

项目三十一

食品中黄曲霉毒素及其检测



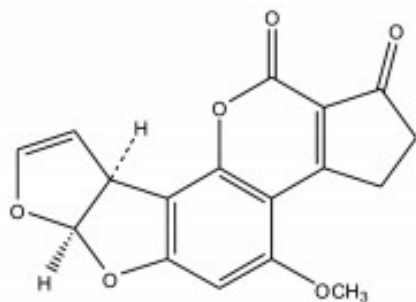
食品中黄曲霉毒素 B1 的测定

黄曲霉毒素 (AFT) 是一组化学结构类似的化合物，根据其在 365nm 紫外光下呈现的荧光颜色可分为 B、G 两大类。根据 Rf 值不同，又分为 B1、B2、G1、G2、M1、M2 等，其中以 AFTB1 毒性、致癌性最强，且含量多。

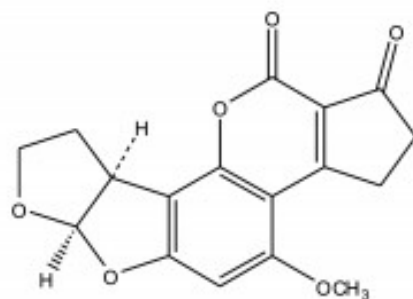
常以 B1 为主要指标。

黄曲霉毒素的基本结构为二呋喃环和香豆素。

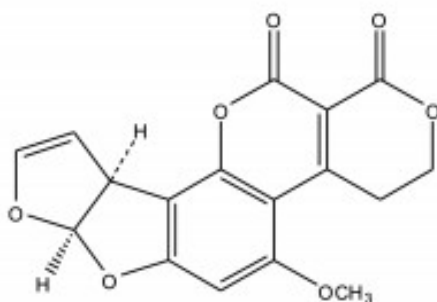
AFT 主要污染：花生、花生油、玉米、大米、乳制品、腌制鱼肉等，M₁和 M₂主要存在于牛奶中。



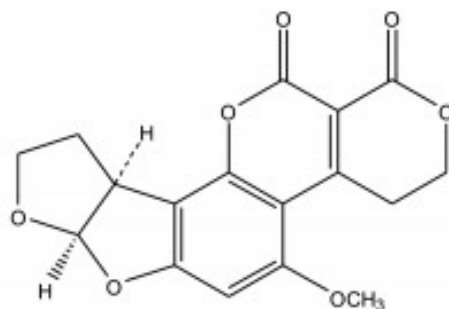
黄曲霉毒素 B1



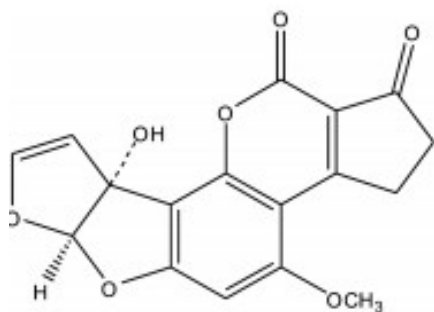
黄曲霉毒素 B2



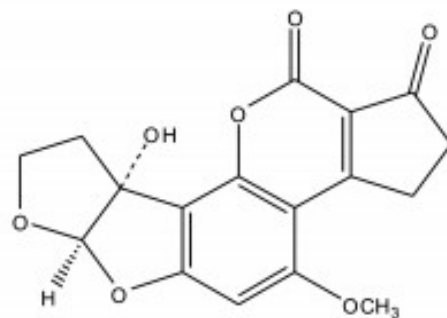
黄曲霉毒素 G1



黄曲霉毒素 G2



黄曲霉毒素 M1



黄曲霉毒素 M2

性质：

- 难溶于水，不溶于乙醚、石油醚及己烷。
- 易溶于油、甲醇、丙酮、氯仿、苯及乙腈等有机溶剂。
- 对光、热、酸较稳定，对碱和氧化剂则不稳定。
- 其纯品为无色结晶，紫外线对低浓度 AFT 有破坏性。

食品中 AFTB1 的允许量标准

玉米、花生、花生油为 $\leq 20\mu\text{g}/\text{Kg}$

玉米及花生制品（按原料折算）为 $\leq 20\mu\text{g}/\text{Kg}$

大米、其他食用油为 $\leq 10\mu\text{g}/\text{Kg}$

其他粮食、豆类、发酵食品、发酵酒、糕点、饼干、面包等为 $\leq 5\mu\text{g}/\text{Kg}$

婴儿食品不得检出。

薄层层析法

原理

样品中黄曲霉毒素 B₁，经有机溶剂提取、浓缩、薄层分离后，在波长 365nm 紫外光下产生蓝紫色荧光，根据其在薄层上显示荧光的最低检出量来测定黄曲霉毒素 B₁ 的含量。

该法最低检出量为 0.0004 μ g，检出限为 5 μ g / Kg。

仪器和试剂

(1) 仪器

小型粉碎机、样筛、电动振荡器、玻璃浓缩器、玻璃板 5cm×20cm、薄层板涂布器、展开槽 (内 25cm×6cm×4cm)、紫外光灯 100 — 125w 带波长 365nm 滤光片、微量注射器

(2) 试剂

① 三氯甲烷、正己烷或石油醚 (沸程 30 ~ 60℃ 或 60 ~ 90℃)、甲醇、苯、乙腈、无水乙醚或乙醚经无水硫酸钠脱水、丙酮。以上试剂在试验前需先进行空白试验, 如不干扰测定即可使用, 否则需逐一进行重蒸。

② 硅胶 G(薄层色谱用)、三氟乙酸、无水硫酸钠、氯化钠、苯—乙腈 (98+2) 混合液、甲醇水溶液 (55+45)。

③ 黄曲霉毒素 B1 标准液

④ 黄曲霉毒素 B1 标准使用液：

I 液 (1.0ug / mL)：取 1mL AFTB1 标准液 (10.0ug / mL) 于 10mL 容量瓶中，用苯—乙腈混合液稀释、定容。

II 液 (0.2ug / mL)：取 I 液 1mL，按上法定容 5mL。

III 液 (0.04ug / mL)：取液 II 1mL，按上法定容 5mL。

⑤ 次氯酸钠溶液 (消毒用)：

取 100g 漂白粉，加入 500mL 水，搅拌均匀。另将 80g 工业用碳酸钠 ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 溶于 500mL 温水中。将两液合并、搅拌、澄清、过滤。此液含次氯酸约 25g / L。污染的玻璃器皿用次氯酸钠溶液浸泡可达到去毒的效果。

分析步骤



一、样品处理

取大样，经粗碎及连续多次用四分法缩减至 0.5 ~ 1 kg 后全部粉碎。粮食样品全部通过 20 目筛，花生样品全部通过 10 目筛，混匀。

二、提取

20.00g 样品置于具塞锥形瓶中→加 30mL 正己烷或石油醚和 100mL 甲醇水溶液→振荡 30min，静置，过滤于分液漏斗中→分层后，放出下层甲醇水溶液于另一具塞锥形瓶内→取 20.00mL 甲醇水溶液（相当于 4.0g 样品）置于另一分液漏斗中→加 20mL 三氯甲烷，振摇、静置分层→放出三氯甲烷层，经无水硫酸钠脱水，过滤于蒸发皿中→5mL 三氯甲烷重复提取，合并滤液→于 65°C 水浴上挥干→冰盒上冷却 2 ~ 3min →1.00mL 苯 - 乙腈溶解残渣→转入小具塞试管中。

三、测定

① 单向展开法

a . 薄板制备：称取 3g 硅胶 G ，加 2 ~ 3 倍量的水，研磨 1 ~ 2min 呈糊状后，倒入涂布器推成 5cm×20cm ，厚度约 0.25mm 的薄层板 3 块。在空气中干燥 15min ，在 100℃ 活化 2h ，取出，放干燥器中保存。

b . 点样：在距薄层板下端 3cm 的基线上用微量注射器或血色素吸管滴加样液。一块板可滴加 4 个点，点距边缘和点间距为 1cm ，点直径约 3mm ，在同一板上滴加点的大小应一致，滴加时可用吹风机用冷风边吹边加。

滴加样式如下：

第一点：10 μ L AFTB1 标准使用液 (0.04 μ g / mL)。

第二点：20 μ L 样液。

第三点：20 μ L 样液 + 10 μ L 0.04 μ g / mL AFTBI 标液。

第四点：20 μ L 样液 + 10 μ L 0.2 μ g / mL AFTB1 标液

。

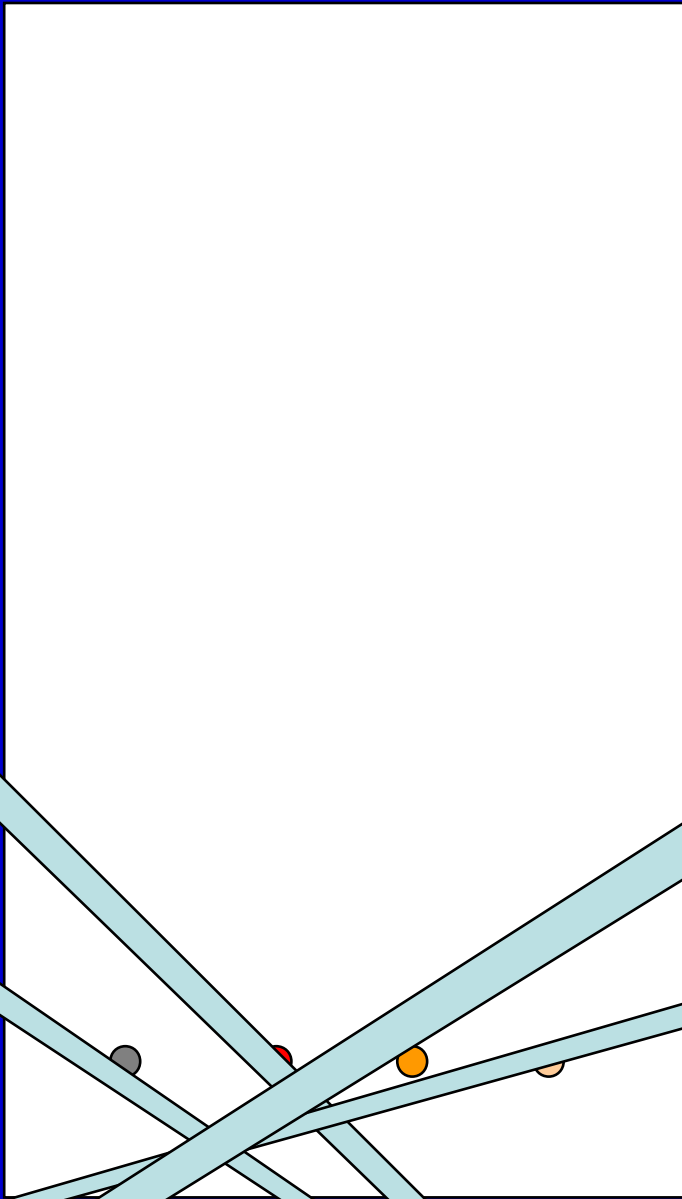
c. 展开与观察：在展开槽内加 10mL 无水乙醚，预展 12cm，取出挥干。再于另一展开槽内加 10mL 丙酮 - 三氯甲烷 (8+92)，展开 10 ~ 12cm，取出，在紫外光下观察结果，方法如下：

2 样
液

1 标
液

3 样液 + 标
液

4 样液 + 标
液



- **第一点应有荧光，第一点滴加了 AFTB1 0.4ng ，作为最低检出量。如无荧光，则可能是薄层板未制好或色谱条件有问题。**
- **第一点有荧光，而其余三点无荧光，说明样液中有荧光猝灭剂，样液需重新制备。**
- **第一点有荧光，第二点无荧光，三、四点有荧光。说明样液不含 AFTB1 或含量小于最低检出量 ($<5\mu\text{g} / \text{kg}$) 。**
- **四个点都有荧光。需做确证实验后再进行定量。**
- **由于样液上加滴了 AFTB1 标准，可使 AFTB1 标准点与样液中 AFTB1 荧光点重叠。若样液为阴性，薄板上第三点 AFTB1 为 0.4ng ，可用作检查样液中 AFTB1 最低检出量是否正常出现；若样液为阳性，则起定性作用。薄层板上第四点 AFTB1 标准为 2ng ，主要起定位作用，在上述色谱条件下，AFTB1 的 Rf 值约在 0.6 左右。**

d . 确证试验：

第一点：10 μ L 0.04 μ g / mL AFTBI 标准使用液。

第二点：20 μ L 样液

于以上两点各加一小滴三氟乙酸盖于其上，反应 5min 后，用吹风机吹热风 2min(板上温度不高于 40 $^{\circ}$ C)，再于薄层板上滴加以下两点。

第三点：10 μ L 0.04 μ g / mL AFTBI 标准使用液。

第四点：20 μ L 样液。

按上法展开并观察，样液是否产生与 AFTBI 标准点相同的衍生物。未加三氟乙酸的三、四两点，可依次作为样液与标准的衍生物空白对照。

e. 稀释定量：

若样液中荧光强度比最低检出量强，则根据其强度估计，减少滴加微升数，或将样液稀释后再滴加不同微升数，直至样液点的荧光强度与最低检出量的荧光强度一致为止。滴加式样如下：

第一点：10 μ L AFTB1 标准使用液 (0.04 μ g / mL)。

第二点：根据情况滴加 10 μ L 样液。

第三点：根据情况滴加 15 μ L 样液。

第四点：根据情况滴加 20 μ L 样液。

f. 结果计算：

$$x = 0.0004 \times \frac{V_1}{V_2} \times \frac{D}{m} \times 1000$$

式中：X — 样品中 AFTBI 的含量， $\mu\text{g} / \text{kg}$ ；

V1 — 加入苯 - 乙腈混合液的体积，mL；

V2 — 出现最低荧光时滴加样液的体积，mL；

D — 样液的总稀释倍数；

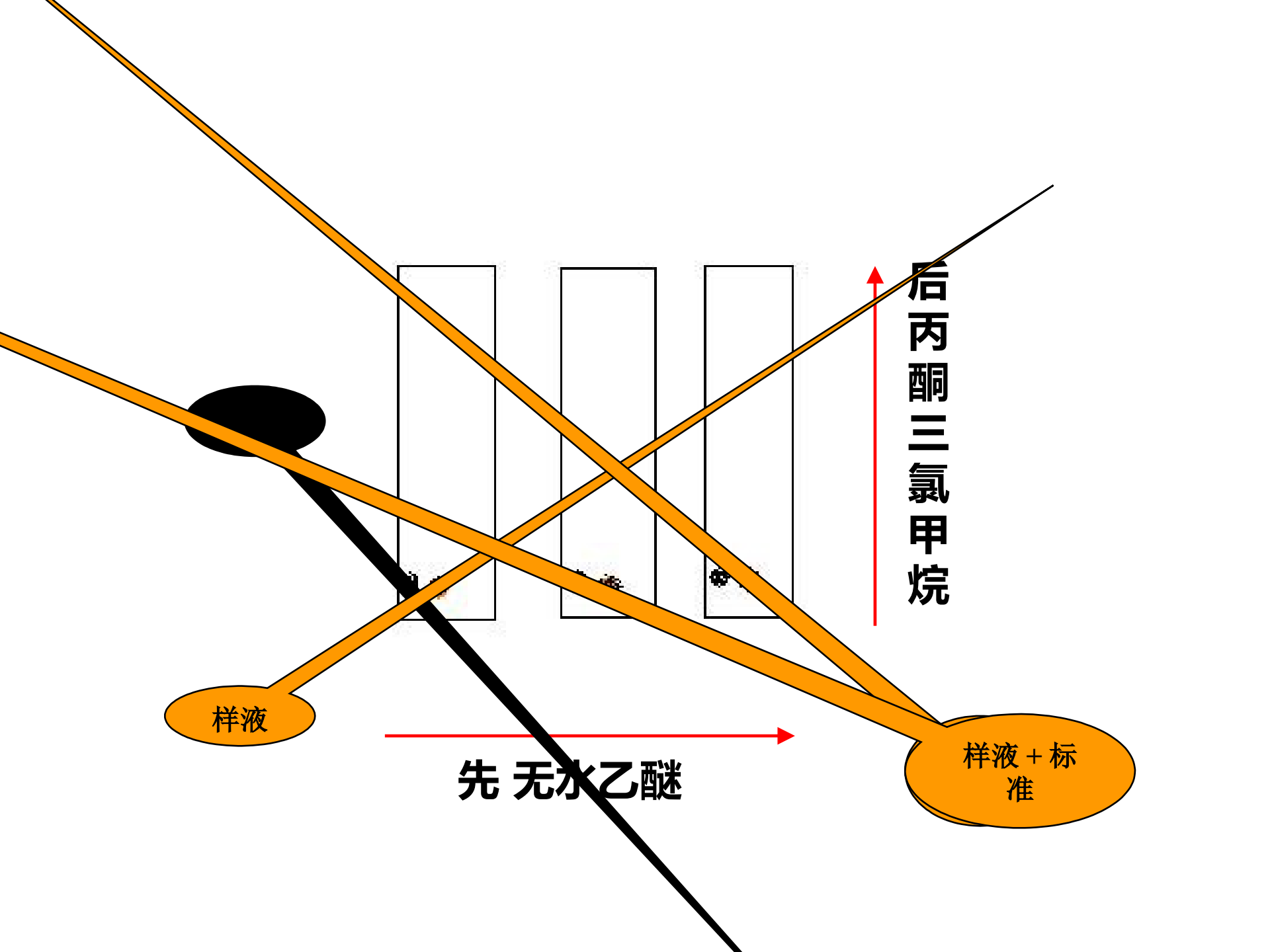
m — 加入苯 - 乙腈混合液溶解时相当样品的质量，g；

0.0004 — AFTBI 的最低检出限量， μg 。

② 双向展开法

(滴加两点法)

(1) 点样：取薄层板三块，在距下端 3cm 基线上滴加 AFTB1 标液与样液。即在距左边缘 0.8 ~ 1cm 处各滴加 10uL AFTB1(0.04ug / mL) 标准液，在距左边缘 2.8 ~ 3cm 处各滴加 20uL 样液。然后在第二块板的样液点上加滴 10uL AFTB1(0.04ug / mL) 标准液，在第三块板的样液点上加滴 10uL AFTB1(0.2ug / mL) 标准液。



样液

先无水乙醚

后丙酮三氯甲烷

样液 + 标准

(2) 展开：

a . 横向展开：10mL 无水乙醚，展至板端后，取出挥干。根据情况，可再重复1 ~ 2次。

b . 纵向展开：以丙酮 - 三氯甲烷 (8+92) 展开至 10 ~ 12cm 为止。

(3) 观察与评定结果：

a . 在紫外灯下观察第一、二块板，若第二块板的第二点在 AFTB1 标准点的相应处出现最低检出量，而第一板在与第二板的相同位置上未出现荧光，则样品中 AFTBI 含量 $<5\mu\text{g} / \text{kg}$.

b . 若第一块板在与第二块板的相同位置上出现荧光点，则将第一块板与第三块板比较，看第三块板上第二点与第一块板上第二点的相同位置上的荧光点是否与 AFTB1 标准点重叠，如果重叠，再进行确证试验。在具体测定中，三块板可以同时做，也可按顺序做。当第一块板出现阴性时，第三块板可以省略，如第一块板为阳性，则第二块板可省略，直接做第三块。

(4) 确认试验：

另取薄层板二块，于第四、五两板距左边缘 0.8 ~ 1cm 处，各滴加 10u LATTB1(0.04ug / mL) 标准液及一小滴三氟乙酸；在距左边缘 2.8 ~ 3cm 处，于第四板滴加 20uL 样液及一小滴三氟乙酸；于第五板滴加 20uL 样液、10uLAFTBI(0.04ug / mL) 标准液及一小滴三氟乙酸，反应 5min 后，用热风吹 2min(板上温度不高于 40℃)。再用双向展开法展开后，观察样液是否产生与 AFTB1 标准点重叠的衍生物。观察时，可将第一板作为样液的衍生物空白板。若样液 AFTB1 含量较高时，则将样液稀释后，按单向展开法中 d 做确认试验。

(5) 稀释定量：

(6) 结果计算：

同单向展开法。

注意事项

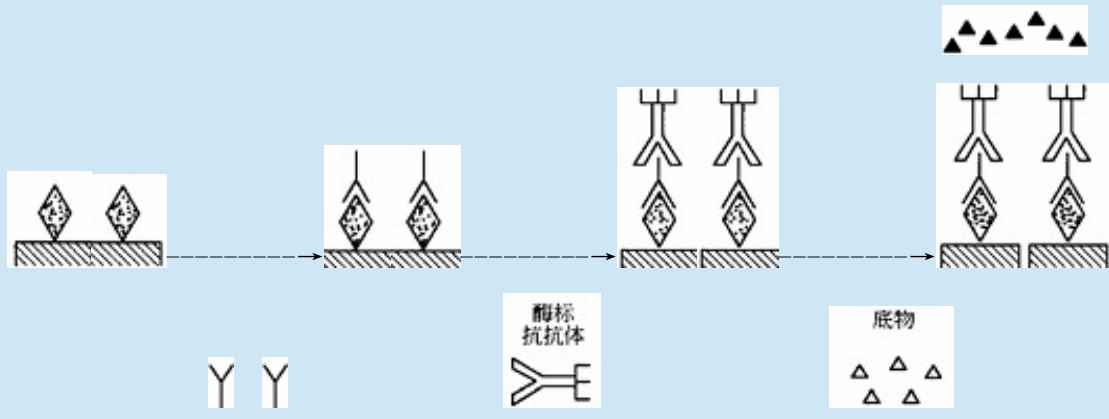
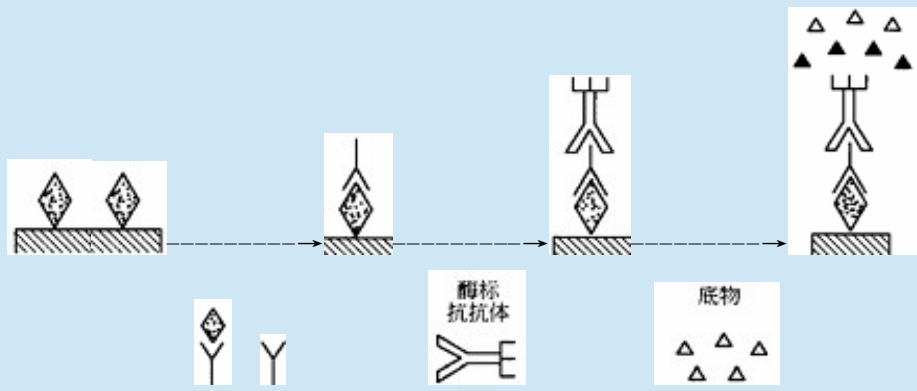
用过后受污染的玻璃器皿，应经次氯酸溶液 (25g / L) ，浸泡消毒数小时后再清洗之！

酶联免疫 (ELISA) 法

enzyme-linked immunosorbent assay

实验原理：

采用间接竞争 ELISA 方法，样品中的黄曲霉毒素 B1 经提取、脱脂、浓缩后与定量特异性抗体反应，多余的游离抗体则与酶标板内的包被抗原结合，加入酶标记物和底物后显色，与标准比较测定含量。



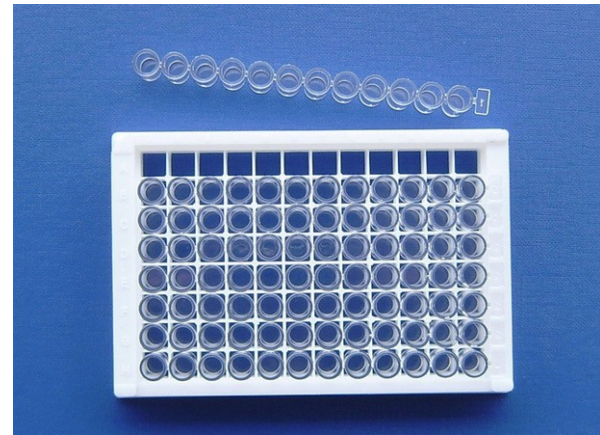
仪器与试剂：

(一) 试剂盒组成

- 1、 AFTB1 抗原包被 96 孔酶标板；
- 2、 抗体；
- 3、 酶标二抗；
- 4、 空白对照液；
- 5、 底物 (1mg×4) ；
- 6、 底物液 A ；
- 7、 底物液 B ；
- 8、 终止液 (2mol/LH₂SO₄) ；
- 9、 PBS — T 洗液；
- 10、 一次性手套 (2 副)。

(二) 仪器

- 1、 酶标仪；
- 2、 离心机。



实验步骤：

(一) 样品中 AFTB1 的提取

1 . 大米和小麦 (脂肪含量 < 3.0 %)

样品粉碎后过 20 目筛，称取 20.0g，加入 250mL 具塞锥形瓶中。准确加入 60mL 三氯甲烷，盖塞后滴水封严，150rpm 振荡 30min。静置后，用快速定性滤纸过滤于 50mL 烧杯中，立即取 12mL 滤液 (相当 4.0g 样品) 于 75mL 蒸发皿中，65°C 水浴通风挥干。用 2.0mL 甲醇—PBS (20+80) 分三次 (0.8mL、0.7mL、0.5mL) 溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物，移至小试管加盖振荡后静置待测。此液每毫升相当 2.0g 样品。

2. 玉米 (脂肪含量 3.0 ~ 5.0 %)

样品粉碎后过 20 目筛，称取 20.0g，加入 250mL 具塞锥形瓶中。准确加入 50.0mL 甲醇—水 (80+20) 溶液和 15.0mL 石油醚，盖塞后滴水封严，150rpm 振荡 30min。用快速定性滤纸过滤于 125mL 分液漏斗中，待分层后，放出下层甲醇水溶液于 50mL 烧杯内，从中取 10.0mL (相当于 4.0g 样品) 于 75mL 蒸发皿中，以下按上述 “ 65°C 水浴通风挥干 ” 起，依法操作。

3 . 花生 (脂肪含量 15.0 - 45.0 %)

样品去壳去皮粉碎后称取 20.0g , 加入 250mL 具塞三角瓶中 , 准确加入 100.0mL 甲醇 - 水 (55 + 45) 溶液和 30mL 石油醚 , 盖塞后滴水封严 , 150rpm 振荡 30min , 静置 15min 后用快速定性滤纸过滤于 125mL 分液漏斗中 , 待分层后 , 放出下层甲醇 - 水溶液于 100mL 烧杯内 , 从中取 20.0 mL (相当于 4.0g 样品) 置于另一 125mL 分液漏斗中 , 加入 20.0mL 三氯甲烷 , 振摇 2min , 静置分层 (如有乳化现象可滴加甲醇促使分层) . 放出三氯甲烷于 75mL 蒸发皿中 , 再加 5.0mL 三氯甲烷于分液漏斗中重复振摇提取后 , 放出三氯甲烷层一并于蒸发皿中 , 以下按上述 “ 65°C 水浴通风挥干 ” 起 , 依法操作。

4 . 植物油

**用小烧杯称取 4.0g 样品，用 20.0mL 石油醚，将样品移于 125mL 分液漏斗中，用 20.0mL 甲醇 - 水 (55 + 45) 溶液分次洗烧杯，溶液一并移入分液漏斗中。
(精炼油 4.0g 样为 4.525mL ，可直接用移液器加入分液漏斗再加溶剂后振摇) 振摇 2min ，静置分层后，放出下层甲醇 - 水溶液于 75mL 蒸发皿中。再用 5.0mL 甲醇 - 水溶液重复振摇提取一次，提取液一并加入蒸发皿中，以下按自 “ 65°C 水浴通风挥干 ” 起，依法操作。**

(二) 样品测定

1、将下列试剂稀释后备用

PBS — T 洗液：390mL 蒸馏水稀释 (1:40) ；

底物液 A: 9mL 蒸馏水稀释 (1:9) ；

抗体：7.0mL 洗液稀释 (1:140) ；

酶标二抗：10mL 洗液稀释 (1:200) ；

阴性对照液：200 μ l 抗体 + 200 μ l 空白对照液在玻璃试管内混合振荡后静置。

2、抗体抗原反应

将抗体与等量样品提取液在玻璃试管内混合振荡后室温静置 15 分钟。启封酶标板，用洗液 2×3 分钟洗板后在吸水纸上拍干，分别在适当孔位加入此抗体抗原反应液及空白对照液（3 孔）和阴性对照液（3 孔），130μl / 孔，37℃ 孵育（盖上覆膜），2 小时后，倒掉反应液并拍干，用洗液 3×3 分钟洗板，拍干。

3、酶标记反应

加入酶标二抗，100μl / 孔，37℃ 孵育 1 小时后，用洗液 5×3 分钟洗板，拍干。

4、显色反应

1mg 底物 + 2.5ml 底物液 A + 42μl 底物液 B，待底物充分溶解后加入酶标板，100μl / 孔，37℃ 15 分钟后加终止液 40μl / 孔。

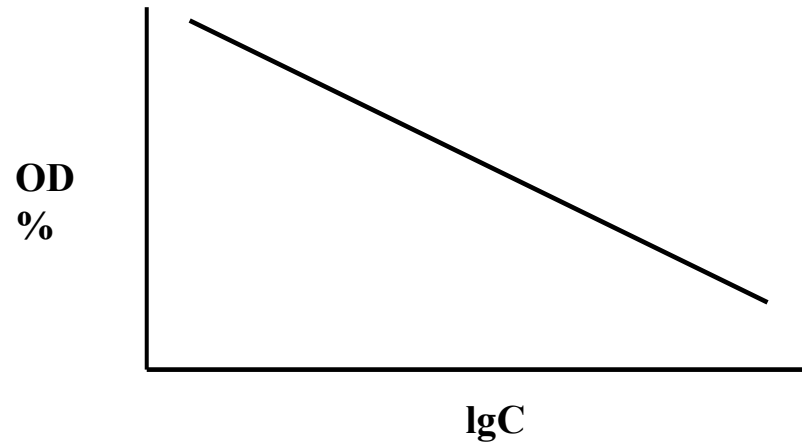
5、测定

酶标仪 490nm 测定各孔 OD 值。

数据处理及计算结果：

$$OD\% = \frac{OD_{校}}{\overline{OD}_{初, 校}} 100\%$$

$$OD_{校} = OD_{测} - \overline{OD}_{空白}$$



标准竞争抑制曲线

- ◆ **薄层层析法 (GB1 法) 和液相色谱法：可定性、定量，应用广，检测周期长，程序复杂，所需试剂繁多。**
- ◆ **免疫化学分析方法（如酶联免疫法 (GB2 法)、胶体金免疫层析试纸法）：快速，简便，特异，敏感，低耗，不需贵重仪器。适合大量样品的筛检及现场检测。受环境影响，可能会出现假阳假阴。**