

黄曲霉毒素 B₁ 荧光定量快速检测卡性能评价

黄曲霉毒素是一种天然的真菌毒素，具有强致癌性以及剧毒性，是迄今发现的各种真菌毒素中最稳定的一种。从 1993 年开始黄曲霉毒素被认定为世界卫生组织（WHO）的癌症研究机构划定的一类致癌物，是世界公认的三大强致癌物质之一，而黄曲霉毒素 B₁ 由于毒性最大，污染最重，是危害最大的一种黄曲霉毒素。

黄曲霉毒素分布范围广，从物种上说，黄曲霉毒素存在于土壤、动植物、各种坚果（特别是花生和核桃中）中。日常检验发现在大豆、谷物、玉米、通心粉、调味品、牛奶、奶制品、食用油等制品中也经常发现黄曲霉毒素（其中以花生和玉米最严重）^[1]。

表 1 中国黄曲霉毒素 B₁ 的限量指标 ^[2]

食品类别	品种	限量 ug/kg
谷物及其制品	玉米、玉米面（渣、片）及玉米制品	20
	稻谷、糙米、大米	10
	小麦、大麦、其他谷物	5.0
	小麦粉、麦片、其他去壳谷物	5.0
豆类及其制品	发酵豆制品	5.0
坚果及籽类	花生及其制品	20
	其他熟制坚果及籽类	5.0
油脂及其制品	植物油脂（花生油、玉米油除外）	10
	花生油、玉米油	20
调味品	酱油、醋、酿造酱（以粮食为主要原料）	5.0
婴幼儿制品	婴幼儿配方食品、辅助食品	0.5

目前，国际上测定黄曲霉毒素普遍采用的检测方法是用甲醇 / 水将样品提取，免疫亲和柱净化，然后采用溴衍生荧光光度计测定黄曲霉毒素总量 ^[3]，或者采用三氟乙酸柱前衍生 ^[4]、碘柱后衍生 ^[5]、电化学在线柱后衍生 ^[6]、柱后光化学衍生 ^[7] 高效液相色谱法结合荧光检测器测定黄曲霉毒素 B₁。但这些分析方法需要大型的仪器设备，价格昂贵，操作过程复杂、时间较长，且无法在现场和基础小型实验室使用。除此之外，也有采用黄曲霉毒素酶联免疫试剂盒或胶体金快速检测试纸条用于大量样品的筛查，操作简便，检测快速，成本也较低，但准确性和重复性较差，容易造成假阳性或者假阴性。因此，急需一种既简便快速，又能准确定量的检测方法，荧光定量免疫层析正好可以满足这种需求。本文通过粮食谷物及饲料样品的实测，验证了上海飞测生物开发的黄曲霉毒素荧光定量快速检测试纸条的性能。

1. 实验材料和方法

1.1 试剂和材料

除注明外，均为分析纯，试验用水均为纯净水。

黄曲霉毒素 B₁ 荧光定量检测卡（上海飞测生物科技有限公司），由包被有荧光微球标记黄曲霉毒素 B₁ 抗体的乳胶垫、喷涂有黄曲霉毒素 B₁ 抗原测定线和羊抗鸡的控制线的测试卡和稀释缓冲液组成。

谷物饲料样品：大米粉、玉米粉、花生粕等，市场购得或企业送样。

1.2 仪器与设备

FD-100 型荧光免疫定量分析仪，上海飞测生物科技有限公司提供；低速离心机，上海卢湘仪离心机仪器有限公司；旋转摇床：海门市其林贝尔仪器制造有限公司；电子天平：sartorius；移液器：sartorius；

1.3 试验方式

1.3.1 样品提取

样品提取液配制：准确量取 800mL 无水甲醇（AR 级），加入 200mL 去离子水混匀；

谷物饲料样品前处理过程：

- 取有代表性的样品 500g，粉碎，过 20 目筛，混匀；
- 准确称取 1.0±0.05g 待测样品于 10mL 离心管中，加入 5mL 样品提取液，用漩涡振荡器或者摇床振荡 5min；
- 震荡结束后，静置 3 min 或者 4000rpm 离心 1min，取 100ul 上清，加入到 600 μL 样品稀释液，混匀后备用；

1.3.2 检测过程

- 1. 将荧光读数仪开机；
- 2. 用移液器吸取 100 μL 经过前处理的待测样品加入试纸条的加样孔中，开始计时 10 min；
- 3. 10 min 后将试纸条插入荧光读数仪中，按读数键。

2. 结果和讨论

2.1 荧光定量快速检测法准确性和重复性的实验结果

在空白样品中分别添加黄曲霉毒素 B₁ 总量为 1ppb、5ppb、10ppb、25ppb、50ppb，以及企业送样，按照黄曲霉毒素 B₁ 荧光定量检测卡的检测方法进行检测，检测结果的准确性和重复性的如下表。

2.1.1 谷物饲料

样品	黄曲霉毒素 B ₁ 添加量/ppb					
	平行试验	1	5	10	25	50
大米粉	1	1. 225	5. 041	11. 908	22. 861	48. 889
	2	1. 171	4. 956	9. 784	25. 123	49. 990
	3	0. 989	4. 724	9. 889	24. 365	46. 723
	4	0. 981	4. 036	10. 522	23. 618	51. 210
	5	1. 115	5. 123	11. 003	25. 367	48. 234
平均值/ppb		1. 096	4. 776	10. 621	24. 267	49. 009
平均回收率/%		91. 22	95. 52	106. 21	97. 08	98. 02
变异系数 CV/%		9. 92	9. 21	9. 70	4. 30	3. 48
玉米粉	1	0. 987	4. 383	9. 876	25. 098	51. 987
	2	0. 956	3. 900	12. 287	26. 341	52. 010
	3	0. 931	4. 570	10. 659	23. 497	48. 698
	4	0. 793	5. 210	10. 169	24. 671	49. 712
	5	1. 089	4. 897	9. 785	25. 704	49. 109
平均值/ppb		0. 945	4. 592	10. 355	25. 062	50. 303
平均回收率/%		105. 80	91. 84	103. 55	100. 24	100. 61
变异系数 CV/%		12. 51	10. 88	9. 19	4. 30	3. 16
花生粕	1	1. 345	5. 004	8. 884	23. 780	47. 123
	2	1. 276	5. 418	10. 683	22. 461	49. 045
	3	1. 011	4. 230	10. 720	24. 189	49. 276
	4	1. 058	4. 792	8. 684	23. 590	46. 123
	5	1. 104	4. 894	9. 994	25. 671	48. 528
平均值/ppb		1. 159	4. 868	9. 793	23. 938	48. 019
平均回收率/%		86. 30	97. 35	97. 93	95. 75	96. 04
变异系数 CV/%		12. 41	8. 80	9. 88	4. 85	2. 81

表 2 不同谷物样本中添加准确性和重复性

从表 2 可以看出，该方法所得谷物饲料中黄曲霉毒素 B₁ 回收率均在 80%–125%之间，3 个水平添加 5 次重复的变异系数均在 12%以内。

2.2.2 企业送检谷物饲料样本实测值对比

表 3 黄曲霉毒素 B₁ 荧光定量检测卡与高效液相色谱法检测值对比

	荧光定量试纸条检测值/ppb		平均值/ppb	CV/%	液相色谱检测值//ppb		平均值/ppb	CV/%
大米粉	1. 778	1. 530	1. 654	7, 50	1. 812	1. 634	1. 723	5. 17
玉米粉	2. 309	1. 850	2. 080	11. 03	1. 908	2. 178	2. 043	6. 61

高粱粉	7.456	9.046	8.251	9.64	6.739	9.898	8.319	18.99
花生粕	21.202	24.200	22.701	6.60	22.678	25.732	24.205	6.31
DDGS	7.881	7.437	7.659	2.90	6.189	7.772	6.981	11.34
喷浆玉米皮	14.530	10.756	12.643	14.93	12.229	13.031	12.630	3.17

从表 3 中可以看出，黄曲霉毒素 B₁ 荧光定量检测卡的检测值与高效液相色谱法检测值吻合。

3. 结论

飞测生物所开发的黄曲霉毒素 B₁ 荧光定量检测卡在 1-50ppb 检测范围内，添加回收率为 80%-125%，变异系数在 12%以内，实测值与高效液相色谱法高度吻合，其准确性和可靠性均可以满足欧盟和我国对黄曲霉毒素总量分析方法标准的技术要求，分析检测时间在 18min 中以内。该方法具有简便快速、准确可靠、重复性好等特点，可以用于谷物饲料中黄曲霉毒素 B₁ 总量的快速定量筛查检测。

参考文献：

【1】《浅议黄曲霉毒素的危害及预防》孟智勇，徐秀珍（蓟县产品质量监督检验所），中图分类号：R8221.4+2，文献标识码：A，文章编号：1674-098x（2008）02（b）-0169-01

【2】《中华人民共和国国家标准-食品中真菌毒素限量》，GB 2761-2011

【3】王晶.食品安全快速检测技术【M】.北京：化学工业出版社，2002.

【4】Trucksess M W,Stack M E,Nesheim S,et al.Multifunctional column coupled with liquid chromatography for determination of aflatoxins B1,B2,G1 and G2 in corn,almonds,brazil nuts,peanuts,and pistachio nuts collaborative study[J].J.of AOAC International,1994,77(6): 1512-1521.

【5】GB/T 18979-2003 食品中黄曲霉毒素的测定----免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法【S】.北京：中国标准出版社，2003.

【6】张鹏，张艺兵，赵卫东，等.免疫亲和柱净化、在线电化学衍生化高效液相色谱法检测花生中的黄曲霉毒素【J】.色谱，2000,18（1）:82-84.

【7】Bao L,Trucksess M W,White K D.Determination of aflatoxins B1,B2,G1 and G2 in olive oil,and sesame oil[J].JAOAC Int,2010,93(3):926-942.