



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103896959 B

(45)授权公告日 2016.10.05

(21)申请号 201410116242.7

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2014.03.26

审查员 王衍强

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103896959 A

(43)申请公布日 2014.07.02

(73)专利权人 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)

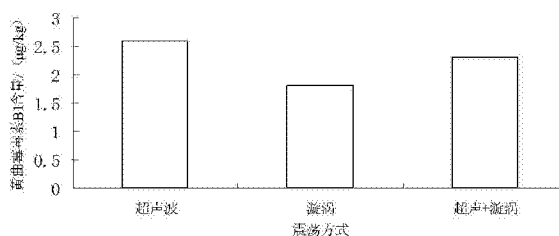
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(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;所述甲醇水溶液体积浓度为65%;超声震荡功率为180W;超声震荡时间为30min;糟醅与溶剂A的固液比为1g:10mL;

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所述的提取方法,其特征在于:步骤b中,所述的溶剂B为二氯甲烷。

3. 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或2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。

4. 根据权利要求3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%。

5. 根据权利要求4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50%。

6. 根据权利要求3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。

7. 根据权利要求6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Na₂SO₄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/℃
[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℃,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℃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℃,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℃,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2.0μg/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2.3μg/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2.9μg/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 μ g/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 μ g/kg,第二组加标AFB1标准品2 μ g/kg,第三组加标AFB1标准品5 μ g/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 (μ g/kg)	超声波提取方法			国标方法		
	添加前 (μ g/kg)	添加后 (μ g/kg)	回收率 (%)	添加前 (μ g/kg)	添加后 (μ g/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。

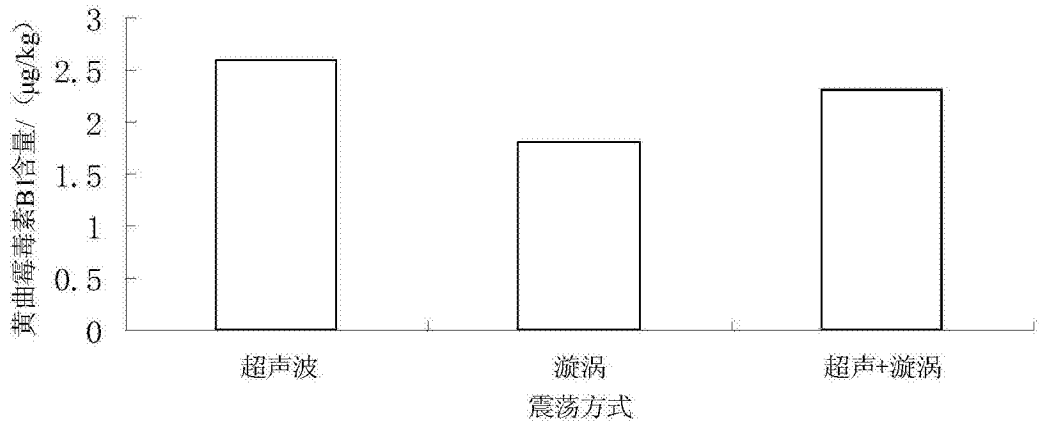


图1

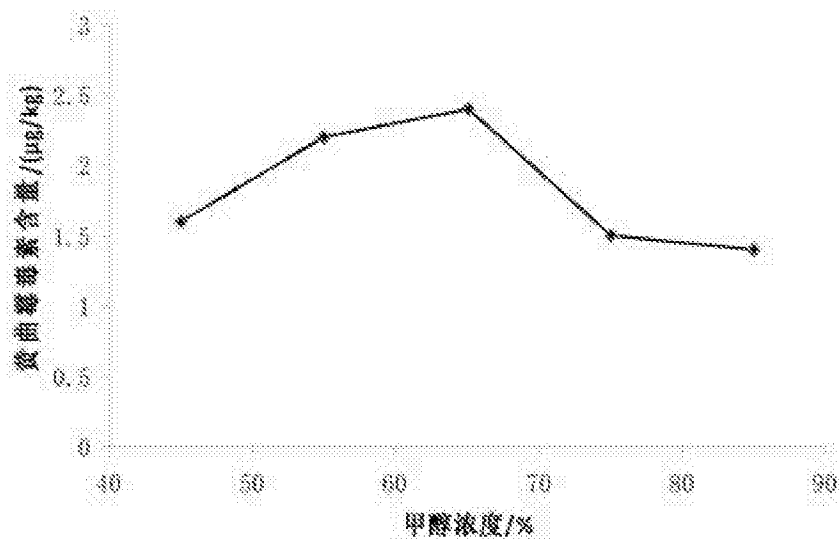


图2

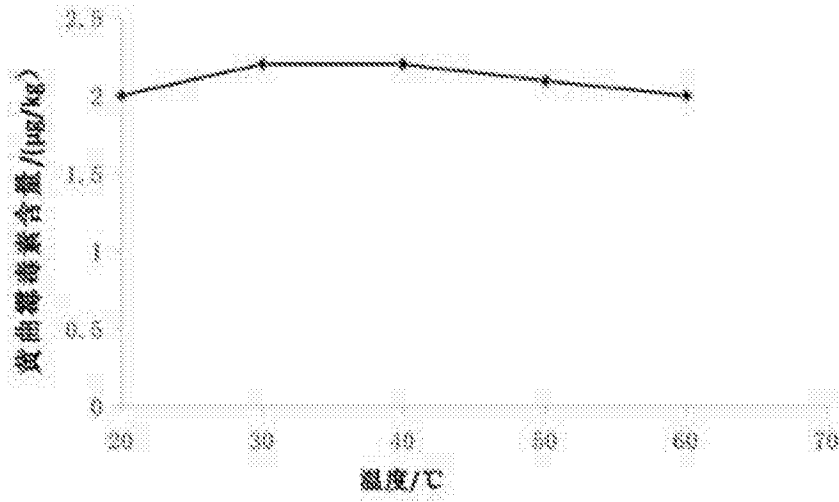


图3

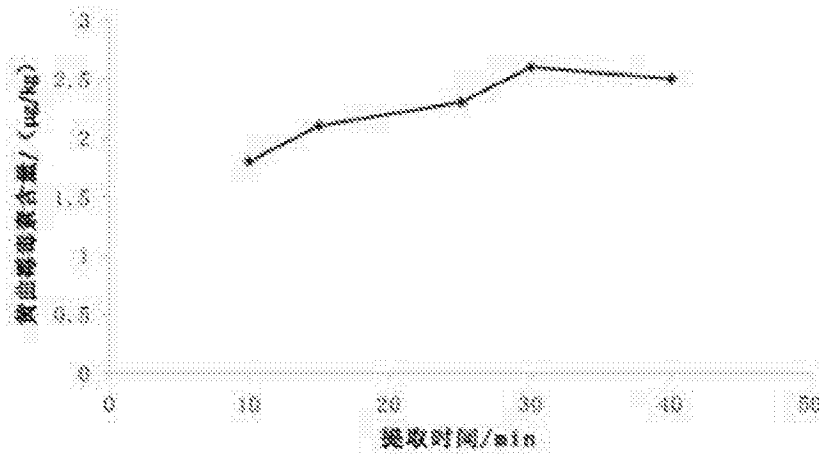


图4

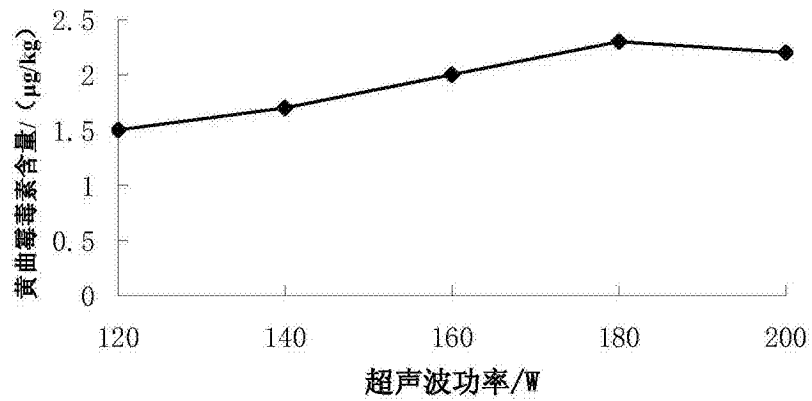


图5

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	CN103896959B	公开(公告)日	2016-10-05
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	CN103896959A		
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。

