

ACQUITY™ Premier UPLC方法分析多种真菌毒素的优势

Nicola Dreolin, Stuart Adams, Simon Hird, Peter Hancock, Timothy Jenkins

Waters Corporation

摘要

分析多种真菌毒素通常面临挑战，如不同化合物响应不均衡、LC系统中的残留，以及基质效应。这些因素不利于验证实验，并会显著影响方法性能。为应对这些挑战，沃特世开发了采用MaxPeak™高性能表面(HPS)技术的ACQUITY Premier系统和分析柱。在本研究中，我们成功将以前分析多种真菌毒素的LC-MS/MS方法转移到新的ACQUITY Premier系统上，并观察到与传统UPLC相比，伏马菌素的残留显著降低近80%。此外，在线性、精密度、峰形和保留时间稳定性方面也具有优异的性能。

优势

- 与传统的UHPLC系统相比，ACQUITY Premier系统和色谱柱有效地减少了伏马菌素的残留
- 使用ACQUITY Premier系统不需要向流动相或清洗溶液中添加金属螯合剂
- 使用ACQUITY Premier系统可以减少清洗循环次数，从而提升分析通量
- 具有良好的线性、精密度、峰形和保留时间重现性，性能满足SANTE/12089/2016的指导原则

简介

我们以前开发了一种基于“稀释-上样”样品前处理步骤的UPLC-MS/MS方法来分析受管制的真菌毒素，之后又将该方法扩展到更多天然毒素的测定中^{1,2}。分析多种真菌毒素的方法通常面临挑战。毒素化合物的化学多样性会导

致响应不均衡以及LC系统中某些类别化合物的残留问题。此外，各种食品和饲料产品的复杂性往往会引起明显的基质效应。这些挑战不利于验证实验，并会显著影响方法性能。

在样品前处理方案中加入有效的净化步骤可以减少不必要的共萃取物引入UPLC-MS/MS系统的含量，从而减轻基质效应的影响并增强方法稳定性³。此外，还可以通过使用高灵敏度串联四极杆质谱仪来缓解基质效应，如Xevo™ TQ-Absolute质谱仪，它可以应用更高的样品稀释倍数（最高可达100倍）。

使用现代LC模块时，经常会有少量样品或分析物被滞留在湿流路中，导致连续色谱图中出现意外或额外的（鬼）峰。这通常被称为“残留”，是液相色谱中一道颇为棘手的难题，其数值可达3~20%（高浓度标准品/样品进样后空白进样的峰面积百分比）。我们通过不同的研究分析了伏马菌素B₂ (FB₂)的残留情况，并当做案例研究来比较使用不同的进样系统和配置来减少流路中残留分析物含量的各种策略⁴。FB₂和类似化合物的化学性质可能会导致重现性差，并且出现潜在的假阳性结果。因此，将残留量减少到可接受的水平十分重要。通常采用的方法是添加螯合剂，如向流动相或样品稀释剂中添加乙二胺四乙酸(EDTA)或柠檬酸。然而，螯合剂会引起离子抑制，并且很难从LC系统中去除。

为应对这些挑战，沃特世开发了采用MaxPeak HPS技术的ACQUITY Premier系统和分析柱⁵。HPS由高度交联层组成，内含亚乙基桥硅氧烷基团，可提供一道高效的屏障，减少分析物与流路中金属表面不需要的相互作用。

本研究将之前分析多种毒素所开发的方法转移到新的ACQUITY Premier UPLC系统中，并进行了对比研究，以评估MaxPeak HPS技术是否可以减少由于金属螯合而部分吸附在不锈钢表面的真菌毒素残留。此外还根据SANTE指导原则评估了系统灵敏度、保留时间重现性、峰形和整体方法性能⁶。

实验

样品和标样制备

根据之前的研究步骤萃取小麦、燕麦和全麦面粉样品^{1,2}。简而言之，取5.0 g均质样品置于50 mL塑料离心管中，使用20 mL 79:20:1的乙腈:水:乙酸(v/v/v)在自动涡旋器上萃取10分钟。在>5000 g的转速下离心6分钟后，使用直径13 mm的1.2 μm玻璃纤维针式过滤器滤出部分上清液，然后用水按1:5的比例直接稀释到液相色谱样品瓶中（即，100 μL萃取物与400 μL水混合），使总稀释倍数为20倍。在进行LC-MS/MS分析之前，向每个样品瓶中加入10 μL含有¹³C标记内标的内标混合物。

通过连续稀释混标储备液制备包含目标分析物的溶剂校准曲线标样，保持溶剂成分为水:乙腈95:5 (v/v)。向每个

500 μ L校准标样中加入10 μ L内标溶液。

液相色谱条件

色谱系统：	标准ACQUITY UPLC I-Class PLUS和 ACQUITY Premier UPLC（配备二元溶剂管理器）
自动进样器：	流通针式(FTN)进样器，配备15 μ L进样针和50 μ L HSP扩充定量环(P/N: 700012825)，安装在进样阀 端口6与APH之间。
色谱柱：	标准系统：ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μ m (P/N: 186002352) Premier系统：ACQUITY Premier BEH C ₁₈ 1.7 μ m (P/N: 186009453)
流动相：	水相：1 mM乙酸铵水溶液 + 0.3%乙酸 + 0.1%甲酸 (v/v) 有机相：甲醇 + 0.3%乙酸 + 0.1%甲酸(v/v)
洗针溶剂：	水:甲醇:乙腈:异丙醇:丙酮 20:20:20:20:20 + 0.1%甲酸（体积比）
密封清洗溶剂：	水:甲醇80:20 (v:v)
柱温：	40 °C
样品温度：	15 °C
进样体积：	5 μ L
流速：	0.40 mL/min



图1.本研究中使用的配置（从左至右：ACQUITY Premier、ACQUITY I-Class Plus和Xevo TQ-S micro）。

时间 (min)	%有机相	%水相	曲线
0.0	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
14.0	5	95	6

表1.UPLC梯度

质谱条件

质谱系统：	Xevo TQ-S micro
电离模式：	ESI+/-（极性切换）
采集模式：	多重反应监测(MRM)
毛细管电压：	+0.75/-0.3 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
数据采集和处理:	waters_connect™定量软件(v. 1.1)

注: 优化后的MRM通道、锥孔电压和碰撞能量的完整列表详见之前的研究⁷。

结果与讨论

减少残留

Tamura及其同事通过实验证实, 伏马菌素中游离的羧基可以与样品流路中的金属形成螯合物, 导致随后的进样中产生分析物残留⁸。

我们通过实验评估了真菌毒素在两套系统中的残留情况: 将一组由3个溶剂空白样、1个顶级校准品和6个溶剂空白样组成的进样序列执行多次, 然后通过峰面积百分比(CO [A%])和信噪比比率(S/N r/r)计算残留⁴。

图2报告了不同日期两次重复实验的结果。在该图中, 残留值达到LLOQ以上的空白进样用红色突出显示, 残留值在LLOQ的65%以内的用黄色突出显示, 低于LLOQ的用绿色突出显示(视为可接受)。可以注意到, 在标准ACQUITY I-Class以及大多数其他供应商的UHPLC系统上, 进样高度浓缩的标准品或高度污染的样品(本研究为2000 µg/kg FB₂)后, 通常需要2至3次空白进样才能将FB₂的水平降至定量下限(LLOQ = 15 µg/kg)以下。相比之下, 在ACQUITY Premier系统中, FB₂的响应值在第1个后续空白样中就和LLOQ相当甚至更低, 而第2个空白样中的FB₂已无法定量。由此可以减少同一序列中清洗循环的次数和/或持续时间, 从而提高ACQUITY Premier的分析通量。此外, 重复实验所得的值非常接近, 进一步增加了结果的可信度。

实验#1

标准ACQUITY I-Class						ACQUITY Premier				
进样	峰面积	S/N	CO (A%)	CO (µg/kg)	S/N r/r	峰面积	S/N	CO (A%)	CO (µg/kg)	S/N r/r
标样	1505389	1022.0				2736304	1616.1			
空白样#1	49351	45.9	3.3	66	4.5	19341	9.2	0.7	14	0.6
空白样#2	19455	12.5	1.3	26	1.2	3860	ND	0.1	3	NA
空白样#3	9958	19.1	0.7	13	1.9	ND	ND	0.0	0	NA
空白样#4	5702	6.5	0.4	8	0.6	ND	ND	0.0	0	NA
空白样#5	ND	ND	0.0	0	NA	ND	ND	0.0	0	NA
空白样#6	ND	ND	0.0	0	NA	ND	ND	0.0	0	NA

实验#2

标准ACQUITY I-Class						ACQUITY Premier				
进样	峰面积	S/N	CO (A%)	CO (µg/kg)	S/N r/r	峰面积	S/N	CO (A%)	CO (µg/kg)	S/N r/r
标样	1516581	634.8				2500681	1004.7			
空白样#1	52020	37.7	3.4	69	5.9	12589	5.2	0.5	10	0.5
空白样#2	24558	18.7	1.6	32	3.0	5739	5.3	0.2	5	0.5
空白样#3	12741	12.2	0.8	17	1.9	3919	5.8	0.2	3	0.6
空白样#4	8021	6.7	0.5	11	1.0	3149	ND	0.1	3	NA
空白样#5	6894	13.1	0.5	9	2.1	2956	ND	0.1	2	NA
空白样#6	7111	13.4	0.5	9	2.1	ND	ND	0.0	0	NA

图2.在标准ACQUITY I-Class和ACQUITY Premier系统上进行的两个实验的FB₂残留值。S/N = 信噪比；CO (A%) = 以峰面积百分比表示的残留；CO (µg/g) = 以FB₂ ppb表示的残留；S/N r/r = 信噪比比率；ND = 未检出；NA = 不适用。颜色编码：红色 = 残留值 > LLOQ；黄色 = 残留值在LLOQ的65%以内；绿色 = 残留值 < LLOQ。

图3为ACQUITY Premier系统上顶级标准品与后续溶剂空白样进样的FB₂迹线和峰面积的对比图。

在标准ACQUITY I-Class系统上，2000 µg/kg标准品进样后的后续空白样进样中，伏马菌素B₁ (FB₁)的残留值分别为30、14、8 µg/kg和未检出。而在ACQUITY Premier系统上，第1个后续空白样的残留就已低于LLOQ，第2个空白样进样没有检测到峰。

因此，使用ACQUITY Premier系统的优势显而易见，它能显著减少真菌毒素的残留，而这得益于HPS技术，该技术作为一个有效的屏障，可减少金属表面对分析物的吸附。

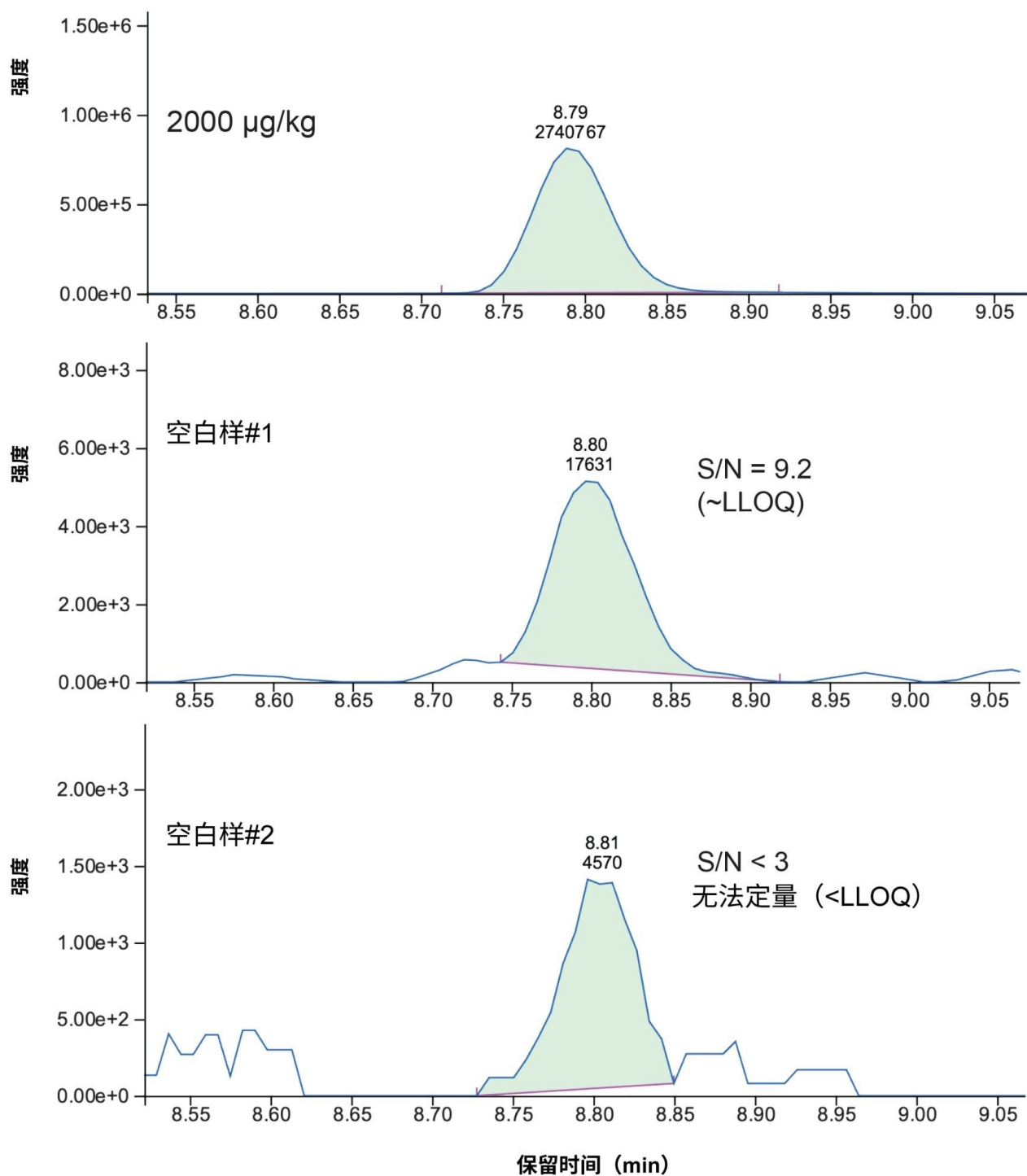


图3.ACQUITY Premier系统上，高纯标准品（上）、第1次后续空白样进样（中）和第2次后续空白样进样（下）中

的伏马菌素 B_2 峰面积和信噪比(S/N)。

总体性能比较

通过设置分析序列来复制常规食品和饲料检测实验室中的典型序列，使用两种配置对谷物样品供试品以及添加了12种已知浓度的管制真菌毒素的样品进行了分析（图4）。评估了两套系统的一般方法性能，如精密度、灵敏度、线性和峰形。

2x溶剂空白
第1个分段校正曲线（8个点）
4x溶剂空白
3x小麦粉样品
3x加标12种真菌毒素的小麦粉样品
3x溶剂空白
3x燕麦样品
3x加标12种真菌毒素的燕麦样品
3x溶剂空白
3x全麦面粉样品
3x加标12种真菌毒素的全麦面粉样品
3x溶剂空白
第2个分段校正曲线（8个点）
4x溶剂空白

[...]

图4.分析序列重复单元。

在这两套系统上，所有真菌毒素都获得了很好的线性，决定系数(R^2) > 0.99，残差在±20%以内。两套系统的定量下限(LLOQ)相当，尽管在ACQUITY Premier上观察到一些化合物的峰面积和信噪比略高。表2报告了LLOQ和方法线性范围，图5显示了两种代表性真菌毒素在LLOQ水平下的峰响应和信噪比对比。

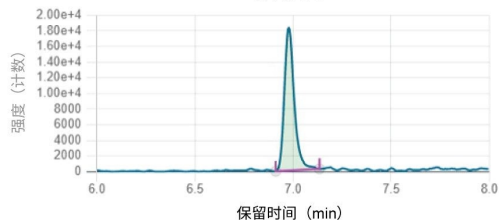
分析物	LLOQ (µg/kg)	线性范围 (µg/kg)
黄曲霉毒素B ₁	0.75	0.75-100
黄曲霉毒素B ₂	0.75	0.75-100
黄曲霉毒素G ₁	0.75	0.75-100
黄曲霉毒素G ₂	0.75	0.75-100
脱氧雪腐镰刀菌烯醇	18	18-2400
玉米赤霉烯酮	15	15-2000
赭曲霉毒素A	1	1-400
HT-2毒素	9	9-1200
T-2毒素	9	9-1200
伏马菌素B ₁	15	15-2000
伏马菌素B ₂	15	15-2000
雪腐镰刀菌烯醇	360	360-40000

表2.12种管制真菌毒素的方法定量下限(LLOQ)和线性范围。

标准ACQUITY I-Class

含量1: 0.75 µg/kg

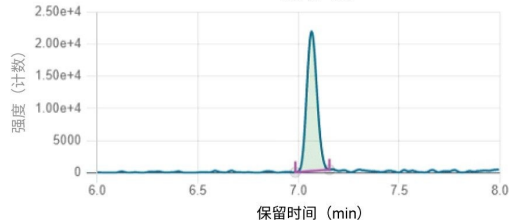
黄曲霉毒素B₁
峰面积: 63875
S/N: 38



ACQUITY Premier

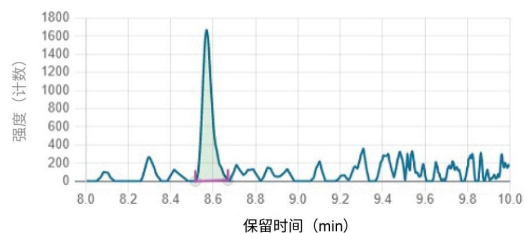
含量1: 0.75 µg/kg

黄曲霉毒素B₁
峰面积: 77406
S/N: 45



含量1: 0.75 µg/kg

伏马菌素B₂
峰面积: 5363
S/N: 10



含量1: 0.75 µg/kg

伏马菌素B₂
峰面积: 16121
S/N: 18

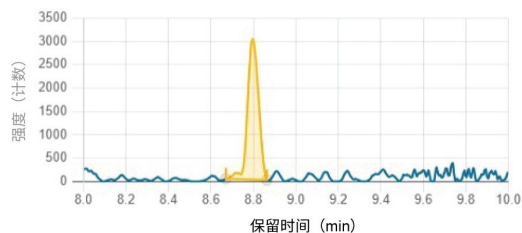


图5.黄曲霉毒素B₁ (0.75 µg/kg)和伏马菌素B₂ (15 µg/kg)在ACQUITY I-Class (左) 和ACQUITY Premier (右) 上的峰响应和信噪比。黄色迹线表示手动修改的峰积分。

我们计算了供试品和加标样品在重复性条件下重复测定三次的相对标准偏差(RSD%)，所有分析物在两套系统上的值均低于10%。保留时间的重现性非常好，所有分析物在同一序列中的保留时间偏差均低于0.006分钟。此外，两套系统上所得的峰形相似，例如图6所示15种谷物样品中FB₂的色谱迹线。可以看到，两套系统上的高斯峰都无拖尾。

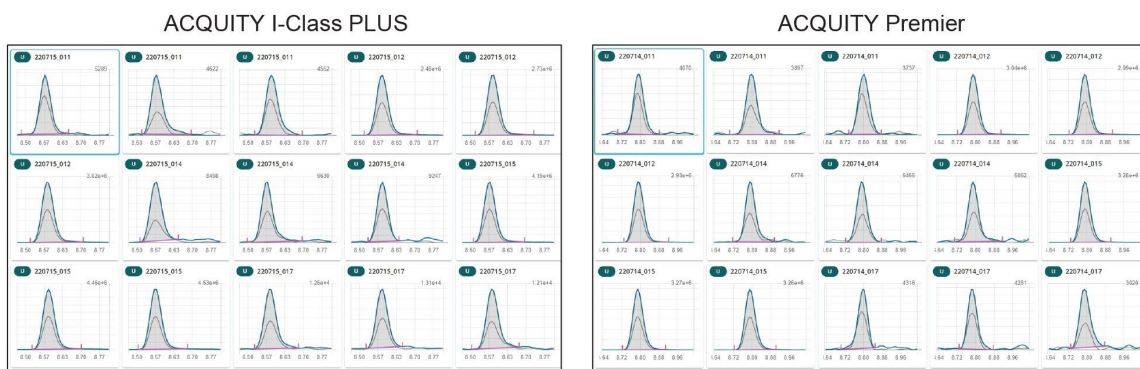


图6.两种不同的系统配置下谷物样品中伏马菌素 B_2 的色谱迹线

结论

我们成功将之前使用内标校正分析多种真菌毒素的方法转移到新的ACQUITY Premier系统上，并且只对液相色谱条件做了细微修改。用该方法对一组包含不同批次多个重复样的食品样品进行典型的常规分析时获得了同等的性能。根据SANTE指导原则，所有分析物均观察到非常好的线性、准确度、精密度、峰形和保留时间重现性。

ACQUITY Premier系统的主要优势在于HPS技术，能够使伏马菌素的残留显著降低近80%。得益于该技术，我们无需在流动相和洗针溶液中添加金属螯合剂，并且由于同一序列中需要的清洗循环次数更少，因此还能提高分析通量。

参考资料

1. Dreolin N. and 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. 沃特世应用纪要, 2019, [720006685ZH](#).
2. Dreolin N.; Foddy H.; Hird S.; Hancock P. and Jenkins T. 开发一种分析谷物产品中50种真菌毒素和托烷生物碱的多毒素UPLC-MS/MS方法. 沃特世应用纪要, 2021, [720007476ZH](#).

3. Dreolin N.; Foddy H.; Hird H.; Hancock P. and Jenkins T. Improve the robustness of an LC-MS/MS method for the determination of multiple mycotoxins in a range of food matrices. Waters White Paper, 2022, [720007521EN](#). <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135092963&lcid=135092962>>
4. Dreolin N. Carryover in UPLC methods: the case-study of fumonisins B₂. Waters White Paper, 2020, [720006826en](#). <<https://www.waters.com/waters/library.htm?&lid=135077606>>
5. Walter T. H.; Trudeau M.; Simeone J.; Rainville P.; Patel A. V.; Lauber M. A.; Kellet J.; DeLano J.; Brennan K.; Boissel K.; Birdsall R. and Berthelette K. Low adsorption UPLC system and columns based on MaxPeak High performance Surfaces: the ACQUITY Premier solution. Waters White Paper, 2021, [720007128en](#) <
<https://www.waters.com/waters/library.htm?cid=511436&lid=135079876&lcid=135079875>> .
6. SANTE/12089/2016. Guidance document on identification of mycotoxins in food and feed. Implemented by 01/01/2017.
7. Dreolin N.; Stead S.; Hird S.; Jenkins T. 使用直通式SPE和UPLC-MS/MS测定谷物、坚果、无花果和动物饲料中的管制真菌毒素及新型真菌毒素. 沃特世应用纪要, 2021, [720007377ZH](#).
8. Tamura, M.; Matsumoto, K.; Watanabe, J.; Iida, J.; Nagatomi, Y.; Mochizuki, N. Minimization of carryover for high-throughput liquid chromatography with tandem mass spectrometry analysis of 14 mycotoxins in corn grits. Journal of Separation Science. (2014). DOI: 10.1002/jssc.201400099.

特色产品

ACQUITY Premier系统 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077739>>

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

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

waters_connect定量分析软件 <[nextgen/cn/zh/products/informatics-and-software/waters_connect-for-quantitation.html](https://www.waters.com/nextgen/cn/zh/products/informatics-and-software/waters_connect-for-quantitation.html)>

720007773ZH, 2022年10月

© 2023 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](#)