

同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁

华 宇, 高和杨, 聂兴娜, 周旌, 张大伟*

(Romer Labs 无锡实验室, 无锡 214101)

摘 要: 目的 建立一种高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 的方法。**方法** 样品经甲醇溶液提取后, 经离心机离心, 上层清液用 MycoSep™226 AflaZon+Multifunctional 净化柱净化, 在线添加黄曲霉毒素 M₁ 同位素内标后采用 LC-MS/MS 进行检测。**结果** 黄曲霉毒素 M₁ 在 0.05~5.0 µg/L 范围内线性关系良好, 相关系数大于 0.995; 在 0.02、0.05 和 0.10 µg/L 添加水平的回收率为 89.02%~118.85%, 相对标准偏差小于 7.06%(n=6), 定量限为 0.06 µg/kg。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合用于测定奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁。

关键词: 黄曲霉毒素 M₁; 高效液相色谱-串联质谱法; 同位素内标; 牛奶; 奶粉

Determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder by isotope internal standard-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

HUA Yu, GAO He-Yang, NIE Xing-Na, ZHOU Jing, ZHANG Da-Wei*

(Romer Labs Analitacai Serice (Wuxi) Co., Ltd, Wuxi 214101, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder by isotope internal standard-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** After the sample was extracted with methanol solution, it was centrifuged in a centrifuge, and the supernatant was purified with a MycoSep™ 226 AflaZon + Multifunctional purification column, and then separated and detected by LC-MS/MS with isotope internal standard. **Results** Aflatoxin M₁ had a good linear relationship in the range of 0.05–5.0 g/L, and the correlation coefficient was greater than 0.995. The recoveries at the addition levels of 0.02, 0.05 and 0.10 µg/L were 89.02%–118.85%, the relative standard deviations were less than 7.06% (n=6), and the limit of quantification was 0.06 µg/kg. **Conclusion** This method is rapid, accurate and sensitive, and is suitable for the determination of aflatoxin M₁ in milk and milk powder.

KEY WORDS: aflatoxin M₁; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; isotopic internal standard; milk; milk powder

*通讯作者: 张大伟, 博士, 主要研究方向为真菌毒素及发酵。E-mail: David.Zhang@romerlabs.com

*Corresponding author: ZHANG Da-Wei, Ph.D, Fermentation in Mycotoxin, Wuxi 214122, China. E-mail: David.Zhang@romerlabs.com

1 引 言

黄曲霉毒素(aflatoxin, AF)是黄曲霉和寄生曲霉真菌产生的次生代谢产物^[1]。此类物质对人和动物有着极强的危害。其中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)毒性最强, 在 1993 年即被世界卫生组织国际癌症研究机构确定为 I 类致癌物质。黄曲霉毒素 M₁(AFM₁)是哺乳动物摄入污染了黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的饲料后在体内的代谢产物, 主要存在于乳、肝脏、蛋、肉及尿液中, 具有与 AFB₁ 相似的毒性和致癌性, 在 2003 年同样被世界卫生组织国际癌症研究机构确定为 I 类致癌物质^[2,3]。为此, 我国卫生部于 1989 年 6 月 1 日开始对牛乳及其制品的黄曲霉毒素 M₁ 进行了限量需小于 0.5 μg/kg, 并对相关标准进行了持续更新^[4,5]。

目前检测牛奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 含量的方法主要有薄层色谱法^[6]、酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[7]、液相色谱法^[8,9]、液相色谱-串联质谱法^[10,11]等。薄层色谱法准确性差, 灵敏度差; ELSIA 灵敏度较高, 但重复性和专属性较差, 易出现假阳性; 液相色谱法前处理步骤繁琐, 检出限、定量限较高; 高效液相色谱-串联质谱法准确、高效, 灵敏度高, 符合当前食品检测快速高效的要求。但也存在步骤繁琐, 耗费时间较长等问题, 这也是目前分析工作者致力改进的主要方面。

本研究利用 MycoSep™226 AflaZon+Multifunctional 净化柱代替免疫亲和柱(immunoaffinity chromatography column, IAC 柱)对样品进行前处理, 并利用同位素内标进行基质校正, 建立了高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)测定奶及奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 的方法, 大大简化了黄曲霉毒素 M₁ 的前处理步骤, 极大的缩短了前处理时间, 可以显著提高样品的检测效率。同时针对采样点和检测实验室通常不在一处, 样品需要冷冻运输存储这个状况, 对液态奶样品在冷冻复融后的检测结果做了探讨, 对相关的检测数据的准确性进行研究, 为更好地判定冷冻液态奶中黄曲霉毒素 M₁ 的含量提供了一些基础数据。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Agilent 1290-Sciex QTRAP 5500 高效液相色谱-串联质谱仪(美国安捷伦公司和美国 SCIEX 公司); Milli-Q 超纯水仪(德国默克密理博公司); BSA2202S-CW 分析天平(德国赛多利斯公司); 3-15 离心机(美国 SIGMA 公司); 氮吹 Romer Evap™(奥地利 Romer Labs 公司)。

甲醇、乙腈、乙酸、醋酸铵(色谱纯, 德国默克公司); 黄曲霉毒素 M₁(Aflatoxin M₁, 0.501 μg/mL)、黄曲霉毒素 M₁ 同位素内标(U-[¹³C¹⁷]-Aflatoxin M₁, 0.507 μg/mL)、MycoSep™226 净化柱(奥地利 Romer Labs 公司)。

牛奶样品由合作客户提供; 奶粉样品为 FAPAS 提供。

2.2 标准溶液配制

稀释液: 分别取 50 mL 乙腈和 50 mL 超纯水于 150 mL 玻璃瓶中, 再加入 5 mL 乙酸混匀备用。

黄曲霉毒素 M₁ 标准曲线: 先用乙腈将黄曲霉毒素 M₁ 母液稀释至 50 μg/L, 然后再用稀释液逐级稀释, 浓度为 0.01、0.05、0.10、0.50、1.00、2.00、5.00 μg/L。

AFM₁ 同位素内标: 先用乙腈将 AFM₁ 母液稀释至 50 μg/L, 然后再用稀释液逐级稀释至 5 μg/L。

2.3 样品前处理

①采样和试样制备

将冷冻存储的样品回至室温, 摇匀备用。

②提取

液态奶样品: 称取 1 g(精确至 0.01 g)化冻混匀得液态牛奶样品于 50 mL 离心管中, 准确加入 10 mL 甲醇溶液, 充分振荡 30 min, 4000 r/min 离心, 10 min, 取上清液备用^[12]。

奶粉样品: 称取 1 g(精确至 0.01 g)奶粉溶于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 50℃热水, 混匀后准确加入 10 mL 甲醇溶液, 充分振荡 30 min, 4000 r/min 离心, 10 min, 取上清液备用。

③净化

由于常规的免疫亲和柱 IAC 柱净化过程耗时较长, 大大影响实验效率, 本实验采用 Romer Labs 多功能净化柱进行净化。取 8 mL 离心上清液于 MycoSep™226 配套玻璃管中, 过 MycoSep™226 净化柱, 取 2 mL 净化液在 50℃下缓缓吹至近干, 用 0.5 mL 稀释液复溶, 0.22 μm 滤膜过滤, 收集滤液于进样瓶中以备进样。

2.4 液相色谱-串联质谱条件

(1) 液相色谱条件

飞诺美 Phenomenox Gemini HPLC C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 柱温 40 ℃, 流速 0.5 mL/min; 进样量 10 μL, 流动相 A 为含 2 mmol 乙酸铵的 0.5%乙酸水溶液; 流动相 B 为含 2 mmol 乙酸铵的 0.5%乙酸的甲醇溶液^[13]。梯度洗脱条件如表 1 所示。

表 1 梯度洗脱程序
Table 1 Gradient elution program

时间/min	0	1	14	15	15.1	16	20
流动相 B/%	10	10	97	97	10	10	10

(2) 质谱条件

扫描模式: 多反应监测模式; 离子源: 电喷雾电离 ESI(+), 离子源温度: 550℃; 气帘气: 30.0 psi; 碰撞气: 中等; 电喷雾电压: 4500 V; Gas1: 55 psi; Gas2: 65 psi; 其他质谱条件见表 2。

3 结果与分析

3.1 质谱条件

将黄曲霉毒素 M₁ 及同位素内标配制成合适浓度的标准溶液, 进行流动注射分析, 在正离子模式下进行全扫描

选择合适的母离子, 然后进行产物离子扫描, 选择相对丰度最高的子离子作为定量离子, 其次的作为定性离子, 从而得到待测物离子对。通过优化离子对、去簇电压、入口电压、碰撞能等条件(具体参数见表 2), 得到多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM)色谱图, 见图 1、2。

表 2 质谱条件
Table 2 Mass spectrometer condition

母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	保留时间 /min	定性定量离子	去簇电压 /V	入口电压 /V	碰撞能量	碰撞室出口 电压/V	扫描时间 /ms
329.000	273.000	12.45	AFM1 – P	90.0	10	35	14	30
	259.000	12.45	AFM1 – S	90.0	10	35	14	30
346.000	288.100	12.45	AFM1 – IS	90.0	10	35	16	30

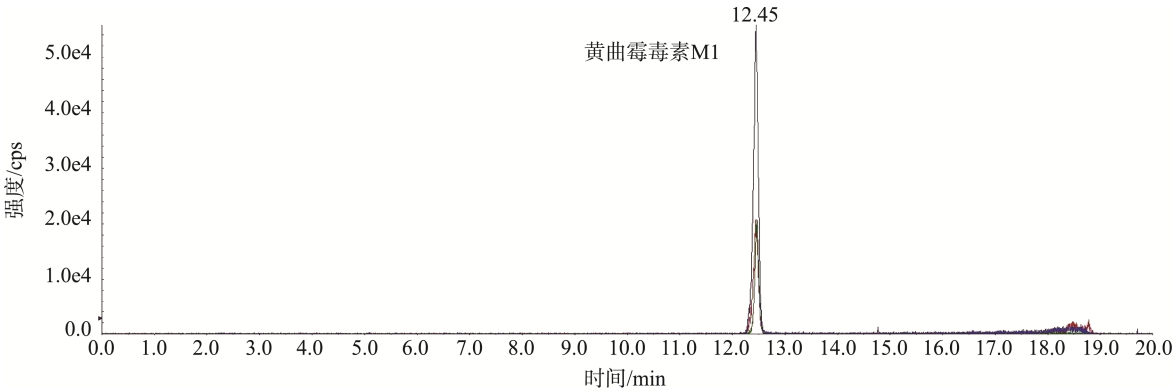


图 1 黄曲霉毒素 M1 及同位素内标总离子流图
Fig.1 Total ion flow diagram of aflatoxin M1 and isotopic internal standard

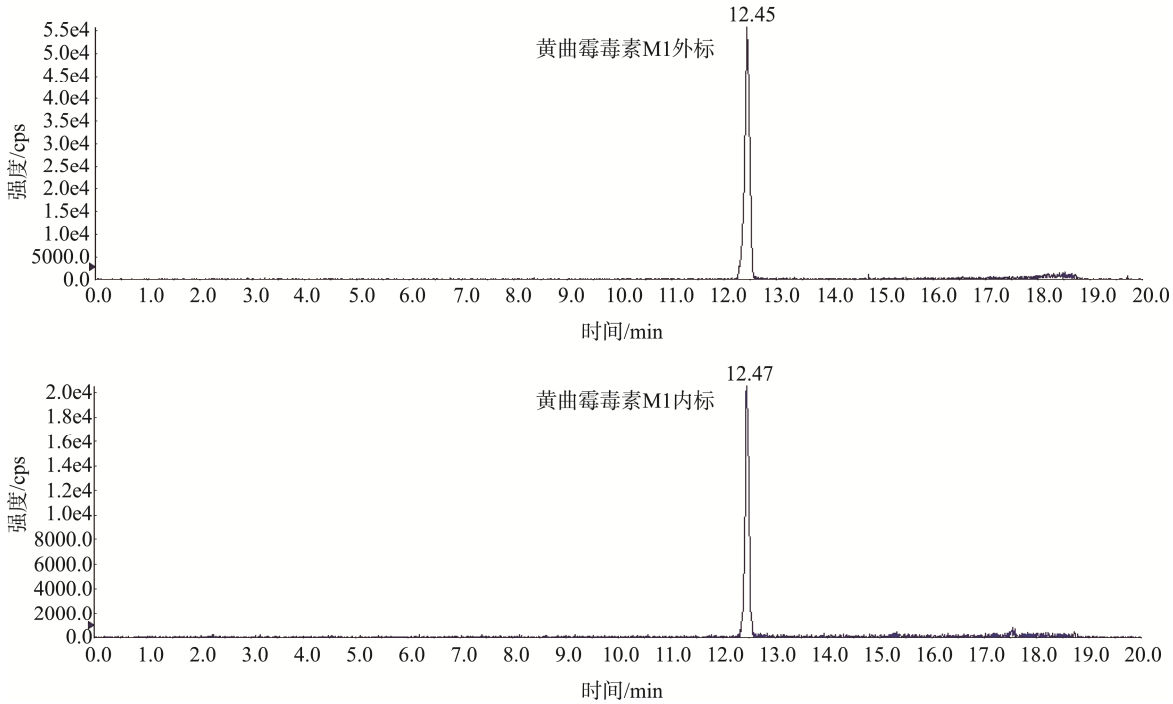


图 2 黄曲霉毒素 M1 及同位素内标多反应监测色谱图
Fig.2 Multiple reaction monitoring chromatogram of aflatoxin M1and isotope internal standard

3.2 前处理条件优化

本实验采用 MycoSep™226 净化柱, 将传统免疫亲和柱 IAC 净化时间由 1 h 左右缩短至 2 min, 大大提高了前处理效率, 同时奶粉样品采用 FAPAS 样品 T04339QC 进行测试, 可以发现检测器噪音更低, 目标物信号更强, 见图 3; 更重要的是检测结果与证书赋值非常接近, 表明用 MycoSep™226 净化柱代替免疫亲和柱 IAC 净化乳制品是完全可行的, 详细数据见表 3、4。

3.3 基质效应

基质效应(离子抑制或离子增强)是指不同样品基质在质谱检测时特别是使用电离源时由于离子化效应而产生^[14]。MycoSep™226 净化柱专属性不如 IAC 柱子, 净化后样品的基质效应还是相当强的, 所以需要一种简单易行的方法

来消除基质效应。常见的方法是绘制基质标准曲线。基质标准曲线配制费时费力, 适用性又比较差, 而同位素内标与目标物有着相同的离子化效应, 基本上可以完全消除基质效应。同时考虑到同位素内标价格昂贵, 其主要作用是消除基质干扰, 因此在上机时在线添加适量较低浓度的同位素内标即可。

3.4 方法的线性范围及检出限

按 2.2.1 在不同的 3 d 分别配制 7 个不同浓度的标曲点分别上机, 由仪器自动绘制标准曲线, 线性相关系数为 0.9997~0.9998, 见表 5。以信噪比为 3(S/N=3)计算检出限(limit of detection, LOD)为 0.02 µg/kg, 以信噪比为 10(S/N=10)计算定量限(limit of quantitation, LOQ)为 0.06 µg/kg。

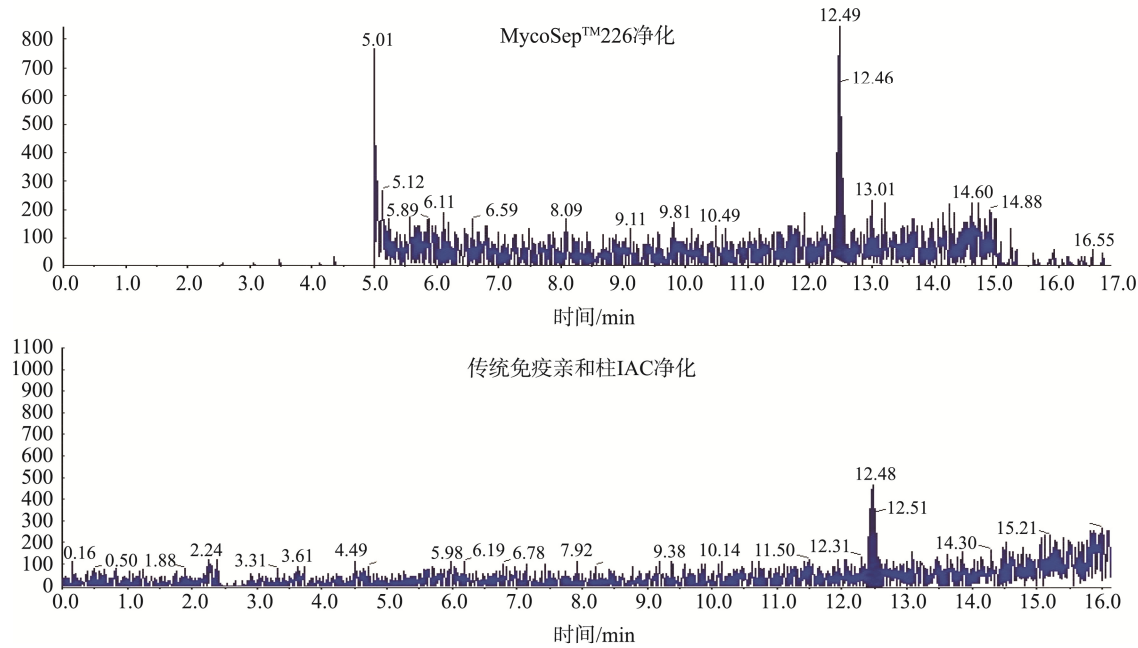


图 3 FAPAS 奶粉样品黄曲霉毒素 M1 MycoSep™226 净化柱和 IAC 净化色谱图
Fig.3 MRM chromatograms of FAPAS milk powder cleaned up with MycoSep™226 and IAC

表 3 FAPAS 样品 T04339QC 数据报告
Table 3 FAPAS T04339QC sample report

样品编号	基质	霉菌毒素	赋值/Xa	Z ≤2 范围	单位	参考实验室数量
T04339QC	奶粉	黄曲霉毒素 M1	0.0342	0.0192-0.0492	µg/kg	61

表 4 FAPAS 样品检测数据
Table 4 Inspection data of FAPAS samples

霉菌毒素	参考值/(µg/kg)	测试值/(µg/kg)	回收率/(以 0.0342 计)	平均值/(µg/kg)	相对标准偏差/%
黄曲霉毒素 M1	0.0192~0.0492	0.035	102.3	0.033	8.80
		0.035	102.3		
		0.030	87.72		
		0.029	84.80		
		0.036	105.3		
		0.032	93.57		
		0.036	105.3		

3.5 回收率及精密度实验

在空白牛奶和奶粉中, 分别在 0.02、0.05 和 0.10 $\mu\text{g/L}$ 3 个水平下进行加标回收实验, 每个单独 6 平行。牛奶回收率在 84.88%~128.75%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.08%~5.14%; 奶粉回收率在 85.64%~120.14%, RSD 为 4.40%~7.06%, 详见表 6、7。回收率与精确度均能满足实验要求。

3.6 冷冻试验

由于生鲜奶采样点与检测实验室通常不在一个点, 样品需要冷冻运输及储藏。实验室收到样品后解冻后再检

测, 这个过程可能会使牛奶理化性质产生一定变化, 从而影响黄曲霉毒素 M_1 的检测结果^[15,16]。为此, 在空白牛奶样品中分别加入 0.02、0.05 和 0.10 $\mu\text{g/kg}$ AFM1, 混匀后冷冻过夜, 第 2 d 解冻后分别用 Mycosep226 和 COIAC1005 净化上机。从数据中可以看出 Mycosep226 净化柱和 COIAC1005(IAC 柱)对结果没有明显的影响, 但冷冻过程对黄曲霉毒素 M_1 的回收率有相当大的影响, 而且含量越高, 影响越大, 在检测冷冻后的奶样品时, 可能进行回收率校正是必要的。同时由于简化了操作, 过 Mycosep226 净化柱样品的检测数据 RSD 明显要小于过 IAC 柱样品数据。详细数据见表 8。

表 5 在不同 3 天里制备的 3 条标准曲线
Table 5 Standard curves prepared in different 3 days

分析日期	霉菌毒素	线性方程	相关系数(r^2)
2019-1-21	黄曲霉毒素 M1	$Y=1.74X$	0.9997
2019-1-23		$Y=1.82X$	0.9998
2019-2-15		$Y=1.54X$	0.9998

表 6 牛奶样品平均回收率及 RSD 值
Table 6 Average recoveries and RSDs of milk samples

霉菌毒素	牛奶加标实验		
	空白牛奶+0.02 $\mu\text{g/kg}$ 回收率/%	空白牛奶+0.05 $\mu\text{g/kg}$ 回收率/%	空白牛奶+0.10 $\mu\text{g/kg}$ 回收率/%
黄曲霉毒素 M1	117.50	105.00	84.88
	118.13	102.75	91.75
	110.00	100.25	85.63
	128.75	104.50	92.25
	117.50	103.25	89.25
	121.25	106.50	90.38
平均值/%	118.85	103.71	89.02
RSD/%	5.14	2.08	3.50

表 7 奶粉样品平均回收率及 RSD 值
Table 7 Average recoveries and RSDs of milk powder samples

霉菌毒素	奶粉加标实验		
	空白奶粉+0.02 $\mu\text{g/kg}$ 回收率/%	空白奶粉+0.05 $\mu\text{g/kg}$ 回收率/%	空白奶粉+0.10 $\mu\text{g/kg}$ 回收率/%
黄曲霉毒素 M1	115.32	95.52	92.56
	120.14	102.32	88.97
	116.42	106.78	91.22
	109.85	110.21	85.64
	105.78	98.75	97.65
	98.86	103.49	90.18
平均值/%	111.06	102.85	91.04
RSD/%	7.06	5.16	4.40

表 8 冷冻加标牛奶样品平均回收率及 RSD 值
Table 8 Average recoveries and RSDs of frozen milk samples

霉菌毒素	空白牛奶+ 0.02 µg/kg 回收率/%		空白牛奶+ 0.05 µg/kg 回收率/%		空白牛奶+0.10 µg/kg 回收率/%	
	净化柱 Micosep 226	免疫亲和柱 IAC 1005	净化柱 Micosep 226	免疫亲和柱 IAC 1005	净化柱 Micosep 226	免疫亲和柱 IAC 1005
黄曲霉毒素 M1	76.25	88.20	63.00	73.08	53.13	58.38
	85.00	70.00	64.25	62.16	54.00	65.24
	83.13	82.60	64.75	67.76	53.38	59.64
平均值/%	81.46	80.27	64.00	67.67	53.50	61.09
RSD/%	5.97	11.61	1.94	8.07	0.34	5.98

3.7 实际样品检测

对选取的实际样品牛奶与奶粉进行检测后, 均未检出黄曲霉毒素 M₁。

4 结 论

本方法基于 Mycosep226 净化柱前处理技术以及同位素内标基质校正技术, 建立了一种针对牛奶及奶粉的液相色谱-质谱联用技术, 本方法具有操作简单、快速、准确等特点, 极大地减轻了检测人员的劳动强度, 显著提高了检测效率。同时对液态奶运输储藏过程中冷冻的影响进行了初步的研究, 得到了一些有用的数据, 为今后牛奶和奶粉的黄曲霉毒素检测提供了一个新的途径, 新的思路。

参考文献

[1] Anfossi L, baggiani C, Giovabboli C, *et al.* Occurrence of aflatoxin M1 in Italian cheese: Results of a survey conducted in 2010 and correlation with manufacturing, production season, milk animals, and maturation of cheese [J]. Food Control, 2012, 25(1): 125–130.

[2] IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic and mycotoxins [M]. /IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, France: IARC, World Health Organization, 1993.

[3] IARC. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [M]. //IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Lyon, France: IARC, World Health Organization, 2002: 171–175.

[4] GB 9676-1988 牛乳及其制品中黄曲霉毒素 M1 限量卫生标准[S]. GB 9676-1988 Hygienic standard for the limit of aflatoxin M1 in milk and its products [S].

[5] GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. GB 2761-2017 National food safety standard-Limit of mycotoxin in food [[S].

[6] Sarma UP, Bhetaria PJ, Devi P, *et al.* Aflatoxins on health [J]. Indian J Clin Biochem, 2017, 32(2): 124–133.

[7] 梁晶晶, 沈丹, 张玉. 酶联免疫法测定婴幼儿配方乳粉中黄曲霉毒素 M1 的方法研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 163–166.

Liang JJ, Shen D, Zhang Y. Determination of aflatoxin M1 in infant formula milk powder by ELISA [J]. China Brew, 2016, 35(4): 163–166.

[8] 丁俭, 李培武, 李光明, 等. 在线固相萃取富集-高效液相色谱法快速测定牛奶中黄曲霉毒素 M1[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 289–293.

Ding J, Li PW, Li GM, *et al.* Determination of aflatoxin M1 in milk by high performance liquid chromatography using on-line solid phase extraction [J]. Food Sci, 2013, 35(4): 163–166.

[9] 牛军小, 苏军, 徐晓枫, 等. 免疫亲和柱净化-反相高效液相色谱法检测乳与乳制品中黄曲霉毒素 M1[J]. 中国卫生检验杂志, 2014. 24(7): 940–941.

Niu JX, Su J, Xu XF, *et al.* Detection of aflatoxin M1 in milk and dairy products by immune affinity column purification- high performance liquid chromatography [J]. China J Health Inspect, 2014, 24(7): 940–941.

[10] Michlig N, Repetti MR, Chiericatti, *et al.* Multicalss compatible sample preparation for UHPLC-MS/MS determination of aflatoxin M1 in raw milk [J]. Chromatographia, 2016, 79(17–18): 1091–1100.

[11] 于晓瑾, 王浩, 杨红梅, 等. 液质法同时测定婴幼儿乳粉中 7 种有毒及禁用物质残留[J]. 食品研究与开发, 2015, 36(4): 133–137.

Yu XJ, Wang H, Yang HM, *et al.* Simultaneous determination of seven kinds of toxic and prohibited substances residues in infant milk powder by LC-MS/MS [J]. Food Red Dev, 2015, 36(4): 133–137.

[12] 张大伟, 高和杨, 周旌. 超高效液相色谱-串联质谱法同时检测饲料原料, 饲料成品中 18 种真菌毒素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(22): 87–96.

Zhang DW, Gao HY, Zhou J. Simultaneous determination of 18 kinds of mycotoxins in feed ingredients and feed products by ultra performance liquid Detection of salbutamol and clenbuterol in swine liver and swine urine by enzyme chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Qual Saf, 2018, 9(22): 87–96.

[13] Michael S, Rudolf K, Rainer S. Application of an LC-MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds [J]. Food Chem, 2010, (119): 408–416.

[14] 郭同军, 王佳琪, 卜登攀. 牛奶保存方法和采样时间对乳尿素氮变化

的影响[J]. 中国奶牛, 2008, 6: 22-24

Guo TJ, Wang JQ, Bo PD. Effect of milk preservation method and sampling time on nitrogen change in milk urea [J]. China Dairy Catt, 2008, 6: 22-24.

[15] 王泽华. 加热、冷冻对牛奶特性的影响[J]. 山西农业, 2007, 9: 19-20.

Wang ZH. The influence of heating and freezing on milk properties. [J]. Shanxi Agric, 2007, 9: 19-20.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介

华 宇, 高级工程师, 主要研究方向为真菌毒素的检测。

E-mail: Fisher.Hua@romerlabs.com

张大伟, 博士, 主要研究方向为真菌毒素及发酵。

E-mail: David.zhang@romerlabs.com