

关键词

全自动固相萃取；高效液相色谱法；黄曲霉毒素M1

介绍

采用睿科Fotector Plus全自动固相萃取仪分析奶粉中的黄曲霉毒素M1，试样经热水溶解后用甲醇进行提取，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10mL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。

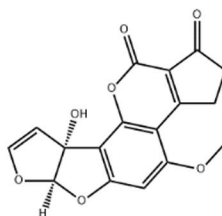


图-1黄曲霉毒素M1的结构式

本文参考《GB5009.24-2016食品中黄曲霉毒素M族的测定》第二法，采用免疫亲和柱净化，高效液相色谱检测，建立了奶粉中黄曲霉毒素M1高灵敏度的前处理和分析方法，得到黄曲霉毒素M1的加标回收率在88%-95%之间，RSD值小于5%。

1. 仪器与耗材

仪器和耗材

睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪

睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站

睿科 Auto EVA 80 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

黄曲霉毒素专用免疫亲和柱 (Romer, 60mg/3mL)

试剂

甲醇 (Merck, 色谱纯)

乙腈 (Merck, 色谱纯)

超纯水 (Wastons)

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制, 可将购买的标液 (1000 $\mu\text{g/L}$) 通过工作站的直接稀释模式, 配制成浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 和 2 $\mu\text{g/L}$ 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 0.05 $\mu\text{g/L}$, 0.1 $\mu\text{g/L}$, 0.5 $\mu\text{g/L}$, 1.0 $\mu\text{g/L}$, 2.0 $\mu\text{g/L}$ 和 5.0 $\mu\text{g/L}$ 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
1	填充管路						3.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
2	直接稀释	A1	1000.00	1.00	A2	50.00	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
3	直接稀释	A2	50.00	1.00	A3	2.00	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
4	直接稀释	A3	2.00	1.00	A11	0.05	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
5	直接稀释	A3	2.00	1.00	A12	0.10	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
6	直接稀释	A3	2.00	1.00	A13	0.50	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
7	直接稀释	A2	50.00	1.00	A14	1.00	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
8	直接稀释	A2	50.00	1.00	A15	2.00	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15
9	直接稀释	A2	50.00	1.00	A16	5.00	1.00	水/甲醇/乙腈70/15/15

图-2. Auto Prep 200 液体工作站配标程序

3. 样品前处理

3.1 样品提取

准确称取 1g 奶粉于 50mL 离心管中，加入 4mL 50℃ 热水，涡旋混匀。若奶粉不能完全溶解，将离心管至于 50℃ 的水浴中，将奶粉完全溶解后取出。待样液冷却至 20℃ 后，加入 10mL 甲醇，涡旋提取 3min。在 4℃ 条件下以 8000r/min 的转速离心 10min，取全部上清液于 80mL 玻璃上样管中，加入 50mL PBS 缓冲液稀释，待用。

3.2 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 Raykol 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 2mL/min 的速度精确上样 65mL 待测液，5mL 水润洗样品瓶，5mL 水淋洗免疫亲和柱，气推 30mL 推干免疫亲和柱，推速为 80mL/min。最后用 4mL 乙腈以 1mL/min 的速度洗脱样品，收集洗脱液用睿科 Auto EVA 80 全自动平行浓缩仪于 50° C、气流量 1L/min 的条件下吹干，用初始流动相定容至 1mL，涡旋混匀，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	乙腈				2.8
2	填充样品路径	水		40	4	1.5
3	特殊上样		有机废液	2	65	36.1
4	清洗样品瓶	水	有机废液	60	5	3.4
5	淋洗	水	废水	2	5	2.9
6	气推		废水	80	30	2.2
7	清洗注射泵	乙腈		60	3	0.4
8	洗脱	乙腈	收集	1	2	2.4
9	暂停					2
10	洗脱	乙腈	收集	1	2	2.4
11	气推		收集	2	2	1.4
12	气推		收集	20	10	1.3
13	结束					
14						

图-3. Fotector Plus 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱净化方法

4. 检测条件

4.1 液相色谱条件

表-2 黄曲霉毒素 M1 液相色谱检测条件

色谱柱	Waters BEH-C ₁₈ (2.1×100mm, 1.7 μ m)
流速	0.300mL/min
流动相	A:水, B: (甲醇:乙腈=1:1)
柱温	40° C
进样体积	10 μ L
梯度洗脱	等度洗脱 A:B=70:30
荧光检测器	激发波长 430nm, 发射波长 360nm

4.2 色谱图

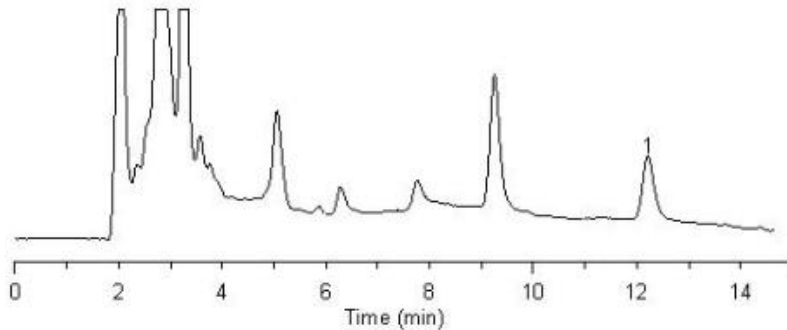


图-4. 黄曲霉毒素 M1 色谱图 (1 μ g/L)

5. 样品测试

取空白奶粉样品 5g, 添加浓度为 1 μ g/kg 的黄曲霉毒素 M1 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 奶粉添加水平为 1 μ g/kg 的回收率 (n=6)

名称	回收率 (%)						平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3	4	5	6		
AFM1	89.3	94.6	94.7	92.2	92.1	87.9	91.8	3.0

6. 结果与讨论

6.1 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, 回收率没有用 PBS 缓冲液进行稀释的高, 因此建议用 PBS 缓冲液进行稀释, 调节样品环境的 pH。

6.2 稀释体积的影响

标准采用 40mL 水或 PBS 缓冲液稀释, 考虑到提取液中有机相的比例较高, 稀释体积不足的话对免疫

亲和柱内抗体的活性有影响，因此本方法采用 50mL 的 PBS 缓冲液对提取液进行稀释。

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。

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

8. 总结

采用高通量全自动固相萃取仪法，准确性和重复性均满足实验要求，能够用于《GB 5009.24-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》方法对奶粉的检测。

采用睿科 Fotector Plus 高通量全自动固相萃取仪能同时进行 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。

睿科 Auto Prep 200 全自动液体工作站可实现混标、标准曲线的配制，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。

睿科 Auto EVA 80 全自动平行浓缩仪处理通量高，80 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。



全自动液体样品处理工作站
标曲配制



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.

智能化、自动化实验室整体解决方案

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

2021年10月版