Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

使用Myco6in1+ Immunoaffinity Clean-Up和ACQUITY QDa检测器快速定量分析加工玉米中的12种霉菌毒素

Dominic Roberts,[1] Sara Stead,[1] Veronica Lattanzio,[2] Biancamaria Ciasca,[2] Eimear McCall,[1] Jennifer Burgess,[3]和Stephen Powers[4]
[1]沃特世公司(英国威姆斯洛); [2]意大利国家研究理事会, 食品生产科学研究所(意大利巴里); [3]沃特世公司(美国马萨诸塞州米尔福德); [4]VICAM(美国马萨诸塞州米尔福德)

应用优势

- 通过单个方法检测多种霉菌毒素。
- 可在规定限值水平检测复杂谷类原料食品中的12种霉菌毒素。

沃特世解决方案

CORTECS™ UPLC® C_{18}色谱柱

ACQUITY UPLC® I-Class系统

ACQUITY QDa™检测器

VICAM® Myco6in1+® Immunoaffinity色谱柱(IAC)

关键词

霉菌毒素, 单端孢霉烯, 雪腐镰, 刀菌烯醇, 烟曲霉毒素, 黄曲霉毒素, 赭曲霉毒素, 玉米赤霉烯酮, QDa

简介

霉菌毒素是由真菌天然生成的次生代谢物。霉菌毒素种类繁多, 可污染多种水果、谷物和粮食。由于具有较高的化学稳定性且可耐受不同形式的分解, 许多此类物质都具有致癌性、雌激素活性和体内免疫毒性作用。因此, 全世界出台了多种法规, 强制执行霉菌毒素的取样和测定方法, 并规定了特定霉菌毒素的允许限值。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、烟曲霉毒素(B1和B2)、黄曲霉毒素(B1、B2、G1和G2)、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的最高允许浓度在欧盟委员会法规1881/2006和1126/2007中进行了规定。最近, 建议2013/165又提供了T2和HT2毒素总量的推荐浓度。除此之外, 法规401/2006还对分析方法中取样和分析方法作出了相关规定。对于另一种常与DON结合污染谷物的镰刀菌毒素——雪腐镰刀菌烯醇(NIV), 虽然目前尚无相关规定, 但本研究中仍然关注了这种霉菌毒素的存在。

由于被真菌天然污染的食品类商品复杂多样, 多种霉菌毒素的分析极具挑战性且非常耗时。因此, 找到可根据相关霉菌毒素和商品的规定浓度快速灵敏地进行筛选的工具至关重要。我们迫切需要开发出能够检测多种霉菌毒素的方法, 而LC-MS在这一领域扮演着重要的角色。然而, 由于主要霉菌毒素的化学和物理性质不同, 样品制备便成为了最具挑战性的任务。

鉴于食品和饲料被各种霉菌毒素天然污染的频率, 需要针对管制霉菌毒素的简单且灵敏的检测方法。本研究的目的是使用免疫亲和净化方法和单一检测器开发出一种简单、准确的方法, 对加工玉米中的多种霉菌毒素进行定量分析。

实验

UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
运行时间:	12 min
色谱柱:	CORTECS C_{18} 1.6 µm, 2.1 x 100 mm
流动相 A:	2 mM 醋酸铵，含 0.1% 甲酸的水溶液
流动相 B:	2 mM 醋酸铵，含 0.1% 甲酸的甲醇溶液
流速:	0.4 $mL.min^{-1}$
进样体积:	10 µL

梯度:

时间 (min)	A (%)	B (%)
初始	99.0	1.0
7.00	50.0	50.0
10.0	1.0	99.0
11.5	1.0	99.0
11.6	99.0	1.0
14.00	99.0	1.0

MS条件

MS系统:	ACQUITY QDa检测器
电离模式:	ESI±
脱溶剂气温度:	600 °C
毛细管电压:	缺省(0.8 kV)
采样速率:	缺省(5 Hz)
SIR通道:	见表 1

样品制备

将10克研磨后的样品经高速提取后与40 mL水混合，然后再加入60mL乙醇。过滤提取物，取5mL样品在氮气下浓缩至大约2mL。加入磷酸盐缓冲液(5 mL)，将所得溶液上样至VICAM Myco6in1+ Immunoaffinity色谱柱(IAC)。用10 mL水清洗色谱柱，然后对毒素进行洗脱，首先使用甲醇(3 mL)，接下来使用水(2 mL)。将洗脱液在温和的氮气流中蒸发至干，然后复溶于0.2 mL 10:90 v/v甲醇:流动相A溶液中。

标准品制备

使用Myco6in1 * IAC制备空白谷物食品样品(未加标)。所得洗脱液用混合的霉菌毒素标准品进行基质加标，以得到5个点的校准曲线，所有校准曲线上中点范围与每种霉菌毒素的允许浓度相等。其余点平均分布，使得其中两个标准品的浓度在相关霉菌毒素的允许限值之下，另两个在允许限值之上。接着，将这些标准品蒸发至干，并复溶于10:90 v/v甲醇:流动相A溶液中。

结果与讨论

Waters® ACQUITY QDa检测器的缺省源条件为所有12种霉菌毒素分析物的分析提供了最佳性能。各个质量数、锥孔电压和电喷雾电离模式的鉴定结果如表1所示。

表1 . 12种霉菌毒素及其实验参数。

霉菌毒素	缩写	RT (min)	SIR (*m/z*)	锥孔电压 (V)	校准范围 (μg.kg^{-1})
1. 雪腐镰刀菌烯醇	[NIV-H_2O+H^+]	2.2	295.0	15	468.75 to 5625.00
2. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇	[DON+H^+]	2.9	297.0	10	468.75 to 5625.00
3. 黄曲霉毒素G2	[AFG2+H^+]	5.8	331.0	20	0.625 to 7.50
4. 黄曲霉毒素G1	[AFG1+H^+]	6.2	329.0	20	0.625 to 7.50
5. 黄曲霉毒素B2	[AFB2+H^+]	6.5	315.0	20	1.250 to 15.00
6. 黄曲霉毒素B1	[AFB1+H^+]	6.8	313.0	20	0.625 to 7.50
7. HT2毒素	[HT2+Na^+]	8.2	447.0	15	31.250 to 375.00
8. 烟曲霉毒素B1	[FB1+H^+]	8.3	722.0	20	500.000 to 6000.00
9. T2毒素	[T-2+NH_4^+]	8.6	484.0	15	31.250 to 375.00
10. 赭曲霉毒素A	[OTA+H^+]	8.8	404.2	20	62.500 to 750.00
11. 玉米赤霉烯酮 (负离子模式)	[ZEA-H]$^-$	8.8	317.0	20	1.875 to 22.50
12. 烟曲霉毒素B2	[FB2+H^+]	9.0	706.0	20	125.000 to 1500.00

全部12种霉菌毒素在相关的校准范围内都获得了良好的线性。每种分析物在色谱峰中至少都获得了12个数据点。图1显示了线性情况的一个例子，如图所示，AFG1和DON展示了规定限值的差异及所需的校准范围。由于黄曲霉毒素的规定限值较低，AFG1的校准曲线在0.125到4.0 μg.kg-1的范围内；而DON的校准曲线则在94.0到1500 μg.kg-1的范围内。在这些不同校准范围内所观察到的所有分析物良好的线性表明，即使是较为复杂的基质，该仪器也能在宽泛的动态范围内表现出优异的稳定性。

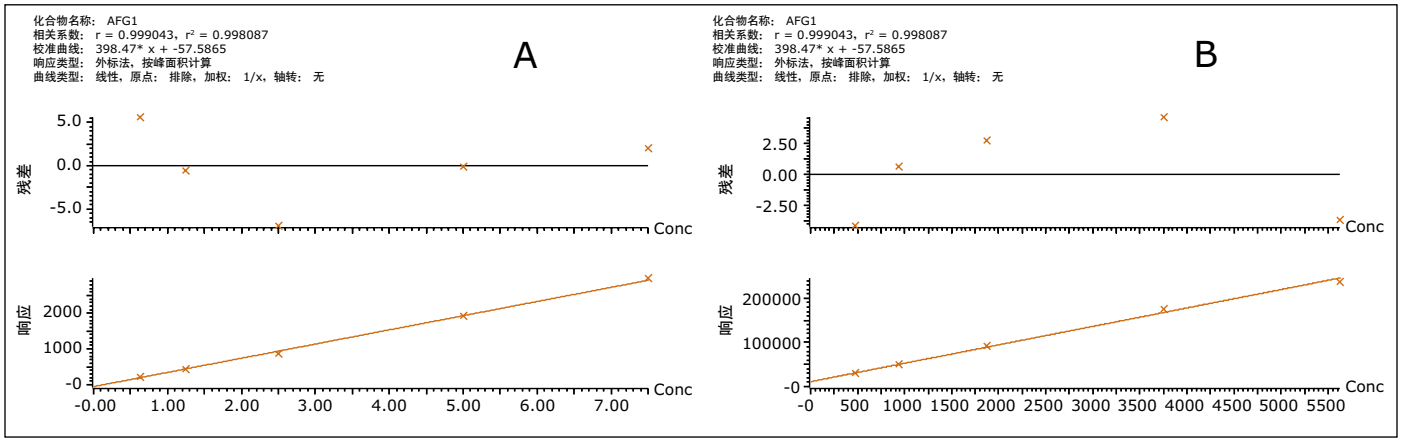
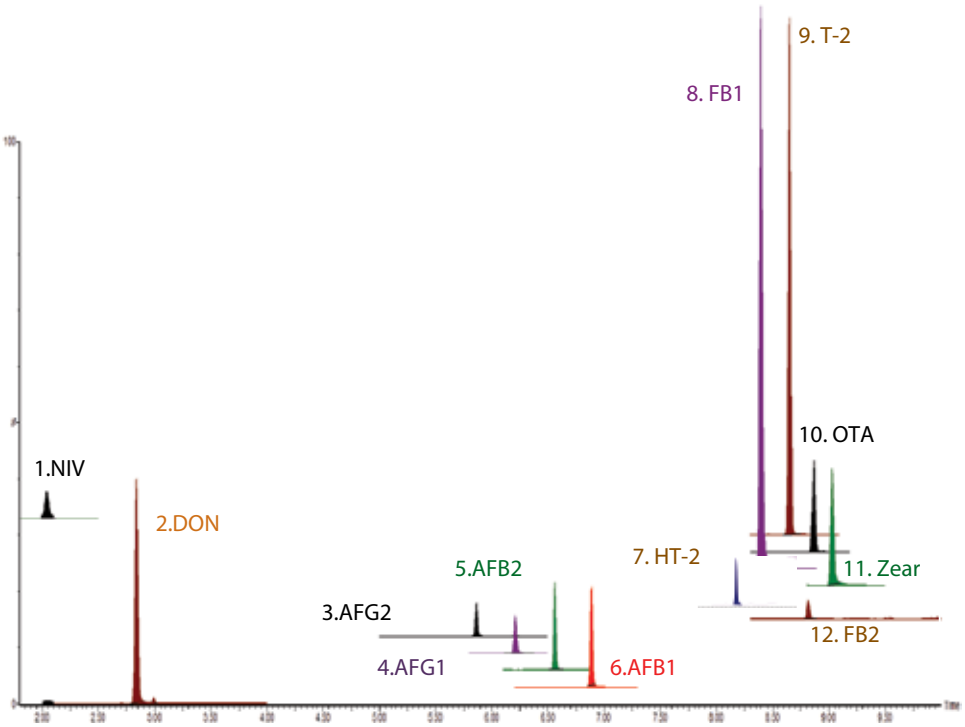


图1. 基质匹配校准曲线示例，1A为黄曲霉素G1，其对应的校准范围为0.125到4 μg.kg-1，1B为脱氧雪腐镰刀菌烯醇，其对应的校准范围为94.0到1500 μg.kg^{-1}。

色谱所得结果的例子如图2所示，在此例中，玉米食品中的霉菌毒素含量被加标至规定限值。每种分析物的测定都表现出令人满意的灵敏度，并且获得了出色的信噪比(S/N)。所有四种黄曲霉毒素以及其他八种霉菌毒素都可以通过配备质谱检测器的液相色谱仪轻松检出。



霉菌毒素	加标浓度 (µg kg⁻¹)	S/N
NIV	750	1188
DON	750	20955
AFG2	1	5149
AFG1	1	18272
AFB2	1	1967
AFB1	2	12766
HT2	50	430
FB1	800	2682
T-2	50	64641
OTA	3	993
Zear	100	6682
FB2	200	1967

图2. 加标至所示浓度(欧盟规定限值)的加工玉米食品样品。在法律允许的浓度范围内，色谱分离所得的峰(已归一化)表现出优异的信噪比。

结论

在本应用纪要中，开发了一种简单、灵敏且经济有效的方法用于加工玉米提取物中12种管制霉菌毒素的定量分析。仅使用一种样品制备程序就能够提取出所有分析物并使用ACQUITY QDa检测器轻松进行检测。无需额外耗时的样品制备过程，使用单一检测器便可完成多种霉菌毒素的快速筛选。

Waters
THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, UPLC, ACQUITY UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。CORTECS和ACQUITY QDa是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自的拥有者所有。

©2014沃特世公司　印制于中国 2014年4月 720005018ZH AG-PDF

沃特斯中国有限公司
沃特世科技(上海)有限公司

北京: 010 - 5209 3866
上海: 021 - 6156 2666
广州: 020 - 2829 5999
成都: 028 - 6578 4990
香港: 852 - 2964 1800

免费售后服务热线: 800 (400) 820 2676
www.waters.com