

VICAM免疫亲和色谱净化法结合UPLC-MS/MS测定各种食品类商品中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A

Nicola Dreolin, Sara Stead, Simon Hird

Waters Corporation

摘要

黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A可通过收获前和收获后的污染机制天然存在于各种食品中，在全球范围内受到监管。食用受真菌毒素污染的食品会给人体健康带来巨大风险。本文针对特定食品类商品介绍了三种不同方法：

1. Aflatest WB净化法分析花生、开心果和榛子中的黄曲霉毒素
2. OchraTest WB净化法分析烘焙咖啡和可可中的赭曲霉毒素A
3. AflaOchra净化法分析黑胡椒中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A

所述方法均已使用加标样品以及天然受污染标准品（如有）进行内部验证，方法采用固液萃取技术，随后进行免疫亲和色谱(IAC)捕集-释放步骤和LC-MS/MS分析。

这些方法在正确度和重现性方面提供了理想性能，黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的方法LOQ分别低至0.050 µg/kg和0.4 µg/kg。

IAC净化法极为有利，因为它允许使用基于溶剂标准品的校准曲线，无需制备基质匹配度高的校准标样，也不需要

使用（同位素标记的）内标。此外，由于抗体结合具有高特异性，该方法还可实现优异的回收率（范围为71%~108%，平均值为90%），尽量降低潜在的基质效应，因此适合与串联质谱联用。

优势

- 高选择性方法，能够靶向分析复杂基质中的目标真菌毒素
- 在样品前处理的任何阶段均无需使用同位素标记的内标
- 无需使用基质匹配校准标样，使用溶剂标准品即可实现可靠定量
- 所有基质中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的方法LOQ都非常低
- 方法重现性相当高（即，AflaOchra分析黑胡椒得到的RSD_r小于5%）
- 几乎不存在基质效应

简介

测定用于食品和饲料的农作物中所含的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A是行业和主管部门等机构检查相关产品是否符合严格法规限值的首要任务。除国际食品法典委员会标准以外¹，许多国家都专门制定了自己国家适用的真菌毒素法规，因为食用受污染的食品会给人体健康带来风险。欧盟针对一些真菌毒素最大允许限值的严格程度位居全球之首，欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)食品链污染物专家组就新出现的风险提出了建议^{2,3}。基于抗体的免疫亲和色谱法(IAC)已成为真菌毒素分析的常用方法。免疫亲和色谱柱预先填充有聚合物凝胶固定相，与抗体（对特定的目标化合物有交叉反应性）共价固定。当提取物经过色谱柱时，目标真菌毒素选择性地与抗体结合，而其他共提取组分将通过清洗步骤被去除⁴。然后用可混溶溶剂（例如甲醇）洗脱真菌毒素，使抗体变性。由于免疫亲和色谱柱具有高度特异性，因此与选择性较低的SPE吸附剂材料相比，它们可产生更洁净的提取物，不易受到共提取物的干扰。多年来，IAC净化和HPLC分析与荧光检测的组合已成功用作一种检查黄曲霉毒素是否符合法规限值的经济有效的方法^{5,6}。此外，IAC色谱柱也可以与LC-MS/MS配合使用，以增加分析灵敏度（例如在法规限值水平非常低的婴幼儿食品分析中），从而能够轻松分析更复杂的商品，并通过省去基质匹配校准或对内标的依赖性来简化定量分析⁷。本文展示了以下三种分析方法的性能：各类坚果中的黄曲霉毒素分析；咖啡和可可中的赭曲霉毒素A分析；以及黑胡椒中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A分析。

实验

方法1 – AflaTest WB净化法分析花生、开心果和榛子中的黄曲霉毒素

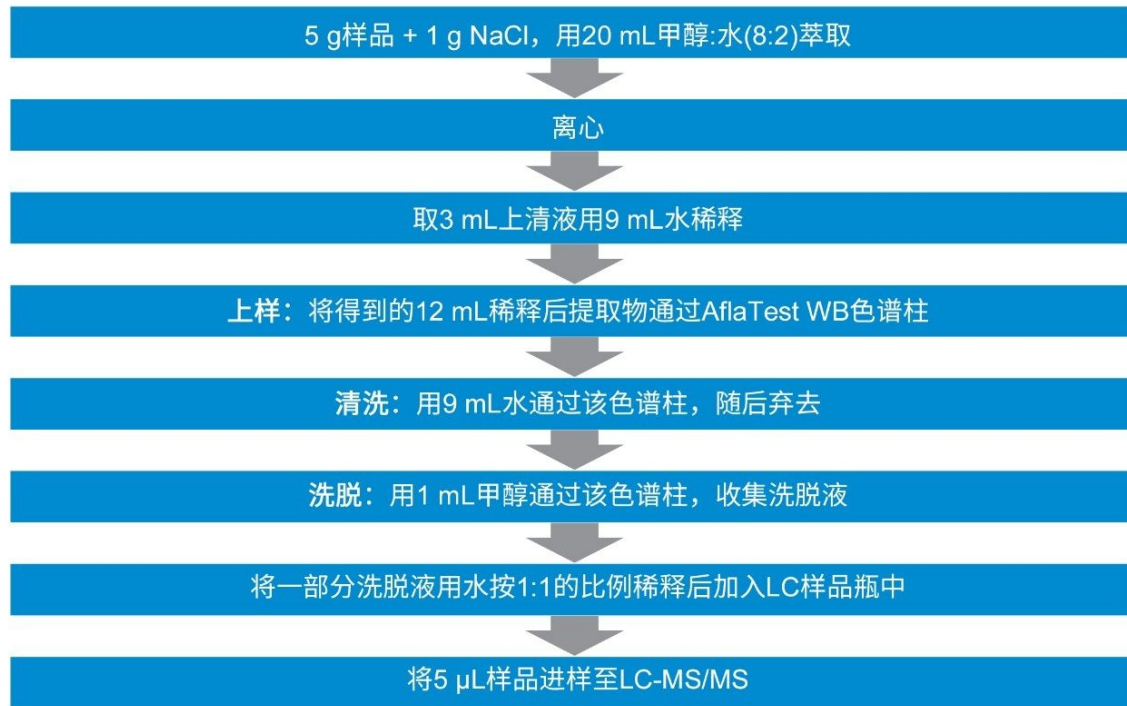


图1. 样品前处理方案

样品描述和预处理

花生和开心果购自当地市场。提取前，使用分析型研磨机(IKA)研磨约300 g各种食品类商品使其均质化。榛子标准品由Fera Science Ltd (FAPAS T04390QC <<https://fapas.com/shop/product/aflatoxins-in-hazelnut-quality-control-material/2032>>)以均质化水/坚果浆液的形式提供。FAPAS质控品中黄曲霉毒素的认定值和浓度范围见附录A。

样品提取与净化

提取前，称取 5.0 ± 0.01 g均质化固体样品和1 g氯化钠置于50 mL Falcon试管中。加入20 mL甲醇:水8:2 (v/v)，将试管剧烈振摇10 s，然后放入自动涡旋混合器中处理10 min。在5000 rpm (约5300 g) 下离心6 min后，取3 mL上清液用9 mL水稀释。将12 mL稀释后提取物以1滴/秒的速度通过VICAM AflaTest WB色谱柱 (部件号

G1024) (上样步骤)。然后用9 mL水以1~2滴/秒的速度通过色谱柱 (清洗步骤), 并泵入约3 mL空气。用1 mL甲醇以1滴/秒或更慢的速度通过色谱柱, 洗脱黄曲霉毒素。最后在LC样品瓶中混合500 μ L洗脱液与500 μ L水再进行LC-MS/MS分析。所得稀释因子为2.67 (8/3)。

方法验证

用四种浓度水平的黄曲霉毒素混合物 (各分析物的浓度分别为0.05、0.5、1.5和10 μ g/kg) 加标花生和开心果样品一式三份, 开展回收率实验。然后按照上一节所述的方法提取并分析空白和加标样品。另外, 通过分析六个独立的榛子标准品重复样, 验证正确度和精密度。

方法2 - OchraTest WB净化法分析烘焙咖啡和可可中的赭曲霉毒素A

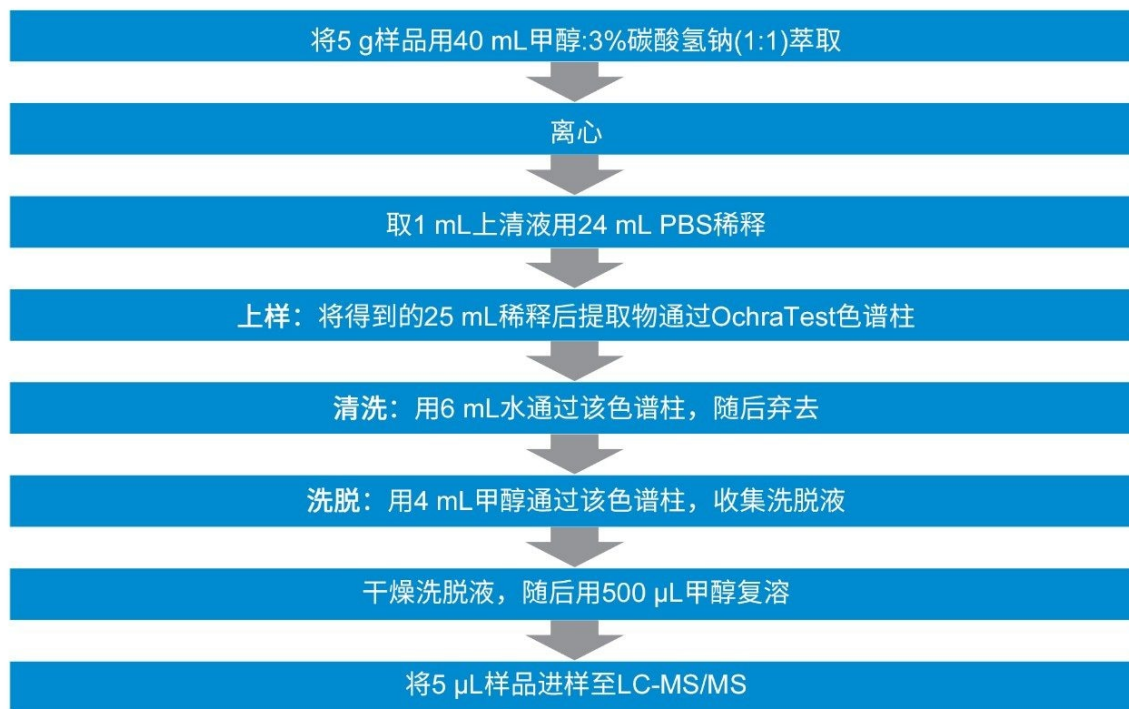


图2.样品前处理方案

样品描述和预处理

烘焙咖啡豆和可可粉购自当地市场。提取前, 使用分析型研磨机(IKA)研磨约300 g咖啡豆使其均质化。通过混合不同样品部分来制备大量可可粉样品。在方法验证之前使用LC-MS/MS筛查咖啡和可可, 且未报告存在可检出水平的赭曲霉毒素A (OTA)。

样品提取和净化

称取 5.0 ± 0.01 g均质化固体样品加入50 mL塑料离心管中。加入40 mL由50:50 (v/v)甲醇:水混合液和3% (w/v)碳酸氢钠a组成的提取溶液。将试管放入自动涡旋混合器中处理10 min。在5000 rpm (约5300 g) 下离心10 min后, 取1 mL提取物与24 mL磷酸盐缓冲液(PBS)b在30 mL玻璃样品瓶或同类容器中混合, 将上清液稀释25倍。将稀释后提取物(25 mL)以1~2滴/秒的速度通过VICAM OchraTest WB色谱柱(部件号G1033) (上样步骤)。然后用6 mL水以相同的速度通过色谱柱(清洗步骤), 随后泵入空气(约3 mL)。用4 mL甲醇以1滴/秒或更慢的速度通过色谱柱, 收集流出液, 洗脱赭曲霉毒素A。在40 °C的氮气环境中干燥洗脱液。干燥后的残余物用500 μ L甲醇:水50:50 (v/v)复溶, 转移至LC样品瓶中, 再进行LC-MS/MS分析。所得稀释因子为4。

(a)提取溶液的制备: 向1 L玻璃瓶中加入15 g碳酸氢钠和500 mL纯净水。混匀, 将玻璃瓶放入超声水浴中, 直至盐完全溶解。加入500 mL甲醇并混匀。

(b) PBS的制备: 向1 L玻璃瓶中加入100 mL VICAM 10倍PBS浓缩液(部件号G1113) 和900 mL纯净水(pH 7.0)。

方法验证

用三种浓度水平(0.40、2.0和6.0 μ g/kg)的赭曲霉毒素A加标咖啡粉和可可粉样品一式三份, 开展回收率实验以验证正确度。然后按照上一节所述的方法提取并分析空白和加标样品。六个不同的空白咖啡和可可样品以6.0 μ g/kg OTA加标, 计算RSDr%作为日内重复性参数。

方法3 - AflaOchra净化法分析黑胡椒中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A

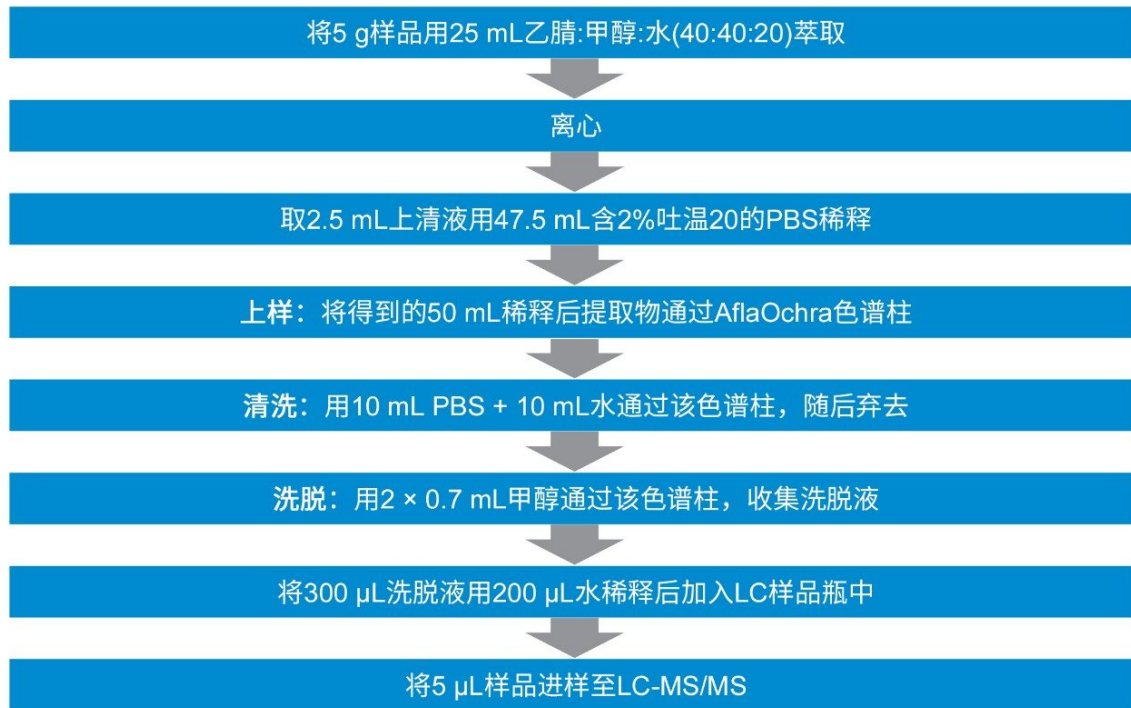


图3.样品前处理方案

样品描述和预处理

黑胡椒粒购自当地市场。提取前，使用分析型研磨机(IKA)研磨约200 g样品使其均质化。黑胡椒粉标准品由Fera Science Ltd. (FAPAS T04332QC <<https://fapas.com/shop/product/mycotoxins-in-black-pepper-quality-controlmaterial/1234>>)提供。FAPAS质控品中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的认定值和浓度范围见附录A。

样品提取和净化

提取前，称取 5.0 ± 0.01 g均质化固体样品置于50 mL Falcon试管中。加入10 mL乙腈:水84:16 (v/v)，将试管涡旋3 min。加入15 mL甲醇:水80:20 (v/v)，将试管再涡旋3 min。在5000 rpm (约5300 g) 下离心6 min后，取2.5 mL上清液用47.5 mL含2% (w/w) 吐温20的磷酸盐缓冲液(PBS)^a稀释。将全部的稀释后提取物(50 mL)以1滴/秒的速度通过VICAM AflaOchra色谱柱 (部件号G1017) (上样步骤)。然后用10 mL PBS^b以1~2滴/秒的速度通过色谱柱 (清洗步骤1)，再用10 mL水通过色谱柱 (清洗步骤2)。缓慢泵入约3 mL空气以干燥柱芯。用0.7 mL甲醇以1滴/秒的速度通过色谱柱并收集流出液 (洗脱1)。在不泵入额外空气的情况下干燥色谱柱并使其静置1

min。再用0.7 mL甲醇通过色谱柱（洗脱2），强制通过10 mL空气，与前一部分的流出液一起收集。最后在LC样品瓶中直接混合300 μ L洗脱液提取物与200 μ L水再进行LC-MS/MS分析。所得稀释因子为4.67 (14/3)。

(a) 稀释剂（含2%吐温20的PBS）的制备：称取20 g吐温20加入1 L玻璃瓶中。加入100 mL VICAM 10倍PBS浓缩液（部件号G1113）和900 mL纯净水。混匀，将玻璃瓶放入超声水浴中处理10 min。

(b) PBS的制备：向1 L玻璃瓶中加入100 mL VICAM 10倍PBS浓缩液（部件号G1113）和900 mL纯净水(pH 7.0)。

方法验证

用四种浓度水平的黄曲霉毒素和OTA混合物（各黄曲霉毒素的浓度分别为0.1、0.5、1.5、10 μ g/kg，OTA的浓度分别为0.4、2.0、6.0、40 μ g/kg）加标单独的黑胡椒样品一式三份，开展回收率实验。然后按照上一节所述的方法提取并分析空白和加标样品。另外，通过分析六个独立的黑胡椒认证标准品重复样，验证正确度和精密度。

结果与讨论

方法1

线性、检测限和定量限

在测试的浓度范围内(0.050~13.3 μ g/kg)验证方法线性。用溶剂制备标准品溶液（标准品制备见附录A）。表1报告了线性参数以及检测下限(LOD)和定量下限(LOQ)。各黄曲霉毒素的仪器LOQ为0.013 ng/mL，方法LOQ为0.050 μ g/kg。花生、榛子和开心果中AFB₁的欧盟最大限值分别为2.0、5.0和8.0 μ g/kg。而AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂总和的最大限值在花生中为4.0 μ g/kg，在开心果和榛子中为10.0 μ g/kg²。这些限值处于本方法的线性范围内。

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
线性范围	0.050-15 µg/kg			
仪器LOD/LOQ	0.004/0.013 ng/mL			
方法LOD/LOQ	0.015/0.050 µg/kg			
斜率[峰面积*kg/µg]	756	603	709	373
截距[峰面积]	31	6	11	-1
决定系数(R ²)	0.9998	1	0.9999	0.9999
最大残差%	5	8	7	10

表1.花生和坚果中黄曲霉毒素的线性和定量参数

正确度和精密度

在所有水平下，花生中的回收率在82%~106%之间，开心果中的回收率在77%~100%之间（表2）。榛子标准品的计算浓度在 $\pm 2|z|$ -得分之间，正确度在83%~99%之间。在重复性条件下评估精密度(RSDr%)，其范围在1.5%~3.6%之间(n = 6)，如表3所示。欧盟法规在黄曲霉毒素推荐回收率方面的方法性能规定为：浓度低于1.0 µg/kg时为50%~120%，浓度介于1~10 µg/kg之间时为70%~110%；RSDr%不得超过14.5%（由Horwitz方程导出）⁸⁻¹⁰。因此，方法正确度和重复性符合欧盟法规要求。

加标浓度 (µg/kg)	基质	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
0.05	花生	100 ± 2	101 ± 2	98 ± 4	106 ± 2
	开心果	84 ± 3	77 ± 4	94 ± 2	79 ± 4
0.5	花生	98 ± 3	97 ± 1	96 ± 1	97 ± 5
	开心果	82 ± 2	91 ± 5	85 ± 4	85 ± 4
1.5	花生	94 ± 6	100 ± 3	100 ± 5	95 ± 2
	开心果	97 ± 2	99 ± 2	98 ± 2	98 ± 2
10	花生	86 ± 2	86 ± 3	86 ± 1	82 ± 5
	开心果	97 ± 1	100 ± 1	96 ± 2	99 ± 3

表2.以四种浓度水平加标食品基质得到的回收率(%)±标准偏差(n = 3)

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂
平均值(μg/kg)	4.38	2.24	1.81	0.9
标准偏差(μg/kg)	0.07	0.05	0.04	0.03
RSD%	1.5	2.2	2.2	3.6
Xa (μg/kg)	4.5	2.27	1.96	1.09
Xa-2 z (μg/kg)	2.52	1.27	1.1	0.61
Xa+2 z (μg/kg)	6.49	3.26	2.83	1.57
正确度(%)	97	99	92	83

表3.分析黄曲霉毒素含量已知的FAPAS榛子测试样品(T04390QC)得到的结果 (FAPAS榛子标准品中计算浓度的平均值、标准偏差和相对标准偏差(%); Xa=认定值)

方法2

线性、检测限和定量限

在测试的浓度范围内 (0.40~80 μg/kg固体样品) 验证方法的线性。用溶剂制备标准品溶液 (标准品制备见附录A)。表4报告了线性参数以及检测下限(LOD)和定量下限(LOQ)。仪器LOQ为0.10 ng/mL, 方法LOQ为0.40 μg/kg。烘焙咖啡豆和烘焙咖啡研磨粉末中OTA的欧盟最大限值为5.0 μg/kg², 完全包含在校准范围内。可可粉目前正在接受EFSA CONTAM专家组审查, 预计未来会受到监管, 其最大限值可能与咖啡类似。

线性范围	0.40–80 µg/kg
仪器LOD/LOQ	0.030/0.10 ng/mL
方法LOD/LOQ	0.12/0.40 µg/kg
斜率[峰面积*kg/µg]	241
截距[峰面积]	25
决定系数(R ²)	0.9996
最大残差%	8

表4.咖啡和可可中赭曲霉毒素A的线性定量参数

正确度和精密度

咖啡的回收率在90%~98%之间，可可的回收率在86%~90%之间（表5）。在重复性条件下评估精密度。重复性实验（分析六个独立的重复样）所得到的咖啡和可可的RSDr%分别为1.0%和2.1%。欧盟法规在赭曲霉毒素A推荐回收率方面的方法性能规定为：浓度低于1 µg/kg时为50%~120%，浓度高于1 µg/kg时为70%~110%；同时浓度低于1 µg/kg时的RSDr%不得超过40%，浓度高于1 µg/kg时的RSDr%不得超过20%⁸。方法正确度和重复性符合欧盟法规要求。

加标浓度(µg/kg)	咖啡	可可
0.4	98 ±4	90 ±5
2	95 ±2	86 ±3
6	90 ±2	87 ±2

表5.咖啡和可可中不同加标水平的赭曲霉毒素A的回收率(%) (n = 3)

方法3

线性、检测限和定量限

在测试的浓度范围内（黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的浓度范围分别为0.10~25 µg/kg和0.40~100 µg/kg）验证方法的线性。用溶剂制备标准品溶液（标准品制备见附录A）。表6报告了线性参数以及检测下限(LOD)和定量下限(LOQ)。各种黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的仪器LOQ分别为0.02 ng/mL和0.08 ng/mL；方法LOQ分别为0.10 µg/kg和0.40 µg/kg。欧盟规定的香料（包括黑胡椒）中AFB₁和OTA的最大允许限值分别为5.0 µg/kg和15 µg/kg。而AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂总和的最大限值为10.0 µg/kg²。这些限值处于本方法的线性范围内。

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
线性范围	0.10–25 µg/kg				0.40–100 µg/kg
仪器LOD/LOQ	0.006/0.02 ng/mL				0.024–0.08 ng/mL
方法LOD/LOQ	0.030/0.10 µg/kg				0.12–0.40 µg/kg
斜率[峰面积*kg/µg]	585	529	691	363	139
截距[峰面积]	2	-4	0	-6	-28
决定系数(R ²)	0.9996	0.9998	0.9997	0.9999	0.9997
最大残差%	8	5	7	2	8

表6.黑胡椒中黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A的线性和定量参数

正确度和精密度

在所有水平下，各种黄曲霉毒素的回收率在80%~108%之间，OTA的回收率在71%~85%之间（表7）。黑胡椒标准品的计算浓度在±2|z|得分之间，各种黄曲霉毒素的正确度在73%~102%之间，OTA的正确度为70%。在重复性条件下评估精密度，各种真菌毒素的RSDr%在0.5%~5%的范围内(n = 6)，如表8所示。欧盟法规在黄曲霉毒素推荐回收率方面的方法性能规定为：浓度低于1.0 µg/kg时为50%~120%，浓度介于1~10 µg/kg之间时为70%~110%；RSDr%不得超过14.5%（由Horwitz方程导出）⁸⁻¹⁰。欧盟法规在赭曲霉毒素A推荐回收率方面的方法性能规定为：浓度低于1 µg/kg时为50%~120%，浓度高于1 µg/kg时为70%~110%；同时浓度低于1 µg/kg时的RSDr%不得超过40%，浓度高于1 µg/kg时的RSDr%不得超过20%⁸。因此，方法正确度和重复性符合欧盟法规要求。

黄曲霉毒素加标浓度 (µg/kg)	OTA加标浓度 (µg/kg)	回收率(%)				
		AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
0.1	0.4	102 ±5	108 ±4	85 ±5	85 ±6	85 ±6
0.5	2	99 ±3	96 ±5	82 ±5	83 ±4	73 ±2
1.5	6	101 ±3	98 ±1	85 ±3	87 ±1	75 ±5
10	40	96 ±2	96 ±2	87 ±3	80 ±1	71 ±2

表7.以四种浓度水平加标黑胡椒得到的回收率(%)±标准偏差(n = 3)

	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
平均值(µg/kg)	3.46	3.32	1.12	1.72	6.21
标准偏差(µg/kg)	0.07	0.02	0.03	0.09	0.25
RSD%	2	0.5	3	5	4
X _a (µg/kg)	3.4	3.44	1.52	2.34	8.87
X _a -2 z (µg/kg)	1.91	1.93	0.85	1.31	4.97
X _a +2 z (µg/kg)	4.9	4.96	2.19	3.36	12.78
正确度(%)	102	97	73	74	70

表8.FAPAS黑胡椒标准品T04332QC中计算浓度的平均值、标准偏差和相对标准偏差(%)。X_a = 认定值。计算浓度相对于认定值的正确度(%)。

基质效应评估

将基质效应因子(ME_F%)评估为百分比形式

$$ME_F\% = \left(\frac{b_M}{b_S} - 1 \right) * 100$$

其中b_M和b_S分别是基质匹配校准曲线和溶剂校准曲线的斜率。通过绘制用空白基质提取物稀释真菌毒素储备液(稀释程序与溶剂标准品制备方法相同)制得的标准品的响应,获得基质匹配校准曲线。在本文所述的三种方法

中，方法1（坚果中的黄曲霉毒素分析）的基质效应最低，其基质效应因子在-4%（信号抑制）至+2%（信号增强）的范围内。而方法3（黑胡椒中的黄曲霉毒素和赭曲霉毒素A分析）的基质效应最高，对于黄曲霉毒素，其基质效应因子在+11%至+13%（信号增强）的范围内；对于赭曲霉毒素A，其基质效应因子为-5%（信号抑制）。需要注意的是，与之前报道的“稀释注入”方法相比，基质效应显著降低；采用“稀释注入”法时，谷物中的赭曲霉毒素A表现出 $ME_F\% > 100\%$ 的信号增强¹¹。例如，图4中展示了黑胡椒中黄曲霉毒素G₂和赭曲霉毒素A的校准图。很显然，本文遇到的基质效应对所测分析物的定量结果无显著影响。免疫亲和色谱法对于降低基质效应非常有用，该方法无需补偿基质效应或制备基质匹配校准品即可测定方法回收率，因为使用溶剂标准品即可获得准确的结果。

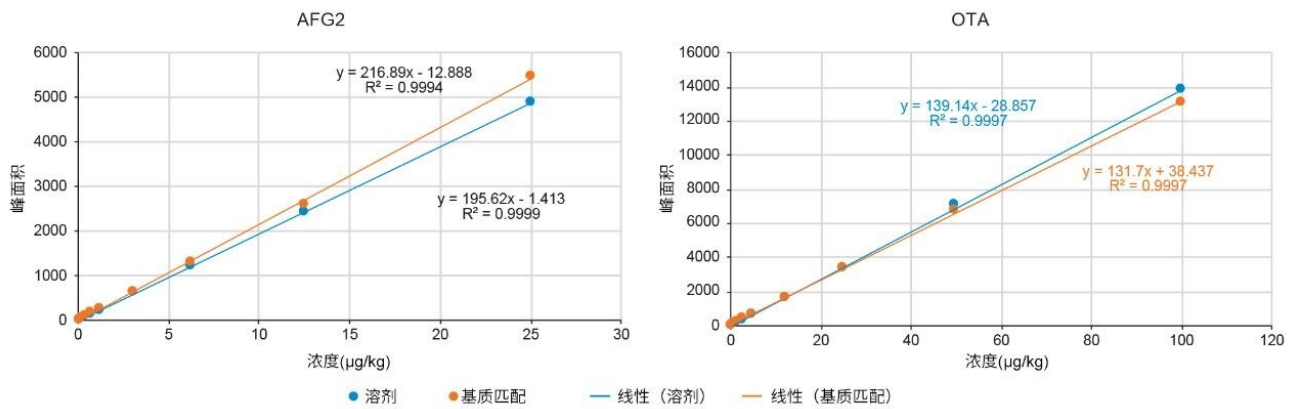


图4.黄曲霉毒素G₂（方法1）和赭曲霉毒素A（方法3）的校准图，显示了溶剂曲线和基质匹配曲线的回归方程。

图5展示了经IAC净化后溶剂空白和花生提取物的ESI+扫描色谱图，突出显示了黄曲霉毒素的洗脱区域。可以明显看出，色谱图中不存在额外的共提取物干扰分析或与电喷雾离子源区域的电荷竞争。这一结果进一步证明，使用免疫亲和色谱法可有效去除基质组分。

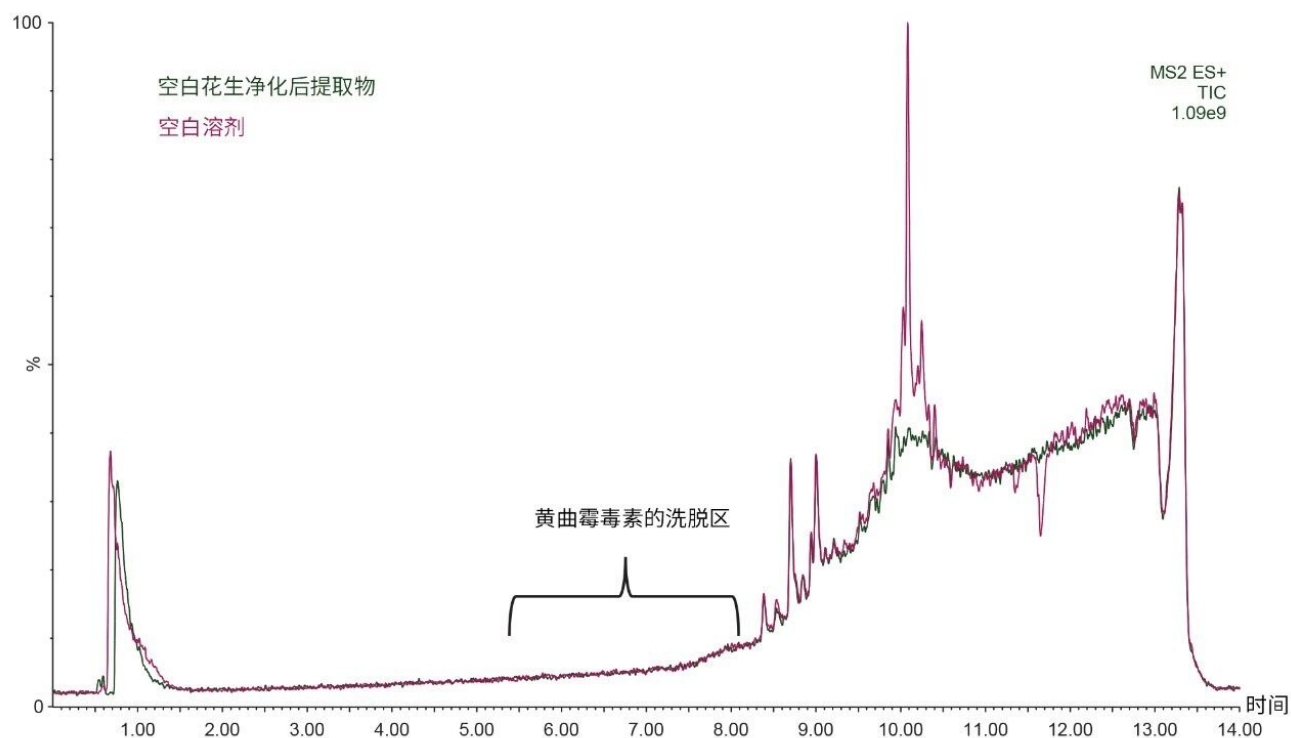


图5.用ESI+扫描模式采集的花生净化后提取物（绿色）和空白溶剂（红色）的叠加色谱图（扫描时间：0.1 s；采集范围：50–800 m/z ）

结论

本文所述3种方法的性能均符合欧盟法规和SANTE指导原则中规定的标准¹²。免疫亲和色谱净化法的主要优势在于，可以使用在溶剂中制备的校准标准品，无需使用基质匹配度高的标准品，且无需使用带标记的内标即可实现可靠定量。这一点很重要，因为典型位点污染会导致通常难以获得真正的空白样。本文所述方法的重复性非常好，并通过回收率实验使用真菌毒素浓度已知的真实标准品验证了正确度。还评估了基质效应，发现潜在基质引起的信号抑制/增强非常小(<13%)，对定量性能的影响可忽略不计。

最后，这些方法可扩展至更广泛的食物类商品类型（与本研究所测试的样品类似）。

致谢

由衷感谢Nancy Zabe Collette、Danrey Toth和Chiara Bottesini对本研究的帮助。

参考资料

1. General Standard for Contaminants and Toxins in Food and Feed (Codex STAN 193-1995).Codex Alimentarius, International Food Standards, FAO and WHO, last revision 2015.
2. European Commission Regulation No.1881/2006 of 19 December 2006 Setting Maximum Levels for Certain Contaminants in Foodstuffs. Annex, section 2.
3. Contaminants in the Food Chain, EFSA Website (accessed 4th June 2021):
<https://www.efsa.europa.eu/en/science/scientific-committee-and-panels/contam> <
<https://www.efsa.europa.eu/en/science/scientific-committee-and-panels/contam>> .
4. Mycotoxins Analysis in Tree Nuts – Regulatory, Technology, and Economic Considerations. VICAM. 2015. White Paper p/n 720005530EN (<https://www.vicam.com/white-papers/mycotoxin-analysis-tree-nuts> <<https://www.vicam.com/white-papers/mycotoxin-analysis-tree-nuts>>).
5. Soleimany F., Jinap S., Rahmani A., Khatib A., Simultaneous Detection of 12 Mycotoxins in Cereals Using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and Post-Column Derivatization System. *Food Additives and Contaminants*, 2011, 28, p. 494–501.
6. Turcotte A-M., Scott P. M., Tague B., Analysis of Cocoa Products for Ochratoxin A and Aflatoxins. *Mycotoxin Res*, 2013, 29, p. 193–201.
7. Desmarchelier A., Sabine Tessiot S., Bessaire T., Racault L., Fiorese E., Urbani A., Chan W-C., Cheng P., Mottier P., Combining the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe Approach and Clean-up by Immunoaffinity Column for the Analysis of 15 Mycotoxins by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1337, p. 75–84.
8. 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.

9. Horwitz W., Kamps L.R., Boyer K.W., Quality Assurance in the Analysis of Foods and Trace Constituents. *J.Assoc.Off.Analy.Chem.*,1980, 63, 1344–54.
10. Thompson M., Recent Trends in Inter-Laboratory Precision at ppb and Sub-ppb Concentrations in Relation to Fitness for Purpose Criteria in Proficiency Testing.*Analyst*, 2000, 125, p. 385–386.
11. Dreolin, N.; Stead, S. 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.沃特世公司.2019. 应用纪要部件号720006685ZH (<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135035321> < <https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135035321>>).
12. SANTE/12089/2016.Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed.Implemented by 01/01/2017.
13. AflaTest™ WB SR+ Performance Data for Spices, Cocoa, Coffee, and Herbs.VICAM Performance Data.2021.(<https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus> < <https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus>>).Contact: techservice@vicam.com for more information.

附录A

LC-MS/MS条件

LC-MS/MS条件基于此前所述的多真菌毒素分析方法（应用纪要部件号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>>）¹¹。

液相色谱条件

系统:	配备FTN自动进样器的ACQUITY UPLC I-Class (BSM)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ (2.1 × 100 mm, 粒径 1.7 μm, 孔径130 Å, 部件号186002352)

水性流动相:	1 mM乙酸铵水溶液+0.5%乙酸+0.1%甲酸(v/v)
有机流动相:	甲醇+0.5%乙酸+0.1%甲酸
柱温:	40 °C
样品温度:	15 °C
进样体积:	5 μ L
流速:	0.40 mL/min
进样针:	FTN 15 μ L
洗针液:	水:甲醇:乙腈:异丙醇:丙酮20:20:20:20 + 1%甲酸 (体积比)
密封清洗溶剂:	水:乙腈80:20 (v/v)

UPLC梯度

时间 (min)	%有机相	%水相	曲线
0	5	95	-
0.7	5	95	6
6.5	50	50	6
9.5	100	0	6
12.5	100	0	6
12.6	5	95	6
14	5	95	6

质谱条件

系统:	Xevo TQ-S cronos
电离模式:	ESI+
采集模式:	多重反应监测(MRM)
毛细管电压:	+0.75 kV
锥孔气流速:	50 L/h
脱溶剂气温度:	600 °C

脱溶剂气流速：1100 L/h

离子源温度：150 °C

分辨率：MS1单位，MS2单位

软件：MassLynx v4.2（使用TargetLynx XS进行数据处理）

优化的MRM通道

分析物	预期RT范围 (min)*	母离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
黄曲霉毒素B ₁ (AFB ₁)	6.7-7.4	313.0	30	20
				37
黄曲霉毒素B ₂ (AFB ₂)	6.4-7.7	315.1	30	25
				28
黄曲霉毒素G ₁ (AFG ₁)	6.2-6.5	329.1	25	24
				20
黄曲霉毒素G ₂ (AFG ₂)	5.8-6.2	331.1	25	25
				30
赭曲霉毒素A (OTA)	8.5-8.9	404.1	20	25
				36

(*)保留时间(RT)存在变化。执行测试进样，校正各MRM通道的采集时间以尽量减小重叠，从而增加自动驻留时间（峰宽=6 s，每个峰包含的数据点数=15）。

驻留时间=自动。

所有功能通道的跨度= 0 Da。

校准标样的制备

用乙腈制备的黄曲霉毒素标准品（AFB₁、AFB₂、AFG₁和AFG₂的混合物）中各化合物的浓度为1 μg/mL，OTA标准品的浓度为10 μg/mL，这些标准品均购自Biopure (Romer Labs Division Holding GmbH)。工作溶液的制备方法为：将250 μL黄曲霉毒素储备液与100 μL OTA储备液混合，在硅烷化琥珀色玻璃样品瓶中定容至总体积4 mL。临分析前制备工作溶液的系列稀释液，直接加入LC样品瓶中。所有标准品均使用95:5水:乙腈(v/v)作为稀释剂。各种黄曲霉毒素的浓度范围为0.013~5.0 ng/mL，OTA的浓度范围为0.050~20 ng/mL。

代表性色谱图

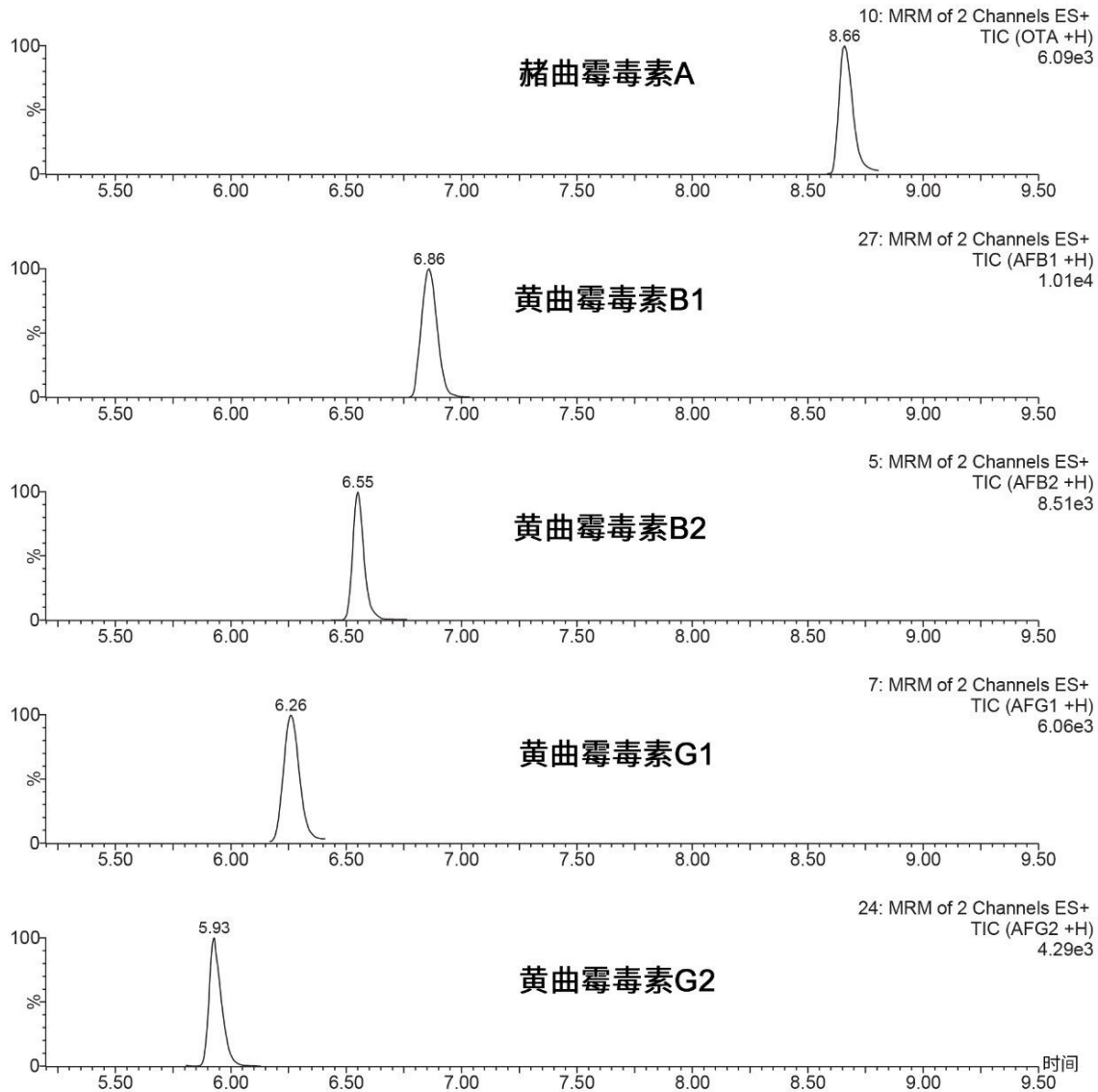


图6.用0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 各黄曲霉毒素和2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 赭曲霉毒素A强化加标后的黑胡椒净化后提取物的色谱图

更多信息（提示和技巧）

- IAC中的空气 - 从去除储存缓冲液、上样到清洗步骤的任何阶段，IAC柱芯均不得变干。完成清洗步骤后，通过强制缓慢泵送空气通过色谱柱（约3 mL）干燥柱床。洗脱后，将空气泵入IAC柱芯以收集所有剩余溶剂（甲醇

)，确保实现最大回收。

- 过滤 - 本文所述方法在样品处理的任何步骤中均未执行过滤操作。如果需要过滤稀释后提取物，应谨慎选择过滤器材料。早期实验（数据未显示）发现，玻璃纤维和PTFE针式过滤器是理想选择，因为它们对黄曲毒素霉和赭曲毒素霉A的回收率影响可忽略不计。相反，聚偏二氟乙烯(PVDF)、亲水性聚丙烯(GHP)和尼龙滤膜对回收率有不利影响。
- 稀释 - 在黑胡椒分析中，一个关键的样品前处理步骤是在上样至IAC之前用水溶液稀释上清液。由于抗体对高百分比的有机溶剂敏感，因此稀释很重要。起初是用PBS将上清液稀释4倍；图7展示了该步骤的结果。

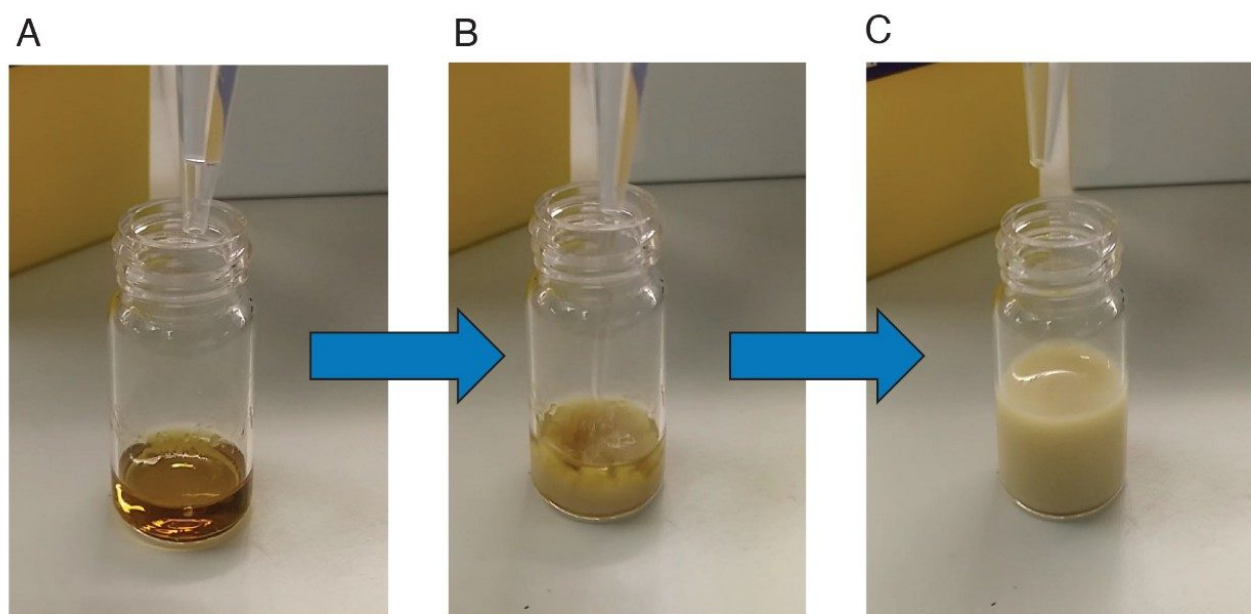


图7.将上清液收集到玻璃样品瓶中(A)；向上清液中加入几滴PBS (B)；用PBS将上清液稀释4倍(v/v)后得到悬浮液。

稀释后，所得溶液变成混浊、粘稠的悬浮液，并出现黑色沉淀物。这是因为存在由80:20有机溶剂:水性溶剂混合物共提取的油树脂。油树脂和类似的亲脂性物质可包裹生物活性化合物（例如真菌毒素），从而在悬浮液通过IAC时降低抗原-抗体的相互作用效率。过滤和/或离心稀释后的提取物有助于使溶液更洁净，但不会提高真菌毒素的回收率。加入脱脂步骤（包括用己烷或同类非极性溶剂对上清液进行液液分配）可降低亲脂性物质在稀释前的浓度。但是，这一步骤只能缓解问题，无法彻底解决问题，同时非常耗时，并非最优选择。

发现一种有效的替代方法是将提取物用表面活性剂溶液按1:20 (v/v)的比例稀释。具体而言，就是用含2% (w/v)吐

温20的PBS将真菌毒素保留在溶液中。此外，增加稀释因子对于油树脂通过表面活性剂在较高液体体积中扩散非常重要。图8展示了仅使用PBS或使用含吐温20的PBS稀释的提取物之间的比较。该策略也适用于肉豆蔻及其他香料¹³，它们是公认的复杂基质，因为存在不同类型的共提取化合物，这些化合物可能会干扰分析物并产生显著的基质效应。

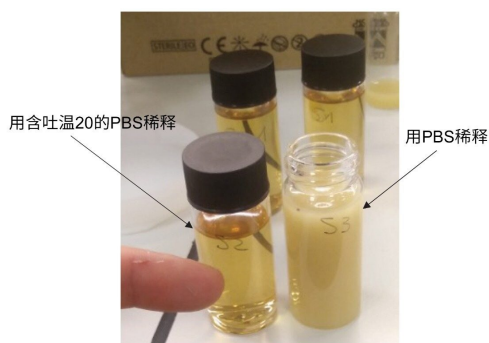


图8.在稀释剂中加入表面活性剂所得到的稀释后提取物比较

标准品规格

认定值来源于参与能力测试的实验室使用多种方法所得到的共识。 $|z| \leq 2$ 的范围是处于 ± 2 z得分限值以内的浓度范围。

榛子（水/坚果浆液） – T04390QC

分析物	认定值(Xa) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	$ z \leq 2$ 的范围 [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	产生Xa的数据点数量
黄曲霉毒素B ₁	4.5	2.52–6.49	54
黄曲霉毒素B ₂	2.27	1.27–3.26	51
黄曲霉毒素G ₁	1.96	1.10–2.83	51
黄曲霉毒素G ₂	1.09	0.61–1.57	51
赭曲霉毒素A	7.96	4.46–11.47	26

黑胡椒 – T04332QC

分析物	认定值(Xa) [µg/kg]	z ≤2的范围 [µg/kg]	产生Xa的数据点数量
黄曲霉毒素B ₁	3.40	1.91–4.90	35
黄曲霉毒素B ₂	3.44	1.93–4.96	34
黄曲霉毒素G ₁	1.52	0.85–2.19	33
黄曲霉毒素G ₂	2.34	1.31–3.36	34
赭曲霉毒素A	8.87	4.97–12.78	27

磷酸盐缓冲液(PBS)组成

利用PBS稀释提取物，并将pH稳定在7.0。VICAM提供10倍PBS浓缩液（部件号G1113），可按1:10的比例稀释后使用。也可以按以下方法制备10倍PBS浓缩液：

称取8.0 g NaCl、1.2 g Na₂HPO₄、0.2 g KH₂PO₄和0.2 g KCl溶于990 mL纯净水中，使用浓HCl将pH调节至7.0。用纯净水定容至1 L。

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>>

AflaTest WB SR+ 免疫亲和柱 <<https://www.vicam.com/products/aflatest-wb-sr-plus>>

OchraTest WB 免疫亲和柱 <<https://www.vicam.com/products/ochratest-wb>>

AflaOchra LC 免疫亲和柱 <<https://www.vicam.com/products/aflaochra-lc>>

720007298ZH, 2021年6月

© 2022 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