



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107462641 A

(43)申请公布日 2017.12.12

(21)申请号 201710581373.6

(22)申请日 2017.07.17

(71)申请人 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司

地址 011500 内蒙古自治区呼和浩特市和林格尔盛乐经济园区

(72)发明人 杜晶晶 丁勇宝 李慧娟 王克超 宋晓东 常建军

(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250

代理人 闫聪彦

(51)Int. Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/14(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

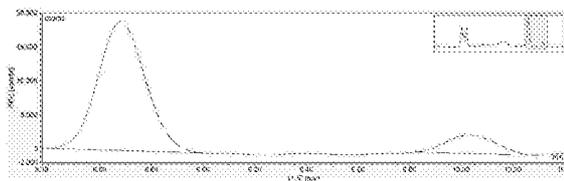
权利要求书1页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法

(57)摘要

本发明提供了一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,包括,采用乙腈-水混合溶剂对粮食和/或粮食制品进行提取,收集提取液,过滤,滤液经水稀释后转移至免疫亲和柱中,用甲醇洗脱至少两次,合并洗脱液并吹干,残留物经溶解、过滤后得到供试液;采用高效液相色谱法对供试液进行检测。本发明的检测方法对赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的检出限分别为0.7ng/mL、4ng/mL,在加标水平分别为2.5、5、10 μg/Kg时对大米中的赭曲霉毒素A的回收率为98.4%、99.6%、99.3%,在加标水平分别为30、60、120 μg/Kg时对大米中的玉米赤霉烯酮的回收率为95.17%、95.23%、98.62%,远高于现有技术,表明本发明的方法具有高的灵敏度和准确度,能够实现同时对赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的同时检测。



1. 一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:

采用乙腈和水的混合溶剂对粮食和/或粮食制品进行提取,收集提取液,过滤,滤液经水稀释后转移至免疫亲和柱中,以甲醇为洗脱剂洗脱至少两次,合并洗脱液并吹干,残留物经溶解、过滤后得到供试液;

采用高效液相色谱法对所述供试液进行检测,色谱条件如下:

色谱柱:C<sub>18</sub>柱,250mm×4.6mm,5μm;

流动相:

乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为(45~49.5):(45~49.5):(1~10);

流速:1.0mL/min;

检测波长:激发波长333nm,发射波长477nm;

进样量:10μL;

柱温:25℃±5℃。

2. 根据权利要求1所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述混合溶剂中乙腈和水的体积比为(8~9.5):1。

3. 根据权利要求1或2所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,1g所述粮食和/或粮食制品需4~6mL的所述混合溶剂。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述滤液与水的体积之比为1:(3~5)。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述免疫亲和柱由玉米赤霉烯酮免疫亲和柱和赭曲霉毒素A免疫亲和柱串联而成,所述滤液经水稀释后进入所述玉米赤霉烯酮免疫亲和柱中,所述玉米赤霉烯酮免疫亲和柱的流出物再进入所述赭曲霉毒素A免疫亲和柱中。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,甲醇一次洗脱时的流速为0.5~1滴/s。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,甲醇二次洗脱时的流速为1~2滴/s。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,采用所述流动相溶解所述残留物。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述流动相中乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为49.5:49.5:1。

10. 根据权利要求1-9任一项所述的同時检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,其特征在于,所述粮食为大米或小麦。

## 一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于分析检测技术领域,具体涉及一种能够同时检测粮食及其制品中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法。

### 背景技术

[0002] 真菌毒素是真菌生长产生的有毒次生代谢产物,在粮食或饲料生产过程中由于温度、湿度等为真菌的生长繁殖提供适宜条件,从而引起真菌毒素的污染。据世界粮农组织报告,全球每年约有25%的农作物遭受真菌及其毒素污染,约有2%的农作物因污染严重而失去营养和经济价值。

[0003] 真菌毒素对人类和动物健康均有害,尤其是赭曲霉毒素和玉米赤霉烯酮,不仅分布比较普遍,而且对人体健康的危害也较大。赭曲霉毒素是曲霉属和青霉属中的某些菌种产生的一组次级代谢物,它包含7种结构类似的化合物,其中以赭曲霉毒素A(OTA)的毒性最强。动物试验表明,OTA主要会引起肝脏和肾脏毒害,长期摄入有致癌作用。1993年国际癌症研究会将OTA定为2B组致癌物质(可能使人类致癌物),2002年我国粮食国家卫生标准中规定,谷物和豆类中OTA $\leq 5\mu\text{g}/\text{kg}$ 。玉米赤霉烯酮(ZEN)是由镰刀菌产生的一种雌激素类真菌毒素,它广泛地存在于霉变的玉米、小麦等谷物中,具有很强的生殖毒性和致畸作用,为此各国都制定了严格的限量标准,例如澳大利亚规定黑麦中不得超过0.06mg/kg,巴西规定玉米中不得超过0.2mg/kg,法国规定食用谷物中不得超过0.2mg/kg,罗马尼亚规定所有食品中不得超过0.03mg/kg。

[0004] 目前,对于真菌毒素的检测方法主要有薄层色谱法、免疫分析法及精密仪器分析法等,其中精密仪器分析法可以对样品中的真菌毒素进行精确的定性、定量分析,是真菌毒素检测的确认方法。例如,王向红等人发表于《中国食品学报》的科技论文“高效液相色谱法同时测定谷物中的赭曲霉毒素和玉米赤霉烯酮”中披露了一种利用高效液相色谱同时测定谷物中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,该方法包括,将谷物样品粉碎后加入甲醇超声提取,过滤,收集甲醇提取液,蒸干,残留物用流动相溶解,过膜后上机检测,色谱条件如下:以ODS  $\text{C}_{18}$ 为色谱柱,乙腈-2%乙酸(体积比40:60)为流动相,荧光检测器检测,激发波长 $E_x 325\text{nm}$ ,发射波长 $E_m 455\text{nm}$ ,流速 $1\text{mL}/\text{min}$ ,柱温 $40^\circ\text{C}$ ,进样量 $20\mu\text{L}$ 。上述方法对赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的检出限分别为 $0.025\text{ng}$ 和 $0.26\text{ng}$ ,具有较高的灵敏度,但其在加标水平分别为2.5、5、 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 时对多种谷物中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的加标回收率普遍在90%以下,尤其对大米和小麦还不足80%,这说明上述检测方法的准确度较差,难以胜任对谷物中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的同时检测。

[0005] 鉴于此,如何对现有的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法进行改进,是本领域尚未解决的一个技术问题。

### 发明内容

[0006] 本发明解决的是现有的同时测定谷物中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法准

确度差的问题,进而提供一种准确度高、灵敏度好的适于同时检测粮食及其制品中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法。

[0007] 为达到上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0008] 一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:

[0009] 采用乙腈和水的混合溶剂对粮食和/或粮食制品进行提取,收集提取液,过滤,滤液经水稀释后转移至免疫亲和柱中,以甲醇为洗脱剂洗脱至少两次,合并洗脱液并吹干,残留物经溶解、过滤后得到供试液;

[0010] 采用高效液相色谱法对所述供试液进行检测,色谱条件如下:

[0011] 色谱柱:C<sub>18</sub>柱,250mm×4.6mm,5μm;

[0012] 流动相:

[0013] 乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为(45~49.5):(45~49.5):(1-10);

[0014] 流速:1.0mL/min;

[0015] 检测波长:激发波长333nm,发射波长477nm;

[0016] 进样量:10μL;

[0017] 柱温:25℃±5℃。

[0018] 优选地,所述混合溶剂中乙腈和水的体积比为(8~9.5):1。

[0019] 优选地,1g所述粮食和/或粮食制品需4~6mL的所述混合溶剂。

[0020] 优选地,所述滤液与水的体积之比为1:(3~5)。

[0021] 优选地,所述免疫亲和柱由玉米赤霉烯酮免疫亲和柱和赭曲霉毒素A免疫亲和柱串联而成,所述滤液经水稀释后进入所述玉米赤霉烯酮免疫亲和柱中,所述玉米赤霉烯酮免疫亲和柱的流出物再进入所述赭曲霉毒素A免疫亲和柱中。

[0022] 优选地,甲醇一次洗脱时的流速为0.5~1滴/s。

[0023] 优选地,甲醇二次洗脱时的流速为1~2滴/s。

[0024] 优选地,采用所述流动相溶解所述残留物。

[0025] 优选地,所述流动相中乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为49.5:49.5:1。

[0026] 优选地,所述粮食为大米或小麦。

[0027] 本发明采用的免疫亲和柱通过转接头实现串联,转接头的构造为:

[0028] 所述转接头包括至少三个层叠设置的圆片,多层所述圆片的直径由上至下逐渐减小,下一级层析柱的内径介于相邻两个所述圆片的直径之间;

[0029] 所述转接头的上表面具有进液口,所述进液口的口径大于上一级层析柱的排液口的口径;所述转接头的下表面设置有出液口。

[0030] 优选地,多层所述圆片的圆心之间的连线垂直于水平面。

[0031] 优选地,在相邻两个所述圆片中,下层所述圆片的周缘与下一级层析柱的内壁密封连接。

[0032] 优选地,所述进液口的内壁与上一级层析柱的排液口的外壁密封连接。

[0033] 优选地,所述出液口向下延伸形成出液管路,所述出液管路的末端接近下一级层析柱中的填料。

[0034] 优选地,所述进液口位于所述转接头的上表面的中部,所述出液口位于所述转接头的下表面的中部。

[0035] 与现有技术相比,本发明的上述技术方案具有如下优点:

[0036] 1、本发明提供的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,通过采用乙腈和水的混合溶剂作为提取剂对粮食和/或粮食制品进行提取,可提高粮食和/或粮食制品中的待测物—赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的提取率;而后采用免疫亲和柱对提取液进行纯化处理,有利于提高后续仪器分析的准确度和灵敏度,在纯化过程中利用甲醇至少洗脱两次,以保证待测物能够完全从免疫亲和柱上洗脱下来,提高免疫亲和柱的回收率。本发明的色谱条件可以将杂质的出峰位置与待测物的出峰位置明显分离开,且两个待测物的出峰位置也能彼此分开,互不干扰,说明本发明的检测方法能够实现对粮食及其制品中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的同时检测,二者的检出限分别为0.7ng/mL、4ng/mL,在加标水平分别为2.5、5、10 $\mu$ g/Kg时对大米中的赭曲霉毒素A的回收率依次为98.4%、99.6%、99.3%,在加标水平分别为30、60、120 $\mu$ g/Kg时对大米中的玉米赤霉烯酮的回收率依次为95.17%、95.23%、98.62%,远高于现有技术,由此表明本发明所述检测方法具有高的灵敏度和准确度。

[0037] 2、本发明提供的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,通过限定混合溶剂中乙腈和水的体积比为(8~9.5):1,粮食和/或粮食制品的质量与混合溶剂的体积之比为1:(4~6),以使赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的提取率达到最大值。

[0038] 3、本发明提供的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,通过将玉米赤霉烯酮免疫亲和柱和赭曲霉毒素A免疫亲和柱通过转接头串联,使得提取液先经玉米赤霉烯酮免疫亲和柱分离纯化之后再由赭曲霉毒素A免疫亲和柱分离纯化,由此可有效缩短纯化时间,大幅降低化学试剂的使用量,达到对同一检测样本中的多种真菌毒素进行连续性分离纯化的目的。

[0039] 作为优选的实施方式,转接头中的多层圆片的圆心之间的连线垂直于水平面,这样可保证转接头整体上呈水平放置,从而有利于多个层析柱沿竖直方向上的串联连接以提高柱效。转接头中的下层圆片的周缘与下一级层析柱的内壁密封连接,与此同时其进液口的内壁与上一级层析柱的排液口的外壁密封连接,这样一方面可以防止上一级层析柱的流出液在进入下一级层析柱的途中因外流而损失,以提高整个装置的密封性,另一方面还可简化装置结构,省略使用能够起到支撑、固定层析柱等作用的部件,以便于装置的快速组装和使用。另外,转接头的出液口向下延伸形成出液管路,且出液管路的末端接近下一级层析柱中的填料,这样能够避免上一级层析柱的流出液在进入下一级层析柱时因重力作用而影响下一级层析柱填料的平整度,进而确保尽可能高的纯化效果。

[0040] 4、本发明提供的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,进一步限定滤液与水的体积比及每次甲醇洗脱时的流速,以最大可能地除去杂质的干扰,更好地实现对赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的分离纯化。

## 附图说明

[0041] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式中的技术方案,下面将对具体实施方式描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0042] 图1为根据实施例1的方法得到的标准品的HPLC谱图；  
[0043] 图2为根据实施例1的方法得到的标准曲线图；  
[0044] 图3为根据实施例1的方法得到的供试液的HPLC谱图；  
[0045] 图4为实施例4提供的免疫亲和柱的使用状态图；  
[0046] 图5为实施例4中转接头的结构图；  
[0047] 图6为根据实施例2的方法得到的供试液的HPLC谱图；  
[0048] 图7为根据实施例3的方法得到的供试液的HPLC谱图；  
[0049] 其中，附图标记说明如下：  
[0050] 1-进样装置；2-第一转接头；3-玉米赤霉烯酮免疫亲和柱；4-第二转接头；5-赭曲霉毒素A免疫亲和柱；6-固定件；7-圆片；8-出液管路。

### 具体实施方式

[0051] 下面将结合附图对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

[0052] 在本发明的描述中，v%代表体积百分含量。另外需要说明的是，术语“上”、“下”、“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系，仅是为了便于描述本发明和简化描述，而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作，因此不能理解为对本发明的限制。术语“相连”、“连接”应做广义理解，例如，可以是固定连接，也可以是可拆卸连接，或一体地连接；可以是直接相连，也可以通过中间媒介间接相连，还可以是两个元件内部的连通。术语“上一级”、“下一级”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性。对于本领域的普通技术人员而言，可以具体情况理解上述术语在本发明中的具体含义。

[0053] 此外，下面所描述的本发明不同实施方式中所涉及的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互结合。

#### [0054] 实施例1

[0055] 分别称取赭曲霉毒素A 0.01mg和玉米赤霉烯酮0.1mg，混合后用流动相溶解并定容至1mL，过0.45 $\mu$ m有机滤膜，得到标准品供试液；

[0056] 采用高效液相色谱仪对标准品供试液进行检测，得到的HPLC谱图如图1所示，图1中，保留时间为8.817min处的峰为赭曲霉毒素A的吸收峰，保留时间为10.037min处的峰为玉米赤霉烯酮的吸收峰；其中，色谱条件如下：

[0057] 色谱柱： $C_{18}$ 柱，250mm $\times$ 4.6mm，5 $\mu$ m；

[0058] 流动相：乙腈：水：2v%冰乙酸的体积比为49.5：49.5：1；

[0059] 流速：1.0mL/min；

[0060] 检测波长：激发波长333nm，发射波长477nm；

[0061] 进样量：10 $\mu$ L；

[0062] 柱温：25 $^{\circ}$ C。

[0063] 分别吸取赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮标准溶液，配成赭曲霉毒素A浓度为0ng/ml、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml；玉米赤霉烯酮浓度为0ng/ml、10ng/ml、

50ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml的标准溶液。浓度由低到高进样检测,以峰面积-浓度作图,得到标准曲线回归方程和线性相关系数,分别为:

[0064] 玉米赤霉烯酮: $Y=17.9406X+53.2369, R^2=0.99572$ ;

[0065] 赭曲霉毒素A: $Y=1591.4389X+372.8680, R^2=0.99865$ 。

[0066] 分别将浓度为1ng/ml的赭曲霉毒素A标准溶液与浓度为10ng/ml的玉米赤霉烯酮标准溶液混合、浓度为5ng/ml的赭曲霉毒素A标准溶液与浓度为50ng/ml的玉米赤霉烯酮标准溶液混合、浓度为10ng/ml的赭曲霉毒素A标准溶液与浓度为100ng/ml的玉米赤霉烯酮标准溶液混合、浓度为20ng/ml的赭曲霉毒素A标准溶液与浓度为200ng/ml的玉米赤霉烯酮标准溶液混合、浓度为30ng/ml的赭曲霉毒素A标准溶液与浓度为300ng/ml的玉米赤霉烯酮标准溶液混合,得到五个混合标准溶液,按照浓度由低到高进样检测,以峰面积-浓度作图,得到的HPLC谱图如图2所示。图2进一步证实赭曲霉毒素A、玉米赤霉烯酮的浓度与峰面积之间均具有良好的线性关系。

[0067] 基于上述实验,本实施例还提供了一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:

[0068] S1、样品预处理:

[0069] 称取大米粉末25.00g,加入体积比为9:1的乙腈和水的混合溶剂100mL,振荡提取30min,收集提取液,过滤,吸取滤液10mL,加入至40mL水中稀释混匀;

[0070] 取10mL稀释液转移至免疫亲和柱中,调节压力使溶液以1~2滴/s的流速通过免疫亲和柱,直至有部分空气进入柱体中,而后用水淋洗柱子两次,待水流干后,用1.5mL甲醇进行一次洗脱,控制其流速为0.5滴/s,待一次洗脱剂流干后再用1.5mL甲醇进行二次洗脱,控制其流速为2滴/s,待二次洗脱剂流干后合并两次洗脱液,在50℃氮气下吹干,残留物冷却至室温后用流动相溶解并定容至1mL,过0.45μm有机滤膜,得到供试液,备用;

[0071] S2、上机检测:

[0072] 采用高效液相色谱仪对供试液进行检测,得到的HPLC谱图如图3所示,图3中,保留时间为8.680min处的峰为赭曲霉毒素A的吸收峰,保留时间为10.030min处的峰为玉米赤霉烯酮的吸收峰。

[0073] 其中,色谱条件如下:

[0074] 色谱柱:C<sub>18</sub>柱,250mm×4.6mm,5μm;

[0075] 流动相:

[0076] 乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为49.5:49.5:1;

[0077] 流速:1.0mL/min;

[0078] 检测波长:激发波长333nm,发射波长477nm;

[0079] 进样量:10μL;

[0080] 柱温:25℃。

[0081] 实施例2

[0082] 本实施例提供的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:

[0083] S1、样品预处理:

[0084] 称取小麦粉末25.00g,加入体积比为8:1的乙腈和水的混合溶剂150mL,振荡提取40min,收集提取液,过滤,吸取滤液10mL,加入至50mL水中稀释混匀;

[0085] 取10mL稀释液转移至免疫亲和柱中,调节压力使溶液以1~2滴/s的流速通过免疫亲和柱,直至有部分空气进入柱体中,而后用水淋洗柱子两次,待水流干后,用2.0mL甲醇进行一次洗脱,控制其流速为3滴/4s,待一次洗脱剂流干后再用2.0mL甲醇进行二次洗脱,控制其流速为1滴/s,待二次洗脱剂流干后合并两次洗脱液,在50℃氮气下吹干,残留物冷却至室温后用流动相溶解并定容至1mL,过0.45μm有机滤膜,得到供试液,备用;

[0086] S2、上机检测:

[0087] 采用高效液相色谱仪对供试液进行检测,得到的HPLC谱图如图6所示,图6中,保留时间为8.680min处的峰为赭曲霉毒素A的吸收峰,保留时间为9.990min处的峰为玉米赤霉烯酮的吸收峰。其中色谱条件如下:

[0088] 色谱柱:C<sub>18</sub>柱,250mm×4.6mm,5μm;

[0089] 流动相:乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为45:47.5:1;

[0090] 流速:1.0mL/min;

[0091] 检测波长:激发波长333nm,发射波长477nm;

[0092] 进样量:10μL;

[0093] 柱温:20℃。

[0094] 实施例3

[0095] 本实施例提供的同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,包括如下步骤:

[0096] S1、样品预处理:

[0097] 称取大米粉末25.00g,加入体积比为9.5:1的乙腈和水的混合溶剂125mL,振荡提取30min,收集提取液,过滤,吸取滤液10mL,加入至30mL水中稀释混匀;

[0098] 取10mL稀释液转移至免疫亲和柱中,调节压力使溶液以1~2滴/s的流速通过免疫亲和柱,直至有部分空气进入柱体中,而后用水淋洗柱子两次,待水流干后,用1.5mL甲醇进行一次洗脱,控制其流速为1滴/s,待一次洗脱剂流干后再用2.0mL甲醇进行二次洗脱,控制其流速为3滴/2s,待二次洗脱剂流干后合并两次洗脱液,在50℃氮气下吹干,残留物冷却至室温后用流动相溶解并定容至1mL,过0.45μm有机滤膜,得到供试液,备用;

[0099] S2、上机检测:

[0100] 采用高效液相色谱仪对供试液进行检测,得到的HPLC谱图如图7所示,图7中,保留时间为8.710min处的峰为赭曲霉毒素A的吸收峰,保留时间为9.993min处的峰为玉米赤霉烯酮的吸收峰。其中色谱条件如下:

[0101] 色谱柱:C<sub>18</sub>柱,250mm×4.6mm,5μm;

[0102] 流动相:乙腈:水:2v%冰乙酸的体积比为47.5:45:1;

[0103] 流速:1.0mL/min;

[0104] 检测波长:激发波长333nm,发射波长477nm;

[0105] 进样量:10μL;

[0106] 柱温:30℃。

[0107] 实施例4

[0108] 如图4所示,本实施例提供的免疫亲和柱包括,由上至下依次串联设置的进样装置1、第一转接头2、玉米赤霉烯酮免疫亲和柱3、第二转接头4、赭曲霉毒素A免疫亲和柱5及固定件6;其中,第一转接头2和第二转接头4的结构具体参见图5,包括四个层叠设置的圆片7,

四层所述圆片7的直径由上至下逐渐减小,且所有圆片的圆心之间的连线垂直于水平面;赭曲霉毒素A免疫亲和柱5的内壁与第二转接头4的第三层圆片(从上向下计数)的周缘密封连接;在第二转接头4的第一层圆片的中部设置有进液口,所述进液口的内壁与玉米赤霉烯酮免疫亲和柱3的排液口的外壁密封连接;在第二转接头4的第四层圆片的中部设置有出液口,所述出液口向下延伸形成出液管路8,所述出液管路8的末端接近赭曲霉毒素A免疫亲和柱5中的填料。

[0109] 同样地,玉米赤霉烯酮免疫亲和柱3的内壁与第一转接头2的第三层圆片(从上向下计数)的周缘密封连接;在第一转接头2的第一层圆片的中部设置有进液口,所述进液口的内壁与进样装置1的排液口的外壁密封连接;在第一转接头2的第四层圆片的中部设置有出液口,所述出液口向下延伸形成出液管路8,所述出液管路8的末端接近玉米赤霉烯酮免疫亲和柱3中的填料。

[0110] 在本实施例中,进样装置1为一次性针筒,固定件6为能够固定安放下一级层析柱的多孔架,可同时固定多组本实施例中所述的免疫亲和柱。

[0111] 作为实施例4的可变型实施方式,任何类型的层析柱都适用于本发明,诸如硅胶柱、氧化铝柱、氨基柱等,并不局限于免疫亲和柱。当然关于层析柱的数量也不限制于两个,在其它实施例中还可以是三个及以上,这主要取决于检测样本中的待检物的种类。

[0112] 作为实施例4的可替换实施方式,转接头中圆片的数量根据实际所使用的层析柱的型号而定,以免疫亲和柱为例,有1mL和3mL的柱管,这样就可以设置由三层圆片构成的转接头,第一层圆片的直径大于所有型号的免疫亲和柱的内径,第二层圆片的直径与3mL柱管的免疫亲和柱的内径匹配,第三层圆片的直径与1mL柱管的免疫亲和柱的内径匹配。

[0113] 作为实施例4的可选择实施方式,只要保证下一级层析柱的内径介于转接头的相邻两个圆片的直径之间,且转接头进液口的口径大于上一级层析柱的排液口的口径,即可实现上下两级层析柱之间的串联和传质,进而达到本发明的目的。

[0114] 实验例1:加标回收实验

[0115] 取3份本发明实施例1中的流动相各1mL,分别向每份流动相中加入赭曲霉毒素A标准品1ng和玉米赤霉烯酮标准品17ng、赭曲霉毒素A标准品2ng和玉米赤霉烯酮标准品30ng、赭曲霉毒素A标准品5ng和玉米赤霉烯酮标准品60ng,待完全溶解后依次标记为实验组1、实验组2、实验组3,上机检测,每个实验组进行6次平行测定,色谱条件同实施例1。

[0116] 分别按照GB5009.209-2016《食品安全国家标准食品中玉米赤霉烯酮的测定》和GB5009.96-2016《食品安全国家标准食品中赭曲霉毒素A的测定》的方法对与实验组1-3具有相同加标量的样品进行6次平行检测。

[0117] 上述检测结果及计算得到的平均加标回收率请见表1。

[0118] 表1:

[0119]

	标准品	添加前浓度(ng/ml)	添加浓度(ng/ml)	检测结果(ng/ml)	平均加标回收率(%)
实验组 1	玉米赤霉烯酮	0	17	15.9	106.0
	赭曲霉毒素 A	0	1	0.93	93
实验组 2	玉米赤霉烯酮	0	30	28.77	95.9
	赭曲霉毒素 A	0	2	1.92	96
实验组 3	玉米赤霉烯酮	0	60	62.2	103.7
	赭曲霉毒素 A	0	5	4.67	93.4
对照组 1	玉米赤霉烯酮	0	17	11.61	68.3
	赭曲霉毒素 A	0	1	0.84	84
对照组 2	玉米赤霉烯酮	0	30	21.89	73
	赭曲霉毒素 A	0	2	1.9	95
对照组 3	玉米赤霉烯酮	0	60	44.56	74.3
	赭曲霉毒素 A	0	5	4.44	88.8

[0120] 从表1可以看出,本发明的方法对玉米赤霉烯酮的加标回收率为95.9-106%,对赭曲霉毒素A的加标回收率为93~96%,均高于国标方法的加标回收率。

[0121] 表2还示出了上述实验组1-3及对照组1-3的其它相关实验结果,由表2可知,本发明的检测方法可以大大节约检测时间和化学试剂使用量。

[0122] 表2:

[0123]

	项目	实验组 1	实验组 2	实验组 3	对照组 1	对照组 2	对照组 3
精密度 (相对标准偏差)	玉米赤霉烯酮	6.55%	9.45%	9.47%	1.68%	0.86%	0.42%
	赭曲霉毒素 A	12.83%	8.16%	8.02%	2.91%	16.11%	6.59%
回收率	玉米赤霉烯酮	99.65%~ 117.09%	83.41%~ 106.46%	81.10%~ 103.66%	66.44%~ 69.65%	71.31%~ 72.95%	73.46%~ 74.27%
	赭曲霉毒素 A	75.25%~ 90.89%	82.06%~ 98.37%	78.26%~ 95.82%	80.22%~ 84.35%	68.76%~ 96.73%	76.58%~ 88.83%
检测时间 (以 8 个样品为准)	两种毒素	15 小时	15 小时	15 小时	30 小时	30 小时	30 小时
消耗的主要化学试剂 (以 8 个样品为准)	两种毒素	720ml 乙腈	720ml 乙腈	720ml 乙腈	1200ml 乙腈	1200ml 乙腈	1200ml 乙腈
消耗的主要废弃物处理试剂 (以 8 个样品为准)	两种毒素	2000ml 次氯酸钠	2000ml 次氯酸钠	2000ml 次氯酸钠	4000ml 次氯酸钠	4000ml 次氯酸钠	4000ml 次氯酸钠

[0124] 采用逐级稀释法分析本方法的检出限和定量限,根据信噪比为3的峰响应值得出方法检出限,结果见表3。从表3可以看出,实验组1和实验组2均可检测到较低浓度的待测物。

[0125] 表3:

	项目	实验组 1	实验组 2	对照组 1	对照组 2
[0126] 检测限 (ng/ml)	玉米赤霉烯酮	4	4	5	5
	赭曲霉毒素 A	0.7	0.7	1	1

[0127] 实验例2:加标回收实验

[0128] 取3份未污染的大米粉末各1g,分别向每份大米粉末中加入赭曲霉毒素A标准品2.5ng和玉米赤霉烯酮标准品30ng、赭曲霉毒素A标准品5ng和玉米赤霉烯酮标准品60ng、赭曲霉毒素A标准品10ng和玉米赤霉烯酮标准品120ng,依次标记为实验组4、实验组5、实验组6,供试液预处理方法及上机检测的色谱条件同实施例1。

[0129] 根据王向红等人发表于《中国食品学报》的科技论文“高效液相色谱法同时测定谷物中的赭曲霉毒素和玉米赤霉烯酮”中披露了一种利用高效液相色谱同时测定谷物中的赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法,取3份未污染的大米粉末各1g,分别向每份大米粉末中加入赭曲霉毒素A标准品2.5ng和玉米赤霉烯酮标准品30ng、赭曲霉毒素A标准品5ng和玉米赤霉烯酮标准品60ng、赭曲霉毒素A标准品10ng和玉米赤霉烯酮标准品120ng,依次标记为对照组4、对照组5、对照组6,供试液预处理方法及上机检测的色谱条件同该现有技术。

[0130] 上述检测结果及计算得到的平均加标回收率请见表4。

[0131] 表4:

	标准品	添加前浓度 (ng/ml)	添加浓度 (ng/ml)	检测结果 (ng/ml)	平均加标回收率 (%)
[0132] 实验组 4	玉米赤霉烯酮	0	30	28.55	95.17
	赭曲霉毒素 A	0	2.5	2.46	98.4
实验组 5	玉米赤霉烯酮	0	60	57.14	95.23
	赭曲霉毒素 A	0	5	4.98	99.6
实验组 6	玉米赤霉烯酮	0	120	118.35	98.62
	赭曲霉毒素 A	0	10	9.93	99.3
对照组 4	玉米赤霉烯酮	0	30	22.44	74.8
	赭曲霉毒素 A	0	2.5	1.95	78
对照组 5	玉米赤霉烯酮	0	60	45.78	76.3

[0133]		赭曲霉毒素 A	0	5	3.91	78.3
	对照组 6	玉米赤霉烯酮	0	120	90.24	75.2
		赭曲霉毒素 A	0	10	7.94	79.4

[0134] 从表4可以看出,在加标量相同的条件下,本发明的方法对赭曲霉毒素A的加标回收率为98.4%、99.6%、99.3%,对玉米赤霉烯酮的加标回收率为95.17%、95.23%、98.62%,均高于现有技术的方法,这说明本发明所述的检测方法与现有技术相比具有更高的准确度。

[0135] 实验例3:抗干扰实验

[0136] 向与未污染的大米粉末基质中加入黄曲霉毒素B1标准品1mg、及适量赭曲霉毒素A标准品和玉米赤霉烯酮标准品,按照实施例1相同的方法进行检测,检测结果及加标回收率请见表5。

[0137] 表5:

	添加前浓度 (ng/ml)	添加浓度 (ng/ml)	检测结果 (ng/ml)	加标回收率 (%)
[0138] 玉米赤霉烯酮	0	30	27.21	90.7
赭曲霉毒素 A	0	2	1.93	96.5

[0139] 根据表5可知,黄曲霉毒素B1对玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A的测定无影响,说明本发明所述的检测方法抗干扰能力强,与国标方法的效果相当。

[0140] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

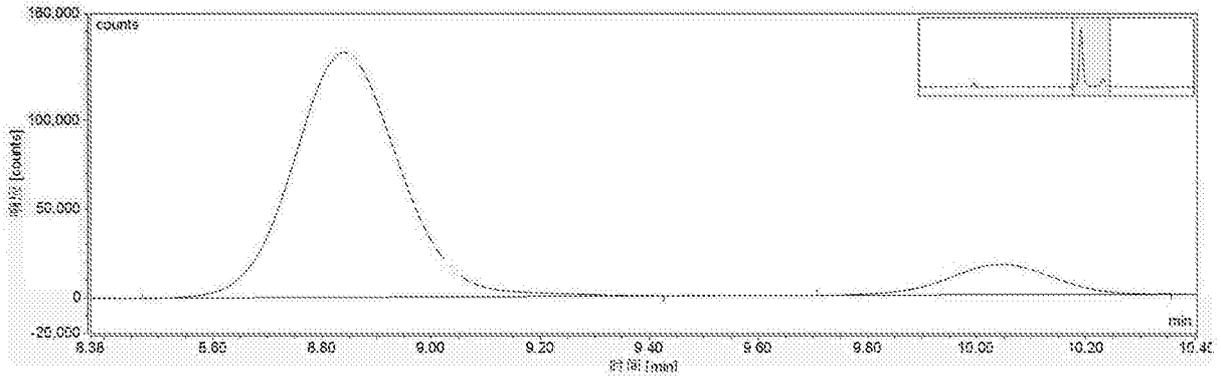


图1

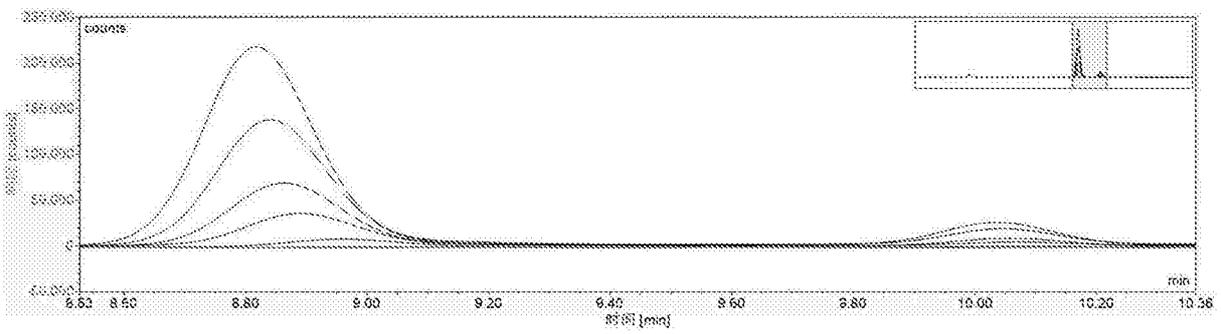


图2

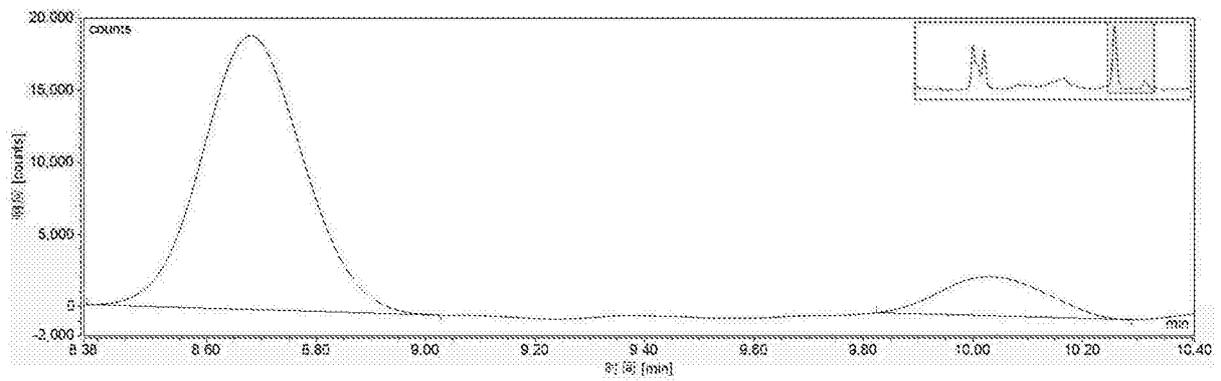


图3

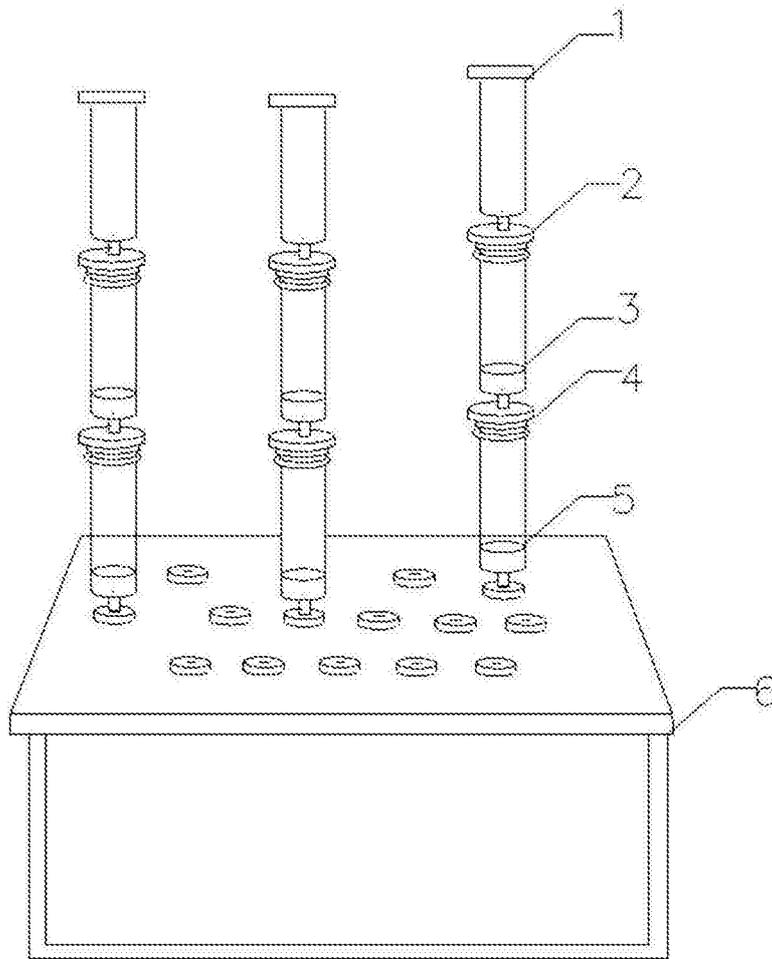


图4

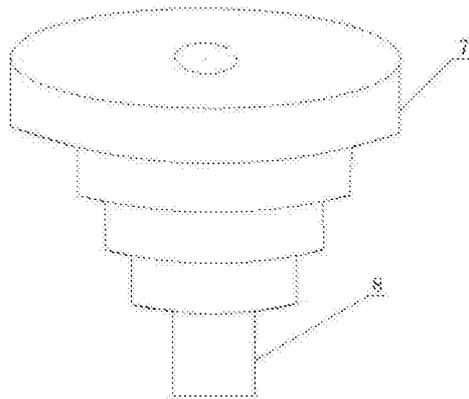


图5

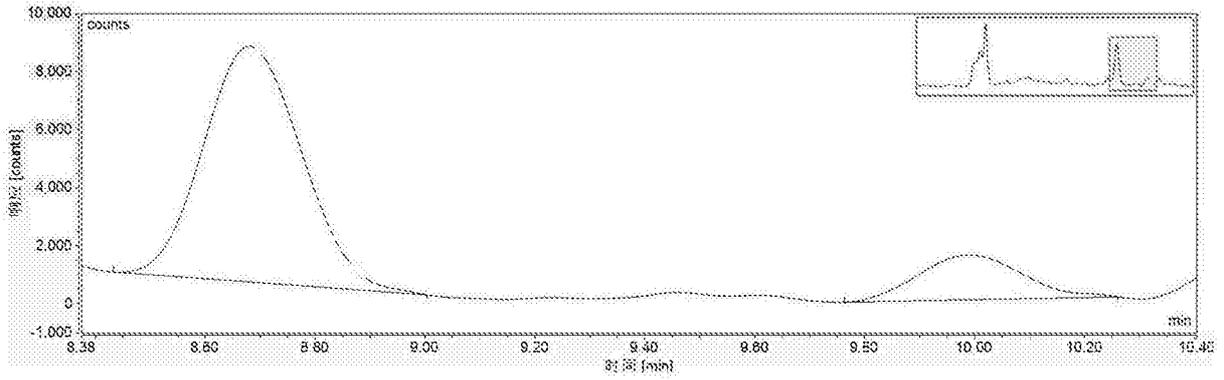


图6

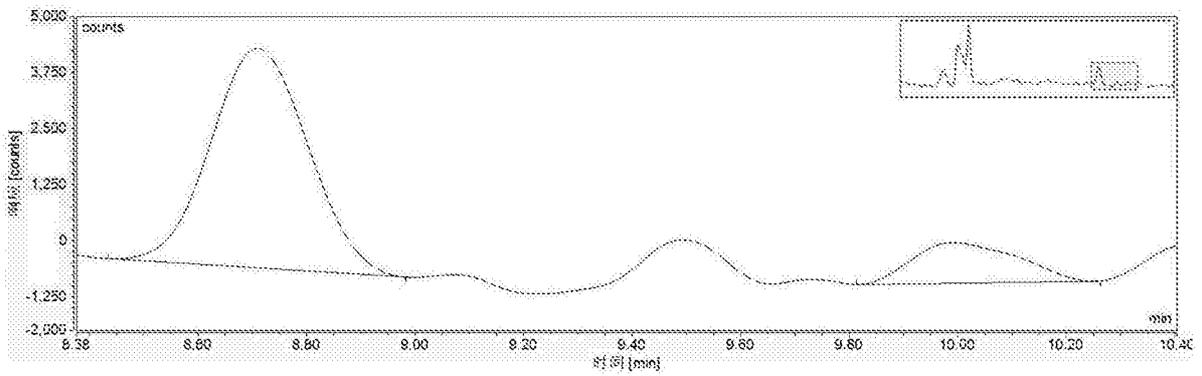


图7

专利名称(译)	一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107462641A</a>	公开(公告)日	2017-12-12
申请号	CN2017110581373.6	申请日	2017-07-17
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
[标]发明人	杜晶晶 丁勇宝 李慧娟 王克超 宋晓东 常建军		
发明人	杜晶晶 丁勇宝 李慧娟 王克超 宋晓东 常建军		
IPC分类号	G01N30/02 G01N30/14 G01N33/53		
CPC分类号	G01N30/02 G01N30/14 G01N33/53		
代理人(译)	闫聪彦		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种同时检测赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的方法，包括，采用乙腈-水混合溶剂对粮食和/或粮食制品进行提取，收集提取液，过滤，滤液经水稀释后转移至免疫亲和柱中，用甲醇洗脱至少两次，合并洗脱液并吹干，残留物经溶解、过滤后得到供试液；采用高效液相色谱法对供试液进行检测。本发明的检测方法对赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的检出限分别为0.7ng/mL、4ng/mL，在加标水平分别为2.5、5、10 $\mu$ g/Kg时对大米中的赭曲霉毒素A的回收率为98.4%、99.6%、99.3%，在加标水平分别为30、60、120 $\mu$ g/Kg时对大米中的玉米赤霉烯酮的回收率为95.17%、95.23%、98.62%，远高于现有技术，表明本发明的方法具有高的灵敏度和准确度，能够实现对赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮的同时检测。

