

黄曲霉毒素 B₁/B₂/G₁/G₂ 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黄曲霉毒素，从而对样品起到非常针对性的净化作用，过柱净化后的样品液可直接用于 HPLC 分析或处理后用荧光光度计检测。

亲和柱与 HPLC 或荧光光度计配合使用可达到快速测定的目的，以改善信噪比，可提高检测方法的准确度。

2、概述：

黄曲霉毒素是一类真菌（如黄曲霉和寄生曲霉）的有毒的代谢产物，它们具有很强的致癌性，主要存在于谷物、花生、坚果、棉籽、饲料、植物油以及动物组织和血液中。其中黄曲霉毒素 B₁ (AFT B₁) 的毒性、致癌性、污染频率均居于首位。

3、原理：

测定的基础是抗原、抗体反应，抗体连接在柱体内，样品中的黄曲霉毒素经过提取、过滤、稀释，然后缓慢的通过黄曲霉毒素免疫亲和柱，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。用甲醇洗脱黄曲霉毒素，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黄曲霉毒素免疫亲和柱及 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
- 衍生装置 (配 HPLC 使用)：如光化学衍生器、电化学衍生器、碘衍生装置
- 气控操作架
- 空气泵
- 天平
- 高速均质器 (最高转速≥10,000r/min) 或摇床
- 离心机 (最高转速≥6,000r/min)
- 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
- 玻璃纤维滤纸 (Whatman934-AH)

5.2 试剂

- 甲醇 (CH₃OH)：提取过程用分析纯/洗脱过程用色谱纯
- 乙腈 (CH₃CN)：分析纯
- 氯化钠 (NaCl)：分析纯
- 吐温-20 (C₅₈H₁₁₄O₂₆)：分析纯
- 盐酸 (HCl)：分析纯
- 氢氧化钠(NaOH)：分析纯
- 水 (H₂O)：蒸馏水或去离子水

6、注意事项：

- 请在有效日期内使用免疫亲和柱。
- 使用前，免疫亲和柱需回至室温 (22~25℃)。
- 亲和柱 2~8℃ 储存，不得冷冻保存。
- 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：200ng，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 6~8 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。
- 黄曲霉毒素 B₁ 可致癌，应戴手套口罩等防护工具操作。
- 使用过的容器及黄曲霉毒素 B₁ 溶液最好用次氯酸钠溶液 (5%V/V) 浸泡过夜。

7、配液：

- 7.1 提取液 1 (70%甲醇-水溶液)：
70%甲醇-水溶液 (V 甲醇：V 水=70：30)：取 700mL 甲醇，加入去离子水定容至 1L。
- 7.2 提取液 2 (84%乙腈-水溶液)：
84%乙腈-水溶液 (V 乙腈：V 水=84：16)：取 840mL 乙腈，加入去离子水定容至 1L。
- 7.3 1%吐温-水溶液：
取 1ml 吐温-20，加入去离子水并定容至 100mL。
- 7.4 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：适用于玉米、小麦等粮食作物，坚果、玉米油、花生油、饲料等样品
- 5g±0.01g 样品 (固体样品需粉碎，并过 1mm 分样筛) 加入 20mL 提取液 (84%乙腈-水溶液) 混匀 (必要时可加

入 1g NaCl 以获得更好的提取效果);

----高速均质 ($\geq 10,000\text{r/min}$) 3min, 或摇床 (200r/min ~ 300r/min) 剧烈振荡 20min, 离心机 (6,000r/min) 离心 10min, 取上清液备用;

----取 4mL 上清液加入水或 PBS 溶液 46mL 稀释, 摇匀作为上样液备用;

----将全部上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 1

方法二: 适用于面粉、麦芯粉、辣椒、花椒、黄豆酱、芝麻油及其它植物油、谷草、花生及其制品等样品

----5g \pm 0.01g 样品 (固体样品需粉碎, 并过 1mm 分样筛) 加入 20mL 提取液 (84%乙腈-水溶液) 混匀 (必要时可加入 1g NaCl 以获得更好的提取效果);

----高速均质 ($\geq 10,000\text{r/min}$) 3min, 或摇床 (200r/min ~ 300r/min) 剧烈振荡 20min, 用快速定性滤纸过滤, 收集滤液或离心机 (6,000r/min) 离心 10min, 收集上清液;

----取 4mL 滤液或上清液加入水或 PBS 溶液 46mL 稀释, 摇匀作为上样液;

----将全部上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 1

方法三: 适用于中药 (2020 版药典规定的中药材及饮片等)

----15g \pm 0.01g 样品 (固体样品需粉碎, 并过 1mm 分样筛) 加入 3g 氯化钠, 加入 75mL 提取液 2 (84%乙腈-水溶液) 混匀;

----高速均质 ($\geq 10,000\text{r/min}$) 2min, 或摇床 (200r/min ~ 300r/min) 剧烈振荡 20min, 离心机 (4000r/min) 离心 5min;

----取 5mL 上清液加入水或 PBS 溶液稀释定容至 50mL (必要可用 1%吐温-水溶液稀释定容), 混匀, 再用微纤维滤纸过滤, 并收集滤液作为上样液;

----取 25mL 上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 2

方法四: 适用红茶、绿茶、乌龙茶、普洱茶等茶叶样品

----5g \pm 0.01g 样品 (固体样品需粉碎, 并过 1mm 分样筛) 加入 20mL 提取液 (70%甲醇-水溶液) 混匀;

----高速均质 ($\geq 10,000\text{r/min}$) 1min, 或摇床 (200r/min ~ 300r/min) 剧烈振荡 20min, 用快速定性滤纸过滤, 收集滤液;

----取 4mL 滤液或上清液加入水或 PBS 溶液 23mL 稀释, 摇匀作为上样液;

----将全部上样液过免疫亲和柱净化。

稀释倍数: 1

9、操作程序:

----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;

----取适量步骤 8 中处理后的溶液, 注入到注射器筒中;

----去掉亲和柱下方堵头, 调节开关, 使液体以 1~2 滴/秒的速度流出;

----待液体排干后, 用 10mL 水洗涤 2 次, 流速 2~3 滴/秒; 对于颜色附着比较深的样品, 先用 1%Tween-20 水溶液洗涤 10mL, 再用水洗涤 10mL, 流速 2~3 滴/秒;

采用 HPLC 分析时, 按以下步骤操作:

----待液体排干后, 用 2 \times 1mL 甲醇洗脱, 流速 1 滴/秒, 收集洗脱液定容至 2ml, 或先用 1.5mL 甲醇洗脱, 再用 0.5mL 水洗脱, 流速 1 滴/秒, 收集洗脱液并用水定容至 2mL;

----洗脱液用 0.22 μm 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 GB5009.22-2016、GB/T30955-2014 和药典方法。

10、结果判读:

黄曲霉毒素的含量=检测浓度 \times 稀释倍数

11、贮藏条件及有效期

贮藏条件: 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 。

有效期: 该产品有效期为 12 个月。