

# 牛奶中黄曲霉毒素 M1 检测的免疫亲和柱法 (Copure® 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱法)

## 一、引言

黄曲霉毒素 M1, (Aflatoxin M1, 缩写 AFT M1), 属于黄曲霉毒素 (Aflatoxins) 一类结构相似的化合物中的一种, 是由常见的黄曲霉菌 (Aspergillus flavus) 和寄生曲霉菌 (Aspergillus parasiticus) 产生的代谢产物, 毒性主要表现在致癌性和致突变性, 为强致癌剂。由于其相对稳定, 且在乳及乳制品中污染较多, 严重威胁人类健康。

逗点生物根据国标 GB5009.24—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》第二法, 高效液相色谱法, 分别对牛奶进行 0.25 µg/kg 和 0.50 µg/kg 两个浓度 AFT M1 加标验证。AFT M1 在 0.05 ng/mL ~ 5.00 ng/mL 范围内线性相关系数为 0.99995。平均回收率在 90.0% ~ 92.5% 范围内, 相对标准偏差在 2.97% ~ 4.86% 范围内。该方法重复性好、加标回收率高, 适用于牛奶中黄曲霉毒素 M1 的检测。

## 二、样本前处理

### 2.1 样品提取

称取 4 g 牛奶 (精确到 0.001 g) 于 50 mL 离心管中, 涡旋混匀后静置 30 min, 加入 10 mL 甲醇, 涡旋 3 min。置于 4°C、8000 r/min 离心 10 min, 取上清液 8 mL 于另一洁净的 50 mL 离心管中, 8000 r/min 离心 3 min。取 6.5 mL 上清液, 加入 40 mL PBS 稀释, 混匀, 待净化。

### 2.2 试样的净化浓缩

将低温下保存的免疫亲和柱恢复至室温 (最适使用温度为 25°C 左右。)

免疫亲和柱内的液体流完后, 将上述稀释液全部过柱, 调节流速为 1 mL/min~3 mL/min。待样液滴完后, 加入 10 mL 一级水, 以稳定流速淋洗。待水滴完后, 抽干亲和柱。在柱下放置 15 mL 离心管, 加入 4 mL 甲醇洗脱亲和柱, 流速控制在 1 mL/min~3 mL/min, 流干后, 抽干亲和柱, 收集全部洗脱液。在 45°C 下氮气缓缓地将洗脱液吹至近干, 用初始流动相定容至 1.0 mL, 旋 30 s 溶解残留物, 过 0.22 µm 尼龙膜, 收集滤液于进样瓶中, 上机测试。

### 2.3 空白实验

2.3.1 过程空白: 取一支洁净的 50 mL 具塞离心管, 不称取试样, 按照上述 2.1 和 2.2 进行提取、净化, 浓缩, 取续滤液上机测试。

### 2.3.2 空白本底实验

称取空白牛奶 4 g (精确至 0.001 g) 按照上述 2.1 和 2.2 进行提取、净化, 浓缩, 取续滤液上机测试。

## 三、标准系列工作溶液

标准系列工作溶液: 分别准确吸取标准工作液 (100 ng/mL) 5 µL、10 µL、50 µL、100 µL、200 µL、500 µL 至 10 mL 容量瓶中, 用初始流动相定容至刻度, AFT M1 的浓度为 0.05 ng/mL、0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、5.0 ng/mL。

## 四、仪器条件

### 4.1 色谱条件

仪器: ThermoFisher U3000 液相色谱仪

色谱柱: CommaSil® AQ-C18 (4.6 mm×250 mm, 5 µm)

流动相: A: 水 B: 乙腈 - 甲醇 (50+50)

洗脱方式: 等度洗脱 等梯度洗脱条件: A,70%; B,30%

流速: 1 mL/min 柱温: 40 °C 进样量: 50 µL

荧光检测波长: 激发波长 360 nm; 发射波长 430 nm。

## 五、实验结果

### 5.1 线性范围

表 1 线性关系和相关系数

化合物	线性回归方程	R2
AFT M1	Y=10613.941X+41.1583	0.99995

### 5.2 加标回收

表 2 加标回收率及 RSD

化合物	0.25 µg/kg			0.50 µg/kg						
	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)				
AFT M1	87.7	96.6	93.3	92.5	4.86	87.3	90.2	92.6	90.0	2.97

### 5.3 色谱图

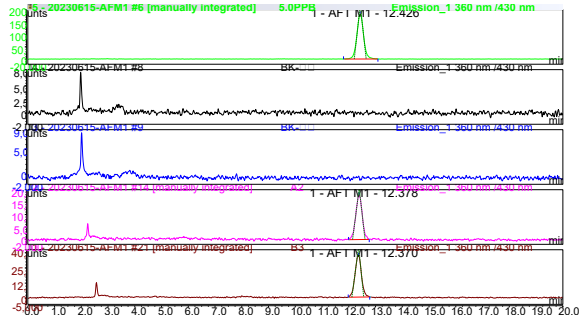


图 1 牛奶中黄曲霉毒素 AFT M1 检测色谱图

注: A2 为加标浓度 0.25 µg/kg, B3 为加标浓度 0.50 µg/kg

## 订购信息

货号	描述	包装
COAFMM103	Copure® 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱	20 支 / 盒
SDC-3000-D	biocomma® 多管涡旋混匀仪	1 台 / 箱
BN24	智能水浴氮吹仪	1 台 / 箱
SF250-22-NL	尼龙针式过滤器, 直径 25 mm, 孔径 0.22 µm, 有机系	100 个 / 盒
SC2-1	2 mL 蓝色聚丙烯盖, 白色 PTFE/红色硅胶垫, 9-425	100 个 / 盒
V2-AL	2 mL 螺纹棕色样品瓶, 带书写处 11.6*32 mm, 9-425	100 个 / 盒