

使用Xevo TQ-S为定量测定动物饲料和青贮饲料中的霉菌毒素 开发一种灵敏的多残留LC-MS/MS方法

Sara Stead,¹ Dominic Roberts,¹ Antonietta Gledhill,¹ Theo de Rijk,² Christof Van Poucke,³ 和 Sarah De Saeger³

¹沃特世公司(英国曼彻斯特); ²RIKILT食品安全研究院(荷兰瓦格宁根)

³根特大学(比利时根特)

应用优势

- 提供了一种LC-MS/MS定量检测方法，可同时测定动物饲料和青贮饲料中的33种霉菌毒素。
- 适合作为灵敏的筛查检测方法，用于测定动物饲料中低水平的霉菌毒素污染。
- 通过结合简单的分析前萃取稀释步骤，减少了复杂基质效应。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® I-Class 系统

Xevo® TQ-S

TargetLynx™ 应用软件

Quanpedia™ 数据库

关键词

霉菌毒素，饲料，青贮饲料，单端孢霉，白僵菌素，恩镰孢菌素，烟曲霉毒素，赭曲霉毒素，T2，HT-2，交链孢霉，串联四极杆

简介

目前已确认可能存在于动物饲料中的霉菌毒素超过400种，据报道，世界范围内有25%的谷物可能受到霉菌毒素污染¹。

动物饲料的分析包括青贮饲料，这些基质的复杂性和非均质性成为了主要的技术难题。尽管欧盟规定的霉菌毒素浓度允许限值相对较高(µg/kg)^{2,3}，但在某些物种(家禽和猪)中经常观察到µg/kg水平浓度下产生免疫毒性和饲料摄取问题等毒性作用⁴。因此，通常要求饲料达到较低的检测限。此外，采收前后的虫害侵袭同时会造成污染，导致出现单端孢霉、白僵菌素、恩镰孢菌素、烟曲霉毒素、赭曲霉毒素、T2、HT-2和交链孢霉等毒素，例如在单一饲料样品中⁵。

本应用纪要介绍了一种可对多种动物饲料和青贮饲料提取物中的33种相关霉菌毒素进行定量测定的方法开发。该方法采用与Xevo TQ-S联用的Waters® ACQUITY UPLC I-Class系统对饲料提取物中的多种霉菌毒素进行快速、高质量、超灵敏的分析。我们的目标是研究基质稀释效应、提高仪器灵敏度，从而克服离子抑制等常见分析难题，降低基质差异效应。

实验

提取准备

用于此项研究的各种动物饲料和青贮饲料提取物由荷兰RIKILT瓦格宁根大学友情提供。采用一种简便通用的样品提取方法，将乙腈与酸化水以84:16体积比混合，用于回收各种饲料和青贮饲料中的霉菌毒素⁶。简而言之，将饲料样品在提取溶剂中机械研磨成匀浆，然后进行离心操作。取一份上清液放入自动进样器样品瓶中进行后续的LC-MS/MS分析。

UPLC条件

LC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
色谱柱	BEH C ₁₈ , 2.1 x 100 mm, 1.7 µm
温度:	40 °C
进样体积:	5 µL
流速:	0.4 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的乙腈溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液

MS条件

MS系统:	Xevo TQ-S
电离模式:	ES +/-转换
毛细管电压:	3.4 kV
源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	400 °C
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	800 L/h

表1. UPLC梯度。

时间	A	B	曲线
0	90	10	
3	90	10	
10	30	70	
10.1	10	90	6
12	10	90	
12.1	90	10	
15	90	10	

表2. 使用Quanpedia优化饲料和青贮饲料中多种霉菌毒素Xevo TQ-S分析的MS/MS条件。

霉菌毒素	MRM通道	驻留时间 (s)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	极性
黄曲霉毒素 B1	Q 313.1 > 241.1 q 313.1 > 285.1	0.02	25	50 30	正
黄曲霉毒素 B2	Q 315.1 > 259.1 q 315.1 > 287.1	0.02	25	40 35	
黄曲霉毒素 G1	Q 329.1 > 243.1 q 329.1 > 311.1	0.02	20	33 20	
黄曲霉毒素 G2	Q 331.1 > 245.1 q 331.1 > 313.1	0.037	25	18 19	
DON	Q 297.1 > 231.1 q 297.1 > 249.1	0.103	20	30 36	
恩镰孢菌素 A	Q 682.6 > 99.9 q 682.6 > 210.3	0.108	70	30 34	
恩镰孢菌素 A3	Q 668.5 > 99.9 q 668.5 > 210.0	0.052	64	30 36	
恩镰孢菌素 B	Q 640.5 > 85.9 q 640.5 > 195.9	0.052	64	30 36	
恩镰孢菌素 B1	Q 654.5 > 85.9 q 654.5 > 195.9	0.02	70	55 50	
烟曲霉毒素 B1	Q 722.4 > 334.3 q 722.4 > 352.3	0.023	25	55 50	
烟曲霉毒素 B2	Q 706.4 > 336.2 q 706.4 > 318.2	0.023	50	5 12	
HT-2	Q 425.2 > 245.1 q 425.2 > 263.1	0.021	14	32 30	
OTA	Q 404.2 > 245.1 q 404.2 > 263.1	0.021	10	5 5	
T-2	Q 467.3 > 245.1 q 467.3 > 305.1	0.052	20	23 19	
玉米赤霉烯酮	Q 319.1 > 185 q 319.1 > 187	0.038	78	70 28	
白僵菌素	Q 784.5 > 133.9 q 784.5 > 244.0	0.052	32	43 30	
赈毒素	Q 415.2 > 131.9 q 415.2 > 312.1	0.038	17	12 7	
青霉酸	Q 171.1 > 125.0 q 171.1 > 153.0	0.163	28	25 25	
桔霉素	Q 251.1 > 191.0 q 251.1 > 205.1	0.023	25	30 25	
交链孢酚	Q 259.0 > 185.1 q 259.0 > 213.2	0.02	10	20 8	
NIV	Q 313.7 > 175.1 q 313.7 > 295.1	0.163	14	15 7	
α - 玉米赤霉烯酮	Q 323.0 > 277.1 q 323.0 > 305.2	0.023	14	15 7	
β - 玉米赤霉烯酮	Q 323.0 > 277.1 q 323.0 > 305.2	0.023	20	39 36	
杂色曲霉毒素	Q 325.1 > 253.1 q 325.1 > 281.1	0.05	22	20 26	
环匹阿尼酸	Q 337.1 > 182.0 q 337.1 > 196.0	0.163	18	19 12	
3-乙酰基-DON	Q 339.1 > 137.0 q 339.1 > 231.0	0.03	14	12 10	
15-乙酰基-DON	Q 339.1 > 261.0 q 339.1 > 279.1	0.03	20	20 13	
镰刀菌酮-X	Q 355.2 > 229.1 q 355.2 > 247.1	0.03	14	10 10	
蛇形菌素	Q 367.2 > 289.1 q 367.2 > 307.2	0.02	17	27 20	
新茄镰孢菌醇	Q 383.1 > 185.1 q 383.1 > 215.1	0.03	27	28 19	
酪青霉毒素	Q 390.2 > 193.0 q 390.2 > 322.2	0.032	25	42 30	
麦角胺	Q 587.3 > 208.1 q 587.3 > 187.5	0.02	35	40 30	
交链孢酚单甲醚	Q 271.2 > 228.2 q 271.2 > 256.2	0.031	42	30 10	负

图1显示出通过MRM通道和自动时间窗口计划功能在由Quanpedia生成的每个色谱峰上获得至少12个点。此方法可在Quanpedia数据库中找到。

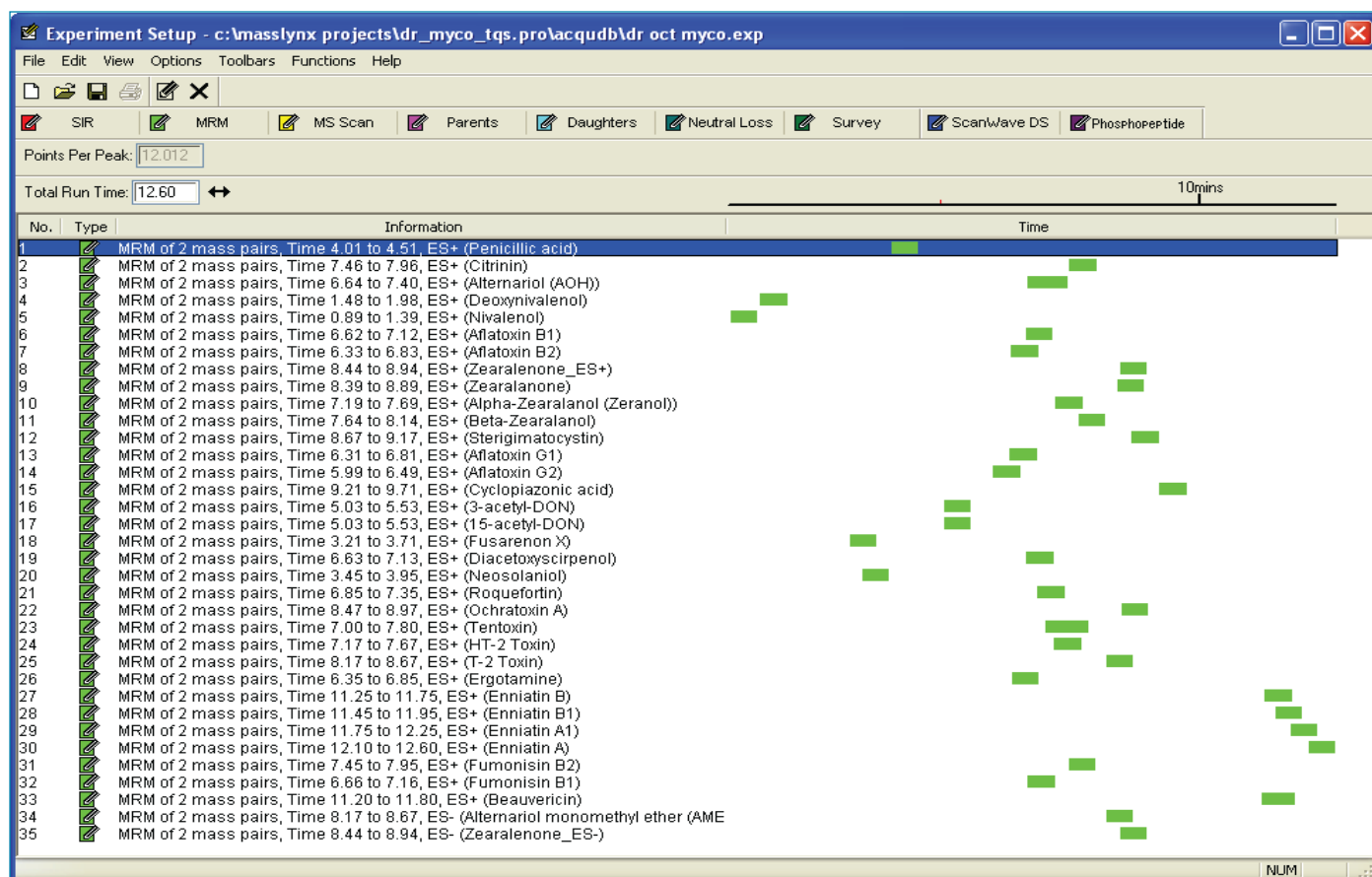


图1. Quanpedia数据库生成的33种霉菌毒素的MRM通道 (ESI +/-模式) 和自动时间窗口计划功能。

结果与讨论

对饲料和青贮饲料样品的纯净稀释提取物进行分析，然后对照溶剂标准品或基质匹配标准品进行定量(如适用)。正如预期，基质干扰特征非常复杂，并且不同样品之间的基质干扰存在差异，可通过 RADAR功能得到测定结果。图2显示了一种猪饲料纯提取物的LC-MS/MS谱图。我们发现，在全扫描模式下得到的基峰强度(BPI)谱图和同时采集到的样品中五种霉菌毒素的MRM通道(如插图所示)在高基质背景区域发生洗脱。高浓度的基质背景可导致目标分析物产生不同的离子抑制效应，从而影响整体分析性能。因此，对复杂基质中的霉菌毒素进行定量分析时，通常会采用基质匹配校准物、标准品加入法和同位素标记内标以克服基质效应，提高定量准确性和精度。

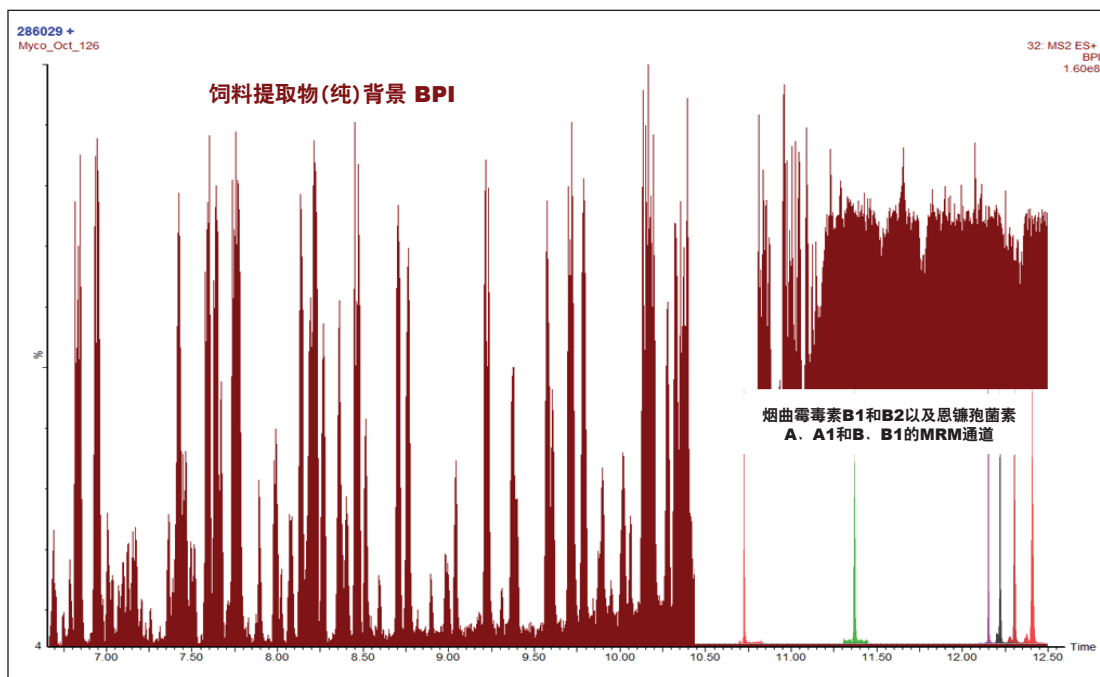


图2. 天然污染猪饲料提取物的基峰强度(BPI)色谱图，显示了全扫描模式(MS功能2，RADAR)下监测到的背景基质特征以及烟曲霉素B1和B2与恩镰孢菌素A、A1、B、B2的MRM通道(MS功能1)。

在本研究中，我们使用简单稀释步骤结合超高灵敏度Xevo TQ-S以降低基质效应，从而提高不同样品类型之间的测量重复性和准确性。表3显示了用六种霉菌毒素加标的六种不同饲料提取物的重复性数据，进样前经1:10稀释。结果发现，所有加标霉菌毒素的日内方法精度(用RSD%表示)良好，均低于23%。

对更多饲料(12个)和青贮饲料(10个)样品提取物使用相同的稀释系数(1:10)，按照优化的Xevo TQ-S条件检测33种霉菌毒素，并对照相应校准系列进行定量。图3为生成的TargetLynx报告，报告显示了方法的线性和灵敏度以及未知样品的浓度计算结果。

表3. 六种霉菌毒素加标至不同动物饲料(n=6)的重复性数据，提取物在Xevo TQ-S分析之前经过1:10稀释。

饲料类型	1:10稀释动物饲料提取物的浓度测定结果 (ng/g)*					
	恩镰孢菌素 A	恩镰孢菌素 A1	恩镰孢菌素 B	恩镰孢菌素 B1	烟曲霉毒素 B1	烟曲霉毒素 B2
玉米麸质	305.9	165.6	48.0	86.1	14.0	17.1
猪饲料	275.5	160.5	43.6	56.5	17.0	17.5
黑麦	258.5	136.1	61.8	62.1	18.7	19.3
燕麦	221.9	115.5	41.4	62.0	22.7	20.1
葵花籽	197.4	117.7	48.2	77.1	13.0	13.2
牛饲料	193.9	102.2	32.0	51.3	14.0	14.8
平均值	242.2	133.0	45.8	65.9	16.6	17.0
SD	45.1	25.7	9.8	13.1	3.7	2.6
%RSD	19	19	21	20	22	15

*霉菌毒素在提取前加标至饲料样品

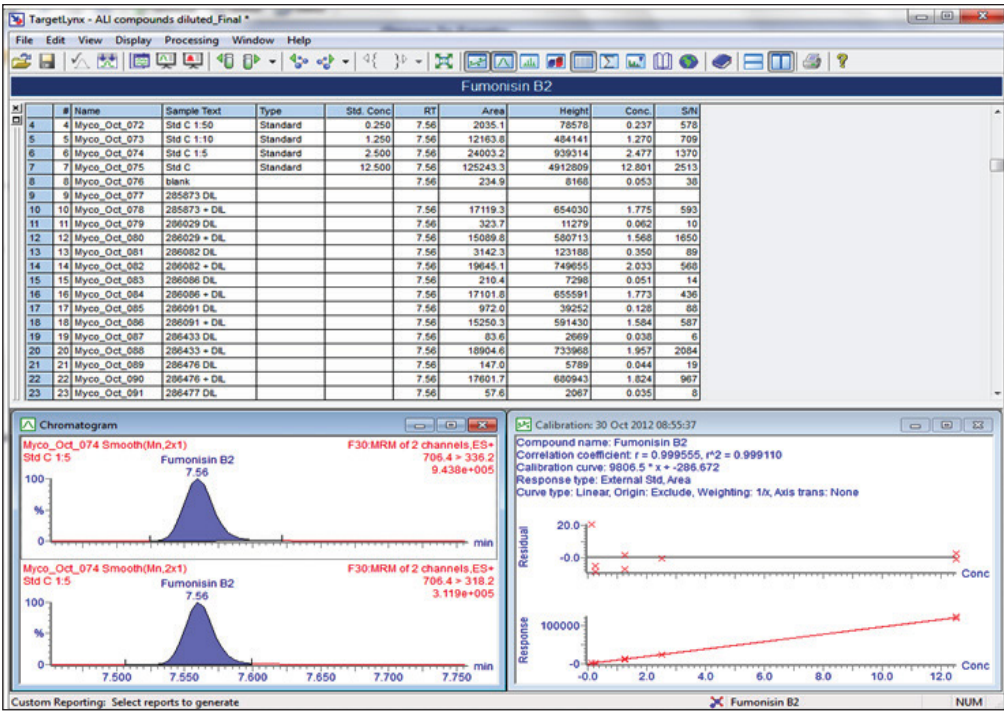


图3. TargetLynx报告显示了Xevo TQ-S测定含量低至0.25 µg/kg的烟曲霉毒素B2标准品的线性和灵敏度。

表4和5显示了从自然污染的饲料和青贮饲料样品中检测出的霉菌毒素浓度测量结果以及各自的LOD计算结果(S:N≥1:3)。结果发现，所有检测出的霉菌毒素的LOD值在溶剂和基质中均处于ppt至低ppb的范围内。自然污染的饲料样品中含有多种霉菌毒素(33种监测的可能霉菌毒素中的3到12种)，浓度相当于1以下到300 µg/kg左右。我们认为此方法适合作为一种高灵敏度的筛查有/无的方法。由于污染物浓度由溶剂标准校准系列确定，因此基质效应可能仍然对定量性能有所影响。

表4. 使用两个MRM通道检测12个不同动物饲料样品中一系列霉菌毒素的浓度测量结果，样品在Xevo TQ-S分析之前经1:10稀释。

霉菌毒素	LOD (ng/g)	1:10稀释的动物饲料提取物浓度检测结果 (ng/g)*											
		动物饲料样品检测结果和类型											
		U1 / 牛 饲料	U2 / 猪 饲料	U3 / 玉米 麸质	U4 / Diva L 关键 猪饲料	U5 / Alpha 肥育 猪饲料	U6 / 黑麦	U7 / 大麦	U8 / 小麦	U9 / 燕麦	U10 / 玉米	U11 / 葵花籽油	U12 / 猪饲料
15-乙酰基-脱氧雪腐镰刀菌烯醇	0.50	nd	nd	152.8	nd	nd	nd	13.2	33.4	nd	nd	nd	nd
黄曲霉毒素B1	0.05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.2	nd
黄曲霉毒素B2	0.05	nd	nd	0.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd
黄曲霉毒素G1	0.05	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.1	nd
黄曲霉毒素G2	0.05	0.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
交链孢酚	0.06	nd	3.2	nd	nd	nd	5.3	nd	nd	7.6	2.6	10.0	nd
DON	0.13	nd	21.2	283.6	13.2	18.4	nd	nd	nd	4.8	nd	0.3	nd
恩镰孢菌素A	0.10	59.3	6.3	1.4	15.7	39.9	9.7	11.7	0.4	3.2	nd	nd	50.5
恩镰孢菌素A1	0.10	148.6	17.1	3.2	40.1	19.0	14.2	34.1	0.5	4.9	nd	nd	122.4
恩镰孢菌素B	0.10	125.2	43.3	5.8	65.3	53.3	92.8	52.9	0.4	9.0	nd	nd	116.1
恩镰孢菌素B1	0.10	263.0	41.8	5.5	72.1	32.3	42.8	64.0	0.5	9.9	nd	nd	238.2
烟曲霉毒素B1	0.10	0.3	0.7	18.9	nd	4.0	nd	nd	nd	0.4	92.8	nd	1.7
烟曲霉毒素B2	0.10	0.1	nd	3.1	nd	0.8	nd	0.2	nd	nd	16.0	nd	0.3
HT-2 毒素	0.25	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3.9	nd	nd	nd
赭曲霉毒素A	0.06	0.1	nd	nd	0.1	nd	0.2	2.8	nd	nd	nd	nd	0.1
酪青霉毒素	0.10	nd	0.3	0.3	0.2	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
杂色曲霉毒素	0.10	nd	0.1	0.4	0.2	nd	10.7	nd	nd	nd	nd	0.1	0.2
玉米赤霉烯酮	0.20	nd	1.6	84.0	nd	4.9	31.2	nd	6.1	nd	nd	nd	nd
检出霉菌毒素数量		8	10	12	8	9	8	7	6	8	3	6	8

*浓度按照溶剂校准系列确定。

与复合饲料样品相比，青贮饲料样品中检出的霉菌毒素较少(33种潜在霉菌毒素中的0到3种)。图4显示了1:10稀释后的加标青贮饲料提取物色谱分离图。浓度计算结果在约20至260 µg/kg的范围内。由加标对照样品测定的17种霉菌毒素的回收率在89%至108%之间，平均值为96%。

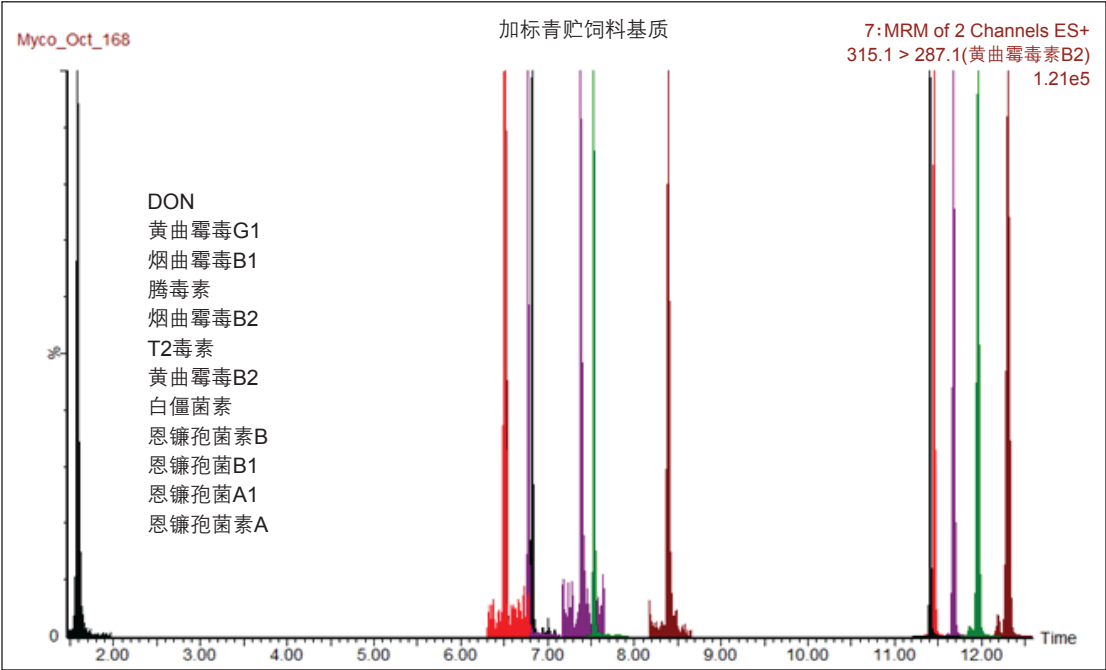


图4. 使用ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-S得到的加标青贮饲料提取物色谱分离结果。

表5. 使用两种MRM通道鉴别10个不同青贮饲料样品中一系列霉菌毒素的浓度测量结果和回收率%，样品在Xevo TQ-S分析之前经1:10稀释。

霉菌毒素	LOD (ng/g)	1:10稀释青贮饲料样品的浓度测量结果 (ng/g)*										
		青贮饲料样品鉴定结果										加标对照回收率%
		S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	
黄曲霉毒素 B1	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	95
黄曲霉毒素 B2	0.2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	104
黄曲霉毒素 G1	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	93
黄曲霉毒素 G2	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	94
DON	0.9	958.1	1310.0	158.4	550.8	435.4	359.8	216.4	nd	261.7	nd	100
恩镰孢菌素 A	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	94
恩镰孢菌素 A1	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	94
恩镰孢菌素 B	0.1	nd	nd	64.0	72.4	50.9	108.4	204.1	nd	82.7	nd	89
恩镰孢菌素 B1	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	94
烟曲霉毒素 B1	2.0	nd	nd	nd	256.3	nd	nd	nd	nd	nd	nd	93
烟曲霉毒素 B2	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	95
HT-2 毒素	0.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	36.2	nd	nd	nd	97
赈霉毒素 A	0.8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	103
T2 毒素	5.0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	96
玉米赤霉烯酮	2.5	170.2	140.2	108.4	42.5	nd	84.2	76.1	nd	76.3	nd	108
白僵菌素	0.2	nd	72.5	23.2	nd	nd	28.4	22.5	nd	nd	nd	96
赈霉毒素	0.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	92
检出霉菌毒素数量		2	3	4	4	2	4	5	0	3	0	17

结论

- 使用Waters ACQUITY UPLC I-Class系统结合配有Quanpedia数据库的Xevo TQ-S, 开发了一种适用于同时测定动物饲料和青贮饲料中33种霉菌毒素的LC-MS/MS定量检测方法。
- 由于TQ-S仪器具备超高灵敏度, 在分析前增加一个简单的提取物稀释步骤, 可以降低这些难以分析的样品的复杂基质效应, 获得良好的方法重复性和准确性。
- 结果显示日内重复性(RSD%) ≤ 22%, 青贮饲料中17种霉菌毒素的平均回收率为96%。
- 这种优化方法已用于鉴定多种样品中的一系列霉菌毒素并测定其浓度。

致谢

感谢RIKILT食品安全研究所(荷兰瓦格宁根)和根特大学(比利时根特)提供动物饲料和青贮饲料提取物及分析标准品。

参考文献

1. World-grain news website accessed on 29th October 2012: <http://www.world-grain.com/News/News%20Home/Features/2011/6/Mycotoxins.aspx?cck=1>
2. EC Commission Directive 2003/100/EC (2003) *Official Journal of the European Union* L285 33-37.
3. EC Commission Recommendation 2006/576/EC (2006) *Official Journal of the European Union* L229 7-9.
4. EFSA website accessed on 29th October 2012: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins.htm>
5. FSA website accessed on 29th October 2012: <http://www.food.gov.uk/policy-advice/mycotoxins/animalfeed/>
6. G J Mol, P Plaza-Bolanos, P Zomer, T C de Rijk, A A M Stolker, and P Mulder. *Anal Chem.* 80: (24) 9450-9459, 2008.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.®

Waters, ACQUITY UPLC, Xevo, UPLC和The Science of What's Possible是沃特世公司的注册商标。RADAR, TargetLynx和Quanpedia是沃特世公司的商标。其它所有商标均归各自所有者所有。

©2014 沃特世公司。中国印刷 2014 年 3 月 720004961ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
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