

Application News

No. L506

高效液相色谱
High Performance Liquid Chromatography

使用 Prominence-i 和荧光检测器 RF-20Axs 根据通知检测法测定牛奶中的黄曲霉毒素 M₁

Assay of Aflatoxin M₁ in Milk Based on Notification Test Methodology, Using Prominence-i and the RF-20Axs Fluorescence Detector

黄曲霉毒素 M₁ (AFM₁) 是一种具有致癌性的霉菌毒素。若哺乳类动物食用被黄曲霉毒素 B₁ 污染的饲料, 则其乳汁中可检测到该成分。

在 2015 年 7 月 23 日日本颁布的《有关牛奶中含有黄曲霉毒素 M₁ 的处理》(食安发 0723 第 1 号)¹⁾ 中, 规定牛奶中 AFM₁ 的上限值为 0.5 μg/kg, 并从 2016 年 1 月 23 日起开始执行。

在同时颁布的《有关牛奶中含有黄曲霉毒素 M₁ 的试验方法》(食安发 0723 第 5 号)²⁾ 中收录了两种检测方法, 具体如下:

- ①使用带有荧光检测器的 HPLC 进行定量, 然后使用 LC/MS 或者 LC/MS/MS 进行确认的方法
- ②使用分析试剂盒的筛选法

本文向您介绍根据方法①对市售牛奶进行分析的示例。使用一体型 HPLC Prominence-i 和荧光检测器 RF-20Axs, 对牛奶中的 AFM₁ 进行分析。由结果可知, 该方法对牛奶中 AFM₁ 检测浓度为上述法规上限的 1/10。

■ 标准溶液的分析

Analysis of Standard Aflatoxin M₁ Solutions

图 1 为分析 AFM₁ 的标准溶液 (0.1 μg/L, 相当于法规规定的上限值 1/100 的浓度) 得到的色谱图。表 1 为分析条件。结果得出, 重复分析 6 次得到的峰面积相对标准偏差 (%RSD) 为 3.4%。图 2 为浓度范围在 0.1~20 μg/L 的标准曲线。在此浓度范围的相关系数达到 R²=0.9999 以上, 表示线性良好。由此可知, 使用荧光检测器 RF-20Axs 可对极微量的 AFM₁ 进行高灵敏度、高精度分析。

另外, 按照图 3 所示的通知检测法进行预处理后, 标准溶液 0.1 μg/L 相当于法规规定的牛奶中 AFM₁ 上限值的 1/100 (0.005 μg/kg)。

表 1 HPLC 分析条件
HPLC Analytical Conditions

仪器	: Prominence-i
色谱柱	: Shim-pack VP-ODS (150 mm L. × 4.6 mm I.D., 5 μm)
流动相	: 水/乙腈= 3/1(v/v)
流速	: 1.0 mL/min
柱温	: 40 °C
检测器	: RF-20Axs, Ex. 365 nm, Em. 435 nm
流通池	: 标准池
流通池温度	: 25 °C
进样体积	: 100 μL

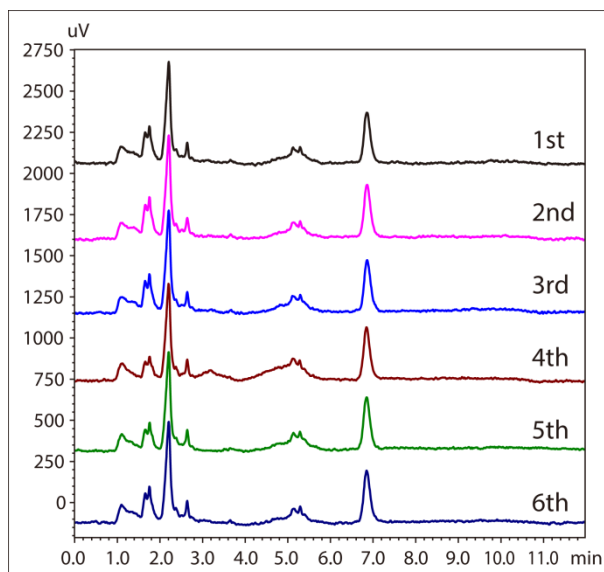


图 1 相当于上限值 1/100 浓度 (0.1 μg/L) 的 AFM₁ 标准溶液的色谱图 (重复测定 6 次)

Chromatograms for Standard AFM₁ Solution Equivalent to 1/100th the Regulatory Concentration (0.1 μg/L, Test Repeated 6 Times)

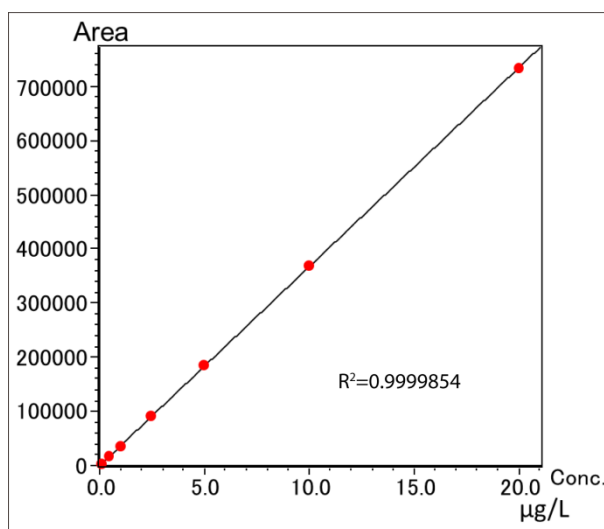


图 2 AFM₁ 标准曲线
AFM₁ Calibration Curve (0.1-20 μg/L)

牛奶中 AFM₁ 的分析

Analysis of Aflatoxin M₁ in Milk

作为食品样品的分析示例，我们对市售牛奶以及在市售牛奶中添加了 AFM₁ 的样品进行了分析。通过添加 AFM₁，将牛奶中 AFM₁ 浓度配制为 0.05 μg/kg(上限值的 1/10)，并按照通知检测法²⁾ 对该浓度样品进行预处理。图 3 为预处理步骤。有关详细内容，请参考通知检测法²⁾。

使用 Romer Labs 公司生产的免疫亲和柱 AflaStar™ R^{*} 去除杂质。图 4 为分析该成分得到的色谱图。其中 (A) 为添加了 AFM₁ 的牛奶，(B) 为未添加 AFM₁ 的牛奶。

分析条件与图 1 相同，如表 1 所示。

※ AflaStar 是 Romer Labs 公司的注册商标。
AflaStar™ R 可以在 Shimadzu GLC Ltd. 购买。

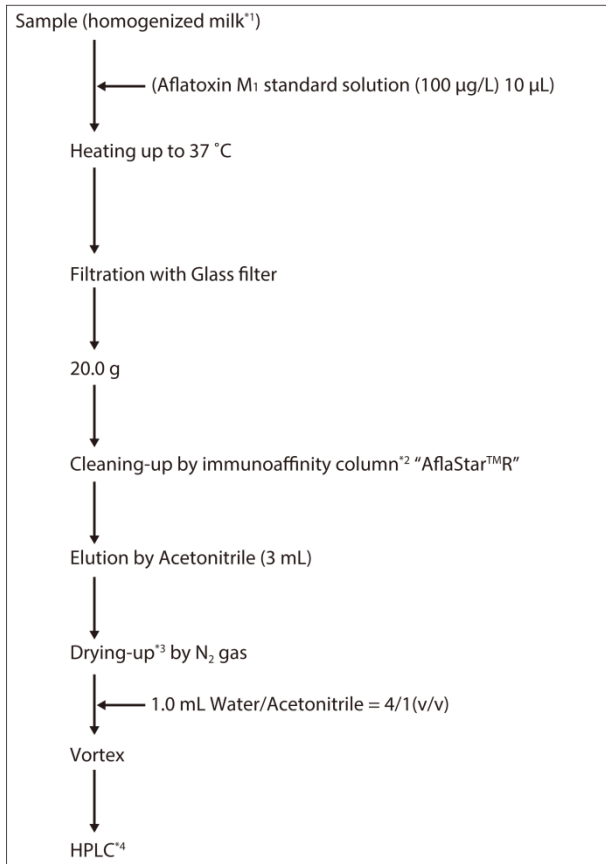


图 3 牛奶的预处理步骤
Milk Pretreatment Procedure

- * 1 如果是未经过均质化的原料奶，需要进行离心处理。有关详细内容请参考文献²⁾。
- * 2 有关免疫亲和柱的使用方法，请参考文献²⁾ 的注解。
- * 3 进行干燥时，AFM₁ 可能会吸附在容器上，建议您使用 20~30% 乙腈水溶液对经硅烷处理后干燥的容器进行清洗。
- * 4 对于注入 HPLC 的自动进样器用样品瓶，即使使用经硅烷处理的玻璃样品瓶，也可能吸附 AFM₁，所以建议您使用树脂样品瓶。

参考文献

- 1) 《关于牛奶中含有黄曲霉毒素 M₁ 的处理》(2015 年 7 月 23 日，食安发 0723 第 1 号)
- 2) 《关于牛奶中含有黄曲霉毒素 M₁ 的检测方法》(2015 年 7 月 23 日，食安发 0723 第 5 号)

按照下述的 Eqn. 1 计算得出的回收率为 98%。由此可知，使用荧光检测器 RF-20AxS 可对上限值 1/10 浓度的样品进行高灵敏度及高精度的分析。

另外，对于未添加 AFM₁ 的牛奶，在 AFM₁ 的洗脱位置检测到极微小的峰。使用 LC/MS/MS 分析未添加 AFM₁ 的牛奶，结果得出未添加 AFM₁ 的牛奶中具有 AFM₁，其浓度低于规定上限值的 1/100。

$$\text{回收率}[\%] = \frac{(\text{添加 AFM}_1 \text{ 的牛奶标准样品的峰面积}) - (\text{未添加 AFM}_1 \text{ 的牛奶标准样品的峰面积})}{\text{AFM}_1 \text{ 标准样品的峰面积}} \times 100$$

Eqn. 1 回收率计算公式
Percentage Recovery Equation

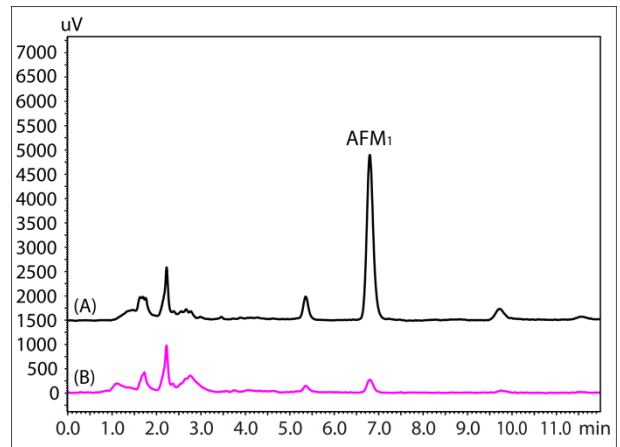


图 4 牛奶的 HPLC 色谱图
(A) 添加了 AFM₁、(B) 未添加 AFM₁
HPLC Chromatograms for Commercially Available Milk
(A) With added standard AFM₁, (B) with no added standard AFM₁



岛津企业管理(中国)有限公司
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439
400-650-0439

免责声明:

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;
* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2016 年 6 月