



主要谷物中 16 种真菌毒素的测定

Agilent LC-MS/MS 解决方案及 e-Method 使用说明

主要内容

1. 谷物中 16 种真菌毒素测定 Agilent 解决方案
 - 1.1 适用范围
 - 1.2 硬件系统的配置
 - 1.3 样品前处理与标准曲线
 - 1.4 仪器条件
2. e-Method 使用说明
 - 2.1 e-Method 的介绍
 - 2.2 e-Method 采集方法的调用
 - 2.3 e-Method 定量方法的调用与更新
 - 2.3.1 定量方法的调用
 - 2.3.2 保留时间的更新
 - 2.3.3 Qualifier Ratios 的更新
 - 2.3.4 化合物定量表的更新

1. 谷物中 16 种真菌毒素测定 Agilent 解决方案

1.1 适用范围

本文所述解决方案适用于小麦、玉米和稻谷等主要谷物中 16 种真菌毒素的测定。

解决方案涉及的 16 种真菌毒素包括雪腐镰刀菌烯醇 (NIV)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇-3-葡萄糖苷 (DON-3G)、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)、黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)、HT-2 毒素 (HT-2)、T-2 毒素 (T-2)、赭曲霉毒素 A (OTA)、伏马毒素 B₁、B₂ (FB₁、FB₂)、玉米赤霉烯酮 (ZEN)、杂色曲霉毒素 (ST)。

本文所述电子方法 (e-Method) 适用于 Agilent 液质联用系统。适用的液相色谱系统包括 Agilent 1290 Infinity LC 和 Agilent 1290 Infinity II LC；适用的三重四级杆质谱为配备安捷伦喷射流 (AJS) 电喷雾离子源的 Agilent 6470 Triple Quad LC/MS；适用的软件版本为 MassHunter Data Acquisition B07 及 B07 以上版本、MassHunter Quantitative Analysis B07 及 B07 以上版本。

1.2 硬件系统的配置

液相系统	1290 Infinity LC	1290 Infinity II LC
泵	G4220A 1290 Bin Pump (Jet Weaver 35 µL)	G7120A 1290 High Speed Pump (Jet Weaver 35 µL)
自动进样器	G4226A 1290 Sampler	G7167B 1290 Multisampler
柱温箱	G1316C 1290 TCC	G7116B 1290 MCT
热交换器	G1316-80002/3 (1.6 µL)	G7116-60015 (1.6 µL)
管线配置		
泵→自动进样器	Capillary 0.17 × 400 mm (green), 5500-1245	
自动进样器→热交换器	Capillary 0.12 × 500 mm (red), 5500-1157	
热交换器→色谱柱	A-Line Quick Connect Fitting, ST 0.12 × 150 mm, 5067-5958 或 Capillary 0.12 × 150 mm	
色谱柱→质谱	PEEK tubing, 0.13 mm, cut to 600 mm	
质谱系统	6470 Triple Quad LC/MS	
离子源	Agilent Jet Stream (AJS) Electrospray (ESI), G1958B	

1.3 样品前处理与标准曲线

小麦、玉米和稻谷等样品经粉碎机粉碎，过 1 mm 孔径试验筛，混匀。准确称取 5 g 制备好的样品于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 提取液乙腈-水-乙酸混合液（70:29:1，v/v/v），并用涡旋混合器混匀 1 min，置于旋转摇床上振荡提取 30 min，然后以 6000 r/min 离心 10 min，吸取 0.5 mL 上清液于 1.5 mL 离心管中，加入 0.5 mL 水并涡旋混匀，在 4 °C 下以 12000 r/min 离心 10 min，上清液过 0.2 μm 的聚四氟乙烯滤膜。吸取 180 μL 样品滤液于 400 μL 内插管中，加入 20 μL 稳定同位素内标混合标准工作溶液，涡旋混匀待测。

本方案采用内标法定量，方法中涉及的同位素内标包括^[13C15]-NIV、^[13C15]-DON、^[13C17]-3-AcDON、^[13C17]-AFB₁、^[13C17]-AFB₂、^[13C17]-AFG₁、^[13C17]-AFG₂、^[13C20]-OTA、^[13C24]-T-2、^[13C22]-HT-2、^[13C18]-ZEN、^[13C34]-FB₁、^[13C34]-FB₂、^[13C18]-ST。DON-3G，15-AcDON 分别采用结构相近的^[13C15]-DON、^[13C17]-3-AcDON 作为内标。用乙腈-水-乙酸溶液（35:64.5:0.5，v/v/v）配制不同浓度的系列混合标准工作液，然后向 400 μL 内插管中加入 20 μL 稳定同位素内标混合标准工作溶液，再分别加入 180 μL 系列混合标准工作液，涡旋混匀后上机检测，绘制内标标准曲线。

1.4 仪器条件

液相条件			
色谱柱	ZORBAX Eclipse Plus C18 2.1 x 100 mm, 1.8 μm (959764-902)		
柱温	35 °C		
进样体积	2 μL		
流动相组成	A = 1.0% Acetic Acid and 5 mM Ammonium Acetate in Water		
	B = methanol		
流速	0.3 mL/min		
梯度	Time (minutes)	% A	% B
	0.0	90	10.0
	2.0	90	10.0
	3.0	80	20.0
	7.0	76	24.0
	10.5	70	30.0
	13.5	40	60.0
	15.0	30	70.0
	18.0	25	75.0
	18.1	5	95.0
	21.9	5	95.0
	22.0	90	10.0



质谱条件						
采集模式	MRM Mode, ESI Positive/Negative					
干燥气温度	300 °C					
干燥气流速	7 L/min Nitrogen					
喷雾器压力	35 psi					
鞘气温度	350 °C					
鞘气流速	11 L/min Nitrogen					
时间段	序号	开始时间(min)	阀	ΔEMV	毛细管电压(V)	喷嘴电压(V)
	1	0	To Waste	0(+)/0(-)	3500(+/-)	0(+)/1000(-)
	2	1.8	To MS	0(+)/300(-)	3500(+/-)	0(+)/1000(-)
	3	3.6	To MS	0(+)/400(-)	3500(+/-)	0(+)/1000(-)
	4	8.0	To MS	200(+)/0(-)	3500(+/-)	0(+)/1000(-)
	5	12.4	To MS	400(+)/0(-)	3500(+/-)	0(+)/1000(-)
	6	14.9	To MS	200(+)/0(-)	3500(+/-)	500(+)/1000(-)
	7	16.5	To MS	300(+)/300(-)	2500(+/-)	500(+)/1000(-)
	8	18.0	To Waste	0(+)/0(-)	3500(+/-)	0(+)/1000(-)

时间段	化合物名称	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	Fragmentor (V)	碰撞能量 (V)	极性
2	[¹³ C]-NIV	386	295.1	90	10	负
	NIV	371	281.1*/59.1	90	10/30	负
3	[¹³ C]-DON	370.1	279.0	90	10	负
	DON	355.1	265.0*/247.0	90	10/10	负
	DON-3G	517.1	427.0*/247.0	120	20/20	负
4	15-AcDON	356.1	261.0/137.0*	90	15/15	正
	[¹³ C]-3-AcDON	356.2	245.1	110	10	正
	3-AcDON	339.2	231.1*/213.1	110	10/20	正
5	[¹³ C]-AFB1	330.1	301.1	160	21	正
	AFB1	313.2	285.1*/241.1	160	22/38	正
	[¹³ C]-AFB2	332.2	303.0	160	21	正
	AFB2	315.2	287.1*/259.1	160	24/30	正
	[¹³ C]-AFG1	346.1	257.1	150	25	正
	AFG1	329.2	311.1*/243.1	150	20/25	正

6	[¹³ C]-AFG2	348.1	330.1	160	23	正
	AFG2	331.2	313.1*/245.1	160	23/30	正
	[¹³ C]-FB1	756.5	356.4	180	45	正
	FB1	722.4	352.3/334.3*	180	45/45	正
	[¹³ C]-T-2	508.3	322.1	110	10	正
	T-2	484.3	305.1*/185.1	110	10/20	正
	[¹³ C]-HT-2	464.1	278.1	100	10	正
	HT-2	442.2	263.1/215.1*	100	10/10	正
7	[¹³ C]-FB2	740.5	358.3	180	45	正
	FB2	706.5	336.3*/318.3	180	45/45	正
	[¹³ C]-OTA	424.2	250.1	120	25	正
	OTA	404.1	358.0/239.0*	120	10/25	正
	[¹³ C]-ST	343.1	327.1	150	20	正
	ST	325	310.0/281.0*	150	20/36	正
	[¹³ C]-ZEN	335.2	185.0	190	25	负
	ZEN	317.1	175.0*/130.8	190	25/33	负

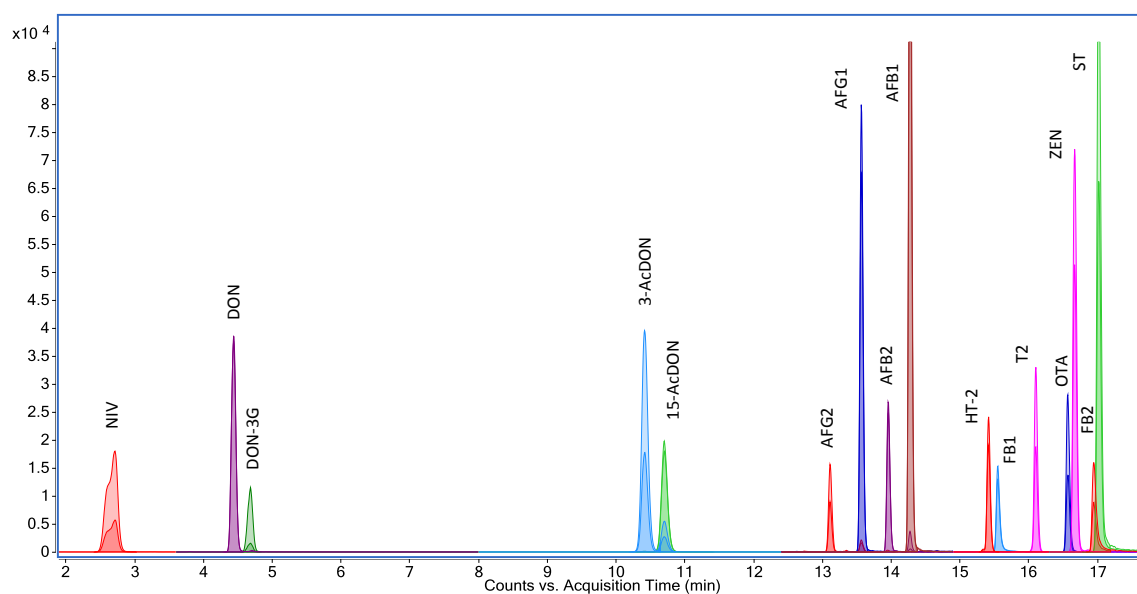


图 1. 16 种真菌毒素混合标准溶液的 MRM 叠加图

2. 电子方法（e-Method）的使用

2.1 e-Method 介绍

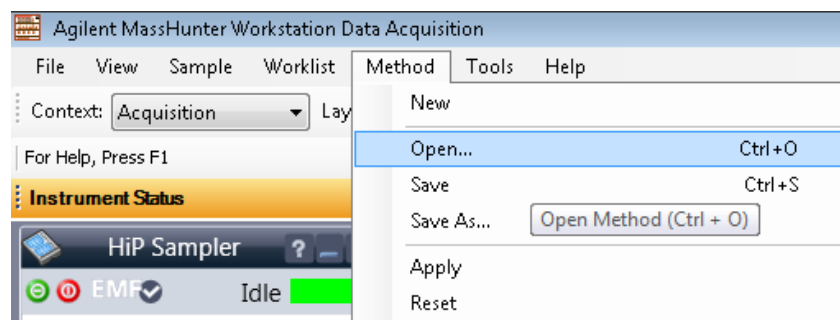
液质联用多残留检测方法参数较多，实验室在建立新的 LC-MS/MS 方法时，需要优化大量的仪器参数；在进行方法参数编辑时，也需要花费大量的时间和精力。为提高用户的工作效率，安捷伦科技依托液质联用系统的先进性能，并结合其质谱软件的独特功能，建立了可以实现“plug-and-play”功能的 e-Method，实验操作人员只需确认仪器配置，选择相应的 e-Method，经过简单的调试后，即可进行样品采集和定量分析，大大节约了方法开发时间和使用难度，使实验室检测流程更加标准化，同时也更易于在实验室间推广应用。

e-Method 包含以下三部分内容：

1. *.m 文件：此为 MassHunter 采集软件可直接调用的方法，此格式的方法文件中包含液相色谱参数、三重四级杆串联质谱离子源参数和 16 种真菌毒素、14 种稳定同位素内标的多反应监测 MRM 模式的采集参数。
2. *.quantmethod.xml 文件：此为 MassHunter 定量分析软件可直接使用的目标化合物定量方法文件，16 种真菌毒素采用内标法定量，同位素内标标准曲线的系列浓度设置符合粮油检测行业标准《粮油检测 主要谷物中 16 种真菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》的规定。
3. *.pdf 文件：此文档中包含了 e-Method 的使用说明和备注信息。

2.2 e-Method 采集方法的调用

确认仪器配置，打开采集软件后，即可直接调用与仪器型号对应的 *.m 采集方法文件。逐一检查液相部分和质谱部分的参数设置，即可进行样品分析。

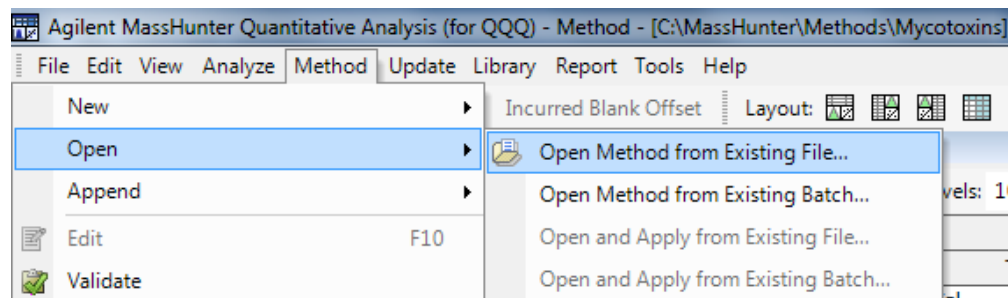


采用本方法对标准曲线系列的中等浓度标准溶液进样分析，检查每个化合物的保留时间以确认在实验室条件下，方法中时间段的设置是否合适，如有必要，可根据实际出峰情况调整时间段起始时间点的设置；采用该方法对标准曲线系列的浓度最低点标准溶液进样分析，检查每个化合物的峰面积以确认方法中 ΔEMV 的设置是否合适，如有必要，可根据实际出峰情况调整相应时间段 ΔEMV 的设置。

2.3 e-Method 定量方法的调用

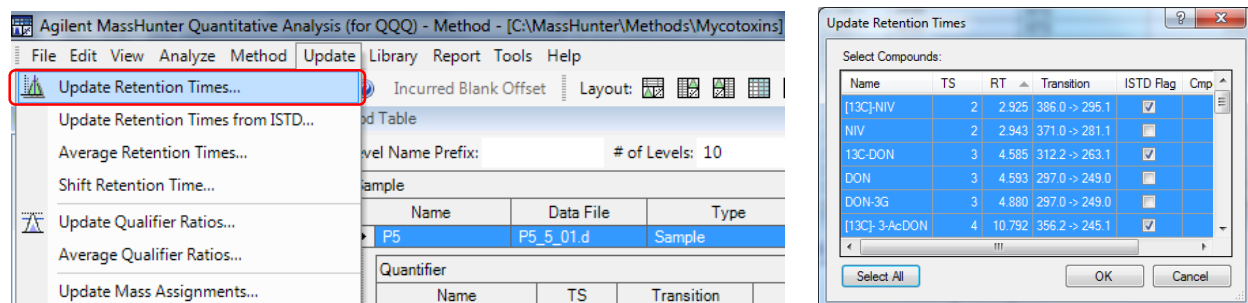
2.3.1 定量方法的调用

在进行定量分析时，打开 MassHunter Quantitative Analysis 定量软件，新建一个 batch，将准备进行定量分析的数据导入 batch 中。鼠标左键选中较高浓度的标准品数据，然后如下图所示调入 e-Method 中的定量方法*.quantmethod.xml，进入定量方法的编辑界面。



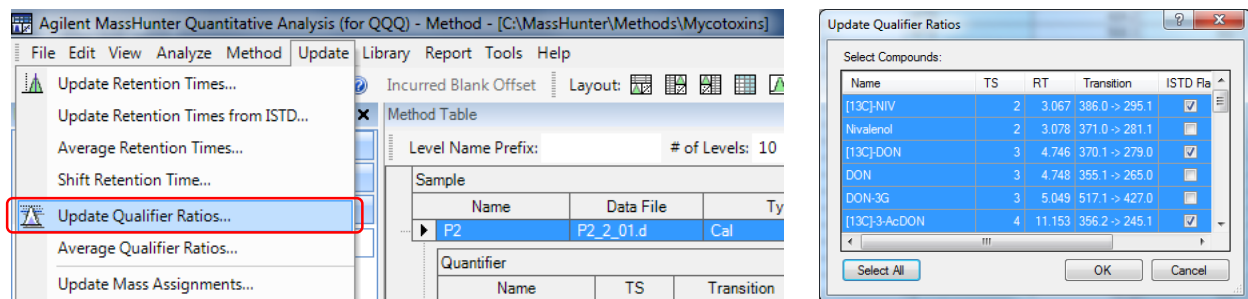
2.3.2 保留时间的更新

选中较高浓度的标准品数据，进入定量方法的编辑界面，如下图所示选择更新保留时间“Update Retention Times...”，选择需要更新保留时间的化合物，一般选择“Select All”，软件将自动根据实际采集的数据更新定量方法里的保留时间。



2.3.3 Qualifier ratios 的更新

选中较高浓度的标准品数据，进入定量方法的编辑界面，如下图所示选择更新离子对比比例“Update Qualifier Ratios...”，选择需要更新离子对比比例的化合物，一般选择“Select All”，软件将自动根据实际采集的数据更新定量方法里的离子对比比例。



2.3.4 化合物定量表的更新

*.quantmethod.xml 文件中的 16 种真菌毒素的标准曲线系列浓度和 14 种同位素内标的浓度，符合粮油检测行业标准《粮油检测 主要谷物中 16 种真菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法》的规定，详见表 1 和表 2。

表 1. e-Method 定量方法中，16 种真菌毒素的浓度设置 (ng/mL)

名称	标曲点 1	标曲点 2	标曲点 3	标曲点 4	标曲点 5	标曲点 6
NIV	50	100	200	500	1000	2000
DON	37.5	75	150	375	750	1500
DON-3G	6.25	12.5	25	62.5	125	250
3-DON	10	20	40	100	200	400
15-DON	5	10	20	50	100	200
AFG ₂	0.075	0.15	0.3	0.75	1.5	3
AFG ₁	0.25	0.5	1	2.5	5	10
AFB ₂	0.075	0.15	0.3	0.75	1.5	3
AFB ₁	0.25	0.5	1	2.5	5	10
HT-2	2.5	5	10	25	50	100
FB1	5	10	20	50	100	200
T-2	0.5	1	2	5	10	20
ZEN	5	10	20	50	100	200
OTA	0.5	1	2	5	10	20
ST	0.25	0.5	1	2.5	5	10



表 2. e-Method 定量方法中，14 种同位素内标的浓度设置

名称	浓度 ng/mL	名称	浓度 ng/mL	名称	浓度 ng/mL	名称	浓度 ng/mL
[¹³ C ₁₇]-AFB ₁	1	[¹³ C ₁₅]-NIV	250	[¹³ C ₂₀]-OTA	4	[¹³ C ₃₄]-FB ₁	50
[¹³ C ₁₇]-AFB ₂	1	[¹³ C ₁₅]-DON	200	[¹³ C ₂₄]-T-2	5	[¹³ C ₃₄]-FB ₂	30
[¹³ C ₁₇]-AFG ₁	1	[¹³ C ₁₇]-3-AcDON	100	[¹³ C ₂₂]-HT-2	12.5		
[¹³ C ₁₇]-AFG ₂	1	[¹³ C ₁₈]-ZEN	20	[¹³ C ₁₈]-ST	2.5		

实验人员也可以根据实际情况，在定量方法编辑界面“Concentration Setup”下更改标准曲线的系列浓度。

Agilent MassHunter Quantitative Analysis (for QQQ) - Method - [C:\MassHunter\Methods\Mycotoxins]

File Edit View Analyze Method Update Library Report Tools Help

Analyze Batch Incurred Blank Offset Layout: Restore Default Layout

Method Tasks

- New / Open Method
- Workflow
- Method Setup Tasks
 - MRM Compound Setup
 - Retention Time Setup
 - ISTD Setup
 - Concentration Setup**
 - Qualifier Setup Setup Concentrations
 - Calibration Curve Setup
 - Globals Setup
- Save / Exit
- Validate

Method Table

Level Name Prefix: # of Levels: 10 Create Levels

Sample			
Name	Data File	Type	
P2	P2_2_01.d	Cal	6

Quantifier			
Name	TS	Transition	Scan
3-Acetyldeoxy nivalenol	4	339.2 -> 231.1	MRM

Calibration		
Level	Conc.	Enable
1	10.0000	<input checked="" type="checkbox"/>
2	20.0000	<input checked="" type="checkbox"/>
3	40.0000	<input checked="" type="checkbox"/>
4	100.0000	<input checked="" type="checkbox"/>
5	200.0000	<input checked="" type="checkbox"/>
6	400.0000	<input checked="" type="checkbox"/>