应用简报

食品检测与农业

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

作者

Derick Lucas

安捷伦科技有限公司

摘要

多个国家规定了食品中真菌毒素的含量限值。然而，某些食品中含有复杂的蛋白质和脂质，为准确定量分析这些基质中的低浓度真菌毒素带来了很大的挑战。本应用简报介绍了采用快速、简便、经济、高效、耐用和安全 (QuEChERS) 的工作流程和 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化测定固态和液态婴儿配方奶中的 13 种真菌毒素。由于 Captiva EMR-Lipid 吸附剂的高选择性，所有真菌毒素均获得了出色的回收率 (70.4%–106.8%) 和精密度 (RSD < 18%)。这一简单而稳定的方法仅需极少设备和专业技术，因此可轻松应用于食品实验室。

前言

真菌毒素是谷物、玉米和坚果等多种农作物上真菌物种的次级代谢物。当奶牛食用了受污染的饲料后，真菌毒素及其代谢物会分泌到牛奶中[1]。黄曲霉毒素 M1 是牛奶中最常见的真菌毒素，许多国家/地区都对其进行了监测和监管，包括美国和欧洲国家[2,3]。尽管还没有针对牛奶中其他真菌毒素的法规，但对其他真菌毒素（如伏马菌素和赭曲霉毒素）的监测也日渐增多。

由于法规限值非常低，尤其是在婴儿配方奶中，因此，为去除基质干扰以增强低浓度分析物的信号，样品前处理必不可少。免疫分析或 LC/MS 方法，结合样品前处理技术（如免疫亲和、固相萃取 (SPE) 或稳定同位素稀释[4]）可用于分析真菌毒素。但是，复杂的多脂样品由于基质组分（如蛋白质和脂质）浓度较高，其分析尤为棘手。免疫亲和柱价格昂贵，且只能用于特定的分析物、化合物类别或样品类型。其他净化产品可能缺乏对目标分析物的选择性，无法有效去除脂质，从而导致分析重现性差、基质效应明显，并使基质在仪器中聚集。

Agilent Captiva EMR-Lipid 是一款脂质去除产品，结合了体积排阻与疏水相互作用两种净化机制，能够选择性地捕获脂类烃链，同时不损失目标分析物。Captiva EMR-Lipid 净化管现有 3 mL 和 6 mL 两种体积，可提供一种简单的流通式净化，能够从多脂样品萃取物中选择性地去除脂质，适用于多类别、多残留分析。使用 QuEChERS 萃取从液态婴儿配方奶和婴儿配方奶粉中萃取 13 种真菌毒素。QuEChERS 方法因其能够高效萃取多个类别的分析物而著称，但该方法同时也会萃取出大量基质。Captiva EMR-Lipid 过滤柱具有高脂质去除率，有助于分析人员准确定量目标真菌毒素。此外，通过分析婴儿配方奶样品中三种加标浓度下的黄曲霉毒素（AF-B1、B2、G1、G2 和 M1）、赭曲霉毒素（OTA 和 OTB）、伏马菌素（FB1、FB2 和 FB3）、玉米赤霉烯酮 (ZON)、霉酚酸 (MPA) 和杂色曲霉素 (STC) 对该方法进行了验证。对于这类复杂脂肪基质中痕量真菌毒素的分析，该方法表现出了优异的回收率、精密度和灵敏度。

实验部分

样品前处理

- Captiva EMR-Lipid 3 mL 净化管（部件号 5190-1003）
- Captiva EMR-Lipid 6 mL 净化管（部件号 5190-1004）
- QuEChERS Original 萃取盐（部件号 5982-5555）
- VacElut SPS 24 位真空萃取装置（部件号 12234022）

液相色谱配置和参数

配置	
Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)	
Agilent 1290 Infinity II multisampler (G7167B)	
Agilent 1290 Infinity II 高容量柱温箱 (G7116B)	
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 液相色谱柱，2.1 × 100 mm, 2.7 µm（部件号 695775-902） Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 保护柱，2.1 × 5 mm, 2.7 µm（部件号 821725-911）
柱温	40 °C
进样量	5 µL
流动相 A	5 mmol/L 甲酸铵水溶液 + 0.1% 甲酸
流动相 B	1:1 乙腈 (ACN):甲醇 + 0.1% 甲酸
流速	0.5 mL/min
梯度	由 5% B 开始， 保持 1 分钟， 从 50% 升至 60% B（4 分钟）， 然后升至 98% B（7 分钟）， 保持 1 分钟
后运行时间	2 分钟
进样针清洗	1:1:1 水:乙腈:异丙醇，持续 10 秒
样品瓶	2 mL 样品瓶（部件号 5190-4044） PTFE 瓶盖（部件号 5182-0725） 内插管（部件号 5183-2086）

MS/MS 配置

配置	
采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6490 三重四极杆 LC/MS 系统	
MS/MS 模式	动态 MRM
离子模式	正离子/负离子
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器压力	40 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	5000 V
电子增倍器电压 (EMV)	500 V(+) 0 V(–)
喷嘴电压	1500 V(+) 0 V(–)

MS/MS 参数

化合物	母离子	定量离子 (CE)	定性离子 (CE)	碎裂电压 (V)	保留时间 (min)
黄曲霉毒素 M1	329.1	313.0 (24)	115.1 (88)	135	1.842
黄曲霉毒素 G2	331.1	313.0 (24)	115.1 (88)	165	1.916
黄曲霉毒素 G1	329.1	243.2 (24)	200.0 (44)	175	2.018
黄曲霉毒素 B2	315.1	287.0 (28)	259.0 (32)	175	2.104
黄曲霉毒素 B1	313.1	285.2 (24)	128.1 (84)	170	2.223
伏马菌素 B1	722.4	352.3 (36)	334.4 (44)	200	2.810
赭曲霉毒素 B	370.0	205.0 (16)	120.1 (96)	120	3.200
霉酚酸	321.1	302.9 (4)	206.9 (20)	90	3.235
伏马菌素 B3	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	3.676
玉米赤霉烯酮	317.1	175 (24)	131 (28)	175	4.217
伏马菌素 B2	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	4.398
赭曲霉毒素 A	404.1	239.0 (24)	120.1 (96)	120	4.398
杂色曲霉素	325.0	310.0 (24)	281 (40)	150	4.525

表 1. 样品 QC 浓度

分析物	LQ (ng/g)	MQ (ng/g)	HQ (ng/g)
黄曲霉毒素 B1 (AF-B1)	2	10	20
黄曲霉毒素 B2 (AF-B2)	2	10	20
黄曲霉毒素 G1 (AF-G1)	2	10	20
黄曲霉毒素 G2 (AF-G2)	2	10	20
黄曲霉毒素 M1 (AF-M1)	1	5	10
伏马菌素 B1 (FB1)	10	50	100
伏马菌素 B2 (FB2)	10	50	100
伏马菌素 B3 (FB3)	10	50	100
霉酚酸 (MPA)	2	10	20
赭曲霉毒素 A (OTA)	2	10	20
赭曲霉毒素 B (OTB)	1	5	10
杂色曲霉素 (STC)	2	10	20
玉米赤霉烯酮 (ZON)	2	10	20

化学品与试剂

从当地杂货店购买食品样品用于方法定量和基质去除研究。标准品和内标以预混合溶液的形式购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 或 Romer Labs (Getzersdorf, Austria)。LC 溶剂购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。

验证研究

通过分批分析验证婴儿配方奶中的真菌毒素，包括两个双空白样品、两个空白样品、六个校准品和三种 QC 浓度。QC 样品的预加标浓度如表 1 所示，每个样品重复六次 (n = 6)，并在两组校准曲线之间进样。使用六种浓度的校准品绘制校准曲线，如下所示：

- 对于 AF-B1、AF-B2、AF-G1、AF-G2、MPA、OTA、STC 和 ZON，采用 0.25、1、5、10、20、40 ng/mL
- 对于 AF-M1 和 OTB，采用 0.125、0.5、2.5、5、10、20 ng/mL
- 对于 FB1、FB2 和 FB3，采用 1.25、5、25、50、100、200 ng/mL

同位素标记内标 $^{13}C_{17}$-AF-B1 的加标浓度为 5 ng/mL。

样品前处理的详细步骤

对于婴儿配方奶粉 (5 g)，向校准品和 QC 样品中预加标适当浓度的目标分析物，萃取之前，使其完全浸入至少 1 小时。接下来加入 10 mL 水，使其浸入样品中。对于液态婴儿配方奶，使用 10 g 样品进行萃取，并相应地对校准品和 QC 样品预加标，无需再加水。对于婴儿配方奶粉和液态婴儿配方奶，加入 10 mL 乙腈（含 2% 甲酸）和 QuEChERS 萃取盐（4 g $MgSO_4$，1.5 g NaCl），在 Geno/Grinder 上垂直振荡 10 分钟以萃取样品。然后在 5000 rpm 下离心 5 分钟。移取上层乙腈相 (8 mL) 至洁净的 15 mL 试管中，加入 2 mL 水进行稀释（水的体积百分比为 20%）并涡旋混合。将萃取物 (2.5 mL) 上样到 3 mL Captiva EMR-Lipid 净化管，使其在重力作用下流过净化管。待萃取物完全从 Captiva EMR-Lipid 净化管中洗脱之后（约 10 分钟），施加真空，将真空度从 1 增加到 10 英寸汞柱以排空净化管。对于预加标样品，将 0.500 mL 洗脱液转移到自动进样器管中，加入 0.300 mL 含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 甲酸铵。将 0.500 mL 空白洗脱液转移至自动进样器管中，加入 0.270 mL 含 0.1% 甲酸的 5 mmol/L 甲酸铵和 0.030 mL 适当的工作标准溶液，来配制基质匹配的校准物。

结果与讨论

线性

使用 Agilent MassHunter 定量分析软件处理数据。使用线性回归拟合和 $1/x^2$ 加权得到 13 种真菌毒素的校准曲线，其 R^2 值均在 0.992–0.998 之间。所有校准品的准确度都在预期值 ±10% 以内。

准确度和精密度结果

本研究获得了出色的结果，结果汇总如表 2 所示。所有 QC 样品的回收率都在 70%–120% 范围内，所有浓度下的 %RSD 均小于 20，其中大多数分析物的 %RSD 小于 10。由于乙腈对伏马菌素的萃取能力较差，伏马菌素成为了本研究中唯一一类具有挑战性的真菌毒素。优化实验表明，加入 2% 甲酸可大幅提高该类分析物的溶解度，且不会对其他类别的分析物产生不利影响。

EMR-Lipid 机制

EMR-Lipid 的选择性得益于体积排阻和疏水相互作用两种机制的结合。脂类具有线性、无支链的烃链，其分子足够小，可以进入 EMR-Lipid 吸附剂中。一旦进入吸附剂中，脂类就会因疏水相互作用而被牢牢捕获。大多数分析物都不含线性、无支链的烃链结构，因此不会进入吸附剂中，而是留在溶液中以待分析。较短的烃链（少于六个碳原子）与 EMR-Lipid 的结合不够强，因此无法像烃链较长的脂类那样得到有效去除。EMR-Lipid 独特的净化机制以基质干扰物而不是各种类别的分析物为捕集目标，非常适用于多类别、多残留分析。

表 2. 婴儿配方奶中 13 种真菌毒素的回收率和精密度结果 (n = 6)

分析物	液态婴儿配方奶					
	LQ		MQ		HQ	
	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD
黄曲霉毒素 M1	92.6	5.5	96.1	3.7	94.5	3.8
黄曲霉毒素 G2	82.6	2.6	91.4	5.5	87.5	5.1
黄曲霉毒素 G1	86.9	2.4	97.7	3.2	93.7	3.4
黄曲霉毒素 B2	86.9	2.6	97.5	2.7	91.1	4.2
黄曲霉毒素 B1	88.3	1.8	99.6	4.3	92.0	3.2
伏马菌素 B1	80.6	2.1	89.2	3.7	82.5	2.0
赭曲霉毒素 B	89.2	6.7	96.8	2.7	93.2	3.1
霉酚酸	83.0	2.7	92.1	4.6	93.3	3.7
伏马菌素 B3	87.0	4.4	88.1	5.8	90.1	4.6
玉米赤霉烯酮	91.0	2.2	92.5	7.2	88.2	3.4
伏马菌素 B2	82.2	5.3	88.5	4.9	88.0	5.0
赭曲霉毒素 A	84.4	2.3	92.8	5.7	90.5	2.0
杂色曲霉素	85.8	1.9	88.2	7.0	91.4	3.6

分析物	婴儿配方奶粉					
	LQ		MQ		HQ	
	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD
黄曲霉毒素 M1	97.5	5.1	96.9	4.9	100.4	4.6
黄曲霉毒素 G2	100.6	5.5	98.4	1.5	101.9	3.7
黄曲霉毒素 G1	101.5	1.4	98.2	3.3	101.7	5.1
黄曲霉毒素 B2	101.0	3.4	99.3	3.5	102.1	4.2
黄曲霉毒素 B1	99.7	3.6	97.5	3.6	100.5	4.7
伏马菌素 B1	85.1	11.8	85.7	11.1	92.9	12.0
赭曲霉毒素 B	102.5	6.5	98.4	2.8	106.8	4.6
霉酚酸	106.2	6.3	98.8	1.4	101.8	4.6
伏马菌素 B3	76.0	12.8	94.2	17.2	96.8	5.1
玉米赤霉烯酮	99.9	5.6	100.6	2.4	103.2	4.0
伏马菌素 B2	70.4	13.7	73.2	7.6	72.4	10.4
赭曲霉毒素 A	98.1	5.9	97.1	4.3	102.3	3.7
杂色曲霉素	87.5	4.7	87.3	2.7	93.1	3.3

竞争产品比较 — 回收率和精密度

对 Captiva EMR-Lipid（6 mL 小柱）和市售直通式净化产品（竞争产品 A，6 mL，500 mg）的回收率和精密度进行评估。在此次评估过程中，直接对婴儿配方奶萃取物进行加标，以排除萃取过程对回收率和精密度的影响。表 3 中汇总的评估结果表明，使用 Captiva EMR-Lipid 的回收率更高，尤其是对于玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和杂色曲霉素。Captiva EMR-Lipid 独特的吸附剂化学机制能够选择性地捕获脂质，而目前的市售产品往往会将不需要的分析物保留下来（尤其是具有较强疏水性的分析物）。

使用 GC/MS 监测基质去除率

尽管已经使用 LC/MS 完成了验证，但通过比较样品净化产物的 GC/MS 全扫描结果仍可获取有关基质和脂质去除情况的重要信息。图 1 所示为婴儿配方奶在 Captiva EMR-Lipid 净化前后的 GC/MS 全扫描色谱图。黑线为未净化样品的色谱图，表明存在脂质及其他基质共萃取物。Captiva EMR-Lipid 净化后的液态婴儿配方奶（紫线）的去除率为 90%（根据公式 1 计算得到）。晚洗脱基质被完全去除，早洗脱基质显著减少但未完全去除。

表 3. Captiva EMR-Lipid 和竞争产品 A 直通式净化产品的回收率和精密度比较（婴儿配方奶，5 ng/g，n = 4）

分析物	Captiva EMR-Lipid		竞争产品 A	
	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD
黄曲霉毒素 M1	96.1	3.6	93.5	4.4
黄曲霉毒素 G2	100.9	0.5	89.5	4.4
黄曲霉毒素 G1	102.4	1.6	86.1	4.8
黄曲霉毒素 B2	100.8	3.2	84.2	4.7
黄曲霉毒素 B1	98.4	4.0	85.3	5.5
伏马菌素 B1	96.6	3.4	77.3	3.8
赭曲霉毒素 B	104.9	6.4	76.7	7.5
霉酚酸	90.8	7.2	79.3	7.0
伏马菌素 B3	103.1	11.6	76.8	11.5
玉米赤霉烯酮	96.1	3.1	46.7	7.5
伏马菌素 B2	85.0	6.9	85.1	9.6
赭曲霉毒素 A	95.1	10.9	66.4	11.7
杂色曲霉素	99.6	4.1	50.1	10.3

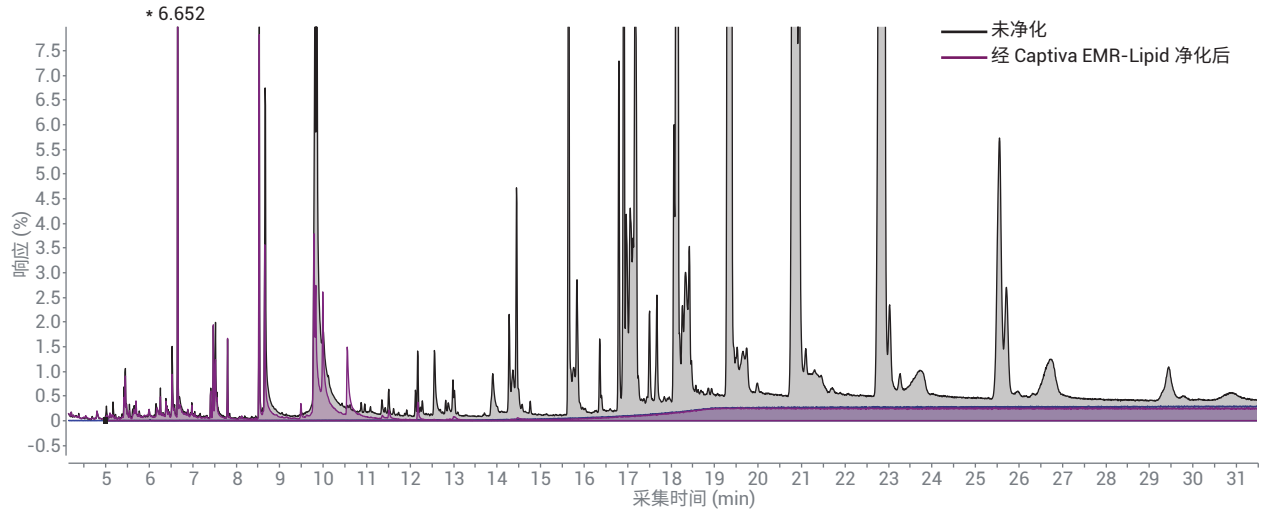

图 1. 通过比较婴儿配方奶样品经 Captiva EMR-Lipid 净化前后的 GC/MS 全扫描色谱图来评估基质去除率

$$\%\ 基质去除率 = \frac{(峰面积_{未净化的空白样} - 峰面积_{经\ Captiva\ 净化的空白样})}{(峰面积_{未净化的空白样} - 峰面积_{试剂空白})} \times 100$$

公式 1. 使用色谱图中的总峰面积计算基质去除百分比的公式

结论

本研究证明 Captiva EMR-Lipid 是一种简便有效的净化方法，适用于多种真菌毒素的分析。婴儿配方奶的验证结果表明方法具有优异的回收率（70.4%–106.8%）和精密度 (RSD < 18%)，且灵敏度可达 1.0 ng/g。GC/MS 全扫描结果表明该方法可实现高效净化。产品比较结果表明，使用 Captiva EMR-Lipid 的真菌毒素回收率远优于其他市售净化产品。该方法在多种应用中都具有较高的基质脂质去除率以及分析物回收率，但其中一些应用不在本研究的范围之内[5,6]。Captiva EMR-Lipid 代表了用于多类别、多残留分析的新一代选择性脂质净化产品，对于需要简化样品前处理并改善方法性能的实验室而言，该产品是理想之选。

参考文献

1. Jard, G.; *et al.* Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* **2011**, *11*, 1590-1609
2. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed. http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm#afla（**2018** 年 8 月 27 日访问）
3. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701（**2018** 年 8 月 27 日访问）
4. Zhang, K.; et al. Determining Mycotoxins in Baby Foods and Animal Feeds Using Stable Isotope Dilution and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 8935-8943
5. Zhao, L.; Lucas, D. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 过滤柱净化和 LC/MS/MS 分析牛肉中的多类别兽药多残留，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8598ZHCN
6. Lucas, D.; Zhao, L. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 样品净化产品和 LC/MS/MS 分析奶酪中的多种真菌毒素，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-8694ZHCN

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

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，2018

2018 年 10 月 19 日，中国出版
5994-0365ZHCN

Agilent
Trusted Answers