

Application News

No. C165

LC/MS

通过 LC/MS/MS 同时分析 18 种霉菌毒素 (2)

据报道,会产生多种镰刀菌属真菌的霉菌毒素 (Mycotoxin) 是一种具有多种结构的次生代谢产物群,会污染各种食物和饲料,最终影响人类和动物的健康。为了尽量减少人畜健康问题,EU 对食品和饲料中的霉菌毒素设定了最大容许值。毒理学上最为重要的镰刀菌属真菌所产生的霉菌毒素包括脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON), T-2 毒素 (T-2), 玉米赤霉烯酮 (ZON) 以及伏马毒素 B1 (FB1)。

本应用项目将介绍通过 LC/MS/MS 对存在食品安全问题的 18 种主要霉菌毒素进行的一起分析的方法。

根据开发的方法,可在 12.5 分钟的周期时间内完成黄曲霉毒素类 (B1、B2、G1、G2)、伏马毒素类 (B1、B2、B3)、赭曲霉毒素 A (OTA) 以及单端孢霉 (3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-AcDON)、15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-AcDON)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、双乙酰基草镰刀菌醇 (DAS)、镰刀菌烯酮-X (FUS-X)、HT-2、新茄病镰刀菌烯醇 (NEO)、瓜萎镰菌醇 (NIV)、T-2、玉米赤霉烯酮 (ZON)) 的分析。定量限小于或等于 EC / 1886/2006 规定的最大值。

■ 样品和分析条件

测量样品由英国的受托分析公司 Concept LifeSciences 公司基于由该公司自身研发的提取方案处理后提供。

测量仪器采用了 UHPLC Nexera X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8060。为分离三组位置异构体对 (3-AcDON/15-AcDON、FB2/FB3 以及 FA2/FA3), 使用五氟苯基 (PFP) 结合型柱与 C18 柱进行了比较。

为提升信号强度,将乙酸铵、氟化铵、甲酸铵和乙酸溶液作为流动相候选进行了研究。根据研究结果,最终采用了氟化铵甲醇溶液中添加有氟化铵水溶液和乙酸的溶液作为流动相。已证实该流动相条件大幅改善了本次研究的所有霉菌毒素的正离子模式离子的信号强度。定量结果通过在提取处理阶段添加霉菌毒素的 13C 内标品计算。供于测量的所有溶剂均为 LCMS 级 (Sigma-Aldrich 制造)。

D. Baker^{*1}, C. Titman^{*1}, N. Loftus^{*1}, J. Horner^{*2}
^{*1}: Shimadzu, Manchester, UK
^{*2}: Concept Life Sciences, Cambridge, UK

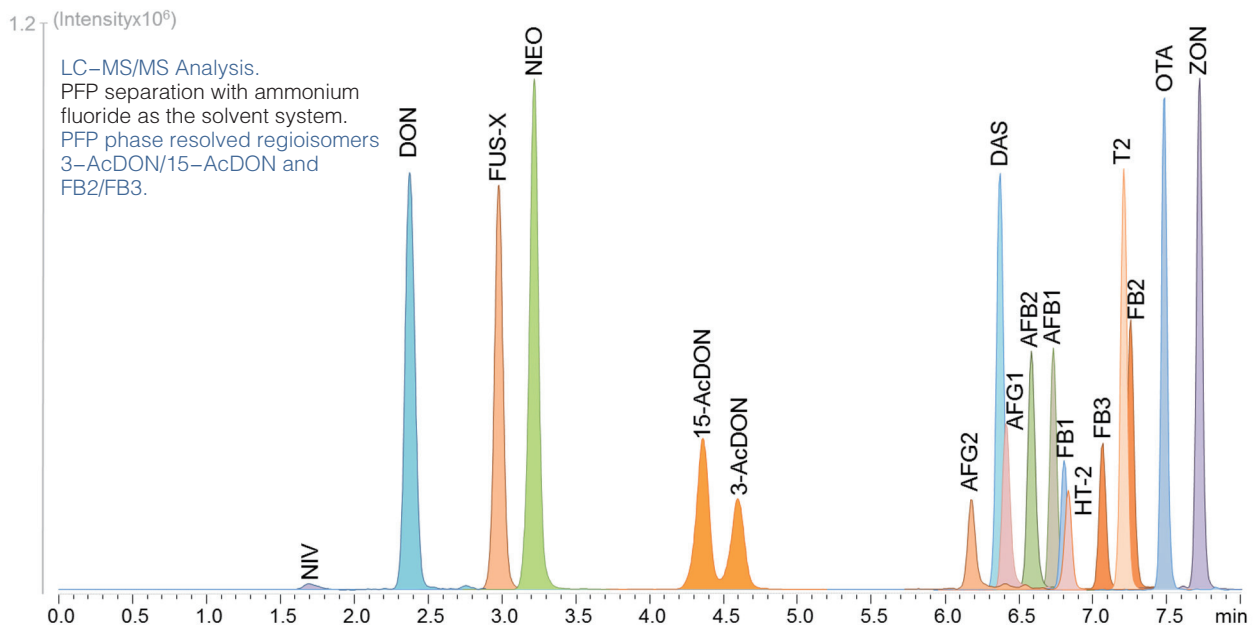


图 1 SFC / MS 的系统结构图

AFB1 (aflatoxin B1; 1 μ g/kg; rescaled x3), AFB2 (aflatoxin B2; 1 μ g/kg; rescaled x3), AFG1 (aflatoxin G1; 1 μ g/kg; rescaled x3), AFG2 (aflatoxin G2; 1 μ g/kg; rescaled x3), OTA (ochratoxin A; 4 μ g/kg), FB1 (fumonisins B1; 100 μ g/kg; rescaled x2), FB2 (fumonisins B2; 100 μ g/kg; rescaled x2), FB3 (fumonisins B3; 100 μ g/kg; rescaled x2), 15-AcDON (15-acetyldeoxynivalenol; 100 μ g/kg), 3-AcDON (3-acetyldeoxynivalenol; 100 μ g/kg), DON (deoxynivalenol; 100 μ g/kg), DAS (diastereoisomer of DON; 100 μ g/kg), FUS-X (fusarenon-X; 100 μ g/kg), HT-2 (100 μ g/kg), T-2 (100 μ g/kg; rescaled x0.3), NEO (neosolaniol; 100 μ g/kg; rescaled x0.3), NIV (nivalenol; 100 μ g/kg), ZON (zearalenone; 100 μ g/kg)

■ 氟化铵对离子信号强度的影响

通常，氟化铵因其在汽化状态下显示出较高的碱性，且具有在负离子模式的离子化过程中提高低分子化合物灵敏度的效果而广为人知。

然而，本次我们将其与霉菌毒素中使用的一般流动相条件进行了比较研究，结果证明可通过向流动相中加入氟化铵，来提升正离子模式下的离子信号强度。

向流动相中添加氟化铵，提升离子信号强度的实例如图2所示。三种色谱图的纵轴用相同的信号强度进行了归一化。与其他条件相比，添加了氟化铵的流动相大幅提升了各霉菌毒素在正离子模式下的离子信号强度（图2a）。

表 1 分析条件

UHPLC	Nexera X2 LC system
Analytical column	Mastro PFP (100 mmL. × 2.1 mm I.D., 3 μm)
Column temperature	40 °C
Flow rate	0.4 mL/min
Solvent A	0.15 mmol/L ammonium fluoride aqueous solution
Solvent B	0.15 mmol/L ammonium fluoride methanol solution with 2 % acetic acid
Binary Gradient	B conc. 15 % (0 min) – 25 % (1 min) – 40 % (2 min) – 41 % (4.5 min) – 100 % (7.5 – 10 min) – 15 % (10.1 min) – Stop (12.5 min)
Mass spectrometer	Shimadzu LCMS-8060
Pause time/Dwell time	1 msec/10–40 msec
Polarity switching time	Pos/neg switching time set to 5 msec
Source temperatures (interface; heat block; DL)	300 °C ; 400 °C ; 250 °C
Gas flows (nebulising; heating; drying)	3 L/min; 10 L/min; 10 L/min

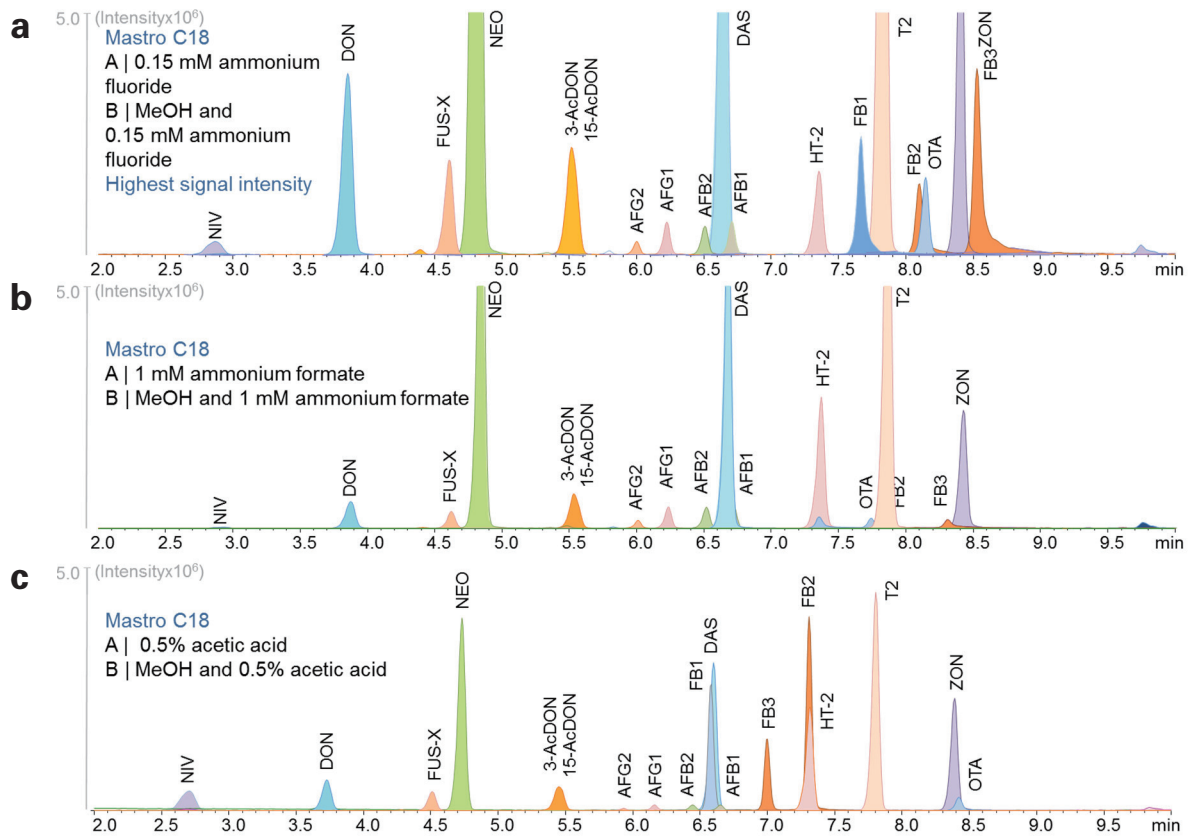


图 2 流动相条件不同的 18 种霉菌毒素成分的 MRM 色谱图比较 (Mastro C18 柱)

a: 流动相 A 0.15 mM 氟化铵水溶液、流动相 B 0.15 mM 添加了氟化铵的甲醇溶液

b: 流动相 A 1 mM 甲酸铵水溶液、流动相 B 1 mM 添加了甲酸铵的甲醇溶液

c: 流动相 A 0.5% 乙酸水溶液、流动相 B 0.5% 添加了乙酸的甲醇溶液

使用了氟化铵流动相的 18 种霉菌毒素成分的 PFP 柱同 C18 柱的色谱图比较如图 3 所示。PFP 柱使 C18 柱难以分离的绝大多数 3-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇的基线分离成为了可能。

另一方面，C18 柱对 3-AcDON 的负离子检测具有良好效果，因此被用于了该用途。

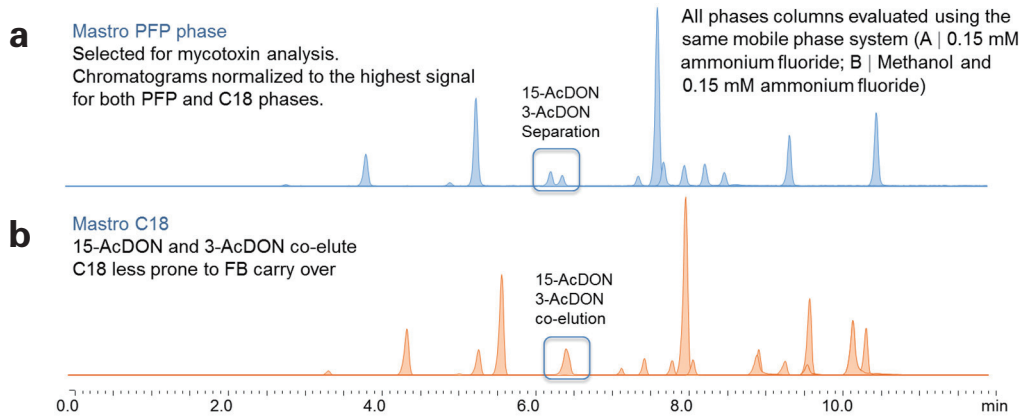


图 3 色谱柱不同的 18 种霉菌毒素成分的 MRM 色谱图比较
流动相 A 0.15 mM 氟化铵水溶液、流动相 B 0.15 mM 添加了氟化铵的甲醇溶液
a: Mastro PFP 柱、b: Mastro C18 柱

实际样品基质的测量

为了对 3-AcDON/15-AcDON 和 FB2/FB3 (位置异构体) 进行分离评估, 我们评估了以下的 PFP 柱 (Mastro PFP、Kinetix PFP、Discovery HS F5 PFP 和 ACE PFP)。相较于 C18 柱, 上述所有 PFP 柱均以几乎将位置异构体从基线上分离的状态实现了分离。但若想抑制 FB 的残留, 必须对流动相做出

些许变更。向流动相 B 添加 2% 乙酸后有效抑制了 FB 的残留。霉菌毒素标准样品溶液、混合香料提取液以及胡椒提取液的色谱图如图 4 所示。反复注入各提取液 (n=12) 后, 霉菌毒素 (AFB1、B2、G1、G2、OTA) 的各面积值 %RSD 均变为了 10% 以下。

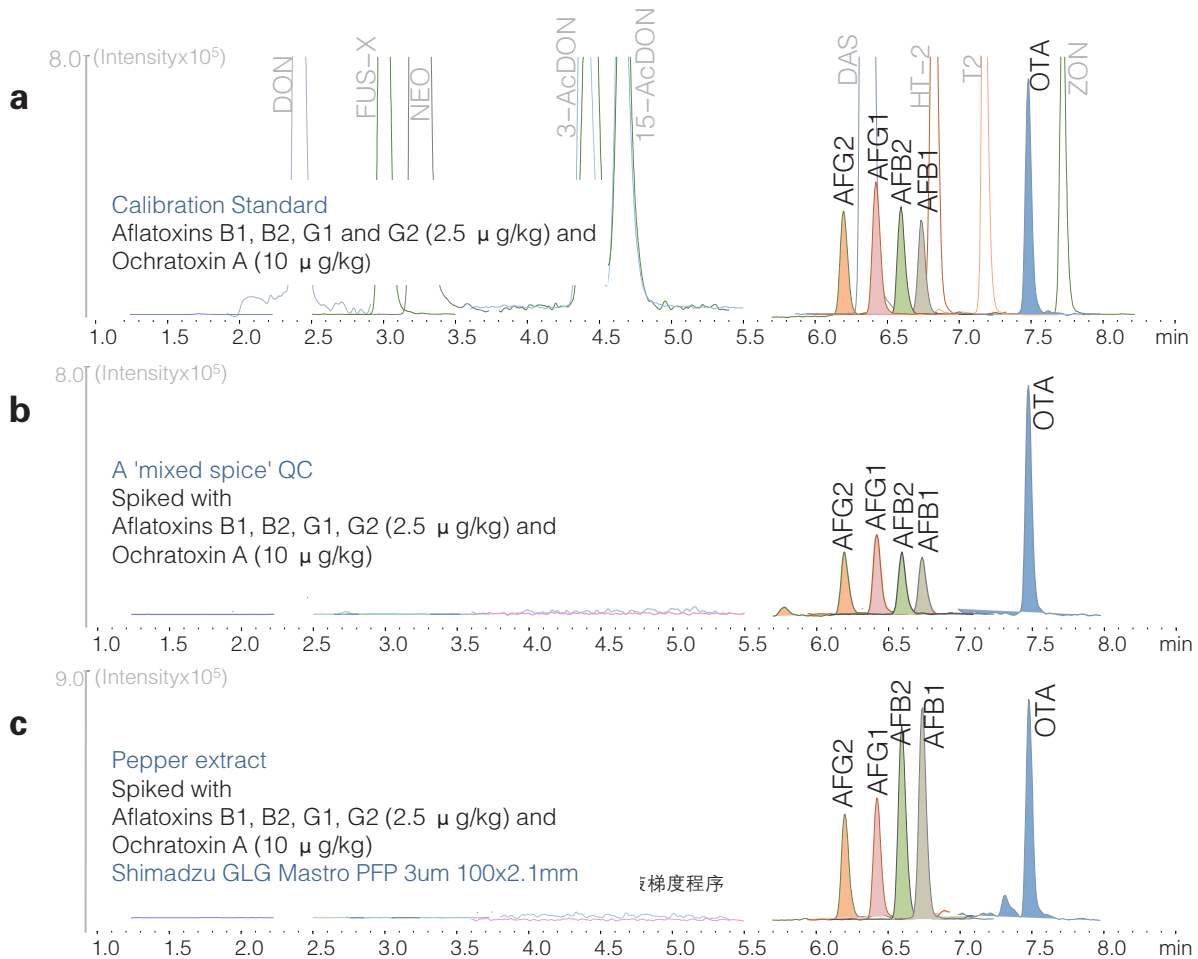


图 4 霉菌毒素标准样品和混合香料、胡椒提取液的色谱图 添加黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 (2.5 μ g/kg) 和赭曲霉毒素 A (10 μ g/kg)
a: 霉菌毒素标准样品溶液、b: 混合香料提取液、c: 胡椒提取液

表 2 霉菌毒素的 MRM 定量离子和定性离子对

Compound name	Parention	RT (mins)	MRM 1	MRM 2	Internal Standard	Calibration range ($\mu\text{g/kg}$)	R ²
Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	6.773	313 > 241	313 > 285	¹³ C Aflatoxin B1	0.1 – 10	0.9988
Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	6.621	315 > 259	315 > 287	¹³ C Aflatoxin B2	0.1 – 10	0.9995
Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	6.453	329 > 243	329 > 200	¹³ C Aflatoxin G1	0.1 – 10	0.9998
Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	6.219	331 > 245	331 > 285	¹³ C Aflatoxin G2	0.1 – 10	0.9965
Ochratoxin A	[M+H] ⁺	7.509	404 > 239	404 > 221	¹³ C Ochratoxin A	0.4 – 40	0.9969
Fumonisin B1	[M+H] ⁺	6.811	722 > 352	722 > 334	¹³ C Aflatoxin B2	10 – 1000	0.9937
Fumonisin B2	[M+H] ⁺	7.26	706 > 318	706 > 354	¹³ C Aflatoxin B2	10 – 1000	0.9998
Fumonisin B3	[M+H] ⁺	7.073	706 > 318	706 > 354	¹³ C Aflatoxin B2	10 – 1000	0.9991
Deoxynivalenol	[M+H] ⁺	2.372	297 > 279	297 > 249	¹³ C Deoxynivalenol	10 – 1000	0.9992
Diacetoxyscirpenol	[M+NH ₄] ⁺	6.349	384 > 229	384 > 307	¹³ C T-2 Toxin	10 – 1000	0.9994
T-2	[M+NH ₄] ⁺	7.206	484 > 185	484 > 215	¹³ C T-2 Toxin	10 – 1000	0.9989
HT-2	[M+Na] ⁺	6.822	447 > 345	447 > 285	¹³ C T-2 Toxin	10 – 1000	1.0000
Nivalenol	[M+CH ₃ COO]	1.684	371 > 281	371 > 311	¹³ C HT-2	10 – 1000	0.9991
Neosolaniol	[M+NH ₄] ⁺	3.227	400 > 215	400 > 305	¹³ C Deoxynivalenol	10 – 1000	0.9995
Fusarenol X	[M+H] ⁺	2.986	355 > 247	355 > 277	¹³ C Deoxynivalenol	10 – 1000	0.9987
Zearalenone	[M-H] ⁻	7.711	317 > 175	317 > 131	¹³ C T2 Toxin	10 – 1000	0.9985
15-Acetyldeoxynivalenol	[M+H] ⁺	4.406	339 > 261	339 > 297	¹³ C Deoxynivalenol	10 – 1000	1.0000
3-Acetyldeoxynivalenol	[M+H] ⁺	4.618	339 > 261	339 > 297	¹³ C Deoxynivalenol	10 – 1000	0.9986
13C HT-2	[M+NH ₄] ⁺	6.844	464 > 278				
13C T-2	[M+NH ₄] ⁺	7.228	508 > 322				
13C Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	6.754	330 > 301				
13C Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	6.614	332 > 303				
13C Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	6.435	346 > 212				
13C Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	6.219	348 > 259				
13C Ochratoxin A	[M+H] ⁺	7.516	424 > 250				

■ 总结

使用氟化铵有效的提升了霉菌毒素在正离子模式检测中的信号强度。

通过向流动相 B 中添加 2% 乙酸，成功地抑制了伏马毒素类真菌的残留。

通过使用 PFP 固定相柱，使霉菌毒素的位置异构体的分离成为了可能。

根据本次开发的方法、使得通过 PFP 和 C18 柱对霉菌毒素的高灵敏度分析成为了可能。两种柱子均实现了 12.5 分钟的分析。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2017 年 9 月