

使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 样品 净化产品和 LC/MS/MS 分析奶酪中的 多种真菌毒素

作者

Derick Lucas 和 Limian Zhao
安捷伦科技公司

摘要

本研究使用脂质去除产品 Agilent Captiva EMR-Lipid 成功净化了含有多种真菌毒素的蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪提取物。奶酪中所含的大量脂质给准确定量低浓度真菌毒素带来了挑战。Captiva EMR-Lipid 将体积排阻与疏水相互作用两种净化机制相结合，能够选择性地捕获脂类烃链，以及保留非目标干扰成分。这款小柱有 3 mL 和 6 mL 两种规格，可对多脂样品提取物进行直通式净化。净化后的提取物可直接进样至 LC/MS 进行分析，也可根据分析方法要求进行后处理。本研究依次采用 QuEChERS 工作流程和 Captiva EMR-Lipid 小柱进行样品净化，成功验证了蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪中的 13 种真菌毒素。该方法可检测奶酪中浓度低至 0.5 ng/g 的真菌毒素，且回收率达 70.7%-111.8%，RSD 小于 20%。此外，本研究还通过残留物重量分析、GC/MS 全扫描、磷脂 LC/MS 检测和脂质冻析法评估了基质去除率。

前言

真菌毒素是多种农作物上真菌物种的次级代谢物，与致突变、致癌、致畸作用以及免疫影响有一定关联¹。奶酪中的真菌毒素污染可能由原料污染引起，也可能由真菌菌株污染奶酪之后天然合成的毒素引起。奶酪极易发霉，并且易受储存条件和化学防腐剂含量的影响^{2,3}。检测和定量复杂样品中低浓度有害真菌毒素的方法不仅包括各种免疫分析法，还包括将 LC/MS 与样品前处理技术（如免疫亲和、SPE、QuEChERS⁴ 或稳定同位素稀释⁵）相结合的方法。高脂肪含量样品的分析尤为棘手，许多样品净化产品（如基于免疫原理的小柱）都价格昂贵，且只能用于特定的分析物、化合物类别或样品类型。其他净化产品致力于高效且高选择性地去除基质共萃取物（尤其是脂质），这种物质会导致分析重现性差、基质效应明显，并在仪器中聚集引起污染。

Agilent Captiva EMR—Lipid 3 mL 和 6 mL 萃取管提供了一种简单的直通式净化方案，能够从多脂样品提取物中选择性地去除脂质以分析多种真菌毒素。本研究使用快速、简便、经济、高效、耐用和安全 (QuEChERS) 的萃取方法萃取奶酪中的 13 种真菌毒素。QuEChERS 方法因其能够高效萃取多个类别的分析物而著称，但该方法同时也会萃取出大量基质。Captiva EMR—Lipid 小柱的脂质去除率极高，有助于分析人员准确定量目标真菌毒素。本研究使用基质共萃取物残留重量分析、GC/MS 全扫描、磷脂 LC/MS/MS 分析以及脂质冻析结果比较等方法评估了脂质去除率。此外，通过分析加标三种浓度的黄曲霉毒素 (AF-B1、B2、G1、G2、M1)、赭曲霉毒素 (OTA、OTB)、伏马菌素 (FB1、FB2、FB3)、玉米赤霉烯酮 (ZON)、霉酚酸 (MPA) 和杂色曲霉毒素 (STC) 的蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪样品，对该方法进行了验证。对于这类高脂肪含量样品基质中痕量真菌毒素的分析，使用该方法可达到优异的回收率、精度和灵敏度。

实验部分

样品前处理

- Agilent Captiva EMR—Lipid 3 mL 萃取管（部件号 5190-1003）
- Agilent QuEChERS Original 萃取盐（部件号 5982-5555）
- Agilent VacElut SPS-24 真空歧管（部件号 12234022）

液相色谱配置和参数

配置											
组件	Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II 大容量柱温箱 (G7116B)										
分析柱	Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm, 液相色谱柱 (部件号 695775-902) Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 2.1 × 5 mm, 2.7 μm (部件号 821725-911)										
柱温	40 °C										
进样量	5 μL										
流动相 A	5 mM 甲酸铵水溶液 + 0.1% 甲酸										
流动相 B	1:1 乙腈:甲醇 + 0.1% 甲酸										
流速	0.5 mL/min										
梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>5</td></tr><tr><td>1</td><td>50</td></tr><tr><td>4</td><td>60</td></tr><tr><td>7</td><td>98</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0	5	1	50	4	60	7	98
时间 (min)	%B										
0	5										
1	50										
4	60										
7	98										
后运行时间	2 分钟										
进样针清洗	1:1:1 水:乙腈:异丙醇, 持续 10 秒										
样品瓶	2 mL 样品瓶 (部件号 5190-4044) PTFE 瓶盖 (部件号 5182-0725) 垫片 (部件号 5183-2086)										

MS/MS 配置和参数

配置	
	采用安捷伦喷射流技术的 Agilent 6460 三重四极杆 LC/MS 系统
MS/MS 模式	动态 MRM
离子模式	正离子/负离子
干燥气温度	250 °C
干燥气流速	8 L/min
雾化器压力	40 psi
鞘气温度	350 °C
鞘气流速	11 L/min
毛细管电压	3500 V
EMV	500 V (+) 0 V (-)
喷嘴电压	1500 V (+) 0 V (-)

化合物	母离子	定量离子 (CE)	定性离子 (CE)	碎裂电压 (V)	保留时间 (min)
黄曲霉毒素 M1 (AF-M1)	329.1	313.0 (24)	115.1 (88)	135	1.842
黄曲霉毒素 G2 (AF-G2)	331.1	313.0 (24)	115.1 (88)	165	1.916
黄曲霉毒素 G1 (AF-G1)	329.1	243.2 (24)	200.0 (44)	175	2.018
黄曲霉毒素 B2 (AF-B2)	315.1	287.0 (28)	259.0 (32)	175	2.104
黄曲霉毒素 B1 (AF-B1)	313.1	285.2 (24)	128.1 (84)	170	2.223
¹³ C 黄曲霉毒素 B1 (IS)	330.1	301.1 (24)	-	170	2.223
伏马菌素 B1 (FB1)	722.4	352.3 (36)	334.4 (44)	200	2.810
赭曲霉毒素 B (OTB)	370.0	205.0 (16)	120.1 (96)	120	3.282
霉酚酸 (MPA)	321.1	302.9 (4)	206.9 (20)	90	3.304
伏马菌素 B3 (FB3)	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	3.780
玉米赤霉烯酮 (ZON)	317.1	175 (24)	131 (28)	175	4.155
伏马菌素 B2 (FB2)	706.4	336.3 (36)	318.5 (40)	200	4.511
赭曲霉毒素 A (OTA)	404.1	239.0 (24)	120.1 (96)	120	4.604
杂色曲霉毒素 (STC)	325.0	310.0 (24)	102.1 (96)	120	4.685

化学品与试剂

从当地杂货店购买食品样品用于方法定量和基质去除研究。标准品和内标以预混合溶液的形式购自 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) 或 Romer Labs (Getzersdorf, Austria)。LC 溶剂购自 Honeywell (Muskegon, MI, USA)。

验证研究

通过批次分析验证奶酪中的真菌毒素，批次中的样品包括两个双空白样品、两个空白样品、六个校准品和三种 QC 浓度的加标样品。QC 样品的预加标浓度如表 1 所示，每个样品重复测定五次 (n = 5)，并在两组校准曲线之间进样。使用六种浓度的校准品绘制校准曲线：对于 AF-B1、AF-B2、AF-G1、AF-G2、MPA、OTA、STC 和 ZON，采用 0.25、1、5、10、20 和 40 ng/mL；对于 AF-M1 和 OTB，采用 0.125、0.5、2.5、5、10 和 20 ng/mL；对于 FB1、FB2 和 FB3，采用 1.25、5、25、50、100 和 200 ng/mL。同位素标记内标 ¹³C-AF-B1 的加标浓度为 5 ng/mL。

表 1. 样品 QC 浓度

分析物	LQ (ng/g)	MQ (ng/g)	HQ (ng/g)
AF-B1	1	5	10
AF-B2	1	5	10
AF-G1	1	5	10
AF-G2	1	5	10
AF-M1	0.5	2.5	5
FB1	5	25	50
FB2	5	25	50
FB3	5	25	50
MPA	1	5	10
OTA	1	5	10
OTB	0.5	2.5	5
STC	1	5	10
ZON	1	5	10

样品前处理的详细步骤

称取 2 g 奶酪置于 50 mL 离心管中。向校准品和 QC 样品中预加标适当浓度的目标分析物，在萃取之前等待其完全浸入奶酪基质中，持续 1 小时以上。接下来加入 10 mL 水并保持 5 分钟，使其浸入样品中。加入 10 mL 乙腈 (含 2% 甲酸)，在 Geno/Grinder 上垂直振荡 20 分钟以萃取样品。将 QuEChERS Original 萃取盐 (4 g MgSO₄, 1.5 g NaCl) 加入样品中，继续垂直振荡 2 分钟。样品在 5000 rpm 下离心 5 分钟。移取 8 mL 上层乙腈相至洁净的试管中，加入 2 mL 水进行稀释 (水的体积百分比为 20%) 并涡旋混合。取 2.5 mL 提取物加载到 3 mL Captiva EMR—Lipid 萃取管中，使其在重力作用下流过萃取管。待提取物完全从 Captiva EMR—Lipid 萃取管中洗脱之后 (约 10 分钟)，施加真空，将真空度从 1 增加到 10 英寸汞柱以排空萃取管。接下来，取 1.25 mL 洗脱液转移至洁净的样品管中，在 40 °C 氮气流吹扫下挥干，并在涡旋混合和超声辅助下用 200 µL 85:15 的 5 mM 甲酸铵:乙腈复溶。将样品转移至自动进样器样品瓶中进行 LC/MS/MS 分析。

结果与讨论

线性

使用 Agilent MassHunter 定量分析软件处理数据。使用线性回归拟合和 $1/x^2$ 加权得到 13 种真菌毒素的校准曲线，其 R^2 值均大于 0.990。所有校准品的准确度都在预期值 $\pm 10\%$ 以内。

回收率和精度结果

表 2 中的汇总数据表明本研究获得了出色的结果。所有 QC 样品的回收率都在 70%-120% 范围内，所有浓度下的 %RSD 均小于 20，且大多数分析物的 %RSD 小于 10。帕尔玛奶酪的总体重现性更出色，这可能是由于其基质复杂性低于蓝纹奶酪。以前的研究没有最终浓缩步骤，但考虑到样品量少且检测限低，浓缩步骤是很有必要的。由于乙腈的萃取能力有限，伏马菌素成为了本研究中唯一一类具有挑战性的真菌毒素。优化实验表明，加入 2% 甲酸可大幅提高该类分析物的溶解度，且不会对其他类别的分析物产生不利影响。

表 2. 蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪中 13 种真菌毒素的回收率和精度结果 (n = 5)

分析物	LQ		MQ		HQ	
	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD
帕尔玛奶酪						
AF-M1	111.8	1.5	95.6	5.9	96.3	1.7
AF-G2	101.8	2.2	98.5	3.8	104.6	3.2
AF-G1	102.2	2.8	89.1	2.2	93.9	6.6
AF-B2	108.5	1.5	101.5	4.2	103.5	2.4
AF-B1	103.2	5.1	84.9	2.7	90.3	2.9
FB1	79.4	6.7	71.3	3.2	74.2	2.2
OTB	109.6	1.7	98.5	7.2	106.0	1.8
MPA	111.3	8.6	103.6	2.1	107.5	4.6
FB3	98.2	7.1	90.6	8.1	92.0	5.0
ZON	98.0	7.8	85.8	4.0	88.2	2.8
FB2	101.9	5.5	92.4	7.8	95.6	3.8
OTA	104.7	10.4	89.4	5.7	92.6	2.5
STC	85.4	3.4	70.7	2.3	75.7	2.5
蓝纹奶酪						
AF-M1	97.0	17.8	101.2	8.8	107.9	5.8
AF-G2	88.6	12.4	96.1	6.3	98.3	8.6
AF-G1	91.8	9.1	97.5	2.5	105.5	3.2
AF-B2	98.2	13.8	99.7	8.8	108.5	8.1
AF-B1	91.8	7.9	93.5	5.7	102.4	6.2
FB1	103.9	7.9	83.5	5.4	85.3	5.8
OTB	81.5	7.1	79.9	3.9	89.0	5.8
MPA	92.4	10.3	95.0	1.8	95.4	8.0
FB3	101.9	5.7	93.9	5.0	94.3	7.7
ZON	76.1	3.9	83.3	9.6	90.2	9.3
FB2	102.0	4.7	100.6	5.9	99.4	3.9
OTA	89.0	3.4	82.5	7.9	84.9	5.5
STC	100.0	3.0	74.3	13.4	70.9	6.8

EMR—Lipid 机制

EMR—Lipid 的选择性得益于体积排阻和疏水相互作用两种机制的结合。脂类具有线性、无支链的烃链，其分子足够小，可以进入 EMR—Lipid 吸附剂中。一旦进入吸附剂中，脂类就会因疏水相互作用而被牢牢固定住。大多数分析物都没有线性、无支链的烃链结构，因此不会进入吸附剂中，而会留在溶液中以待分析。较短的烃链（少于 6 个碳原子）与 EMR—Lipid 的结合不够强，因此无法像烃链较长的脂类那样被完全去除。EMR—Lipid 独特的净化机制以基质干扰物而不是各种类别的分析物为捕集目标，非常适用于多类别、多残留分析。

竞争产品比较 — 回收率和精度

本研究评估并比较了 Captiva EMR—Lipid 和来自另一制造商的市售直通式净化小柱 (6 mL, 500 mg) 的回收率和精度。在评估过程中，直接对奶酪提取物进行加标，以排除萃取过程对回收率和精度的影响。表 3 中汇总的评估结果表明，使用 Captiva EMR—Lipid 小柱净化样品的回收率更高，尤其是对于玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素 A 和杂色曲霉毒素这几种化合物。Captiva EMR—Lipid 独特的吸附剂化学机制能够选择性地捕获脂质，而目前的市售产品往往会将不需要的分析物保留下来（尤其是具有较强疏水性的分析物）。

基质去除

奶酪中含有多个类别的脂质，包括游离脂肪酸、甘油三酯和一些低浓度的磷脂。基于乙腈的 QuEChERS 萃取方法可有效去除蛋白质。本研究使用定量和定性方法评估了脂质去除率，包括残留物重量测定、GC/MS 全扫描、磷脂 LC/MS/MS 分析以及脂质冻析等。

表 3. Agilent Captiva EMR—Lipid 与其他制造商小柱的直通式净化回收率和精度比较（帕尔玛奶酪提取物，5 ng/mL，n = 4）

	Agilent Captiva EMR—Lipid 小柱		其他制造商的小柱	
	%回收率	%RSD	%回收率	%RSD
AF-M1	96.1	3.6	93.5	4.4
AF-G2	100.9	0.5	89.5	4.4
AF-G1	102.4	1.6	86.1	4.8
AF-B2	100.8	3.2	84.2	4.7
AF-B1	98.4	4.0	85.3	5.5
FB1	96.6	3.4	77.3	3.8
OTB	104.9	6.4	76.7	7.5
MPA	90.8	7.2	79.3	7.0
FB3	103.1	11.6	76.8	11.5
ZON	96.1	3.1	46.7	7.5
FB2	85.0	6.9	85.1	9.6
OTA	95.1	10.9	66.4	11.7
STC	99.6	4.1	50.1	10.3

使用 GC/MS 监测基质去除率

尽管已经使用 LC/MS/MS 完成了验证，但通过比较样品最终提取物的 GC/MS 全扫描结果仍可获取有关基质和脂质去除情况的重要信息。进行 Captiva EMR—lipid 净化之后，通过基于 MgSO₄ 的盐析去除样品提取物中残留的水。图 1 所示为蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪在 Captiva EMR—Lipid 净化前后的 GC/MS 全扫描色谱图。图中的黑色迹线为未净化样品提取物的色谱图，表明存在脂质及其他基质共萃取物。红色迹线是经

过 Captiva EMR—Lipid 小柱净化后的样品提取物的色谱图。经 Captiva EMR—Lipid 净化后的蓝纹奶酪（红色）的基质去除率为 61%，而净化后的帕尔玛奶酪（紫色）的基质去除率为 68%，基质去除率根据公式 1 计算得到。晚洗脱基质被完全去除，早洗脱基质显著减少但未完全去除。还有一点也非常明显：尽管两种奶酪的色谱图显示二者的组成类似，但蓝纹奶酪所含的脂肪酸比帕尔玛奶酪更多。

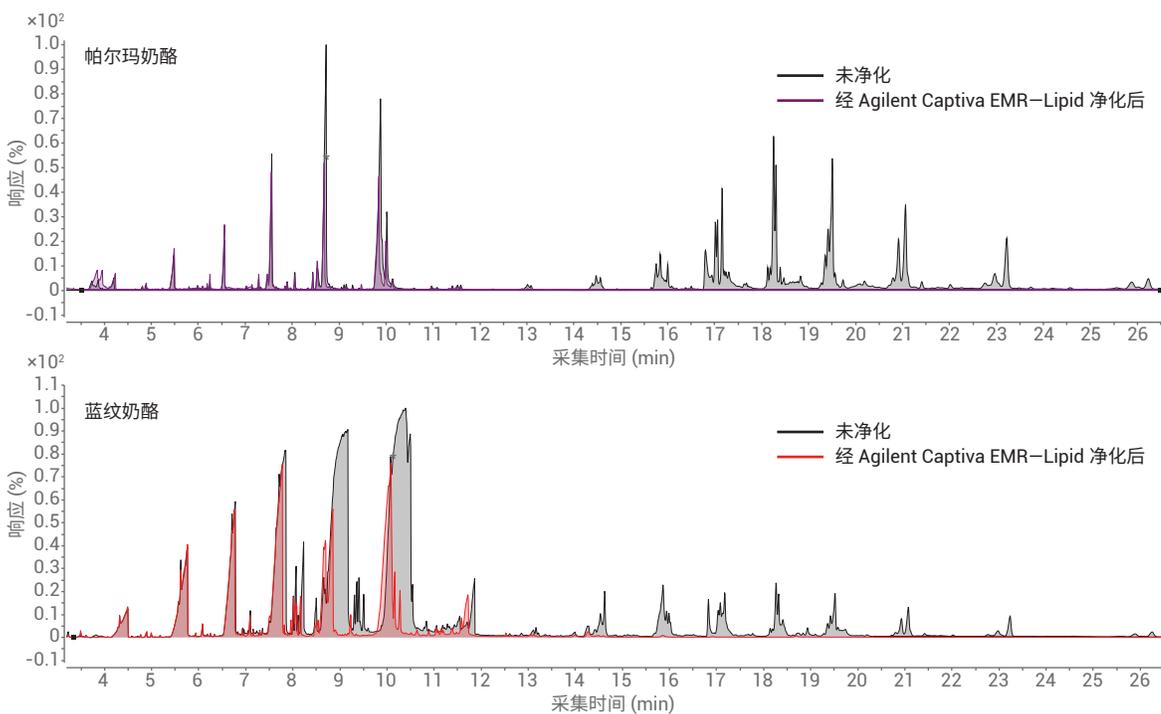


图 1. 通过比较奶酪样品经 Agilent Captiva EMR—Lipid 净化前后的 GC/MS 全扫描色谱图来评估基质去除率

$$\% \text{基质去除} = \frac{(\text{峰面积}_{\text{未净化的空白样}} - \text{峰面积}_{\text{经 Captiva 净化的空白样}})}{(\text{峰面积}_{\text{未净化的空白样}} - \text{峰面积}_{\text{试剂空白}})} \times 100$$

公式 1. 使用色谱图中的总峰面积计算基质去除百分比的公式

磷脂去除率评估

本研究通过比较 $m/z = 184$ 子离子的 LC/MS/MS 母离子扫描色谱图分析了磷脂去除情况（如图 2 所示）。总体来说，蓝纹奶酪中的磷脂浓度较低，而帕尔玛奶酪中的磷脂基本可以忽略。黑色迹线代表蓝纹奶酪提取物中未去除的磷脂，而红色迹线为 Captiva EMR-Lipid 净化后的结果。根据公式 1 计算得到 Captiva EMR-Lipid 的基质去除率为 92%。

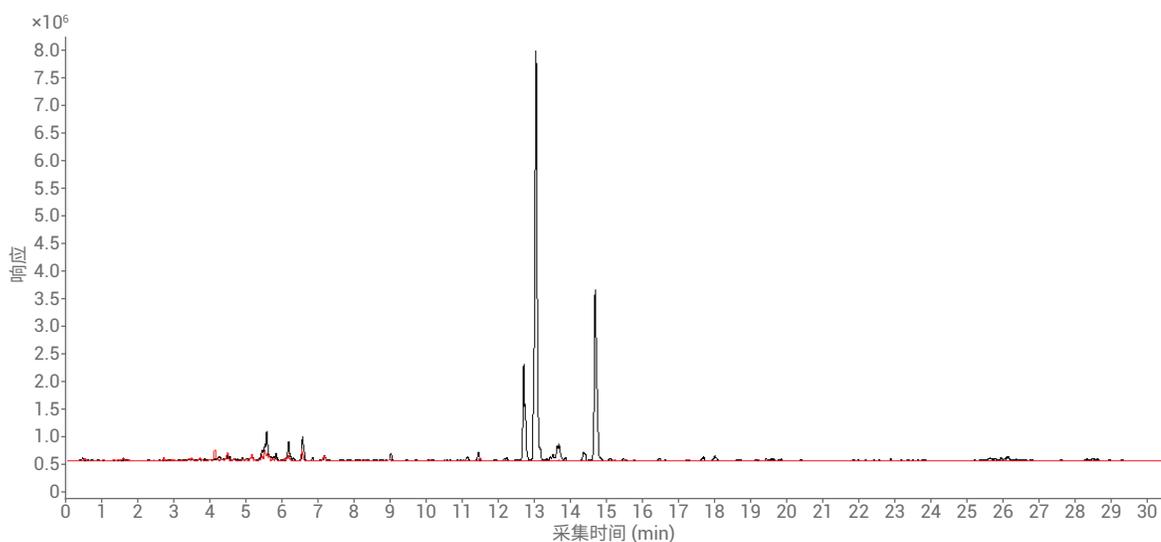


图 2. 通过 $m/z = 184$ 的 LC/MS/MS 母离子扫描得到的蓝纹奶酪中的磷脂去除情况

共萃取物残留重量测定

通过蒸发 1.25 mL 洗脱液收集共萃取物残留并称重，使用净化和未净化样品的共萃取物残留重量来计算净化方法的共萃取物去除率。结果汇总于表 4，表明该方法有效去除了基质。

表 4. 使用 Agilent Captiva EMR-Lipid 净化蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪的共萃取物残留质量和基质去除率

	共萃取物质量 (mg)	基质共萃取物去除率 (%)
蓝纹奶酪：未净化	12.76	-
蓝纹奶酪：Agilent Captiva EMR-Lipid	6.22	51.3
帕尔玛奶酪：未净化	5.81	-
帕尔玛奶酪：Agilent Captiva EMR-Lipid	1.50	74.2

脂质冻析

将未经处理的奶酪样品和经 Captiva EMR—Lipid 处理的样品置于冰箱中，在 0 °C 下保持 1 小时，然后观察、记录脂质沉淀情况并进行定性比较（图 3）。如图所示，未经处理的蓝纹奶酪样品中有大量脂质沉淀，而帕尔玛奶酪样品中只有少量附着于塑料样品瓶壁上的脂质沉淀。经 Captiva EMR—Lipid 处理的样品在脂质冻析条件处理后未产生可见的脂质。

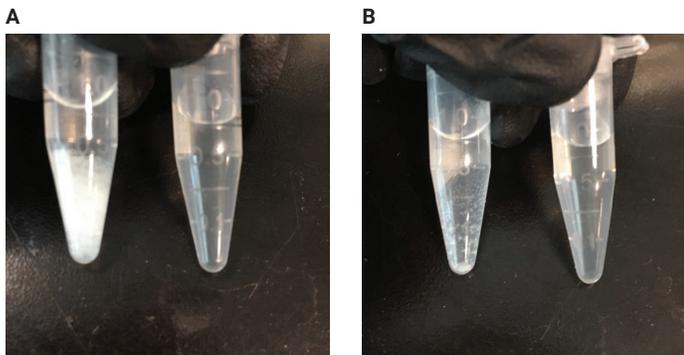


图 3. 经 Agilent Captiva EMR—Lipid 净化的蓝纹奶酪 (A) 和帕尔玛奶酪 (B) 以及未净化样品的脂质冻析实验

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2017
2017 年 11 月 15 日，中国出版
5991-8694ZHCN

结论

本研究证明 Agilent Captiva EMR—Lipid 提供了一种简便有效的净化方法，适用于多种真菌毒素的分析。采用蓝纹奶酪和帕尔玛奶酪进行方法验证，结果表明该方法具有优异的回收率 (70.7%-111.8%) 和精度 (< 20%)，且灵敏度可达 0.5 ng/g 奶酪。重量分析、GC/MS 全扫描、磷脂分析和脂质冻析比较的结果均表明该方法可实现高效净化。蓝纹奶酪比帕尔玛奶酪更复杂（如文中所述），而得益于 2 g 的样品量，本研究的各项分析均顺利完成。若奶酪分析需要达到更低的检测限，这个经过验证的方案可使用多达 5 g 的帕尔玛奶酪样品。产品比较结果表明，Captiva EMR—Lipid 的回收率远优于其他市售净化产品。该方法在多种应用中都具有较高的基质脂质去除率以及分析物回收率，但其中一些应用不在本研究的范围之内⁶。Captiva EMR—Lipid 代表了用于多类别、多残留分析的新一代选择性脂质净化产品，对于需要简化样品前处理并改善方法性能的实验室而言，该产品是理想之选。

参考文献

1. Richard, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, 119, 3–10
2. Nolwenn Hymery; et al. Filamentous Fungi and Mycotoxins in Cheese: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2014**, 13, 437-456
3. Dian Bueno; et al. Determination of Mycotoxins in Food: A review of Bioanalytical to Analytical Methods. *Applied Spectroscopy Reviews* **2015**, 50, 728-774
4. Lukas Vaclavik; et al. Determination of Multiple Mycotoxins in Dietary Supplements Containing Green Coffee Bean Extracts Using UHPLC-MS/MS. *J. Agric. and Food Chem.* **2013**, 61, 4822-4830
5. Kai Zhang; et al. Determining Mycotoxins in Baby Foods and Animal Feeds Using Isotope Dilution and LC-MS/MS. *J. Agric. and Food Chem.* **2014**, 62, 8935-8943
6. L. Zhao; D. Lucas, 安捷伦科技公司，出版号 5991-8598EN