doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2022.11.06

QuEChERS－高效液相色谱－串联质谱法测定乳粉中黄曲霉毒素 B_1 和 M_1

刘　瑞[1,2],陈冬东[2],贾景建[2],王一名[2],霍思宇[2],董　静[2],彭　涛[2*],呼秀智[1*]

（1.河北工程大学,生命科学与食品工程学院,河北邯郸 056107;2.中国检验检疫科学研究院,北京 100176）

［收稿日期］2022－05－28　［文献标识码］A　［文章编号］1002－1280（2022）11－0039－09　［中图分类号］S859.84

［摘　要］　建立了 QuEChERS 结合高效液相色谱－串联质谱测定乳粉中黄曲霉毒素 B_1(aflatoxin B_1,AFB_1)和黄曲霉毒素 M_1(aflatoxin M_1,AFM_1)的检测方法。乳粉用水复溶,乙腈提取,十八烷基键合硅胶和无水硫酸镁净化,在 InertSustain－C_{18}柱(2.1 mm×150 mm,3 μm)上分离,乙酸铵溶液－甲醇为流动相,梯度洗脱,电喷雾正离子模式扫描,多反应监测,基质添加外标曲线定量。乳粉中 AFB_1 和 AFM_1 在 0.08～20 μg/kg 范围内线性关系良好,$r>0.999$。检出限为 AFM_1 0.02 μg/kg,AFB_1 0.03 μg/kg,定量限均为 0.05 μg/kg。在定量限的 1、5 和 10 倍添加浓度下,平均回收率为 91.5%～100.7%。本方法便捷高效、重现性好、结果准确,可以为日常检测乳粉中黄曲霉毒素提供技术参考。

［关键词］　乳粉;黄曲霉毒素 B_1 和 M_1;QuEChERS;高效液相色谱－串联质谱法

Determination of Aflatoxin B_1 and M_1 in Milk Powder by QuEChERS－High Performance Liquid Chromatography－Tandem Mass Spectrometry

LIU Rui[1,2],CHEN Dong－dong[2], JIA Jing－jian[2],WANG Yi－ming[2],
HUO Si－yu[2], DONG Jing[2], PENG Tao[2*],HU Xiu－zhi[1*]

(1. *School of Life Sciences and Food Engineering*, *Hebei University of Engineering*, *Heibei Handan* 056107, *China*;
2. *Chinese Academy of Inspection and Quarantine*,*Beijing* 100176, *China*)

Corresponding author: *PENG Tao*, *E－mail*:*caiq_pengtao*@126.*com*; *HU Xiu－zhi*, *E－mail*: *xiuzhihu*6@163.*com*

Abstract: A method for the determination of aflatoxin B_1 and M_1 in milk powder was established by QuEChERS combied with high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC－MS/MS). Milk powder was redissolved with water, extracted with acetonitrile, and the extract was purified by octadecyl bonded silica gel and anhydrous magnesium sulfate. The samples were separated by InetSustain－C_{18}(2.1 mm×150 mm,

基金项目:“科技助力经济 2020 项目”(2020－032);国家重点研发计划项目(2018YFC1603400);中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2020 JK039)

作者简介:刘 瑞,硕士,从事食品加工与安全研究。

通讯作者:彭 涛,E－mail:caiq_pengtao@126.com; 呼秀智,E－mail: xiuzhihu6@163.com

3 μm) using ammonium acetate solution – methanol as mobile phase, and eluted in a gradient manner. Then detected by electrospray positive ion multiple and monitored by multiple reaction mode, and quantified by matrix – added external standard method. The results demonstrated that the concentrations of AFB_1 and AFM_1 in milk powder were in the range of 0.08 ~ 20 μg/kg, and the correlation coefficient(r) was higher than 0.999. The limit of detection were 0.02 μg/kg for AFM_1 and 0.05 μg/kg for AFB_1, and the limit of quantification were 0.05 μg/kg. At 1,5 and 10 times of the limit of quantitation, the average recoveries were 91.5% ~ 100.7%. This method is convenient, efficient, reproducible and accurate, which can provide technical reference for daily detection of aflatoxin in milk powder.

Key words: milk powder; aflatoxin B_1 and M_1; QuEChERS; high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry

黄曲霉毒素天然存在于自然界中,在湿度大雨水偏多地区的饲料中往往能检测出黄曲霉毒素含量超标。在所有已分离出的结构相似的黄曲霉毒素中,黄曲霉毒素 B_1(aflatoxin B_1, AFB_1)对人类和动物畜禽的毒害影响最大, 1 μg 便能引起肝脏癌变[1-2],各国对食品中黄曲霉毒素都进行了严格控制。大量研究数据表明,进入哺乳动物体内的 AFB_1 会有一部分在酶的作用下被羟化为毒性仅次于 AFB_1 的黄曲霉毒素 M_1(aflatoxin M_1, AFM_1)[3],并积蓄在动物乳汁中。我国奶类产量在 2019 年居世界第四位,面对日益增长的乳品产量及层出不穷的乳品中黄曲霉毒素含量超标事件,我国于 2017 年规定了 AFB_1 与 AFM_1 在婴幼儿食品及乳品中的限量标准为 0.5 μg/kg。可见,能够简单准确、高效快速的检测乳粉中 AFB_1 与 AFM_1 在确保消费者健康方面至关重要。

近年来,检测不同食品基质中真菌毒素的各种方法随着检测仪器的进步而迅速发展,包括液相色谱法[4-5]、液相色谱 – 串联质谱法[6-7]、酶联免疫吸附法[8-9]等。其中高效液相色谱法需要大量试剂且灵敏度相对较低,酶联免疫法存在酶不稳定性问题,而高效液相色谱 – 串联质谱法(High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC – MS/MS)在分离及筛选待测物方面都有很好的效果,该技术结合了液相和质谱的优点,稳定可靠、灵敏度高、高效快速[10-11]。前处理方法中, QuEChERS 技术经过不断优化,只需经过提取、盐析和净化 3 个步骤则可将待测物从样品基质中转移出来。目前报道的对乳粉中黄曲霉毒素的研究多集中在 AFM_1 的测定上。曲斌等[12]检测生鲜牛乳中 AFM_1 以 Sampli Q 萃取剂萃取,用 900 mg 硫酸镁和 150 mg 十八烷基键合硅胶吸附剂(C_{18})对萃取液净化并浓缩后,上机检测。于建玉等[13]选择用 50 mg 胺丙基键合硅胶(NH_2)和 50 mg N – 丙基乙二胺(primary secondary amine, PSA)吸附牛奶提取液中的干扰杂质,建立了检测牛乳中 AFM_1 方法,说明 QuEChERS 技术在乳品中黄曲霉毒素检测方面的可行性。因此,本研究选择在优化 QuEChERS 技术结合高效液相色谱 – 串联质谱的基础上,对乳粉中 B_1 与 M_1 的同时检测方法进行研究,以期为乳粉中黄曲霉毒素残留的检测提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂　婴幼儿配方乳粉(西安银桥乳业集团有限公司);乙酸铵(色谱纯,比利时 Acros 公司);氯化钠、无水硫酸镁(使用前 200 ℃烘干 12 h)(分析纯,北京伊诺凯科技有限公司);十八烷基键合硅胶吸附剂(C_{18})、N – 丙基乙二胺(PSA)(德国 CNW 科技公司);C_{18}柱(2.1 mm × 150 mm,3 μm)(上海技尔商贸有限公司);甲酸(质谱级,美国 Fisher 公司)、甲醇、乙腈、正己烷(色谱纯,美国 Fisher 公司);AFB_1、AFM_1 标准溶液(3 mg/L,纯度≥98%,上海安谱实验科技股份有限公司);乳粉中 AFB_1、AFM_1 质控样品(中检科(北京)实验室能力评价有限公司)。

1.2　仪器　Milli－Q 去离子水发生器(美国 Millipore 公司);ms205 du 型精密电子天平(十万分之一,上海梅特勒－托利多仪器公司);H1750R 型离心机(湖南湘仪离心机仪器公司);STM－18－14 型马弗炉(河南三特炉业科技有限公司);VORTEX－5 型涡旋振荡器,(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);STV－100 型多管涡旋振荡器(杭州茂丰仪器有限公司);DC－24－RT 型 24 位水浴加热氮吹仪(上海安谱实验科技股份有限公司);KQ－700DV 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司);HPLC－MS 8045 型高效液相色谱－串联质谱仪(日本岛津公司)。

1.3　样品来源　从北京市超市采购的乳粉样品,选择无黄曲霉毒素残留且基质背景较为干净的样品,最终确定以西安银桥牌乳粉样品作为空白样品。

1.4　标准溶液配制　各取浓度为 3 mg/L 的 AFB_1 与 AFM_1 标准溶液 1 mL 于 10 mL 容量瓶内,甲醇稀释并定容,标准工作液浓度为 300 μg/L,保存于－18 ℃恒温环境中,所用容量瓶为棕色且保存过程中注意避光。使用前静置至常温,并用甲醇稀释至目标浓度。

1.5　样品前处理

1.5.1　样品提取　称取 2 g 乳粉样品(精确至 0.001 g)于 25 mL 离心管中,3 mL 超纯水溶解。涡旋 1 min,10 mL 乙腈提取,振荡 10 min,超声 10 min,10 000 r/min 离心 8 min。

1.5.2　样品净化　取上述上清液至另一装有 4 g 无水硫酸镁和 1 g 氯化钠离心管中,涡旋 1 min,振摇 10 min,10000 r/min 离心 8 min。取全部上清液至含 40 mg C_{18} 和 450 mg 无水硫酸镁离心管中,涡旋 1 min 振荡 10 min,10000 r/min 离心 8 min,全部上清液于 40 ℃下氮吹至干,1 mL 初始流动相定容,过 0.22 μm 有机相滤膜,待测。

1.6　仪器分析条件

1.6.1　色谱条件　InertSustain－C_{18} 色谱柱(2.1 mm×150 mm,3 μm);柱温:28 ℃;流速:0.2 mL/min;进样量:5 μL;流动相:A 为 5 mmol/L 乙酸铵,B 为甲醇溶液;梯度洗脱程序:0～5 min,30%～100% B;5～5.5 min,100% B;5.5～6 min,30% B;6～9 min,30% B。

1.6.2　质谱条件　电喷雾离子源(electrosprayionization,ESI);多反应监测(multi－reactionmonitoring,MRM)模式;正离子模式;雾化器流量:3 L/min;干燥器流量:10.0 L/min;加热器流量:10 L/min;接口温度:300 ℃;接口电压:4.0 kV;其他质谱采集参数见表 1。

表 1　AFM_1 与 AFB_1 的质谱分析条件参数

Tab 1　Mass spectrometric parameters for M_1 and B_1

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 /eV	保留时间 /min
AFM_1	329.15	229.20*/273.2	－35.0	6.7
AFB_1	312.27	241.10*/269.0	－35.0	7.1

*为定量离子

1.7　基质匹配外标曲线　各称取 6 份 2 g 阴性乳粉样品(精确至 0.001 g)于离心管中,分别加入 AFB_1 和 AFM_1 的标准工作液,使样品中质量浓度分别为 0.08、0.5、1、5、10、20 μg/kg,经过 1.4 项和 1.5 项的前处理,用 1.6 项条件检测。以所得 AFB_1 和 AFM_1 的色谱峰面积为纵坐标,所添加质量浓度为横坐标分别绘制基质添加外标曲线,进行定量分析。

1.8　数据处理　本研究数据采用 Excel 和 Origin 8.5 进行数据处理。

1.9　方法准确度与精密度　采用标准添加法,分别准确称取空白乳品样品 2 g 并添加一定体积的黄曲霉毒素,使乳粉中 AFM_1 与 AFB_1 的含量分别为 0.05、0.25、0.50 μg/kg 三个不同浓度,按上述样品前处理方法处理后进行测定,一日内每种毒素的每个添加浓度取 6 个平行样品进行测定,重复测定3 d,基质匹配外标法定量,计算回收率和批内、批间相对标准偏差(*RSD*)。

2　结果与分析

2.1　色谱条件的建立　高效液相色谱－串联质谱法既能做定性检测又能做定量检测,已成为国内实验室日常使用的检测技术。黄曲霉毒素具有较好的脂溶性,最常采用的分析柱为 C_{18} 色谱柱,为选择最佳色谱柱分离条件,本研究选用高纯度、高比表面积的硅胶材料、具有很强惰性、化学性质稳定的 InertSustain－C_{18}(2.1 mm×150 mm,3 μm)。因此,本研究将上述溶液进行组合来选出最佳流动相体

系。结果表明，甲醇 - 5 mmol/L 乙酸铵溶液做流动相时分离效果和灵敏度最好。在确定流动相成分后，对高效液相色谱的洗脱条件、流速及色谱柱柱温进行优化，确定了 1.6 项的梯度洗脱条件，在 28 ℃时以 2.0 mL/min 的流速完成仪器检测，图 1b 为 5 μg/L 的浓度水平下 AFB_1 与 AFM_1 的色谱图。

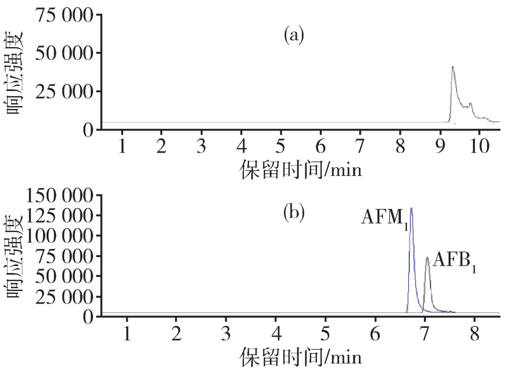

图 1　AFB_1 与 AFM_1 的 HPLC - MS/MS 图(质量浓度 5 μg/L)

(a)等度洗脱色谱图；(b)梯度洗脱色谱图

Fig 1　HPLC - MS/MS chromatogram of AFB_1 and AFM_1 (5 μg/L)

(a) Isocratic elution chromatogram;

(b) Gradient elution chromatogram

2.2　质谱条件的优化　由于 AFB_1 和 AFM_1 的化学结构及相对分子质量相似，用高效液相色谱法得到的 AFB_1 和 AFM_1 色谱峰为重叠状态，分离度较差，因此，选择 HPLC - MS/MS 法并优化其质谱条件。考虑到乳粉样品不易挥发以及 AFB_1 和 AFM_1 属极性化合物的特性，本研究选择离子源为 ESI 源。将浓度为 5 μg/L 的 AFB_1 和 AFM_1 标准溶液分别通过流动注射泵打进质谱分析系统，进行 ESI^+ 和 ESI^- 离子模式扫描，发现目标待测物在正离子模式下自身所带氧原子易获得质子，得到 $[M+H]^+$ 结构响应最高，其在负离子模式下较难失去氢离子且响应度较差，故选择在 ESI^+ 扫描模式下优化 AFB_1 和 AFM_1 的质谱检测条件，获得它们的母离子分别为 313 和 329。在多反应模式下，优化 AFB_1 和 AFM_1 的雾化器流量、干燥器流量、接口电流、加热块温度、检测器电压、加热器流量等质谱参数，使所有参数均为最优检测参数以得到更高的质谱响应。随后将上述所得母离子打碎，寻找丰度较强、适合用于定量定性的碎片离子作子离子(图 2、图 3)。

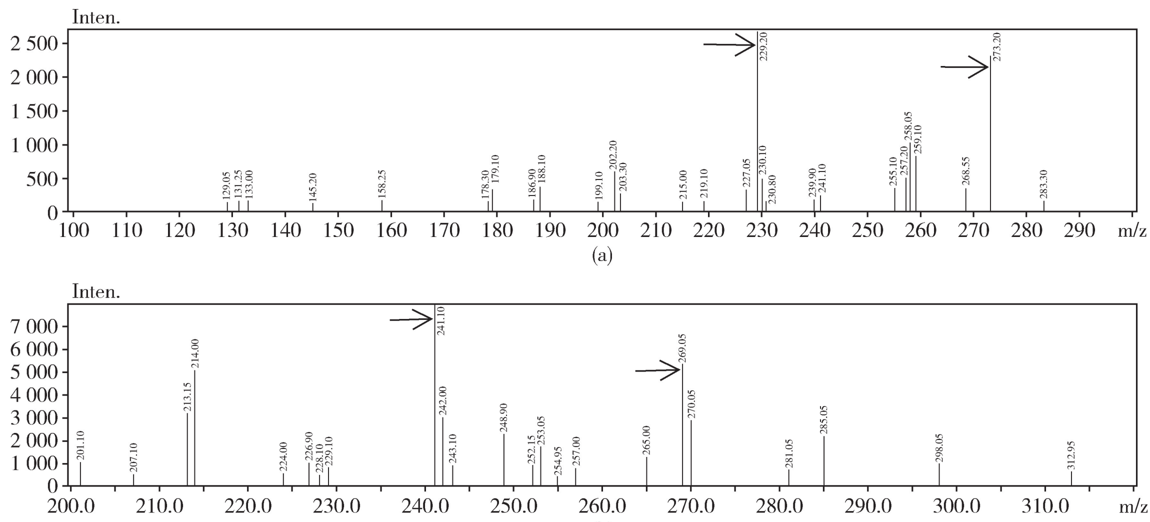

图 2　二级碎片离子扫描图

(a) M_1 (b) B_1

Fig 2　Secondary fragment ionscan

(a) M_1 (b) B_1

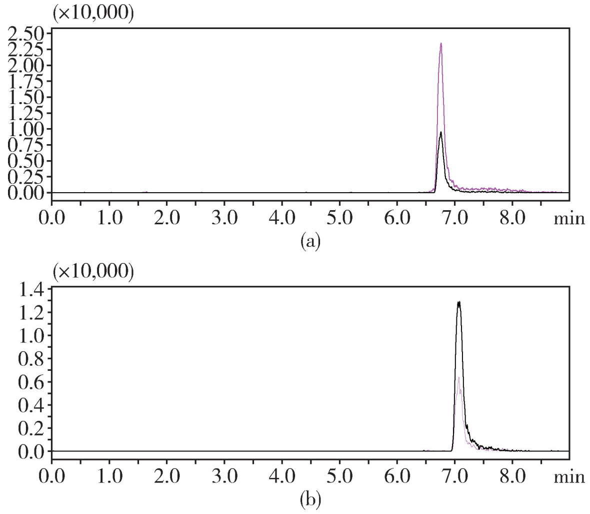

图 3　特征离子色谱图

(a) M_1 (b) B_1

Fig 3　Characteristic ion chromatogram

(a) M_1 (b) B_1

2.3　提取方法的优化　AFB_1 和 AFM_1 均属于极性分子,呈弱酸性。因此,要根据乳粉样品基质与黄曲霉毒素具体的理化性质,选择合适的提取溶剂把黄曲霉毒素从复杂的样品基质中提取出来,同时要做到避免对共萃物的萃取。根据国内外参考文献,本研究选择用乙腈、乙腈－水(V∶V = 4∶1)、乙腈－0.1%甲酸溶液(V∶V = 85∶15)、甲醇、甲醇－水(V∶V = 4∶1)、甲醇－0.1%甲酸溶液(V∶V = 85∶15)分别提取乳粉样品中黄曲霉毒素并比较其回收率,结果见图 4a,在 5 μg/kg 的添加量水平下,乙腈回收率最高。对乙腈用量进一步优化,结果见图 4b,选取 10 mL 乙腈提取乳粉样品最合适。

2.4　净化方式的优化　根据 QuEChERS 前处理技术,首先用 4 g 无水 $MgSO_4$ 和 1 g NaCl 的盐类初步净化,随后采用 C_{18}、PSA 和无水硫酸镁分别处理乳粉并通过改变各吸附剂的用量来选出回收率最高的组合。在 5 μg/kg 添加量下,使用 20、40、60 mg 的 PSA、C_{18}分别与 450 mg 无水硫酸镁组合净化乳粉样品,所得回收率结果见图 5。对 C_{18}用量优化,C_{18}在 40 mg 时回收率最高,当用量大于 60 mg 时,回收率变低。对 PSA 用量优化,结果显示随着 PSA 用量的增多样品回收率只在 56% ~62%范围内波动,并无明显变化。之后进一步优化无水硫酸镁用量,结果发现在 300 mg 以及 600 mg 添加量时回收率比 450 mg 的回收率低,因此本研究最终采用 40 mg C_{18}和 450 mg 无水硫酸镁为乳粉中 AFB_1 和 AFM_1 的净化方案,回收率更好(图 5)。

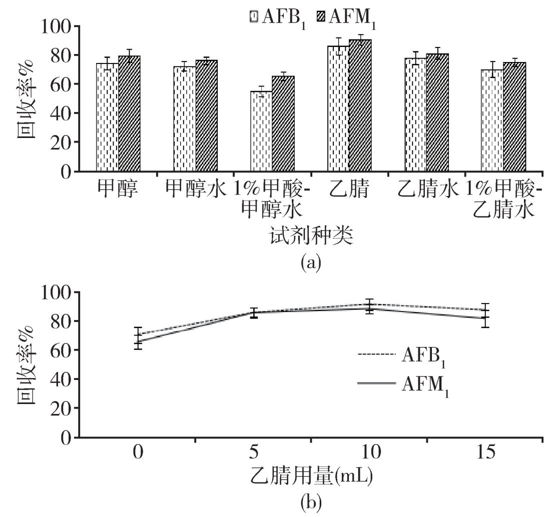

图 4　提取液对乳粉中 AFM_1 与 AFB_1 回收率的影响

(a) 甲醇、甲醇水、甲酸－甲醇水、乙腈、乙腈水、甲酸－乙腈水对回收率的影响;(b) 乙腈用量对回收率的影响

Fig 4　Recoveries of AFM_1 and AFB_1 in milk powder with different extraction solvents

(a) Influence of methanol、methanol water、formic acid－methanol water、acetonitrile、acetonitrile water、formic acid－acetonitrile water on recovery rate

(b) Influence of acetonitrile dosage on recovery

2.5　基质效应测定　乳粉样品溶液中常常带有大量基质成分,会在一定程度上对仪器分析黄曲霉毒素过程产生干扰,形成基质效应,影响仪器定量。当前有两种基质效应的评价方式:一种是得到待测物在空白溶剂中的响应值或峰面积及其在样品基质中的响应值或峰面积,通过响应值或峰面积的比值来评价[14],一种是通过分别绘制空白溶剂标准工作液和基质添加标准溶液的标准曲线,比较两线性方程的斜率比值来评价[15]。本研究结合实验室实际环境选择采用第二种评价方法,所得结果为正时,表现出基质增强,结果为负时,表现出基质抑制,计算公式如式(1)所示,数据如表 2 所示。

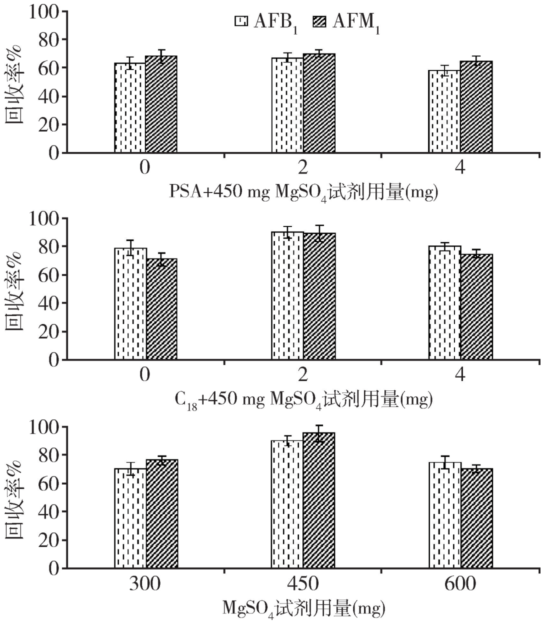

图 5　吸附剂质量对乳粉中 AFB_1 与 AFM_1 回收率的影响(n=3)

Fig 5　Effect of adsorbent quality on recovery rate of AFB_1 and AFM_1 in milk powder(n=3)

$$基质效应(\%)=\left(\frac{基质添加标准曲线斜率}{溶剂标准曲线斜率}-1\right)\times 100 \quad (1)$$

表 2　基质效应评估结果(*n*=3)

Tab 2　Evaluation results of matrix effect(*n*=3)

化合物	溶剂曲线方程	基质添加曲线方程	基质效应结果
AFB_1	$Y=29881.3x-267.392$	$Y=26833.4x-37.7876$	-10.2%
AFM_1	$Y=24888.2x-395.472$	$Y=20976.5x-395.472$	-15.7%

可得计算结果为 AFB_1 基质效应为 -10.2%，AFM_1 基质效应为 -15.7%，表明乳粉基质对 AFB_1 与 AFM_1 的检测结果表现出抑制效应。为减弱基质效应，故采用基质添加外标法定量。

2.6　线性关系及灵敏度　以 1.7 项绘制的基质添加标准曲线评估乳粉中 AFB_1 与 AFM_1 的线性定量关系，经过本研究前处理方法优化及仪器条件测定后，结果表明 AFB_1 与 AFM_1 在 0.08～20 μg/kg范围内呈线性关系。以 3 倍信噪比(S/N)为检出限，10 倍信噪比(S/N)为定量限，见表 3，检出限均低于国家标准检出限，*r* 都大于 0.999，表明本方法灵敏度较高，可用于实际样品检测。

表 3　乳粉中 AFB_1 与 AFM_1 的线性回归方程、检出限及定量限

Tab 3　Linear regression equation、detection limit and quantitative limit of AFB_1 and AFM_1 in milk powder

化合物	加标浓度 /(μg·kg^{-1})	线性范围 /(μg·kg^{-1})	回归方程	*r*	检出限 /(μg·kg^{-1})	定量限 /(μg·kg^{-1})
AFB_1	5	0.08～20	Y=26833.4x-37.7876	0.9999	0.03	0.05
AFM_1	5	0.08～20	Y=20976.5x-395.472	0.9995	0.02	0.05

2.7　准确度和精密度　使用阴性乳粉为空白样品，分别选择添加定量限的 1 倍、5 倍和 10 倍的黄曲霉毒素，按前述方法进行加标回收率测定。结果见表 4，乳粉中 AFM_1 的平均添加回收率在 91.5%～100.7%之间，相对标准偏差在 3.8%～9.6%之间；乳粉中 AFB_1 的平均添加回收率在 91.7%～99.8%之间，相对标准偏差在 3.2%～9.3%之间，表明方法准确度良好。

表 4　准确度和精密度实验结果

Tab 4　Accuracy and precision of the method

化合物	加标量 /(μg·kg^{-1})	批内(*n*=6)		批间 *RSD*/%
		回收率/%	批内 *RSD*/%	
AFM_1	0.05	91.5、92.2、96.8	6.6、7.3、3.8	8.7
	0.25	99.6、96.6、92.1	4.5、7.2、8.5	7.9
	0.50	100.7、95.9、92.1	8.7、5.0、6.2	9.6
AFB_1	0.05	95.1、94.8、91.7	5.6、6.1、3.9	7.4
	0.25	94.2、95.7、98.5	3.2、5.2、6.7	5.4
	0.50	99.8、92.8、91.9	6.2、7.7、4.1	9.3

2.8　质控样品分析　将本方法应用于检测乳粉中 AFB_1 以及 AFM_1 的质控样品。通过对有具体特性值及不确定度的质控样品的检测，以达到对检测方法验证的目的。所用 AFB_1 质控样指定值及不确定度为 0.672 ± 0.0119 μg/kg，能力评定标准差为 0.113 μg/kg；AFM_1 质控样指定值及不确定度为 0.811 ± 0.0108 μg/kg，能力评定标准差为 0.173 μg/kg。每个质控样品重复测定 3 次，取 3 次结果平均值得：AFB_1 检测值为 0.558 μg/kg，采用稳健统计值的统计方式计算 Z 值为 -1.0；AFM_1 检测值为 0.711 μg/kg，计算 Z 值为 1.6。$|z|$ 均小于 2.0，表明检测结果为满意结果，证明本方法检测乳粉中 AFB1 和 AFM_1 的可靠性。图 6 为所检测质控样品的 AFB_1 和 AFM_1 多反应监测色谱图。

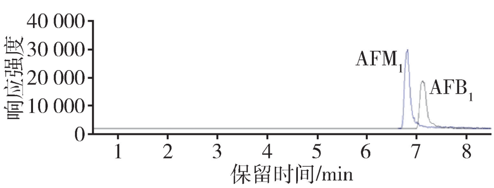

图 6　乳粉质控样品中 AFB_1 和 AFM_1 的 MRM 色谱图

Fig 6　MRM chromatogram of AFB_1 and AFM_1 in milk powder quality control samples

3　讨论与小结

3.1　色谱条件的建立　实验室在进行各类样品基质中黄曲霉毒素的检测时通常选择以乙腈[16]或甲醇[17]作流动相中的有机相，以水[18]或缓冲盐溶液[19]作水相，有时会在流动相中加入挥发性酸[20]以增强黄曲霉毒素的离子化效应，提高仪器检测的响应度。本研究比较了 5 μg/L 浓度的 AFB_1 和 AFM_1 混合标准溶液在乙腈与甲醇两种有机相下的色谱行为，结果发现乙腈虽然有很好的提取效果但在淋洗过程中会造成回收率损失。本研究还对比了水和 5 mmol/L 乙酸铵及 0.1% 甲酸洗脱待测物的区别，发现用水做流动相时，所得色谱峰顶端分叉，仪器响应值低，加入甲酸后并不能有效改善峰形且待测物响应值没有明显提高。用乙酸铵缓冲盐溶液做流动相时，待测物分离度和响应值得到改善，色谱峰峰形左右对称。考虑到洗脱方式的影响，比较了使用甲醇 -5 mmol/L 乙酸铵(1∶1)等度洗脱和梯度洗脱的响应值和分离度，结果表明使用 1.6 项的梯度洗脱条件能把待测物很好分离，实现 8 min 内快速出峰。随后优化了流动相流速，观察了在 1.0、2.0、3.0 mL/min 的流速下待测物色谱峰峰形、出峰时间及色谱柱柱压的变化，结果显示流速为 2.0 mL/min 满足残留检测要求。同时优化柱温条件 28 ℃时 AFB_1 与 AFM_1 在仪器响应度最高，避免了其他方法相对较高的柱温对色谱柱的损耗。

3.2　提取方式的优化　国内外的研究报道中实验室普遍选择将黄曲霉毒素转移到甲醇或乙腈等易于检测的有机溶剂中[21-22]，或用它们和水的混合溶液为提取剂来提取黄曲霉毒素[23]。由于乳粉含水量在 2.5% ~5% 之间，为使黄曲霉毒素与提取溶剂更充分融合，本研究在提取之前选择先用水浸润复溶乳粉，之后比较用乙腈、乙腈 - 水(V∶V = 4∶1)、乙腈 -0.1% 甲酸溶液(V∶V = 85∶15)、甲醇、甲醇 - 水(V∶V = 4∶1)、甲醇 -0.1% 甲酸溶液(V∶V = 85∶15)分别提取乳粉样品中黄曲霉毒素的回收率，实验发现用甲醇提取乳粉时上层清液会变浑浊不清并直接影响后续氮吹定容，最终优化乙腈用量选取 10 mL 乙腈提取乳粉样品，AFB_1 与 AFM_1 的提取回收率为 85% ~100%。

3.3　净化方式的优化　黄曲霉毒素的前处理技术有很多，大多数实验室普遍选择的专一性好、抗干扰能力强的免疫亲和柱进行净化[24]，但免疫亲和柱价格昂贵且有保质期限制，还需要保存于特定的低温环境中，在进行前处理净化时需消耗大量时间。另一常见的固相萃取法[25]存在操作复杂、需要大量试剂等问题。QuEChERS (quick easy cheap, effective rugged and safe)技术作为新兴的样品前处理手段已逐渐被应用到食品添加剂、生物毒素、激素及其他越来越多的不同领域[26-28]。因此本研究选择采用 QuEChERS 技术代替免疫亲和柱的使用进行方法优化。为了进一步提高萃取效率及回收率，参考国内外文献[29-30]，考虑在提取上清液中加入 4 g 无水 $MgSO_4$ 和 1 g NaCl 的盐类与水充分作用进行初步净化，促进水和乙腈的分离，以

利于 AFM_1 与 AFB_1 向有机溶剂中转移。对于乳粉中通常会存在的脂肪、糖类以及蛋白质等干扰物质,有文献报道用 C_{18} 和 PSA 吸附去除乳粉中的酯类、碳水化合物、色素及脂肪酸等干扰物,但是在实验中发现,加入 PSA 并不能有效提高方法回收率,而 C_{18} 和无水硫酸镁组合时所得回收率最高。同时考察 C_{18} 和无水硫酸镁的用量,最终确定了用 40 mg C_{18} 和 450 mg 无水硫酸镁净化乳粉中 AFB_1 和 AFM_1,比本文参考文献更节约试剂的使用。

本研究建立了 QuEChERS 净化与高效液相色谱 – 串联质谱法结合对乳粉中 B_1、M_1 同时进行检测的方法。本研究对提取液、净化条件等方面进行优化,最终选取乙腈作为提取液,40 mg C_{18} 和 450 mg无水硫酸镁净化提取液,方法定量限为 0.05 μg/kg,回收率在 91.5% ~100.7% 之间,使用本方法可以弥补现行国标不能同时检测乳粉中 M_1 和 B_1 的缺陷。而且本方法检测乳粉中黄曲霉毒素简单快速、回收率和重现性好,结果准确可靠,可为日常检测乳粉中黄曲霉毒素提供技术支持。

参考文献:

[1] Verheeche C, Liboz T, Mathieu F. Microbial degradation of aflation B_1: Current status and future advances [J]. Int J Food Microbiol, 2016, 237: 1.

[2] Medina A, Rodriguez A, Magan N. EFFECT of climate change on Aspergillus flavus and aflatoxin B_1 production [J]. Front Microbiol, 2014, 5: 348.

[3] 邵 帅, 戴 军, 杜 馨, 等. 降解黄曲霉毒素 B_1 菌株的发酵条件优化及降解机制 [J]. 食品科学, 2016, 522(5): 138 – 143.
Shao S, Dai J, Du X, *et al*. Optimization of fermentation conditions and degradation mechanism of aflatoxin B_1 – degrading strain [J]. Food Sci, 2016, 522(5): 138 – 143.

[4] 朱丹倩, 陶志成, 孔玉婷, 等. 高效液相色谱测定乳制品中黄曲霉毒素 M_1[J]. 食品安全导刊, 2019(15): 123.
Zhu D Q, Tao Z C, Kong Y T, *et al*. Determination of aflatoxin M_1 in dairy products by HPLC [J]. Chin Food Saf Magaz, 2019 (15): 123.

[5] 杨媛媛, 谢志民, 胡 静, 等. 高效液相色谱 – 柱后光化学衍生法测定茵栀黄口服液中黄曲霉毒素 G_2、G_1、B_2、B_1 的含量 [J]. 中南药学, 2020, 18(10): 1695 – 1698.
Yang YY, Xie Z M, Hu J, *et al*. Determination of aflatoxin G_2, G_1, B_2 and B_1 in Yinzhihuang oral solution by HPLC – post column photochemical derivatization [J]. Central South Pharm, 2020, 18(10): 1695 – 1698.

[6] 陈慧玲, 刘红河, 康 莉. 液体奶及奶粉中黄曲霉毒素 M_1 的液相色谱 – 串联质谱连用测定[J]. 实用预防医学: 2014, 21 (6): 742 – 744.
CHen H L, Liu H H, Kang L. Determination of aflatoxin M1 in liquid milk and milk powder by LC – MS/MS [J]. Pract Prev Med: 2014, 21(6): 742 – 744.

[7] Campone L, Piccinelli A L, Celano R, *et al*. Rapid and automated on – line solid phase extraction HPLC – MS/MS with peak focusing for the determination of ochration A in wine saples [J]. Food Chem, 2018, 244: 128 – 135.

[8] Fang B L, Xu S L, Huang Y J, *et al*. Gold nanorods etching – based plasmonic immunoassay for qualitative and quantitative detection of aflatoxin M_1 in milk [J]. Food Chem: 2020. 329: 127160.

[9] Yao C Y, Xu Z I, Wang H, *et al*. High affinity antibody based on a rationally designed hapten and development of a chemiluminescence enzyme immunoassay for quantification of alternariol in fruit juice, maize and flour [J]. Food Chem, 2019, 283: 359 – 366.

[10] Gonzalez – jartin JM, Rodriguez – canas I, Amparo A, *et al*. Multianalyte method for the determination of regulated, emerging and modified mycotoxins in milk: QuEChERS extraction followed by UHPLC – MS/MS analysis [J]. Food Chem, 2021, 356: 129647.

[11] Flores – flores ME, Gonzalez – penas E. An LC – MS/MS method for multi – mycotoxin quantification in cow milk [J]. Food Chem, 2017(218): 378 – 385.

[12] 曲 斌, 耿士伟, 朱志谦, 等. 用 UPLC – MS/MS 结合 QuEChERS 前处理方法快速测定生鲜牛乳中的黄曲霉毒素 M_1[J]. 农产品质量与安全, 2013(04): 51 – 53.
Qu B, Geng S W, Zhu Z Q, *et al*. Rapid determination of aflatoxin M_1 in fresh milk by UPLC – MS/MS combined with QuEChERS pretreatment method [J]. Qual Saf Agro – products, 2013 (04): 51 – 53.

[13] 于建玉, 任合松. QuEChERS – HPLC 快速测定牛奶中的黄曲霉毒素 M_1[J]. 化学工程师, 2020, 34(03): 29 – 31.
Yu J Y, Ren H S. Rapid Determination of aflatoxin M_1 in Milk by QuEChERS – HPLC [J]. Chem Eng, 2020, 34(03): 29 – 31.

[14] 刘艳平. QuEChERS 方法在复杂基质中兽药残留及霉菌毒素分析检测中的应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
Liu Y P. Application of quechers method in analysis and detec-

tion of veterinary drug residues and mycotoxins in complex matrix [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2017.

[15] 尹增浩. 动物源性食品中乙酰孕激素类药物多残留检测方法的建立[D]. 张家口: 河北北方学院, 2020.
Yin Z H. Establishment of multi - residue detection method of acetyl progesterone drugs in animal - derived foods [D]. Zhangjiakou: Hebei North University, 2020.

[16] 宋 月, 杨丽君, 吴平谷, 等. 复合柱净化 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定粮油中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮类毒素[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(1): 39 - 44.
Song Y, Yang L J, Wu P G, *et al*. Determination of aflatoxin and zearalenone in grain and oil by compound column purification - ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(01): 39 - 44.

[17] 李单单, 贺金涛. 高效液相色谱法测定枸杞中的黄曲霉毒素[J]. 农产品加工, 2020, (23): 54 - 56.
Li D D, He J T. Determination of aflatoxin in Lycium barbarum by HPLC [J]. Farm Prod Proc, 2020, (23): 54 - 56.

[18] 王一晨, 刘 奇, 吴学贵, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定花生中的黄曲霉毒素 B_1[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(07): 2059 - 2063.
Wang Y C, Liu Q, Wu X G, *et al*. Determination of aflatoxin B_1 in peanuts by HPLC - MS/MS [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(07): 2059 - 2063.

[19] 王 清. 动物源食品中氯霉素、玉米赤霉醇类化合物和黄曲霉毒素残留量测定[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2014.
Wang Q. Determination of chloramphenicol, zearalanol compounds and aflatoxin residues in animal food [D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2014.

[20] 陈佩佩, 陈琳珊, 陈 茹. 分散液液微萃取 - 超高效液相色谱 - 串联质谱法测定茶饮料中黄曲霉毒素 B_1 和 B_2[J]. 食品安全导刊, 2021(19): 67 - 69 + 71.
Chen P P, Chen L S, Chen R. Determination of aflatoxins B_1 and B_2 in tea drinks by dispersive liquid - liquid microextraction - ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. Chin Food Saf Magaz, 2021(19): 67 - 69 + 71.

[21] 张国梁, 郑冬梅, 李晓冬, 等. 亲水亲脂平衡柱萃取高效液相色谱快速测定干酪中的黄曲霉毒素 M_1[J]. 中国制造, 2013, 32(4): 141 - 143.
Zhang G L, Zheng D M, Li X D, *et al*. Rapid determination of aflatoxin M_1 in cheese by hydrophilic - lipophilic balance column extraction and high performance liquid chromatography [J]. China Brewing, 2013, 32(4): 141 - 143.

[22] 黄隽灏, 王珉道, 伍嘉耀, 等. 生鲜乳中黄曲霉毒素 M_1 检测方法研究[J]. 中国乳业, 2021(01): 55 - 59.
Huang J H, Wang M D, Wu J Y, *et al*. Study on detection method of aflatoxin M_1 in raw milk [J]. Chin Dairy, 2021(01): 55 - 59.

[23] 凌阿茹, 郭文博, 杨俊花, 等. QuEChERS - 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定畜禽组织中 6 种黄曲霉毒素和杂色曲霉素[J]. 色谱, 2018, 36(5): 439 - 445.
Ling A R, Guo W B, Yang J H, *et al*. QuEChERS - ultra - high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry for simultaneous determination of six aflatoxins and variegated tromycin in livestock and poultry tissues [J]. Chin J Chromatogr, 2018, 36(5): 439 - 445.

[24] Zinedine A, Gonzalez - osnaya L, Soriano JM, *et al*. Presence of aflatoxin M_1 in pasteurized milk from Morocco [J]. Int J Food Microbiol. 2007, 114: 25 - 29.

[25] 易珊珊, 杜 鑫. PRIM - HLB 固相萃取/超高效液相色谱 - 串联质谱法同时快速检测粮食中 4 种真菌毒素的含量[J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2020, 40(5): 47 - 52.
Yi S S, Du X. Simultaneous determination of 4 mycotoxins in grains by UPLC - MS/MS coupled with PRIME - HLB SPE clean - up [J]. J Yunnan Norm Univ (Nat Sci Ed), 2020, 40(5): 47 - 52.

[26] Lee T P, Saad B, Khayoon W S, *et al*. Molecularly imprinted polymer as sorbent in micro - soild phase extraction of ochratoxin A in coffee, grape juice and urine [J]. Talanta, 2012, 88: 129 - 135.

[27] Rodriguez - carrasco Y, Fattore M, Albrizio S, *et al*. Occurrence of Fusarium mycotoxins and their dietary intake through beer consumption by the European population [J]. Food Chem, 2015, 178: 149 - 155.

[28] Zhou J, Xu J J, Cong J M, *et al*. Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk [J]. J Chromatogr A, 2018, 1532: 20 - 29.

[29] 何 佳. QuEChERS 提取法结合 UHPLC - MS/MS 检测葡萄酒中多种农药残留及真菌毒素方法研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
He J. Study on detection of pesticide residues and mycotoxins in wine by QuEChERS extraction method combined with UHPLC - MS/MS [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.

[30] 熊 欣. QuEChERS 结合 LC - MS/MS 检测食品中多种真菌毒素的方法研究[D]. 广州: 暨南大学, 2018.
Xiong X. Study on the method of detecting mycotoxins in food by QuEChERS combined with LC - MS/MS [D]. Guangzhou: Jinan University, 2018.

(编 辑:侯向辉)