

- [6] OEHHHA. No significant risk level (NSRL) for the proposition 65 carcinogen 4-methylimidazole [S]. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Branch Office of Environmental Health Hazard Assessment (OEHHHA) California Environmental Protection Agency, 2011.
- [7] 黄志勤, 屈海云. 分光光度法测定焦糖色中 4-甲基咪唑 [J]. 中国调味品, 2005 (6): 52-54.
- [8] 荣维广, 宋宁慧, 阮华, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定焦糖色素中副产物 2-甲基咪唑、4-甲基咪唑和 2-乙酰基-4-(1,2,3,4-四羟丁基)咪唑 [J]. 分析化学, 2015, 43 (5): 742-774.
- [9] 孙梓宇, 罗群, 罗庆铭, 等. SPE 萃取-离子对高效液相色谱法测定可乐中 4-甲基咪唑 [J]. 广东化工, 2014, 41 (7): 188-189.
- [10] 彭向前, 冯玮, 石海英. 气相色谱法同时检测焦糖色素中的 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑 [J]. 中国调味品, 2012, 37 (8): 83-85.
- [11] 张晓燕, 芦春梅, 郭娜, 等. 高效液相色谱法测定饮料中的 4-甲基咪唑 [J]. 中国酿造, 2013, 32 (5): 148-150.
- [12] 王淼, 陈海珍. 高效液相色谱法测定焦糖中 4-甲基咪唑的含量 [J]. 中国处方药, 2015, 13 (10): 25-26.
- [13] 熊珺, 陈美玲, 赖毅东. 固相萃取-选择离子气质联用法测定液
态调味料中的 4-甲基咪唑 [J]. 现代食品科技, 2012, 28 (5): 567-569.
- [14] 张璐, 孔祥虹, 何强. UPLC-MS-MS 检测饮料中的 4-甲基咪唑及其同分异构体 2-甲基咪唑 [J]. 食品科学, 2014, 35 (8): 244-248.
- [15] 吴玉鑫, 洗燕萍, 郭新东, 等. 分散固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法测定酱油中的 2-甲基咪唑和 4-甲基咪唑 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5 (5): 1357-1363.
- [16] 王丽英, 任贝贝, 杨立新, 等. 同位素稀释超高效液相色谱-串联质谱法测定酱油、醋和饮料中的 4-甲基咪唑 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6 (3): 962-967.
- [17] Goscinnny S, Hanot V, Trabelsi H, et al. Determination of caramel colorants' by-products in liquid foods by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. Food Additives and Contaminants: Part A, 2014, 31 (10): 1652-1660.
- [18] XU X B, LIU D B, YU S J, et al. Separation and determination of 4-methylimidazole, 2-methylimidazole and 5-hydroxymethyl-furfural in beverages by amino trap column coupled with pulsed amperometric detection [J]. Food Chemistry, 2015, 169: 224-229.

实验技术与方法

超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的黄曲霉毒素 M₁

刘颖¹, 周鑫², 刘晓光³, 熊亚南¹

(1. 华北理工大学基础医学院 河北省慢性疾病重点实验室 唐山市慢性病临床基础研究重点实验室, 河北唐山 063000; 2. 唐山市畜牧水产品质量监测中心, 河北唐山 063000; 3. 华北理工大学生命科学院, 河北唐山 063000)

摘要:目的 建立超高效液相色谱-串联质谱测定牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的方法。方法 采用 Acquityuplc BEH C₁₈液相色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm), 梯度洗脱, 多反应监测 (MRM)。通过黄曲霉毒素 M₁ 与免疫亲和柱中抗体结合, 确定了从牛奶中提取黄曲霉毒素 M₁ 的处理条件并优化了质谱的测定参数。结果 黄曲霉毒素 M₁ 在 0.1 ~ 10.0 ng/ml 的范围内线性良好, 其回归标准曲线方程的相关系数为 0.997 8, 回收率 94.8% ~ 98.2%, RSD 为 2.34% ~ 3.87%, 方法定量限为 0.005 μg/kg。结论 提供了一种有效检测牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的方法。

关键词:牛奶; 黄曲霉毒素 M₁; 超高效液相色谱-串联质谱; 食品污染物; 检测方法

中图分类号: R155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456 (2016) 05-0613-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.05.012

Determination of aflatoxin M₁ in milk by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Ying, ZHOU Xin, LIU Xiao-guang, XIONG Ya-nan

(Hebei Province Key Laboratory on Chronic Diseases, Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, College of Basic Medicine, North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063000, China)

Abstract: Objective An ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method was developed

收稿日期: 2016-02-18

作者简介: 刘颖 女 主管药师 研究方向为食品安全与质量控制 E-mail: 48245531@qq.com

通信作者: 熊亚南 女 副教授 研究方向为食品安全与质量控制 E-mail: 492377@qq.com

and validated for the analysis of aflatoxin M₁ in milk. **Methods** Samples were extracted and cleaned by SPE cartridge. Extracts were analyzed for aflatoxin M₁ by LC-MS/MS in a single injection with positive electrospray ionization (ESI) mode for aflatoxin M₁. **Results** Recoveries were 94.8%-98.2% in the range of 0.1-10.0 ng/ml with RSDs less than 3.87%. The limit of quantification was 0.005 μg/kg. **Conclusion** This essay provides an effective way to detect aflatoxin M₁ in milk.

Key words: Milk; Aflatoxin M₁; ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; food contaminant; detection method

黄曲霉毒素是一组化学结构类似的二呋喃香豆素的衍生化合物,可由曲霉菌黄曲霉、寄生曲霉等产生^[1]。黄曲霉毒素的主要形式包括 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 等,其中黄曲霉毒素 M₁ (AFM₁) 是黄曲霉毒素 B₁ 在动物体内经过羟化生成的代谢产物^[2-3],主要存在于动物的乳、肾脏、肝脏、蛋、肉和尿中,其中以乳中最为常见。黄曲霉毒素 M₁ 是一种强致癌性物质,毒性在黄曲霉毒素家族中仅次于黄曲霉毒素 B₁,急性毒性与黄曲霉毒素 B₁ 类似,能致癌、致畸、致诱变^[4-6],且对高温稳定,牛奶经巴氏杀菌后,黄曲霉毒素几乎不被破坏^[7-8]。

另外,当婴幼儿乳品及母乳中含有黄曲霉毒素 M₁ 时,对婴幼儿健康会造成很大影响,可以造成发育迟缓、肾功能降低、肝细胞癌早发甚至可能导致急性中毒死亡^[7,9]。近年来,世界各国纷纷制定了乳与乳制品中 AFM₁ 的限量标准。包括中国、美国和日本在内的许多国家规定奶及奶制品中 AFM₁ 的含量不得超过 0.5 μg/kg^[10],其中,中国规定婴幼儿乳品及代乳品中 AFM₁ 不得检出。欧盟制定的标准更为严格,为 0.05 μg/kg。

目前 AFM₁ 的检测方法有酶联免疫吸附法^[11]、薄层色谱法^[12]、高效液相色谱法^[13] 以及高效液相色谱-串联质谱法^[14] 等。其中高效液相色谱-串联质谱法可对 AFM₁ 的检测进行准确的定性和定量分析,成为近年来真菌毒素检测的主要方向。本试验以免疫亲和柱净化牛奶样品,超高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中 AFM₁,提供了一种高灵敏度和准确性的测定方法。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂

Xevo TQS 液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters)、二十孔位固相萃取装置(美国 Varian)、AFM₁ 免疫亲和柱(1 ml,德国 R-Biopharm)。

AFM₁ 标准品(A6412-1MG,美国 Sigma),乙腈、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾、盐酸均为国产分析纯,试验用水为超纯水(电阻率为 18.25 MΩ·cm⁻¹)。磷酸盐缓冲液(PBS)配制:称取磷酸二氢钾 0.27 g,磷酸氢二钠 1.42 g,氯化钠 8 g,氯化钾 0.2 g,加超纯水 800 ml 充分搅拌溶解,然后

加入浓盐酸调 pH 至 7.4,最后定容到 1 L。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液配制

标准工作液:称取 AFM₁ 适量,乙腈定容,配制成 100 ng/ml 的工作液,4 ℃ 保存。

标准溶液:准确吸取 100 ng/ml 标准工作液,用乙腈定容,配制成 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/ml 的标准系列浓度梯度,上机备用。

1.2.2 样品预处理

准确量取 30 ml 牛奶样品,至 50 ml 离心管中,水浴振荡使其温度加热到 35 ~ 37 ℃,8 000 r/min 离心 10 min。将 50 ml 一次性注射器筒与 AFM₁ 免疫亲和柱顶部串联,再将亲和柱与固相萃取装置连接。取离心后的样液 25 ml 过 AFM₁ 免疫亲和柱,流速 2 ml/min,稳定的慢速过柱能够使 AFM₁ 被免疫亲和柱的抗体所亲和。样品过柱后,用 20 ml PBS 淋洗 AFM₁ 免疫亲和柱,过后抽干小柱。先后用 1.5 ml 的乙腈和 1.0 ml 水洗脱免疫亲和柱,收集洗脱液。过 0.22 μm 滤膜,待上机。

1.2.3 仪器条件

色谱条件:Acquityuplc BEH C₁₈ 液相色谱柱(50 mm × 2.1 mm,1.7 μm);流速 0.3 ml/min;柱温 40 ℃;进样量 5 μl;流动相:A 为 0.1% 甲酸水溶液,B 为甲醇,梯度洗脱,洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

t/min	0.1% 甲酸水溶液/%	甲醇/%
0.0	90	10
0.5	90	10
1.0	10	90
1.5	10	90
1.6	90	10
2.0	90	10

质谱条件:电喷雾离子源(ESI+);质谱扫描方式为多反应监测(MRM);电喷雾电压 3.2 kV;离子源温度 150 ℃,雾化温度 400 ℃,碰撞气为高纯氩气;碰撞气流速 0.16 ml/min。AFM₁ 检测离子对、锥孔电压(cone)、碰撞能量(CE)见表 2。

2 结果与分析

2.1 样品预处理条件优化

表2 AFM₁的特种离子对、锥孔电压、碰撞能量Table 2 Precursor ion, product ion, cone, CE of aflatoxin M₁

分析物	母离子 /(m/z)	子离子 /(m/z)	锥孔电压 /V	碰撞能量 /eV
AFM ₁	329.0	273.0*	30	30
		259.0	30	30

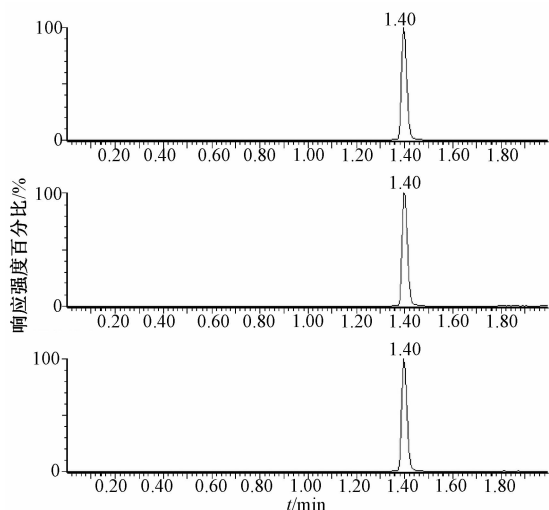
注: * 为定量离子

先后用 1.5 ml 甲醇和 1.0 ml 水作为洗脱剂对驻留在免疫亲和柱上的 AFM₁ 进行洗脱定容,洗脱后直接过膜上机。蔡增轩等^[1]用甲醇作为洗脱液,55 °C 下氮气吹干,之后用 1 ml 20% 乙腈进行复溶。本方法省去氮吹步骤,既节约了预处理时间,又减少了试验消耗。

2.2 色谱质谱条件优化

试验中比较了流动相中有机相与水相的梯度洗脱的比例对 AFM₁ 的出峰影响。当使用 0.1% 甲酸水溶液和甲醇作为流动相,进行梯度洗脱,各化合物能够得到较好的色谱峰形,也取得了比较好的出峰时间,降低了整体试验的时间成本。

根据 AFM₁ 的理化性质及其母离子,选择信号强度大的两个子离子碎片作为定量离子和定性离子,并以此为基础,对质谱参数进行优化,以多反应监测为检测方式,使目标化合物的离子化达到最佳的水平。AFM₁ 的色谱图见图 2。

图2 AFM₁的色谱图Figure 2 Chromatogram of aflatoxin M₁

2.3 线性范围和检出限

对配制好的标准品的梯度进行上机分析,以标准品浓度为横坐标,标准品色谱峰面积为纵坐标,进行线性回归分析,AFM₁ 在 0.1 ~ 10.0 ng/ml 的浓度范围内呈现出良好的线性关系,其线性方程和相关系数为 $y = 14684.4x - 614.095$ ($r = 0.9978$)。

在空白样品中添加标准工作液,通过计算得到本试验方法检出限 (LOD, $S/N > 3$) 为 0.001 μg/kg,

定量限 (LOQ, $S/N > 10$) 为 0.005 μg/kg。

2.4 基质效应

用超高效液相色谱-串联质谱对样品进行检测时,由于 ESI 离子源固有的特性和基质效应的影响,目标化合物会受到电离增强或抑制。采用溶剂和基质配制标准系列浓度分别上机检测,拟合出标准

曲线,并对斜率进行归一化处理 $A = \frac{slope_m}{slope_s}$, $slope_m$

为基质标准曲线, $slope_s$ 为溶剂标准曲线,当 $A > 1$ 时,表明目标化合物离子化程度增强;当 $A < 1$ 时,表明目标化合物离子化受到抑制。本试验中溶剂标准方程为 $y = 14684.4x - 614.095$,基质标准方程为 $y = 13798.4x + 190.024$, $A = 0.94$,分析得出 AFM₁ 在 ESI 离子源电离时受到较小的抑制效应,预处理净化效果良好,故而采用溶剂标准曲线来定量未知牛奶样品中 AFM₁ 的含量,一方面简化试验操作步骤,另一方面降低试验成本。

2.5 回收率和精密度

称取空白样品,对其进行标准品添加,选择 0.05、0.2、1.0 μg/kg 三种不同浓度,使用优化后的提取和上机条件进行数据处理,计算回收率和精密度,回收率在 94.8% ~ 98.2% 之间, RSD 在 2.34% ~ 3.87% 范围内,结果见表 3。

表3 方法加标回收与精密度试验 ($n = 6, \%$)

Table 3 Recoveries and precision of spiked samples

分析物	添加量 0.05 μg/kg		添加量 0.2 μg/kg		添加量 1.0 μg/kg	
	回收率	RSD	回收率	RSD	回收率	RSD
AFM ₁	94.8	3.87	96.8	2.34	98.2	3.21

3 小结

本研究建立了牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的超高效液相色谱-串联质谱的测定方法,本方法稳定性好,回收率高,检测限低,抗干扰能力强,适于测定牛奶中不同浓度的黄曲霉毒素 M₁,且能够在一定程度上降低检测成本,节省试验时间。

参考文献

- [1] 蔡增轩,胡玲玲,王军淋,等.超高效液相色谱检测奶及奶制品中的 M 族黄曲霉毒素[J].食品安全质量检测学报,2014,5(3):801-807.
- [2] Malka B, Shmulik F, Joshua M, et al. Carry-over of aflatoxin B₁ to aflatoxin M₁ in high yielding Israeli cows in mid-and late-lactation [J]. Toxins, 2013, 5(1): 173-183.
- [3] Francis A O, Pauline E J, Yi J, et al. Aflatoxin B₁ albumin adducts in plasma and aflatoxin M₁ in urine are associated with plasma concentrations of vitamins A and E [J]. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 2010, 80(6): 355-368.
- [4] Dvorackova I. Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma

- [J]. *BMJ*, 1976, 1(6011): 691.
- [5] Carlson M A, Bargeron C B, Benson R C. An automated, handheld biosensor for aflatoxin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2000, 14(11): 841-848.
- [6] Hasan A, Abdurrahman A, Sahar S. Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara [J]. *Food Control*, 2005, 16(3): 263-266.
- [7] 黄亚伟, 魏光, 王若兰, 等. 乳品中黄曲霉毒素 M₁ 检测方法研究进展 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(3): 770-775.
- [8] Abdolazim B, Zahra N K, Ziyaaddin A, et al. Determination of aflatoxin M₁ levels in produced pasteurized milk in Ahvaz City by using HPLC [J]. *Jundishapur J Nat Pharm Prod*, 2012, 7(2): 80-84.
- [9] Ghiasian S A, Maghsood A H. Infants exposure to aflatoxin M₁ from mother's breast milk in Iran [J]. *Iranian J Publ Health*, 2012, 41(3): 119-126.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB 2761—2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [11] 胡晓飞, 职爱民, 刘庆堂, 等. 真菌毒素 ELISA 检测方法新进展 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(8): 100-103.
- [12] LIN L M, ZHANG J, WANG P. Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatography methods [J]. *J Chromatogr A*, 1998(815): 3.
- [13] 李佐卿, 章再婷, 谢东华, 等. 免疫亲和柱高效液相色谱法快速测定牛奶和奶粉中黄曲霉毒素 M₁、B₁、B₂、G₁、G₂ [J]. *理化检验(化学分册)*, 2005, 41(6): 406-408.
- [14] 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.

实验技术与方法

同位素稀释-超高效液相色谱-串联质谱法测定茶叶中的高氯酸盐

李雨哲, 杨杰, 王雨昕, 陈达炜, 周爽, 方从容, 赵云峰

(国家食品安全风险评估中心, 北京 100021)

摘要:目的 建立茶叶中高氯酸盐的超高效液相色谱-串联质谱测定方法。方法 茶叶中高氯酸盐用 0.2% 乙酸提取, 经石墨炭黑柱净化, 优选 Synergi™ MAX-RP 柱(4.6 mm × 250 mm, 4 μm) 为分析柱, 以超高效液相色谱-串联质谱法测定, 内标法定量。结果 高氯酸盐在 0.25 ~ 50.0 μg/L 范围内线性良好, 回归方程 $y = 1.569x + 0.0268$, 相关系数 $r^2 = 0.9996$ 。加标浓度为 0.05 ~ 0.50 mg/kg 时, 回收率 95.6% ~ 120.0%, 相对标准偏差(RSD) 1.9% ~ 17.5%。检出限为 2.5 μg/kg。结论 本方法前处理简单、准确、灵敏度高, 适用于茶叶中高氯酸盐的测定。

关键词: 同位素稀释; 超高效液相色谱-串联质谱; 高氯酸盐; 茶叶; 食品污染物; 检测方法

中图分类号: R155 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2016)05-0616-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2016.05.013

Detection of perchlorate in tea by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and isotope dilution method

LI Yu-zhe, YANG Jie, WANG Yu-xin, CHEN Da-wei, ZHOU Shuang, FANG Cong-rong, ZHAO Yun-feng

(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of perchlorate in tea by ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Methods** The perchlorate residue in tea was extracted with 0.2% acetic acid, and the supernatant was cleaned up with Carb SPE, the detection was performed by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with internal standard method for quantitative. **Results** The calibration curve was linear in the concentration range of 0.25-50 μg/L ($r^2 = 0.9996$), the recovery was in the range of 95.6%-120.0%, the relative standard deviation (RSD) was in the range of 1.9%-17.5%, and the limit of detection of perchlorate was 2.5 μg/kg. **Conclusion** The method is suitable for the determination of perchlorate in tea with more simplicity, accuracy and high sensitivity.

收稿日期: 2016-04-29

基金项目: 新型含卤污染物的环境暴露组与健康效应的毒理学机制 (21537001)

作者简介: 李雨哲 女 助理研究员 研究方向为食品安全标准 E-mail: liyuzhe@cfsa.net.cn

通信作者: 赵云峰 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail: zhaoyf@cfsa.net.cn