

乳与乳制品中黄曲霉毒素 M_1 的检测方法(综述)

李燕俊 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

黄曲霉毒素 M_1 (以下简称 AFM_1) 是动物摄入黄 于牛奶及各种相关乳制品的检测⁽¹⁾ (见表)。

肉瘤。鉴于 AFM_1 对人类健康构成一种潜在的威胁, 因此应限制其在牛奶或乳制品中存在。为此, 必须有精确、简便、快速、灵敏、回收率高、不需特殊设备和可在基层实验室开展的分析方法。

自从 1965 年 AFM_1 被发现以来, 国内外建立了大量的方法用于测定乳与乳制品中 AFM_1 的含量, 其程序包括试样的提取、净化和定量测定三部分。

1 提取和净化

由于乳与乳制品成分复杂, 而 AFM_1 在其中仅为痕量, 为了减少干扰和误差, 必须在定量测定前先对试样进行提取、净化等前处理。一般先将试样均化, 再根据乳品种类, 应用 AFM_1 的各种不同理化特性, 如分子质量、溶解度、极性等, 用不同的理化方法对其进行提取、净化。这些方法包括使用不可互溶的两种溶剂萃取、色谱柱层析、金属离子络合以及应用沉淀系统分离等。前两类方法经常结合使用, 并在不同作者报道的方法中采用不同的溶剂和色谱柱。若试样中含有大量蛋白质, 可用 $Zn(OH)_2$ 或 $Pb(Ac)_2$ 脱去蛋白或用丙酮处理以沉淀蛋白; 若试样中含有较多的脂肪, 可用正己烷萃取或冷冻离心除去, 或在 $Na_2SO_4-Al_2O_3-Na_2SO_4$ 色谱柱上, 用甲苯和三氯甲烷洗脱除去。

尽管文献报道了大量的测定方法, 但在提取和净化方面的差别并不显著。Martin 等选择了 6 种提取和净化方法进行比较, 结果明确显示 Takeda 用 Sep-Pak 柱提取和净化牛奶中 AFM_1 的方法, 在节约操作时间及提高最终提取物的净化程度方面均有极大的优越性, 较它法更易实现自动化操作, 可广泛地应用

(LC)、高效液相色谱法 (HPLC) 以及近年来新发展的质谱检测 (Mass) 等; 另一类为可快速测定的免疫化学法, 如放射免疫测定法 (RIA) 和酶免疫测定法 (EIA)。

应用理化学方法和免疫学方法检测乳与乳制品中微量 AFM_1 仍有困难, 且对实验操作要求较高, 在操作过程中难以实现质量控制 (AQA)。为此, 八十年代末, BCR (Community Bureau of Reference) 在其参考物项目中建立了 4 个奶粉中 AFM_1 的确证参考物 (Certified Reference Material CRM) RMs282, RMs283, RMs284 和 RMs285。这些参考物具有良好的同一性和稳定性, 变异度仅为 2.4%, 可将其应用于 AFM_1 测定的质量控制, 并可用于奶粉中 AFM_1 的全自动分析过程。^(2, 3)

2.1 理化学方法

薄层色谱法

薄层色谱法是最早建立的测定乳与乳制品中 AFM_1 含量的方法, 并为 AOAC 所采用。虽然薄层色谱法灵敏度相对较差, 但提取净化的不断改进和多种展开系统和显色剂的使用, 使该法具有较好的分离和专一性。国内外对建立 AFM_1 测定的薄层色谱法有大量的报道, Schuller 等建立的方法检出限为 $0.05 \mu g/kg$, 回收率为 98%;⁽¹³⁾ Tuinstra 和 Bronsgeest 将其检出限提高到 $0.04 \mu g/kg$,⁽¹⁴⁾ Stubbfield 建立的方法尽管未能达到上述水平, 其检出限为 $0.1 \mu g/kg$, 回收率仅为 80%, 但方法简便快速。Lucas 等在提取系统中增加了碳酸氢钠, 低温离心脱脂肪和蛋白, 最后用三氯甲烷提取 AFM_1 , 其回收率达到 95% 以上, 在不使用柱层析净化的条件下, 检出限可达到 $0.1 \mu g/kg$, 如引入柱层析, 则检出限可达到 $0.02 \mu g/kg$ 。

我国胡文娟等建立的薄层色谱法用甲醇提取 AFM₁,石油醚分配净化,再用三氯甲烷分配提取,并进行三次展开,其检出限在牛奶、炼乳、奶粉、乳酪和黄油中分别为 0.1, 0.2, 0.5,0.5 和 0.5 $\mu\text{g/kg}$,回收

开改为二次展开,修改后的方法灵敏度达 0.25 $\mu\text{g/kg}$,最低检出量为 $1.2\times 10^{-4} \mu\text{g}$ 。⁽⁵⁾毛显林等用丙酮-三氯甲烷提取 AFM₁ 后,经硅胶柱色谱纯化再进行二次展开,其最低检出限为 0.3 ng,回收率在灵敏

方法	牛奶量 mL	前处理	提 取	净化
Stubblefield	50	无	三氯甲烷(120mL)	硅胶柱
Chang and Devries	50	无	三氯甲烷(120mL)	乙腈-轻汽油提取
Gauch	50	盐酸(0.4mL), 甲醇(15mL)	Extrelut 柱	洗脱液用氢氧化钠和盐酸处理
Chambon	20	硫酸锌-氢氧化钠去蛋白	滤液用三氯甲烷提取	无
Ferguson - Foos and Warren	20	热水(20mL)	Sep - Pak C ₁₈ 柱	硅胶柱
Takeda	10	热水(10mL)	Sep - Pak C ₁₈ 柱	无

方法	以往报道的 回收率 %	以往报道的 测定方法	每一样品 分析时间 h	平均 回收率 %	检出限 $\mu\text{g/kg}$	相对费用比 (溶剂/材料)	总相对费用比 (包括劳动力)
Stubblefield	80	TLC(一次展开)	4	77	0.005	1.3	2.2
Chang and Devries	100 $\pm$ 13	HPLC(TFA 衍生)	2.5~3.0	80	0.005	1.7	1.7
Gauch	78 $\pm$ 4	TLC(二次展开)	5.5~6.0	60	0.01	4.0	3.5
Chambon	83~89	HPLC	3.5~4.0	74	0.005	1.0	2.1
Ferguson - Foos and Warren	90~102	HPLC(硅胶柱)	1.5	84	0.005	1.8	1.0

法作为 AOAC 测定牛奶和猪奶中 AFM₁ 含量的方法,⁽⁷⁾该法用色谱柱色谱代替原方法的纤维柱色谱进行净化处理,丙酮提取液用醋酸铅处理后经己烷脱脂,再用三氯甲烷萃取,过 Sep - Pak 色谱柱,AFM₁ 被三氯甲烷-甲醇溶液洗脱,用连接荧光检测器的 C₁₈ 反相液相色谱方法测定其含量。在牛奶中添加0.25, 0.5 和 1.0 ng/mL 的回收率分别为 90.8%,93.4%和 94.1%,牛奶和猪奶中 AFM₁ 的检出限均小于 0.1 ng/mL。

高效液相色谱法

高效液相色谱法作为灵敏度高、特异性强的分析方法,被广泛应用于 AFM₁ 的定量测定中。国内外的报道大多采用反相色谱,用 C18 柱作固定相。Chang 等建议采用 HPLC 以修改 AOAC 牛奶与脱脂干牛奶中 AFM₁ 的测定方法,该法仍保留三氯甲烷提取,但

的 6-7 倍)用荧光检测器测定,方法检出限为 0.014 mg/L。⁽⁸⁾Carisano 等使用 Sep - Pak C18 色谱柱对牛奶进行 AFM₁ 分离和净化,作为 HPLC 的试样前处理方法,大大提高了方法的灵敏度,检出限为 1 ng/L,线性范围为 2.5~50 ng/L,回收率约为 97%,变异度为 4.8%。⁽⁹⁾此外,HPLC 方法还被广泛地应用于奶粉、干酪等乳制品中 AFM₁ 的含量测定。

Marlin 等组织了 30 个国家 80 个实验室对同一份牛奶试样中 AFM₁ 的含量进行测定,表明用 AOAC 方法 1 和 AOAC 方法 2(均为 TLC 法)进行定量测定各实验室间结果较为一致,而用 AOAC 方法 1 和用 HPLC 方法进行定量测定,各实验室间的测定结果具有统计学上的显著性差异。用 HPLC 方法进行定量测定的 12 个实验室间数据较为集中,尽管使用了不同的提取和净化方法,变异度仅为 19%。用 AOAC

方法2进行定量测定的实验室之间数据相差较大,为AOAC方法1的2倍,且包括本次测定中的最大值(140.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)和最小值(0 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。⁽¹⁰⁾

质谱法

Friedli建立了质谱法测定黄曲霉毒素,其中AFM₁的检出限为100 pg,并提出对试样进行简单的净化,如蒸干后再溶于甲醇—水(1:2)溶液中,可去除其它污染物的干扰。William建立了两种质谱法分析农产品和生物体液中的黄曲霉毒素,其一为经薄层

由于抗AFM₁的抗血清与AFB₁有交叉反应,Harder等用³H标记AFB₁建立了放射免疫测定方法测定乳与乳制品中的AFM₁,脱脂奶的三氯甲烷提取液不需净化可直接用于RIA测定,其方法灵敏度为0.5~20 ng/mL。⁽¹⁶⁾Rauch等用¹²⁵I标记的AFB₁建立AFM₁的放射免疫测定方法,并使用Stubblefield和Shannon方法作为定量测定的前处理方法,该法检出限为每管4 pg。⁽¹⁷⁾

酶免疫测定方法

微柱测定法

Cathey等报道了一种使用微柱测定牛奶中AFM₁含量的方法,牛奶用水等倍稀释后通过C₁₈色谱柱,用丙酮—亚甲基—三氯甲烷洗脱,洗脱液加入装有中性沙和硅酸氧化镁的玻璃微柱,淋洗后在长波长紫外光下观察测定。本法具有准确、快速、简便和稳定的优点,方法检出限为0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。⁽¹²⁾

亲和柱层析方法

Hansen建立了抗体亲和柱层析方法分离生牛奶中的AFM₁,脱脂牛奶直接通过亲和柱,再将AFM₁

ng/mL,回收率为89.9%~109.4%。⁽¹⁸⁾刘兴圻等报道了用抗AFM₁的特异性抗体建立直接竞争ELISA法测定奶粉中的AFM₁含量,灵敏度为0.08 ng/mL,回收率为85%~125%。⁽¹⁹⁾Hu等用Sep-Pak色谱柱作ELISA方法的前处理,使灵敏度提高20~40倍,检出限达到15 pg/mL。⁽²⁰⁾此外尚有用聚苯乙烯微珠和尼龙珠作包被抗原(体)载体建立ELISA方法的报道。

Pestka等用一株高特异性的抗AFM₁抗体建立了放射免疫测定法和酶联免疫吸附测定法,并对这两

用于检测AFM₁的免疫化学测定方法大多以特异性抗体为基础,一般分为抗血清即多价抗体和单克隆抗体两种。AFM₁为小分子物质,不具有免疫原性,因此需要连接到大分子载体上,使其成为完全抗原,再用来免疫动物制备抗体。国内外多采用牛血清白蛋白(BSA)作为载体,通过碳二亚胺法与AFM₁连接形成AFM₁-oxime-BSA偶联物,经多次免疫动物后制备抗血清;或取脾与杂交瘤细胞融合制备单克隆抗体。制备单抗国外多采用BalB/c小鼠经多次免疫后与小鼠骨髓瘤细胞株融合,并进行多次亚克隆以获得稳定的杂交瘤细胞株,⁽¹⁴⁾但我国目前仅上海细胞生物研究所制备了5株分泌抗AFM₁抗体的大鼠—小鼠淋巴细胞杂交瘤细胞株,⁽¹⁵⁾尚无制备BalB/c小鼠杂交瘤细胞株的报道。

放射免疫测定方法

测乳与乳制品中AFM₁含量时使用。⁽²¹⁾

3 结语

AFM₁具有较强的毒性和潜在致癌性,而其在乳与乳制品中污染极为普遍。为达到保护消费者健康的目的,对乳与乳制品中AFM₁的允许限量进行控制显得尤为必要。从国外情况来看,AFM₁的允许限量标准在逐渐降低,要从管理层面达到这一目的,必须有灵敏、特异、可靠、快速、容易普及的检测方法做为保障。传统的理化检测方法,有些方法(如TLC)简便,但灵敏度差;有些方法(如HPLC)虽然灵敏度高,但样品处理繁琐,仪器昂贵,目前难以普及使用,只适合做确证实验。以单克隆抗体为基础的免疫检测方法,具有灵敏度高、特异性强、快速、简便等优点,可以满足大量试样筛选的需要,在基层容易普及,可作为

一种快速筛选方法使用,但该方法目前我国尚属空白。因此,这种检测方法的开发具有十分重要的现实意义。

(罗雪云 审校)

4 参考文献

- 1 Martin J Shepherd, Michael Holmes, John Gilbert. Comparison and critical evaluation of six published extraction and clean-up procedures for aflatoxin M₁ in liquid milk. *Journal of Chromatography*, 1986, 354: 305~315
- 2 Hans P, Van Egmond, Peter J. Wagstaffe. Development of milk powder reference materials certified for aflatoxin M₁ content (Part I). *Journal of Association Official Analysis Chemistry*, 1987, 70(4): 605~610
- 3 Hans P, Van Egmond, Peter J. Wagstaffe. Development of milk powder reference materials certified for aflatoxin M₁ content (Part II). *Journal of Association Official Analysis Chemistry*. 1988, 71(6): 1180~1182
- 4 胡文娟,韩玉莲.几种主要动物性食品中黄曲霉毒素 M₁ 与 B₁ 的测定方法. *卫生研究*, 1980, 9(3): 23~29
- 5 王加生,朱晓燕,张志炎.牛乳粉中黄曲霉毒素 M₁ 污染状况调查. *铁道医学*, 1985, 13(6): 354~355
- 6 毛显林,何倩琼,钱掌珠.采用柱层析纯化薄层法测定乳品中黄曲霉毒素 M₁. *卫生研究*, 1984, 13(6): 29~32
- 7 Geng Sun Qian, Parvin Yasei, George C Yang. Rapid extraction and detection of aflatoxin M₁ in cow's milk by high-performance liquid chromatography and radio immunoassay. *Journal of Association Official Analysis Chemistry*, 1984, 67(4): 739~741
- 8 Chang H L, Devries J W. Rapid high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in milk and nonfat dry milk. *Journal of Association Official Analysis Chemistry*, 1982, 66(4): 913~917
- 9 Alessandro Carisano, Glancarlo Della Torre. Sensitive reversedphase high performance liquid chromatographic determination of aflatoxin M₁ in dry milk. *Journal of Chromatography*, 1986, 355, 340~344
- 10 Marlin D, Liliane Garren. International mycotoxin check sample program: Part II. Report on laboratory performance for determination of aflatoxin M₁ in milk. *Journal of Association Official Analysis Chemistry*, 1982, 65(4): 864~868
- 11 William F Haddon, Masri M Sid, Randall V Garcia, et al. Mass spectral confirmation of aflatoxins. *Journal of Association Official Analysis Chemistry*, 1977, 60(1): 107~113
- 12 Cathey C G, Huang Z G, Sarr A B, et al. Development and evaluation of a minicolumn assay for the detection of aflatoxin M₁ in milk. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77(5): 1223~1231
- 13 Hansen T J. Affinity column cleanup and direct fluorescence measurement of aflatoxin M₁ in raw milk. *Journal of Food Production*, 1990, 53(1): 75~77
- 14 Nancy A Woychik, Ronald D Hinsdill, Chu Fun S, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies against aflatoxin M₁. *Applied and Environmental Microbiology*, 1984, 48(6): 1096~1099
- 15 季永铺,林国妹,叶敏.分泌抗黄曲霉毒素 M₁ 抗体的大鼠—小鼠淋巴细胞杂交瘤细胞株的建立及其特性的研究. *生物工程学报*, 1992, 8(2): 150~156
- 16 Harder W O, Chu F S. Radioimmunoassay of aflatoxin M₁. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, 1979, 79: 204
- 17 Rauch P, Fukal L, Prosek J, et al. Radioimmunoassay of aflatoxin M₁. *Journal of Radioanal Nucl Chemistry, letters*, 1987, 117(3): 163~169
- 18 聂晶,刘滨磊,刘兴玠,等.酶联免疫吸附法检测黄曲霉毒素 M₁ 的研究. *中华预防医学杂志*, 1993, 27(4): 233~235
- 19 刘兴玠,李秀芳,温世凡.应用 ELISA 直接竞争法测定乳粉中黄曲霉毒素 M₁. *卫生研究*, 1992, 21(5): 251~253
- 20 Hu W J, Woychik N, Chu F S, et al. ELISA of picogram quantities of aflatoxin M₁ in urine and milk. *Journal of Food Protection*, 1984, 47(2): 126~127
- 21 Pestka J J, Li Y, Harder W O, et al. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M₁ in milk. *Journal of Association Official Analysis Chemistry*, 1981, 64(2): 294~301