

赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱说明书

1、用途：

免疫亲和柱可选择性吸附样品液中的赭曲霉毒素 A，从而对样品起到非常针对性的纯化作用，过柱净化后的样品液可直接用于 HPLC 分析或氮吹复溶后用 LC-MS/MS 检测。

2、概述：

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)，是由曲霉属和青霉属的某些菌种产生的有毒代谢物，是一种具有强肾脏毒和肝脏毒的真菌毒素，并有致畸、致突变和致癌作用。

3、原理：

测定的基础是抗原、抗体反应，抗体连接在柱体内，样品经过提取、过滤后，缓慢的通过赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱，在免疫亲和柱内毒素与抗体结合，之后洗涤免疫亲和柱除去没有被结合的其他无关物质。用甲醇洗脱赭曲霉毒素 A，然后注入到分析仪器中用于检测。

4、包装组成：

每一个盒中包括各种规格的赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱及 1 份说明书。

5、需要的材料但盒中不提供：

5.1 设备及耗材

- HPLC/LC-MS/MS
- 气控操作架
- 空气泵
- 天平
- 高速均质器（最高转速 $\geq 10,000/\text{min}$ ）或摇床
- 粉碎机
- 分样筛
- 量筒：100mL/10mL
- 漏斗：50mL
- 注射器：10mL/20mL
- 移液器或移液管：1mL
- 均质杯（或 250mL 具塞锥形瓶）
- 样品瓶
- 快速定性滤纸
- 微纤维滤纸

5.2 试剂

- 甲醇 (CH_3OH)：提取过程用分析纯/洗脱过程用色谱纯
- 氯化钠 (NaCl)：分析纯
- 碳酸氢钠 (NaHCO_3)：分析纯
- 盐酸 (HCl)：分析纯
- 氢氧化钠(NaOH)：分析纯

----吐温-20 ($\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$)：分析纯

----水 (H_2O)：蒸馏水或去离子

6、注意事项：

- 使用前，免疫亲和柱需回至室温 ($22 \sim 25^\circ\text{C}$)。
- 亲和柱 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 储存，不得冻存。
- 请在有效日期内使用免疫亲和柱。
- 须排空亲和柱内液体再进行上样操作。
- 取样量：根据需要可以适当增加或减少取样量，注意提取液量要相应改变。
- 柱容量：柱容量是 100ng，当样本中待检毒素的含量除以稀释倍数高于柱容量时，需要适当降低上样液的体积，重新检测。
- pH：亲和柱的上样溶液 pH 需在 $6 \sim 8$ 之间，若偏离此范围需要用盐酸或氢氧化钠调节 pH。
- 上机检测时的溶剂与流动相保持一致可以消除溶剂效应的影响。
- 赭曲霉毒素可致癌，应戴手套口罩等防护工具操作。
- 使用过的容器及标准品溶液最好用次氯酸钠溶液 (5%V/V) 浸泡过夜。

7、试液的配制：

7.1 提取液 I（用于粮食类样品、辣椒和辣椒制品及酱油、醋类样品的提取）

80%甲醇-水溶液 (V 甲醇:V 水=80:20)：取 800mL 甲醇，加入去离子水定容至 1L。

7.2 提取液 II（用于酒类样品的提取）

称取 150g 氯化钠、20g 碳酸氢钠溶于约 950mL 水中，加水定容至 1L。

7.3 清洗缓冲液（用于酱油、醋类样品净化步骤的洗涤）称取 12.5g 氯化钠、2.5g 碳酸氢钠溶于水中，加 0.1mL 吐温-20，用水定容至 1L。

7.4 冲洗液（用于酒类样品净化步骤的洗涤）

称取 25g 氯化钠、5g 碳酸氢钠于约 950mL 水中，加水定容至 1L。

7.5 洗脱液（用于所有样品过柱后洗脱）甲醇:乙酸=98:2，根据需要量配制。

7.6 磷酸盐缓冲溶液（简称：PBS）

称取 8.00g 氯化钠、1.20g 磷酸氢二钠（或 2.92g 十二水磷酸氢二钠）、0.20g 磷酸二氢钾、0.20g 氯化钾，用 900mL 水溶解，用盐酸调节 PH 至 7.4 ± 0.1 ，加水稀释至 1000mL。

8、样品处理：

方法一：粮食类

- 25g±0.01g 样品(固体样品需粉碎,并过2mm分样筛),5g 氯化钠于三角瓶中,加入 100mL 的提取液 I (见 7.1);
- 高速均质(≥10,000r/min)3min(或用摇床 200r/min~300r/min 剧烈振荡 30min);
- 用快速定性滤纸过滤,收集滤液;
- 取 10mL 滤液加入 40mL 水稀释,混匀;
- 用玻璃纤维滤纸过滤,并收集滤液作为上样液;
- 取 20mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 1

方法二：辣椒及其制品

- 称取样品 5.0g,加入 1.0g 氯化钠,加入提取液 I (见 7.1)定容至 20ml,混匀;
- 涡旋混匀 30 分钟。然后转移至离心机 6000r/min,室温,离心 10 分钟;
- 移取上述上清液 10ml 于离心管中,加水定容至 50ml,混匀(如果必要,可在此步骤重复进行一次离心),备用;
- 准确移取 10ml 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 2

方法三：酒类

- 取脱气的酒类样品(含二氧化碳的酒类样品,使用前先搅拌或超声脱气)或不含二氧化碳的酒类样品 20g±0.01g,加入提取液 II (见 7.2)定容至 25mL;
- 高速均质(≥10,000r/min)1min(或用摇床 200r/min~300r/min 剧烈振荡 20min);
- 用微纤维滤纸过滤至滤液澄清,并收集滤液作为上样液;
- 取 1mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 1.25

方法四：酱油、醋类样品

- 取样品 25g±0.01g,加入提取液 I (见 7.1)定容至 50mL;
- 高速均质(≥10,000r/min)1min(或用摇床 200r/min~300r/min 剧烈振荡 20min);
- 用快速定性滤纸过滤,收集滤液;
- 移取 10mL 滤液用水定容至 50mL;
- 用微纤维滤纸过滤至滤液澄清,并收集滤液作为上样液;
- 取 10mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 1

9、操作程序:

9.1 上样

- 取出免疫亲和柱,将注射器筒的下端直接穿透亲和柱上方的塞子,完成注射器筒与亲和柱的连接,将其放置在气控操作架上进行固定;
- 排空亲和柱内液体后,取适量步骤 8 中处理后的溶液,注入到注射器筒中;
- 调节开关,使液体以 1~2 滴/秒的速度流出;

9.2 洗涤

- 待液体排干;
- 净化样品为粮食类时,用 10mL 水淋洗免疫亲和柱,流速 2~3 滴/秒;
- 净化样品为辣椒及辣椒制品时,依次用 10mL PBS 溶液(见 7.6),10mL 水淋洗免疫亲和柱,流速 2~3 滴/秒;

- 净化样品为酱油、醋类时,依次用 10mL 清洗缓冲液(见 7.3),10mL 水淋洗免疫亲和柱,流速 2~3 滴/秒;

- 净化样品为酒类样品时,依次用 10mL 冲洗液(7.4),10mL 水淋洗免疫亲和柱,流速 2~3 滴/秒;

9.3 洗脱

- 待液体排干后,更换新针筒,上样 2mL 洗脱液(见 7.5),用试管接洗脱液,流速 1 滴/秒,收集洗脱液:

方法 1: 定容至 2mL;

方法 2: 氮吹至近干,用流动相复溶至 2mL。

- 洗脱液用 0.22μm 微孔滤器过滤后转移至样品瓶用于 HPLC 分析。

*每次上样前都要将上次液体完全排干。

*也适用于 GB5009.96-2016 和 GB/T30957-2014。

10、结果判读:

赭曲霉毒素 A 的含量=检测浓度×稀释倍数×2

11、贮藏条件及有效期:

贮藏条件: 2~8℃。

有效期: 该产品有效期为 12 个月。