

共价有机聚合物固相微萃取结合高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中黄曲霉毒素

刘 通^{1#}, 母国栋^{1,2#}, 姚桂红¹, 姚美伊¹, 陈凤明¹, 凌 云¹, 吴玉杰¹, 王秀娟^{1*}
(1. 中国检验检疫科学研究院食品安全研究所, 北京 100176; 2. 中国农业科学院蜜蜂研究所, 北京 100193)

摘 要: **目的** 建立基于共价有机聚合物固相微萃取前处理结合高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)快速、高灵敏检测牛奶中 6 种黄曲霉毒素残留的分析方法。**方法** 以 1,3,5-三(4-氨基苯基)苯[1,3,5-tri (4-aminophenyl) benzene, TAPB]和 1,3,5-三甲酰基间苯三酚(1,3,5-triformyl-phloroglucinol, Tp)为单体制备了共价有机聚合物材料并固定在木签表面,用于黄曲霉毒素的固相微萃取前处理。在萃取时间为 20 min、洗脱溶剂为乙腈、洗脱时间为 6 min 条件下,对黄曲霉毒素进行萃取和洗脱。**结果** 6 种黄曲霉毒素在一定质量浓度范围内线性关系良好,相关系数均大于 0.9995。日内和日间精密度的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)分别为 4.39%~8.21%和 4.97%~9.12%。将开发的方法用于实际牛奶样品中黄曲霉毒素残留检测,加标回收率为 80.01%~92.71%, RSDs 为 3.12%~9.54%。**结论** 制备的共价有机聚合物固相微萃取材料对 6 种黄曲霉毒素吸附性能强,开发的固相微萃取-HPLC-MS/MS 适用于牛奶中黄曲霉毒素的快速、高灵敏定量检测。

关键词: 黄曲霉毒素; 牛奶; 共价有机聚合物; 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of aflatoxins in milk by covalent organic polymer solid phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

LIU Tong^{1#}, MU Guo-Dong^{1,2#}, YAO Gui-Hong¹, YAO Mei-Yi¹, CHEN Feng-Ming¹,
LING Yun¹, WU Yu-Jie¹, WANG Xiu-Juan^{1*}

(1. Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;
2. Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid and highly sensitive method for the determination of 6 kinds of aflatoxins in milk by covalent organic polymer solid phase microextraction combined with high performance liquid

基金项目: 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目(2021JK002、2022JK01)、国家乳业技术创新中心项目(2022-科研攻关-13, 2022-开发性课题-18)、国家重点研发计划项目(2022YFF1100900、2018YFC1603501、2018YFC1602403-1)

Fund: Supported by the Fund of Chinese Academy of Inspection and Quarantine (2021JK002、2022JK01), the National Dairy Technology Innovation Center (2022-Scientific Research-13, 2022-Development Project-18), and the National Key Research and Development Program (2022YFF1100900, 2018YFC1603501, 2018YFC1602403-1)

#刘通、母国栋为共同第一作者

#LIU Tong and MU Guo-Dong are Co-first Authors

*通信作者: 王秀娟, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。E-mail: wangxiuj@caiq.org.cn

*Corresponding author: WANG Xiu-Juan, Master, Professor, Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Ronghua South Road, Daxing District, Beijing 100176, China. E-mail: wangxiuj@caiq.org.cn

chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** The 1,3,5-tri (4-aminophenyl) benzene (TAPB) and 1,3,5-triformyl-phloroglucinol (Tp) were used as monomers to prepare covalent organic polymers and fixed on the wooden tip surface, then used for solid phase microextraction pretreatment of aflatoxin. Under the conditions of extraction time of 20 minutes, elution solvent of acetonitrile, and elution time of 6 minutes, aflatoxin was extracted and eluted. **Results** The linear relationship of 6 kinds of aflatoxins was good in a certain mass concentration range, and the correlation coefficients were all greater than 0.9995. The relative standard deviations (RSDs) of intra-day and inter-day precision were 4.39%–8.21% and 4.97%–9.12%, respectively. The developed method was used to detect the aflatoxins residue in real milk samples. The recoveries of aflatoxins in spiked milk samples were 80.01%–92.71%, and RSDs were 3.12%–9.54%. **Conclusion** The prepared covalent organic polymer solid phase microextraction material has strong adsorption performance for 6 kinds of aflatoxins. The proposed solid phase microextraction-HPLC-MS/MS method is suitable for rapid and highly sensitive quantitative detection of aflatoxins in milk.

KEY WORDS: aflatoxin; milk; covalent organic polymer; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引 言

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)主要是由黄曲霉、寄生曲霉和集峰曲霉产生的具有相似结构和理化性质的次级代谢产物^[1]。目前发现的 AFs 种类达 20 多种, 其中食品中常见的主要有 6 种, 分别为黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)、黄曲霉毒素 B₂ (aflatoxin B₂, AFB₂)、黄曲霉毒素 G₁ (aflatoxin G₁, AFG₁)、黄曲霉毒素 G₂ (aflatoxin G₂, AFG₂)、黄曲霉毒素 M₁ (aflatoxin M₁, AFM₁)和黄曲霉毒素 M₂ (aflatoxin M₂, AFM₂)。AFs 对人和动物具有致癌、致畸、致突变毒性, 当动物摄入 AFs 污染的食物时, 可以转移到牛奶和乳制品中。此外, 由于 AFs 在人体内还有一定的蓄积性, 长期低剂量的摄入也会增加患肝癌的风险^[2-3]。因此, 许多国家和组织都针对 AFs 制定了严格的限量标准。比如美国规定食品中 4 种 AFs 总量 (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) 的最大残留限量 (maximum residue limits, MRL) 为 15 μg/kg, 牛奶中 AFM₁ 的 MRL 为 0.5 μg/kg。欧盟(European Union, EU)规定了 17 类食品中 AFB₁、AFM₁ 以及 4 种 AFs 总量 (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂) 的限量标准, 其中牛奶中 AFM₁ 的限量值为 0.05 μg/kg。我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定了 AFB₁ 与 AFM₁ 在不同食品类别中的限量, 其中乳及乳制品中 AFM₁ 的限量为 0.5 μg/kg。与美国、欧盟等标准相比, 我国标准尚未涉及到总量要求。考虑到 AFs 的极强毒副作用及其蓄积效应, 建立一种快速、灵敏、准确测定食品中痕量 AFs 残留的分析方法至关重要。

目前报道的食品中 AFs 检测方法主要有免疫分析^[4-5]、生物传感^[6]、光谱法^[7]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[8]、高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[9-10]等。其中免疫分析、生物传感、光谱法通常用作快速筛选分析, 面临着检测精度方面的巨大挑战。HPLC 需要烦琐

的柱后衍生用于荧光检测, 具有痕量分析灵敏度不足的缺点。结合 HPLC 的强分离功能和质谱检测的高灵敏度, HPLC-MS/MS 可以实现高选择性和高准确度的多目标分析。然而, 由于食品基质复杂且 AFs 残留水平较低, 在仪器检测前通常需要进行净化和富集前处理, 目前开发的前处理方法有液液萃取^[11]、固相萃取^[12-14]、分散固相萃取^[15]、QuEChERS^[16-17]、固相微萃取^[18]等。固相微萃取保留了固相萃取的优点, 使提取和富集一步完成, 并减少溶剂的使用, 因此被认为是一种简单环保的前处理方法。固相微萃取过程是基于目标物在吸附剂材料和样品基质之间的选择性吸附进行的^[18]。吸附剂一般通过物理黏附或化学反应的方法固定在惰性支撑载体上, 已经尝试的支撑材料有二氧化硅纤维^[19]、不锈钢丝^[20]、中空纤维^[21]和木签(wooden tip, WT)^[22]等。固相微萃取的提取效率主要取决于吸附材料, 因此吸附材料的选择至关重要。

共价有机聚合物(covalent organic polymer, COP)是由有机结构单元通过较强的共价键相互连接而成的一类新型多孔高分子材料, 具有结构多样可调、比表面积大、物化性质稳定等特点^[23]。COP 作为固相萃取填料已被应用到复杂食品基质中生物毒素残留的检测。如 WU 等^[24]设计合成磁性 COP 材料, 比表面积高达 1293 m²/g, 具有强吸附性和热稳定性, 对环境水样中的 AFB₁ 进行吸附, 吸附去除率高达 90%; LI 等^[25]设计合成磁性共价有机框架材料, 用于新型磁性分散固相微萃取, 结合 HPLC-MS/MS 用于测定食品基质中的 4 种 AFs, 对 AFs 的吸附容量在 69.5~92.2 mg/g 范围内, 可重复使用 8 次以上。但是上述 COP 材料在四氧化三铁磁性载体上合成, 采用磁分离的方式进行, 存在磁性材料制备难度较大, 前处理操作烦琐的缺点。WT 作为一种惰性支撑载体, 具有规则的纤维空隙结构和较大理论比表面积, 且应用于固相微萃取, 具有易加工、成本低的优点。但是目前尚未有 COP 修饰 WT 固相载体实现方便、快速提

取食品中 AFs 的研究报道。

基于此,本研究拟采用 1,3,5-三(4-氨基苯基)苯[1,3,5-tri(4-aminophenyl) benzene, TAPB]和 1,3,5-三甲酰基间苯三酚(1,3,5-triformyl-phloroglucinol, Tp)为单体,采用模板介导的沉淀聚合反应制备了 COP 材料(T-COP),利用粘合法在 WT 表面制备形成 COP 涂层,得到新的 COP-固相微萃取材料(T-COP-WT),建立一种基于 COP 的固相微萃取-HPLC-MS/MS 快速检测牛奶中 AFs 残留的分析方法,以期拓展 COP 修饰固相微萃取载体在食品安全快速检测领域中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

木尖、牛奶样品购买自当地市场(北京)。

甲酸(色谱纯,美国 Fisher Scientific 公司);甲醇、乙醇、乙腈、乙酸、乙酸乙酯(色谱纯,德国 CNW Technologies 公司);丙酮(色谱纯,美国 J.T. Baker 公司);四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)(纯度 99%,上海麦克林生化科技有限公司);TAPB[纯度>93%,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司];Tp(纯度>98%,北京伊诺凯科技有限公司);AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、AFM₁、AFM₂ 标准品(纯度>97%,上海西格玛奥德里奇贸易有限公司)。

1.2 仪器与设备

SYMBIOSISTM PICO 液相色谱仪(荷兰 Spark Holland 公司);AB SCIEX Qtrap 6500 三重四极杆串联质谱仪(美国爱博才思公司);Hitachi S-4800 扫描电镜仪(日本 Hitachi 公司);Allegra X-22 高速冷冻离心机(美国贝克曼公司);Milli-Q Advantage A10 超纯水系统(18.2 MΩ/cm,美国默克密理博公司);PL-203 型号称量天平(精度 0.001 g,上海梅特勒托利多仪器有限公司);Xbridge C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm, 美国 Waters 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱-质谱检测条件

(1)色谱条件

色谱柱: Xbridge C₁₈ 柱(2.1 mm×100 mm, 3.5 μm);进样量 5 μL;柱温 30℃;流速: 0.35 μL/min;流动相 A: 乙腈/甲醇(1:1, V:V)、流动相 B: 含 0.1%甲酸的水溶液,梯度洗脱条件为 0~1.0 min, 97% B; 1.0~2.0 min, 97%~90% B; 2.0~5.0 min, 90%~88% B; 5.0~7.0 min, 88%~1% B; 7.0~9.0 min, 1% B; 9.0~11.1 min, 1%~97% B, 11.1~18.0 min, 97% B。

(2)质谱条件

扫描方式: 电喷雾离子源正离子(electro spray ionization, ESI+); 检测方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM); 电喷雾电压: 4500 V; 离子源温度: 550℃; 雾化气压力: 35 bar; 辅助气压力: 10 bar; 驻留时间: 100 ms; 质谱检测参数见表 1。

表 1 质谱检测参数

Table 1 Mass spectrometry detection parameters

分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	碰撞电压 /V	去簇电压 /V
AFB ₁	313.1	241.1, 285.1*	32	30
AFB ₂	315.1	259.1, 287.1*	38	20
AFG ₁	329.1	283.1, 243.2*	35	30
AFG ₂	331.1	285.1, 245.1*	39	30
AFM ₁	329.1	259.0*	33	30
AFM ₂	331.1	273.1*	30	30

注: *为定量离子。

1.3.2 实验方法

(1)标准溶液的配制

准确称取 AFs 标准品 1.0 mg, 用乙腈配制成 0.1 mg/mL 的标准储备液, 之后准确量取适量标准储备液, 用乙腈稀释成 10 μg/mL 的标准中间液; 准确量取适量标准中间液, 用初始流动相稀释成 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0、200.0 ng/mL 系列浓度溶液。

(2)牛奶样品前处理

取市售牛奶 10.0 g 放入 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 乙腈和 2.00 g 氯化钠后, 涡旋振荡 5 min, 在 4℃条件下以 10000 r/min 的速度离心 10 min, 移取 10 mL 上清液至另一个离心管中, 进行蒸发浓缩, 加超纯水复溶至 5 mL, 得到样品溶液供后续实验使用。

(3) T-COP-WT 制备

称取 TAPB 100 mg 于圆底烧瓶中, 接着加入 20 mL 的 THF, 超声溶解 20 min。接着, 称取 Tp 60 mg 溶于 8 mL THF 中(适当超声 2 min 溶解)。然后, 将 TAPB 的 THF 溶液加入上述反应体系中, 边摇晃边加入, 再加 1 mL 乙酸, 于磁力搅拌器上继续反应 6 h (60℃, 150 r/min)。反应结束后, 将所获材料用乙醇和乙腈交替清洗 3 次, 放入烘箱烘干备用, 得到 T-COP 材料。

制备流程示意图如图 1 所示, 选取 5 cm 的 WT, 表面打磨光滑均匀, 再用超纯水超声清洗后于 60℃下烘干备用。采用粘合法制备修饰有 T-COP 的木签(T-COP-WT), 具体步骤如下: (a)称量少许烘干的 T-COP 粉末进行研磨, 转移至 2.5 mL 离心管中; (b)配制硅酮胶溶液, 于 50 mL 离心管中称取 5.0 g 中性硅酮胶加入 1 mL 苯, 混合均匀后, 将 WT 垂直浸入硅酮胶溶液中保持 30 s, 再从浆液中缓慢拉出, 立即插入含 T-COP 粉末的离心管中保持 60 s, 然后缓慢取出后, 再放入 60℃烘箱中老化 4 h; (c)老化后 WT 涂层用甲醇超声清洗 1 min, 重复此操作直至清洗溶液中不再有沉淀, 用氮气吹干; (d)刮去多余涂层, 使涂层的长度为 2.5 cm, 最终得到 T-COP-WT, 备后续实验使用。

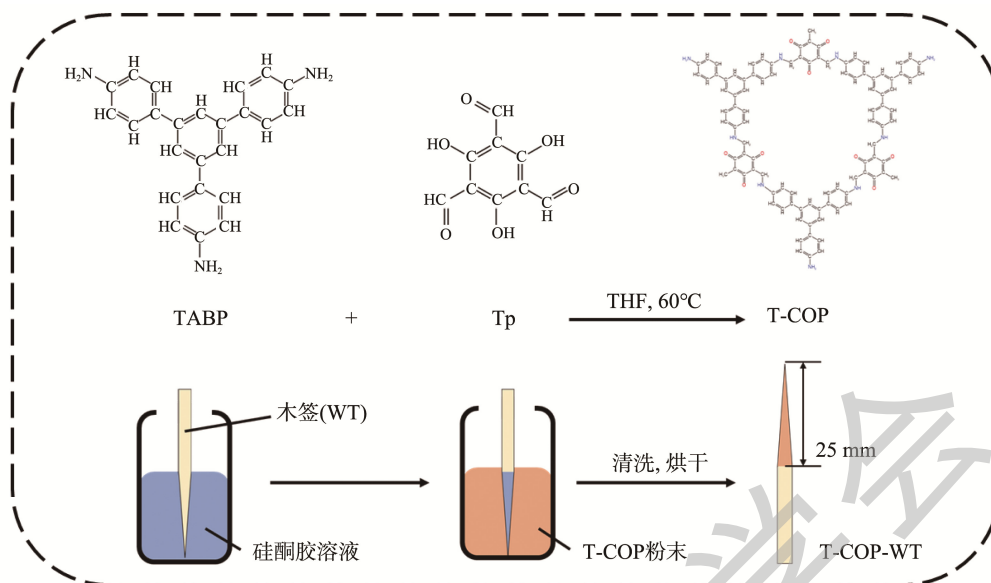


图1 COP修饰WT的制备流程示意图
Fig.1 Preparation process of the T-COP-WT

(4)固相微萃取-HPLC-MS/MS 检测牛奶中黄曲霉毒素残留

将 2.00 g 牛奶样品置于 4 mL 样品瓶中, 放入制备好的 T-COP-WT, 保证涂层完全浸入样品溶液中, 置于摇床上, 150 r/min 萃取 20 min。然后将 T-COP-WT 立即放入加有 2 mL 乙腈洗脱液的小瓶中, 超声 6 min, 收集洗脱液, 洗脱液过 0.22 μm 微孔滤膜, 备后续 HPLC-MS/MS 分析。使用后的 T-COP-WT 用甲醇(20 mL)和超纯水(20 mL)各清洗 3 次, 备下次使用。

1.4 数据处理

采用 Analysis 软件(AB SCIEX)对质谱信号进行采集和分析; 运用外标法定量, 以 AFs 的定量离子的相应峰面积进行计算; 绘图采用 GraphPad Prism 9 软件; 实验重复次数为 3 次。

2 结果与分析

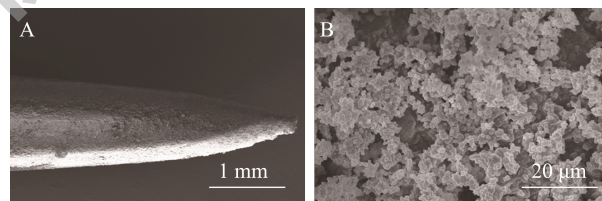
2.1 T-COP-WT 的表征结果

使用 Hitachi S-4800 扫描电镜对 T-COP-WT 进行表征, 观察表面形态, 加速电压为 10 kV, 放大倍数为 30 倍和 2000 倍。电镜结果如图 2, 可以清晰地观察到 T-COP 粉末在 WT 尖端结合紧密且分布均匀(图 2A)。放大倍数为 2000 倍时, 能观察到 WT 表面的 T-COP 呈高度交联的骨架结构(图 2B), 具有巨大的比表面积, 为固相微萃取 WT 的强吸附性提供了基础。

2.2 固相微萃取条件优化

为获得最佳的萃取量, 实验中考察了萃取时间、洗脱

溶剂类型、洗脱溶剂酸碱性和洗脱时间等几个重要参数对 T-COP-WT 的萃取性能的影响。将制备的 T-COP-WT 用于萃取添加量为 10 ng/mL 的加标牛奶样品, 以 AFs 的检测结果为指标, 考察 T-COP-WT 的萃取性能。



注: A: 放大倍数30倍; B: 放大倍数2000倍。

图2 COP固相微萃取WT的扫描电镜图

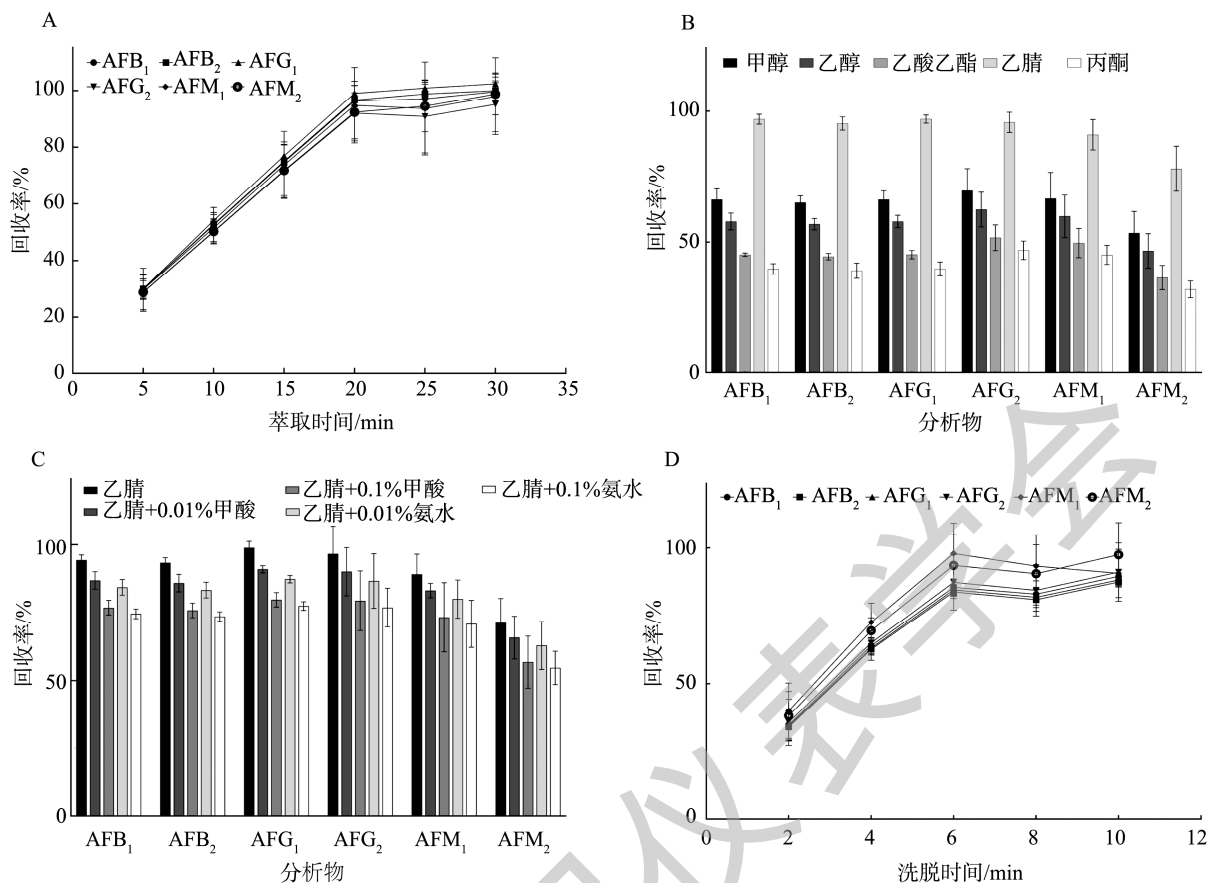
Fig.2 Scanning electron micrographs of the T-COP-WT

2.2.1 萃取时间

固相微萃取是个逐渐达到动态平衡的过程, 萃取时间与萃取量呈正相关直至吸附平衡。实验考察了不同萃取时间(5、10、15、20、25、30 min)对吸附量的影响, 按 1.3.2(4)步骤在每个设置时间下进行 3 次平行实验。实验结果如图 3A 所示, 当萃取时间小于 20 min 时, AFs 的回收率随着萃取时间的增加而增加, 但当萃取时间大于 20 min 时, 6 种 AFs 的回收率随着时间的增加几乎不变, 这可能是由于当萃取时间较短时, T-COP-WT 吸附尚未达到饱和, 而当萃取时间超过 20 min 时, T-COP-WT 的吸附位点趋于饱和。因此, 选择 20 min 作为最佳萃取时间。

2.2.2 洗脱溶剂类型

洗脱溶剂的类型直接影响到从 T-COP-WT 中解吸 AFs 的效果, 合适的洗脱溶剂可以将目标物最大限度地从 T-COP-WT 上洗脱下来。按 1.3.2(4)步骤, 考察了 5 种不同洗



注: A: 萃取时间; B: 洗脱溶剂类型; C: 洗脱溶剂酸碱性; D: 洗脱时间。

图3 T-COP-WT 固相微萃取条件的优化

Fig.3 Optimization of the T-COP-WT solid phase microextraction conditions

脱溶剂(甲醇、乙醇、乙酸乙酯、乙腈、丙酮)的洗脱效果。实验结果如图 3B 所示,当使用乙腈作为洗脱溶剂时,AFs 的回收率最高,洗脱效果最好。因此,选用乙腈作为洗脱溶剂,能更有效地解吸目标物。

2.2.3 洗脱溶剂酸碱性

通过加不同量的甲酸和氨水对洗脱溶剂的酸碱性进行调节,考察洗脱溶剂的酸碱性对洗脱性能的影响。实验结果如图 3C 所示,甲酸和氨水的加入一定程度地降低了洗脱效果,这可能是因为 pH 的改变增强了目标物与 COP 之间的氢键作用力,因此最终选择不对洗脱溶剂的酸碱性进行调节。

2.2.4 洗脱时间

洗脱时间直接影响 T-COP-WT 上的 AFs 解吸量和解吸效率,决定了是否能将吸附在 T-COP-WT 上的 AFs 完全洗脱掉。实验考察了不同的洗脱时间(2、4、6、8、10 min)对 AFs 解吸量的影响,结果如图 3D 所示,当洗脱时间较短(<6 min)时,洗脱效果较差;当洗脱时间大于等于 6 min 时,回收率较高且趋于平稳,表明 AFs 已基本从 T-COP-WT 上洗脱下来。考虑到 T-COP-WT 的解吸效率,最终选择 6 min 作为最优洗脱时间。

2.3 重复使用次数

为评价 T-COP-WT 的可重复使用性,对添加量为 10 ng/g 的加标牛奶样品进行了 5 次循环吸附实验,以回收率为指标。实验结果如图 4 所示,随着使用次数的增加,回收率虽有一定降低,但 5 次循环吸附实验的回收率均大于 75%。5 次循环后,AFs 回收率达到首次使用的 83.67%。在这种情况下,T-COP-WT 表现出良好的循环利用性能,可以多次回收利用。

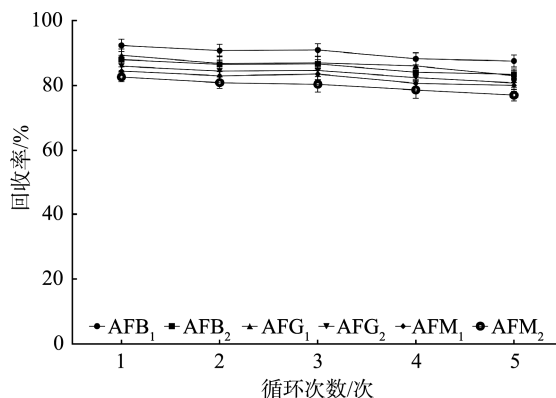


图4 T-COP-WT的重复使用能力

Fig.4 Re-use capability of T-COP-WT

2.4 方法学评价

2.4.1 标准曲线、检出限与定量限

按 1.3.2(1)步骤配制的 AFs 标准溶液, 在最佳萃取条件和洗脱条件下对 6 种 AFs 进行检测, 以 6 种 AFs 的浓度(X , ng/g)为横坐标, 定量离子峰面积(Y)为纵坐标得到 AFs 的标准曲线。由表 2 可得, 6 种 AFs 在一定的范围内呈良好线性关系, 相关系数均大于 0.9995。以 3 倍和 10 倍信噪比计算本方法的检出限(limits of detection, LODs)和定量限(limits of quantification, LOQs)分别为 0.01~0.04 ng/g 和 0.03~0.13 ng/g。实验结果表明建立的方法能实现牛奶中痕量 AFs 的快速、灵敏地检测。

2.4.2 精密度

使用单根 T-COP-WT 对 50 ng/g 的 AFs 混合溶液按 1.3.2(4)步骤处理后, 洗脱液进行 HPLC-MS/MS 检测, 连续

测定 3 d, 计算得到日内精密度和日间精密度。以测试结果的相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)作为指标, RSDs 越小, 表明实验的精密度的越好。实验结果见表 2, 日内和日间精密度(RSDs)分别为 4.39%~8.21%和 4.97%~9.12%, 说明该方法具有良好的精密度, 能对牛奶样品中的 AFs 进行准确的测定。

2.4.3 实际样品和加标回收测定

从当地超市采集了 4 种不同品牌的牛奶样品, 按照本方法进行 AFs 残留的测定, 结果未检测到 AFs 残留。为了验证方法的准确性, 在上述样品中加入 5、10 和 50 ng/g 3 个不同浓度的 AFs 进行回收率测定, 实验结果如表 3, 牛奶样品中 AFs 的加标回收率为 80.01%~92.71%, RSDs 为 3.12%~9.54%。由此可见, 市售牛奶具有较好的安全性, 该方法对于牛奶样品中的 AFs 检测具有较好的适用性。

表 2 6 种 AFs 的线性方程、LODs、LOQs、重复性和重现性
Table 2 Linear equations, LODs, LOQs, repeatabilities and reproducibilities of 6 kinds of AFs

目标物	线性范围/(ng/g)	线性方程	相关系数(r^2)	LODs/(ng/g)	LOQs/(ng/g)	日内精密度/(%, $n=6$)	日间精密度/(%, $n=3$)
AFB ₁	0.10~100.00	$Y=1.13e6X+1.12e5$	0.9996	0.02	0.07	5.41	7.21
AFB ₂	0.05~100.00	$Y=7.13e5X+7.37e4$	0.9995	0.01	0.03	6.55	6.65
AFG ₁	0.10~100.00	$Y=7.55e5X+7.64e4$	0.9996	0.03	0.10	4.39	5.79
AFG ₂	0.10~100.00	$Y=3.25e5X+2.7e4$	0.9995	0.02	0.07	7.03	8.23
AFM ₁	0.20~100.00	$Y=2.92e5X+1.31e4$	0.9999	0.04	0.13	8.21	4.97
AFM ₂	0.20~100.00	$Y=2.17e5X+8.99e4$	0.9998	0.04	0.13	5.93	9.12

表 3 实际牛奶样品中 AFs 的加标回收率和 RSDs (%, $n=3$)
Table 3 Spiked recoveries and RSDs of AFs in real milk samples (%, $n=3$)

目标物	添加水平/(ng/g)	平均回收率和 RSDs			
		牛奶样品 1	牛奶样品 2	牛奶样品 3	牛奶样品 4
AFB ₁	5	89.71±8.79	87.26±8.33	88.63±7.96	88.47±8.65
	10	90.36±6.84	89.53±7.01	88.94±6.24	89.51±6.51
	50	92.71±6.05	91.96±5.39	92.64±5.03	90.96±4.76
AFB ₂	5	87.06±8.65	88.01±8.03	87.36±7.89	87.59±7.31
	10	88.56±6.24	88.06±6.84	87.96±6.19	88.52±7.02
	50	89.35±4.87	89.89±3.56	90.04±5.01	90.51±4.52
AFG ₁	5	85.67±7.96	86.25±9.38	85.73±9.06	84.99±7.36
	10	86.11±6.51	86.93±7.12	85.97±6.89	86.56±7.09
	50	87.25±4.23	87.49±5.07	86.79±4.41	87.03±5.54
AFG ₂	5	82.99±8.96	83.51±8.97	84.01±7.54	84.77±9.14
	10	84.06±7.45	84.73±7.11	84.65±6.05	85.02±5.42
	50	85.61±3.12	84.99±5.05	85.97±4.47	85.09±4.12
AFM ₁	5	82.09±7.89	81.93±8.36	81.02±8.49	81.07±9.52
	10	83.54±7.45	82.47±6.58	82.49±7.06	81.54±7.07
	50	83.66±4.12	82.79±5.34	84.73±3.67	82.36±4.59
AFM ₂	5	80.69±8.94	80.04±9.54	80.01±7.46	80.63±8.63
	10	81.01±7.15	81.03±7.91	81.55±6.75	80.91±6.45
	50	81.02±4.97	81.54±3.79	81.97±4.99	81.23±5.33

2.4.4 与已报道方法的比较

将本研究开发建立的方法与已报道的方法进行了比较。如表 4 所示, 本研究开发的固相微萃取-HPLC-MS/MS 获得的 LOD 远低于使用 HAS、PSA 和分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP)作为吸

附剂获得的 LOD。因为即使是少量的 AFs 残留也有很大的危害, 因此, 在保证良好回收率的前提下, 降低检测的 LOD 是非常重要的。此外, 与其他 SPE 方法相比, 将 COP 材料固定在 WT 表面, 无须使用磁分离或离心步骤, 使提取过程更简单、提取速度更快。

表 4 固相微萃取-HPLC-MS/MS 与已报道方法的比较
Table 4 Comparison of solid phase microextraction-HPLC-MS/MS with previously developed methodologies

食品基质	目标物	吸附剂和萃取方法	分析方法	线性范围/($\mu\text{g/kg}$)	LODs/($\mu\text{g/kg}$)	参考文献
牛奶、油、大米	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	Fe ₃ O ₄ @COF (TFPB-PPD), MSPE	HPLC-MS/MS	0.05~100	0.01~0.05	[25]
食用油	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	HAS, SPE	HPLC-MS/MS	0.1~80	0.012~0.035	[26]
茶	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	UVM-7 silica, SPE	UPLC-MS/MS	0.8~19.3*	0.45~0.7	[27]
玉米、大米	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	Silica/GO, SPE	HPLC-FLD	0.5~20	0.1~0.3	[28]
鱼饲料	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	MIP- μ SPE	UPLC-MS/MS	3~100	0.42~1.2	[29]
谷物	AFB ₁	PSA, QuEChERS	LC-MS/MS	10~200	0.03	[30]
谷物制品	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂	Fe ₃ O ₄ @UiO-66-NH ₂ @MON, SPE	HPLC-FLD	0.16~60 ^b	0.15~0.87	[31]
牛奶	AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ , AFG ₂ , AFM ₁ , AFM ₂	COF-modified WT, 固相微萃取	HPLC-MS/MS	0.05~100	0.01~0.04	本研究

注: 磁性固相萃取(micro-solidphase extraction, MSPE); 腐植酸键合二氧化硅吸附剂(humic acid-bonded silica sorbent, HAS); 固相萃取(solid-phase extraction, SPE); *质量浓度单位 $\mu\text{g/L}$; 分子印迹聚合物-固相微萃取(molecularly imprinted polymer-micro-solid phase extraction, MIP- μ SPE); N-丙基亚乙基二胺(N-propylethane-1,2-diamine, PSA)。

3 结 论

本研究制备了一种共价有机聚合物 T-COP, 利用固体硅酮胶溶液将 T-COP 修饰于 WT 表面, 简易制备了固相微萃取木签 T-COP-WT, 并将其用于牛奶样品中 AFs 残留的快速萃取和富集净化。该 T-COP-WT 对 AFs 具有良好的选择性以及较高的吸附能力和效率。建立的固相微萃取过程相较于以往研究中采用的分散固相微萃取, 固液分离方式和洗脱方式更加简便, 能极大程度地提高样品前处理效率。本研究开发的固相微萃取-HPLC-MS/MS 检测方法前处理简单、检测快速, 可实现牛奶等食品中 6 种 AFs 的同时快速检测。后续研究中将在此材料优异的吸附性能基础上, 与敞开式电离质谱技术相结合, 将功能材料修饰后的 WT 与无需色谱分离的小型原位电离质谱仪集成, 开发分离-电离一体化质谱检测技术, 有望进一步降低检测成本, 提高检测效率。

参考文献

[1] 刘晓晗, 白艺珍, 岳晓凤, 等. 农产品及食品黄曲霉毒素污染研究[J]. 中国油料作物学报, 2022, 44(4): 729-738.
LIU XH, BAI YZ, YUE XF, *et al.* Investigation of aflatoxin contamination in agricultural products and foods [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2022, 44(4): 729-738.

[2] FLORES-FLORES M, LIZARRAGA E, LOPEZ CA, *et al.* Presence of mycotoxins in animal milk: A review [J]. Food Control, 2015, 53: 163-176.

[3] MELISSA M, ROGER C, KENT R. Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B1 in poultry [J]. Agriculture, 2015, 5(3): 742-777.

[4] CHADSEESUWAN U, SANGDOKMAI A, PIMPITAK U, *et al.* Production of a monoclonal antibody against aflatoxin M1 and its application for detection of aflatoxin M1 in fortified milk [J]. J Food Drug Anal, 2016, 24(4): 780-782.

[5] SELVOLINI G, LETTIERI M, TASSONI L, *et al.* Electrochemical enzyme-linked oligonucleotide array for aflatoxin B1 detection [J]. Talanta, 2019, 203: 49-57.

[6] SMEESTERS L, KUNTZEL T, THIENPONT H, *et al.* Handheld fluorescence spectrometer enabling sensitive aflatoxin detection in maize [J]. Toxins, 2023, 15(6): 361.

[7] ULUDAG Y, ESEN E, KOKTURK G, *et al.* Lab-on-a-chip based biosensor for the real-time detection of aflatoxin [J]. Talanta, 2016, 160: 381-388.

[8] CHEN JN, WANG M, DONG ZM. Determination of four aflatoxins in feeds by high throughput automated immunoaffinity magnetic beads purification-ultra performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2023, 41(6): 504-512.

[9] PRATA R, LÓPEZ-RUIZ R, PETRARCA MH, *et al.* Targeted and non-targeted analysis of pesticides and aflatoxins in baby foods by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry [J]. Food Control, 2022, 139: 109072.

[10] 丁学妍, 邵瑞婷, 张涵璐. 超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中 24 种真菌毒素[J]. 食品科学, 2022, 43(24): 325-334.

- DING XY, SHAO RT, ZHANG HL. Determination of 24 mycotoxins in milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2022, 43(24): 325–334.
- [11] 王冠宇, 刘越, 周焕英, 等. 微流控芯片液液萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法检测玉米油中黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(10): 295–300.
- WANG GY, LIU Y, ZHOU HY, *et al.* Detection of aflatoxin B₁ in corn oil by microfluidic chip liquid-liquid extraction combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2023, 14(10): 295–300.
- [12] CHEN J, LIU F, LI Z, *et al.* Solid phase extraction based microfluidic chip coupled with mass spectrometry for rapid determination of aflatoxins in peanut oil [J]. Microchem J, 2021, 167: 106298.
- [13] PELLICER-CASTELL E, BELENGUER-SAPIÑA C, BORRÀS VJ, *et al.* Extraction of aflatoxins by using mesoporous silica (type UVM-7), and their quantitation by HPLC-MS [J]. Microchim Acta, 2019, 186(12): 792.
- [14] XIE J, JIANG H, SHEN J, *et al.* Design of multifunctional nanostructure for ultrafast extraction and purification of aflatoxins in foodstuffs [J]. Anal Chem, 2017, 89(19): 10556–10564.
- [15] ZHU A, JIAO T, ALI S, *et al.* Dispersive micro solid phase extraction based ionic liquid functionalized ZnO nanoflowers couple with chromatographic methods for rapid determination of aflatoxins in wheat and peanut samples [J]. Food Chem, 2022, 391: 133277.
- [16] MIRÓ-ABELLA E, HERRERO P, CANELA N, *et al.* Determination of mycotoxins in plant-based beverages using QuEChERS and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food Chem, 2017, 229: 366–72.
- [17] SARTORI AV, MORAES MHP, SANTOS RP, *et al.* Determination of aflatoxins M₁, M₂, B₁, B₂, G₁, G₂ and ochratoxin a in infant formulas from brazil using a modified QuEChERS method and UHPLC-MS/MS [J]. Food Anal Method, 2023, 16(5): 841–849.
- [18] NONAKA Y, SAITO K, HANIOKA N, *et al.* Determination of aflatoxins in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(20): 4416–4422.
- [19] QUINTO M, SPADACCINO G, PALERMO C, *et al.* Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection [J]. J Chromatogr A, 2009, 1216(49): 8636–8641.
- [20] SIRHAN AY, TAN GH, AL-SHUNNAQ A, *et al.* QuEChERS-HPLC method for aflatoxin detection of domestic and imported food in Jordan [J]. J Liq Chromatogr Relat Technol, 2014, 37(3): 321–342.
- [21] LI WK, XUE YJ, FU XY, *et al.* Covalent organic framework reinforced hollow fiber for solid-phase microextraction and determination of pesticides in foods [J]. Food Control, 2022, 133: 108587.
- [22] YANG Y, DENG J. Internal standard mass spectrum fingerprint: A novel strategy for rapid assessing the quality of Shuang-Huang-Lian oral liquid using wooden-tip electrospray ionization mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2014, 837: 83–92.
- [23] CÔTÉ AP, BENIN AI, OCKWIG NW, *et al.* Porous, crystalline, covalent organic frameworks [J]. Science, 2005, 310(5751): 1166–1170.
- [24] WU J, QIU Y, LIU M, *et al.* Efficient adsorption of aflatoxin B₁ from water with a reusable magnetic covalent organic framework [J]. J Chem Technol Biotechnol, 2022, 97(10): 2852–2860.
- [25] LI J, XU XL, GUO W, *et al.* Synthesis of a magnetic covalent organic framework as sorbents for solid-phase extraction of aflatoxins in food prior to quantification by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Food Chem, 2022, 387: 132821.
- [26] ZHOU NZ, LIU P, SU XC, *et al.* Low-cost humic acid-bonded silica as an effective solid-phase extraction sorbent for convenient determination of aflatoxins in edible oils [J]. Anal Chim Acta, 2017, 970: 38–46.
- [27] PELLICER-CASTELL E, BELENGUER-SAPIÑA C, BORRÀS VJ, *et al.* Extraction of aflatoxins by using mesoporous silica (type UVM-7), and their quantitation by HPLC-MS [J]. Microchim Acta, 2019, 186(12): 1–10.
- [28] YU L, MA F, DING X, *et al.* Silica/graphene oxide nanocomposites: Potential adsorbents for solid phase extraction of trace aflatoxins in cereal crops coupled with high performance liquid chromatography [J]. Food Chem, 2018, 245: 1018–1024.
- [29] JAYASINGHE GTM, DOMINGUEZ-GONZALEZ R, BERMEJO-BARRERA P, *et al.* Ultrasound assisted combined molecularly imprinted polymer for the selective micro-solid phase extraction and determination of aflatoxins in fish feed using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2020, 1609: 460431.
- [30] ZHAO Y, HUANG J, MA L, *et al.* Development and validation of a simple and fast method for simultaneous determination of aflatoxin B₁ and sterigmatocystin in grains [J]. Food Chem, 2017, 221: 11–17.
- [31] LI CY, LIU JM, WANG ZH, *et al.* Integration of Fe₃O₄@UiO-66-NH₂@MON core-shell structured adsorbents for specific preconcentration and sensitive determination of aflatoxins against complex sample matrix [J]. J Hazard Mater, 2020, 384: 121348.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)

作者简介



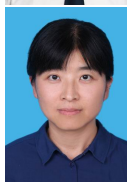
刘 通, 博士, 副研究员, 主要研究方向为分析化学。

E-mail: liutongyes@163.com



母国栋, 博士研究生, 主要研究方向为农产品质量与食品安全。

E-mail: mgd102179@163.com



王秀娟, 硕士, 研究员, 主要研究方向为食品安全。

E-mail: wangxiujie@caiq.org.cn