

免疫亲和柱结合超高效液相色谱-串联质谱法测定牛奶中的 16 种真菌毒素比较研究

张 烁¹, 周 爽^{1*}, 裴晓燕^{2,3}, 李敬光¹, 赵云峰¹, 吴永宁¹

(1. 国家食品安全风险评估中心, 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 中国医学科学院创新单元 2019RU014, 北京 100021; 2. 国家乳业技术创新中心, 呼和浩特 010090; 3. 内蒙古伊利实业集团股份有限公司, 呼和浩特 010080)

摘要: **目的** 通过比较 5 种不同商品化多合一免疫亲和柱的可检测目标毒素种类、回收率和稳定性, 筛选性能最优的免疫亲和柱, 建立免疫亲和前处理-超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 测定牛奶中 16 种真菌毒的方法。 **方法** 牛奶样品分别经 5 种不同多毒素免疫亲和柱进行净化富集, 用优化后的 UPLC-MS/MS, 在多反应监测模式下测定, 同位素内标法定量, 筛选覆盖牛奶中真菌毒素污染种类全面、回收率和稳定性最佳的免疫亲和柱, 并进行免疫亲和柱性能评价和方法学验证, 最终将方法应用于实际样品检测。 **结果** 免疫亲和柱 A 对牛奶中 16 种真菌毒素在低、中、高 3 个添加水平均具有良好的准确度和精密性, 加标回收率在 83.6%~126.8% 之间, 相对标准偏差为 0.2%~18.4%。柱 A 内各毒素残留水平低于仪器检出限, 柱容量在 21.8~1317.5 ng 之间。使用免疫亲和柱 A 富集净化样品, 各目标毒素在线性范围内线性良好, 相关系数均大于 0.99, 定量限为 0.0010~0.2000 ng/g。应用该方法对牛奶质控样品和实际样品进行检测, 质控样品测定值均在标示范围内; 实际样品中能够检出较低水平的黄曲霉毒素 M₁、去环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马毒素 B₁。 **结论** 本研究验证筛选免疫亲和柱 A 应用于牛奶中 16 种真菌毒素的测定, 其柱残留和柱容量能够满足牛奶中真菌毒素污染的测定; 经方法学验证该方法准确可靠、灵敏度高, 适用于牛奶中 16 种真菌毒素的日常检测。

关键词: 真菌毒素; 牛奶; 免疫亲和; 超高效液相色谱-串联质谱法

Comparative study of immunoaffinity columns combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of 16 kinds of mycotoxins in milk

ZHANG Shuo¹, ZHOU Shuang^{1*}, PEI Xiao-Yan^{2,3}, LI Jing-Guang¹, ZHAO Yun-Feng¹, WU Yong-Ning¹

[1. China National Center for Food Safety Risk Assessment, NHC Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, Chinese Academy of Medical Sciences Research Unit (No.2019RU014), Beijing 100021, China; 2. National Center of Technology Innovation for Dairy, Hohhot 010090, China; 3. Inner Mongolia Yili Industrial Group Co., Ltd., Hohhot 010080, China]

基金项目: 国家自然科学基金项目(32272429、31871723)、国家乳业技术创新中心项目(2022-开放性课题-19)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32272429, 31871723), and the National Center of Technology Innovation for Dairy (2022-open-ended project-19)

***通信作者:** 周爽, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品污染物暴露解析。E-mail: zhoush@cfsa.net.cn

***Corresponding author:** ZHOU Shuang, Ph.D, Professor, China National Center for Food Safety Risk Assessment, No.7, Panjiayuan Nanli, Chaoyang District, Beijing 100021, China. E-mail: zhoush@cfsa.net.cn

ABSTRACT: Objective To screen the immunoaffinity column with the best performance by comparing the detectable target toxin types, recovery rates and stabilities of 5 kinds of different commercial multi-in-one immunoaffinity columns, establish a method for the determination of 16 kinds of mycotoxins in milk by immunoaffinity pretreatment-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). **Methods** The milk samples were purified and enriched by 5 kinds of different multi-toxin immunoaffinity columns respectively. The optimized UPLC-MS/MS was used for determination in the multi-reaction monitoring mode and quantitation by isotope internal standard method. The immunoaffinity column with comprehensive coverage of the mycotoxin pollution types in milk and the optimal recovery rate and stability was screened. The performance evaluation and methodological verification of the immunoaffinity column were conducted. Finally, the method was applied to actual sample detection. **Results** The immunoaffinity column A showed good accuracy and precision at low, medium and high addition levels for the 16 kinds of mycotoxins in milk, with the recoveries of spiked samples within the range of 83.6%–126.8%, and the relative standard deviations of 0.2%–18.4%. The residual levels of each toxin in column A were below the limit of detection with a column capacity of 21.8–1317.5 ng. The purified samples were enriched with immunoaffinity column A, and the linearity of each target toxin was good in the linear range, with the correlation coefficient greater than 0.99 and the limits of quantification of 0.0010–0.2000 ng/g. The method was applied to the detection of milk quality control sample and actual samples. The measured values of quality control samples were within the marked range. Lower levels of aflatoxin M₁, de-epoxy-deoxynivalenol and fumonisin B₁ could be detected in actual samples. **Conclusion** This study verified that screening immunoaffinity column A is applied to the determination of 16 kinds of mycotoxins in milk, and its column residue and column capacity can meet the determination of mycotoxin pollution in milk. The method is proved to be accurate, reliable and sensitive by the methodology, and is suitable for the daily detection of 16 kinds of mycotoxins in milk.

KEY WORDS: mycotoxin; milk; immunoaffinity; ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

0 引言

真菌毒素(mycotoxin)是产毒真菌产生的次级代谢产物,在农作物中污染普遍、种类繁多,主要包括黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)及其衍生物、伏马毒素(fumonisin, FBs)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)和赭曲霉毒素(ochratoxins, OTs)等,真菌毒素毒性复杂,具有强烈的致癌、致畸、遗传毒性和靶器官毒性^[1-5]。其中 AFs 是 1 类致癌物,对人有明确的致癌作用; OTs 和 FBs 是 2B 类致癌物,对人很可能有致癌作用^[6]。从农场到餐桌的真菌毒素污染问题威胁人类健康,是食品安全热点问题^[7-8]。牛奶具有很高的营养价值,是人类摄入蛋白质、维生素、微量元素等营养的重要来源,也是生产婴幼儿配方粉、婴幼儿食品的重要原料,其安全性一直都是社会关注的焦点^[9-10]。农作物中真菌毒素能够通过食物链以原型及其代谢物的形式污染牛奶^[11]。牛奶中最受关注的真菌毒素为黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin B₁, AFB₁)和黄曲霉毒素 M₁ (aflatoxin M₁, AFM₁),其中 AFM₁ 是 AFB₁ 在牛奶中的羟基代谢物,是牛奶和乳制品中污染率最高的真菌毒素^[12-14]。国际食品法典委员会(Codex Alimentarius

Commission, CAC)、欧盟和包括中国在内的许多国家对乳及乳制品中 AFM₁ 的限量要求非常严格,制定了 AFM₁ 在牛奶中的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)。欧盟委员会在 Commission Regulation (EC) No.1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs (consolidated version from 28/11/2019)中规定在成人和婴儿食用的牛奶中 AFM₁ 的 MRL 分别为 50 和 25 ng/L。我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定乳与乳制品中 AFM₁ 的限量值为 0.5 μg/kg(乳粉按生乳折算)。此外,牛奶和奶制品中也发现了 OTs、ZEN、T-2 毒素、FBs 和 DON^[15-16]。尽管还没有像 AFM₁ 那样被广泛研究,但这些毒素的实际污染情况仍不容忽视。目前牛奶中其他真菌毒素数据十分匮乏,亟待建立牛奶中多种真菌毒素同时检测的高灵敏方法^[17-18]。

牛奶基质前处理复杂且毒素含量低,是乳与乳制品中真菌毒素的检测的难点与挑战,目前常见的检测方法有酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA)^[19-22]、高效液相色谱-荧光检测法(high performance liquid chromatography-fluorescence detection, HPLC-FD)^[23-24]、液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry,

LC-MS)和高分辨质谱法^[25-27]。其中 ELISA 具有灵敏度高、特异性强、简单快速等优点,但此法存在假阳性问题,因此多用于快检筛查,不能作为确证方法。HPLC-FD 对于自身不能产生荧光的毒素,需要衍生化生成荧光物质进行检测,受毒素本身结构的局限且样品制备烦琐,因此主要用于 AFBs 和赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)的检测。而 LC-MS 虽然具有定性、定量准确和多种毒素同时测定的优势,但灵敏度较低,通过常规的液-液萃取、固相萃取 (solid-phase extraction, SPE)等净化策略难以达到满意的灵敏度。

免疫亲和柱 (immunoaffinity column, IAC) 净化技术是一种特殊的 SPE 净化技术,利用抗原抗体特异结合原理,使真菌毒素会与事先连接在固定相上的特异性抗体结合,淋洗去除基质中的杂质,有机溶剂洗脱目标毒素,从而富集浓缩目标毒素,大大提高方法灵敏度。随着多毒素 IAC 技术的发展,商业化复合免疫亲和柱相继出现,能够实现 AFBs、OTA、ZEN 等多类型毒素同时富集。该技术在粮食检测中使用较为广泛,常用于检测粮食中 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)、OTA、和 ZEN^[28],却极少应用于牛奶中的检测。由于不同品牌制备免疫亲和柱的工艺不同,可稳定结合的抗原毒素种类、容量也不尽相同,在牛奶基质中的适用性也有待考察。因此,本研究通过对 5 种不同多毒素 IAC 的性能考察和比较,将 IAC 与超高效液相色谱-串联质谱法 (ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS) 结合,用于测定牛奶中多种真菌毒素。从而拓展免疫亲和柱的应用基质和真菌毒素类型,提高牛奶中真菌毒素检测的灵敏度,解决牛奶中真菌毒素污染监测的技术瓶颈问题,为牛奶中真菌毒素暴露的风险评估提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

巴氏杀菌乳购于当地超市;复合免疫亲和柱 A(柱容量未说明, 2 mL)、复合免疫亲和柱 B(柱容量 10~500 ng, 2 mL)、复合免疫亲和柱 C(柱容量 200~5000 ng, 2 mL)、复合免疫亲和柱 D(柱容量 100~5000 ng, 2 mL)、复合免疫亲和柱 E(柱容量 100~1000 ng, 2 mL)(市场采购)。

甲醇、乙腈[色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司];甲酸(色谱纯,美国 Sigma 公司);磷酸盐(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液(pH 7.4, 美国 Vicam 公司);黄曲霉毒素混和标准溶液 (AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂)(质量浓度分别为 2.0、0.5、2.0、和 0.5 μg/mL)、AFM₁、T-2 毒素和 HT-2 毒素混和标准溶液、DON (100 μg/mL)、去环氧脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (de-epoxy-deoxynivalenol, DOM-1) (50 μg/mL)、3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (3-acetyldeoxynivalenol, 3-A-DON)、

15-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (15-acetyldeoxynivalenol, 15-A-DON)、ZEN (100 μg/mL)、玉米赤霉酮 (zearalenone, ZAN)、 α -玉米赤霉烯醇 (α -zearalenol, α -ZEL) (10 μg/mL)、 β -玉米赤霉烯醇 (β -zearalenol, β -ZEL) (10 μg/mL)、 α -玉米赤霉醇 (α -zearalanol, α -ZAL) (10 μg/mL)、 β -玉米赤霉醇 (β -zearalanol, β -ZAL) (10 μg/mL)、伏马毒素混和标准品 (FB₁、FB₂ 和 FB₃) (50 μg/mL)、OTA (10 μg/mL)、赭曲霉毒素 B (ochratoxin B, OTB) (10 μg/mL)(奥地利 Romer 公司)。

同位素内标: ¹³C-黄曲霉毒素 B₁ (¹³C-AFB₁, 0.5 μg/mL)、¹³C-黄曲霉毒素 G₁ (¹³C-AFG₁, 0.5 μg/mL)、¹³C-黄曲霉毒素 B₂ (¹³C-AFB₂, 0.5 μg/mL)、¹³C-黄曲霉毒素 G₂ (¹³C-AFG₂, 0.5 μg/mL)、¹³C-黄曲霉毒素 M₁ (¹³C-AFM₁, 0.5 μg/mL)、¹³C-T-2 毒素 (25 μg/mL)、¹³C-HT-2 毒素 (25 μg/mL)、¹³C-脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (¹³C-DON, 25 μg/mL)、¹³C-3-乙酰基脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (¹³C-3A-DON, 25 μg/mL)、¹³C-玉米赤霉酮 (¹³C-ZEN, 25 μg/mL)、¹³C-赭曲霉毒素 A (¹³C-OTA, 10 μg/mL)、¹³C-伏马毒素 B₁ (¹³C-FB₁, 5 μg/mL)、¹³C-伏马毒素 B₂ (¹³C-FB₂, 5 μg/mL)、¹³C-伏马毒素 B₃ (¹³C-FB₃, 5 μg/mL)(奥地利 Biopure 公司)。

1.2 仪器与设备

Vortex Genie2T 型旋涡混合器 (美国 Scientific Industries 公司); Millipore Milli-Q 超纯水仪 (美国 Millipore 公司); ACQUITY UPLC I-Class 超高效液相色谱-Xevo TQ-S 三重四极杆质谱联用仪、CORTECS C₁₈ 色谱柱 (100 mm×2.1 mm, 1.6 μm)(美国 Waters 公司); MS304S 万分之一电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 标准溶液的配制

分别移取适量的真菌毒素标准溶液,加乙腈/水(50:50, V:V)稀释至特定浓度,毒素质量浓度为 80~4000 ng/mL。按照相同的方法,准确称取 14 种真菌毒素内标标准品稀释至 20~1000 ng/mL,以上储备液置于-20℃冰箱保存。

1.3.2 样品前处理

准确量取空白牛奶样品 10.0 g,加入混合标准溶液,加入内标混合溶液,涡旋混匀。选取常见的 5 种商品化复合免疫亲和柱,分别按其操作指南进行操作。每种免疫亲和柱操作方法略有差异,总体过程如下:将免疫亲和柱放置室温,在重力作用下使柱内液体流出,加入上述待净化稀释液。在重力作用下,待净化稀释液以 1 滴/s 的速度通过免疫亲和柱,待全部通过后,加入 5~10 mL 淋洗溶剂以 1~2 滴/s 的速度通过免疫亲和柱。加入 3 mL 甲醇/乙酸(98:2, V:V)洗脱溶剂,柱内停留 30 s~5 min 后,以 1~2 滴/s 的速度进行洗脱,并收集洗脱剂,在 40℃氮气下吹至近干,1 mL 初始流动相复溶,待进样分析。

1.3.3 仪器条件

液相色谱条件: CORTECS C₁₈ 色谱柱(100 mm×2.1mm, 1.6 μm), 柱温 40°C, 进样体积 5 μL。流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B), 流速 0.35 mL/min。梯度洗脱程序: 0.0~7.0 min, 10%~60% B; 7.1~8.0 min, 90% B; 8.0~8.1 min, 90%~10% B; 8.1~10 min, 10% B。

质谱条件: 采用电喷雾离子源; 毛细管电压 3.0 kV (ESI+)/3.5 kV (ESI-); 离子源温度 150°C; 去溶剂温度 500°C; 脱溶剂气流速为 800 L/h; 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式; 优化后的22种真菌毒素母离子、子离子质谱参数见表1。

1.3.4 数据处理

采用 Excel 2019 和 Origin 9.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 仪器条件的优化选择

将22种真菌毒素的标准溶液稀释至1 μg/mL, 与流动相通过 combine 模式质谱进样分别评估正/负离子模式下该毒素化合物的电离响应。其中 AFB₁、AFG₁、AFB₂、AFG₂、AFM₁、T-2、HT-2、DON、DOM-1、3-A-DON、15-A-DON、FB₁、FB₂、FB₃、OTA、OTB 及其同位素内标化合物在正

表1 目标化合物质谱参数
Table 1 MS parameters of targeted compounds

真菌毒素	ESI 模式	母离子	保留时间/min	定量离子/定性离子	锥孔电压/V	碰撞电压/eV
AFB ₁	ESI+	313.1	4.22	241.2/285.0	10	34/20
AFG ₁	ESI+	329.0	3.85	243.1/311.1	36	28/20
AFB ₂	ESI+	315.1	3.90	259.1/287.1	8	26/24
AFG ₂	ESI+	331.1	3.53	245.2/313.2	20	18/20
AFM ₁	ESI+	329.1	3.24	243.1/311.1	36	28/20
T-2	ESI+	484.3	6.00	185.1/305.2	15	17/15
HT-2	ESI+	425.3	4.76	245.1/263.2	13	12/12
DON	ESI+	297.2	1.38	203.2/249.1	20	16/10
DOM-1	ESI+	281.1	1.83	215.0/233.2	12	12/11
3-A-DON	ESI+	339.1	2.73	203.1/249.1	20	18/10
15-A-DON	ESI+	339.2	2.65	137.1/321.1	18	10/8
FB ₁	ESI+	722.4	3.94	334.4/352.4	42	40/32
FB ₂	ESI+	706.5	4.76	318.4/336.4	40	38/38
FB ₃	ESI+	706.5	4.44	318.4/336.4	40	38/38
OTA	ESI+	404.1	6.39	239.0/358.1	21	27/13
OTB	ESI+	370.0	5.43	187.0/205.0	24	37/23
¹³ C-AFB ₁	ESI+	330.2	4.22	301.2	8	20
¹³ C-AFB ₂	ESI+	332.1	3.90	303.1	42	24
¹³ C-AFG ₁	ESI+	346.1	3.85	257.2	18	24
¹³ C-AFG ₂	ESI+	348.2	3.53	330.1	6	25
¹³ C-AFM ₁	ESI+	346.0	3.24	242.0	58	40
¹³ C-T-2	ESI+	508.3	6.00	322.2	15	15
¹³ C-HT-2	ESI+	447.0	4.76	278.2	13	10
¹³ C-DON	ESI+	312.0	1.38	283.0	18	10
¹³ C-3-A-DON	ESI+	356.1	2.73	330.1	6	25
¹³ C-FB ₁	ESI+	756.5	3.94	356.4	42	40
¹³ C-FB ₂	ESI+	740.5	4.76	358.4	40	38
¹³ C-FB ₃	ESI+	740.5	4.44	358.4	40	38
¹³ C-OTA	ESI+	424.1	6.39	250.1	21	27
ZEN	ESI-	317.2	6.37	175.2/131.1	16	24/29
ZAN	ESI-	319.1	6.32	205.0/275.0	48	22/20
α-ZEL	ESI-	319.1	5.54	159.8/174.1	44	30/28
β-ZEL	ESI-	319.1	5.01	159.8/174.1	44	30/28
α-ZAL	ESI-	321.1	5.41	277.0/303.1	10	25/22
β-ZAL	ESI-	321.1	4.90	277.0/303.1	10	25/22
¹³ C-ZEN	ESI-	335.0	6.37	185.0/290.0	30	24/28

离子模式下响应较好;ZEN、ZAN、 α -ZEL、 β -ZEL、 α -ZAL、 β -ZAL 在负离子模式下响应较强,根据响应和离子稳定性选择适当的母离子。进一步在不同碰撞能量下,观察子离子变化过程,优化能量电压。在待测目标物中,极性差异较大,AFG₁和AFM₁, α -ZEL和 β -ZEL, α -ZAL和 β -ZAL,FB₂和FB₃为同分异构体,且具有相同的离子对,为了使目标化合物在一支色谱柱实现分离,避免相互干扰,需要优化流动相梯度实现基线分离。本研究考察了两种色谱柱ACQUITY UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μ m)和CORTECS C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.6 μ m)分别在0.1%甲酸水-乙腈、0.1%甲酸水-甲醇两种流动相体系中的分离效果。结果表明,CORTECS C₁₈在0.1%甲酸水-乙腈系统中能使所有待测物具有更高响应,并且柱效较高,使以上同分异构待测物都实现基线分离,并获得对称峰型和稳定响应。最终确定1.3.3中的液相色谱条件。22种真菌毒素化合物及其同位素内标的质谱参数如表1所示。

2.2 多毒素 IAC 的性能比较

本方法利用商品化免疫亲和萃取柱扩大其适用范围,将其应用于牛奶基质和主要真菌毒素的代谢物的检测。(1)利用抗体反应环境与牛奶基质相兼容的优势,可通过大体积上样提高灵敏度。商品化免疫亲和萃取柱针对粮食基质开发,上样前需要通过适当配比极性的溶剂对研磨均匀的粮食样品进行提取;用PBS稀释提取溶剂,改变溶剂极性再上样,使抗体与毒素能够发挥结合作用。本方法利用牛

奶良好的生物相容性,无需事先稀释样品调整上样溶液极性与pH,同时利用大体积上样和少量有机溶剂洗脱,最终实现高效的富集-浓缩,大大提高方法灵敏度。(2)目前市面上多毒素复合免疫亲和柱多声称能够特异性结合4-7种主要真菌毒素,包括AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂、OTA、FB₁、DON、ZEN和T-2等。根据免疫亲和柱抗体与毒素结合的构效关系原理,本研究将抗原毒素和与其结构类似的22种毒素共同作为考察对象,考察5种免疫亲和柱对牛奶中22种毒素的分离富集效果,从而筛选出更多方法目标毒素,扩展免疫亲和柱适用毒素类别。

本研究通过对牛奶低中高3个水平的平行加标实验,分析A、B、C、D、E5种ICA对22种毒素的回收率和重复性,如表2所示。从结果可以看出,对于AFB₁、T-2、DON、ZEN和OTA5种常见的真菌毒素,A、B、C、D、E5种免疫亲和柱都具有较好的富集效果。对于规定了牛奶中限量值的AFM₁,免疫亲和柱A、D、E在限量水平0.5 ng/g具备良好的方法准确性和稳定性。除了以上毒素,免疫亲和柱A还对AFB₂、AFG₁、AFG₂、HT-2、DOM-1、3-A-DON、ZAN、FB₂、FB₃都具有满意的回收率和精密度(表2)。说明免疫亲和柱A上的抗体能够特异识别较多类型的真菌毒素且具有良好、稳定的结合能力,适用于牛奶中该16种真菌毒素的检测,16种真菌毒素的MRM色谱图如图1所示。因此,本研究选择免疫亲和柱A,进一步考察其柱本底和柱容量,并对方法进行详细验证。

表 2 5种免疫亲和柱在不同加标水平下的回收率与精密度($n=3$)
Table 2 Recoveries and precision of 5 kinds of immunoaffinity columns at different spiked levels ($n=3$)

化合物	加标水平 /(ng/g)	A		B		C		D		E	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
AFB ₁	0.004	116.3	13.7	96.3	16.5	133.8	19.8	103.8	5.1	103.1	6.0
	0.040	108.5	8.5	94.5	1.1	100.8	2.8	97.4	12.5	94.0	12.4
	0.440	94.9	4.0	104.3	7.6	97.4	4.1	111.8	10.9	101.8	3.4
AFG ₁	0.004	113.3	18.4	ND	ND	82.5	87.0	ND	141.4	ND	ND
	0.040	98.4	2.7	81.9	1.1	109.9	59.0	115.1	33.3	81.5	25.6
	0.440	107.5	14.1	113.4	10.5	121.3	0.4	96.1	6.9	102.1	11.6
AFB ₂	0.001	115.0	4.3	135.7	4.0	215.0	16.4	97.8	40.2	141.8	18.2
	0.010	106.5	3.3	115.5	4.3	107.0	17.2	107.4	13.9	142.5	131.2
	0.110	91.8	10.0	37.0	42.7	93.7	0.6	90.6	3.3	93.6	6.0
AFG ₂	0.001	96.0	8.8	140.0	20.2	160.0	17.7	ND	ND	ND	ND
	0.010	99.5	16.9	68.5	25.8	84.0	37.0	56.0	22.7	ND	ND
	0.110	106.4	2.3	108.3	3.6	104.6	6.8	158.4	14.6	ND	ND
AFM ₁	0.001	112.0	17.2	27.0	60.6	77.0	40.9	72.0	5.4	ND	ND
	0.010	101.5	2.1	106.5	31.2	79.5	25.8	75.0	17.0	103.8	7.1
	0.110	111.3	6.0	51.0	32.1	72.9	37.6	83.3	10.7	152.0	4.7
T-2	0.2	105.6	7.2	94.4	3.7	189.0	4.6	99.5	46.8	103.6	31.6
	2.0	98.6	1.4	178.1	10.6	232.5	37.3	83.1	12.0	97.8	10.6
	22.0	84.2	0.2	90.2	2.1	90.7	3.0	90.3	5.6	94.2	5.9
HT-2	0.2	126.8	3.7	300.3	0.5	291.5	23.8	312.3	27.2	135.7	9.7
	2.0	105.0	5.3	104.4	9.5	120.2	19.4	80.4	2.6	130.4	10.0
	22.0	95.5	5.4	117.5	1.2	132.4	7.2	251.7	4.5	267.5	3.6

表2(续)

化合物	加标水平 (ng/g)	A		B		C		D		E	
		回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%	回收率/%	RSDs/%
DON	0.2	95.9	13.6	102.3	10.9	124.9	30.3	372.5	45.8	108.5	8.1
	2.0	101.7	0.4	102.6	0.6	118.4	14.0	114.7	3.3	123.2	6.2
	22.0	111.2	7.3	107.6	8.2	104.6	2.0	122.4	4.9	107.5	4.0
DOM-1	0.1	90.7	9.57	ND	ND	225.3	69.4	ND	ND	ND	ND
	1.0	100.6	4.96	ND	ND	133.4	0.3	ND	ND	104.6	10.5
	11.0	83.6	7.89	ND	ND	173.4	24.4	ND	ND	90.1	6.5
3-A-DON	0.2	95.7	4.58	ND	ND	88.8	1.8	ND	ND	89.3	8.7
	2.0	90.3	2.71	ND	ND	89.8	0.4	ND	ND	85.8	1.7
	22.0	87.6	2.88	ND	ND	91.7	4.7	ND	ND	87.3	7.0
15-A-DON	0.2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	2.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	22.0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ZEN	0.2	101.2	11.6	100.7	29.4	98.2	42.6	251.9	0.2	180.2	21.0
	2.0	109.7	3.8	109.6	2.4	114.0	6.1	112.5	1.6	112.2	2.7
	22.0	103.0	2.3	102.0	4.9	97.8	3.5	98.3	4.0	98.7	4.2
ZAN	0.02	106.4	15.7	90.1	104.9	118.0	15.0	146.3	7.0	169.4	11.0
	0.20	111.6	7.5	133.3	0.3	117.9	16.7	121.4	4.0	124.6	13.5
	2.20	110.9	7.4	135.8	4.3	116.3	6.3	105.4	8.2	107.2	5.3
α -ZEL	0.02	160.0	1.8	148.3	0.7	145.0	1.5	255.5	37.6	264.1	19.2
	0.20	145.6	24.0	160.6	6.7	165.4	13.9	120.2	5.3	182.7	11.7
	2.20	182.4	11.1	167.9	7.9	166.6	2.7	156.4	9.3	156.4	12.5
β -ZEL	0.02	270.8	39.6	197.8	77.4	193.8	6.0	173.5	43.6	248.4	3.2
	0.20	193.9	22.2	186.1	8.7	238.8	7.0	119.0	12.4	280.1	18.6
	2.20	244.0	17.4	208.7	0.9	231.6	6.4	190.6	2.4	197.4	7.1
α -ZAL	0.02	204.0	30.8	219.3	19.8	234.3	5.3	176.3	1.0	300.6	3.5
	0.20	166.1	19.6	203.4	8.2	160.8	20.0	111.1	1.9	227.8	5.6
	2.20	253.9	14.7	223.0	7.1	205.0	8.6	192.6	2.9	258.5	10.6
β -ZAL	0.02	212.3	36.5	241.8	46.1	200.8	0.5	116.5	4.9	178.5	3.2
	0.20	124.7	7.8	119.4	2.3	86.7	21.4	80.9	4.2	240.8	3.1
	2.20	267.3	15.2	228.8	3.9	217.4	7.7	211.5	10.9	225.7	19.1
FB ₁	0.1	94.5	1.0	76.9	0.8	91.2	3.1	93.5	1.1	94.1	2.0
	1.0	104.0	9.5	55.2	5.2	94.1	1.7	43.3	26.7	40.6	5.1
	11.0	91.7	5.5	85.2	7.2	67.6	4.5	90.6	5.7	95.5	7.4
FB ₂	0.1	113.1	7.1	106.3	21.5	108.5	9.3	94.8	4.7	98.7	10.4
	1.0	112.3	13.9	128.5	25.2	170.9	16.5	86.0	13.6	100.8	13.4
	11.0	92.9	0.2	101.3	3.1	105.7	1.9	100.7	1.5	98.5	2.6
FB ₃	0.05	116.2	6.8	111.4	1.5	106.2	14.9	118.1	16.0	88.6	6.6
	0.50	108.3	6.6	118.2	1.9	112.3	5.8	114.5	20.6	65.2	18.1
	5.50	102.7	4.8	108.3	2.7	120.0	8.5	117.7	9.9	83.8	8.8
OTA	0.02	110.0	10.9	107.8	18.0	84.8	23.8	161.8	9.8	131.3	5.1
	0.20	110.0	10.2	109.4	3.0	105.6	11.7	113.8	1.2	108.3	0.0
	2.20	97.0	1.8	98.8	2.0	94.7	2.1	103.0	12.5	99.5	2.8
OTB	0.02	ND	ND	527.0	2.4	344.0	7.8	246.5	22.7	300.3	8.8
	0.20	ND	ND	478.1	8.9	220.8	8.3	289.4	11.4	471.6	10.9
	2.20	ND	ND	260.1	4.9	155.2	8.9	176.5	11.6	215.0	21.0

注: ND 为未检出(小于检出限), 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs), 下同。

2.3 柱残留和柱容量测试

免疫亲和净化柱在获得抗体及生产过程中易有抗原毒素的残留干扰检测结果。本研究将 10 mL PBS 通过免疫亲和柱 A, 按 1.3.2 操作, 经过淋洗、洗脱, UPLC-MS/MS 检测洗脱液中 16 种毒素残留, 均未检出。为了在实际检测中避免样本超载, 需验证在牛奶基质中免疫亲和柱吸附量,

从而确定上样量, 既达到满意的灵敏度又避免发生过载。由于实际牛奶样品中真菌毒素的含量远低于谷物样品中的浓度, 因此本研究并未选择产品声称的理论容量进行验证, 而是选择添加了混合标准溶液的空白牛奶基质, 优先考虑乳制品中常见的 AFM₁ 柱容量, 将混合标准储备液按 AFM₁ 含量为 2.5 ng/g(限量值 5 倍)添加到牛奶基质中并进行验证, 此时的 AFM₁ 测试柱容量为 25 ng, 其他毒素浓度

如表 3 所示。加标牛奶基质经免疫亲和柱 A 富集, 经洗涤和洗脱后测定回收率(表 3)。将测试容量用回收率校正后, 得到实际使用柱容量为 21.8~1317.5 ng。按上样体积换算后, 柱饱和状态下, 牛奶中的各毒素含量在 2.2~131 ng/g 之间, 对比各国牛奶污染数据^[25,29-30], 该容量已远远超过正常污染水平, 能够满足污染样品实际检测需要。

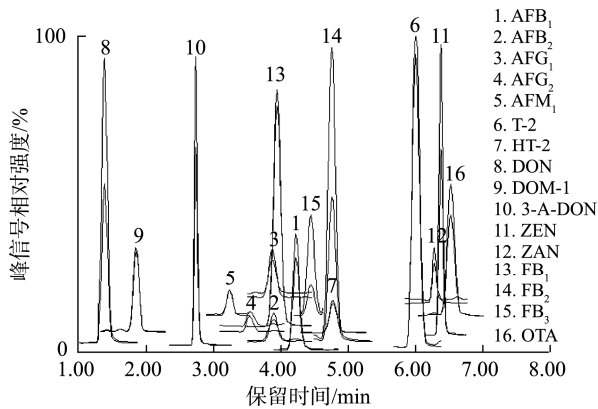


图 1 16 种目标真菌毒素的 MRM 色谱图

Fig.1 MRM chromatograms of 16 kinds of targeted mycotoxins

2.4 基质效应评价

待测物在离子源中的离子化反应受样品基质影响, 发生响应抑制或增强的现象叫做基质效应(matrix effect, ME)。将按 1.3.2 操作 IAC 净化后的空白牛奶基质中加入 16 种毒素混合标准溶液, 混匀后比较各毒素在基质与在初始流动相溶剂中的响应峰面积比值, 比值小于 100%表明存在基质抑制作用, 大于 100%表明存在基质增强作用, 越接近 100%基质效应越小, 反之则基质效应越严重。从表 4

中可以看出 16 种真菌毒素的 ME 范围在 25.3%~127.4%之间, 对于大多数真菌毒素存在基质抑制效应, 因此采用同位素内标校正法校正。本方法选择在样品净化前加入同位素内标, 该策略与净化后在提取液中加入同位素内标相比, 不但可以校正 ME, 还可以校正富集净化过程中产生的损失。16 种待测毒素中, DOM-1、15-A-DON 和 ZAN 分别以结构、性质相似的 ¹³C-DON、¹³C-3-A-DON 和 ¹³C-ZEN 作为同位素内标, 其他毒素均以其自身对应的 ¹³C 标记化合物作为内标, 来校正 ME 和前处理损失。

表 3 免疫亲和柱 A 柱容量

Table 3 Column capacity of immunoaffinity column A

目标毒素	容量测试水平/ng	回收率/%	实际柱容量/ng
AFB ₁	100	66.3	66.3
AFG ₁	100	46.4	46.4
AFB ₂	25	87.3	21.8
AFG ₂	25	102.3	25.6
AFM ₁	25	98.2	24.6
T-2	500	94.4	472.0
HT-2	5000	17.5	875.0
DON	5000	12.1	605.0
DOM-1	5000	10.7	535.0
3-A-DON	2500	13.4	335.0
ZEN	5000	13.8	690.0
ZAN	5000	15.4	770.0
FB ₁	500	86.6	433.0
FB ₂	2500	16.5	412.5
FB ₃	2500	12.1	302.5
OTA	2500	52.7	1317.5

表 4 方法线性相关系数、线性范围、检出限、定量限和 ME

Table 4 Linearity correlation coefficients, linearity ranges, LODs and LOQs, and ME

目标毒素	线性相关系数(<i>r</i>)	线性范围/(ng/mL)	LODs/(ng/g)	LOQs/(ng/g)	MEs/%
AFB ₁	0.9994	0.04~4.00	0.0010	0.0020	67.7
AFG ₁	0.9985	0.04~4.00	0.0010	0.0020	82.6
AFB ₂	0.9918	0.01~1.00	0.0003	0.0010	80.6
AFG ₂	0.9961	0.01~1.00	0.0003	0.0010	98.5
AFM ₁	0.9939	0.01~1.00	0.0003	0.0010	107.5
T-2	0.9970	2~200	0.0200	0.0500	71.2
HT-2	0.9969	2~200	0.1000	0.2000	104.3
DON	0.9971	2~200	0.0100	0.0500	42.1
DOM-1	0.9972	1~100	0.0400	0.1000	52.8
3-A-DON	0.9998	2~200	0.0100	0.0500	78.8
ZEN	0.9994	2~200	0.0100	0.0200	37.6
ZAN	0.9983	2~200	0.0100	0.0200	41.5
FB ₁	0.9982	1~100	0.0040	0.0100	127.4
FB ₂	0.9986	1~100	0.0010	0.0050	32.5
FB ₃	0.9963	0.5~50.0	0.0040	0.0100	33.3
OTA	0.9958	0.2~20.0	0.0010	0.0020	25.3

注: 检出限(limits of detection, LODs); 定量限(limits of quantitation, LOQs)。

2.5 方法学考察

真菌毒素混合标准储备液经逐级稀释, 添加混合同位素内标, 制成标准曲线, 同位素稀释法定量。结果如表4所示, 各真菌毒素在线性范围内相关系数均大于0.99。在空白牛奶中添加16种毒素混合内标溶液, 经免疫亲和柱A富集分离, 分别以3倍信噪比($S/N=3$)和10倍信噪比($S/N=10$)时相应的加标量为方法的LODs和LOQs。16种真菌毒素的LOQs在0.0010~0.2000 ng/g之间, AFM₁的LOQ为0.0010 ng/g, 低于AFM₁在牛奶中的限量值(0.5 ng/g)500倍, 能够满足食品安全监测和健康风险评估的需要。向空白牛奶中添加低、中、高水平的真菌毒素标准溶液, 考察本方法的回收率, 平均添加回收率为83.6%~126.8%, RSDs为0.2%~18.4%(图2)。本研究建立的方法用于牛奶中16种毒素在较宽的含量范围内, 均具有较好的准确度与精密度。

2.6 质量控制和实际样品分析

为进一步验证方法的准确性和适用性, 本研究测定了3份市售牛奶实际样品和一种牛奶质控样品(QC-MI-703), 结果如表5所示, AFM₁的测定值为0.479 μg/kg, 在标示范围0.323~0.653 μg/kg内, 且接近标示值0.488 μg/kg, 表明方法准确可靠。采用本方法对3份牛奶样品进行测定, 一个样品检出AFM₁, 含量为0.001 μg/kg, 远低于

限量值标准0.5 μg/kg; 两个样品检出DOM-1, 含量为0.097和0.160 μg/kg; 3个样品均检出含量较低的FB₁, 含量分别为0.020~0.046 μg/kg(表5)。说明该方法灵敏度高, 能够用于检测实际样品中较低含量的真菌毒素残留。

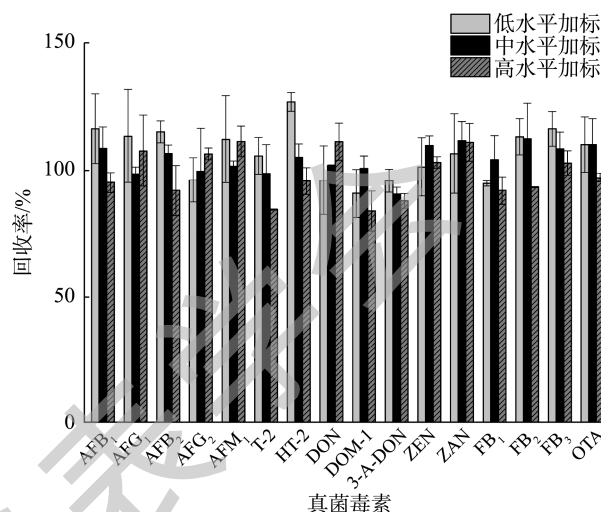


图2 16种真菌毒素在牛奶中低、中、高3个标准添加水平的回收率与精密度($n=3$)

Fig.2 Recoveries and precision of 16 kinds of mycotoxins in milk spiked at low, medium and high levels of standards ($n=3$)

表5 质控样品和实际样品测定结果

Table 5 Analyzed results of the quality control sample and actual samples

检出毒素	质控样品 QC-MI-703		牛奶样品 S1	牛奶样品 S2	牛奶样品 S3
	检测值/(μg/kg)	标示值/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)
AFM ₁	0.479	0.488	0.001	ND	ND
DOM-1	ND	ND	0.160	0.097	ND
FB ₁	ND	ND	0.031	0.020	0.046

3 结论

本研究通过使用商品化5种免疫亲和柱对牛奶中多种真菌毒素进行富集净化, 拓展其基质和目标毒素适用范围, 并进行回收率和精密度评价。选择对16种真菌毒素回收率和精密满意的免疫亲和柱A, 评价其柱残留和柱容量, 开发优化UPLC-MS/MS并进行详细的方法学验证, 最终将其应用于质控样品和真实牛奶样品的检测。结果表明, 该方法准确、可靠、灵敏度高, 适用于牛奶中多种真菌毒素的日常监测。

参考文献

[1] Joint FAO/WHO expert committee on food additives. Evaluation of certain contaminants in food: Eighty-third report of the joint FAO/WHO Expert committee on food additives [R]. WHO Technical Report Series, 2017.

[2] WATSON S, MOORE SE, DARBOE MK, *et al.* Impaired growth in rural Gambian infants exposed to aflatoxin: A prospective cohort study [J]. BMC Publ Health, 2018, 18: 1247.

[3] SHIRIMA CP, KIMANYA ME, ROUTLEDGE MN, *et al.* A prospective study of growth and biomarkers of exposure to aflatoxin and fumonisin during early childhood in Tanzania [J]. Environ Health Perspect, 2015, 123: 173-178.

[4] WARTH B, PREINDL K, MANSER P, *et al.* Transfer and metabolism of the xenoestrogen zearalenone in human perfused placenta [J]. Environ Health Perspect, 2019, 127: 107004.

[5] HOHENBICHLER J, AICHINGER G, RYCHLIK M, *et al.* *Alternaria alternata* toxins synergistically activate the aryl hydrocarbon receptor pathway *in vitro* [J]. Biomolecules, 2020, 10: 1018.

[6] International Agency for Research on Cancer Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [J]. Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2002, 82: 1-556.

- [7] EKWOMADU TI, AKINOLA SA, MWANZA M. Fusarium mycotoxins, their metabolites (free, emerging, and masked), food safety concerns, and health impacts [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18: 11741.
- [8] MOUDGIL P, BEDI JS, AULAKH RS, *et al.* Antibiotic residues and mycotoxins in raw milk in Punjab (India): A rising concern for food safety [J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 56(11): 5146–5151.
- [9] BECKER-ALGERI TA, CASTAGNARO D, DE BORTOLI K, *et al.* Mycotoxins in bovine milk and dairy products: A review [J]. *J Food Sci*, 2016, 81(3): R544–R552.
- [10] FLORES-FLORES ME, LIZARRAGA E, CERAIN AL, *et al.* Presence of mycotoxins in animal milk: A review [J]. *Food Control*, 2015, 53: 163–176.
- [11] ROCCHETTI G, GHILARDELLI F, BONINI P, *et al.* Changes of milk metabolomic profiles resulting from a mycotoxins-contaminated corn silage intake by dairy cows [J]. *Metabolites*, 2021, 11(8): 475.
- [12] KETNEY O, SANTINI A, OANCEA S. Recent aflatoxin survey data in milk and milk products: A review [J]. *Int J Dairy Technol*, 2017, 70(3): 320–331.
- [13] AWIASHEH SS, RAHAHLEH RJ, ALGROOM RM, *et al.* Contamination level and exposure assessment to aflatoxin M₁ in Jordanian infant milk formulas [J]. *Ital J Food Saf*, 2019, 8(3): 8263.
- [14] MILICEVIC DR, MILESEVIC L, GURINOVIC M, *et al.* Dietary exposure and risk assessment of aflatoxin M₁ for children aged 1 to 9 years old in serbia [J]. *Nutrients*, 2021, 13: 4450.
- [15] OGUNADE IM, MARTINEZ-TUPPIA C, QUEIROZ OCM, *et al.* Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation [J]. *J Dairy Sci*, 2018, 101(5): 4034–4059.
- [16] USHKALOV VV, DANCHUK S, MIDYK N, *et al.* Mycotoxins in milk and in dairy products [J]. *J Food Sci Technol*, 2020, 14: 137–149.
- [17] DENNIS KK, MARDER E, BALSHAWD, *et al.* Biomonitoring in the era of the exposome [J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125: 502–510.
- [18] ADEGBEYE MJ, REDDY PRK, CHILAKA CA, *et al.* Mycotoxin toxicity and residue in animal products: Prevalence, consumer exposure and reduction strategies-A review [J]. *Toxicon*, 2020, 177: 96–108.
- [19] ISLAM F, TRISHA AD, HAFSA JM, *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in human breast milk in bangladesh [J]. *Mycotoxin Res*, 2021, 37: 241–248.
- [20] WARTH B, BRAUN D, EZEKIEL CN, *et al.* Biomonitoring of mycotoxins in human breast milk: Current state and future perspectives [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29: 1087–1097.
- [21] MAGGIRA M, IOANNIDOU M, SAKARIDIS I, *et al.* Determination of aflatoxin M₁ in raw milk using an HPLC-FL method in comparison with commercial elisa kits-application in raw milk samples from various regions of greece [J]. *Vet Sci*, 2021, 108(3): 46.
- [22] SANG P, LU G, YU D, *et al.* Simultaneous determination of antibiotics, mycotoxins, and hormones in milk by an 8-17 dnzyme-based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(39): 12681–12688.
- [23] HOOSHFAR S, KHOSROKHAVAR R, YAZDANPANA H, *et al.* Health risk assessment of aflatoxin M₁ in infant formula milk in Iran [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 142: 111455.
- [24] WOOD JE, GILL BD, INDYK HE, *et al.* Determination of aflatoxin M₁ in liquid milk, cheese, and selected milk proteins by automated online immunoaffinity cleanup with liquid chromatography-fluorescence detection [J]. *J AOAC Int*, 2021, 104(3): 719–724.
- [25] IZZO L, RODRIGUEZ-CARRASCO Y, TOLOSA J, *et al.* Target analysis and retrospective screening of mycotoxins and pharmacologically active substances in milk using an ultra-high-performance liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry approach [J]. *J Dairy Sci*, 2020, 103(2): 1250–1260.
- [26] ZHAO Y, YUAN YC, BAI XL, *et al.* Multi-mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC-Q-exactive HRMS after magnetic solid-phase extraction based on PEGylated multi-walled carbon nanotubes [J]. *Food Chem*, 2020, 305: 125429.
- [27] ROCCHETTI G, GHILARDELLI F, MASOERO F, *et al.* Screening of regulated and emerging mycotoxins in bulk milk samples by high-resolution mass spectrometry [J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2025.
- [28] ABDALLAH MF, GIRGIN G, BAYDAR T. Mycotoxin detection in maize, commercial feed, and raw dairy milk samples from Assiut City, Egypt [J]. *Vet Sci*, 2019, 6: 57.
- [29] LI SL, MIN L, WANG G, *et al.* Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk from manufacturers of infant milk powder in China [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2018, 15: 879.
- [30] CINTECOTTO ACT, PANTE GC, CASTRO JC, *et al.* Occurrence, exposure evaluation and risk evaluation in child population for aflatoxin M₁ in dairy products in Brazil [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 148: 111913.

(责任编辑: 张晓寒 于梦娇)

作者简介

张 烁, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品污染物暴露解析。
E-mail: zhangsh@cfsa.net.cn

周 爽, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品污染物暴露解析。
E-mail: zhoush@cfsa.net.cn