

固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测婴幼儿奶粉中的7种链格孢霉毒素

邢家溧¹, 张子庚², 郑睿行^{1*}, 徐晓蓉¹, 毛玲燕¹, 承海¹, 沈坚¹

(1. 宁波市产品质量检验研究院(宁波市纤维检验所), 浙江 宁波 315048;

2. 中国计量大学生命科学学院, 浙江 杭州 310018)

摘要: 婴幼儿奶粉配料中的植物油易受到链格孢霉菌污染, 因而链格孢霉毒素(ATs)成为该类食品的重点检测对象。该研究建立了超高效液相色谱-串联质谱法快速检测婴幼儿奶粉中链格孢酚、链格孢单甲醚、交链孢霉烯、细交链孢菌酮酸、腾毒素、交链孢毒素I、细格菌素7种ATs的方法。通过参数优化确定最佳的质谱与色谱条件, 选取BEH-C₁₈色谱柱, 以0.1%甲酸水溶液-乙腈为流动相, 然后分别对提取条件(提取剂比例及提取方式)以及固相萃取条件(萃取小柱、洗脱液种类及体积、上样液pH)进行优化, 确定使用乙腈-水(84:16, v/v)为前两次提取剂, 乙腈-甲醇-水(45:10:45, v/v/v)为第三次提取剂, 水平摇匀30 min为最佳提取方式, 以pH 5.5的一级水复溶上样, 经HLB小柱净化, 10 mL 甲醇洗脱, 不浓缩直接过0.22 μm滤膜后直接进行色谱分离, 色谱分离后以电喷雾正负离子交替多反应监测模式分析。在最佳优化分析条件下, 7种ATs在0.5~200 μg/L范围内线性关系良好, 判定系数(R²)>0.990 3, 检出限为0.15~0.64 μg/kg, 定量限为0.54~2.24 μg/kg。在3个不同加标水平下, 7种ATs的平均回收率为79.1%~114.3%, RSD≤8.87%。将该方法用于60份实际婴幼儿奶粉样品的测定分析, 结果显示一段奶粉和二段奶粉中未发现毒素; 三段奶粉中只有1份样品被检出, 检出毒素为腾毒素, 其含量为4.97 μg/kg。该方法准确、快速、简便、灵敏度高, 重复性与稳定性良好, 可用于婴幼儿奶粉7种ATs的实际测定。

关键词: 固相萃取; 超高效液相色谱-串联质谱法; 链格孢霉毒素; 婴幼儿奶粉

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2022)02-0156-09

Determination of seven *Alternaria* toxins in infant milk powder by solid phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

XING Jiali¹, ZHANG Zigeng², ZHENG Ruihang^{1*}, XU Xiaorong¹,

MAO Lingyan¹, CHENG Hai¹, SHEN Jian¹

(1. Ningbo Academy of Product and Food Quality Inspection (Ningbo Fibre Inspection Institute), Ningbo 315048, China; 2. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: *Alternaria* toxin is a general term for a class of toxic metabolites produced by *Alternaria*, which widely exists in soil, grain, vegetables, and fruits. This mycotoxin is extremely harmful to human health. It is well known that infant milk powder containing vegetable oil is easily contaminated by *Alternaria alternata*. *Alternaria* toxins have thus become an increasingly important focus in food. Rapid and accurate detection of *Alternaria* toxin residues in food is of

收稿日期: 2021-05-31

* 通讯联系人. E-mail: 875266016@qq.com.

基金项目: 国家市场监督管理总局科技计划项目(2019MK080); 浙江省基础公益研究计划项目(LGC20C200013); 宁波市自然科学基金项目(202003N4196, 2019A610438, 2019A610437); 宁波市泛3315创新团队项目(2018B-18-C); 宁波市高新精英创新团队项目(甬高科[2018]63号)。

Foundation item: Science and Technology Plan Program of State Administration for Market Regulation (No. 2019MK080); Basic Research Plan Program of Zhejiang (No. LGC20C200013); Natural Science Foundation of Ningbo (Nos. 202003N4196, 2019A610438, 2019A610437); Project of Fan-3315 Innovation Team of Ningbo (No. 2018B-18-C); Project of Ningbo High-Tech Elite Innovation Team (Yonggaoke [2018] No. 63).

great significance for food safety. This requires pretreatment to purify the target toxins and maximize the accuracy and precision of the analysis. In this study, a rapid method based on online solid phase extraction/purification and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (online SPE UPLC MS/MS) was established to detect seven *Alternaria* toxins (alternariol monomethyl ether, altenuene, tenuazonic acid, alternariol, tentoxin, alternusin, and altertoxin I) in infant milk powder. First, the mass spectrometry and chromatographic conditions were optimized. A BEH-C₁₈ column (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) was selected, with 0.1% formic acid aqueous solution-acetonitrile as the mobile phase. Then, the extraction conditions (extraction agent ratio and extraction method) and the solid phase extraction process (extraction column, type and volume of the eluent, and pH of the sample loading solution) were optimized. One gram of milk powder (accurate to 0.01 g) was weighed into a 50 mL tip and bottom plug centrifuge tube. Acetonitrile-water (84:16, v/v) was set as the extraction agent for the first two cycles, and acetonitrile-methanol-water (45:10:45, v/v/v) was set as the third extraction agent. Horizontal shaking for 30 min was the best extraction method. The sample was centrifuged at 9 500 r/min for 10 min, and the supernatant extracted many times was mixed and blown with nitrogen at 40 °C. The sample was redissolved in first-order water (pH 5.5), purified on an HLB column, and successively activated with 6 mL methanol and 6 mL first-order water (pH 5.5). The solution was then loaded onto the column, and the SPE was adjusted to ensure that the water sample flowed through the column at the rate of 1 mL/min so that the column did not dry up during the analysis process before the end of sample loading. The column was rinsed with 12 mL of first-order water. After leaching, the negative pressure filtration was continued for approximately 5 min, followed by elution with 10 mL methanol, and the eluted solution was directly tested after passing through a 0.22 μm filter membrane, without concentration. The analytes were determined by electrospray ionization (ESI) with alternating positive and negative ions. Under the optimal analysis conditions, the linear relationships of the seven *Alternaria* toxins were good in the mass concentration range of 0.5–200 μg/L, with coefficients of determination (R^2) > 0.990 3. The limits of detection and limits of quantification were 0.15–0.64 μg/kg and 0.54–2.24 μg/kg, respectively. The recoveries of the seven *Alternaria* toxins were 79.1%–114.3%, and the relative standard deviations were less than 8.87% at different concentrations. The method was applied to the determination and analysis of 60 samples of infant milk powder, and the results showed that no toxin was found in stage one or stage two of the milk powder. Only one sample of the stage three of milk powder was detected, which was tentoxin, and the content was 4.97 μg/kg. The developed method is accurate, rapid, simple, sensitive, repeatable, and stable. It can be used for the practical determination of seven *Alternaria* toxins in infant milk powder.

Key words: solid phase extraction (SPE); ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS); *Alternaria* toxins (ATs); infant milk powder

引用本文:邢家溧,张子庚,郑睿行,徐晓蓉,毛玲燕,承海,沈坚. 固相萃取-超高效液相色谱-串联质谱法检测婴幼儿奶粉中的7种链格孢霉毒素. 色谱,2022,40(2):156–164.

XING Jiali, ZHANG Zigeng, ZHENG Ruihang, XU Xiaorong, MAO Lingyan, CHENG Hai, SHEN Jian. Determination of seven *Alternaria* toxins in infant milk powder by solid phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chinese Journal of Chromatography, 2022, 40(2): 156–164.

链格孢霉菌广泛存在于泥土和各种农作物里,是污染谷物、油籽与果蔬的一种极为常见的条件致病菌和腐生丝状真菌^[1]。由于该菌能在潮湿、低温的环境下生长繁殖,环境适应能力较强,可以产生大量的次级代谢产物,这类代谢产物统称链格孢毒素(*Alternaria* toxins, ATs),因此即使是冷藏运输的农产品也可能受到 ATs 的污染^[2]。现今已有诸多研究表明 ATs 对人与动物均具有急慢性毒性以及三致效应(致癌、致畸、致突变)等风险存在,对人畜的健康造成了损害。研究表明约有 70 余种 ATs 具有明显毒性,欧洲食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)在 2011 年对 ATs 的结构进行了细致的描述^[3],此外在 Georg 等^[4]的研究中可知,链格孢毒素由于结构的不同,大体上可分为 6 种不同的类型:(1)二苯并吡喃酮类及其衍生物,主要毒素包括交链孢烯(altenuene, ALT)、交链孢酚单甲醚(alternariol monomethyl ether, AME)和链格孢酚(alternariol, AOH);(2)四氨基酸衍生物类,代表毒素为细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid, TeA)和异细交链孢菌酮酸(iso-TeA);(3)二萜苯醌类及其衍生物,包括交链孢毒素 I(altertoxin I, ATX-I)、ATX-II、ATX-III 等一类衍生物毒素,是少数链格孢霉的代谢物;(4)丙三羧酸酯类化合物,是一系列长链氨基多元醇,即互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*, AAL)毒素,又可分为 AAL-TA、AAL-TB、AAL-TC、AAL-TD 和 AAL-TE 几大类,其中 AAL-TA 的毒性最强;(5)包括腾毒素(tentoxin, Ten)在内的环形四肽结构;(6)其他结构:细格菌素(altenusin, ALS)等。近年来,与 ATs 相关的食品安全事件时常发生^[5],婴幼儿是受全社会关注的一种特殊群体,而婴幼儿奶粉是有益于婴幼儿生长发育的首选食品。植物油在婴幼儿奶粉中占比很高,又因其易被链格孢霉菌污染,因此对婴幼儿的健康产生了威胁^[6]。目前已报道的关于 ATs 检测的主要基质为柑橘^[7]、番茄^[8]、苹果^[9]、麦芯粉^[10]、啤酒^[11]、豌豆^[12]、向日葵籽^[13]等,且同时检测的 ATs 种类也不超过 6 种,关于婴幼儿奶粉中 ATs 的检测方法相对较少,因此建立婴幼儿奶粉中典型 ATs 的检测方法具有重要的意义。

目前我国有关 ATs 的标准只有 1 项行业标准^[14],并且该标准仅涉及 4 种 ATs,应用范围只限于部分果蔬,尚不涵盖婴幼儿奶粉中 ATs 的检测。现有研究涉及的 ATs 的检测技术主要有薄层色谱

法^[15]、酶联免疫吸附法^[16]、气相色谱(GC)^[17]以及气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)^[18]、液相色谱(LC)^[19]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[20]等。薄层色谱法灵敏度较低,实验操作繁琐且重复性较差;GC 和 GC-MS/MS 经常用于分离和检测易挥发和热稳定的毒素^[21],因为 ATs 相对来说较为稳定且挥发性较差,所以 GC 和 GC-MS/MS 在 ATs 检测方面的应用受到了限制;LC-MS/MS 适用性非常广泛,因为其同时具备质谱的高灵敏度与 LC 的高分离性,能够对 ATs 准确地定量定性,可以补充 LC 技术的不足^[22]。考虑到奶粉基质组成十分复杂,不利于提取,所以选取固相萃取前处理技术净化 ATs,可以更有效地将干扰组分和分析物分离^[23]。基于此,本研究拟开发一种固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱技术(UPLC-MS/MS)同时准确检测婴幼儿奶粉中 7 种 ATs 的分析方法。

1 实验部分

1.1 材料与试剂

从国内各大企业和当地市场收集了 60 份婴幼儿奶粉样本,其中一段(0~6 月龄)、二段(6~12 月龄)、三段(12~36 月龄)各 20 份,密封,-20℃保存使用。

ATs 标准品:AOH、AME、ALT、Ten、TeA、ALS、ATX-I,购自上海安谱实验科技股份有限公司,纯度均大于 98%;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯,购自德国 Merck 公司。

1.2 仪器与设备

ACQUITY UPLC I-CLASS 超高效液相色谱-Waters XeVO TQ-XS 串联质谱仪,配有电喷雾离子源(美国 Waters 公司);TGL-20M 高速台式冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);Vortex 3 自动漩涡混合器(德国 IKA 公司);Milli-Q 型超纯水机,电阻率为 18.2 MΩ·cm(美国 Millipore 公司);KS-300EI 超声波清洗机(宁波科生设备有限公司);SW22 振荡水浴锅(德国 Julabo 公司);AH-30 全自动均质器(睿科仪器有限公司);0.22 μm 有机滤膜(北京捷盛依科科技有限公司);ME204E 电子天平(实际分度值为 0.000 1 g)和 FE28 pH 酸度计(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);N-EVAP112 氮吹仪(上海庆开实验设备有限公司);HLB 小柱 6 mL(上海安谱实验科技股份有限公司)。

1.3 UPLC-MS/MS 条件

色谱条件:BEH C₁₈ 色谱柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),柱温为40℃;流动相体系为(A)0.1% (v/v)甲酸水溶液和(B)乙腈;梯度洗脱程序:0~5.0 min, 10% B~95% B; 5.0~7.0 min, 95% B; 7.0~7.5 min, 95%~10% B; 7.5~10.0 min, 10% B。流速:0.4 mL/min;进样量:3 μL。

质谱条件:采用多反应监测(MRM)模式对7种 ATs 进行分析;数据采集和处理采用 MassLynx™ 4.2 软件完成;离子源参数为:正负离子开关扫描;毛细管电压1.08 kV;射频透镜1(RF lens 1)和 RF lens 2 的电压均为15.0 V;离子源温度150℃;脱溶剂温度600℃;脱溶剂气体流量1000 L/h;锥孔反吹气流量150 L/h,其他质谱参数见表1。

1.4 标准溶液的制备

标准储备液:分别准确称量 TeA、AME、AOH、Ten、ALT、ALS 和 ATX- I 标准品 0.001 g 溶于 10 mL 乙腈中,配制成 100 mg/L 的标准混合液,取 100 mg/L 的标准混合液 100 μL 用乙腈溶解并定容至 10 mL,得到 1 mg/L 的混合标准储备液,密封后置于-20℃保存。

标准工作液:用乙腈-水(1:1, v/v)溶液将标准储备液逐级稀释配制成 0.5、1、2、5、10、20、50、100、200 μg/L 的 7 种 ATs 的混合标准溶液。

基质标准工作液:用空白基质溶液逐级稀释 1 mg/L 的混合标准储备液,制备成 0.5、1、2、5、10、20、50、100 与 200 μg/L 的基质标准工作液。

1.5 链格孢霉毒素的提取

分别称取奶粉 1 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 尖底具塞离心管内,加入标准储备液 50 μL,配制成待测奶粉样品。加入 15 mL 乙腈-水(84:16, v/v)溶液,加入 0.3 mL 甲酸,水平摇匀 30 min,在 9500 r/min 下离心 10 min,取上清液,沉淀重复提取 3 次。最后一次提取时加入 15 mL 乙腈-甲醇-水(45:10:45, v/v/v)和 0.3 mL 甲酸,水平摇匀 30 min,9500 r/min 下离心 10 min,多次提取的上清液混合后于 40℃氮吹,之后重悬于 12 mL 一级水(pH 5.5)中。

1.6 链格孢霉毒素的富集

用 HLB 固相萃取小柱萃取,依次用 6 mL 甲醇和 6 mL 一级水(pH 5.5)活化,之后将待测液加入小柱中,调整固相萃取仪,确保水样以 1 mL/min 的速度流过柱子,在上样结束之前要确保整个过程小柱都不能干,用 12 mL 一级水淋洗小柱,淋洗结束后继续负压抽滤 5 min 左右,最后用 10 mL 甲醇洗脱,振荡混匀 1 min,取 1 mL 混匀液过 0.22 μm 有机滤膜,待测。

2 结果与讨论

2.1 仪器条件的优化

2.1.1 色谱条件的优化

在实际测定过程中,色谱柱的选择对目标物的分离、识别与检测十分重要,因为 BEH C₁₈ 具有较低的次级相互作用,pH 承受能力强,柱效更高,峰形更好^[24],因此采用 BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm)分离 7 种 ATs。

表 1 7 种链格孢霉毒素的质谱测定参数

Table 1 Mass spectrometric determination parameters of the seven *Alternaria* toxins (ATs)

Toxin	Abbreviation	Ionization mode	Parent ion (<i>m/z</i>)	Daughter ion (<i>m/z</i>)	Dwell time/s	Cone voltage/V	Collision energy/eV
Tentoxin	Ten	ESI ⁺	415.4	199.2*	0.012	25	13
				171.2			18
Alternariol monomethyl ether	AME	ESI ⁺	273.2	258.2	0.012	25	25
				128.1*			40
Alternariol	AOH	ESI ⁺	259.2	213.2	0.012	25	25
				185.1*			30
Tenuazonic acid	TeA	ESI ⁺	198.2	125.1*	0.012	25	15
				153.1			12
Altenuene	ALT	ESI ⁺	293.2	257.2*	0.012	25	12
				275.4			8
Altenuisin	ALS	ESI ⁺	291.2	255.2	0.012	25	18
				199.2*			30
Altertoxin I	ATX- I	ESI ⁻	351.3	315.2*	0.012	25	8
				333.3			10

* Quantitative ion.

水-甲醇和水-乙腈都是 UPLC-MS/MS 常用的流动相体系^[25],而且甲酸和甲酸铵的引入一般可以增强靶向响应并改善靶峰^[26]。在我们之前的研究中,甲酸、乙腈被用作萃取剂,为了保持一致性,本实验采用了 3 种流动相体系:水-乙腈、0.1% 甲酸水溶液-乙腈、0.1% 甲酸水溶液(含 0.01 mol/L 甲酸铵)-乙腈进行了比较。结果表明,甲酸的引入增强了 7 种靶向 ATs 的反应;而甲酸铵的引入使靶向 TeA 的反应减弱,并出现峰形拖尾,因此,选择 0.1% 甲酸水溶液-乙腈作为流动相体系。

由于 7 种 ATs 极性的不同,而且极性相差较大,如 ALT 的极性特别强,AME 的极性相对很弱^[20],为了兼顾 7 种毒素可以同时出现良好的峰形,流动相需要有较大的梯度变化,本实验通过不断调整,选取最佳的洗脱顺序,可以同时获得不同 ATs 的灵敏度和稳定性。因为 ESI 扫描检测需要流动相流速较低,所以设置流速为 0.4 mL/min。7 种 ATs 几乎都在 40 °C 左右稳定^[27],不会发生反应,因此,最终选取柱温为 40 °C。

结果显示,优化条件下各种 ATs 分离效果明显,峰形较好(见图 1)。

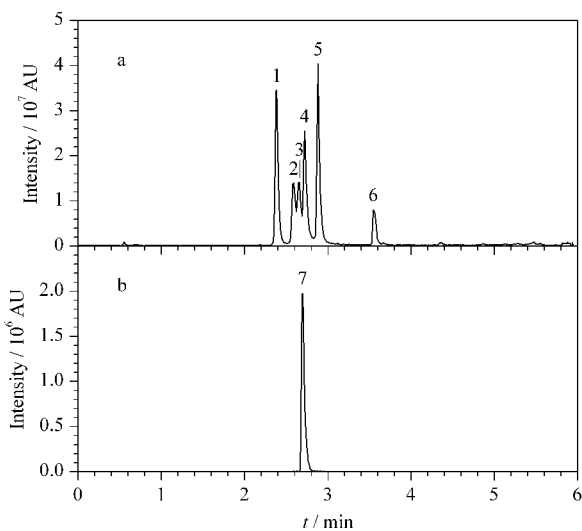


图 1 优化条件下(a)6种链格孢霉毒素的正离子图和(b)ATX-I的负离子图

Fig. 1 (a) Positive ion chromatogram of six ATs and (b) negative ion chromatogram of ATX-I under the optimized conditions

1. ALT; 2. ALS; 3. TeA; 4. AOH; 5. Ten; 6. AME; 7. ATX-I.

2.1.2 质谱条件的优化

因为多反应监测模式可以相当大程度地排除外界干扰,提高信噪比,有助于对目标化合物的定量分析,所以本研究选取多反应监测扫描,并对 7 种 ATs

在 ESI⁺ 和 ESI⁻ 模式扫描时进行优化,结果发现 ATX-I 在 ESI⁻ 模式扫描时响应值较高,其他 ATs 在 ESI⁺ 模式扫描时响应值高,因此选取正负离子交替扫描。锥孔电压、碰撞电压、离子源温度、脱溶剂气体温度、碰撞气体流量和每种毒素的定性、定量离子通过流动注射泵连续进样进行测定,优化质谱条件,达到每种靶物质的最佳电离效率。分别用 ESI⁺ 和 ESI⁻ 模式对毒素进行扫描,寻找响应值较高的母体离子。进一步改变碰撞电压,进行二次质谱扫描,寻找信号强、稳定性好的子离子。

2.2 提取溶剂比例的优化

由于婴幼儿奶粉结构复杂,相对来说难以处理,多次提取有利于增加 ATs 的回收率^[28]。而且 TeA 的酸性和极性较强,因此将提取剂酸化有利于提高 TeA 的提取率^[29,30]。本研究根据相关文献^[31]报道考察了前两次提取剂,即乙腈-水(100:0, 50:50, 84:16, v/v)溶液以及第三次提取中乙腈-甲醇-水(50:25:25, 45:10:45, v/v/v)溶液(加入甲醇是因为其有利于苯醌类 ATs 的提取^[32])。实验结果如图 2a 所示,当采用乙腈-水(50:50, v/v)时,提取液过于混浊,离心不成形,回收率过低;采用纯乙腈提取

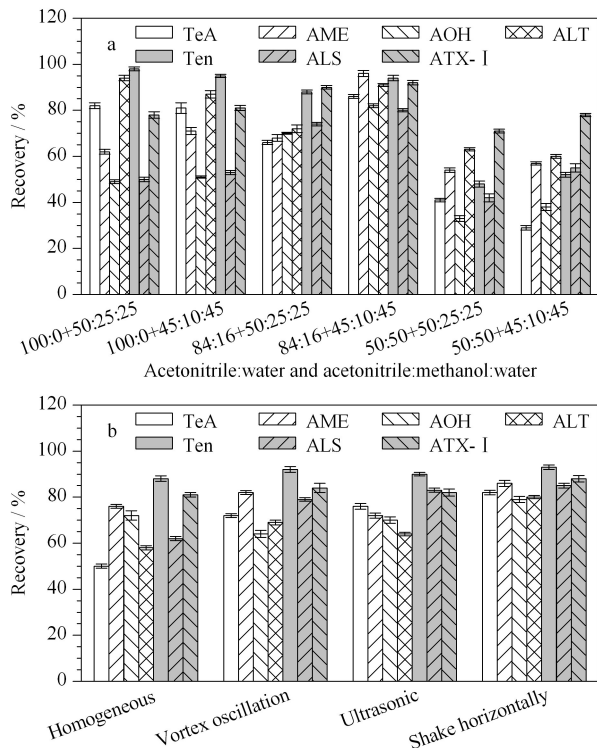


图 2 (a) 提取剂比例和(b)提取方式对婴幼儿奶粉中 7 种链格孢霉毒素回收率的影响 ($n=5$)

Fig. 2 Effects of (a) extractant ratio and (b) extraction method on the recoveries of the seven ATs in infant milk powder ($n=5$)

时, AOH 和 ALS 的回收率相对较低, 两种毒素的回收率仅在 50% 左右, 由此可知, 水的体积比例不可过高或过低, 适量水的加入会提高萃取效果; 当采用乙腈-水(84:16, v/v)+乙腈-甲醇-水(45:10:45, v/v)时, 提取效果更好, 回收率为 80.2%~96.1%, 可以看出甲醇比例高出一定范围可能会影响 ATs 的回收。因此, 选取乙腈-水(84:16, v/v)+乙腈-甲醇-水(45:10:45, v/v)进行提取。

2.3 提取方式的优化

分别比较了均质(12 000 r/min, 5 min)、涡旋振荡(300 r/min, 30 min)、超声波(40 °C, 300 W, 30 min)和水平摇匀(40 °C, 30 min)4种提取方式对7种 ATs 回收率的影响。如图 2b 所示, 使用均质提取时, TeA 的回收率过低, 仅为 50.4%, 这可能是因为婴幼儿奶粉成糊状, 容易粘在均质器头上, 造成基质损失过大, 进而影响对 ATs 的提取; 涡旋振荡提取时, 回收率在 62.5%~91.2%之间; 超声波提取时, 超声时间短会导致提取 ATs 不充分, 而超声时间长又会导致奶粉样品沉积在离心管底部, 致使提取剂和样品接触不充分, 造成个别毒素回收率较低, 7种毒素的回收率范围为 63.1%~90.6%; 而水平摇匀回收率好于其他3种提取方式, 在 79.1%~93.2%之间。Marina 等^[31]同样采取水平摇匀的方法提取婴幼儿食品中的 ATs, 提取效果较好, 检出限为 0.05~1.25 μg/kg, 加标回收率为 83%~108%。这可能是因为水平摇匀过程中, 基质中的 ATs 不易被破坏。

2.4 固相萃取条件的优化

优化固相萃取条件时, 用标准溶液分别对固相萃取小柱和洗脱液条件进行优化, 最后采用实际的基质样品萃取液进行确证。取一定体积的 ATs 混合标准储备液, 用乙腈稀释成 50 μg/L 的混合标准溶液, 用于对条件的优化; 在确证的基质样品中加入 50 ng 的 ATs 混合标准, 保持一致, 对以下固相萃取条件进行系统优化^[33]。

2.4.1 固相萃取小柱的选择

对比了 HLB 小柱、C₁₈ 小柱和 PSA 小柱的净化效果, 如图 3 所示, PSA 小柱对 TeA 净化效果差, 回收率仅为 43.6%, 推测原因是 PSA 填料可以去除有机酸^[34]; HLB 小柱效果略好于 C₁₈ 小柱, 回收率在 73.1%~92.8%之间, 且 HLB 小柱适用性强, 在上样过程中, 小柱干涸不影响分离效果, 易于操作^[35,36]。因此选取 HLB 小柱进行净化。

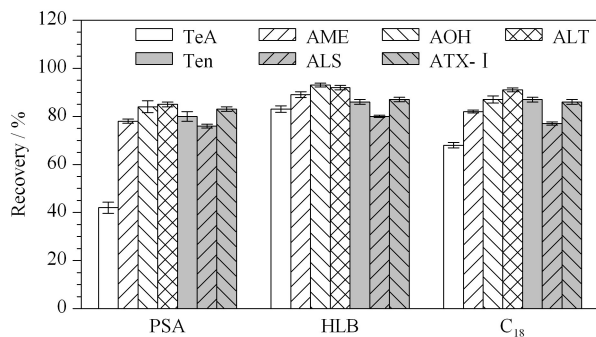


图3 不同固相萃取小柱对7种链格孢霉素回收率的影响(n=5)

Fig. 3 Effect of different SPE columns on the recoveries of the seven ATs (n=5)

2.4.2 洗脱液种类及用量的选择

根据文献^[33]得知, 甲醇、乙腈、甲醇+乙腈洗脱小柱均在文献中被提及。由此本研究分别选用 10 mL 甲醇、10 mL 乙腈、5 mL 甲醇+5 mL 乙腈作为洗脱液(如图 4a), 结果表明, 测定后未发现明显差异。但考虑到使用甲醇时 ATs 的回收率为 76.8%~93.2%, 效果略好于其他两种洗脱液, 所以选取甲醇洗脱 HLB 小柱。考虑到洗脱液的用量可能不足以将 ATs 完全洗脱出来, 本研究分别选取了 6、8、10 和 12 mL 的甲醇洗脱液进行比较, 结果如图 4b 所示, 当甲醇添加量为 6~10 mL 时, 7种 ATs 的回收率均呈现上升趋势; 当甲醇添加量为 10 mL 时, 7种 ATs 的回收率最好, 在 80.6%~92.2%之间; 当甲醇添加量为 12 mL 时, 7种 ATs 的回收率变化不大, 说明甲醇洗脱几乎已达到饱和。综上所述, 选取 10 mL 甲醇为洗脱液。

2.4.3 提取后水的 pH 的优化

因为 ATs 需要酸化提取才会更加完全, 但过度酸化会抑制回收率^[8], 所以本研究在 3 次萃取之后, 针对氮吹复溶的样品水溶液的 pH(4、4.5、5、5.5、6)进行了考察, 如图 5 所示, 结果发现提取效果差异不是特别明显, 但是 pH 5.5 时, ATs 的回收率稳定性相对较高, 所以选取 pH 5.5 的水进行复溶, 回收率为 78.9%~92.3%。同时为了与其保持一致, 利于上样时样品更好的萃取保留, 同样选择 pH 5.5 的水进行活化。

2.4.4 浓缩条件的选择

实验发现, 若洗脱之后在 40 °C 氮吹后再次使用 1 mL 甲醇复溶, 如图 6 所示, AOH、AME 回收率过低, 仅为 20% 左右, 可能这 2 种毒素在奶粉基质中经固相萃取后再氮吹复溶会导致毒素流失, 影响回收

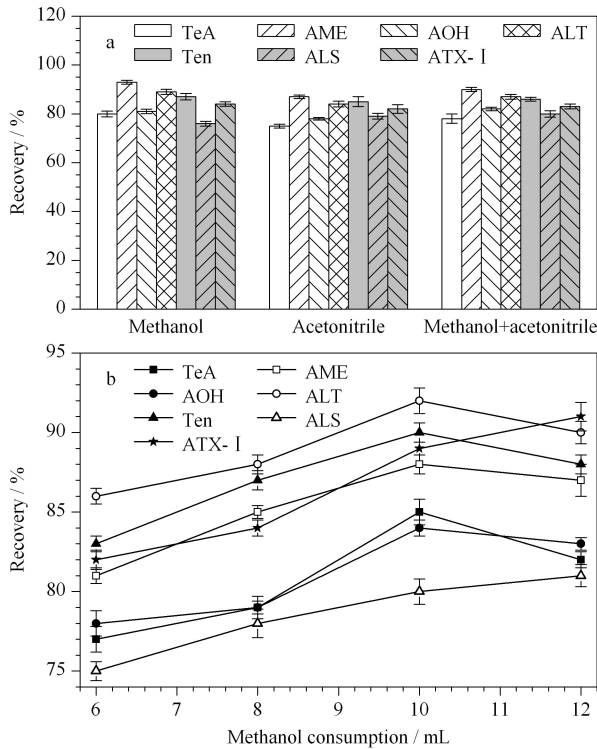


图 4 (a) 洗脱液种类和 (b) 甲醇用量对婴幼儿奶粉中 7 种链格孢霉素回收率的影响 (n=5)

Fig. 4 Effects of (a) eluent type and (b) methanol dosage on the recoveries of the seven ATs in infant milk powder (n=5)

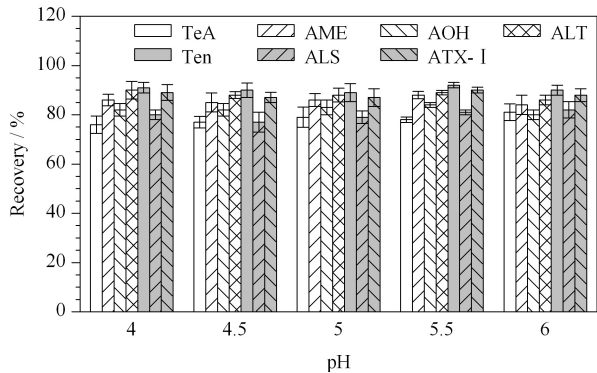


图 5 水的 pH 值对 7 种链格孢霉素回收率的影响 (n=5)

Fig. 5 Effect of water pH on the recoveries of the seven ATs (n=5)

率; 而不复溶时 7 种 ATs 的回收率为 77.4% ~ 91.1%, 即除 AOH、AME 外, 其他毒素复溶与否无显著性差异。因此选择在经 10 mL 甲醇洗脱之后不浓缩, 即振荡混匀后直接吸取 1 mL 洗脱液过 0.22 μm 滤膜后测定。

2.5 方法评价

2.5.1 基质效应 (ME)

在 UPLC-MS/MS 分析中, 洗脱化合物对电喷

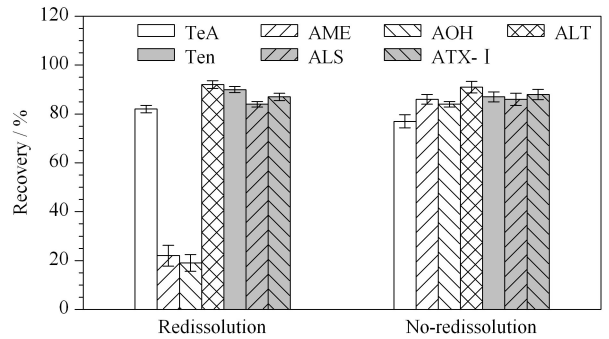


图 6 是否复溶对奶粉中 7 种链格孢霉素回收率的影响 (n=5)

Fig. 6 Effect of redissolution on the recoveries of the seven ATs in milk powder (n=5)

雾界面电离效率的影响表现为造成离子增强或抑制^[37]。据报道, 基质效应在 UPLC-MS/MS 方法分析 ATs 时很常见^[38], 通常通过比较标准溶液和相同浓度的阴性加标样品的响应来研究。本实验为了检测空白样品基质对目标化合物的响应值是否增强或抑制, 分别用溶剂和基质空白液配制 7 种 ATs 的标准混合液, 质量浓度为 50 μg/L, 并进一步对实验结果进行比较。

根据测定的 7 种 ATs 的回收率值, 将 ME 值分为 3 组 (低于 80%、80%~120% 和高于 120%)。ME 值在 80%~120% 之间为低基质效应, 可以忽略。当 ME 值超过 120% 时, 说明存在基质增强作用^[39]。同时, ME 值低于 80% 说明存在基质抑制作用。ME 的计算公式如下^[40]:

$$ME = \frac{A_2 - A_1}{A_1} \times 100\%$$

其中: A_1 为毒素标准品在特定浓度的纯溶剂 (初流动相) 中的平均峰面积; A_2 为基质空白溶液中相同浓度每种毒素标准品的平均峰面积。

如表 2 所示, TeA 的 ME 值在 80%~100% 之间, 说明 TeA 的基质作用较小; Ten 和 AOH 的 ME 值低于 80%, 表现出基质抑制效应。相反 AME、ALT、

表 2 链格孢霉素在婴幼儿奶粉样品基质中的基质效应
Table 2 Matrix effects (MEs) of the ATs in infant milk powder sample matrixes

Target analyte	ME/%
TeA	91.2±2.4
AME	132.6±1.8
AOH	73.5±2.1
ALT	145.5±3.1
Ten	78.2±2.2
ALS	158.7±3.8
ATX-I	123.4±1.2

ALS 和 ATX- I 的 ME 值高于 120%,表现出基质增强效应。根据表 2 所呈现的实验结果,本研究采用基质匹配的方法对基质效应进行补偿,最大程度上抵消基质效应的影响。

2.5.2 线性范围与检出限

在线性关系研究中,所有标准工作溶液均在 1.3 节色谱-质谱条件下测定。以 x 代表质量浓度、 y 代

表峰面积进行线性回归分析,用基质空白标准工作溶液做校准曲线。结果如表 3 所示,每种毒素在 0.5 ~ 200 $\mu\text{g/L}$ 内都有良好的线性关系,判定系数 (R^2) 均大于 0.990。以各目标化合物信噪比 (S/N) 分别为 3 和 10 计算检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ), 7 种 ATs 的 LOD 为 0.15 ~ 0.64 $\mu\text{g/kg}$, LOQ 为 0.54 ~ 2.24 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 3 婴幼儿奶粉中 7 种链格孢霉毒素的线性范围、线性方程、 R^2 和检出限和定量限

Table 3 Linear ranges, linear equations, coefficients of determination (R^2), LODs, and LOQs of the seven ATs in infant milk powder

Toxin	Linear range/($\mu\text{g/L}$)	linear equation	R^2 ($n=9$)	LOD/($\mu\text{g/kg}$)	LOQ/($\mu\text{g/kg}$)
TeA	0.5-200	$y=13176.9x-1758.45$	0.9958	0.64	2.24
AME	0.5-200	$y=2401.37x+356.275$	0.9928	0.48	1.59
AOH	0.5-200	$y=2078.1x-1800.18$	0.9979	0.37	1.13
ALT	0.5-200	$y=39165.8x-11564.9$	0.9996	0.32	1.22
Ten	0.5-200	$y=14368.3x-5782.4$	0.9982	0.15	0.54
ALS	0.5-200	$y=4816.08x+766.478$	0.9903	0.43	1.43
ATX- I	0.5-200	$y=2562.18x-3766.9$	0.9945	0.21	0.73

y : peak area; x : mass concentration, $\mu\text{g/L}$.

2.5.3 样品回收率和精密度结果分析

按 1.5 节和 1.6 节的操作制备婴幼儿奶粉样品,参照 GB/T 27404-2008^[41],分别以 1 倍、2 倍和 10 倍定量限进行三水平加标试验,在一天内每个添加浓度重复进样 5 次,测定样品的回收率与精密度。结果如表 4 所示,7 种 ATs 的平均回收率为 79.1%

表 4 婴幼儿奶粉中 7 种链格孢霉毒素的添加回收率和精密度 ($n=5$)

Table 4 Recoveries and precisions of the seven *Alternaria* toxins spiked in infant milk powder ($n=5$)

Toxin	Spiked/($\mu\text{g/kg}$)	Recovery/%	RSD/%
TeA	2.2	87.7	4.34
	4.4	92.6	5.10
	22.0	94.2	6.21
AME	1.6	89.9	6.33
	3.2	96.3	7.13
	16.0	114.3	5.11
AOH	1.1	86.4	4.67
	2.2	100.2	5.81
	11.0	94.1	3.68
ALT	1.2	79.1	6.54
	2.4	88.4	5.49
	12.2	82.6	7.13
Ten	0.5	93.1	4.98
	1.0	87.4	4.17
	5.0	106.1	3.16
ALS	1.4	86.6	3.69
	2.8	85.7	4.64
	14.0	80.5	5.21
ATX- I	0.7	91.1	6.34
	1.4	93.4	5.29
	7.0	106.2	8.87

~ 114.3%, RSD \leq 8.87%。

2.5.4 实际样品的测定

按照上述方法对实际婴幼儿奶粉样品(一段、二段、三段各 20 个样品)进行检测,结果表明,未在一、二段(0~6 月龄)和二段(6~12 月龄)奶粉中检测出真菌毒素;三段奶粉中只有 1 个样品检测出 Ten,浓度为 4.97 $\mu\text{g/kg}$ 。这是因为奶粉中易受污染的植物油占比较小,所以奶粉受 ATs 的污染程度相对果蔬类产品和小麦类产品较小。而随着婴儿年龄的增长,其奶粉选用原料种类较多,被 ATs 污染的几率也随之升高。

3 结论

本文采用固相萃取技术富集婴幼儿奶粉中 7 种 ATs,并结合 UPLC-MS/MS,定性定量测定婴幼儿奶粉中的 ATs,建立了一种高效检测 7 种 ATs 的检测方法。该方法操作简便,高效灵敏,快速准确,其检出限、线性关系、回收率和重现性等方法学指标均能满足 ATs 的测定,可适用于实际样品检测。本研究开发的方法为检测更多种类的 ATs 提供了技术支持,同时还为婴幼儿奶粉中典型链格孢霉毒素安全限量标准的制订提供理论依据,此外,本研究对于评估婴幼儿奶粉的食品安全风险、保护婴幼儿健康也具有十分重要的理论和现实意义。

参考文献:

[1] Man Y, Liang G, Li A, et al. Journal of Food Safety and

- Quality Inspection, 2016, 7(2): 453
满燕, 梁刚, 李安, 等. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2): 453
- [2] Ostry V. World Mycotoxin J, 2008, 1(2): 175
- [3] Alexander J B D, Boobis A. EFSA J, 2012, 10(2): 2567
- [4] Georg A, Natálie Ž, Elisabeth V, et al. Mycotoxin Res, 2020, 2020(36): 399
- [5] Dong Z G, Liu G T, Dong Z M, et al. Carcinogenesis, 1987, 8(7): 989
- [6] Yuan H, Ding T Y. Food and Machinery, 2020, 36(12): 203
袁航, 丁同英. 食品与机械, 2020, 36(12): 203
- [7] Jiang L Y. [MS Dissertation]. Chongqing: Southwest University, 2016
蒋黎艳. [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2016
- [8] Zhou Y B, Li L, Wu Y T, et al. Physical Testing and Chemical Analysis Part B (Chemical Analysis), 2019, 55(9): 1036
周贻兵, 李磊, 吴玉田, 等. 理化检验(化学分册), 2019, 55(9): 1036
- [9] He Q, Li J H, Kong X H, et al. Chinese Journal of Chromatography, 2010, 28(12): 1128
何强, 李建华, 孔祥虹, 等. 色谱, 2010, 28(12): 1128
- [10] Chen B, Zhu F, Li F, et al. Modern Food Technology, 2017, 33(11): 251
陈蓓, 朱峰, 李放, 等. 现代食品科技, 2017, 33(11): 251
- [11] Prella A, Spadaro D, Garibaldi A, et al. Food Chem, 2013, 140(1/2): 161
- [12] Králová J, Hajlová J, Poustka J, et al. J Food Sci, 2018, 24(6): 288
- [13] Sebastian H, Lena H, Mauriz M L M, et al. Mycotoxin Res, 2017, 33(4): 309
- [14] SN/T 4259-2015
- [15] Sauer D B, Seitz L M, Burroughs R, et al. J Agric Food Chem, 1978, 26(6): 1380
- [16] Gross M, Curtui V, Ackermann Y, et al. J Agric Food Chem, 2011, 59(23): 12317
- [17] Harvan D J, Pero R W. J Chromatogr A, 1974, 101(1): 222
- [18] Scott P M, Weber D, Kanhere S R. J Chromatogr A, 1997, 765(2): 255
- [19] Fente C A, Jaimez J, Vázquez B I, et al. Analyst, 1998, 123(11): 2277
- [20] Li J H, He Q, Kong X H, et al. Chemometric Analysis, 2012, 21(3): 20
李建华, 何强, 孔祥虹, 等. 化学分析计量, 2012, 21(3): 20
- [21] Yang S Y, Qiu J F. Modern Preventive Medicine, 2012, 39(22): 5897
杨世亚, 邱景富. 现代预防医学, 2012, 39(22): 5897
- [22] Zeng X L, Zeng Z. The Medicine Herald, 2010, 29(7): 909
曾祥林, 曾智. 医药导报, 2010, 29(7): 909
- [23] Olariu R I, Arsene C, Vione D, et al. Solid Phase Extraction: Principles and Applications. Louisiana, USA: CRC Press, 2020
- [24] Peng X C, Zhang B, Yang J. Qilu Petrochemical Industry, 2020, 48(3): 260
彭学成, 张博, 杨静. 齐鲁石油化工, 2020, 48(3): 260
- [25] Zhang J Y, Deng H F, Li Y M, et al. Journal of Analytical Testing, 2017, 36(7): 849
张建莹, 邓慧芬, 李月梅, 等. 分析测试学报, 2017, 36(7): 849
- [26] Song H T, Li C Y, Wan Y Y, et al. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2017, 42(4): 686
宋慧婷, 李长印, 万瑶瑶, 等. 中国中药杂志, 2017, 42(4): 686
- [27] Wang Q, Cai R, Wang Z L, et al. Journal of Food Safety and Quality Inspection, 2020, 11(1): 114
王琦, 蔡瑞, 王周利, 等. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(1): 114
- [28] Zhou T X. [MS Dissertation]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2017
周天啸. [硕士学位论文]. 上海: 上海师范大学, 2017
- [29] Scott P M. J AOAC Int, 2001, 84(6): 1809
- [30] Logrieco A, Moretti A, Solfrizzo M. World Mycotoxin J, 2009, 2(2): 129
- [31] Marina G, Stefan A, Klara G, et al. Front Microbiol, 2019, 10: 109
- [32] Chang T, Cui J G, Zhang F. Application of Chemical, 2021, 50(4): 1671
畅彤, 崔建国, 张峰. 应用化工, 2021, 50(4): 1671
- [33] Zhao K. [PhD Dissertation]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2015
赵凯. [博士学位论文]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2015
- [34] Gao Y. [PhD Dissertation]. Jilin: Jilin University, 2014
高岩. [博士学位论文]. 吉林: 吉林大学, 2014
- [35] Li F Q, Yoshizawa T. J Agric Food Chem, 2000, 48(7): 2920
- [36] Spanjer Martien C, Rensen Peter M, Scholten Jos M. Food Addit Contam, 2008, 25(4): 472
- [37] Wang L, Li H, Yu S. Food Chem, 2019, 280(4): 278
- [38] Walravens J, Mikula H, Rychlik M, et al. J Chromatogr A, 2014, 1372(7): 91
- [39] Marta V P, Jesús M S, Javier E G F, et al. Food Chem, 2019, 274(3): 429
- [40] Fierens C, Thienpont L M, Stöckl D, et al. Rapid Commun Mass Spectrom, 2000, 14(10): 936
- [41] GB/T 27404-2008