

# LC-MS/MS 法测定牛奶中黄曲霉毒素 M 族含量作业指导书 (SOP)

标准号：GB 5009.24-2016

## ■ 参考标准

2016 年版《食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中规定的黄曲霉毒素 M 族测定方法。

## ■ 方法概述

### 2.1 方法编制说明

本方法参照《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》中规定的前处理方法，采用同位素稀释 - 液相色谱串联质谱法对牛奶样品中的黄曲霉毒素 M 族残留量进行检测。

### 2.2 方法使用范围

本方法适用于采用液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS) 测定牛奶中黄曲霉毒素 M 族残留量。

### 2.3 方法技术指标

本方法的定量限：AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 均为 0.015 µg/kg

本方法标准溶液线性范围：0.05-5 ng/mL

## ■ 方法原理

液态牛奶样品中的黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 经溶剂提取，黄曲霉毒素 M 族免疫亲和柱净化、浓缩后，经反相液相色谱柱分离，电喷雾离子源离子化，多反应离子监测检测，内标法定量。

## ■ 仪器设备及辅助设备

### 4.1 仪器设备

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，ESI 离子源

### 4.2 辅助设备

分析天平：Shimadzu AUW220D；

离心机：SHUKE TD-600；

固相萃取仪：CNW 12 位固相萃取仪；

涡旋仪：IKA MS3；

氮吹仪：TraceV-24S 24 位水浴氮吹仪 (TV-001)

移液枪：10 mL，1 mL，200 µL，10 µL

## ■ 标准品、试剂、耗材

黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 标准品和 <sup>13</sup>C<sub>17</sub>-AFT M<sub>1</sub> 同位素内标溶液：购于上海安谱，浓度分别为 100 µg/mL、0.5 µg/mL。

乙腈：色谱级，购于上海安谱；

甲醇：色谱级，购于上海安谱；

乙酸铵：色谱级，购于上海安谱；

离心管：50 mL；

黄曲霉毒素 M 族免疫亲和柱：柱容量 ≥ 100 ng，购于上海安谱；

无针注射器：5 mL

微孔过滤膜：WondaDisc 尼龙针头滤器 0.22 μm；

## ■ 操作步骤

### 6.1 标准工作曲线制作

#### 6.1.1 混合标准储备液配制 (1 μg/mL)

分别准确吸取 100 μL 购买的黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 标准品溶液 (100 μg/mL) 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度。溶液转移至棕色试剂瓶中后，在 4°C 下避光保存，有效期 3 个月。

#### 6.1.2 混合标准工作液配制 (100 ng/mL)

准确吸取 1 mL 混合标准储备液 (1 μg/mL) 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容至刻度。溶液转移至棕色试剂瓶中后，在 4°C 下避光保存，有效期 3 个月。

#### 6.1.3 同位素内标工作液 1 的配制 (50 ng/mL)

准确移取 1 mL <sup>13</sup>C<sub>17</sub>-- AFT M<sub>1</sub> 同位素内标 (0.5 μg/mL) 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容。在 -20°C 下避光保存，3 个月内有效。

#### 6.1.4 同位素内标工作液 2 的配制 (5 ng/mL)

准确移取 100 μL <sup>13</sup>C<sub>17</sub>-- AFT M<sub>1</sub> 同位素内标 (0.5 μg/mL) 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容。在 -20°C 下避光保存，3 个月内有效。

#### 6.1.5 标准系列工作溶液配制

按下表内容，分别准确移取混合标准工作液适量至 10 mL 容量瓶中，加入 100 μL 50 ng/mL 的同位素内标工作液，用初始流动相溶液定容至刻度，配制黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 浓度均为 0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL 的系列标准溶液。

No.	混合标准工作液加入量 (μL)	同位素内标工作液 1 加入量 (μL)	初始流动相溶液定容体积 (mL)	最终浓度 (ng/mL)	备注
1	5	100	10	0.05	
2	10	100	10	0.1	
3	50	100	10	0.5	标准系列工作溶液，在 4°C 下避光保存，有效期 1 个月。
4	100	100	10	1	
5	200	100	10	2	
6	500	100	10	5	

### 6.2 仪器条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (100 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm)  
(P/N:227-30048-02, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 -0.2% 甲酸 5 mmol/L 甲酸铵水溶液 B 相 - 乙腈

流速：0.3 mL/min

进样体积：10 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 32%，时间程序见表 1。

表 1 时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	Pumps	Pump B Conc.	32
4.20	Pumps	Pump B Conc.	45
5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
5.70	Pumps	Pump B Conc.	100
6.00	Pumps	Pump B Conc.	32
8.50	Controller	Stop	

## 质谱条件

离子源: ESI (+)	脱溶剂管温度: 250°C
离子源接口电压: -1.5 kV	加热模块温度: 400°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	接口温度: 300°C
干燥气: 氮气 5 L/min	扫描模式: MRM
加热气: 空气 15 L/min	MRM 参数: 见表 2
碰撞气: 氩气	

表 2 MRM 优化参数

中文名	监测离子对	Q1 Pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
AFT M <sub>1</sub>	329.10>273.10*	-24	-23	-20
	329.10>259.10	-24	-25	-28
<sup>13</sup> C <sub>17</sub> - AFT M <sub>1</sub>	346.20>317.20	-24	-22	-24
	346.20>288.20*	-24	-25	-32
AFT M <sub>2</sub>	331.15>273.05*	-22	-23	-20
	331.15>259.10	-22	--23	-28

注: \* 表示定量离子

## 6.3 样品前处理

- 1) 称样: 称取 4 g 液态牛奶样品, 于 50 mL 聚苯乙烯聚塞离心管。
- 2) 加入 100 μL 同位素内标工作液 2, 震荡混匀后静置 30 min, 加入 10 mL 甲醇, 涡旋 3 min。4°C、6000 r/min 下离心 10 min, 上清液转移至烧杯中加入 40 mL 水稀释, 作为样品提取液备用。
- 3) 净化: 将免疫亲和柱内的液体放干后, 将上述样品提取液加入免疫亲和柱中, 待样液滴完后, 加入 10 mL 水, 以稳定流速淋洗免疫亲和柱, 用真空泵抽干亲和柱。再加入 4 mL 乙腈洗脱亲和柱, 收集全部洗脱液。
- 4) 50°C 条件下, 氮吹至近干, 加初始流动相定容至 1 mL, 涡旋使样品溶解, 过 0.22 μm 滤膜, 取滤液待测。

## 6.4 加标试样

称取 4g 液态牛奶样品于 50 mL 离心管中, 加入一定量黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 标准溶液及内标溶液, 使黄曲霉毒素 M 族加标浓度分别为 0.05 μg/kg, 0.25 μg/kg, 1 μg/kg, 涡旋混合均匀, 以下同样品前处理方法。

## 6.5 测定

按照 6.2 的仪器分析条件进行分析, 进样量为 10.0 μL, 若检测溶液中的残留量超过本方法的标准曲线范围, 则需要稀释检测溶液后进样分析。

## 6.6 计算和报告

### 6.6.1 定性分析

试样中目标化合物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，变化范围在 ±2.5% 之内。每种化合物的质谱定性离子必须出现，至少应包括一个母离子和两个子离子，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的两个子离子的相对丰度比与浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过表 3 规定的范围。

表 3 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤ 10%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

### 6.6.2 定量分析

试样中黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub>、AFT M<sub>2</sub> 的含量按式 (1) 计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

X —— 试样中黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub> 或 AFT M<sub>2</sub> 的含量，单位为微克每千克 (μg/kg)；

ρ —— 由标准曲线计算所得的试样溶液中黄曲霉毒素 AFT M<sub>1</sub> 或 AFT M<sub>2</sub> 的浓度，单位为纳克每毫升 (ng/mL)；

V —— 最终定容体积，单位毫升 (mL)；

m —— 试样的称样量，单位克 (g)；

1000 —— 换算系数；

f —— 样液稀释因子。

计算结果保留三位有效数字。

岛津应用云

