

解决方案

玉米、大米和花生油中 黄曲霉毒素B族和G族的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱法；黄曲霉毒素B族和G族

介绍

采用Raykol Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪分析食品中的黄曲霉毒素，试样经过70%甲醇水溶液提取，提取液经离心、稀释后用含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和柱自动净化。用20 mL水淋洗柱子将免疫亲和柱上的杂质除去，以甲醇洗脱免疫亲和柱。将洗脱液在50 °C条件下氮吹干，用1mL初始流动相定容，经高效液相色谱仪上机分析。

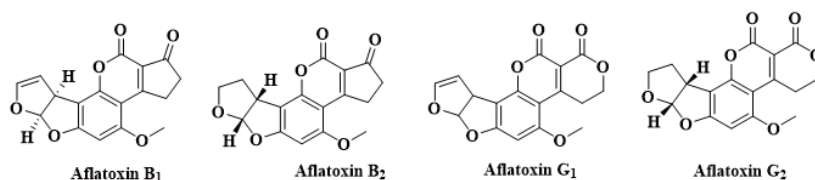


图-1.4种黄曲霉毒素的结构式

本文参考GB5009.22-2016《食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定》中第三法，采用免疫亲和柱净化，高效液相色谱检测，建立了复杂粮油样品基质中黄曲霉毒素高灵敏度的前处理和分析方法，得到四种常见粮油样品中黄曲霉毒素的加标回收率在83-100%之间，RSD值小于5%。

1. 仪器、耗材

Raykol Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

Raykol Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪

高效液相色谱: Waters ACQUITY UPLC I-Class

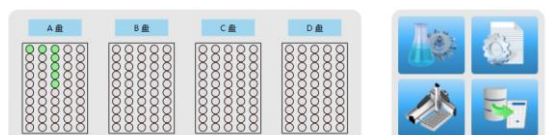
配备大体积流通池

黄曲霉毒素免疫亲和柱 (Romer, 60 mg/3mL)

甲醇 (Merck, 色谱纯)、乙腈 (Merck, 色谱纯)、吐温-20 (Sigma, 试剂纯)、超纯水 (Waston)、PBS 盐包

2. 标准曲线配置

使用睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站可实现标准品的全自动化配置, 可将购买的混合标液 (1000 ug/L) 通过工作站的直接稀释模式, 配置成浓度为 10 ug/L 的工作中间液, 紧接着可通过程序设置, 吸取该工作液, 配置一条浓度分别为 0.5 ug/L, 2.0 ug/L, 5.0 ug/L, 25 ug/L 和 100 ug/L 的标准工作曲线。



序号	命令	源液位	源液浓度	源液体积 (mL)	目标位	目标浓度	目标体积 (mL)	溶剂	洗针溶剂
1	直接稀释	A1	1000.00	1.00	A11	10.00	1.00	水/甲醇/乙腈65/17.5/17.5	水/甲醇/乙腈
2	直接稀释	A11	10.00	1.00	A21	0.50	1.00	水/甲醇/乙腈65/17.5/17.5	水/甲醇/乙腈
3	直接稀释	A11	10.00	1.00	A22	2.00	1.00	水/甲醇/乙腈65/17.5/17.5	水/甲醇/乙腈
4	直接稀释	A11	10.00	1.00	A23	5.00	1.00	水/甲醇/乙腈65/17.5/17.5	水/甲醇/乙腈
5	直接稀释	A1	1000.00	1.00	A24	25.00	1.00	水/甲醇/乙腈65/17.5/17.5	水/甲醇/乙腈
6	直接稀释	A1	1000.00	1.00	A25	100.00	1.00	水/甲醇/乙腈65/17.5/17.5	水/甲醇/乙腈
7	方法结束								

图-1. Auto Prep 200 液体工作站配标程序

3. 样品提取与前处理

花生油样品前处理

准确称取 5 g 花生油样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇-水溶液 (7:3) (v/v), 涡旋震荡提取 20 min, 以 7000 r/min 的转速离心 5 min,

取 4 mL 上清液于 80 mL 玻璃上样管中, 加入 23 mL 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液混匀, 待用。

玉米粉样品

准确称取 5 g 玉米粉样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇-水溶液 (7:3) (v/v), 涡旋震荡提取 20 min, 以 7000 r/min 的转速离心 5 min,

取 4 mL 上清液于 80 mL 玻璃上样管中, 加入 23 mL 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液混匀, 待用。

大米样品

准确称取 5 g 大米样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 甲醇-水溶液 (7:3) (v/v), 涡旋震荡提取 20 min, 以 7000 r/min 的转速离心 5 min, 取 4

mL 上清液于 80 mL 玻璃上样管中, 加入 23 mL 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液混匀, 待用。

固相萃取净化条件

表-1 固相萃取净化条件

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

以 2 mL/min 的速度精确上样 27 mL 待测液, 10 mL 水润洗样品瓶, 10 mL 水淋洗免疫亲和柱, 气推 30 mL 吹干免疫亲和柱, 推速为 80 mL/min。最后用 2 mL 甲醇以 0.5 mL/min 的速度洗脱样品,

收集洗脱液用睿科 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪于 50° C、2 psi 条件下氮吹干，用初始流动相定容至 1 mL，过滤膜上机分析。详细步骤见图-2。

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	ACQ				2.8
2	填充样品筛网	ACQ		40	3	1.3
3	待测上样		取水	2	27	15.2
4	清洗样品瓶	ACQ	取水	80	10	6.2
5	样洗	ACQ	取水	3	10	3.9
6	气推		取水	80	30	2.2
7	清洗注射泵	CHOOH		80	5	0.5
8	洗脱	CHOOH	收集	0.5	2	4.4
9	气推		收集	0.5	2	4.4
10	气推		收集	80	20	1.6
11	结束					
12						

图-2. Fotector Plus 黄曲霉毒素免疫亲和净化方法

4. 检测条件

液相色谱条件

表-2 黄曲霉毒素液相色谱检测条件

色谱柱	Waters BEH-C ₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm)
流速	0.300 mL/min
流动相	A: 水, B: (甲醇:乙腈=1:1)
柱温	40 °C
进样体积	10 μL
梯度洗脱	等度洗脱 A:B=65:35
荧光检测器	激发波长 365nm, 发射波长 463nm

色谱图

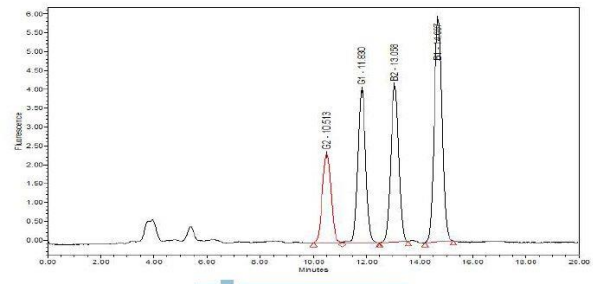


图-3. 四种黄曲霉毒素大流通池检测色谱图 (2 ug/L)

5. 样品测试

油样加标测试

取空白花生油样 5 g，添加 2 ug/kg 的黄曲霉毒素 G₂、B₂、G₁ 和 B₁ 的标准品，进行上述步骤的前处理净化，样品回收率如下表-3 所示：

表-3 添加水平为 2 ug/kg 花生油样的回收率

名称	回收率						平均回收率	RSD
	1	2	3	4	5	6		
AFG ₂	100.00%	97.57%	96.20%	97.98%	92.31%	99.40%	97.24%	2.85%
AFB ₂	94.60%	91.96%	93.46%	94.40%	87.96%	91.38%	92.29%	2.69%
AFG ₁	92.02%	89.90%	87.86%	87.49%	82.01%	81.56%	86.81%	4.86%
AFB ₁	108.35%	104.62%	106.70%	102.18%	100.83%	98.89%	103.60%	3.48%

大米样品加标测试

大米中添加水平为 2 ug/kg 的黄曲霉毒素 G₂、B₂、G₁ 和 B₁ 的回收率结果：

表-4 添加水平为 2 ug/kg 大米的回收率结果

名称	回收率						平均回收率	RSD
	1	2	3	4	5	6		
AFB ₁	98.98%	94.95%	101.46%	98.32%	97.34%	97.83%	98.14%	2.17%
AFB ₂	94.60%	92.54%	97.74%	95.56%	96.11%	96.02%	95.43%	1.83%
AFG ₁	80.71%	84.55%	85.16%	87.24%	86.06%	87.71%	85.24%	2.96%
AFG ₂	88.37%	90.83%	93.88%	93.11%	93.43%	95.16%	92.46%	2.65%

玉米样品加标测试

玉米中添加水平为 2 ug/kg 的黄曲霉毒素 G₂、B₂、G₁ 和 B₁ 的回收率结果：

表-5 添加水平为 2 ug/kg 玉米的回收率结果

名称	回收率						平均回收率	RSD
	1	2	3	4	5	6		
AFB ₁	91.20%	92.04%	89.49%	91.79%	91.23%	88.48%	90.70%	1.55%
AFB ₂	91.26%	91.80%	89.05%	91.71%	90.95%	87.98%	90.46%	1.74%
AFG ₁	86.78%	85.46%	85.64%	85.94%	80.51%	83.11%	84.57%	2.77%
AFG ₂	79.96%	85.29%	81.83%	83.62%	85.93%	83.22%	83.31%	2.65%

6. 结果与讨论

样品提取液 pH 对回收率的影响

只用纯水稀释样品提取液进行上述净化步骤，样品中的加标回收率只有 65-75%；若采用 0.1%吐温-20 的 PBS 缓冲液进行样品提取液稀释，样品回收率为 83-98%。因此需要加入 PBS 缓冲液进行样品上样环境 pH 的调节。

洗脱速度的影响

采用 1 mL/min 的洗脱速度，洗脱效果不佳，回收率在 60-70%；降低洗脱速度至 0.5 mL/min，洗脱效果有明显提升，回收率在 80-95%。因此洗脱速度不宜设置得过快。

7. 注意事项

由于黄曲霉毒素在紫外光照射下不稳定，因此在实验过程中应该避免紫外光和太阳光的照射。

谷物中离心完成后，不可放置过长时间，否则谷物容易重新吸水，可能导致提取液的浓度过高，

使样品的回收率偏高，影响测试结果。

固相萃取进行提取液净化前，特别对于偏酸或偏碱性样品，应用 PBS 缓冲溶液（pH=7.4）进行稀释后上机，否则可能会导致回收率偏低。

8. 总结

本文采用睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪，结合 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪，优化建立玉米、大米和花生油中的黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定前处理方法。

采用 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站可实现混标、标准曲线的配置，全程无需人为值守，让实验人员远离有毒有害特别是黄曲霉毒素这样的剧毒化学物质，保护身体健康。Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪对样品进行检测能同部进行 6 个样品净化，连续自动处理 60 个样品，做

样通量高；同时可无人值守，大幅度减少了工作人员的工作量，提高了工作效率。此外还可避免工作人员因操作失误导致的检测偏差，也可将实验人员更迭对检测结果的影响最小化。Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪处理通量高，60 个样品可同时进行氮吹，实验平行性好；而且采用氮吹针自动追随液面的设计，无需手动调节氮吹针且耗气量小，省时省力。本解决方案快速高效，且无需人员值守，让实验人员远离黄曲霉毒素等有害化学物质且提供工作效率。



全自动液体样品处理工作站
标液配制



高通量全自动固相萃取仪
净化



全自动平行浓缩仪
浓缩



睿科集团股份有限公司
RayKol Group Corp., Ltd.

自动化样品前处理解决方案领先供应商

网址: www.raykol.com

电话: 400-885-1816

邮箱: info@raykol.com



本文中的信息、说明和技术指标如有变更, 恕不另行通知

© 睿科集团股份有限公司

2020 年 5 月版