

全自动固相萃取-高效液相质谱联用测定奶粉及牛奶中的 M_1

1. 介绍

黄曲霉毒素是黄曲霉菌和寄生曲霉菌的代谢产物之一， M_1 是这些产物中的一种，这种物质多在奶制品中发现。对于纯牛奶产品检出超标的黄曲霉毒素 M_1 来说，一是可能储存不当，或加工、运输过程中污染，长出霉菌；二是可能是奶牛食用的饲料中含有过量黄曲霉毒素 B_1 ，经过消化吸收发生羟基化生成了 M_1 ，而后在产奶过程中转移到牛奶里。

黄曲霉毒素被动物食用后，一部分会蓄积在动物的体内，另外一部分则会转化到乳汁和尿液中，转化率一般为 3.45%-11.39%。因此，为保证牛奶中的黄曲霉毒素 M_1 不超过 $0.5\mu\text{g/kg}$ ，美国食品与药品监督管理局（FDA）规定饲料中的黄曲霉毒素 B_1 不得超过 $30\mu\text{g/kg}$ 。

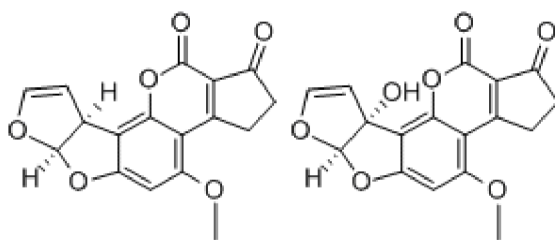


图-1.黄曲霉毒素 B_1 和 M_1 的结构式（左为 B_1 ，右为 M_1 ）

本应用文章参考 GB 5009.24-2016《食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中第一法，采用免疫亲和柱净化，高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）

联用技术检测，建立了奶粉和牛奶中对黄曲霉毒素高灵敏度的前处理和检测分析方法，对于 M_1 毒素的加标回收率在 90-110%之间。

关键字：全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；黄曲霉毒素 M_1

2. 仪器、试剂以及耗材

Raykol Fotector Plus 全自动固相萃取仪

黄曲霉毒素 M_1 免疫亲和柱（Romer, 60 mg/3 mL）

高效液相色谱：（HPLC）Agilent 1260，质谱检测器：（MS）Agilent 6410

氮气吹干装置：Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

Raykol AH-30 全自动均质器

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

3. 样品提取与净化

3.1 样品提取

3.1.1 奶粉样品前处理

将 1 g 奶粉充分溶解于 25 mL 30-35℃温水中，混匀后备用。

3.1.2 牛奶样品前处理

取 25 g 牛奶样品在 30-35℃孵育，直接进行样品上免疫亲和柱净化。

（上述两种的前处理根据 Romer 免疫亲和柱厂家的应用方法推荐。同样采用国标中甲醇的蛋白

沉淀法亦可，但请将上样液中的甲醇含量降低至 15% 以下，否则可能降低免疫亲和柱的吸附能力）

3.1.3 空白样品

空白样品以提取液为样品，进行上述实验操作。

3.3 固相萃取净化

以 3 mL/min 的速度精确上样 25 mL 待测液，5 mL PBS 缓冲溶液润洗样品瓶，10 mL 水淋洗，气推 50 mL 吹干免疫亲和柱，推速为 160 mL/min；最后以 1 mL 的甲醇，以 0.2-0.3 mL/min 的速度洗脱样

品，以 1 mL 的去离子水快速洗脱，收集结束后加入去离子定容至 2 mL，备用。详细步骤见图-2。
(Fotector Plus 上下位机软件版本在 v2.21 以上)。

3.2 固相萃取净化条件

全自动固相萃取仪	睿科 Fotector Plus/Fotector 02HT
固相萃取柱	黄曲霉毒素免疫亲和柱 (Romer, 60 mg/3 mL)
淋洗	纯水
洗脱	甲醇

序号	命令	溶剂	排出	流速 (mL/min)	体积 (mL)	时间 (min)
1	清洗样品通道	CH3OH		40	5	1.7
2	填充样品路径	0.01M PBS ...		50	2	1.2
3	特殊上样		废液1	3	25	9.9
4	清洗样品瓶	0.01M PBS ...	废液1	80	5	2.6
5	淋洗	H2O	废液1	10	5	0.9
6	气推		废液1	160	50	3.1
7	清洗注射泵	CH3OH		80	1	0.3
8	洗脱	CH3OH	收集	5	1	0.5
9	气推		收集	0.2	1.5	7.9
10	洗脱	H2O	收集	20	0.7	0.4
11	气推		收集	10	2	0.6
12	结束					

图-2 黄曲霉毒素M₁的固相萃取净化方法

4.检测条件

4.1 色谱柱条件

柱子	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 μm×2.1 mm×50 mm
流速	0.300 mL/min
流动相	A: 10 mM ammonium acetic (0.1% formic acid), B: Methanol
柱温	30 °C
进样体积	10 μL
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI ⁺
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 °C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	甲醇, 10 mM 乙酸铵水溶液为流动相 (梯度洗脱, 起始 10%甲醇保持 1 分钟, 4 分钟之内升至 90% 的甲醇, 保持 2 分钟, 然后降至 10%, 保留 3 min)。

4.2MRM 参数

表-1. 黄曲霉毒素 M₁ 的串联质谱检测参数

化合物	保留时间 (min)	定量离子对 (碰撞能量 eV、锥孔电压 V)	定性离子 (碰撞能量 eV、锥孔电压 V)
黄曲霉毒素 M ₁	3.8	331.2>331.2 (25, 7)	331.2>285 (30, 7)

5.样品测试

方法可行性验证

5.1 取奶粉 (1 g), 添加黄曲霉毒素 M₁ 标准品 (1 μg /kg, 10 μL), 使其加标浓度为 10 μg/kg, 进行上

述奶粉的提取及净化，测试其回收率如下表所示：

表-2. 奶粉中黄曲霉毒素 M₁ 的加标回收率和 RSD 值 (n=4)

名称	回收率 (%)				平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4		
黄曲霉毒素 M ₁	104.2	96.7	105.8	98.40	101.27	4.48

5.2 取牛奶 (25 mL)，添加黄曲霉毒素 M₁ 标准品 (1 μ g/kg, 25 μ L)，使其加标浓度为 1 μ g/kg，进行上述奶粉的提取及净化，测试其回收率如下表所示：

表-3. 牛奶中黄曲霉毒素 M₁ 的加标回收率和 RSD 值 (n=3)

名称	回收率 (%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3		
黄曲霉毒素 M ₁	83.4	90.3	88.4	87.4	4.1

6. 结果与讨论

6.1 淋洗溶剂对回收率的影响

洗脱以 5 mL 的 PBS 缓冲液和 5 mL 的纯水除去免疫亲和柱上残留的色素和基质，以免液质检测时产生基质抑制。若不进行 10 mL 的纯水淋洗，3 平行样品平行性降低明显，RSD 值提高。

6.2 洗脱速度与洗脱量的影响

洗脱量以 1 mL 为宜，对洗脱速度进行优化摸索：

采用 1 mL/min 的洗脱速度，洗脱效果不佳，回收率在 20-70%，非常不稳定；继续降低洗脱速度至 0.5 mL/min，洗脱效果有明显提升，回收率在 50-90%；继续降低洗脱速度至 0.2-0.3 mL/min，回收率可稳定在 80-100%之间。

7. 解决方案的优势

本方法可实现黄曲霉毒素 M₁ 样品提取和净化前处理过程自动化，将称量好的样品及量取完的溶剂放置于离心管中，将离心管放置 AH-30 全自动均质器中，密闭空间进行快速提取，防止有机溶剂挥发影响人体健康；经均质提取完的上清液通过 Fotector Plus 全自动固相萃取仪对其进行免疫亲和净化，准确地抽取上样体积和清洗样品瓶，减少样品损失量，确保样品回收率，利用柱插杠下压的压力实现免疫亲和柱自动脱帽，告别人为脱帽以及实

验室人员看守的烦恼，准确地按设置步骤进行，确保自动完成净化任务；洗脱液通过 Auto EVA-60 平行浓缩仪进行浓缩，按设置的步骤顺利地浓缩，克服了手动浓缩实验室人员最怕的难点和烦恼点，完全解放实验室人员劳动力；黄曲霉毒素 M₁ 标准中间液、使用液的配制以及替代物、内标物的添加，均可通过 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站所内置储存的方法，精准配制黄曲霉毒素 M₁ 的标准工作曲线，严格按照设置的命令完成配制任务。



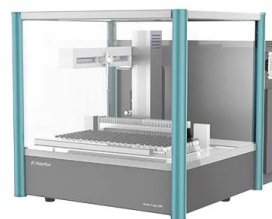
全自动均质器
样品提取



全自动固相萃取仪
样品免疫亲和净化



全自动浓缩仪
样品浓缩



全自动液体样品处理工作站
标准溶液配制