



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103896959 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 02

(21) 申请号 201410116242. 7

(22) 申请日 2014. 03. 26

(71) 申请人 泸州品创科技有限公司

地址 646000 四川省泸州市龙马潭区南光路
9号泸州老窖广场

(72) 发明人 胡竹行 沈才洪 敖宗华 王松涛
王明 廖源 周军

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通
合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51) Int. Cl.

C07D 493/14(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

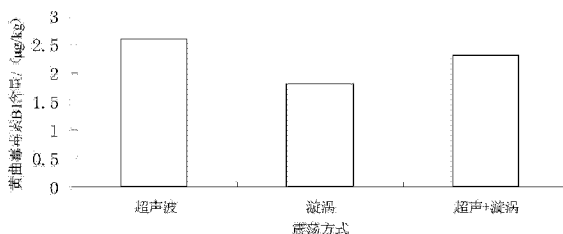
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取及检测方法

(57) 摘要

本发明涉及糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取方法,属于分析检测领域。本发明提供一种糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取方法,包括如下步骤:称取烘干的糟醅,过筛,加入甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮超声波震荡后过滤,取滤液备用,用二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮萃取滤液,收集二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮层并烘干即可。本方法可以快速准确的从糟醅中提取出黄曲霉毒素 B1,然后利用酶联免疫法对提取出的黄曲霉毒素 B1 进行检测。本发明的提取和检测方法能够很好地应用于糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取与检测,为其研究提供了一条更好的途径。



1. 糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取方法,其特征在于:包括以下步骤:
 - a、预处理:称取烘干的糟醅,过筛,在筛下物中加入溶剂 A,超声震荡,过滤,滤液备用;其中,所述的溶剂 A 为甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮中任意一种;
 - b、萃取:用溶剂 B 萃取滤液,收集溶剂 B 相层,烘干后即得到黄曲霉毒素 B1;其中所述的溶剂 B 为二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮中任意一种。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于:步骤 a 中,所述的溶剂 A 为甲醇水溶液,甲醇水溶液体积浓度为 45 ~ 85%,优选为 65%。
3. 根据权利要求 1 所述的提取方法,其特征在于:步骤 a 中,糟醅与溶剂 A 的固液比为 1g : 7 ~ 10mL,优选为 1g : 10mL。
4. 根据权利要求 1 所述的提取方法,其特征在于:步骤 a 中,超声震荡功率为 120 ~ 200W,优选为 180W。
5. 根据权利要求 1 所述的提取方法,其特征在于:步骤 a 中,超声震荡时间为 10 ~ 40min,优选为 30min。
6. 根据权利要求 1 所述的提取方法,其特征在于:步骤 b 中,所述的溶剂 B 为二氯甲烷。
7. 根据权利要求 1 所述的提取方法,其特征在于:所述溶剂 A 为体积浓度 65% 的甲醇水溶液,超声震荡功率为 180W,超声震荡时间为 30min,所述溶剂 B 为二氯甲烷。
8. 一种黄曲霉毒素 B1 的检测方法,其特征在于:包括以下步骤:
 - ①、根据权利要求 1 ~ 7 所述的提取方法提取出黄曲霉毒素 B1;
 - ②、在所得黄曲霉毒素 B1 中加入溶剂 C,采用酶联免疫法检测黄曲霉毒素 B1 的含量;其中所述的溶剂 C 为甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮中任意一种。
9. 根据权利要求 8 所述的检测方法,其特征在于:步骤②中所述的甲醇水溶液体积浓度为 40 ~ 80%,优选为 50%。
10. 根据权利要求 8 所述的检测方法,其特征在于:步骤②中溶剂 C 的加入量为 10g 糟醅对应加入 5 ~ 15ml,优选为 10ml。

糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析检测领域,具体涉及糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取及检测方法。

背景技术

[0002] 黄曲霉毒素(Aflatoxin,AFT)主要是由黄曲霉和寄生曲霉等真菌产生的一类有毒的次生代谢产物,它广泛存在于农作物及食物中,黄曲霉毒素的危害性在于对人及动物肝脏组织有破坏作用,严重时可导致肝癌甚至死亡。

[0003] 白酒酿造主要是以粮食为原料,从而存在着被黄曲霉毒素 B1 污染的可能性,所以在白酒的酿造过程中做好对黄曲霉毒素 B1 的检测尤为重要。现阶段有关黄曲霉毒素 B1 的检测主要集中在粮食和食品上,而白酒酿造过程中的酒糟是一种比较复杂的物质,现有的检测方法并不能完全适应酒糟中黄曲霉毒素 B1 的检测,所以建立一套准确、成本低、操作简便、快速且适应白酒生产过程的毒素检测方法,运用于白酒酿造过程中黄曲霉毒素 B1 检测,意义重大。

[0004] 本方法可以快速准确的从糟醅中提取出黄曲霉毒素 B1 然后利用酶联免疫法(ELISA)对提取出的黄曲霉毒素 B1 进行检测。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的第一个技术问题是提供一种糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取方法,该方法快速、准确、易操作。

[0006] 糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取方法,包括以下步骤:

[0007] a、预处理:称取烘干的糟醅,过筛,在筛下物中加入溶剂 A,超声震荡,过滤,滤液备用;其中,所述的溶剂 A 为甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮中任意一种;

[0008] b、萃取:用溶剂 B 萃取滤液,收集溶剂 B 相层,烘干后即得到黄曲霉毒素 B1;其中所述的溶剂 B 为二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮中任意一种。

[0009] 具体的,上述提取方法步骤 a 中所述的过筛为过 20 目筛。

[0010] 优选的,上述提取方法步骤 a 中所述的溶剂 A 为甲醇水溶液。

[0011] 优选的,上述提取方法步骤 a 中所述的甲醇水溶液体积浓度为 45 ~ 85%。

[0012] 进一步优选的,上述提取方法步骤 a 中所述的甲醇水溶液体积浓度为 65%。

[0013] 具体的,上述提取方法步骤 a 中糟醅与溶剂 A 的固液比为 1g : 7 ~ 10ml。

[0014] 优选的,上述提取方法步骤 a 中糟醅与溶剂 A 的固液比为 1g : 10ml。

[0015] 具体的,上述提取方法步骤 a 中超声震荡功率为 120 ~ 200W。

[0016] 优选的,上述提取方法步骤 a 中超声震荡功率为 180W。

[0017] 具体的,上述提取方法步骤 a 中超声震荡时间为 10 ~ 40min。

[0018] 优选的,上述提取方法步骤 a 中超声震荡时间为 30min。

[0019] 优选的,上述提取方法步骤 b 中所述的溶剂 B 为二氯甲烷。

[0020] 最优选的,上述提取方法中所述溶剂 A 为体积浓度 65% 的甲醇水溶液,超声震荡功

率为 180W, 超声震荡时间为 30min, 所述溶剂 B 为二氯甲烷。

[0021] 本发明所要解决的第二个技术问题是提供一种黄曲霉毒素 B1 的检测方法。该方法包括以下步骤:

[0022] ①、通过上述的提取方法提取出黄曲霉毒素 B1;

[0023] ②、在所得黄曲霉毒素 B1 中加入溶剂 C, 采用酶联免疫法检测黄曲霉毒素 B1 的含量; 其中所述的溶剂 C 为甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮中任意一种。

[0024] 优选的, 上述检测方法步骤②中所述的甲醇水溶液体积浓度为 40 ~ 80%。

[0025] 进一步优选的, 上述检测方法步骤②中所述的甲醇水溶液体积浓度为 50%。

[0026] 优选的, 上述检测方法步骤②中溶剂 C 的加入量为 10g 糟醅对应加入 5 ~ 15ml。

[0027] 更优选的, 上述方法步骤②中溶剂 C 的加入量为 10g 糟醅对应加入 10ml。

[0028] 本方法利用了超声波提取糟醅中黄曲霉毒素 B1, 不仅快速、准确、易操作, 而且取得的效果比国标方法要好得多, 从而使本方法能很好地适应白酒的生产过程。

附图说明

[0029] 图 1 不同震荡方式的比较效果

[0030] 图 2 甲醇水溶液浓度对提取结果的影响

[0031] 图 3 提取温度对提取结果的影响

[0032] 图 4 提取时间对提取结果的影响

[0033] 图 5 超声波功率对提取结果的影响

具体实施方式

[0034] 一种糟醅中黄曲霉毒素 B1 的提取方法, 包括以下步骤:

[0035] a、预处理: 称取烘干的糟醅, 过筛, 在筛下物中加入溶剂 A, 超声震荡, 过滤, 滤液备用; 其中, 所述的溶剂 A 为甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮中任意一种;

[0036] b、萃取: 用溶剂 B 萃取滤液, 收集溶剂 B 相层, 烘干后即得到黄曲霉毒素 B1; 其中所述的溶剂 B 为二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮中任意一种。

[0037] 具体的, 上述提取方法步骤 a 中所述的过筛为过 20 目筛。

[0038] 优选的, 上述提取方法步骤 a 中所述的溶剂 A 为甲醇水溶液。

[0039] 优选的, 上述提取方法步骤 a 中所述的甲醇水溶液体积浓度为 45 ~ 85%。

[0040] 进一步优选的, 上述提取方法步骤 a 中所述的甲醇水溶液体积浓度为 65%。

[0041] 具体的, 上述提取方法步骤 a 中糟醅与溶剂 A 的固液比为 1g : 7 ~ 10ml。

[0042] 优选的, 上述提取方法步骤 a 中糟醅与溶剂 A 的固液比为 1g : 10ml。

[0043] 具体的, 上述提取方法步骤 a 中超声震荡功率为 120 ~ 200W。

[0044] 优选的, 上述提取方法步骤 a 中超声震荡功率为 180W。

[0045] 具体的, 上述提取方法步骤 a 中超声震荡时间为 10 ~ 40min。

[0046] 优选的, 上述提取方法步骤 a 中超声震荡时间为 15min。

[0047] 优选的, 上述提取方法步骤 b 中所述的溶剂 B 为二氯甲烷。

[0048] 最优选的, 上述提取方法所述溶剂 A 为体积浓度 65% 的甲醇水溶液, 超声震荡功率为 180W, 超声震荡时间为 30min, 所述溶剂 B 为二氯甲烷。

[0049] 一种黄曲霉毒素 B1 的检测方法,包括以下步骤:

[0050] ①通过上述的提取方法提取出黄曲霉毒素 B1;

[0051] ②在所得黄曲霉毒素 B1 中加入溶剂 C,采用酶联免疫法检测黄曲霉毒素 B1 的含量;其中所述的溶剂 C 为甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮中任意一种。

[0052] 优选的,上述检测方法步骤②中所述的甲醇水溶液体积浓度为 40 ~ 80%。

[0053] 进一步优选的,上述检测方法步骤②中所述的甲醇水溶液体积浓度为 50%。

[0054] 优选的,上述检测方法步骤②中溶剂 C 的加入量为原料 10g 糟醅对应加入 5 ~ 15ml。

[0055] 更优选的,上述方法步骤②中溶剂 C 的加入量为原料 10g 糟醅对应加入 10ml。

[0056] 由于糟醅中混杂着酸、醇等复杂物质,与普通粮食的成分及含量不同,单纯的国标法只适用于粮食作物,却不完全适用于检测糟醅中的黄曲霉毒素 B1。本发明的发明人针对糟醅的特殊成分,做了大量尝试和探索发现,采用甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮作为提取溶剂,配合超声震荡,可以很好地适用于提取糟醅中黄曲霉毒素 B1,优选采用甲醇水溶液,效果较好同时无毒。

[0057] 本发明技术方案的提出是基于以下原理:从糟醅中提取黄曲霉毒素 B1 主要基于液液萃取的原理,即使用一定浓度的甲醇溶液浸取糟醅中的黄曲霉毒素 B1,由于黄曲霉毒素 B1 在二氯甲烷中溶解度大于甲醇溶液,故再使用二氯甲烷对黄曲霉毒素 B1 进行萃取,重复一次,以确保充分萃取;再者黄曲霉毒素 B1 的沸点要远高于二氯甲烷,对萃取后的二氯甲烷相进行水浴烘干,则可以除去一些低沸点的杂质,最后用一定浓度的甲醇溶液溶解烘干后的物质,即为待测样。

[0058] 试验例 1 震荡方式的选择

[0059] 糟醅烘干粉碎后,过 20 目筛,分别准确称取 10g 样品于三只 250ml 锥形瓶中,编号①、②、③,分别加入 100ml 提取液,①号锥形瓶室温超声提取 30min,②号锥形瓶室温漩涡振荡 30min,③号锥形瓶室温超声漩涡交替进行 30min,用快速定性滤纸过滤于锥形瓶中,吸取 10ml 滤液于分液漏斗中,加入 40ml 二氯甲烷,加塞振摇 5min,静置分层(约 30min),放出下层相,再加入 10ml 二氯甲烷于分液漏斗中,重复提取,合并二氯甲烷相,经盛有约 20g 预先用二氯甲烷润湿的无水 Na_2SO_4 滤纸漏斗过滤于锥形瓶中,65℃水浴烘干,冷却后加入 10ml 甲醇-水(1:1),即为待测样品,用酶联免疫法测定,平行实验三次,确定最佳提取方式,实验结果见图 1。

[0060] 由图 1 可以看出采用超声波震荡提取黄曲霉毒素 B1 效果明显高于其它两种震荡方式。

[0061] 试验例 2 单因素试验

[0062] 取 10g 烘干后的糟醅磨碎,过 20 目筛,选取提取液甲醇浓度、提取时间、超声波提取功率、提取温度四个因素进行单因素试验,单因素试验设计见表 1。

[0063] 表 1 单因素试验设计

	A 甲醇浓度/(%, V/V)	B 提取时间/min	C 超声波功率/W	D 提取温度/°C
[0064]	45	10	120	20
	55	15	140	30
	65	25	160	40
	75	30	180	50
	85	40	200	60

[0065] 1) 提取液甲醇水溶液浓度的选择

[0066] 取 10g 烘干后的糟醅磨碎, 过 20 目筛, 在提取时间为 15min, 温度为 20°C, 超声功率为 180W 时, 选取上述不同浓度的甲醇水溶液进行试验, 结果如图 2 所示, 甲醇浓度为 65% (V/V) 时黄曲霉毒素 B1 含量值最大。

[0067] 2) 提取温度的选择

[0068] 各取 10g 烘干后的糟醅磨碎, 过 20 目筛, 甲醇水溶液浓度为 65% (V/V), 超声功率为 180W, 提取时间 15min, 改变温度, 实验结果如图 3 所示, 提取温度对实验结果影响不大, 综合考虑, 选取 20°C 进行提取。

[0069] 3) 提取时间的选择

[0070] 各取 10g 烘干后的糟醅磨碎, 过 20 目筛, 在甲醇水溶液浓度为 65% (V/V), 超声功率为 180W, 温度为 20°C, 改变提取时间, 实验结果如图 4 所示, 提取时间 30min 效果最好。

[0071] 4) 超声波功率的选择

[0072] 各取 10g 烘干后的糟醅磨碎, 过 20 目筛, 甲醇水溶液浓度为 65% (V/V), 提取时间为 25min, 温度为 20°C, 改变功率, 实验结果如图 5 所示, 当超声波功率为 180W 时提取效果最好。

[0073] 5) 正交试验

[0074] 在单因素试验结果基础上, 选择甲醇浓度(A)、提取时间(B)和超声波功率(C)作为正交实验中的 3 个影响因素, 各因素选取 3 个水平, 然后参照正交表分别选择 3 因素和 3 个水平进行正交实验, 并将因素、水平随机化列成表 2。

[0075] 表 2 正交实验的因素与水平

	因素	水平		
		1	2	3
[0076]	A: 甲醇浓度 (%V/V)	55	65	75
	B: 提取时间 (min)	25	30	40
	C: 超声波功率 (W)	160	180	200

[0077] 表 3 正交试验设计试验数据 $L_9(3^4)$

[0078]

试验号	因素			黄曲霉素 B ₁ 浓度 (ug/kg)
	A	B	C	
1	1	1	1	1.6
2	1	2	2	1.8
3	1	3	3	2.0
4	2	1	2	2.3
5	2	2	3	2.9
6	2	3	1	2.5
7	3	1	3	2.0
8	3	2	1	1.8
9	3	3	2	2.1
均值 1	1.800	1.967	1.967	
均值 2	2.567	2.167	2.067	
均值 3	1.967	2.200	2.300	
极差	0.767	0.233	0.333	

[0079] 对试验结果进行极差分析和方差分析,见上表 3,可知各因素对黄曲霉毒素 B₁ 提取影响的大小顺序为 A > C > B,较好的提取条件为 A2B2C3。

[0080] 同时经过单因素试验和正交设计试验后,可以确定最佳提取条件为:甲醇水溶液浓度 65% (V/V)、提取时间为 30min、提取温度为 20℃、超声波功率为 180W。

[0081] 实施例 1

[0082] 取一定量的糟醅综合样,置于取样袋中,取一定量糟醅烘干粉碎后,过 20 目筛,称取 10g 于 250ml 锥形瓶中,加入 45% (V/V) 甲醇-水溶液,在温度为 20℃,超声波功率为 140W 下提取 15min,过滤,取滤液 10ml 于 250ml 锥形瓶中,加入 40ml 二氯甲烷,震荡 5min,倒入分液漏斗中,静置 25min,放出下层相,重复萃取一次,将二氯甲烷层在 65℃水浴烘干,最后加入 50% (V/V) 甲醇溶液,待测,使用试剂盒和酶标仪对待测样进行检测,测定结果为 2.0 μg/kg。

[0083] 实施例 2

[0084] 取一定量糟醅烘干粉碎后,过 20 目筛,称取 10g 于 250ml 锥形瓶中,加入 85% (V/V) 甲醇-水溶液,在温度为 20℃,超声波功率为 200W 下提取 40min,过滤,取滤液 10ml 于 250ml 锥形瓶中,加入 40ml 二氯甲烷,震荡 5min,倒入分液漏斗中,静置 25min,放出下层相,重复萃取一次,将二氯甲烷层在 65℃水浴烘干,最后加入 50% (V/V) 甲醇溶液,待测,使用试剂盒和酶标仪对待测样进行检测,测定结果为 2.3 μg/kg。

[0085] 实施例 3

[0086] 取一定量糟醅烘干粉碎后,过 20 目筛,称取 10g 于 250ml 锥形瓶中,加入 65% (V/V) 甲醇-水溶液,在温度为 20℃,超声波功率为 180W 下提取 30min,过滤,取滤液 10ml 于 250ml 锥形瓶中,加入 40ml 二氯甲烷,震荡 5min,倒入分液漏斗中,静置 25min,放出下层相,重复萃取一次,将二氯甲烷层在 65℃水浴烘干,最后加入 50% (V/V) 甲醇溶液,待测,使用酶标仪对待测样进行检测,测定结果为 2.9 μg/kg。

[0087] 对比例 1 国标法提取黄曲霉毒素 B1

[0088] 取一定量的糟醅烘干粉碎后,过筛,称取 20g 试样于 250ml 锥形瓶中,用滴管滴加 6ml 水,使试样润湿,准确加入 60ml 三氯甲烷,振荡 30min,加 12g 无水硫酸钠,振摇后,静置 30min,过滤。取 12ml 滤液于蒸发皿中,在 65℃ 水浴烘干,准确加入 1ml 苯-乙腈混合液,用带橡皮头的滴管的管尖将残渣充分混合,再用此滴管吸取上清液转移于 2ml 具塞试管中,待测,使用试剂盒和酶标仪对待测样进行检测,测定结果为 2.6 μg/kg。

[0089] 对比例 2 本发明方法与国标法的回收率对比结果

[0090] 对糟醅进行三个不同浓度水平的加标试验:第一组加标 AFB1 标准品 1.5 μg/kg,第二组加标 AFB1 标准品 2 μg/kg,第三组加标 AFB1 标准品 5 μg/kg,提取方法分别按照本发明方法和国标方法进行,实验结果见表 4:

[0091] 表 4 回收率对比结果

[0092]

添加浓度 (ug/kg)	超声波提取方法			国标方法		
	添加前 (ug/kg)	添加后 (ug/kg)	回收率 (%)	添加前 (ug/kg)	添加后 (ug/kg)	回收率 (%)
1.5	1.8	3.1	86.7	1.7	2.9	80
2	2.1	4.2	105	1.8	3.5	85
5	2.1	6.8	94	2	6.5	90

[0093] 由表 4 可以看出本发明的提取方法在回收率方面明显要高于国标方法,说明本发明方法能够更有效地提取和检测糟醅中黄曲霉毒素 B1。

[0094] 综上所述可以看出采用本发明方法不仅简单、易操作,并且在具体的操作过程中所采用的溶剂价格便宜、易得,同时无毒,更重要的是,采用本发明方法检测糟醅中的黄曲霉毒素 B1 比国标法更准确,从而能够很好地用于检测糟醅中的黄曲霉毒素 B1。

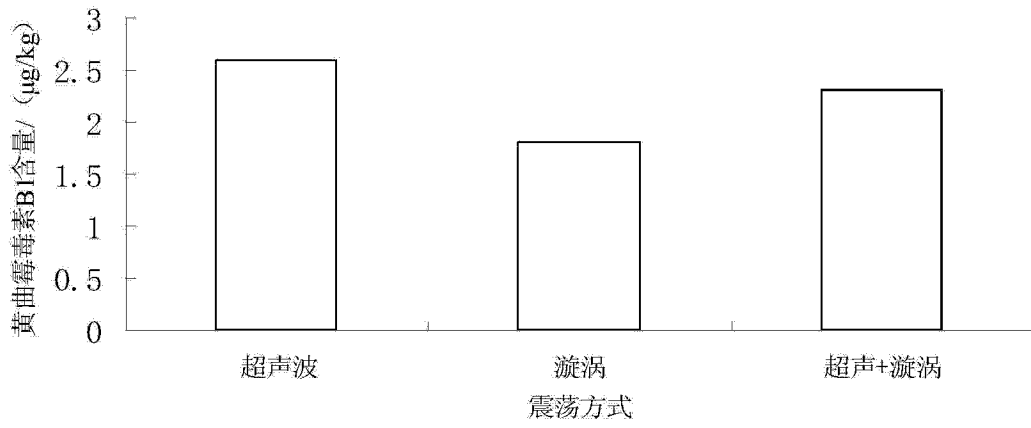


图 1

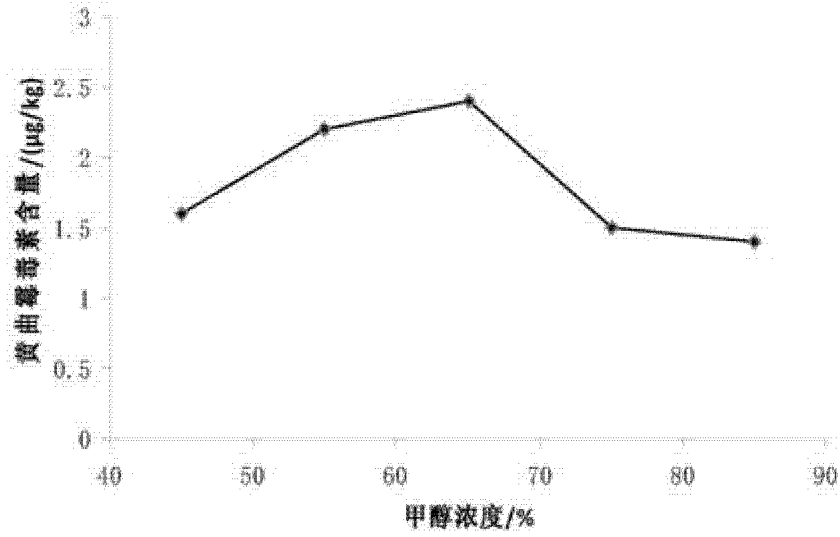


图 2

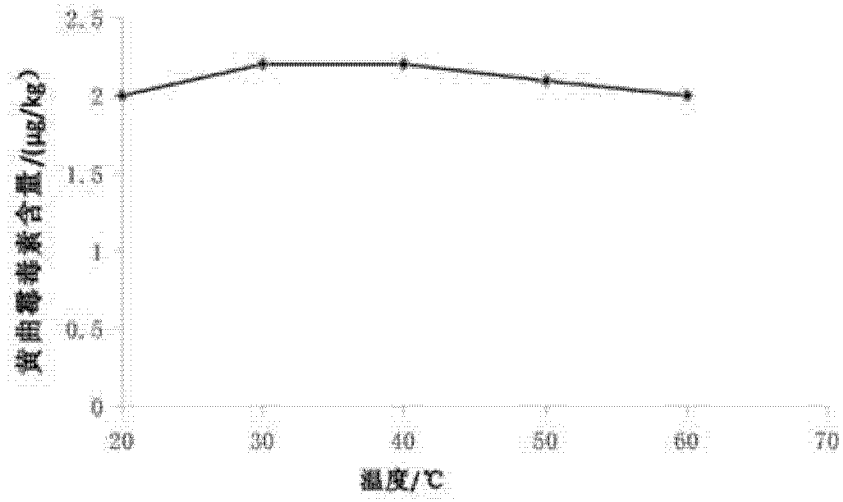


图 3

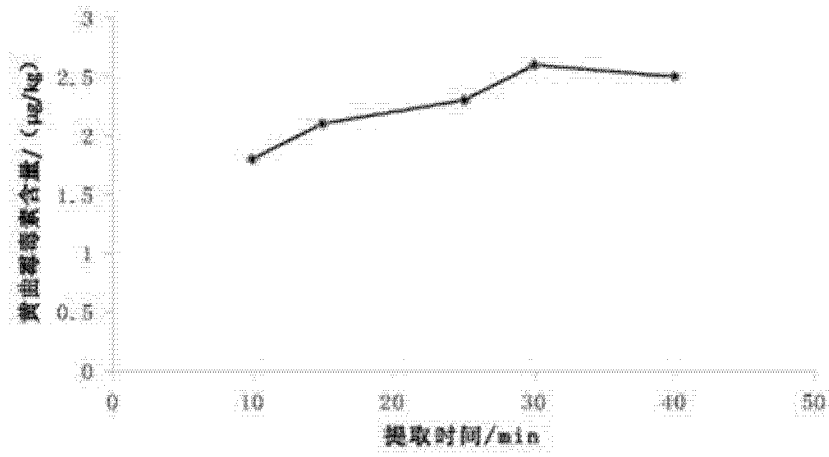


图 4

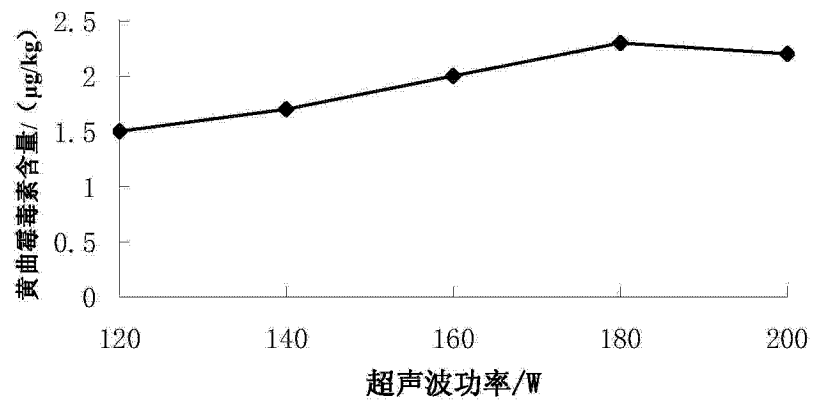


图 5

专利名称(译)	糟醅中黄曲霉毒素B1的提取及检测方法		
公开(公告)号	CN103896959A	公开(公告)日	2014-07-02
申请号	CN201410116242.7	申请日	2014-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	泸州品创科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	泸州品创科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	泸州品创科技有限公司		
[标]发明人	胡竹行 沈才洪 敖宗华 王松涛 王明 廖源 周军		
发明人	胡竹行 沈才洪 敖宗华 王松涛 王明 廖源 周军		
IPC分类号	C07D493/14 G01N33/53		
CPC分类号	C07D493/14 G01N33/56961		
代理人(译)	梁鑫		
其他公开文献	CN103896959B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及糟醅中黄曲霉毒素B1的提取方法，属于分析检测领域。本发明提供一种糟醅中黄曲霉毒素B1的提取方法，包括如下步骤：称取烘干的糟醅，过筛，加入甲醇水溶液、二氯甲烷或丙酮超声波震荡后过滤，取滤液备用，用二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮萃取滤液，收集二氯甲烷、乙酸乙酯或丙酮层并烘干即可。本方法可以快速准确的从糟醅中提取出黄曲霉毒素B1，然后利用酶联免疫法对提取出的黄曲霉毒素B1进行检测。本发明的提取和检测方法能够很好地应用于糟醅中黄曲霉毒素B1的提取与检测，为其研究提供了一条更好的途径。

