

应用纪要

利用实验室间研究对一种通过LC-MS/MS测定谷物中管制真菌毒素的简单方法进行性能评价

Nicola Dreolin, Janitha De-Alwis, Dimple D. Shah, Joanne Williams, Sarah Dowd, Nicole Baumgarten, Stuart Adams, Simon Hird

Waters Corporation



这是一份应用简报，不包含详细的实验部分。

摘要

沃特世先前针对一种用于测定不同谷物中12种欧盟管制真菌毒素的方法报道了开发和单一实验室验证工作，该方法采用LC-MS/MS技术并需要先进行简单且无需净化的通用提取步骤。本应用简报证明实验室间研究能够成功评价该方法的性能。本研究将2种谷物FAPAS质控品发往位于欧洲和美国的4家实验室。每种质控品均由4家实验室进行3次重复分析。这些实验室证明该方法在测定2种FAPAS质控品中的8种真菌毒素时具有良好的准确度和精密度。报告的浓度与FAPAS提供的认定值一致。正确率在85%~113%范围内，实验室内重复性为3.0%~13%，实验室间重现性为3.1%~23%。这些结果符合欧盟委员会设定的性能标准，证明该方法是监测谷物中真菌毒素的理想方法，既适用于官方管控，也适用于食品经营者检测。

优势

- 分析方法便于实施，涵盖从提取到测定的所有步骤
- 在不同地区的多家实验室应用时方法性能相当

简介

真菌毒素是丝状真菌的次级代谢物，可通过生产、加工、运输和储存等多种污染途径出现在食物和农产品中。真菌毒素会对人类和动物的健康产生巨大的不利影响，使财务收益遭受重大损失，还有可能导致品牌和声誉资产流失。世界上许多国家均在进行毒性、发生率和消费数据以及经济和政治方面的全面风险评估后，对常见真菌毒素实行了管制。例如，欧盟委员会1881/2006号法规针对多种不同食品中的黄曲霉毒素B1、B2、G1和G2、伏马菌素B1和B2、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮以及赭曲霉毒素A设定了最大限值，并为T-2和HT-2毒素设定了指导限值^{1,2}。

因此需要分析检测来检查是否符合此类法规。通过一种方法测定多种真菌毒素时需要利用通用提取条件来确保不同类型的真菌毒素均得到回收。先前的研究已证明，得益于LC-MS/MS的灵敏度和选择性，首选方法通常是仅稀释提取物且无需净化³。本文报告的结果来自一项实验室间研究，旨在进一步评价该方法的性能。

结果与讨论

本研究向4家实验室（1家位于奥地利，1家位于英国，2家位于美国）提供了以下各项：

- ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 1.7 μm, 2.1 x 100 mm (部件号: 186002352 <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186002352-acquity-uplc-beh-c18-column-130a-17--m-21-mm-x-100-mm-1-pk.html>>)
- 分析方案(720006685EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-ms-ms-method-development-and-validation-for-the-quantitative-determination-of-regulated-mycotoxins-in-cereal-grain-flours-using-simplified-sample-preparation-conditions-on-xevo-tq-xs.html>>), 包括目标真菌毒素、所用方法的详细信息以及分析运行序列
- FAPAS质控品: T04366QC (玉米粉) 和T04359QC (玉米粉)
- 提前制备的校准标样 (溶液形式)
- ¹³C标记的类似物储备液 (用作内标)

本研究要求4家实验室采用所提供的方法分析2种FAPAS质控品中目标方法适用的12种真菌毒素 (重复提取3次)³。校准标样在威姆斯洛 (英国实验室) 用溶剂制好后再分发。FAPAS质控品中真菌毒素的浓度通过分段式内标校正法确定。每家实验室均采用ACQUITY UPLC系统联合Xevo TQ-XS串联四极杆质谱仪完成分析。

每家实验室均成功应用了发表的色谱方法, 所以每种目标化合物的峰形和保留时间均与参比实验室的对应值相似。最早流出的雪腐镰刀菌烯醇峰的保留时间是色谱柱死体积所对应保留时间的两倍以上⁴。图1所示为1种FAPAS质控品中所检出分析物的典型色谱图和响应值。

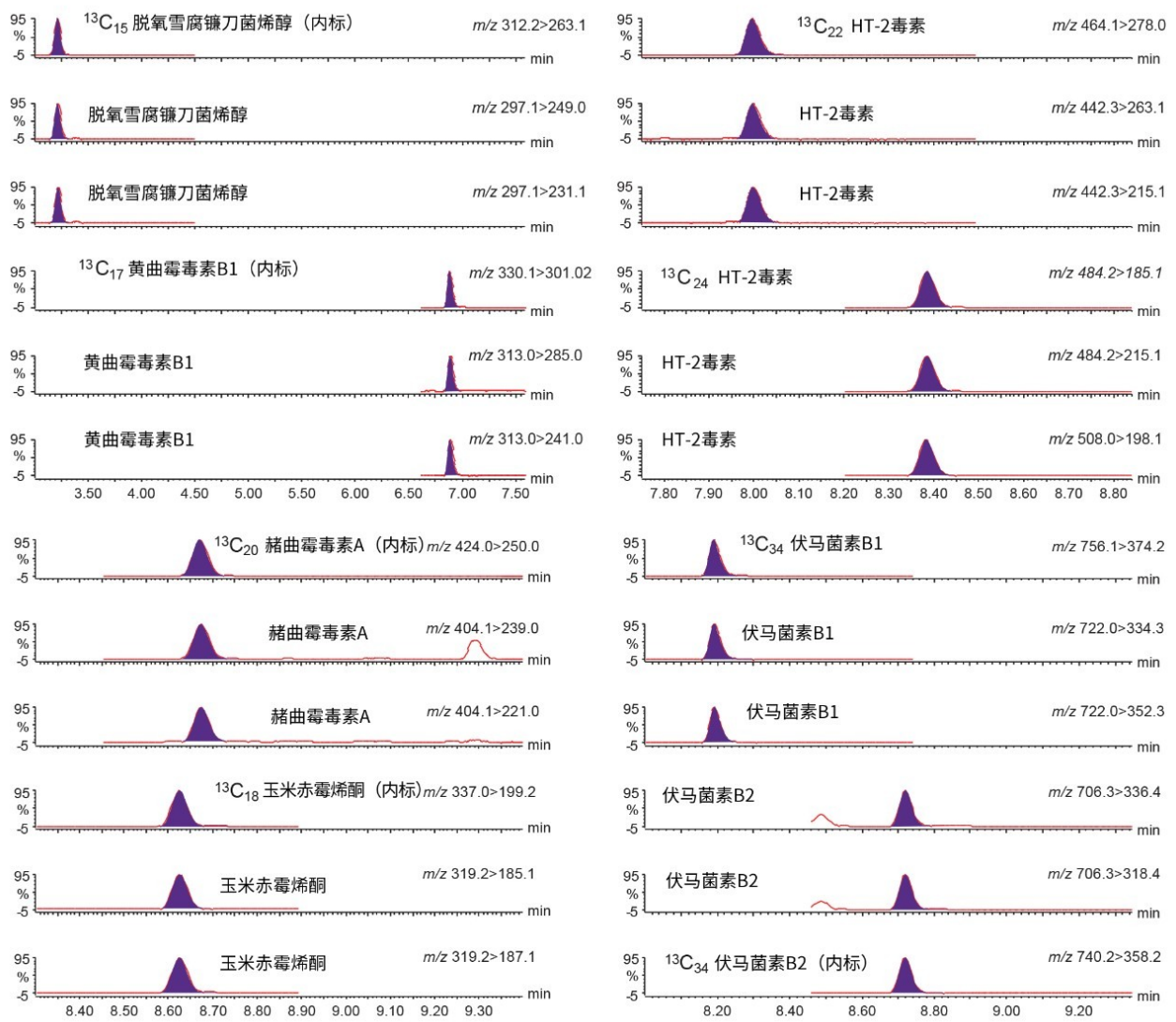
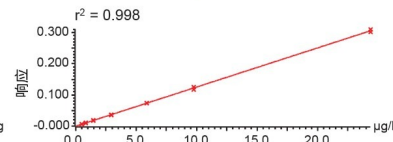
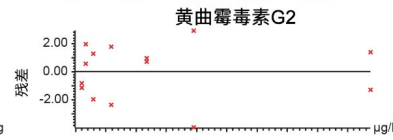
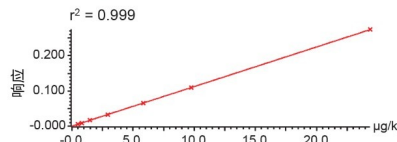
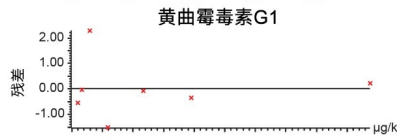
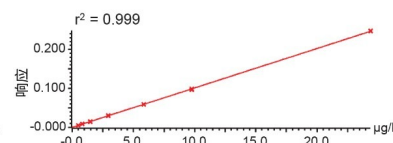
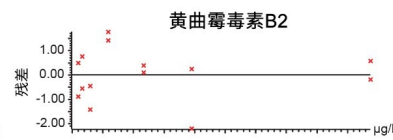
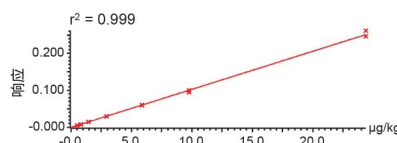
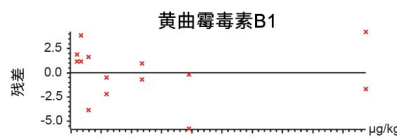
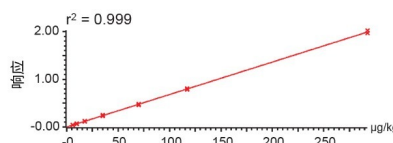
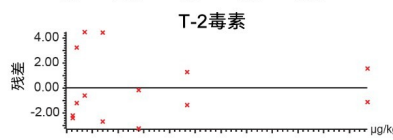
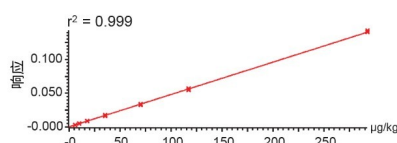
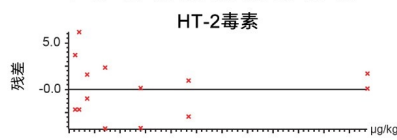
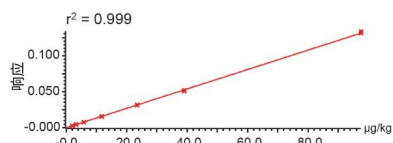
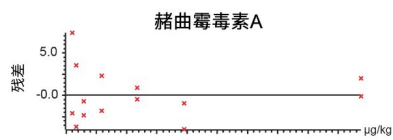
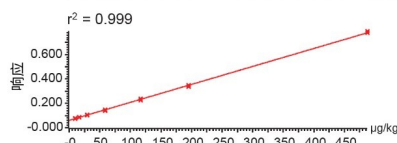
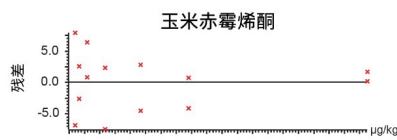


图1.T04366QC分析中所检出的8种真菌毒素及其带标记内标的典型色谱图（浓度见表2）

除一条校准曲线外，其他所有校准曲线的决定系数均大于0.95，残差小于20%。1家实验室出现黄曲霉毒素G2背景污染的问题，而2种参比质控品中均不含该化合物。在分析T04366QC中的伏马菌素B1和T04395QC中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇时，将提取物稀释了10倍，以确保分析物的响应值在校准范围内。分析值与未稀释提取物的值一致（数据未显示）。图2所示为本方法所适用的全部12种管制真菌毒素的典型校准曲线。



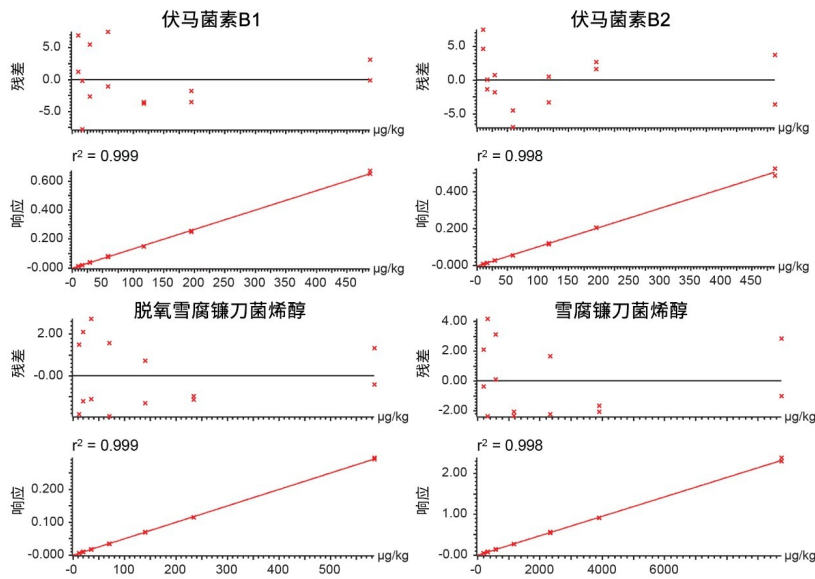


图2.12种管制真菌毒素的典型校准曲线（已经过内标处理）

对2种FAPAS质控品的分析结果表明目标方法在各实验室均具有良好的性能。实测浓度值与认定值非常接近；所有实测浓度值均在FAPAS提供的可接受范围内（ $z \leq 2$ 时），但一组测定结果除外（T04366QC中的伏马菌素B2）。正确度的计算方法是比较实测浓度值与认定值，其值为85%~113%。实验室内重复性(RSD_r)为3.0%~13%，实验室间重现性(RSD_{RL})为3.1%~23%。结果表明，伏马菌素在上述化合物中分析难度最大，但所有结果均符合欧盟委员会设定的方法性能标准⁵。本方法适用的其他真菌毒素均无假阳性报告。实验室间研究结果汇总见表1和表2。

T04395QC	黄曲霉毒素B1	赭曲霉毒素A	HT-2毒素	T-2毒素	玉米赤霉烯酮	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	伏马菌素B1	伏马菌素B2
内标	U-[¹³ C ₁₇]-AFB1	U-[¹³ C ₂₀]-OTA	U-[¹³ C ₂₂]-HT-2	U-[¹³ C ₂₄]-T-2	U-[¹³ C ₁₈]-ZEA	U-[¹³ C ₁₅]-DON	U-[¹³ C ₃₄]-FB1	U-[¹³ C ₃₄]-FB2
认定值 (μg/kg)	9.22	2.69	215	209	95.8	948	287	273
平均实测值 (μg/kg)	9.08	2.38	199	186	94.4	878	246	309
$ z \leq 2$ 时的可接受范围 (μg/kg)	5.26-13.3	1.51-3.87	128-302	125-294	53.7-138	643-1254	176-397	167-370
实测值范围 (μg/kg)	8.28-10.5	2.19-2.60	185-229	163-231	86.5-97.7	813-1004	222-284	276-356
正确度(%)	98.5	88.6	92.5	88.8	98.5	92.6	85.8	113
实验室内重复性 (% RSD _r)	7.39	4.03	4.88	6.36	3.14	4.22	6.04	3.22
实验室间重现性 (% RSD _{RL})	7.83	4.51	6.35	10.6	3.12	7.27	20.9	16.9

表1.4家参与实验室分析FAPAS质控品T04395QC的结果

T04366QC	黄曲霉毒素B1	赭曲霉毒素A	HT-2毒素	T-2毒素	玉米赤霉烯酮	脱氧雪腐镰刀菌烯醇	伏马菌素B1	伏马菌素B2
内标	U-[¹³ C ₁₇]-AFB1	U-[¹³ C ₂₀]-OTA	U-[¹³ C ₂₂]-HT-2	U-[¹³ C ₂₄]-T-2	U-[¹³ C ₁₈]-ZEA	U-[¹³ C ₁₈]-DON	U-[¹³ C ₃₄]-FB1	U-[¹³ C ₃₄]-FB2
认定值(μg/kg)	1.88	1.99	22.9	22.2	26.7	231	526	125
平均实测值(μg/kg)	1.74	1.74	20.1	19.6	25.8	208	446	127
[z]≤2时的可接受范围(μg/kg)	1.05-2.70	1.11-2.86	12.8-33.0	12.4-31.9	14.9-38.4	139-323	341-711	70-172
实测值范围(μg/kg)	1.58-1.89	1.45-1.93	17.5-24.2	17.0-23.1	22.2-28.8	183-246	391-510	108-175
正确度(%)	92.4	87.5	87.7	88.4	96.6	90.2	84.7	102
实验室内重复性(% RSD _r)	2.99	3.51	7.78	5.02	4.68	6.88	7.99	12.7
实验室间重现性(% RSD _{R(L)})	6.44	11.3	9.49	10.1	6.99	10.2	22.9	13.1

表2.4家参与实验室分析FAPAC质控品TO4366QC的结果

每种情况下，FAPAS质控品中所检出真菌毒素的相对保留时间和离子丰度均与校准标样分析中一致，并且达到规定的可接受标准⁴。由于将¹³C同位素标记的分析物类似物用作内标，因此分析物保留时间与带标记的内标一致（偏差范围±0.05 min）。

结论

利用实验室间研究考察了方法性能。每家实验室均根据所发表的应用纪要成功应用该方法测定了12种管制真菌毒素。这些实验室证明该方法在测定2种FAPAS质控品中的8种真菌毒素时具有良好的准确度和精密度。这些结果符合欧盟委员会设定的性能标准，证明该方法是监测谷物中真菌毒素的理想方法，既适用于官方管控，也适用于食品经营者检测。

科学家必须在其实验室内验证分析方法，证明方法性能适合预期用途，并且满足相关分析控制保证体系的要求。

参考资料

1. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Off. J. Eur. Union 2006, L364, 5–23.
2. Commission Recommendation of 27 March 2013 on the Presence of T-2 and HT-2 Toxin in Cereals and Cereal Products (2013/165/EU). Off. J. Eur. Union 2013, L91, 12–15.

3. Dreolin N, Stead S (2019).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.沃特世应用纪要720006685ZH <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2019/lc-ms-ms-method-development-and-validation-for-the-quantitative-determination-of-regulated-mycotoxins-in-cereal-grain-flours-using-simplified-sample-preparation-conditions-on-xevo-tq-xs.html>> .
4. Document No.SANTE/12089/2016.Guidance Document on Identification of Mycotoxins in Food and Feed.
5. European Commission Regulation No.519/2014 of May 16, 2014 amending Regulation (EC) No.401/2006 as Regards Methods of Sampling of Large Lots, Spice and Food Supplements, Performance Criteria for T-2, HT-2 Toxin and Citrinin and Screening Methods of Analysis, Off.J. Eur.Union 2014 L147, 29-43.

致谢

由衷感谢以下沃特世机构的工作人员为我们提供运行样品方面的支持：美洲应用实验室、奥地利应用实验室、英国科学运营应用实验室和美国科学运营应用实验室。

特色产品

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

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

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

720007165ZH, 2021年2月