

在Xevo TQ-XS上使用简化的样品制备条件对LC-MS/MS法定量测定谷物粉中的管制真菌毒素进行方法开发与验证

Nicola Dreolin, Sara Stead

Waters Corporation

摘要

本应用纪要介绍了定量分析小麦面粉中多种真菌毒素的方法验证，进一步扩展该方法以分析一系列不同的谷物粉。

优势

LC-MS/MS法可同时对谷物粉和干制食品中最重要的管制真菌毒素进行完整的定量分析，采用快速、简单的样品制备策略，符合监管限值和方法性能指南的要求。

简介

真菌毒素是由各种霉菌产生的有毒次级代谢物，这些霉菌可在田间或储存期内生长于许多农产品和加工食品上^{1,2}。它们在慢性饮食风险因素中位居榜首，优先级高于合成污染物、植物毒素、食品添加剂或农药残留³。

欧盟委员会法规No.1881/2006（及后续修正案）⁴规定了不同食品中黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2、伏马菌素B1和B2、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、毒素T-2和HT-2、玉米赤霉烯酮和曲霉毒素A的最高允许浓度(MPL)。EFSA的最新科学意见将雪腐镰刀菌烯醇的每日可耐受摄入量(TDI)确定为每日每kg体重1.2 μg⁵，其最高平均浓度通常见于燕麦、玉米、大麦和小麦产品中。2018年，RASFF门户网站发布了25份有关谷物中严重真菌毒素污染的通报⁶。因此，我们将方法开发的重点放在谷物食品上，因为此类食品被视为真菌毒素污染的高风险商品。

本文介绍了定量分析小麦面粉中多种真菌毒素的方法验证，进一步扩展该方法以分析一系列不同的谷物粉。选择Waters Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪的原因在于，它具有优异的灵敏度，并且允许分析人员实施简单的样品制备过程，从而缩短总体分析时间。本应用考察了同位素标记内标的使用，该方法与广泛采用的外标法或标准加入法相比，可实现更优异的性能。根据修订后的欧盟委员会法规No.401/2006和SANTE指导原则所述的标准，对分析程序进行评估^{7,8}。

实验

样品处理

称取粉末状样品材料(0.500 ± 0.005 g)至5 mL塑料离心管中，并加入50 μL内标混合物。向混合物中加入1950 μL提取溶液（乙腈:水79:20+0.75%乙酸+0.2%甲酸），剧烈振荡离心管10秒，然后在自动涡旋混合器中放置10 min（脉冲速度1300）。在5000 rpm (5311 g)下离心后，将150 μL上清液转移至2 mL液相色谱样品瓶中，然后加入1350 μL稀释剂（H₂O+0.5%乙酸+0.1%甲酸），*得到的最终稀释因子为40。

*若最终提取物中存在颗粒，按以下步骤进行过滤：取1 mL上清液通过0.2 μm GHP针式过滤器（部件号：[WAT097962 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat097962-acrodiscghp13mm-02-m-w-minispike-100-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat097962-acrodiscghp13mm-02-m-w-minispike-100-pk.html)）进行过滤，用稀释剂将150 μL过滤后的提取物按1:10的比例稀释到液相色谱样品瓶中，然后进样分析。

制备校准标准品

通过混合和稀释各个储备液，制得包含12种目标真菌毒素的溶剂校准曲线（溶液组成保持水:乙腈95:5+0.5%乙酸+0.1%甲酸），生成的浓度与适当的MPL相对应。使用八个校准点（不包括空白）创建校准曲线。按照相同的方案，用空白小麦面粉提取物进行稀释，制得基质匹配校准曲线。在液相色谱样品瓶中，直接将混合内标溶液的等分试样(10 μL)加入400 μL各个浓度的标样中，绘制两条校准曲线。

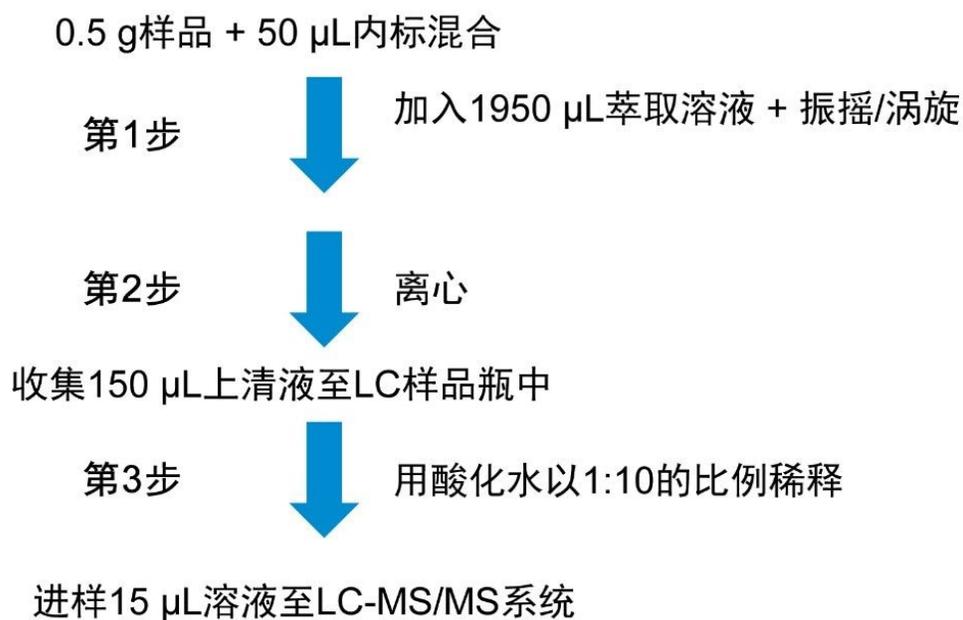


图1. “萃取-稀释-上样” 样品制备方法

液相色谱条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class, 配备固定定量环(50 μ L)样品 管理器
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μ m, 2.1 \times 100 mm (部件号: 186002352)
流动相A:	甲醇 + 0.5%乙酸 + 0.1%甲 酸
流动相B:	1 mM乙酸铵水溶液 +0.5%乙酸+0.1%甲酸

*强洗针液: H₂O+20 mM柠檬酸:甲醇:乙腈:异丙醇:丙酮:二甲亚砜
37:9:18:18:9:9 (清洗体积
900 μL)

*弱洗针液: H₂O:MeCN 1:1+0.125 mM
EDTA (清洗体积1200 μL)

流速: 0.4 mL min⁻¹

进样体积: 15 μL (带针溢出的部分定
量环进样, 5 μL针溢出冲洗
)

柱温: 40 °C

样品温度: 15 °C

*研究发现, 正确选择自动
进样器清洗溶液对于尽可能
减少残留以达到可接受水平
至关重要, 对于伏马菌素B2
和黄曲霉毒素B1尤其如此。

LC梯度:

时间(min)	%A	曲线
0.0	5	?
0.7	5	6

时间(min)	%A	曲线
6.5	50	6
9.5	100	6
12.5	100	6
12.6	5	6
14.0	5	6

质谱条件

仪器:	Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪
电离模式:	ESI(+/-)
毛细管电压:	+0.5/-0.3 kV
电离源补偿:	30 V
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	800 L h ⁻¹
锥孔气流速:	150 L h ⁻¹
喷雾器气流:	7.0 bar

碰撞气体流速:

0.15 mL min⁻¹ (氦气)

每种分析物均监测到两个通道, 其中一个通道用于相应的¹³C标记的异构体 (表1)。在混合注入不同标准溶液的过程中, 通过手动调谐优化锥孔电压和碰撞能量, 这些标准溶液中包含各种分析物, 洗脱以梯度方式进行。根据灵敏度最低的化合物对离子源电压、气体流速和温度进行优化。利用MassLynx软件4.2版采集数据, 并用TargetLynx XS应用软件处理数据。

分析物	加合物	母离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碎片离子 (m/z)	碰撞能量 (eV)	离子丰度比
黄曲霉素B1 (AFB1)	[M+H] ⁺	313.00	30	285.00	23	0.89
¹³ C ₁₇ -AFB1		330.10		241.00	37	
				301.02	23	
黄曲霉素B2 (AFB2)	[M+H] ⁺	315.00	30	287.00	25	0.93
¹³ C ₁₇ -AFB2		332.06		259.00	28	
				303.10	25	
黄曲霉素G1 (AFG1)	[M+H] ⁺	329.00	25	243.00	26	0.42
¹³ C ₁₇ -AFG1		346.00		283.00		
				257.00	26	
黄曲霉素G2 (AFG2)	[M+H] ⁺	331.05	25	313.20	25	0.66
¹³ C ₁₇ -AFG2		348.00		245.05	30	
				330.00	25	
伏马菌毒素B1 (FB1)	[M+H] ⁺	722.00	30	334.30	40	0.97
¹³ C ₃₄ -FB1		756.10		352.30	35	
				374.20	40	
伏马菌毒素B2 (FB2)	[M+H] ⁺	706.30	30	336.40	36	0.52
¹³ C ₃₄ -FB2		740.20		318.40	37	
				358.20	36	
赭曲霉毒素A (OTA)	[M+H] ⁺	404.10	25	239.00	25	0.48
¹³ C ₂₀ -OTA		424.00		221.00	36	
				250.00	25	
玉米赤霉烯酮 (ZEA)	[M+H] ⁺	319.25	20	185.00	25	0.97
¹³ C ₁₈ -ZEA		337.00		187.10	19	
				199.15	19	
HT-2毒素(HT-2)	[M+NH ₄] ⁺	442.17	25	263.15	12	0.98
¹³ C ₂₂ -HT-2		464.10		215.13		
				278.00	12	
T-2毒素(T-2)	[M+NH ₄] ⁺	484.25	25	185.10	22	0.93
¹³ C ₂₄ -T-2		508.00		215.15		
				198.10	22	
脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)	[M+H] ⁺	297.15	15	249.10	10	0.50
¹³ C ₁₅ -DON		312.15		231.10	12	
				263.05	10	
雪腐镰刀菌烯醇(NIV)	[M-H] ⁻	371.00	10	281.00	15	0.74
¹³ C ₁₅ -NIV		386.00		311.00	10	
				294.98	15	

表1.分析物及其相应的¹³C同位素标记类似物的MRM通道。定量通道以粗体显示。 .

结果与讨论

线性、检测限和定量限 (LOD和LOQ)

使用外标法和内标法，在测试的浓度范围内验证方法线性。利用加权因子(1/x)绘制校准曲线。

如果采用内标法，则对[分析物响应/内标响应]比与[分析物浓度/内标浓度]比进行作图。所有回归方程的决定系数(R^2)均介于0.9941~1.0000之间，整个校准范围内的残差百分比低于20%。针对本研究的目的，采用溶剂校准曲线中的最低浓度点作为仪器定量限(LOQ)。同时采用线性校准范围内的最低加标浓度作为方法LOQ。随后，按照Eurachem指南的规定⁹，将10个不同空白样品的“调整后”标准偏差分别乘以因数3和10，对方法LOD和LOQ进行验证。如果空白基质样品未获得信号，则以线性范围内最低浓度加标的小麦面粉样品进行10次独立的重复测定。此外，在与仪器LOQ和方法LOQ相当的浓度下，获得的信噪比(S/N)均大于10。该方法对黄曲霉毒素化合物的检测能力最差，其LOD（由溶剂标准品测得）为0.75~0.93 pg mL^{-1} （相当于11~14 fg 柱上进样量）。对于其他目标真菌毒素化合物，Xevo TQ-XS能够实现浓度范围介于0.0075~1.5 ng mL^{-1} （相当于0.1~22.5 pg 柱上进样量）之间的LOD。

Xevo TQ-XS具备出色的灵敏度，使分析人员能够对谷物基质进行简单的溶剂萃取和稀释，省去耗时的预浓缩或净化步骤，从而提高总体实验室效率，并减少溶剂消耗量。

正确度、日内重复性和基质效应

使用萃取前加标的基质确定回收率百分比，用于估计方法正确度。将12种目标真菌毒素以三种不同浓度水平加标至小麦面粉样品中，浓度水平涵盖方法LOQ并以大部分化合物的相关MPL作为两端值。

分析物	仪器 LOD/LOQ (pg/mL ⁻¹)	方法LOD/LOQ (µg kg ⁻¹)	方法线性范围 (µg kg ⁻¹)	小麦中的 最大允许浓度 (µg kg ⁻¹) ^a
AFB1	0.75/2.5	0.03/0.1	0.1-50	2.0
AFB2	0.93/3.1	0.04/0.1	0.1-50	4.0 (B1、B2、G1、G2之和)
AFG1	0.75/2.5	0.03/0.1	0.1-50	
AFG2	0.93/3.1	0.04/0.1	0.1-50	
FB1	75/250	3/10	10-2000	
FB2	75/250	3/10	10-2000	1000 (玉米基质食品中的 B1、B2之和)
OTA	7.5/25	0.3/1.0	1.0-100	3.0
ZEA	37/123	1.5/5.0	5.0-500	75
HT-2	45/150	1.8/6.0	6.0-600	50 (T-2与HT-2之和, 推荐值) 10
T-2	45/150	1.8/6.0	6.0-600	
DON	90/300	3.6/12	12-2400	750
NIV	1500/5000	60/200	200-20000	—

表2.在小麦面粉中检测真菌毒素所得的线性、检测限和定量限以及允许限值

在日内重复性条件下，对各浓度水平的样品进行七次独立的重复分析，获得回收率(%)和相对标准偏差(RSD_r)。IUPAC对回收率与表观回收率(R_A)进行了区分¹¹。R_A又称为工艺效率(PE)，表示通过校准曲线从分析过程获得的观测值除以已知参比值或理论值的比率，也被称为方法总体回收率或总回收率。术语“回收率”(R_E)本身用于表示分析物在分析过程的预浓缩或萃取阶段的产量除以原始样品中分析物的含量。R_A是R_E与基质效应(ME)共同作用的结果：

$$R_A (\%) = (C_1 - C_0) / C_s \times 100 \quad ME (\%) = b_M / b_S \times 100 \quad R_E (\%) = R_A / ME \times 100$$

其中C₁是以浓度C_S加标样品后计算出的分析物浓度；C₀是未加标样品中计算出的分析物浓度；b_M和b_S分别是基质匹配曲线和溶剂校准曲线的斜率。表观回收率、回收率和基质效应均列于表3中。R_A也可使用内标法计算得出（内标R_A）。图2表明，使用内标校正时，表观回收率（三个加标浓度之间的平均值）作为基质效应与分析物损失综合作用的结果，处于95~105%的窄范围内。

分析物	加标水平	加标浓度 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R_A (%)	M_E (%)	信号增强/ 抑制因子	R_E (%)	I.S. R_A (%)	RSD_i (%)	I.S. RSD_i (%)
AFB1	1	0.10	189	166	1.7	114	97	2	3
	2	1.7	176			106	97	3	1
	3	6.0	157			94	94	8	2
AFB2	1	0.12	136	113	1.1	120	100	1	4
	2	3.0	115			102	95	8	1
	3	5.0	114			100	95	7	1
AFG1	1	0.10	152	137	1.4	112	95	3	1
	2	1.7	142			104	96	3	1
	3	6.0	116			85	92	13	2
AFG2	1	0.12	121	115	1.2	105	98	2	2
	2	3.0	96			84	97	13	1
	3	5.0	95			83	96	15	1
FB1	1	10	66	70	0.7	93	107	8	9
	2	60	50			71	101	4	3
	3	200	47			67	99	6	3
FB2	1	10	64	75	0.8	85	101	5	2
	2	60	70			94	90	4	7
	3	200	71			95	103	4	2
OTA	1	1.0	992	1141	11.4	87	102	11	3
	2	3.3	810			71	107	8	4
	3	12	856			75	101	7	1
ZEA	1	5.0	571	793	7.9	72	101	15	4
	2	17	658			83	104	13	1
	3	60	594			75	101	21	2
HT-2	1	6.0	114	100	1.0	114	107	11	3
	2	35	83			83	102	23	1
	3	70	77			77	100	25	1
T-2	1	6.0	149	146	1.5	102	107	6	4
	2	35	115			79	107	12	3
	3	70	120			82	115	12	1
DON	1	12	118	100	1.0	118	100	13	4
	2	70	93			93	94	14	1
	3	235	78			78	92	20	1
NIV	1	200	96	69	0.7	139	102	4	5
	2	1175	82			118	97	3	4
	3	4000	80			115	97	3	3

表3.根据小麦面粉基质的验证数据获得的方法准确度参数和基质效应。加标浓度1=方法LOQ；加标浓度2和3处于线性范围内。

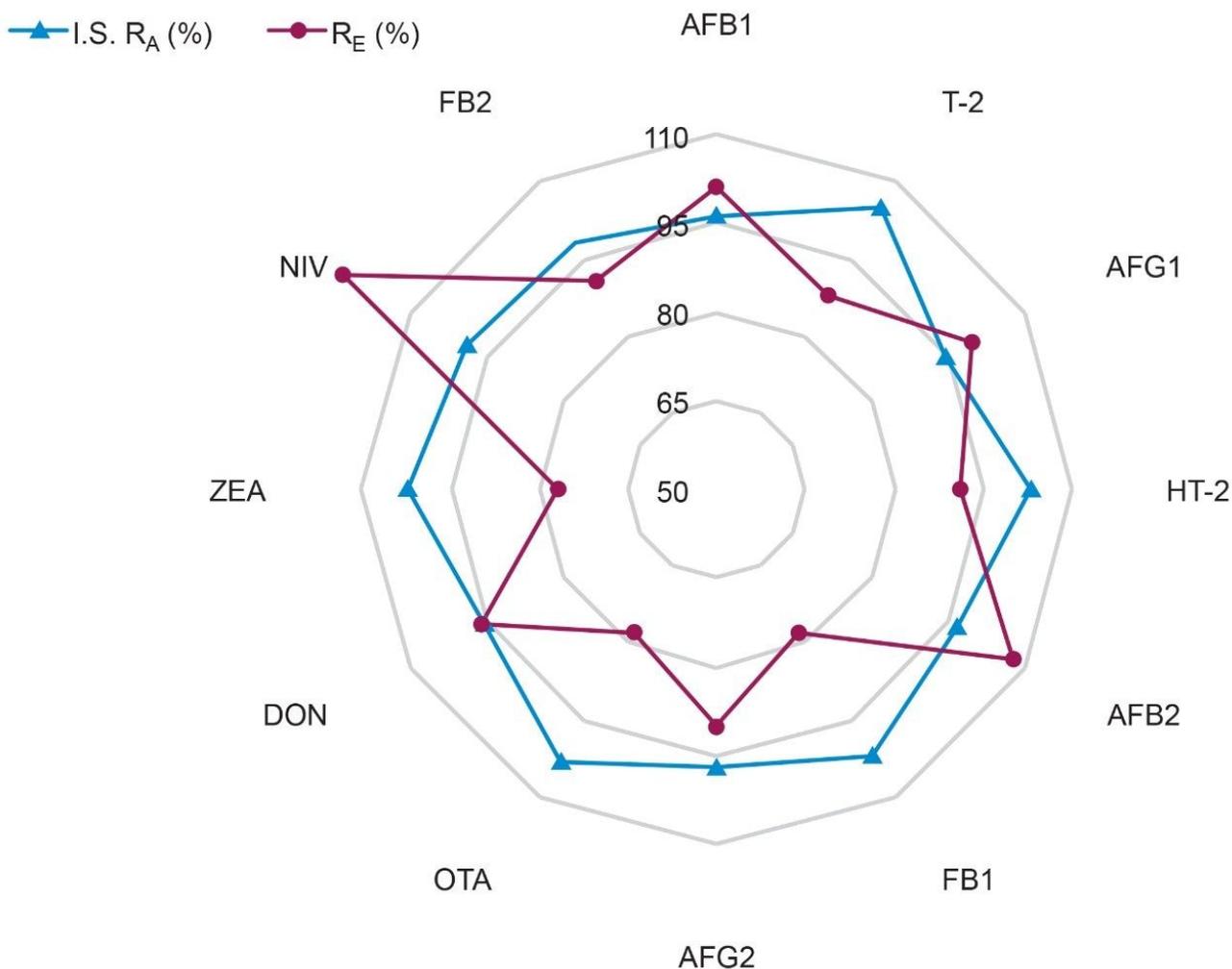


图2.使用内标法比较方法回收率（完全与样品制备过程的产量相关）和表观回收率得到的RADAR图，其中表观回收率是回收率与基质效应综合作用的结果。

回收率和 RSD_r 符合欧盟委员会法规No.519/2014（作为EC法规No.401/2006的修订案）附录II中规定的性能标准¹²，如预期一样，发现内标法能够改善方法正确性和精密度（在所有情况下， $RSD_r \leq 9\%$ ）。

在整个重复性研究中，目标真菌毒素获得了以高斯分布形状呈现的色谱峰，其保留时间(RT)至少为分析柱死体积的2倍（图3）。RT偏差在可接受阈值 ± 0.05 min的范围内。¹³C同位素标记真菌毒素类似物（用作内标）的RT和峰形与目标化合物完全一致。未知样品中的离子丰度比介于根据同一序列内校准标准品平均值计算所得离子丰度比 $\pm 30\%$ 的范围内。

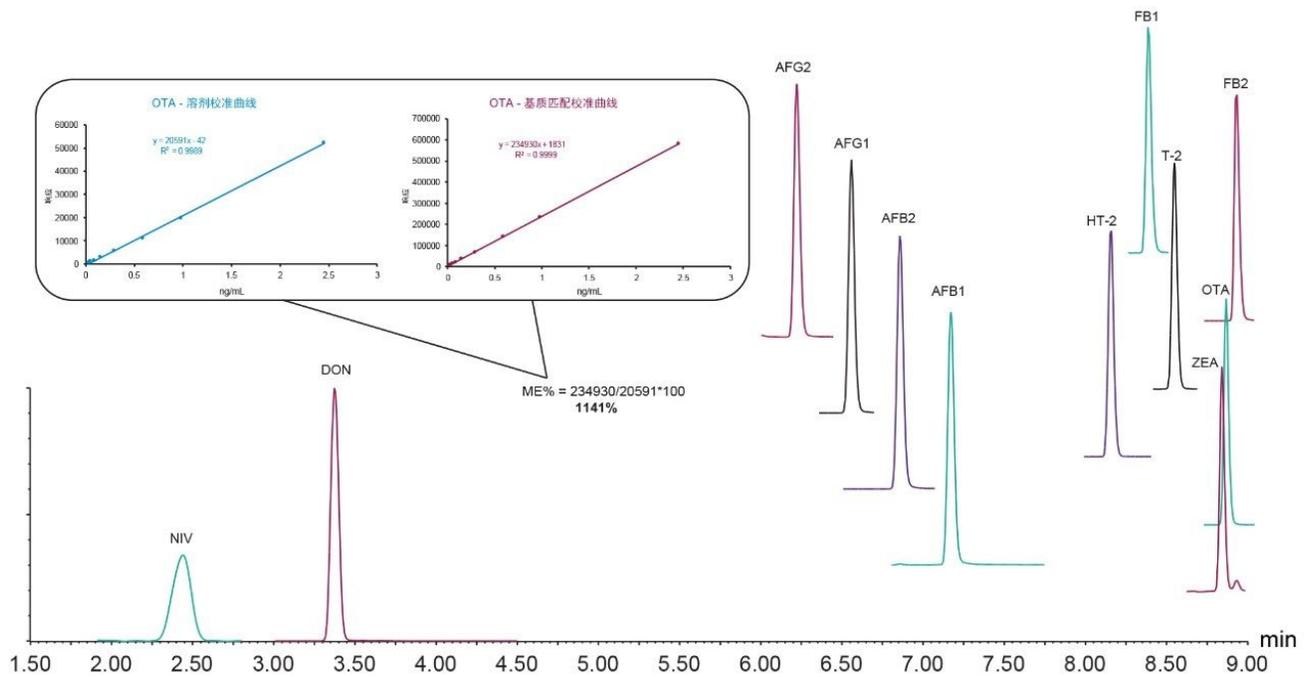


图3.基质匹配校准曲线中第五个浓度点的色谱图（未应用平滑处理）。插图展示了溶剂和基质中赭曲霉毒素A的校准曲线，突出展示了影响该化合物的巨大基质增强效应。

外标数据突出展示了可变基质效应挑战（之前曾在真菌毒素分析中报告）的重要性。在本例中，受到的基质效应范围为从雪腐镰刀菌烯醇信号抑制30%以上，到赭曲霉毒素A信号增强1000%以上。这一发现清楚地证明了使用同位素标记内标的合理性，即，有助于提高定量准确度并消除不同基质的影响，从而允许使用根据溶液标准品绘制的校准曲线。

分析人员可以选择添加内标混合物至最终的稀释后提取物中，然后直接加入LC样品瓶，从而降低分析成本（即，添加10 μL ~400 μL 的稀释后提取物可以将内标消耗量降低到原来的五分之一）。此方法还可以放大整个样品制备过程，例如，称取更多样品并使用更大的萃取溶液，同时保证样品提取溶剂/样品重量的比值等于4。在流程结束时添加IS可能存在一个弊端，即此时方法性能可能降低，因为IS不会补偿分析物损失。

如果无法获取内标，也可以通过创建合适的基质匹配校准曲线实现可靠定量。然而，需要注意的是，要获得真正的“空白”参比物质并非易事，在处理各种不同的商品时尤其如此。

验证研究中使用的零售小麦面粉样品在标签说明中还包含其他标示的添加剂，其中包括维生素（烟酸和硫胺素）和碳酸钙。虽然存在这些添加剂，但无论使用外标法还是内标法进行计算，所有目标真菌毒素均获得了优异的

选择性和线性（线性范围涵盖100倍或更高），如表2所示。

将方法扩展至其他基质

除小麦面粉外，该方法还适用于分析燕麦片（燕麦）以及不同面粉（大米、马铃薯、木薯、玉米和荞麦，含磷酸一钙、碳酸氢钠和黄原胶等添加剂）的无麸质混合物。所有样品均购自当地市场，并在筛选后才用于分析。分析发现，某些样品中包含痕量水平的T-2毒素和脱氧雪腐镰刀菌烯醇，但这些毒素的浓度远低于允许限值。向每个样品中加入12种真菌毒素混标，一式三份，加标浓度为计算出的小麦面粉的LOQ浓度。在萃取之前加入内标(50 μ L)，并根据实验部分所述的程序分析样品。

对于其他面粉，在LOQ水平下观察到所有分析物的回收率均与主要基质（小麦）的回收率相当，信噪比 >10 。上述结果证实，即使存在各种成分和添加剂，该分析方法也具有较好的选择性。

分析物	基质	加标浓度 ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	I.S. R_A (%)	S/N
AFB1	燕麦	0.10	101	248
	混合面粉	0.10	95	85
AFB2	燕麦	0.12	103	40
	混合面粉	0.25	110	202
AFG1	燕麦	0.10	98	125
	混合面粉	0.50	95	463
AFG2	燕麦	0.12	97	27
	混合面粉	0.12	109	24
FB1	燕麦	10	97	34
	混合面粉	10	99	99
FB2	燕麦	10	93	365
	混合面粉	10	114	272
OTA	燕麦	1.0	105	297
	混合面粉	1.0	105	81
ZEA	燕麦	5.0	98	81
	混合面粉	5.0	81	30
HT-2	燕麦	6.0	91	109
	混合面粉	6.0	107	67
T-2	燕麦	6.0	82	471
	混合面粉	6.0	102	667
DON	燕麦	12	100	362
	混合面粉	12	97	476
NIV	燕麦	200	98	11
	混合面粉	200	96	20

表4.使用内标定量法得到的该方法在不同基质中LOQ水平下的表观回收率数据。根据不经额外处理的半高峰宽（信号）和峰到峰噪音（噪音），计算定量通道的信噪比(S/N)。

结论

- Xevo TQ-XS法被视为定量分析干谷物食品（例如，小麦、燕麦、玉米、大米和荞麦基食品）中欧盟管制真菌毒素的“适宜”方法。
- 利用Xevo TQ-XS优异的灵敏度以及MRM采集模式出色的选择性，极大地简化了样品制备程序，从而缩短了总体分析时间并减少了试剂消耗量。
- 在分析工作流程中加入¹³C标记的内标可提高方法性能，因此，建议将其作为校正真菌毒素分析相关基质效应和样品制备过程中不可避免的分析物损失的有效方法。内标法使分析人员可以避免使用基质匹配校准曲线，而是采用溶剂校准曲线实现准确定量。根据特定的分析要求，可在萃取之前或之后加入内标。
- 此外，使用内标还可以实现方法转移，以便分析更多不同的商品（包括干香料）。

参考资料

1. Hussein, H. S.; Brasel, J. M. Toxicity, Metabolism, and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *Toxicology*, 2001. DOI: 10.1016/S0300-483X(01)00471-1.
2. Bennett, J. W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003. DOI: 10.1128/CMR.16.3.497-516.2003.
3. Sulyok, M.; Berthiller, F.; Krska, R.; Schuhmacher, R. Development and Validation of a Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometric Method for the Determination of 39 Mycotoxins in Wheat and Maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. DOI: 10.1002/rcm.2640.
4. European Commission Regulation No.1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Annex, section 2.
5. Scientific Opinion on Risks for Animal and Public Health Related to the Presence of Nivalenol in Food and Feed. *EFSA Journal*, 2013;11(6):3262.
6. <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList> < <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1>> (accessed on July 17, 2019).
7. 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.

8. SANTE/12089/2016.Guidance Document on Identification of Mycotoxins in Food and Feed.Implemented by 01/01/2017.
9. B. Magnusson and U. Örnemark (eds.)Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed.2014).ISBN 978-91-87461-59-0.
10. European Commission Recommendation No.2013/165 of March 27, 2013 on the Presence of T-2 and HT-2 Toxin in Cereals and Cereal Products
11. Burns, D. T.; Danzer, K.; Townshend, A.Use of the Terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in Analytical Procedures.Pure *Appl.Chem.*2002, 74 (11) 2201–2205.
12. European Commission Regulation No.519/2014 of May 16, 2014 amending Regulation (EC) No.401/2006 as Regards Methods of Sampling of Large Lots, Spices and Food Supplements, Performance Criteria for T-2, HT-2 Toxin and Citrinin and Screening Methods of Analysis.

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

Xevo TQ-XS三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134889751>>

720006685ZH, 2021年3月修订

©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号