

解决方案

玉米、小麦中赭曲霉毒素A的测定

关键字

全自动固相萃取；高效液相色谱法；赭曲霉毒素A

介绍

赭曲霉毒素是继黄曲霉毒素后又一个引起世界广泛关注的霉菌毒素。它是由曲霉属的7种曲霉和青霉属的6种青霉菌产生的一组重要的、污染食品的真菌毒素。其中毒性最大、分布最广、产毒量最高、对农产品污染最严重、与人类健康关系最密切的是赭曲霉毒素A。

采用Raykol Fotector Plus高通量全自动固相萃取仪分析食品中的赭曲霉毒素A，试样经过60%乙腈水提取，提取液经离心、稀释后用含有赭曲霉毒素A特异抗体的免疫亲和柱自动净化。用10 mL真菌毒素清洗缓冲液和10 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45 °C条件下氮吹干，用0.5 mL 初始流动相定容，经高效液相色谱仪上机分析。

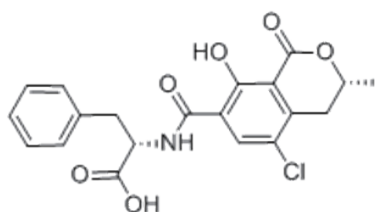


图-1.八种糖皮质激素的结构式

本文参考GB 5009.96-2016《食品中赭曲霉毒素A的测定》第一法，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赭曲霉毒素A高灵敏度的前处理和分析方法，得到常见粮油样品中赭曲霉毒素A的加标回收率在92-102%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 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱 (Romer, 60 mg/3mL)

高效液相色谱: Waters ACQUITY UPLC I-Class
配备大体积流通池

甲醇 (Merck, 色谱纯)

乙腈 (Merck, 色谱纯)

吐温-20 (Sigma, 试剂纯)

PBS 盐包

氯化钠

碳酸氢钠

冰乙酸

超纯水 (Waston)

真菌毒素清洗缓冲液: 称取 25.0g 氯化钠、5.0g 碳酸氢钠溶于水中, 加入 0.1mL 吐温-20, 用水稀释至 1L。

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, 可将购买的单标母液 (100 mg/L) 通过工作站的直接稀释模式, 配置成浓度为 1 mg/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 1.0 ug/L, 2.0 ug/L, 10 ug/L, 50 ug/L 和 100 ug/L

的标准工作曲线。

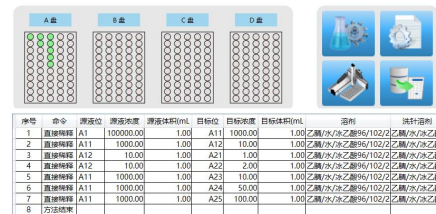


图-2. Auto Prep 200 液体工作站配标程序

3. 样品提取与前处理

玉米样品前处理

准确称取 5 g 玉米样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 60%乙腈水溶液, 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 26 mL PBS 缓冲液稀释混匀, 待用。

小麦样品前处理

准确称取 5 g 小麦样品于 50 mL 离心管中, 加入 20 mL 60%乙腈水溶液, 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 26mL PBS 缓冲液稀释混匀, 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	赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱 (Romer, 60 mg/3 mL)
淋洗	真菌毒素清洗缓冲液和超纯水
洗脱	甲醇

以 2 mL/min 的速度精确上样 30 mL 待测液,

用 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液和 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 AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪于 45° C、2 psi 条件下氮吹干, 用初始流动相定容至 0.5 mL, 过滤膜上机分析。详细步骤见图-3。

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	H ₂ O				2.8
2	填充样品路径	H ₂ O		40	3	1.3
3	特殊上样		废水	2	30	16.8
4	清洗样品瓶	ZJTSQXHCY	废水	80	10	6.2
5	淋洗	H ₂ O	废水	2	10	5.6
6	气推		废水	80	30	2.2
7	清洗注射泵	CK30R		80	5	0.5
8	洗脱	CK30R	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-3. Fotector Plus 赭曲霉毒素 A 免疫亲和净化方法

4. 检测条件

表-2 赭曲霉毒素 A 液相色谱检测条件

色谱柱	Waters BEH-C ₁₈ (2.1×100 mm, 1.7 μm)
流速	0.200 mL/min
流动相	乙腈:水:冰乙酸=96:102:2
柱温	35
进样体积	10 μL
梯度洗脱	等度洗脱
荧光检测器	激发波长 333nm 发射波长 460nm

5. 样品测试

玉米样品加标测试

取玉米样品 5g，添加 1 ug/kg 的赭曲霉毒素 A 如下表-3 所示：
标准品，进行上述步骤的前处理净化，样品回收率

表-3 添加水平为 1 ug/kg 玉米样品回收率

名称	回收率						平均回收率	RSD
	1	2	3	4	5	6		
OTA	95.7%	95.6%	92.5%	98.7%	97.3%	100.4%	96.7%	2.8%

小麦样品加标测试

小麦样品中添加水平为 1 ug/kg 的赭曲霉毒素 A 回收率结果：

表-4 添加水平为 1 ug/kg 小麦样品回收率

名称	回收率						平均回收率	RSD
	1	2	3	4	5	6		
OTA	97.2%	92.7%	94.8%	101.2%	99.7%	96.7%	97.0%	3.2%

6. 结果与讨论

淋洗柱子对回收率的影响

淋洗溶剂对回收率的有一定影响，应以 10 mL 真菌毒素清洗缓冲液和 10 mL 纯水除去免疫亲和柱上残留的色素和基质。若不用真菌毒素清洗缓冲液

淋洗而只是用水淋洗，6 个样品的平行性降低，RSD 值大于 10%。

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 80%以下；降低洗脱速度至 0.5 mL/min，洗脱效果有明显提升，回收率在 90-102%之间。因

此洗脱速度不宜设置得过快。

7. 注意事项

提取液与 PBS 缓冲液稀释混匀后若比较浑浊，可以再次高速离心方便后续过免疫亲和柱。

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。

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、小麦中赭曲霉毒素 A 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、标准曲线的自动配置，全程无需人为值守，让实验人员远离有毒有害的化学物质，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步进行 6 个样品净化，连续自动处理 60 个样品，做样通量高，提高了工作效率。AutoEVA-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

本解决方案的准确性、重复性、再现性均满足实验要求，能够用于 GB 5009.96-2016《食品中赭曲霉毒素 A 的测定》方法对玉米和小麦样品的测定。



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