

# Análise de aflatoxina em alimento infantil com a Remoção de matrizes otimizada (EMR)—Lipídios por LC/MS/MS

## Nota de aplicação

Testes de alimentos

### Autor

Megan Juck  
Agilent Technologies, Inc.

### Resumo

A aflatoxina M1 é a principal aflatoxina encontrada no leite. Ela tem os níveis máximos recomendados pela Comissão Europeia (CE), que são de até 0,025 µg/kg em alimentos infantis na Europa. Nos Estados Unidos, os níveis de aflatoxina ,segundo o Food and Drug Administration (FDA), são de até 0,5 µg/kg no leite. Esta nota de aplicação descreve a determinação de aflatoxinas M1, G2, G1, B2 e B1 em alimento infantil por LC/MS/MS usando a Remoção de matrizes otimizada—Lipídios (EMR—Lipídios) Agilent Bond Elut. Este estudo utilizou uma extração QuEChERS, seguida de limpeza EMR—Lipídios SPE dispersiva (dSPE). Esse método proporciona recuperações (88–113%) e precisão (RSDs = 1,3–13,6%) excelentes para todas as aflatoxinas em todos os níveis. Devido à ampla remoção de matrizes, os limites de quantificação (LOQs) para esse método foram estendidos e ficaram abaixo dos limites regulatórios tanto para os EUA quanto para a Europa. O método simples e robusto exige poucos equipamentos e experiência, o que permite implementá-lo com facilidade em laboratórios de alimentos.



**Agilent Technologies**

## Introdução

As micotoxinas, consideradas um dos contaminantes mais predominantes em alimentos e fontes de alimentação em todo o mundo, são os metabólitos secundários dos fungos. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) estima que até 25% da produção agrícola do mundo esteja contaminada com micotoxinas. Essa contaminação gera perdas econômicas devastadoras, principalmente para a indústria de grãos [1]. As aflatoxinas (Tabela 1) são uma classe de micotoxinas produzidas por várias espécies de fungos, principalmente *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* [2]. A aflatoxina M1, produzida quando as vacas ingerem e metabolizam alimentos contaminados com aflatoxina B1, é a micotoxina encontrada com mais frequência no leite [3]. Tanto o Food and Drug Administration (FDA) quanto a Comissão Europeia (EC) estabeleceram limites para níveis de aflatoxina em vários produtos alimentícios [4,5]. A Tabela 2 resume os limites de aflatoxina do FDA e da EC para os Estados Unidos e para a Europa.

Os limites regulatórios para aflatoxinas são muito baixos, principalmente em matrizes leiteiras e alimentos infantis. O preparo de amostras é necessário para remover interferências de matriz e melhorar os sinais do analito em concentrações baixas. As colunas de imunoafinidade são usadas com frequência na análise de micotoxinas, inclusive aflatoxinas, em várias matrizes [6-9]. No entanto, essas colunas podem ser caras, e exigem um fluxo de trabalho diferenciado, que nem sempre é conveniente para laboratórios de alimentos. O método Rápido, Fácil, Barato, Efetivo, Robusto e Seguro (QuEChERS) usa um procedimento simples em três etapas (extração, limpeza e análise) para as amostras. Sendo assim, é um método atraente para o preparo de amostras de vários analitos e matrizes, incluindo aflatoxinas em grãos e produtos lácteos [3,10,11]. A limpeza QuEChERS com C18 ou PSA, no entanto, tem algumas limitações ao analisar amostras com alto teor lipídico, como carnes e leite. Essas limitações resultam de interações não seletivas com analitos alvo e da remoção mínima das principais classes de lipídios. Qualquer lipídio remanescente pode se acumular na trajetória de fluxo analítica e causar anomalias cromatográficas, gerar dados insatisfatórios, diminuir a precisão e aumentar a frequência de manutenção.

A Remoção otimizada de matrizes—Lipídios (EMR—Lipídios) Agilent Bond Elut é um sorbente inovador que usa uma combinação exclusiva de exclusão de tamanhos e interações hidrofóbicas para remover de forma seletiva as principais classes de lipídios de amostras sem a indesejada retenção de analitos. Esse sorbente pode ser usado como limpeza dSPE com os fluxos de trabalho QuEChERS e de precipitação de proteína, promovendo uma limpeza simples e eficiente [12,13]. Nesse estudo, cinco aflatoxinas em alimento infantil foram analisadas. Escolhemos o alimento infantil para essa matriz devido ao seu teor lipídico e aos níveis regulatórios de aflatoxina. Uma extração QuEChERS seguida da limpeza EMR—Lipídios dSPE e pós-tratamento avançado de amostra usando  $MgSO_4$  anidro proporcionou excelente remoção de matrizes. Essa nota de aplicação demonstra a eficiência da EMR—Lipídios para análise de aflatoxina em três níveis de concentração diferentes.

Tabela 1. Informações químicas e físicas das cinco aflatoxinas.

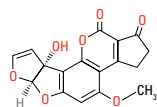
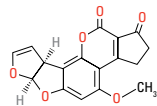
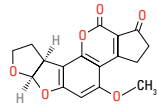
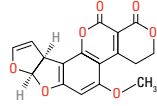
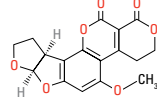
Aflatoxina	Fórmula molecular	Estrutura	pKa	logP
M1	$C_{17}H_{12}O_7$		11,4	0,93
B1	$C_{17}H_{12}O_6$		—	1,58
B2	$C_{17}H_{14}O_6$		—	1,57
G1	$C_{17}H_{12}O_7$		—	1,37
G2	$C_{17}H_{14}O_7$		—	1,36

Tabela 2. Limites de aflatoxina em matrizes associadas de acordo com a EC e o FDA.

Aflatoxina	Limite (µg/kg)	Matriz	Agência regulatória
M1	0,025	Alimento infantil	EC [5]
	0,05	Leite cru	EC [5]
	0,50	Leite cru	FDA [14]
B1	0,10	Alimentos para bebês	EC [5]
	2–12*	Alimento em geral	EC [5]
B1 + B2 + G1 + G2 (concentração total)	4–15*	Nozes, figos, frutas secas, cereais, milho, especiarias	EC [5]
	20	Alimento em geral	FDA [15]**
	20–300	Alimentos para animais	FDA [16]**

\* Consulte o Regulamento da Comissão EC No 1881/2006 para obter detalhes sobre matrizes específicas [5].

\*\* A identidade da aflatoxina B1 deve ser confirmada pelas informações derivativas químicas [15,16].

## Parte experimental

### Reagentes e produtos químicos

Todos os reagentes e solventes têm grau HPLC ou mais alto. A acetonitrila (ACN) e o metanol foram comprados da Honeywell (Muskegon, MI, EUA). A água foi purificada usando um Sistema integral Milli-Q da EMD Millipore (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico de grau reagente usado é da Agilent Technologies (FA, p/n G2453-85060). Material de Referência Europeu ERM-BD283 (Leite em pó integral com níveis baixos de aflatoxina M1) foi comprado da LGC Standards (Teddington, Middlesex, Reino Unido). Aflatoxina M1 (10 µg/mL em ACN), uma mistura de aflatoxinas (B1, G1, B2, G2: 20 µg/mL de cada em ACN) e formiato de amônia foram comprados da Sigma-Aldrich, Corp. (St. Louis, MO, EUA). Os estoques padrão de aflatoxina foram armazenados a 2–8 °C (M1) e –20 °C (mistura de B1, B2, G1, G2) de acordo com as recomendações do fabricante. O alimento infantil líquido e pronto para usar foi comprado em um mercado local.

### Equipamento

Equipamentos e materiais usados:

- Repetidor e pipetas Eppendorf
- Vórtex e vórtex multitubos (VWR, Radnor, PA, EUA)
- Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, EUA)
- Centrífuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, EUA)
- Turbovap LV (Biotage, Charlotte, NC, EUA)
- Microcentrífuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA)
- Kits de extração (10 g de amostra) do método QuEChERS Agilent Bond Elut (não tamponado) com homogeneizadores cerâmicos (p/n 5982-5550CH)
- EMR—Lipídios dSPE Agilent Bond Elut (p/n 5982–1010)
- EMR—Lipídios com bolsa de polimento de MgSO<sub>4</sub> Agilent Bond Elut (p/n 5982–0102)

## Instrumentação

A análise foi realizada em um sistema LC Agilent 1290 Infinity com:

- Bomba binária Agilent 1290 Infinity (G4220A)
- Amostrador automático de alto desempenho Agilent 1290 Infinity (G4226A) equipado com um Termostato FC/ALS Agilent 1290 (G1330B),
- Compartimento da coluna termostatizado Agilent 1290 Infinity (G1316C)

O sistema LC foi acoplado a um sistema LC/MS/MS triplo quadrupolo Agilent 6460A equipado com a tecnologia de ionização por eletrospray Agilent Jet Stream. O software Agilent MassHunter Workstation foi usado na aquisição de dados e análise.

## Preparo de amostras

O alimento infantil líquido (10 mL) foi adicionado a um tubo de centrífuga de 50 mL, e foram adicionados padrões adequados em amostras de controle de qualidade (QC). Dois homogeneizadores cerâmicos e 10 mL de ACN foram adicionados, e a amostra foi submetida a vórtex por dois minutos. Um pacote de sais de extração QuEChERS original (não tamponado, 10 g de amostra) foi adicionado à amostra. A amostra foi misturada em um agitador mecânico por dois minutos, seguida de centrifugação a 5.000 rpm por cinco minutos. Foram adicionados 5 mL de água ao tubo de EMR—Lípidios dSPE. O tubo foi submetido a vórtex e foram adicionados 5 mL de extrato de amostra bruto. A amostra foi submetida a vórtex imediatamente e depois por mais 60 segundos em um vórtex multitubos. A amostra foi centrifugada a 5.000 rpm por cinco minutos e decantada em um tubo de centrifuga vazio de 15 mL. Sulfato de magnésio anidro ( $MgSO_4$ ) de uma bolsa de polimento final foi adicionado ao extrato. A amostra foi submetida a vórtex imediatamente para dispersar o sal e depois por mais 60 segundos, e centrifugada a 5.000 rpm por três minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de centrifuga de 15 mL contendo 1,5 g de  $MgSO_4$  (de uma bolsa de polimento nova). A amostra foi submetida a vórtex imediatamente e depois por 60 segundos. Após a centrifugação a 5.000 rpm por três minutos, a amostra final (1 mL) foi transferida para um tubo de teste de vidro de 16 × 100 mm e evaporada sob nitrogênio a 50 °C até secar. Conforme a necessidade, a matriz em branco foi adicionada com padrões de calibração antes de secar. A amostra foi reconstituída com 100 µL de  $H_2O$  com 0,1% FA/ACN (80/20) e submetida a vórtex por no mínimo dois minutos. A amostra foi submetida a ultrassom e centrifugada se necessário. A amostra final foi transferida a um vial com insert para análise de LC/MS/MS. A Figura 1 mostra todo o procedimento do preparo de amostras.

## Condições do instrumento

### HPLC

Coluna:	Agilent Poroshell 120 SB-C18 2,1 × 100 mm, 2,7 µm (p/n 685775-902)
Guarda:	Agilent Poroshell 120 SB-C18 UHPLC Guarda, 2,1 mm × 5 mm, 2,7 µm (p/n 821725-912)
Fase móvel:	A) 5 mM formiato de amônia em água com 0,1% FA B) 5 mM formiato de amônia em 50/50 ACN/metanol com 0,1% FA
Taxa de fluxo:	0,3 mL/min.
Temp. da coluna:	40 °C
Temp. do amostrador automático:	4 °C
Volume de injeção:	5 µL
Lavagem da agulha:	1:1:1:1 ACN/metanol/isopropanol/água com 0,2% FA
Gradiente:	Tempo (min) %B 0 20 7 70 7,25 95
Desligamento:	11 min
Tempo posterior:	2 min

### MS

Ionização eletrospray (ESI), Modo positivo		
Temp. do gás:	325 °C	
Fluxo de gás:	10 L/min.	
Nebulizador:	50 psi	
Aquecedor do gás de impulsão:	350 °C	
Fluxo do gás de impulsão:	11 L/min.	
Capilar:	4.000 V	
Delta EMV (+):	300 V	
Segmentos de tempo:	No. Tempo (min)	Válvula de desvio
	1 0	Para os resíduos
	2 2	Para o MS

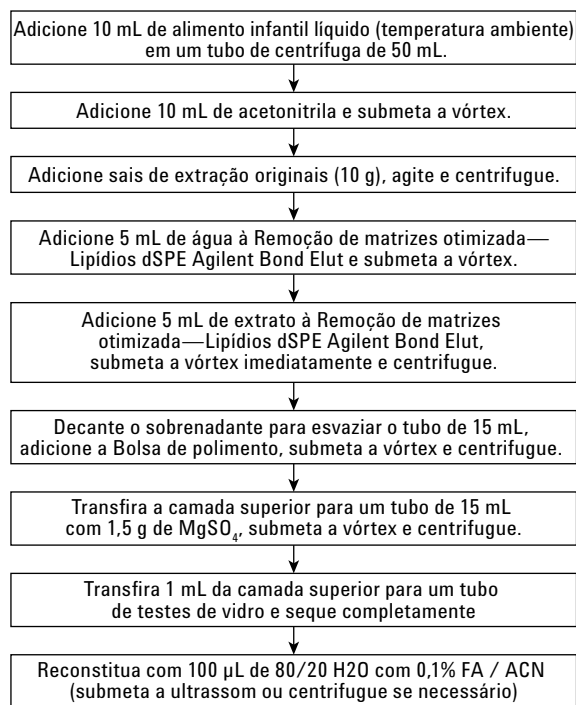


Figura 1. Protocolo de preparo de amostras para aflatoxinas em alimento infantil líquido com Remoção de matrizes otimizada—Limpeza de lipídios Agilent Bond Elut e pós-tratamento avançado de amostras usando  $MgSO_4$ .

Tabela 3. Parâmetros de LC/MS/MS DMRM e tempos de retenção para analitos alvo.

Analito	RT (min)	Íon precursor (m/z)	Frag. (V)	Íon produto			
				Íon quantificador (m/z)	CE (V)	Íon qualificador (m/z)	CE (V)
Aflatoxina M1	4,28	329,1	143	273,1	21	229	45
Aflatoxina G2	4,55	331,1	164	313,1	25	245	33
Aflatoxina G1	4,88	329,07	149	243,1	25	115,1	80
Aflatoxina B2	5,13	315,09	174	287,1	25	259,1	29
Aflatoxina B1	5,44	313,07	169	241	41	128	80

## Padrões de calibração e controles de qualidade

Uma solução de trabalho de aflatoxina foi preparada em ACN a 2 µg/mL (aflatoxina M1) e 10 µg/mL (aflatoxina G2, G1, B2 e B1) a partir das soluções de estoque. A concentração de aflatoxina M1 foi feita cinco vezes menor do que as aflatoxinas adicionais para atender aos distintos limites regulatórios. O padrões de calibração e QC foram feitos a 100x da concentração final diluindo de forma adequada a solução de trabalho. A Tabela 4 mostra a concentração final das amostras de calibração e QC no alimento infantil. As solução de trabalho e todos os padrões de calibração e QC foram armazenados em vials de âmbar a 2–8 °C. Foram adicionados à matriz em branco de alimento infantil 100 µL do padrão de QC correspondente antes da extração. Para obter padrões de calibração compatíveis com a matriz, 10 µL do padrão de calibração correto foram adicionados em 990 µL de extrato de ACN na matriz em branco antes da secagem.

Tabela 4. Concentrações finais para amostras de calibração pós-adicionadas e QC pré-adicionadas em alimento infantil.

Padrão*	Aflatoxina M1 (ng/mL)	Aflatoxina B1, B2, G1, G2 (ng/mL)
Cal 1	0,01	0,05
Cal 2	0,02	0,10
Cal 3	0,10	0,50
Cal 4	0,50	2,50
Cal 5	1,00	5,00
Cal 6	2,50	12,5
QC baixo	0,025	0,125
QC médio	0,25	1,25
QC alto	2,00	10,0

\*Padrões feitos a 100x da concentração final para adição.

## Resultados e discussão

### Otimização do método

A EMR—Lipídios pode ser usada nos fluxos de trabalho de precipitação de proteína e QuEChERS. Testes iniciais mostraram que a análise de aflatoxina em alimento infantil líquido pode ser feita tanto com a precipitação de proteína quanto com o método QuEChERS. No entanto, devido ao aumento do fator de diluição associado à precipitação de proteína tradicional, a metodologia QuEChERS foi escolhida para essa aplicação. Após o experimento preliminar, os sais de extração QuEChERS foram escolhidos para essa aplicação, mas tanto os sais de extração AOAC quanto EN também são aceitáveis.

Com base nos critérios de sinal-ruído (S/N), foi determinado que uma etapa de concentração foi necessária para atingir o limite de quantificação (LOQ) necessário para a aflatoxina M1. Concentrações de 5x, 10x e 20x foram avaliadas, e com a configuração instrumental dada, uma concentração de 10x foi adequada para as necessidades do método e o LOQ. A Figura 2 mostra o cromatograma de LC/MS/MS dMRM para todas as aflatoxinas em alimento infantil após a extração QuEChERS, EMR—Limpeza de lipídios e pós-tratamento avançado de amostra com  $MgSO_4$ .

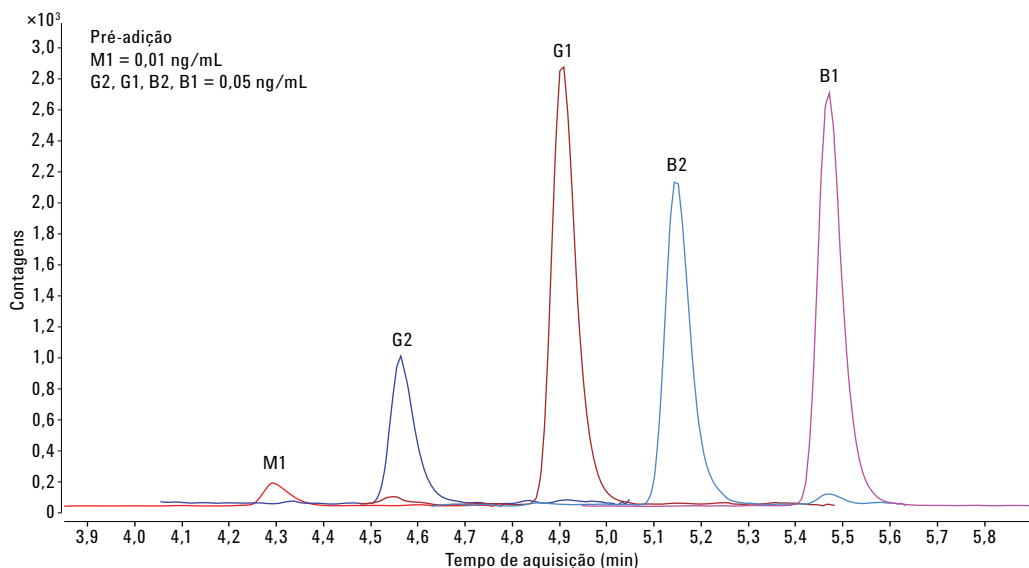


Figura 2. Cromatograma de LC/MS/MS dMRM de aflatoxinas em alimento infantil líquido após a extração QuEChERS e a Remoção de matrizes otimizada—Limpeza de lipídios dSPE Agilent Bond Elut com pós-tratamento avançado de amostras com  $MgSO_4$ .

## Remoção de matrizes

O alimento infantil líquido contém vários componentes de matriz, como gordura, proteína, carboidratos, vitaminas e minerais. Essa matriz complexa pode tornar o preparo de amostras mais desafiador, principalmente porque as concentrações de aflatoxina em geral são muito baixas. A Figura 3 mostra uma sobreposição de cromatogramas de varredura completa de GC/MS para uma amostra de matriz em branco de alimento infantil sem limpeza e com limpeza C18/PSA ou EMR—Lipídios dSPE com concentração de amostra de 10x. Quando comparada com a matriz em branco sem limpeza, a C18/PSA remove muito pouco da matriz, principalmente na região de eluição tardia do cromatograma. No entanto, a EMR—Lipídios, mostrada em vermelho, por meio de seu mecanismo de ação exclusivo, remove uma parte significativa da matriz, mesmo com uma concentração final de 10x durante o preparo de amostras.

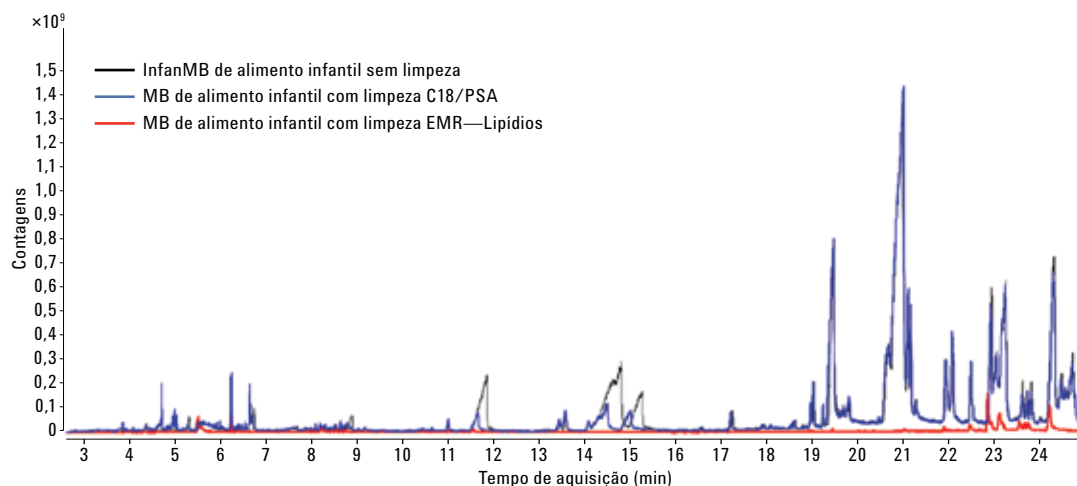


Figura 3. Sobreposição de cromatogramas de varredura completa de GC/MS de matriz em branco (MB) de alimento infantil sem limpeza, com limpeza C18/PSA dSPE e com a Remoção de matrizes otimizada—Limpeza de lipídios Agilent Bond Elut.

Os efeitos da matriz foram avaliados ao comparar a resposta do pico (área) do alimento infantil pós-adicionado e dos padrões de solvente equivalentes (Tabela 5). As amostras foram adicionadas em uma concentração de 0,025 ng/mL para a aflatoxina M1 e 0,125 ng/mL para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1. Esse método demonstra remoção de matrizes aceitável, sem apresentar efeitos de matriz significativos.

Tabela 5. Efeitos de matriz (%) para as cinco aflatoxinas. Os efeitos da matriz foram avaliados ao comparar a resposta do pico do alimento infantil pós-adicionado e dos padrões de solvente equivalentes (n = 5).

Aflatoxina	Efeitos de matriz (%)
M1	+ 12
G2	- 13
G1	- 10
B2	- 11
B1	- 9

## Linearidade e LOQ

A faixa linear foi de 0,01 a 2,50 ng/mL para aflatoxina M1 e 0,05 a 12,5 ng/mL para as aflatoxinas G2, G1, B2 e B1 no alimento infantil. A Tabela 6 mostra a faixa de calibração, regressão/peso com valores de  $R^2$  e o LOQ para cada aflatoxina nesse estudo. Os LOQs foram determinados de forma experimental com base no desempenho do método. O LOQ para a aflatoxina M1 ficou abaixo dos níveis de ação dos EUA e dos níveis máximos da Europa.

Tabela 6. Detalhes de calibração (ajuste de regressão, peso, valor  $R^2$ , faixa linear e LOQ) para cada aflatoxina.

Aflatoxina	Ajuste de regressão, peso	$R^2$	Faixa linear (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
M1	Linear, $1/x^2$	0,9931	0,01–2,50	0,01
G2	Linear, $1/x$	0,9990	0,05–12,5	0,05
G1	Linear, $1/x$	0,9994	0,05–12,5	0,05
B2	Linear, $1/x$	0,9986	0,05–12,5	0,05
B1	Linear, $1/x$	0,9987	0,05–12,5	0,05

## Recuperação e reprodutibilidade

A recuperação e a reprodutibilidade desse método foram avaliadas. Padrões de QC (n = 6) foram preparados adicionando alimento infantil líquido em branco em concentrações de 0,025, 0,25 e 2,00 ng/mL para aflatoxina M1. Além disso, padrões de QC foram preparados a 0,125, 1,25 e 10,0 ng/mL para aflatoxinas G2, G1, B1 e B2. As amostras foram extraídas usando o procedimento detalhado nessa nota de aplicação. Várias calibrações foram preparadas conforme descrito anteriormente e injetadas ao longo da corrida, para um total de n = 6, para verificar se há grandes alterações na resposta, o que não ocorreu. As recuperações das amostras de QC pré-adicionadas foram calculadas com base nas respostas em relação à curva de calibração correspondente à matriz. As Figuras 4 e 5 mostram a recuperação e os dados de Desvio padrão relativo (RSD). A recuperação média para todas as cinco aflatoxinas em todos os três níveis de QC foi de aproximadamente 101% com um RSD médio de <5,0%.

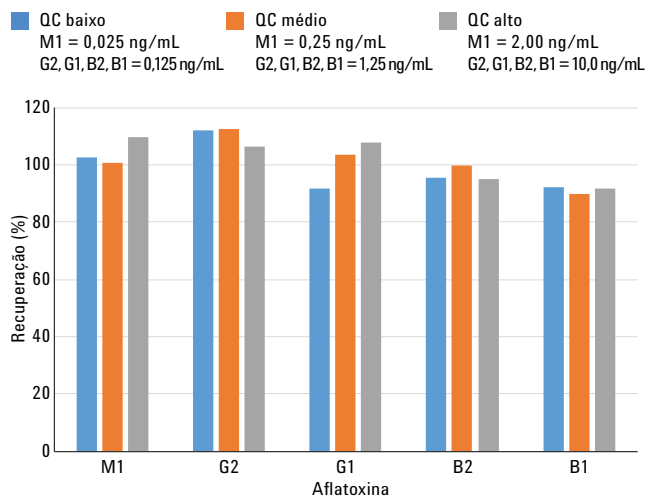


Figura 4. Recuperação (%) para as cinco aflatoxinas em alimento infantil líquido usando a Remoção de matrizes otimizada—Limpeza de lipídios Agilent Bond Elut. (n = 6)

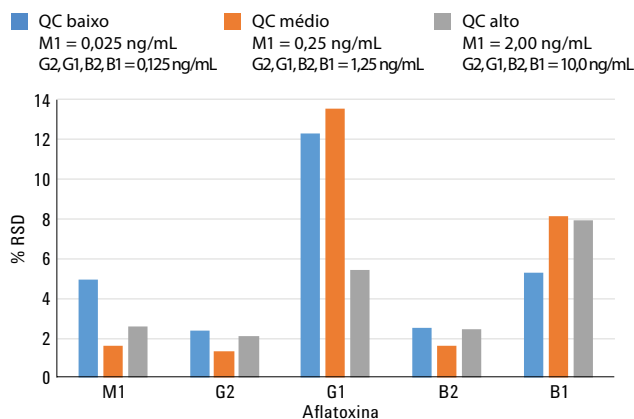


Figura 5. RSD (%) para as cinco aflatoxinas em alimento infantil líquido usando a Remoção de matrizes otimizada—Limpeza de lipídios Agilent Bond Elut. (n = 6).

## Amostra constituída

Um padrão de referência de alimento infantil reconstituído contendo aflatoxinas não estava disponível para compra. No entanto, o Material de Referência Europeu (ERM) - BD283 (leite em pó integral com níveis baixos de aflatoxina M1) foi obtido para avaliar ainda mais o método detalhado nessa nota de aplicação. O valor certificado relatado para esse padrão foi de  $0,111 + 0,018 \mu\text{g}/\text{kg}$  [17]. O padrão de leite em pó integral foi reconstituído de acordo com as recomendações do fabricante detalhadas no Relatório de certificação do ERM. Em resumo, 100 mL de água foi adicionado a 10 g de leite em pó integral, introduzindo um fator de diluição de dez vezes. Portanto, a concentração do leite reconstituído deve ser dez vezes menor do que a concentração relatada, ou seja,  $0,0093\text{--}0,0129 \text{ ng/mL}$ . A amostra reconstituída foi extraída após o mesmo procedimento detalhado anteriormente. A amostra constituída ( $n = 1$ ) foi analisada em um lote de amostras com um conjunto completo de calibradores e todos os três níveis de QC ( $n = 3$ ). Como a quantidade de amostras constituída é próxima ao LOQ do método ( $0,01 \text{ ng/mL}$  para aflatoxina M1), um QC LOQ extra ( $n = 3$ ) a  $0,01 \text{ ng/mL}$  foi incluído. A Tabela 7 apresenta os resultados dessa corrida. O ERM-BD283 foi quantificado a  $0,0101 \text{ ng/mL}$ , que fica dentro do intervalo esperado pelo material de referência. Isso demonstra a viabilidade e a versatilidade desse método para analisar amostras de alimentos infantis em pó (com adição de água) e líquidos.

Tabela 7. Resultados para aflatoxina M1 para amostra constituída ( $n = 1$ ) e amostras de QC ( $n = 3$ ).

Amostra	Conc. esperada (ng/mL)	Conc. calc. (ng/mL)	Precisão	RSD
QC baixo	0,025	0,0219	88	1,9
QC médio	0,25	0,2378	95	1,1
QC alto	2,00	2,0285	101	0,6
LOQ QC	0,01	0,0107	107	4,7
ERM-BD283	0,0111	0,0101	91	n/a

## Conclusões

Um método simples e eficiente para a análise de aflatoxinas em alimento infantil por LC/MS/MS foi desenvolvido. As amostras foram extraídas com um procedimento QuEChERS seguido da limpeza EMR—Lipídios dSPE Agilent Bond Elut e pós-tratamento avançado de amostra usando  $\text{MgSO}_4$ . Esse método proporcionou recuperações (média de 101%) e precisão (RSD médio  $< 5,0\%$ ) excelentes em uma faixa linear ampla. Os LOQs ficaram abaixo das regulamentações com uma etapa de concentração sem os indesejados efeitos de matriz.

Essa metodologia demonstra a remoção de matrizes significativa obtida com a EMR—Lipídios sem a perda de analitos indesejada. A limpeza de alto nível do instrumento oferece melhor cromatografia e diminui a frequência de manutenção e solução de problemas, economizando tempo e dinheiro. A solução exige menos experiência e equipamentos e pode ser implementada facilmente em laboratórios de alimentos. Embora essa aplicação se concentre em apenas uma classe de micotoxinas, a EMR—Lipídios foi desenvolvida para aplicações multirresíduo. Sendo assim, diferente das colunas de imunoafinidade, a EMR—Lipídios pode ser aplicada facilmente à análise de micotoxinas multiclasse. Trabalhos futuros continuarão investigando a limpeza EMR—Lipídios com outras amostras complexas e com alto teor de gordura.

## Referências

- Jard, G.; Liboz, T.; Mathieu, F.; Guyonvarc'h; Lebrihi, A. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2011**, *28(11)*, 1590–1609.
- Wang, H.; Zhou, X. J.; Liu, Y. Q.; Yang, H. M.; Guo, Q. L. Determination of aflatoxin M1 in milk by triple quadrupole liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part A*. **2010**, *27(9)*, 1261–1265.
- Sartori, A. V.; Swensson de Mattos, J.; Paulino de Moraes, M. H.; Wanderley de Nóbrega, A. Determination of Aflatoxins M1, M2, B1, B2, G1, and G2 and Ochratoxin A in UHT and Powdered Milk by Modified QuEChERS Method and Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*. **2015**, *8(9)*, 2321–2330.
- Anon. Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed; <http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/ucm077969.htm#afla>. Accessed on 7 October **2015**.

5. Anon. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs; <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02006R1881-20140701> Accessed on 11 February **2016**.
6. Meucci, V.; Razuoli, E.; Soldani, G.; Massart, F. Mycotoxin detection in infant formula milks in Italy. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2010**, *27(1)*, 64–71.
7. Dragacci, S.; Grosso, F.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Cleanup with Liquid Chromatography for Determination of Aflatoxin M<sub>1</sub> in Liquid Milk: Collaborative Study. *J. of AOAC International* **2001**, *84(2)*, 437–443.
8. Iha, M. H.; Barbosa, C. B.; Okada, I. A.; Trucksess, M. W. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in dairy products in Brazil. *Food Control* **2011**, *22*, 1971–1974.
9. Shundo, L.; Sabino, M. Aflatoxin M<sub>1</sub> in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2006**, *37*, 164–167.
10. Bursić, V. P.; Vuković, G. Lj.; Jajić, I. M.; Lazić, S. D.; Cara, M. H.; Čolović, R. R.; Vukmirović, Đ. M. Analysis of Aflatoxins B<sub>1</sub> and G<sub>1</sub> in Maize by QuEChERS. *Jour. Nat. Sci, Matica Srpska Novi Sad* **2013**, *124*, 51–57.
11. Filigenzi, M. S.; Ehrke, N.; Aston, L. S.; Poppenga, R. H. Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*. **2011**, *28 (10)*, 1324–1339.
12. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Pesticides in Avocado with Agilent Bond Elut EMR—Lipid by LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6098EN, **2015**.
13. Zhao, L.; Lucas, D. *Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS*; Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-6096EN, **2015**.
14. Anon. *CPG Sec. 527.400 Whole Milk, Lowfat Milk, Skim Milk - Aflatoxin M<sub>1</sub>*; <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074482.htm> Accessed on 7 October **2015**.
15. Anon. *CPG Sec. 555.400 Foods - Adulteration with Aflatoxin*; <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074555.htm> Accessed on 7 October **2015**.
16. Anon. *CPG Sec. 683.100 Action Levels for Aflatoxins in Animal Feeds*. <http://www.fda.gov/ICECI/ComplianceManuals/CompliancePolicyGuidanceManual/ucm074703.htm> Accessed on 7 October **2015**.
17. Josephs, R.D.; Koeber, R.; Bernreuther, A.; Schimmel, H.; Ulberth, F.; *EUR Report 21202 EN – DG Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements*, **2005**. [https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/rm/ERM-BD284\\_report.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/default/files/rm/ERM-BD284_report.pdf)

## Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Somente para uso em pesquisas. Não devem ser usados em procedimentos de diagnóstico.

Essas informações estão sujeitas a alterações sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2016  
 Impresso nos EUA  
 31 de março de 2016  
 5991-6818PTBR



**Agilent Technologies**