

应用中国本土化产品Triple Quad™ 6500+系统建立67种真菌毒素的快速定量方法

MKT-33440-A By Triple Quad™ 6500+ System, a Localized Product in China, to Establish a Rapid Quantitative Method for 67 Mycotoxins

刘蓉, 孙小杰, 刘冰洁, 郭立海

Liu Rong, Sun Xiaojie, Liu Bingjie, Guo Lihai

SCIEX Application Support Center, China

关键词: 真菌毒素, 中国本土化产品Triple Quad™ 6500+, 血浆

引言

真菌毒素是真菌产生的有害次生代谢物, 由曲霉属、镰刀菌属、青霉属和交替菌属组成, 是一组稳定、化学性质和结构多样的物质, 具有广泛的毒性作用。真菌毒素通常存在于环境和食物中, 可以在农业生产、加工、运输和储存的任何阶段污染食品或饲料。人类接触真菌毒素的主要途径是通过食用受污染的食物, 食用受霉菌毒素污染的食物可导致急性或慢性疾病, 包括内分泌干扰、免疫毒性、生殖毒性、致畸性和致癌性。世界卫生组织也已确定真菌毒素是导致食源性疾病的主要因素, 对人类健康构成潜在威胁。

由于潜在的协同作用, 暴露于真菌毒素混合物尤其令人担忧, 从而导致新的和意想不到的影响。研究表明至少存在400种不同的真菌毒素, 目前只对部分典型的传统真菌毒素实施了严格的法规, 限定了最大残留限量, 但对于一些频繁检出的新兴真菌毒素, 既没有常规检测, 也不受立法管制。因此, 监测人类接触的多种真菌毒素并进行风险评估至关重要。

本文基于SCIEX中国本土化产品SCIEX Triple Quad™ 6500+系统建立67种真菌毒素的快速检测方法, 为真菌毒素的监测提供快速高效的技术支持。

本方法具有以下特点:

- 1、本方法灵敏度高, 67种化合物的检测灵敏度均达到ng/L级别。
- 2、本方法定量准确, 拥有出色的重现性和稳定性, 线性相关性良好。
- 3、本方法可用于分析复杂生物基质中, 多种化学成分不同的真菌毒素

仪器设备



图1. SCIEX Exion LC AE液相和SCIEX中国本土化产品Triple Quad™ 6500+系统

实验方法

为了更好地体现每个化合物的灵敏度, 67种真菌毒素按照化合物性质和加和形式分为A、B、C三组

1. 前处理流程

取0.1 mL人血浆样品加入10 μ L内标溶液，在25 $^{\circ}$ C下孵育30分钟，然后在混合物中加入0.4 mL含0.1%甲酸的乙腈，超声20 min，在9600 \times g离心5 min，分离上清

A组：氮吹至干

B组：上清液通过Captiva EMR -脂质盒处理，用1 mL乙腈/水（4:1,v/v）进行洗脱，氮吹至干

C组：使用PRIME-HLB纯化上清液，用1 mL乙腈/水（4:1,v/v）进行洗脱，氮吹至干

所有组分分别用0.1 mL乙腈/水（1:9,v/v）复溶，涡旋混合30 s，13800 \times g离心10 min，取上清上机分析。

2. 液相条件

液相：SCIEX Exion LC AE系统

色谱柱：C18（2.0 \times 150 mm，2.7 μ m）

A组流动相：A相为水（含0.1%甲酸和1 mM甲酸铵），

B相为乙腈

流速：0.3 mL/min

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱梯度见表1

表1. 流动相洗脱程序

时间 (min)	A %	B %
1	90	10
5	70	30
11	5	95
15	5	95
15.1	90	10
18	90	10

B组流动相：A相为0.1 mM乙酸铵-水，B相为乙腈，洗脱条件与A组一致

C组流动相：A相为0.01%乙酸-水，B相为乙腈，

流速：0.25 mL/min

柱温：40 $^{\circ}$ C

洗脱梯度见表2

表2. 流动相洗脱程序

时间 (min)	A %	B %
0	98	2
5	75	25
8	70	30
9	5	95
11	5	95
11.1	98	2
14	98	2

3. 质谱条件

A组质谱条件

扫描模式：ESI+

IS电压：5500V

雾化气GS1：40psi

源温度TEM：500 $^{\circ}$ C

气帘气：35psi

辅助加热气GS2：65psi

碰撞气CAD：8psi

B组质谱条件

扫描模式：ESI-

IS电压：-4500V

雾化气GS1：40psi

源温度TEM：550 $^{\circ}$ C

气帘气：35psi

辅助加热气GS2：65psi

碰撞气CAD：10psi

C组质谱条件

扫描模式：ESI-

IS电压：-4500V

雾化气GS1：40psi

源温度TEM：550 $^{\circ}$ C

气帘气：35psi

辅助加热气GS2：50psi

碰撞气CAD：9psi

表3. 67种真菌毒素离子对信息

分组	化合物	母离子	定量离子	碰撞能量 (V)	定性离子	碰撞能量(V)	分组	化合物	母离子	定量离子	碰撞能量 (V)	定性离子	碰撞能量(V)
A组	AFB ₁	313.1	285	33	241	51	B组	ZAN	319.2	205.2	-29	275	-25
	AFB ₂	315.1	287	36	259.1	41		ZEN	317.2	174.9	-33	131	-38
	AFG ₁	329	243	37	200.1	55		α-ZEL	319.2	159.9	-40	274.9	-28
	AFG ₂	331.1	313	33	245	42		β-ZEL	319.2	159.9	-40	274.9	-28
	AFM ₁	329	273	31	259	33		α-ZAL	321.2	277.2	-30	303.2	-30
	AFM ₂	331.1	257	40	245	45		β-ZAL	321.2	277	-30	303	-30
	OTA	404	239	37	358	20		AOH	257.1	215	-34	213	-31
	OTB	370.1	205	26	324	19		AME	271	256	-30	228	-39
	FB ₁	722.4	704.2	41	334.3	48		ALT	291.1	214.1	-29	229.1	-20
	FB ₂	706.4	354.3	43	336.4	50		TeA	196.1	139.1	-27	112.1	-32
	FB ₃	706.4	318.3	51	354.3	43		AXT I	351.2	315.1	-22	333.1	-15
	T ₂	484.3	215	22	305.2	18		TEN	413.2	141.1	-25	271.1	-22
	HT ₂	442.3	263.2	16	215.2	16		MON	97	41	-18		
	T ₂ (OH) ₃	400.1	215.2	20	105.1	57		PAT	153.1	80.9	-17	108.8	-13
	BEA	801.5	784.4	24	134.1	95		OT α	255.1	211	-22	167	-34
	EnA	699.5	210.3	42	555.4	38		DON	355.1	295.1	-14	59.2	-50
	EnA ₁	685.5	668.2	24	210.2	39		D ₃ G	517.1	427.1	-30	457.1	-20
	EnB	657.5	196.2	40	640.2	23	DOM	339.1	249.1	-16	59.1	-50	
	EnB ₁	671.5	196.1	39	654.3	23	FusX	413.3	262.9	-22	59.1	-50	
	NEO	400.2	305.1	15	159	24	NIV	371.1	281.1	-30	59	-46	
	¹⁵ AS	342.2	107	21	265.2	13	³ AcDON	397.3	337.1	-13	307.2	-40	
	DAS	384.1	104.9	48	307.1	15	¹⁵ AcDON	397.3	59	-40	337.1	-9	
	AcI	239.1	183.1	24	208.1	24	¹³ C-AFB ₁	330.1	255.1	53			
	DH-LYS	257.1	208.1	30	167	53	¹³ C-AFB ₂	332.1	273.1	43			
	Ecl	255.1	224.1	20	180.1	57	¹³ C-AFG ₁	346.1	212.1	59			
	Ergine	268.1	223.1	27	208.1	34	¹³ C-AFG ₂	348	259.1	43			
	Eco	562.3	223.2	43	268.1	34	¹³ C-AFM ₁	346.1	288.1	35			
	Econ	562.3	223.2	39	268.1	34	¹³ C-OTA	424.1	377.1	21			
	Ecr	610.3	223.1	43	268.1	35	¹³ C-T ₂	508.2	198.1	31			
	Ecrn	610.2	268.1	34	223.1	41	¹³ C-HT ₂	464.3	113.1	65			
	DH-Ecr	612.3	270.1	39	350.2	34	¹³ C-FB ₁	756.4	356.4	59			
	Ek	576.3	223.1	44	267.9	33	¹³ C-FB ₂	740.5	340.3	55			
Ek _n	576.3	223	42	267.9	35	¹³ C-FB ₃	740.5	340.3	53				
Em	326.1	208	38	223.1	32	¹³ C-DAS	403.2	244.1	23				
Em _n	326.1	208	37	223.1	33	¹³ C-MPA	338.1	169.2	31				
Esn	548.3	223.1	46	268.1	46	¹³ C-RC	412.1	339.2	29				
Et	582.3	223	39	268.2	32	¹³ C-STG	343	327	37				
Etn	582.3	223.2	39	208	46	¹³ C-CIT	264	202	36				
GLIO	327	263.1	14	245.1	22	¹³ C-ZEN	335.1	139.9	-44				
MPA	321.1	206.9	27	159	44	¹³ C-PAT	159.9	86	-16				
PCA	171.1	125	18	97.1	22	¹³ C-AOH	271	168	-37				
RC	390.1	193.1	39	321.9	27	¹³ C-AME	286	269	-41				
STG	325.1	280.9	49	310.1	34	¹³ C-TeA	208.9	115	-35				
CPA	337	196	25	182	26	TEN-d ₃	416	140.9	-26				
CIT	251.1	233.1	17	205.1	27	¹³ C-DON	370.1	310.1	-16				
						¹³ C-D ₃ G	538.2	447.3	-30				
						¹³ C-NIV	386.1	295.1	-22				
						¹³ C- ₃ AcDON	414.4	354.2	-12				
						¹³ C- ¹⁵ AcDON	414.4	354.2	-10				

实验结果

1. 67种真菌毒素的典型色谱图

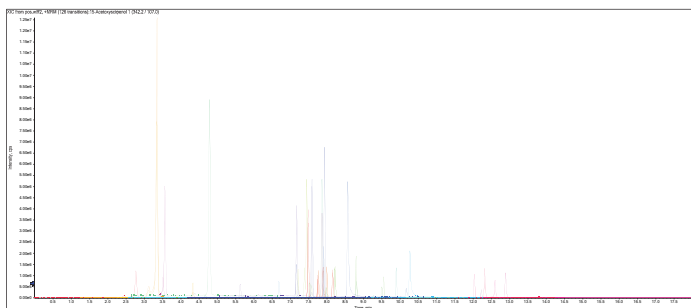


图2. 45种真菌毒素的典型色谱图（正模式）

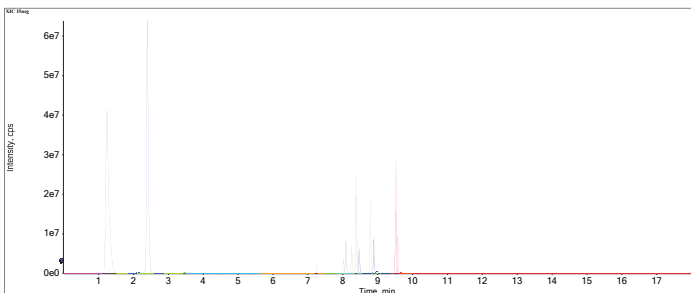


图3. 15种真菌毒素的典型色谱图（负模式）

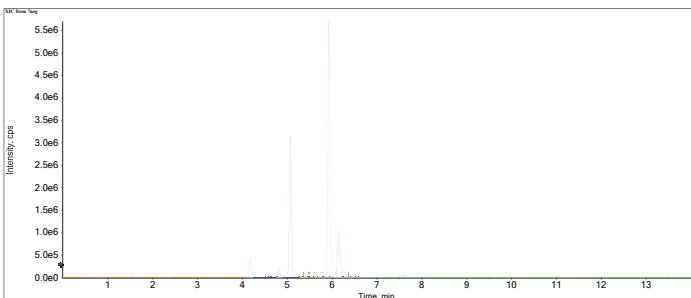


图4. 7种真菌毒素的典型色谱图（负模式）

在A组流动相中加入甲酸可以提高大多数化合物的灵敏度，如OTs、FBs和AFs等。将酸的浓度从0.1%增加到0.2%，可以改善FBs和一些新兴真菌毒素(包括麦角生物碱、MPA、STG和GLIO)的峰形和检测灵敏度，然而，这种变化抑制了一些重要真菌毒素的信号强度，如AFs和OTs，因此甲酸的最佳浓度为0.1%。当流动相中加入甲酸铵时，可以增强加 $[M+NH_4]^+$ 的响应，经过浓度比例的优化，发现A相为1 mM 甲酸铵-0.1%甲酸水溶液，B相为乙腈时，所有真菌毒素都能有较好的灵敏度。

而B组中大部分化合物的信号强度在酸性或碱性体系中被抑制，在流动相中加入乙酸氨可以提高ZEN及其衍生物的检测灵敏度，部分毒素的峰形也有所改善，例如消除了TeA和PAT的拖尾现象。

对于C组化合物，当以相同浓度0.01%的乙酸代替甲酸时，乙酸提供的 $[M+CH_3COO]^-$ 极大地增强了分析物的电离性，化合物响应大大增加。

2. 血浆基质中67种真菌毒素的谱图

在血浆基质中，即使在低浓度水平，各化合物也能保证良好的峰型和灵敏度。

总结

本文采用SCIEX中国本土化产品Triple Quad™ 6500+系统建立了67种真菌毒素化合物的快速定量方法。该方法拥有优异的灵敏度，所有化合物的定量限均在ng/L水平；具有良好线性关系， r^2 均大于0.99，极大地满足了日常检测限量需求。即便是在复杂基质中，也能获得稳定且准确的数据结果，展现了SCIEX Triple Quad™ 系统抗基质干扰的良好品质。此方法为真菌毒素的监测提供了强有力的支撑。

