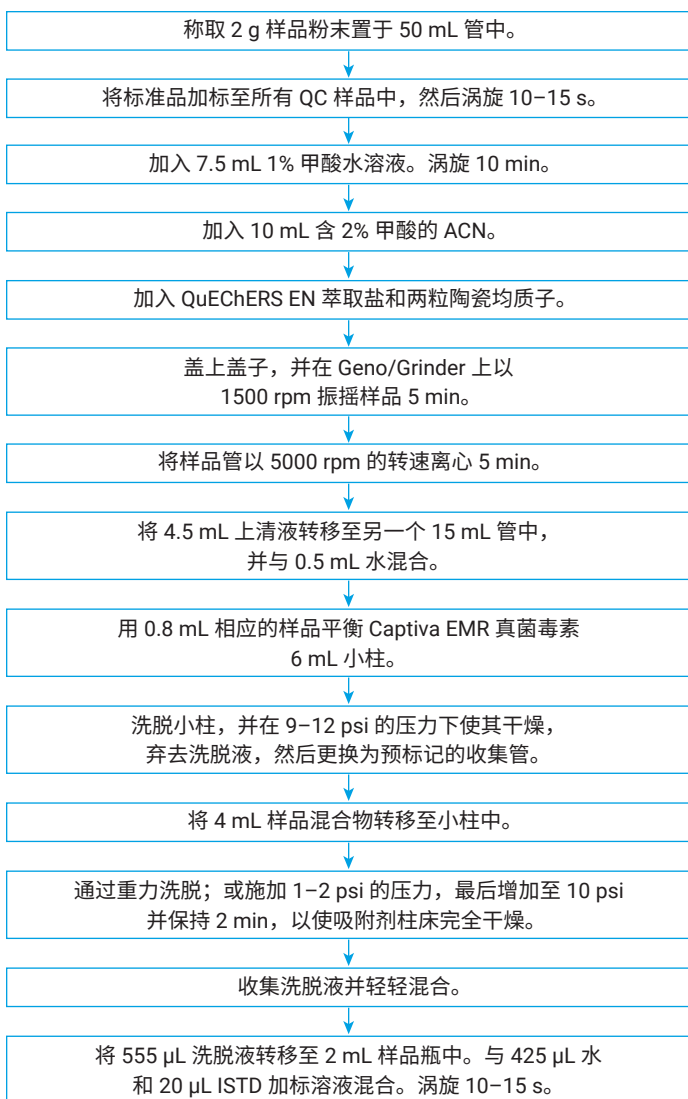


图 1. 用于宠物食品粉末中真菌毒素分析的样品前处理程序

## 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。将结果与稳定同位素稀释分析 (SIDA)<sup>[5]</sup> (使用 1:1 ACN:水进行萃取，随后进行针头过滤器过滤) 进行了比较。方法定量基于加标了同位素 ISTDs 的纯标准品校准曲线。

## 结果与讨论

### EMR 混合模式通过式净化

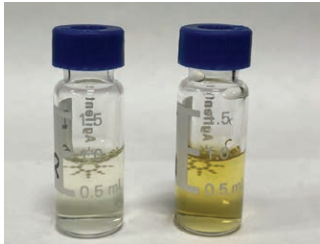
在传统 QuEChERS 萃取之后，Captiva EMR 小柱通过混合模式通过式净化提供全面的基质去除。该方法提供了简单且高效的基质净化，能够去除包括碳水化合物、有机酸、色素、脂肪和脂质以及其他疏水性和亲水性基质共萃取物在内的各种基质干扰物质。Captiva EMR 真菌毒素小柱专为分析复杂的干种子、加工食品或饲料基质中的多类别多组分真菌毒素而开发。该小柱经过专门优化，可防止在样品净化过程中损失高度敏感的真菌毒素化合物 (例如伏马菌素和黄曲霉毒素)。

先前的研究表明，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的专用分散 SPE (dSPE)) 相比，EMR 混合模式通过式净化简化了基质净化程序并提高了敏感真菌毒素的回收率<sup>[5]</sup>。

与 SIDA 方法<sup>[6]</sup> (使用 1:1 ACN:水进行样品萃取，然后进行针头过滤器过滤) 相比，新开发的方法为 LC/MS/MS 进样提供了更干净的最终样品，并且流程简便性与之相媲美。图 2 比较了采用两种不同方法制备的最终样品的净化度。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 3 比较了三种方法的方法流程，证明了新开发的方法采用了与传统 SIDA 方法或竞争厂商开发的另一种方法相当或更简化的流程。

A 样品提取物



B 样品干燥残渣

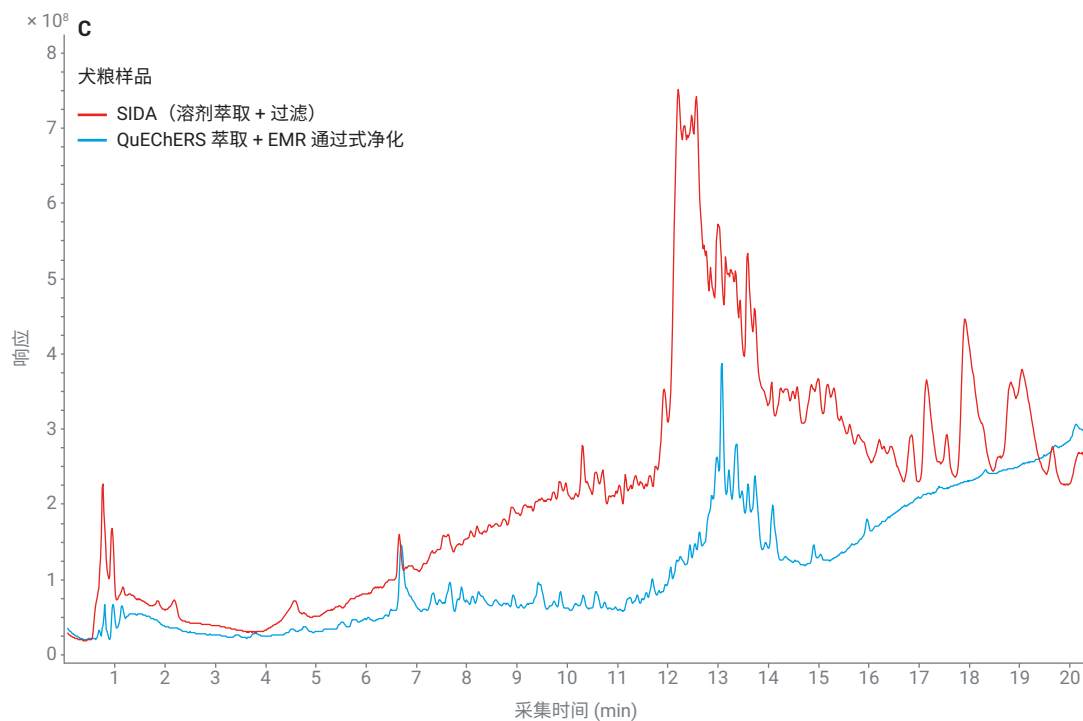
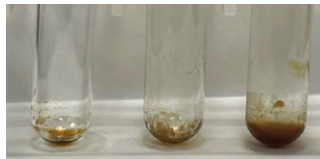


图 2. 利用 SIDA 方法和新开发的方法处理的犬粮样品之间的基质净化度比较。(A) 使用 SIDA 方法 (右图) 和 EMR 方法 (左图) 得到的最终样品提取物; (B) 通过 SIDA 方法 (右图)、QuEChERS 萃取 (中图) 和 QuEChERS 萃取及随后 EMR 通过式净化 (左图) 处理的样品的干燥残渣; (C) 通过 SIDA 方法 (红色) 和 EMR 方法 (蓝色) 处理的样品的 LC/Q-TOF 扫描色谱背景

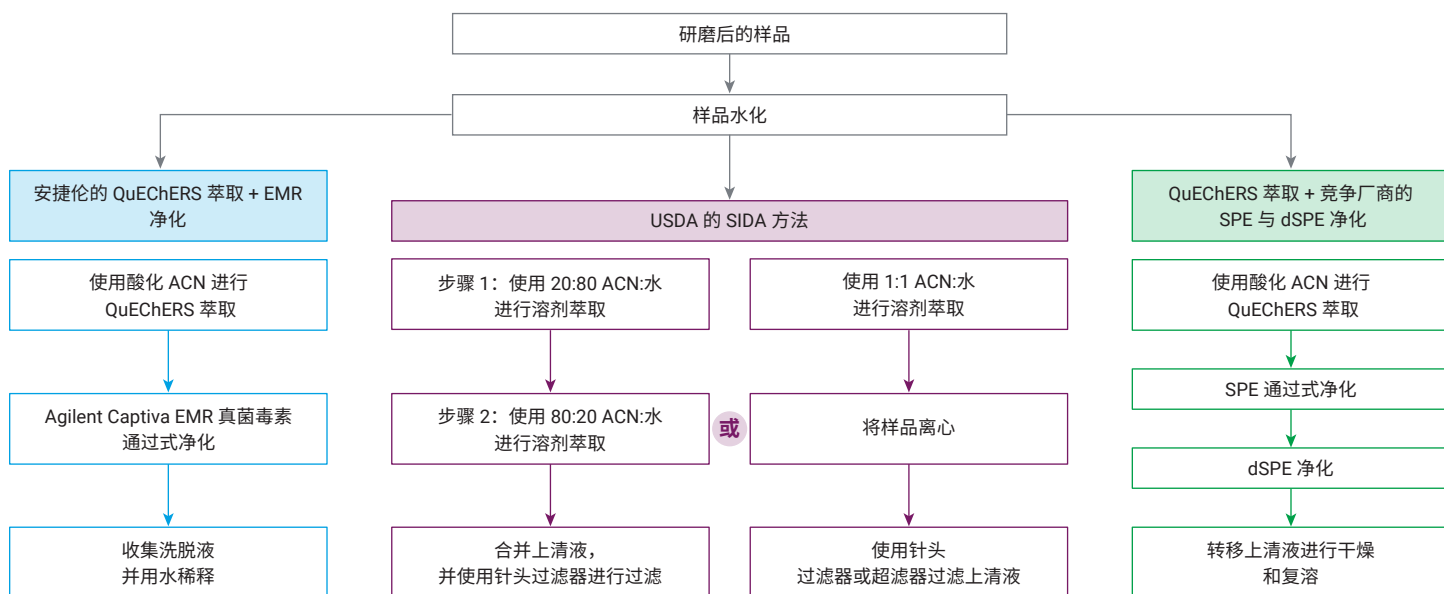


图 3. 方法流程比较

## 方法回收率和重现性

使用预加标 QC-LOQ<sub>m2</sub>、QC-中浓度和 QC-高浓度猫粮样品评估所开发的方法的目标物回收率和重现性。根据对应的预加标和后加标样品中的目标物响应（峰面积）来计算回收率。图 4 所示的结果表明，使用本研究开发的方法，在三个加标浓度下（各 4 个重复样），猫粮中所有真菌毒素的目标物回收率在 79%–134% 范围内，且 %RSD 在 1.1%–14.4% 范围内。

## 完整方法验证

### 方法校准

在先前的研究中讨论了使用含同位素 ISTDs 的纯标准品校准曲线与基质匹配校准曲线进行目标物定量<sup>[5]</sup>。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。总体而言，使用线性回归和  $1/x^2$  权重，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， $R^2 > 0.99$ 。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。

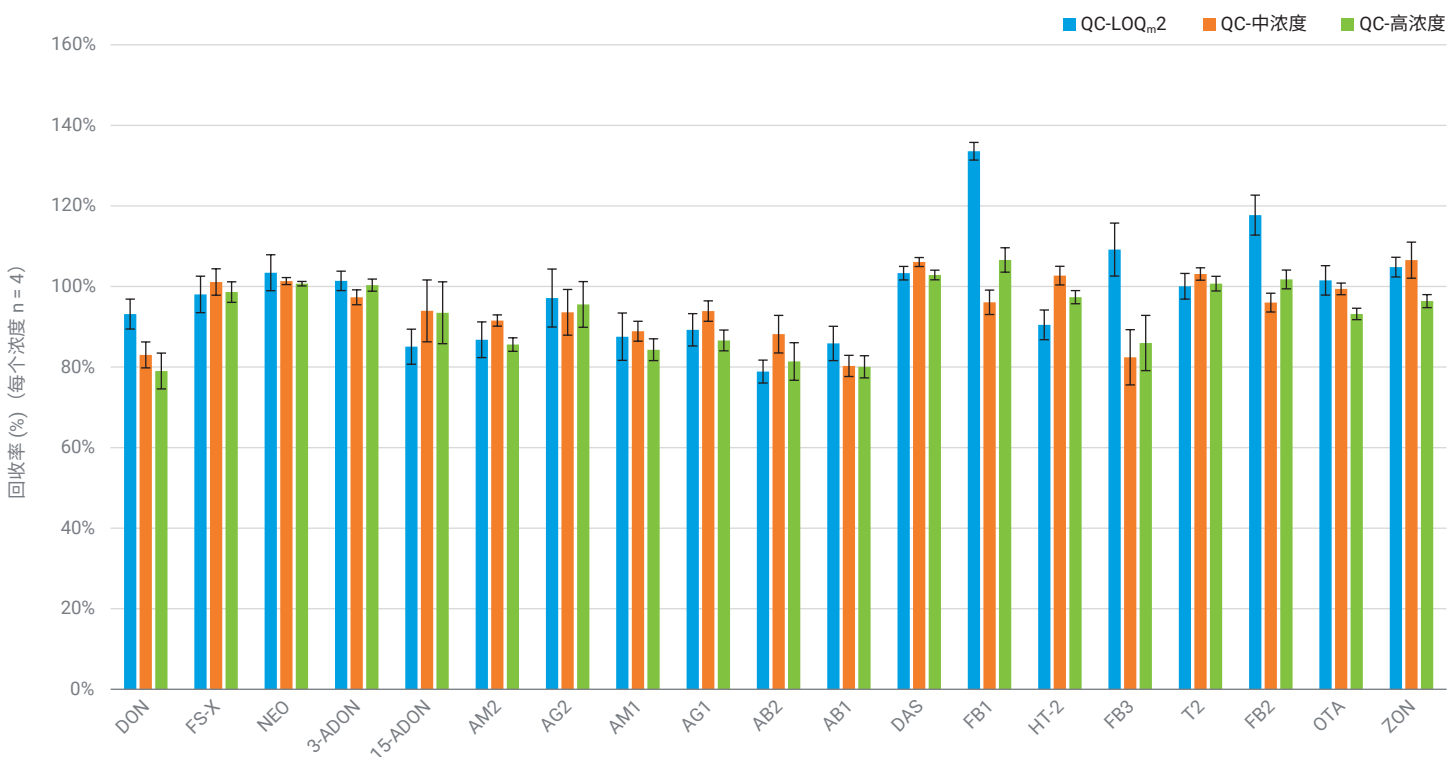


图 4. 通过 QuEChERS 萃取及随后使用 Agilent Captiva EMR 真菌毒素小柱进行混合模式通过式净化所处理的猫粮样品的真菌毒素回收率

## 目标物定量方法验证

表 1 显示了犬粮和猫粮真菌毒素分析的方法验证结果，包括方法 LOQ (LOQ<sub>m</sub>)、所用的 ISTD 以及可报告的预加标 QC 样品定量的准确度和精密度 (RSD)。

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 ISTDs。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，回收率的可接受标准为 65%–135%，且 RSD ≤ 25%。回收率结果表明，所有未

达到可接受标准的目标物均为缺乏相应同位素 ISTDs 的目标物。对于犬粮基质，五种同位素 ISTDs 涵盖除 FS-X 和 FB3 外的所有目标物，得到了可接受的定量结果。对于猫粮基质，五种同位素 ISTDs 涵盖除 OTA 外的所有目标物，得到了可接受的定量结果。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 肯定可以解决定量问题。请注意，在宠物食品中检测到的高浓度 DON、3-ADON 和几种伏马菌素导致方法 LOQs 更高，且用于报告的预加标 QC 浓度水平数量减少。

表 1. 宠物食品中真菌毒素的方法最低可报告 LOQs (计算值) 和经验证的 LOQs (下页续)

真菌毒素	纯标准品 校准曲线 动态范围 (ng/mL)	犬粮					猫粮				
		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)	平均回收率 (%)	RSD (%)
DON	0.15–75	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	75	75*	112	4	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	375	375*	102	9
				–	–	–			–	–	–
				375	99	4			–	–	–
FS-X	0.15–75	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	75	75*	210	7	DON- <sup>13</sup> C <sub>15</sub>	15	15	90	6
				–	–	–			75	98	6
				375	224	16			375	116	1
NEO	0.1–50	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	10	10	80	2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1	1	94	3
				50	89	10			10	93	16
				250	80	6			250	90	1
AM2	0.015–7.5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	91	8	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	94	17
				7.5	66	6			7.5	64	8
				37.5	61	7			37.5	66	5
3-ADON	0.1–50	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	10	10	109	6	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	10	10	91	5
				50	91	4			50	94	8
				250	80	5			250	87	2
15-ADON	0.3–75	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	375	375*	76	12	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	75	75*	90	3
				–	–	–			–	–	–
				–	–	–			375	95	19
AG2	0.002–0.5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.1	0.1	84	16	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.1	0.1	101	9
				0.5	74	11			0.5	107	6
				2.5	75	5			2.5	97	5
AM1	0.015–7.5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	65	19	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1.5	1.5	83	8
				7.5	65	3			7.5	80	7
				37.5	67	7			37.5	79	1

表 1. 宠物食品中真菌毒素的方法最低可报告 LOQs (计算值) 和经验证的 LOQs (续)

真菌毒素	纯标准品 校准曲线 动态范围 (ng/mL)	犬粮					猫粮				
		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)	平均回收率 (%)	RSD (%)
AG1	0.004-2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	92	20	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	114	12
				2	81	3			2	113	4
				10	86	3			10	114	1
AB2	0.001-0.5	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	0.1	0.1	116	11	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	0.5	0.5*	85	8
				0.5	85	10			-	-	-
				2.5	86	6			2.5	83	3
AB1	0.004-2	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.2	0.2	83	12	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.04	0.04	93	11
				2	85	4			0.4	84	9
				10	94	3			10	99	3
DAS	0.1-50	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1	1	115	10	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1	1	84	6
				10	115	3			50	137	2
				250	113	2			250	130	2
HT-2	0.15-75	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	15	15	78	4	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	15	15	101	20
				75	71	7			75	94	3
				375	74	3			375	95	1
FB1	0.2-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	100	100*	83	6	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	20	20*	69	5
				-	-	-			-	-	-
				-	-	-			100	73	2
T2	0.04-20	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.4	0.4	88	10	T2- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	4	4	102	7
				4	105	6			20	105	3
				100	99	4			100	106	3
FB3	0.2-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	20	20*	39	12	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	0.4	0.4	104	10
				-	-	-			4	114	11
				100	49	7			100	108	2
OTA	0.04-20	无	4	4	116	5	无	0.4	0.4	170	6
				20	96	7			4	192	4
				100	99	4			100	168	1
ZON	0.0375-18.75	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.375	0.375	104	5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	3.75	3.75	81	3
				18.75	114	4			18.75	114	11
				93.75	126	5			93.75	108	2
STC	0.01-5	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.1	0.1	96	8	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	1	1	91	5
				1	85	7			5	79	3
				25	95	8			25	75	1
CPA	0.02-10	3-ADON- <sup>13</sup> C <sub>17</sub>	2	2	128	7	AB1- <sup>13</sup> C <sub>24</sub>	0.2	0.2	79	15
				10	126	1			2	75	7
				50	116	8			50	71	2
FB2	0.04-20	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	20	20*	73	5	FB1- <sup>13</sup> C <sub>34</sub>	4	4	128	25
				-	-	-			20	85	7
				100	74	4			100	84	4

\* 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宠物食品中 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 真菌毒素小柱进行混合模式通过式净化，最后进行 LC/MS/MS 检测。与 SIDA 方法相比，所开发的方法在基质去除率、回收率和重现性以及可接受的最终定量准确度和精密度方面得到显著提高。该方法流程简单，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. Yang, L.; Yang, L. H.; Cai, Y.; Luo, Y.; Wang, H.; Wang, L.; Chen, J.; Liu, X.; Wu, Y.; Qin, Y., et al. Natural Mycotoxin Contamination in Dog Food: A Review on Toxicity and Detoxification Methods. *Ecotox. Environ. Safe.* **2023**, 114948. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2023.114948
2. Monbaliu, S.; Van Poucke, C.; Detavernier, C.; Dumoulin, F.; Van De Velde, M.; Schoeters, E.; Van Dyck, S.; Averkieva, O.; Van Peteghem, C.; De Saeger, S. Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 66–71. DOI: 10.1021/jf903859z
3. Alvarenga, I. C.; Dainton, A. N.; Aldrich, C. G. A Review: Nutrition and Process Attributes of Corn in Pet Foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, 62(31), 8567–8576. DOI: 10.1080/10408398.2021.1931020
4. Macias-Montes A.; Rial-Berriel, C.; Acosta-Dacal, A.; Henríquez-Hernández, L. A.; Almeida-González, M.; Rodríguez-Hernández, Á.; Zumbado, M.; Boada, L. D.; Zaccaroni, A.; Luzardo, O. P. Risk Assessment of the Exposure to Mycotoxins in Dogs and Cats Through the Consumption of Commercial Dry Food. *Sci. Total Environ.* **2020**, 708, 134592. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134592
5. Zhao, L.; Zhao, H., Determination of Multiclass Multiresidue Mycotoxins in Dry Corn Kernels and Soybeans Using Captiva EMR Mycotoxins Passthrough Cleanup by LC/MS/MS (使用 Captiva EMR 真菌毒素通过式净化和 LC/MS/MS 对于玉米粒和大豆中的多类别多组分真菌毒素进行测定), 安捷伦科技公司应用简报, 出版号 5994-7373EN, **2024**
6. Zhang, K.; Schaab, M. R.; Southwood, G.; Tor, E. R.; Aston, L.S.; Song, W.; Eitzer, B.; Majumdar, S.; Lapainis, T.; Mai, H. 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(33), 7138–7152. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04872

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)

DE41259898

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 5 月 30 日, 中国出版  
5994-7471ZHCN