

# LC-30A 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 的含量

LC-118

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 的方法。实验结果表明：该法线性范围宽，在 0.05  $\mu\text{g/L}$ ~ 50  $\mu\text{g/L}$  浓度范围内线性良好，相关系数大于 0.9999；进样 3  $\mu\text{L}$ ，仪器检出限为 0.01  $\mu\text{g/L}$ ，定量限为 0.03  $\mu\text{g/L}$ 。0.2  $\mu\text{g/L}$ 、1  $\mu\text{g/L}$  和 5  $\mu\text{g/L}$  三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.12% 和 0.18~1.14% 之间；牛奶样品和婴幼儿奶粉样品加标回收率分别为 83.8%，84.6%。

**关键词：**牛奶 婴幼儿奶粉 黄曲霉毒素 M1 超高效液相色谱 免疫亲和柱

黄曲霉毒素 M1(AFM1) 是由常见的黄曲霉和寄生曲霉产生的代谢产物。哺乳类动物摄入被黄曲霉毒素 B1(AFB1) 污染的饲料和食物后，部分 AFB1 在体内转化成 AFM1，存在于动物分泌的乳汁和产生的尿液中，为强致癌剂。美国和日本规定乳及乳制品中 AFM1 含量不得超过 0.5  $\mu\text{g/kg}$ ；欧盟规定鲜乳中 AFM1 含量不能超过 0.05  $\mu\text{g/kg}$ ；我国规定婴儿乳品中 AFM1 不得检出，牛乳中含量不得超过 0.5  $\mu\text{g/kg}$ 。

免疫亲和柱能特效性地、高选择性地吸附黄曲霉毒素，而让其它杂质通过柱子，使样品得以纯化。吸附后的黄曲霉毒素可被极性有机溶剂洗脱。免疫亲和柱将提取、净化、浓缩一次完成，操作简便，净化效果好，提高了方法的准确度、精密度和灵敏度。

本文参考《GB 5413.37-2010 食品安全国家标准 乳和乳制品中黄曲霉毒素 M1 的测定》标准的要求，采用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A，免疫亲和柱净化，测定了牛奶和婴幼儿奶粉中的黄曲霉毒素 M1，供相关检测人员参考。

## 实验条件

### 1.1 仪器和材料

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 二元高压梯度系统。具体配置为：LC-30AD 输液泵，DGU-20A5R 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30A 柱温箱，RF-20AXS 荧光检测器，CBM-20Alite 系统控制器，LabSolutions Ver. 5.42 SP3 色谱工作站，Romer AflaStar M1 R 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱。

### 1.2 分析条件

#### 液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack XR-ODSIII 2.0 mm I.D.  $\times$  75 mm L., 1.6  $\mu\text{m}$

流动相：乙腈 / 水 (25/75, v/v)

流速：0.5 mL/min

进样体积：3  $\mu\text{L}$

柱温：40 $^{\circ}\text{C}$

检测波长：Ex=365 nm, Em = 435 nm

### 1.3 样品制备液相色谱条件

#### 1.3.1 标准溶液配制

用流动相将标准储备液 (10 mg/L) 逐级稀释成 0.05、0.2、0.5、1、2、5、10、20、50  $\mu\text{g/L}$  等 9 个标准溶液浓度系列。

#### 1.3.2 样品前处理方法

##### ① 试样的制备

参照《GB 5413.37-2010 食品安全国家标准 乳和乳制品中黄曲霉毒素 M1 的测定》标准中试样制备方法进行。

##### ② 试样的提取和净化

收集试样制备得到的乳液至少 50 mL，过黄曲霉毒素 M1 免疫亲和小柱。用 10 mL 水洗柱，并重复一次。抽干小柱。用 0.5 mL 甲醇洗柱，并重复一次。精确移取 0.5 mL 洗脱液和 0.5 mL 超纯水混匀，经 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后供测定。

## 实验结果

### 2.1 标准样品的色谱图

标准样品色谱图如图 1 所示。AFM1 保留时间为 1.501 min。

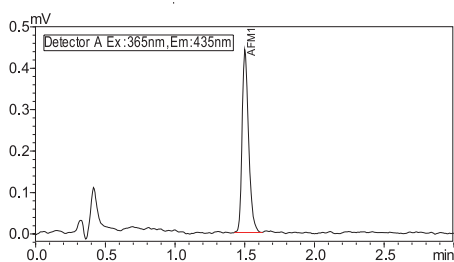


图1 黄曲霉毒素M1标准样品色谱图 (1 µg/L)

## 2.2 线性关系

将9个不同浓度的黄曲霉毒素标准工作溶液,按1.2中的分析条件进行测定。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,外标法制作校准曲线,结果如图2所示。线性方程为  $Y = (1403.47)X + (10.066)$ 、线性范围 0.05~50 µg/mL,相关系数大于 0.9999,线性良好。

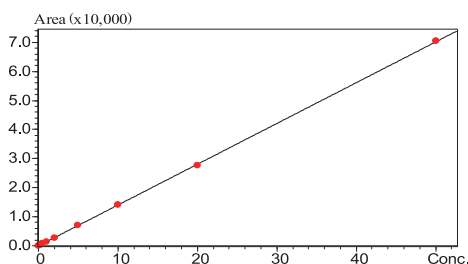


图2 黄曲霉毒素M1的标准工作曲线

## 2.3 检出限和定量限

根据标准曲线中的最低点 0.05 µg/L 计算仪器的灵敏度,通过 LabSolutions 软件,按照 RMS 方式,选取基线为 1.75~3.00 min 计算信噪比,仪器检测限 (3 倍噪声计算) 为 0.01 µg/L、定量限 (10 倍噪声计算) 为 0.03 µg/L。0.05 µg/L 标样色谱图如图3所示。

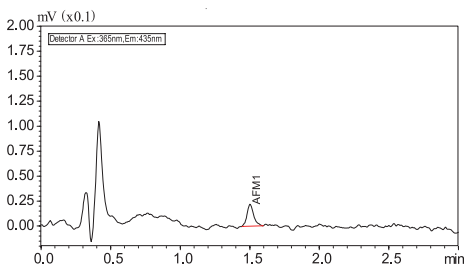


图3 0.05 µg/L标准溶液的色谱图

## 2.4 精密度实验

取低、中、高三个不同浓度标准溶液,分别平行进样6次,目标化合物的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.06~0.12% 和 0.18~1.14% 之间,仪器精密度良好。

表1 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

浓度(µg/L)	保留时间 RSD	峰面积 RSD
0.2	0.12%	1.14%
1	0.03%	0.90%
5	0.06%	0.18%

## 2.5 加标回收实验

按照 1.3 所述方法处理全程序空白样品 (除不加样品外,其他步骤和实际样品的处理相同)、市售纯牛奶和婴幼儿奶粉样品,上机测试。全程序空白样品色谱图如图4所示。纯牛奶样品色谱图如图5所示。纯牛奶样品加标色谱图如图6所示。婴幼儿奶粉样品色谱图如图7所示。婴幼儿奶粉样品加标色谱图如图8所示。加标回收结果见表2。

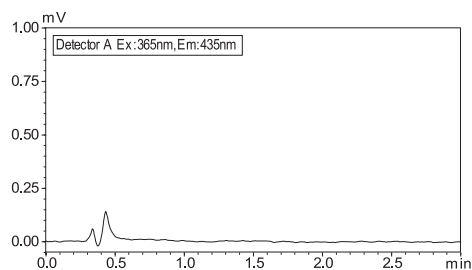


图4 全程序空白样品的色谱图

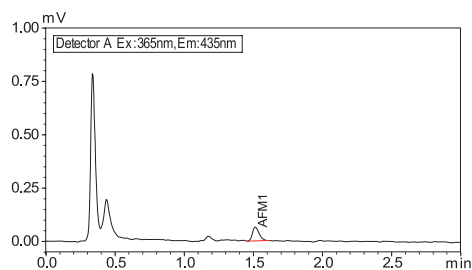


图5 纯牛奶样品的色谱图

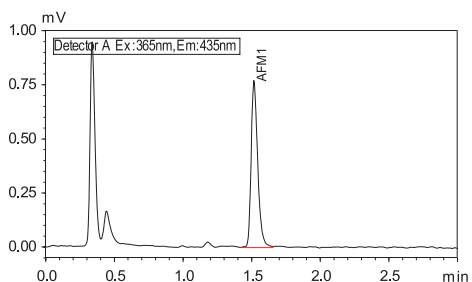


图6 纯牛奶加标样品的色谱图

(加标量: 0.078 µg/kg)

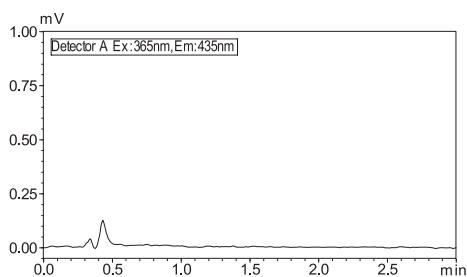


图7 婴幼儿奶粉样品的色谱图

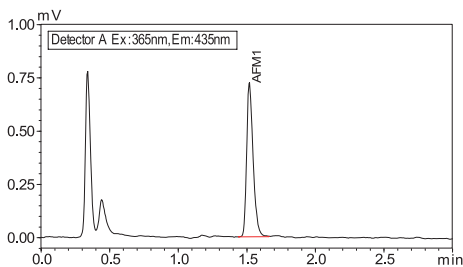


图8 婴幼儿奶粉加标样品的色谱图  
(加标量: 0.800 $\mu$ g/kg)

表2 加标回收结果

基质	样品 $\mu$ g/kg	加标量 $\mu$ g/kg	实测值 $\mu$ g/kg	回收率
牛奶	0.006	0.078	0.071	83.3%
婴幼儿奶粉	N.D.	0.800	0.677	84.6%

注: N.D.表示未检出

## 结论

本文建立了一种使用超高效液相色谱仪 LC-30A 测定牛奶和婴幼儿奶粉中黄曲霉毒素 M1 的方法。实验结果表明: 该法线性范围宽, 在 0.05  $\mu$ g/L~ 50  $\mu$ g/L 浓度范围内线性良好, 相关系数大于 0.9999; 仪器检出限为 0.01  $\mu$ g/L, 定量限为 0.03  $\mu$ g/L。0.2  $\mu$ g/L、1  $\mu$ g/L 和 5  $\mu$ g/L 三个浓度标样 6 次连续进样的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.03~0.12% 和 0.18~1.14% 之间, 仪器精密度良好; 牛奶样品和婴幼儿奶粉样品加标回收率分别为 83.8%, 84.6%。本方法适合作为乳及乳制品中黄曲霉毒素 M1 的快速分析方法。

附录:

表3 黄曲霉毒素M1化合物信息表

中文名称	英文名称	CAS号
黄曲霉毒素M1	Aflatoxin M1	6795-23-9