

比对实验中黄曲霉毒素 B1 的检验与分析

邓建英, 孙旭峰, 凌颖敏

(广州市番禺质量技术监督检验所理化室, 广东广州 511400)

摘要: 本文综合国标法, 色谱法及试剂盒法三种方法进行修正, 把 1:1 的甲醇水改为 7:3 的甲醇水直接加进样品中, 删除国标法及试剂盒自带方法中采用石油醚转移步骤, 把手动振摇、蒸发等步骤改为漩涡振荡及离心方法, 改良了样品的提取方法, 操作方便, 减少交叉污染, 使结果更稳定。

关键词: 黄曲霉毒素 B1; 比对实验; 分析

文章编号: 1673-9078(2012)9-1254-1255

Comparison Experiment of Aflatoxin B1 in Inspection and Analysis

DENG Jian-ying, SUN Xu-feng, LING Ying-min

(Guangzhou Panyu Quality Technology Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511400, China)

Abstract: In this paper, three methods, including GB method, chromatography method and reagent box method, were corrected for detection of Aflatoxin B1 content. The ratio of methanol to water (1:1) was changed to 7:3 methanol water. And the mixture was directly added into the sample. The petroleum ether-transferation step was removed from the GB and reagent kit methods. The manual shaking and evaporation were changed to vortex oscillation and centrifugal method, respectively. The sample extraction method was also improved to be more convenient, to reduce the pollution and to make the result more stable.

Key words: aflatoxin B1; comparison experiment; analysis

黄曲霉毒素(AFT)是一种毒性极强的真菌毒素,目前已分离鉴定的有近 20 种,是一类化学结构相似的物质,其中以 B1、B2、G1、G2 和 M1、M2 为主。在天然污染的食品中以 B1 最为多见,其毒性和致癌性也最强。1993 年该类物质被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为 1 类致癌物^[1]。据报道,全世界每年约有 25% 的粮油作物由于受真菌毒素污染而不能食用^[2]。广东省作为我国食品的生产和出口大省,其食品工业已成为广东省的三大传统支柱产业之一,因此,食品安全更是关系到广东省未来的社会稳定以及可持续发展^[3]。为提高本实验室对黄曲霉毒素 B1 的检测能力,本实验室参加了 2011 年 09 月国家认证认可监督管理委员会(CNCA)组织的能力验证计划。本文将比对实验经过阐述如下,并对检测过程中碰到的问题进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

花生油样品 A 209 和 B 199, 由广东出入境检验检疫局组织承担的 CNCA-11-A12 能力认证计划提供。

1.2 检验仪器及试剂

酶标仪; BRAND 可调式移液器; 试剂盒: 由江

苏省苏微微生物研究有限公司出产; 试剂盒组成: 包被抗体反应板 48 孔; A 试剂: 样品稀释液), B 试剂: AFB1 系列标准溶液 1 套, 浓度为 0、0.1、0.25、0.5、1、2 ng/mL; C 试剂: 酶标抗原; D 试剂: 酶标抗原稀释液; E 试剂: 浓缩洗涤液; F 试剂: 显色底物液 a; G 试剂: 显色底物液 b; H 试剂: 终止液; 反应板框架 1 块。甲醇: 由广州化学试剂厂生产; 样品稀释液 (PBS pH 7.4): 称取 3.0 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.25g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 8.7 g NaCl 定容至 1000 mL。

2 实验方法

2.1 提取方法

2.1.1 采用 GB/T 5009.22-2003《食品中黄曲霉毒素 B1 的测定》(第二法)^[4]提取(以下称国标法)

用小烧杯称取 4.0 g 花生油样品,用 20.0 mL 石油醚,将试样移于 125 mL 分液漏斗中,用 20.0 mL 甲醇水(55+45)溶液分次洗烧杯,移于分液漏斗中,振摇 2 min。静置分层后,放出下层甲醇水溶液于蒸发皿中,再用 5.0 mL 甲醇水重复振摇提取一次,提取液一并加入蒸发皿中,于 65 °C 水浴中通风挥干。用 2.0 mL 20% 甲醇-PBS (pH 7.4) 分三次溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物,移到小试管,加盖振荡后静置待测。此稀释倍数为 D=2。

收稿日期: 2012-05-09

2.1.2 国产酶联免疫测试盒方法（以下称试剂盒法）

称 5.0 g 花生油样品于 25 mL 小烧杯中，用 20 mL 石油醚，将试样移于 125 mL 分液漏斗中，准确加入 25.0 mL 甲醇水（1+1）溶液，加塞振摇 5 min，静置分层后，放出下层甲醇水提取液，此液为样品提取液，准确移取 1 mL 提取液于小试管中，分别加入 10% 甲醇 PSB（pH 7.4）1 mL、3 mL，此稀释倍数分别为 D=2、D=4，总倍数为 10 倍、20 倍，取 50 μL 稀释后的溶液作检测。

2.1.3 参照 GBT 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》^[5]及美国 BIOO 的黄曲霉毒素 B1 酶联免疫反应测试盒使用说明书(M1055)方法（以下称改良法）：

称 5.0 g 花生油样品于 50 mL 离心管中，准确加入 25.0 mL 甲醇水（7+3）溶液，漩涡振荡 5 min 后，4000 rpm 离心 15 min；取 1 mL 上清液，分别加入 10% 甲醇 PSB（pH 7.4）进行 10 倍、20 倍稀释，取 50 μL 稀释后的溶液作检测。

2.2 实验准备

2.2.1 试剂平衡

将试剂盒于室温中放置 15 min 以上，平衡至室温。

2.1.2 每瓶 C 试剂中准确加入 1.5 mL D 试剂，充分溶解，配成实验用酶标抗原溶液。

2.1.3 取适量 E 试剂用蒸馏水按 1:19 稀释备用。

2.3 实验步骤

2.3.1 洗板，每孔加入 250 μL 洗涤液，放置 1 min 后，甩掉洗涤液，在吸水纸上拍干，重复洗板一次。

2.3.2 1 号孔加入 50 μL A 试剂，2~7 号孔分别加入 50 μL 系列标准溶液，其余孔加入 50 μL 已稀释好的样品。

2.3.3 1 号孔加入 50 μL D 试剂，其余各孔均加入 50 μL C 试剂，轻轻振摇，使各孔中反应物均匀后，放入 37 °C 恒温培养 30 min，取出反应板，用力甩干反应液，拍干，每孔加入 250 μL 洗涤液，放置 2 min 后甩掉，在吸水纸上拍干，共洗板 5 次。

2.3.4 每孔分别加入 F 试剂和 G 试剂各 50 μL，摇匀后，置 37 °C 恒温培养 15 min，取出反应板，目测反应孔中颜色变化，初步了解样品情况。

2.3.5 每孔分别加入 H 试剂 50 μL，摇匀后用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 A 值。

2.4 计算

设横坐标为系列标准浓度的常用对数值（LgC），纵坐标为各系列标准液吸光度 A 值与 0 ng/mL 标准液吸光度 A 值的比值（A/A₀%），绘制标准曲线，得到

相应样品的浓度 C 的对数值 lgC，求其反对数，求得待测样品的 AFB₁ 浓度 C，按公式 X=C×V/m×D，其中 X=样品的 AFB₁ 含量（μg/kg）；C=样品的 AFB₁ 含量浓度；V=样品提取液的体积（mL）；m=样品质量（g）；D 样品的稀释倍数。

3 结果与讨论

表 1 不同浓度的提取液分析结果

Table 1 Effect of different concentrations of the extract analysis

results					
样品	提取液浓度		样品	提取液浓度	
	1:1	7:3		1:1	7:3
A1	6.3	9.6	B1	25.8	24.9
A2	10.3	9.5	B2	30.7	27.4
A3	11.7	11.2	B3	26.0	26.8
A4	15.6	11.9	B4	27.7	23.2
A5	11.1	12.1	B5	31.4	28.0
A6	11.1	11.4	B6	28.4	25.8
A7	14.7	13.0	B7	29.5	27.4

注：提取液：甲醇水（单位：μg/kg）。

表 2 不同的稀释倍数分析结果（单位：μg/kg）

Table 2 Effect of different dilution factor analysis results

倍数	样品									
	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#
A 10x	12.1	9.5	6.3	10.3	15.0	11.2	16.4	15.6	15.6	15.5
A 20x	25.4	20.8	18.1	19.9	11.0	14.4	17.7	14.7	11.1	26.0
B 10x	5.6	4.8	7.4	6.0	16.9	13.4	16.8	16.6	17.3	17.1
B 20x	27.4	24.9	25.8	30.7	26.1	26.8	25.5	23.1	28.2	29.5

表 3 不同的提取方法分析结果

Table 3 Results of Aflatoxin B1 content by different extraction

		methods				
		提取方法	1#	2#	3#	4#
A 样品 (μg/kg)	国标法	6.3	15.0	12.1	9.5	
	试剂盒法	16.4	15.6	15.6	15.4	
	改良法	11.0	11.2	10.3	11.4	
B 样品 (μg/kg)	国标法	27.7	30.7	27.4	29.0	
	试剂盒法	29.5	35.5	23.1	28.2	
	改良法	25.8	24.8	25.1	24.9	

3.1 从表 1 中可以看出，不同浓度的甲醇水对样品结果的影响不大，但在实际工作中，采用 7:3 的甲醇水时，提取液析出在上层，方便吸取。

3.2 从表 2 中可以看出，稀释倍数对结果存在影响：当样品含量大，稀释倍数小，结果会造成不稳定，同一个样品结果出现严重的偏差。反之，当样品含量小，稀释倍数高也会对结果造成不稳定。因此，在实验过

程中应严格按照标准的限量要求设置稀释倍数,遇不合格复检时,为方便对结果进行分析,应对样品至少用两个连续稀释倍数进行检测,确保结果的准确性。

3.3 本次实验结果在检测能力验证中的评价是:A样品和B样品均以 $Z/\leq 2$ 取得满意结果。

3.4 综合比对结果和表3分析,本人认为本试剂盒提取方法提取不稳定,结果易偏离;国标方法提取较复杂,操作过程注意事项多,在多个容器内转移的过程中及在蒸发后溶解的过程中易造成误差;改良法操作方便,交叉污染风险小,结果相对稳定,可在酶联免疫试剂盒检验中参考使用。手工震荡的结果偏大,离心后的样品稳定性较高,尽管使用不同的稀释倍数,

结果的仍能保持一致性。

参考文献

- [1] 蔡其洪.黄曲霉毒素检测方法的应用及进展[J].现代食品科技,2006,22(2):238-241
- [2] 李志刚,杨宝兰,姚景会,等.乳酸菌对黄曲霉毒素 B1 吸附作用的研究[J].中国食品卫生杂志,2003,15(3):212-215
- [3] 李锦生,张霞,李琳,等.重视广东省食品安全的现状与发展[J].现代食品科技,2010,26(1):1-4
- [4] GB/T 5009.22-2003《食品中黄曲霉毒素 B1 的测定》[S]
- [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]