

小麦粉中赭曲霉毒素 A 的测定

实验背景:

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。现已发现有 7 种曲霉和 6 种青霉菌能产生赭曲霉毒素 A。该毒素主要污染粮谷类农产品如燕麦、大麦、小麦、玉米、动物饲料和动物性食品(如猪肾脏、肝脏)等。赭曲霉毒素主要侵害动物肝脏与肾脏。这种毒素主要是引起肾脏损伤,大量的毒素也可能引起动物的肠黏膜炎症和坏死。还在动物试验中观察到它的致畸作用。其中,赭曲霉毒素的毒性强弱顺序是:OTA>OTC>OTB,本实验主要针对小麦粉中赭曲霉毒素 A 的测定。

参考标准:

《GB 5009.96-2016 食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》第一法

实验步骤:

甲醇-水 (80:20): 80mL 甲醇+20mL 水, 混匀

磷酸缓冲溶液: 称取 8.0g 氯化钠, 1.2g 磷酸氢钠, 0.2g 磷酸二氢钾, 0.2g 氯化钾溶解于约 990mL 水中, 用浓盐酸调节 pH 至 7.0, 用水稀释至 1L

(1) 样品提取:

称取 5g 小麦粉试样于 50mL 离心管中, 加 20mL 甲醇水 (80:20) 混合溶液, 震荡 30min, 8000r/min 离心 3min, 移去 10mL 上清液, 加入磷酸缓冲溶液 40mL, 经过 8000r/min 离心 3min 备用。

(2) 样品净化:

活化: 将赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱放置到室温, 然后接上注射器

上样: 将上述提取液全部转移到注射器上, 以 1 滴/s 的速度通过免疫亲和柱, 弃流出液

淋洗: 先用 10mL 磷酸缓冲溶液淋洗, 再用 10mL 水淋洗, 然后将小柱抽干

洗脱: 准确加入 1mL 甲醇洗脱至进样瓶中, 抽干, 待 HPLC 分析。

(3) 仪器条件:

3.1 HPLC 条件

色谱柱: Welch Ultimate AQ-C18 4.6×150mm, 5μm

仪器型号: waters2695+FLR2475

流动相: A:2%冰乙酸水溶液 B:乙腈 等度洗脱:A:B(50:50)

柱温: 35°C

流速: 1.0mL/min

检测波长: 激发波长 333nm 发射波长 460nm

进样体积: 10 μL

(4) 实验图谱及结果

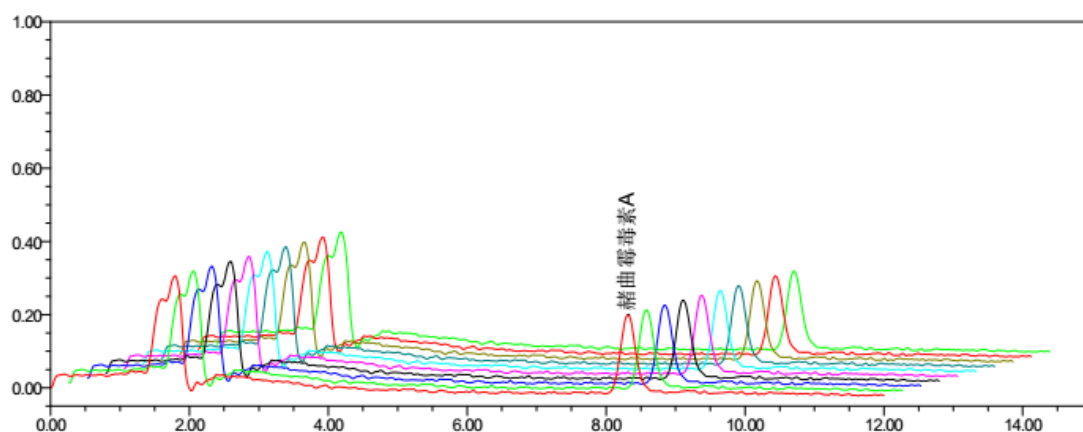


图 1 赭曲霉毒素 A 样品加标 1µg/kg 液相色谱图

Fig 1 liquid chromatogram of Ochratoxin A samples at 1.0µg/kg

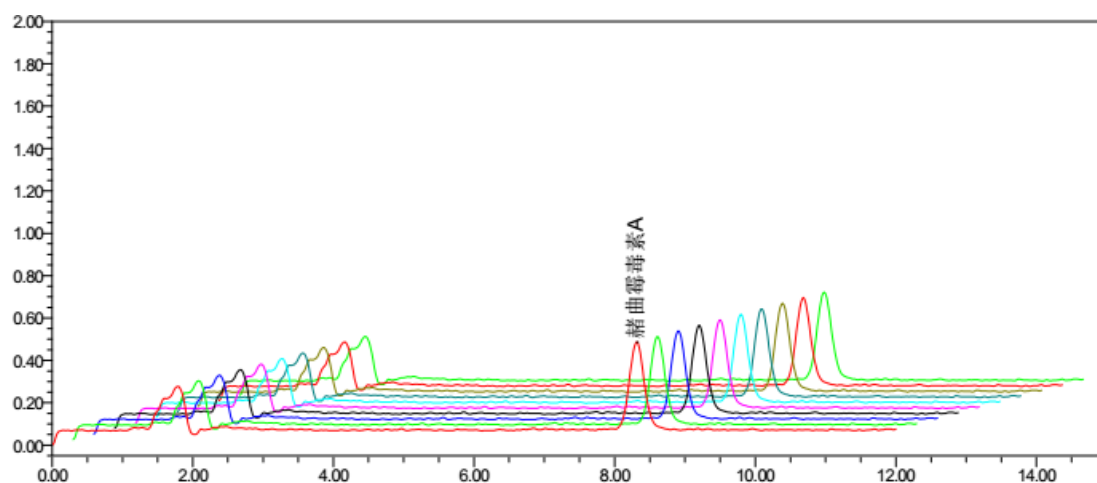


图 2 赭曲霉毒素 A 样品加标 2µg/kg 液相色谱图

Fig 2 liquid chromatogram of Ochratoxin A samples at 2.0µg/kg

由表 3 可知，采用免疫亲和柱结合液相色谱法检测赭曲霉毒素 A，加标量为 1µg/kg 和 2.0 µg/kg 的样品进行了检测，回收率在 85.33%~101.94%，能够满足检测要求。由图 1 可看出经赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱净化，采用月旭 Xtimate C18 色谱柱检测峰形良好，保留时间稳定。

表 3 赭曲霉毒素 A 加标回收实验结果(n=6)

Tab.3 Results of recovery and precision of Ochratoxin A

名称	加标量 (µg/kg)	加标回收率 (%)	RSD (%)	RT (min)
赭曲霉毒素 A	1	90.82	3.11	8.307
	2	92.64	2.67	

(5) 实际样品检测:

为了保证小麦粉样品的代表性，从大润发、永辉、华联、家乐福、苏果、沃尔玛等超市以及菜场选择具有代表性的 10 个小麦粉样品进行检测，结果均为未检出。

(6) 结论

本实验建立了赭曲霉毒素 A 检测的 HPLC 检测方法，对于加标量为 1.0 和 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品进行了检测，回收率在 85.33%~101.94%，符合国标要求，免疫亲和柱方法稳定并且色谱柱重现性良好，说明本方法能够用于检测食品中的赭曲霉毒素 A 的含量。

(7) 订购指南

产品名称	包装规格	订货号
赭曲霉毒素 A	3mL	01140-06032
Ultimate AQ-C18	5.0 μm , 4.6 \times 150mm	00207-31041