

粮油产品黄曲霉毒素 B₁ 检测技术研究进展李培武^{1,2}, 马良², 杨金城², 张文^{2,3}, 杨春洪², 杨涓^{2,3}(1. 华中农业大学, 湖北武汉 430070; 2. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北武汉 430062;
3. 农业部油料及制品质量监督检验测试中心, 湖北武汉 430062)

摘要:对黄曲霉毒素检测技术进行了简要介绍和评述,并对近年来粮油及制品黄曲霉毒素 B₁ 快速检测方法研究进展和发展趋势进行了综述和讨论。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 检测方法; 研究进展

中图分类号:R155.5 **文献标识码:**A

文章编号:1007—9084(2005)02—0077—05

我国花生及制品、食用油、饼粕及饲料和玉米、大米等农产品和食品黄曲霉毒素(Aflatoxin, 简称AFT)污染比较严重,污染严重地区农产品中AFT含量超过国家规定限量标准数百倍,成为一些地区肝癌发病率高的主要原因,已引发过多起因黄曲霉毒素超标而导致的农产品国际贸易纠纷,如2000年我国出口到欧盟的花生约40%黄曲霉毒素超标,遭到退货或被迫转口贸易,致使我国农产品进出口贸易蒙受巨大损失,影响了我国农产品国际市场声誉。黄曲霉毒素特别是黄曲霉毒素 B₁ 污染不仅影响了农产品质量和市场竞争力,而且严重威胁到人民消费安全和身体健康。缺乏高灵敏度、快速、准确的 AFB₁ 检测技术是影响我国农产品质量和国际市场竞争力的重要因素,先进可靠的黄曲霉毒素检测技术是控制农产品黄曲霉毒素污染、保证农产品及食品消费安全的重要技术支撑。本文就粮油及制品黄曲霉毒素 B₁ 检测技术研究进展与发展方向做扼要评述。

1 粮油黄曲霉毒素毒性、污染与限量要求

黄曲霉毒素是一类由黄曲霉(*Asperillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)侵染油料、粮食或其他食品产生的毒性次生代谢产物的总称,基本结构由一个二呋喃环和一个氧杂萘邻酮组成(即香豆素),主要成分包括六种,即 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、

M₂。根据在紫外光下发生荧光的颜色及薄层层析 Rf 值不同命名,在 365nm 波长发蓝色荧光的被命名为 B₁、B₂,发黄绿色荧光的被命名为 G₁、G₂^[1]。M₁、M₂ 是 AFT 在动物制品的主要存在形式。黄曲霉毒素 B₁ 的化学结构式如图 1。

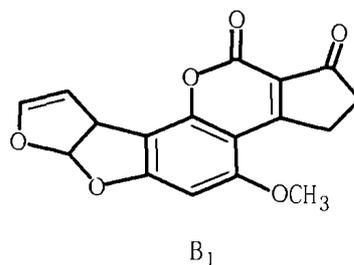
B₁

图1 黄曲霉毒素 B₁ 化学结构式
Fig. 1 Structural formula of AFB₁

黄曲霉毒素极易污染花生、食用植物油、饼粕及饲料等农畜产品,对动物有剧烈的急性毒性和明显的慢性毒性,具有很强的致突变、致畸、致癌作用^[2]。黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最强,敏感动物半致死量仅为 0.294mg/kg 体重,其毒性是氰化钾的 10 倍,砒霜的 68 倍,被世界卫生组织列为已知的最强致癌化学物质之一^[3]。人、家畜、家禽大剂量接触黄曲霉毒素可引起急性中毒死亡,长期小剂量接触可引起免疫抑制,诱发肝癌及胃、支气管、肾、腺体等多器官癌症。畜禽摄入 AFB₁ 污染的饲料后,在动物体内被代谢为 AFM₁, 其毒性仅次于 AFB₁, 饲料

收稿日期:2005—04—10

基金项目:国家科技部重点项目(JG—2002—33,2003DIA6N003—4);国家及湖北省科技攻关计划(2001BA501A16B—05,2004AA203B01)资助项目;“863”计划(2001AA241153)

作者简介:李培武(1962—),男,华中农业大学在读博士研究生,研究员,博士生导师,农业部油料及制品质量监督检验测试中心常务副主任,中国农业科学院油料作物研究所农产品质量与食品安全学科二级杰出人才,从事农产品质量与食品安全研究。

中 AFB₁ 的污染直接造成动物性食品与肉、蛋、奶的连锁污染,给人类的消费安全带来严重的威胁^[4]。

世界上许多国家都规定了食品中黄曲霉毒素的最大允许含量(MRL)。欧盟农产品(如花生等)中黄曲霉毒素的最大允许含量已由早期的 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降至 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$,1998 年黄曲霉毒素总量又降至 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$,AFB₁ 分量降至 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]。国际上黄曲霉毒素的最大允许含量标准不断严格,2004 年欧盟又再次

补充修订对婴儿和儿童食品中的黄曲霉毒素的限量标准,包括谷类食物在内的婴幼儿食品以及具有特殊医疗目的的婴儿食品,AFB₁ 的最大限量均为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在婴儿配方食品及改进配方食品(包括婴儿牛奶和改进配方牛奶)等婴儿食品中,AFM₁ 的最大限量均为 0.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国标准规定食用植物油、玉米、花生、绿色食品及饲料中黄曲霉毒素的最大允许含量见表 1。

表 1 我国饼粕饲料及油料、食用植物油等食品中黄曲霉毒素 B₁ 限量

Table 1 Maximum limit of AFB₁ in oil cake fodder and foods such as oil plants, cooking oil of plant

产品名称	指标/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	标准来源
玉米、花生仁、花生油	≤ 20	GB2761-1981 食品中黄曲霉毒素 B ₁ 允许量标准
玉米及花生仁制品(按原料折算)	≤ 20	GB2761-1981 食品中黄曲霉毒素 B ₁ 允许量标准
大米、其它食用油	≤ 10	GB2761-1981 食品中黄曲霉毒素 B ₁ 允许量标准
其它粮食、豆类、发酵食品	≤ 5	GB2761-1981 食品中黄曲霉毒素 B ₁ 允许量标准
婴儿代乳品	不得检出	GB2761-1981 食品中黄曲霉毒素 B ₁ 允许量标准
绿色食品 花生(果、仁)	≤ 5	NY/T420-2000
绿色食品 食用植物油	≤ 5	NY/T751-2003
精炼食用植物油、色拉油	≤ 5	GB15197-1994, GB13103-1991
玉米、花生饼(粕)、棉籽饼(粕)、菜籽饼(粕)	≤ 50	GB13078-2001 饲料卫生标准
豆粕	≤ 30	GB13078-2001 饲料卫生标准
仔猪配合饲料及浓缩饲料	≤ 10	GB13078-2001 饲料卫生标准
生长肥育猪、种猪配合饲料及浓缩饲料	≤ 20	GB13078-2001 饲料卫生标准
肉用仔鸡前期、雏鸡配合饲料及浓缩饲料	≤ 10	GB13078-2001 饲料卫生标准

2 现有黄曲霉毒素 B₁ 检测方法比较

现有 AFB₁ 检测方法主要包括薄层分析法(TLC)、生物鉴定法、仪器分析法和以酶联免疫为基础的免疫分析和免疫亲和分析法如微孔板酶联免疫吸附分析法(ELISA)等。

2.1 薄层分析法

TLC 法是传统的检测 AFB₁ 最常用方法,也曾是我国测定食品及饲料中 AFB₁ 的国家标准方法之一^[6]。从最初的目测到采用薄层扫描层析仪,TLC 法已从定性分析、半定量分析实现了定性定量的自动化,分析速度加快,误差减小。其原理是针对不同的样品,用适宜的提取溶剂将 AFB₁ 从样品中提取出来,经溶剂萃取纯化,再在薄层板上层析展开、分离,利用 AFB₁ 的荧光特性,根据荧光斑点的大小和强弱,比较测定黄曲霉毒素含量。

TLC 法有单向展开和双向展开法,其中双向展开法能进一步除去样品中的杂质,提高灵敏度,避免了杂质干扰,但增加了操作步骤和时间^[1,7-8]。TLC 法是检测 AFB₁ 的经典方法,虽然其操作步骤

多、灵敏度差,专一性较差、重现性差,检测周期长,有不慎接触或吸入毒素引发急性 AFB₁ 中毒的危险,但由于设备简单,易于普及,分析成本低,国内外仍有使用,是普通实验室的常用方法之一。

2.2 生物鉴定法

生物鉴定法分为幼年动物、胚胎和卵鉴定法、组织培养鉴定法、豚鼠鉴定法、植物和微生物鉴定法、水生动物鉴定法等。基本原理是根据生物摄入或添加 AFB₁ 后产生的病变、死亡或异常现象来判断鉴定^[3,7,9]黄曲霉毒素含量和危害。

生物鉴定法专一性不强,鉴定时间特别长,灵敏度也不如 TLC 法,一般作为薄层层析方法的辅助验证试验。但由于这种方法对样品纯度要求不高,少量杂质不影响测定结果,因此有一定参考价值。

2.3 仪器分析法

借助于大型仪器设备测定 AFB₁,主要包括高效液相色谱(HPLC)法、荧光光密度计法、紫外分光光度法、微型柱荧光反应法、示波极谱法、质谱法、核磁共振法、X 射线衍生物法等^[3,7,8,10]。这类方法的突出特点是测定准确度较高,重复性好,但需要紧密大型

仪器设备,程序繁、耗时长、费用高。

2.3.1 高效液相色谱法 HPLC 法是当前国内外使用的最权威的检测 AFB₁ 方法,在适宜的流动相条件下,采用反相 C₁₈ 柱,使多种黄曲霉毒素成分分离,用荧光检测器检测。HPLC 法检测花生及制品中 AFB₁ 研究已有较多报道^[11-13],该方法测定准确,分辨率高,可同时测定多种黄曲霉毒素成分,完成定性、定量测定,但样品提取纯化程序繁琐,操作技术水平要求高,操作复杂,适合在专业检测实验室使用。

2.3.2 荧光光密度计法 荧光光密度计法以薄层层析法为基础,样品经薄层层析后用荧光光密度计代替目测法测定样品的荧光强度,配上记录仪、自动积分器等装置,自动测定黄曲霉毒素含量,其准确度和重复性比目测法高^[14],但受薄层层析法自身缺陷的限制,加之荧光光密度计仪器昂贵,这种方法使用的不多。

2.3.3 紫外分光光度法 紫外分光光度法测定黄曲霉毒素含量与荧光光密度计法类似,以薄层层析法为基础,样品经薄层层析后,在紫外分光光度计下依据荧光斑点的大小测定 AFB₁ 的含量^[15]。一般用于分析黄曲霉毒素污染严重的高含量样品分析,如花生粉等。这种方法对被测定的样品中 AFB₁ 含量要求较高,因此应用范围受到限制。

2.3.4 微型柱荧光反应法 样品提取液中的黄曲霉毒素经微型柱内的硅镁型吸附层吸附后,在紫外光照射下发出蓝紫色的荧光,其荧光强度与黄曲霉毒素含量在一定浓度范围内成正比,根据荧光强度测定黄曲霉毒素的总量^[1,16]。这种方法不能准确定量,一般仅用于半定量测定。

其他仪器分析法包括质谱法、示波极谱法、核磁共振法、X 射线衍生法等,虽然定性准确,但由于不仅需要十分昂贵的大型仪器设备,特别是还需纯度很高的纯品黄曲霉毒素标样,在我国很少使用。

2.4 酶联免疫法(ELISA)

酶联免疫吸附法(ELISA)是 70 年代以来发展起来的免疫测定技术,可分为直接法、间接法、双抗体夹心法、双夹心法、竞争法、抑制性测定法等^[9,16,17],其原理是利用抗原-抗体反应的高度特异性和酶促反应的高度敏感性,对抗原或抗体进行检测。

ELISA 法将已知的待测 AFB₁ 抗原(或抗体)吸附于固定载体的免疫吸附剂上,洗涤未吸附的其他

抗原和杂质,加入酶标记的 AFB₁ 抗体(或抗原)与样品中的待测物(抗原或抗体)发生特异免疫学反应,形成酶标记的抗原-抗体复合物,洗涤后,加入酶底物,进行显色反应,通过颜色的深浅来测定 AFB₁ 抗原或抗体的含量。这种方法灵敏度高,比薄层法提高了近 200 倍;特异性强,荧光物质、色素、结构类似物对结果无干扰;而且回收率高,提取方法简单,可以进行定性和定量测定,得到了比较广泛的应用。近年来,国内不少科研机构、检验检疫部门对 ELISA 法研究改良,建立了较多的快速检测方法,如 AFB₁ 试剂盒(国内有无锡市生物技术公司的 ELISA 试剂盒,国外有德国拜发罗恩公司 ELISA 试剂盒等)、AFB₁ 试纸等^[9,17-20]。

由于 ELISA 法中酶的活性易受反应条件影响,ELISA 法测定结果重复性较差,测定结果易出现假阳性问题,此外 ELISA 试剂寿命短,需要低温保藏。对食用油、含脂量高的样品如花生等以及葡萄酒类、含盐量高的酱油等,在提取时要进行调节 pH 值、脱盐、脱脂等特殊处理。

3 粮油产品黄曲霉毒素 B₁ 快速检测技术研究进展与发展趋势

随着人们安全消费意识的增强,对粮油等农产品和食品 AFB₁ 含量要求越来越严格,推动了 AFB₁ 检测特别是快速检测技术的不断发展,黄曲霉毒素 B₁ 检测技术发展趋向于集成、准确、快速、简便、智能化。

3.1 荧光分光光度快速检测技术

AFB₁ 荧光光度快速检测技术是根据 AFB₁ 的荧光特性而建立的一种直接采用荧光分光光度计检测样品提取液中 AFB₁ 的快速筛选方法。中国农科院油料所首先报道并改良了该方法^[21]。将 55% 甲醇水溶液加入粉碎花生样品中,经振荡、过滤提取、用荧光增强剂稀释后,用荧光光度计测定 AFB₁ 的含量。该方法专一性和灵敏度不高,在花生遗传育种 AFB₁ 高含量材料的批量筛选中有较多的应用。

3.2 AFB₁ 免疫亲和快速检测技术

针对传统 ELISA 检测方法的缺陷,近年来国内外研究建立了新的 AFB₁ 免疫检测方法,如黄曲霉毒素免疫亲和微柱及免疫亲和纯化与仪器联用检测技术^[22]、时间分辨荧光分析方法^[23]、竞争微球酶联免疫分析方法^[24]等。

3.2.1 免疫亲和层析分离纯化与大型仪器联用法

采用免疫亲和层析柱对经简单提取的样品溶液过柱分离纯化后,直接采用高效液相色谱仪或荧光分光光度计检测黄曲霉毒素含量。这类分析方法综合了两者的优点,样品前处理简单,特异性强、灵敏度高、结果准确,同时,克服了各自的不足之处。近年来国内外对此类 AFB₁ 检测方法的研究报道较多^[25-27],已有商品化的黄曲霉毒素亲和微柱出售,如美国维康公司的产品等。2003 年我国重新修订了食品中黄曲霉毒素测定方法的国家标准^[6],新标准^[28]采用了美国维康公司的黄曲霉毒素亲和微柱分别与 HPLC 和荧光分光光度计联用的两种检测方法。修订后的标准方法显著缩短了样品预处理时间,提高了检验效率,减少了操作人员对毒素及有机溶液的接触。

3.2.2 AFB₁ 免疫亲和荧光传感器检测技术

为了提高 AFB₁ 检测的自动化程度,美国学者 Carlson 等^[29]研究设计了一种免疫亲和荧光传感器,通过向流动反应池泵入一定量免疫微球悬浮液,去除液体后,泵入提取样品溶液,洗去非特异性吸附物,再泵入甲醇洗脱 AFB₁,最后用自带的微型荧光传感器检测,线性范围在 0.1~50ng/g。

3.2.3 竞争微球酶联免疫分析技术

英国学者 Garden S. R. 和 Strachan N. J. C.^[22]利用直径为 98 微米的微球替代传统的酶标板,将一定量已吸附了黄曲霉毒素 B₁ 与牛血清白蛋白连接物的免疫微球置于反应容器中,依照竞争 ELISA 分析方法原理和程序检测 AFB₁ 含量,检测限达 0.2ng/mL,全过程仅需要 2.5h。Garden 等进一步研制了快速比色的序列注射免疫分析系统(简称 SIIA),通过 SIIA 在 10min 内自动化完成竞争微球酶联免疫分析,但该方法由于受样品杂质干扰严重,检测限只能达到 4ng/mL,尚需要进一步完善。

4 小结

对粮油及制品中黄曲霉毒素 B₁ 的检测自 20 世纪五、六十年代以来,逐渐探索出了多种方法,这些方法都曾经在各个历史时期为检测黄曲霉毒素作出了一定贡献,但也存在着操作复杂、污染大、对仪器设备要求高、假阳性率高、检测时间长等缺陷;随着时代的发展,已经不能适应当代社会要求的污染小、灵敏度高、检测时间短、操作简单的检测要求。

以免疫分析为基础的准确、快速、无污染、智能

化检测技术成为黄曲霉毒素 B₁ 快速检测方法研究中的热点,AFB₁ 免疫亲和技术与仪器(如 HPLC)分析联用的检测方法明显优于传统的 ELISA 方法,已被国内外农产品及食品检疫部门接受应用^[30,31],我国目前食品中黄曲霉毒素的测定采用的就是免疫亲和层析净化高效液相色谱法和荧光光度法^[28]。然而,这类方法存在免疫亲和微柱纯化样品成本高、样品处理依赖手工操作,检测过程自动化和检测结果智能化程度低的问题^[32-34]。免疫亲和微球纯化结合快速专用速测仪实现 AFB₁ 的快速定量检测被认为是未来 AFB₁ 快速检测技术发展的趋势。

参考文献:

- [1] 居乃璇. 黄曲霉毒素[M]. 北京:轻工业出版社, 1981.
- [2] 宓晓黎,程恒嵩. 黄曲霉毒素分析方法研究进展[J]. 粮食与饲料工业, 1994(10): 41—43.
- [3] 潘中华,徐燕芳,成恒嵩. 黄曲霉毒素分析方法进展[J]. 农业环境与发展, 1995, 2(44): 30—33.
- [4] 李燕俊. 乳与乳制品中黄曲霉毒素 M1 的检测方法综述[J]. 中国食品卫生杂志, 1998, 10(2): 30—33.
- [5] European Commission Regulation No. 194/97. Amended by European Commission Regulation No. 1525/98, L201 (1998).
- [6] 食品中黄曲霉毒素的测定. 中华人民共和国国家标准 GB/T5009.22—1996.
- [7] 叶雪珠,王小骊,等. 黄曲霉毒素 B₁ 检测方法的分析[J]. 食品与发酵工业, 29(10): 90—92.
- [8] 王宏亮. 薄层层析法测定饲料中黄曲霉毒素 B₁ 方法的改进[J]. 粮食与饲料工业, 1998(1): 40—42.
- [9] 江苏省微生物研究所. 酶联免疫吸附法检测黄曲霉毒素 B₁ 技术资料汇编.
- [10] 刘家珍,刘芮,姚军. 黄曲霉毒素 B₁ 分析方法[J]. 职业与健康, 2002, 18(3): 39—40.
- [11] 王凤英. 高效液相色谱法测定花生中的黄曲霉毒素[J]. 现代仪器, 2002(3): 16, 22—23.
- [12] 何才云,等. 高效液相色谱法测定花生中的黄曲霉毒素[J]. 分析测试技术与仪器, 1(1): 40—42.
- [13] 张鹏,等. 花生中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 多功能净化柱—高效薄层色谱分析[J]. 分析测试学报, 18(6): 62—64.
- [14] 张金龙,于丽伟. 荧光光度薄层扫描法测定玉米中黄曲霉毒素 B₁ 的方法[J]. 陕西粮油科技, 1993, 18(3): 54—56.
- [15] Nabney J, Nesbitt B F. A spectrophotometric method for determining the aflatoxins. Analyst, 1965, 90: 155—160.

- [16] 陈达民. 微柱法快速测定饲料中黄曲霉毒素的总量 [J]. 饲料工业, 1993, 14(1): 29—30.
- [17] 周先碗, 胡晓倩. 生物化学仪器分析与实验技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [18] 刘冬儿. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 食品工业科学与技术, 2002, 23(10): 79—80.
- [19] 黄薇, 王盛良, 熊剑娟. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的酶联免疫吸附测定法 [J]. 职业与健康, 2002, 18(12): 31—32.
- [20] 柳其芳, 黎雪慧. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B₁ [J]. 海南医学, 2004, 15(7): 57—58.
- [21] 肖达人, 王圣玉, 张洪玲. 花生抗黄曲霉毒产毒快速鉴定方法 [J]. 中国油料作学报, 1999, 21(3): 72—75.
- [22] 刘江. 单克隆抗体在真菌毒素检测中的应用进展 [J]. 国外医学卫生分册, 1995, 22(2): 90—94.
- [23] Harri H, Petri A, Time L. Mutilplex immunoassays on sie - categorized individul beads using time - resolved fluorescence [J]. Analytic Chimica. Acta, 2000, 410: 85—89.
- [24] Garden S R, Strachan N J C. Novel colorimetric immunoassay for the detection of aflatoxion B₁ [J]. Analytic Chimica. Acta, 2001, 444: 187—191.
- [25] 王光建, 何才云, 鲁长豪, 等. 用免疫亲和柱分离和高效液相色谱法测定花生和玉米中黄曲霉毒素的研究 [J]. 色谱, 1995, 13(4): 238—296.
- [26] Manju Shara, Carmen Marquez. Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity and HPLC [J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 93: 109—114.
- [27] Jaimez J, Fente C A, Vazquez B I, et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of Chromatography A, 2000, 882: 1—10.
- [28] 食品中黄曲霉毒素的测定. 中华人民共和国国家标准 GB/T18979—2003.
- [29] Carlson M A, Bargeron C B, Benson R C, et al. An automated, handheld biosensor for aflactoxin. Biosensor & bioelectronics, 2000, 14: 841—848.
- [30] 杨长志, 康庆贺, 田丰, 等. 免疫亲和柱法测定小麦中黄曲霉毒素 [J]. 化学工程师, 2002, 93(6): 32—33.
- [31] 王晶, 张鹏, 张艺兵, 等. 免疫亲和层析净化荧光光度法快速测定酱油及醋中黄曲霉毒素 [J]. 2003, 15(5): 412—414.
- [32] 张森, 王家传, 张培正. 我国食品安全存在的问题及解决的科技途径, 中国果蔬 [J]. 2004, 6: 43—44.
- [33] 农军. 目前国家几种检测黄曲霉毒素 B₁ 标准方法的分析与探讨 [J]. 分析与测试, 2003, 增刊: 53—54.
- [34] 蔡正森, 钟文辉, 张东升, 等. ELISA 法和 HPLC 法检测粮油食品中黄曲霉毒素 B₁ 含量的比较研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(3): 302—304.

A review on analytical methods for aflatoxin B₁ in grains and oilseeds products

LI Pei - wu^{1,2}, MA Liang², YANG Jin - er², ZHANG Wen^{2,3}, YANG Chun - hong², YANG Mei^{2,3}

(1. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Oil Crops Research Institute, CAAS, Wuhan 430062, China;

3. Quality Inspection and Test Center for Oilseeds Products, Agricultural Ministry, Wuhan 430062, China)

Abstract: Analytical methods for aflatoxin B₁ were briefly reviewed in this paper. Recent development of new fast test techniques for aflatoxin B₁ analysis in grains and oilseeds products based on immunoaffinity were introduced and discussed.

Key words: Aflatoxin B₁; Analytical Methods; Review