

# 全自动固相萃取-高效液相质谱联用测定 小麦粉和玉米粉中的赭曲霉毒素

## 1. 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、对农产品的污染最重、与人类健康关系最密切的是赭曲霉毒素 A。

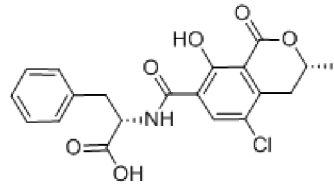


图-1. 赭曲霉毒素 A 的结构式

本应用文章参考 GB 5009.96-2016《食品安全国家标准食品中赭曲霉毒素 A 的测定》中第一法，采用免疫亲和柱净化，高效液相色谱联用技术检测，

建立了大麦粉及玉米粉基质中对赭曲霉毒素 A (OTA) 的前处理和检测分析方法，对于 OTA 的加标回收率在 77.9-78.40%之间。

**关键字：**全自动固相萃取；高效液相色谱-串联质谱；赭曲霉毒素

## 2. 仪器、试剂以及耗材

Raykol Fotector Plus 全自动固相萃取仪

工作站

氮气吹干装置：Raykol AutoEVA-60 全自动平行浓缩仪

赭曲霉毒素免疫亲和柱 (Romer, 60 mg/3mL)

Raykol AH-30 全自动均质器

高效液相色谱：(HPLC) Agilent 1260

Raykol Auto Prep 200 全自动液体样品处理工

质谱检测器：(MS-MS) Agilent 6410

## 3. 样品提取与净化

### 3.1 样品提取

### 3.1.3 加标回收实验

#### 3.1.1 大豆类或者玉米类固体样品

准确称取 5 g 粉碎后的大豆类谷物或玉米粉于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 乙腈/去离子水(v:v, 84/16) 中，采用 AH-30 全自动均质器高速均质 3 分钟。取上清液定性滤纸过滤，准确移取滤液 3 mL 至 60 mL 玻璃上样管 (Raykol)，加入 35 mL 1%的吐温-20PBS 缓冲液混合均匀备用。

添加不同浓度的标准品于不同的样品基质中，进行相对应的提取方法。

### 3.2 固相萃取净化条件

#### 3.1.2 空白样品

空白样品以已知空白大麦粉为样品，进行上述实验操作。

全自动固相萃取仪	睿科 Fotector Plus or Fotector 02HT
固相萃取柱	赭曲霉毒素免疫亲和柱 (Romer, 60 mg/3 mL)
淋洗	PBS 缓冲液
洗脱	2%醋酸甲醇

以 2 mL/min 的速度精确上样 38 mL 待测液，5 mL PBS 缓冲溶液润洗样品瓶，5 mL PBS 缓冲溶液

淋洗，气推 50 mL 吹干免疫亲和柱，推速为 160 mL/min；最后以 3 mL 的 2% 醋酸甲醇，以 0.4 mL/min 的速度洗脱样品，温和氮吹浓缩至干，加入 30% 乙

睛水定容至 1 mL。详细步骤见图-2。（Fotector Plus 上下位机软件版本在 v2.21 以上）

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	2%醋酸甲醇		80	5	1.5
2	填充样品路径	H2O		80	2	1.1
3	特殊上样		废液1	2	38	21.2
4	清洗样品瓶	PBS buffer	废液1	80	5	3.4
5	淋洗	PBS buffer	废液1	10	5	0.9
6	气推		废液1	160	40	2.6
7	清洗注射泵	2%醋酸甲醇		80	1	0.3
8	洗脱	2%醋酸甲醇	收集	0.4	2.9	7.6
9	气推		收集	0.4	1.5	4.1
10	气推		收集	20	5	0.8
11	结束					

图-2. Fotector Plus 赭曲霉毒素的免疫亲和净化方法

## 4. 检测条件

### 4.1 液质联用检测条件

色谱柱	Waters XBridge BEH HILIC 2.5 $\mu$ m $\times$ 21 mm $\times$ 50mm
流速	0.300 mL/min
流动相	A: H <sub>2</sub> O (0.1% formic acid, 5 mmol Ammonium formate), B: 95% Acetonitrile (0.1% formic acid, 5 mmol Ammonium formate)
柱温	40 °C
进样体积	20 $\mu$ L
检测器	Agilent 6410
离子模式	ESI <sup>-</sup>
吹扫气	11 L/min
氮气温度	350 °C
簇电压	4000
雾化压力	35 psi
梯度洗脱	35% B (0 min~0.8 min), 98% B (3.0 min~5.0 min), 100% B (6.0 min~7.9 min), 35% B (7.9 min~10.0 min)

### 4.2 MRM 参数:

表-1. 赭曲霉毒素 A 的串联质谱检测参数

化合物	定量离子对 (碰撞能量 eV、锥孔电压 eV)	定性离子 (碰撞能量 eV、锥孔电压 eV)
OTA	402.1>358.1 (-20, -82)	402.1>166.9 (-40, -68)

### 4.3 色谱图

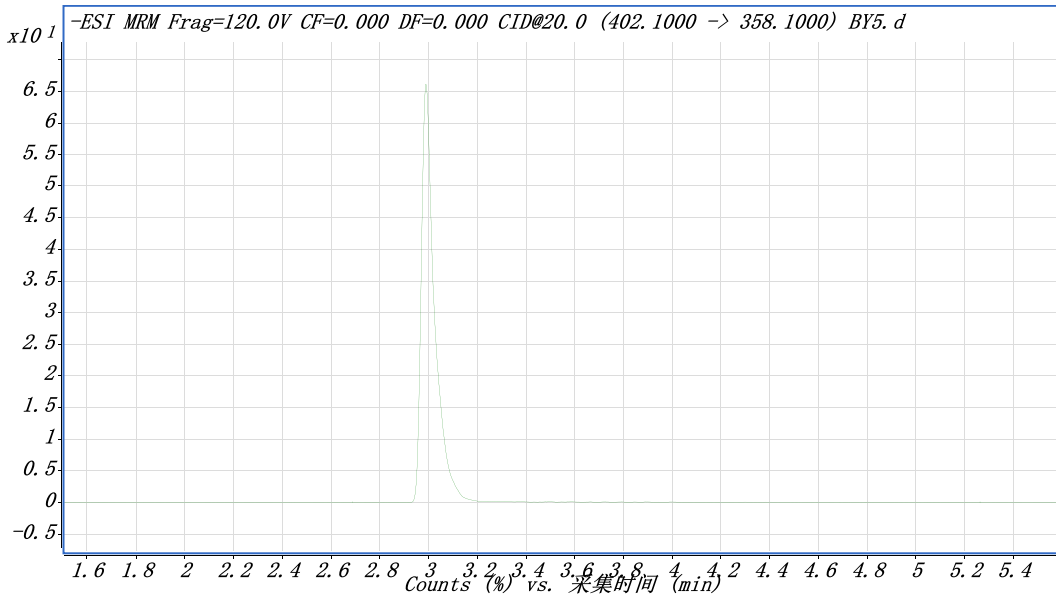


图-3. OTA 的质谱图 (10 ppb)

### 5.方法验证

空白大麦粉中添加水平为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的赭曲霉毒素 A 的回收率结果测试

表-2. 添加水平为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的赭曲霉毒素 A 的回收率结果

名称	回收率 (%)			平均回收率 (%)	RSD (%)
	1	2	3		
OTA	77.90	78.4	80.1	78.8	2.2

### 6.结果与讨论

6.1 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，导致提取液的浓度过高，

导致样品的回收率偏高，影响测试结果。

### 7.仪器优势

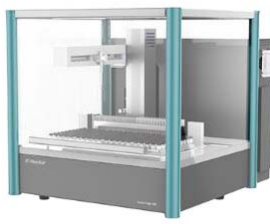
睿科 Auto Prep 200 全自动液体样品处理工作站可实现标准品的全自动化配制，使用高精度双注射泵和自带补偿的软件完美配合，通过智能稀释、直接稀释、内标曲线等多种命令进行自动计算、自动移液、智能操作一步到位，重现性好，准确性高。

睿科 Fotector Plus 全自动固相萃取仪使用镀铂金上样针和特氟龙管路，与高精度注射泵、12 通阀完美配合，能同步进行 6 个样品处理，自动连续处理 60 个样品，从活化、上样、淋洗到洗脱等多种基础命令全部实现自动化，大大提高了仪器精度和

可靠性，保证了回收率。

睿科 Auto EVA-60 全自动平行浓缩仪能够与睿科 Fotector Plus 全自动固相萃取仪进行完美搭配，二者氮吹试管架与收集架能够完美兼容，便捷的操作软件能将手动浓缩仪的氮吹针下降调整自动化，使得净化与浓缩一步到位，省时省力省气。

睿科 AH 300 全自动均质器通过高速运转的刀头对大豆等谷物进行打浆粉碎的预处理，自带水、有机溶剂及超声波三种清洗模式，相比手动研磨，有更好的均质效果，从而提高处理效率。



全自动液体样品处理工作站  
标准溶液配制



全自动均质器  
样品提取



全自动固相萃取仪  
样品净化



全自动浓缩仪  
样品浓缩