

## 生物毒素和中毒控制中常见毒物快速测定技术研究简介

李凤琴

(中国疾控中心营养与食品安全所,北京 100021)

**摘要:**为改变生物毒素和中毒控制领域常见毒物的检测缺乏快速、灵敏、简便技术的现状,选择该领域有代表性的难新问题进行攻关。分别建立了检测粮油食品中 AFB<sub>1</sub> 的 2 个 ELISA 方法,最低检出浓度分别为 0.01 μg/kg 和 0.1 μg/kg,回收率均在 80% 以上,同时研制出拥有我国自主知识产权的 2 个 AFB<sub>1</sub> ELISA 试剂盒,建立了 2 条年产量分别为 1.5 万盒和 2 000 盒的生产线。建立了检测河豚鱼中河豚毒素的直接和间接 ELISA 方法,最低检出浓度分别为 0.1 μg/L 和 1 μg/L,回收率均高于 70%。研制出基于直接法的河豚毒素 ELISA 试剂盒,筛选出了国产可食的河豚鱼种。建立了检测粮食中伏马菌素 B<sub>1</sub> 的 ELISA 方法,最低检出浓度为 5 μg/L,回收率 75.24% ~ 117.65%,研制出检测伏马菌素 B<sub>1</sub> 的 ELISA 试剂盒。建立了食品和中毒样品中亚硝酸盐、甲醇等 20 种毒物的快速检测方法,所建方法与国标法相比检测结果差异无显著性,但检测时间缩短 50% 以上、检测成本降低 80% ~ 95%。自行设计研制出便携式智能化微型光电比色仪和光反射传感器,与建立的 20 种毒物快速检测技术配套使用,实现了中毒样品的现场智能化、自动化快速定量检测。研制出携带方便、便于中毒现场使用的毒物检测箱,建立了一条年产量 2 000 套的生产线。整个课题申请专利 5 项,批准 2 项;获奖 2 项;产生 2 项国家标准和 1 项企业标准。在国内外杂志上共发表文章 28 篇。快速检测技术各项指标均达到国际同等、国内领先水平。

**关键词:**黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>;河豚毒素;伏马菌素 B<sub>1</sub>;病原;中毒控制

### Development of rapid methods for determination of biotoxins and hazardous chemical contaminants

LI Feng-qin

(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

**Abstract:** Some representative and newly pending tasks in the field of biotoxins and poisoning control were selected to study, due to the lack of rapid, sensitive and simple methods for determination of biotoxins and chemical contaminants in foods. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for rapid detection of aflatoxin B<sub>1</sub> based respectively on monoclonal and polyclonal antibodies were developed and the corresponding two ELISA test kits were manufactured. The limits of detection (LOD) were 0.01 μg/kg for monoclonal- and 0.1 μg/kg for polyclonal-ELISA test kit. Both test kits have the mean recoveries higher than 80%. Two production lines for both test kits with the respective annual yields of 15 000 and 2 000 were upbuilt. Direct and indirect ELISA methods for detection of tetrodotoxin in puffer fish were developed. The LOD was 0.1 μg/L for the former and 1.0 μg/L for the latter. Recoveries of both were above 70%. ELISA test kit based on direct ELISA for TTX detection was produced and successfully employed in the screening of edible species of puffer fish. Determination of fumonisin B<sub>1</sub> in cereals by ELISA was studied and ELISA test kit was developed. The LOD were 5 μg/L and the recovery ranged from 75.24% to 117.65%. Rapid methods for analysis of twenty hazardous chemical contaminants such as heavy metals, nitrate, nitrite, methanol etc. in foods, biosamples (blood, urine and so on) and left-over samples suspected in relation to human foodborne diseases

This work was supported by The Grant from National Science and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A14)

基金项目:科学技术部国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A14)

作者简介:李凤琴 女 副研究员

中国食品卫生杂志  
CHINESE JOURNAL OF FOOD HYGIENE

2005 年第 17 卷第 4 期

were developed and validated. The analytical time of all methods developed in this study shorten by 50 % and the cost decreased by 80 % ~ 90 % , but no difference in the results , compared with the associated national standard methods. Intelligentized mini-photoelectric colorimeter and photo-reflect sensor have been designed and assembled. Both work well to match with the rapid methods for twenty contaminants mentioned above and implement the automatic , fast analysis for them in the field. Product line for portable case of contaminants detection with the annual yield of 2 000 sets was founded. Five patents applied and two were approved. Two awards at the provincial level were obtained. Three standard methods either at national or industrial level were issued. Twenty-eight papers were published at international or national journals. All parameters of rapid detection technologies developed reach the international level and keep ahead in the domestic.

**Key word:** Aflatoxin B<sub>1</sub> ; Tetrodotoxin ; Fumonisin B<sub>1</sub> ; Noxae ; Poisoning Control

在我国“菜篮子”的诸多污染因素中,生物毒素是一类重要的天然污染物。由生物毒素引起的食源性疾病和食品贸易争端一直是全球关注的热点,而工业“三废”及城市生活垃圾的污染,使得我国大中城市郊区及一些工矿企业周围环境污染严重,通过生物富积作用,这些地区的饮用水、农产品及食品中重金属、亚硝酸盐、农药等污染物严重超标,由此导致的人畜中毒事件呈逐年上升趋势。由于国内农产品、食品和环境有害物质快速检测技术与设备落后或缺乏,方法标准与设备不配套等,屡次出现我农产品在国内未检出的有害残留成分却被国外检出现象。为增强我国农产品及食品在国际市场上的竞争力,打破国际贸易中的技术壁垒对我国出口农产品和食品的制约,急需建立快速、灵敏、特异的生物毒素和中毒控制中常见毒物的快速测定技术。由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所主持,军事医学科学院卫生学环境医学研究所、北京市营养源研究所、江苏省微生物研究所、扬州大学、青岛海洋大学、南京师范大学等单位参加的“生物毒素和中毒控制中常见毒物快速测定技术的研究”课题是国家“十五”科技攻关计划“食品安全关键技术”的资助项目,课题负责人李凤琴,课题研究周期 2002 年~2003 年,资助经费 170 万人民币,课题合同编号 2001BA804A14,2005 年 2 月 4 日通过科技部验收结题。

## 1 主要研究内容

- 1.1 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 酶联免疫吸附 (ELISA) 快速检测方法的建立、验证和 ELISA 试剂盒的研制。
- 1.2 河鲀鱼中河豚毒素 ELISA 快速检测方法的建立、验证和 ELISA 试剂盒的研制。
- 1.3 食品中伏马菌素 B<sub>1</sub> ELISA 快速检测方法的建立、验证、ELISA 试剂盒和免疫亲和柱的研制。
- 1.4 中毒控制中常见毒物快速检测技术研究

- 1.4.1 血、尿和中毒样品中有机磷残留酶抑制法快速测定技术及速测试剂盒的研发。
- 1.4.2 血、尿和中毒样品中砷、铅、汞、锰、甲醇、杂醇油、氰化物、硝酸盐、亚硝酸盐、桐油、铬、磷化物、组胺、敌鼠、生物碱、安妥、巴比妥、酸度等速测技术研究及光电比色计的研制。
- 1.4.3 血、尿和中毒样品中苯并(a)芘微柱管检测方法研究和新型微型荧光测定仪的研制。
- 1.4.4 毒物检测箱的研制。
- 1.4.5 快速检测方法与液相色谱、离子色谱、原子吸收光谱及薄层扫描方法的比对实验和现场验证。

## 2 研究目标

- 2.1 建立快速、灵敏、特异、适用于现场使用的定量测定食品中 AFB<sub>1</sub>、河豚毒素和伏马菌素 B<sub>1</sub> 的检测技术,形成一套完整的检测方法,报送国家标准管理部门审批公布。同时研制的检测 AFB<sub>1</sub>、河豚毒素和伏马菌素 B<sub>1</sub> 的 ELISA 试剂盒,满足基层现场检测需要。
- 2.2 研制中毒样品、血和尿中有机磷农药残留酶抑制速测卡及检测包,申请国家专利。研制中毒样品、血和尿中砷、铅、汞、氰化物、敌鼠、甲醇等毒物快速检测方法及便携式光电比色仪(完成样机)并申请国家专利。研制中毒样品、血和尿中砷、铅、汞、氰化物、敌鼠、甲醇、重金属、亚硝酸盐和硝酸盐等毒物检测箱,申请国家专利。

## 3 主要经济指标

- 3.1 生物毒素检测技术
  - 3.1.1 可获得具有部分或全部自主知识产权的检测 AFB<sub>1</sub>、河豚毒素及伏马菌素 B<sub>1</sub> ELISA 试剂盒,使我国的 AFB<sub>1</sub>、河豚毒素及伏马菌素 B<sub>1</sub> 的检测技术国内领先,并达到或接近国际先进水平。AFB<sub>1</sub> 和伏马菌素 B<sub>1</sub> ELISA 试剂盒投放市场后可在农场、粮库、食品生产企业、畜产部门、粮油食品进出口商、食

品卫生检验部门和现场监督中使用。河豚毒素 ELISA 检测试剂盒投放市场后可在水产捕捞、进出口商、水产加工部门、餐饮业、食品卫生检验部门和现场监督中使用。3 种生物毒素 ELISA 试剂盒市场需求量大,有广阔的应用前景,可产生直接的经济效益。

3.1.2 3 个试剂盒的研制和应用,为降低生物毒素污染食品,防止或降低食物中毒发生率,保护消费者的健康,降低医疗负担,打破国际贸易中的技术壁垒对我农产品的制约,提高我国农产品的出口创汇能力,维护我国的经济利益和在国际上的声誉提供技术支持,可产生巨大的社会效益和间接的经济效益。

3.1.3 由于用试剂盒检测生物毒素具有检验人员不直接接触毒素标准品、同时检验后的废弃物集中去毒处理、不污染环境等特点,具有明显的环保效益。

### 3.2 中毒控制中常见毒物快速检测技术研究

3.2.1 研制的农药酶抑制速测试剂卡、重金属速测试剂盒、硝酸盐和亚硝酸盐速测试纸及集成速测箱不仅可广泛应用于中毒控制、环境监测、农产品检验、出入境食品检验检疫、食品卫生检测、职业卫生中的毒物监测、基层医疗单位开展中毒检验和一些刑事案件的侦破等领域,而且可普及到千家万户并在条件许可的情况下走向国际市场,预期会取得极为可观的经济效益。

3.2.2 研制的农药酶抑制速测卡、重金属速测试剂盒及硝酸盐和亚硝酸盐速测试纸,可实现农产品在生产现场的及时检测,同时可使农民科学合理使用农药,减少粮、果、菜、茶及环境中的农药含量,促进我国无公害农产品的生产,具有明显的社会和环境效益。

3.2.3 研制出的毒物快速检测技术,可以有效地阻止被污染农产品流入各大农贸市场,同时可提高我国农产品的出口创汇能力,必将产生巨大的社会效益和经济效益。

3.2.4 让人民早日吃上放心菜、放心果、放心粮和喝上放心茶一直是党中央、国务院和各级人民政府的工作重点之一,因此,本课题的实施,可以为政府解忧,促进农业生产向“高产、高效、优质”方向发展,同时促进我国农业产业结构的调整和农业生产的可持续发展。

## 4 结果

4.1 建立了粮油食品中 AFB<sub>1</sub> 的 ELISA 检测方法并研制出相应的试剂盒 采用杂交瘤技术和体液免疫技术,分别获得了抗 AFB<sub>1</sub> 的单克隆和多克隆 2 个抗体,以此为基础分别建立了检测粮油食品中 AFB<sub>1</sub>

的 2 个 ELISA 方法,并成功地将科研成果转化成产业化产品,研制出 2 个具有我国自主知识产权的 AFB<sub>1</sub> ELISA 检测试剂盒,建立了 2 条 AFB<sub>1</sub> ELISA 试剂盒生产线,生产出的试剂盒均已投放市场,并在全中国卫生、农业、质检等部门广泛应用,产生了较大的社会和经济效益。

4.1.1 基于单克隆抗体基础上研制的试剂盒 在获得抗 AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体的前提下,建立了检测粮油食品中 AFB<sub>1</sub> 的 ELISA 方法,并上升为国家标准检测方法(GB/T 5009.22—2003),在此基础上研制出了百林(Brins)<sup>R</sup> AFB<sub>1</sub> ELISA 试剂盒,建立了一条年生产能力 2 000 盒的生产线。研制出的试剂盒具有以下特点。

**灵敏度高** 最低检出限为 2.5 pg,最低检出浓度为 0.01 μg/kg,标准毒素 50%抑制量为 3.2 μg/kg;检测线性范围为 0.1~20 μg/kg,国家制定的食品中 AFB<sub>1</sub> 的容许量标准恰好在检测线性区段范围内。最低检出浓度灵敏度比目前的国家标准检测方法薄层色谱法(5 μg/kg)提高了 500 倍;

**特异性强** 待测基质中存在的其它荧光物质、色素、AFB<sub>1</sub> 结构类似物等对检测结果无干扰。与 AFB<sub>2</sub>、AFB<sub>2a</sub>、AFG<sub>1</sub>、AFM<sub>1</sub> 等主要同系物间的交叉反应率为 0%~21%。

**回收率高** 对小麦、玉米、大米、花生、植物油等 5 类粮油食品进行的回收试验结果表明,在 1~50 μg/kg 添加水平的回收率和相对标准偏差范围分别为:玉米 83.0%~110.3%,RSD 为 1.7%~16.1%;大米 83.0%~110.0%,RSD 为 7.8%~12.8%;小麦 80.4%~104.0%,RSD 为 2.6%~12.9%;花生 91.5%~106.7%,RSD 为 3.5%~15.1%;植物油 95.5%~106.9%,RSD 为 3.1%~13.9%。

**省时、经济** 样品提取方法简便,操作步骤少,测定时间为 4 h,并可同时检测几十份样品。

**安全、环保** 由于 ELISA 法的灵敏度高,因此所需的 AFB<sub>1</sub> 标准溶液浓度很低(1 μg/kg),如此低浓度的毒素标准品对人体健康不会构成危害。实验过程中不使用有害的有机溶剂,实验废弃物不污染环境。

**应用范围广** AFB<sub>1</sub> 是国家强制性卫生检测指标,是各种粮油食品、饲料、中药中必检的重要污染物,因此本试剂盒可在卫生、质检、农业、药检行业、粮食等部门广泛使用。

**重复性和准确性好** 与其它化学方法比较,定量检测结果符合率高。

**性能稳定** 抗体效价在 4 条件下可稳定 1 年(活性保持在 90%以上),试剂盒 - 20 条件下保质期为 6 个月。

4.1.2 基于多克隆抗体基础上研制出的试剂盒的特点 在获得多克隆抗体的基础上,建立了检测粮油食品中 AFB<sub>1</sub> 的另一 ELISA 方法并备案企业标准 (Q/320000HL05—2003),在此基础上研制出了另一个 AFB<sub>1</sub> ELISA 检测试剂盒——苏微牌黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 酶联免疫测试盒。

试剂盒最低检出浓度为 0.1 μg/kg,检测时间为 1.5 h。

检测重复性为  $RSD < 9.5\%$ ,检测范围 0.1 ~ 10 μg/kg。

在 1 ~ 10 μg/kg 添加水平范围内的回收率为 75% ~ 98%,试剂盒有效期为 6 个月(2~8 保存)。

检测结果与 TLC 和 HPLC 方法检测结果比较差异无显著性。

建立了一条年产量 1.5 万盒的生产线,实现了产业化生产。仅 2002 年销售收入就达 264.9 万元,利润 93.6 万元,计缴税金 84.3 万元。2003 年销售收入 317 万元,利润 115.7 万元,计缴税金 99.2 万元。新增就业人员 8 人,培养 ISO 内审员 2 名。

4.1.3 成果的先进性 2 个试剂盒的研制成功,打破了我国快速检测粮油食品中 AFB<sub>1</sub> 一直依靠进口 ELISA 试剂盒的现状,替代了价格昂贵的进口同类产品,降低了检测成本,解决了目前国家标准检测方法——薄层色谱法灵敏度低(5 μg/kg)、误差大的不足,

同时弥补了气(液)相色谱法和放射免疫法等仪器法需昂贵的仪器设备、操作繁琐、对检测人员技术要求较高、检测中因使用毒素标准品危害操作者健康、实验废弃物污染环境、不能满足大批量样品处理和现场检验的需求、难于在基层普遍推广等缺点,并成为与 AFB<sub>1</sub> 国家标准技术体系配套使用的检测试剂盒。2 个试剂盒经 3 家单位对 2 个水平 5 个重复的回收率实验,再现性、重复性、校准曲线、线性、检测限等指标进行了验证,结果均符合要求。同时用免疫亲和柱荧光光度法、HPLC 和 ELISA 试剂盒对盲样和自然样品中 AFB<sub>1</sub> 的含量进行了分析对比,结果显示,与免疫亲和柱荧光光度法一样,ELISA 试剂盒对盲样 AFB<sub>1</sub> 的检测结果在标示范围内,而与 HPLC 检测自然样品中 AFB<sub>1</sub> 的结果差异无显著性。

4.1.4 与国内外同类产品的比较 国内除了本项目研制的 2 个 AFB<sub>1</sub> ELISA 检测试剂盒外,市场上未见到其它商品化的国产同类产品。目前进口的同类产品有美国 Neogen 公司、Romer 实验室和德国拜发公司的产品。本项目产品与上述 3 个国际公司同类产品各项性能指标比较见表 1。由表 1 可见,我们的产品在定量检测范围、检测限、可分析的食品种类、回收率、保质期等重要关键指标上均达到了国际同等水平,而在质量相同的情况下,价格低廉是本项目产品的一大优势,零售价不到国际同类产品的 1/4。

表 1 本课题研制的 AFB<sub>1</sub> 检测试剂盒与国际同类产品比较

商品名称	百林(Brins) <sup>R</sup>	苏微 <sup>R</sup>	Veratox <sup>R</sup>	Ridascreen <sup>R</sup>	AgraQuam <sup>R</sup>
生产公司	北京百林康源生物技术有限责任公司	江苏省微生物研究所	Neogen Co.	R-Biopharm GmbH	RomerLabs Inc.
技术原理	间接竞争 ELISA	直接竞争 ELISA	ELISA	直接竞争 ELISA	直接竞争 ELISA
ELISA 分析时间(min)	240	90	5	15	20
定量检测范围(μg/kg)	0.1 ~ 20.0	0.1 ~ 10.0	5 ~ 50	1.7 ~ 45.0	4 ~ 40
最低检出浓度(μg/kg)	0.01	0.1	1	1.7	1
滤光片(nm)	450	450	650	450	450
保质期(年)	1	<1	<1	<1	1
可分析的粮油食品	建立方法并经回收验证: 小麦、玉米、花生、植物油、大米 建立方法未经回收验证: 各种饲料;中药材及成药;其它食品及原料	玉米、玉米粉、玉米发酵粉、玉米麸粉、玉米/大豆混合粉、棉籽、棉籽粗粉、买罗高粱、生花生、炒花生、花生酱、花生粉、宠物口粮、爆米花、大米、大豆粉、胡桃和小麦	玉米、玉米粉、玉米发酵粉、玉米麸粉、玉米/大豆混合粉、棉籽、棉籽粗粉、买罗高粱、生花生、炒花生、花生酱、花生粉、宠物口粮、爆米花、大米、大豆粉、胡桃和小麦	玉米、小麦、大麦、燕麦和花生	玉米、玉米粉、大米粉、高粱、玉米/大豆混合粉、棉籽、花生、爆米花、玉米麸粉和大豆
回收率 %	80 ~ 120	75 ~ 98		80 ~ 100	85 ~ 120
价格(RMB)	1000	800	>4650	4466	4650

4.2 河豚鱼中河豚毒素(TTX) ELISA 检测方法的建立和试剂盒的研制 在获得抗 TTX 单克隆抗体的基础上,建立了检测河豚鱼中 TTX 的直接、间接 ELISA 方法。间接法的最低检出浓度为 1 ng/ml,线性范围 10~1 000 ng/ml,在 50~1 000 ng/g 范围内的加标回收率为 73.8%~117.4%,平均回收率为 96.4%;而直接法的最低检出浓度为 0.1 ng/ml,线性范围为 5~500 ng/ml,在 10~1 000 ng/g 范围内的加标回收率为 73.0%~118.0%,直接法优于间接法,因此研制出了基于直接法的 TTX ELISA 检测试剂盒,而 TTX 直接 ELISA 检测方法已被批准为国家标准检测方法不久将颁布。

4.2.1 TTX ELISA 检测试剂盒主要技术指标和特点 包被抗原(TTX-BSA)和酶标抗体最佳工作浓度分别为 50 ng/ml 和 1 3.2 万。

酶标抗体与标准品(或样品)预先混合过夜后加入酶标板同二者无需混合过夜直接加入酶标板的检测结果无差异。考虑到现场检测的可操作性,建议将酶标抗体与标准品(或样品)于实验当天直接加入酶标板内。

校正曲线线性范围为 5~500 ng/ml。

重复性实验结果显示,  $RSD < 20\%$ 。

包被抗原在 37℃ 下可稳定 7 d 以上,常温下稳定半年以上。

抗 TTX 单克隆抗体在有 0.250 mol/L 海藻糖存在时,室温下可稳定 1 年以上。

测试盒为 96 孔酶标板,反应孔可拆卸,可测单份样品,亦可测多份样品,每次检测完毕后剩余试剂放于 4℃ 保存可使用 1 个月;

最低检出浓度为 0.1 ng/ml (1 ng/g)。

按 TTX 人体中毒量为 0.5~1 mg 计算,本试剂盒的灵敏度完全可以检测引起人体中毒剂量的 TTX 水平,满足实际工作需要,且具有快速、灵敏、操作简单、省时、检验所需的样品量小(10 g 以下)、对鱼体完整性的破坏较小、不影响受检河豚鱼的商业价值、样品前处理简单、无需复杂的柱层析净化过程、不需要特殊设备,便于现场监测等特点。3 家单位对 2 个水平 5 个重复的回收率实验,再现性、重复性、校正曲线、线性、检测限等相关指标进行了验证,结果均符合要求。同时进行了小鼠生物试验法、HPLC 和 ELISA 3 种方法检测 TTX 的对比试验,结果表明直接 ELISA 法与小鼠生物试验法检测结果符合良好,经配对  $t$  检验,两两之间在统计学上差异无显著性 ( $P > 0.1$ ),2 种方法检测结果的相关系数为 0.944。此外,HPLC 与 ELISA 2 种方法的检测结果也高度相关,相关系数为 0.9406。但 ELISA 法测定的数值一

般高于小鼠法和 HPLC 法,因此用 ELISA 方法进行河豚鱼中 TTX 检测更安全可靠。

4.2.2 试剂盒应用 用所研制的试剂盒对国产可食河豚鱼种东方鲀的带毒状况进行了调查,其中肝脏 TTX 检测结果见表 2。由表 2 可见,尽管同是东方鲀属,但肝脏毒力差别很大,平均毒力范围 2.8~101.0 MU/g,带毒率范围 0%~100%。肝脏最大毒力属于无毒的品种是红鳍东方鲀,属于弱毒的是黄鳍东方鲀、铅点东方鲀和紫色东方鲀,属于强毒的是横纹东方鲀、假睛东方鲀、墨绿东方鲀、暗纹东方鲀、双斑东方鲀、菊黄东方鲀和虫纹东方鲀。从无毒到强毒的东方鲀属鱼类中,各品种不同个体间毒力的差别也很大,如暗纹东方鲀的肝脏毒力最大值为 233.1 MU/g,而最小值为 0,变异范围为 47.1%~326.2%;虫纹东方鲀的最大值与最小值的差别高达 1 300 倍。研制出的试剂盒已应用于突发性公共卫生事件食物中毒原因调查中。自 2002 年至今,用该试剂盒对几十份导致人类中毒的河豚鱼样品进行了检测,为河豚鱼中毒的快速诊断和病人的及时治疗提供了技术支持。

表 2 东方鲀属常见河豚鱼的肝脏毒力 MU/g

	样本量	平均值	标准差	变异系数数(%)	最大值	带毒率(%)
红鳍东方鲀	8	2.8	3.0	106.0	8.3	0.00
铅点东方鲀	2	71.3	33.5	47.0	95.0	100.00
双斑东方鲀	6	67.2	86.1	128.2	227.3	66.67
黄鳍东方鲀	82	2.8	7.5	264.6	45.5	9.64
假睛东方鲀	21	17.2	56.1	326.2	255.6	19.05
虫纹东方鲀	44	101.0	163.4	161.9	672.3	54.55
菊黄东方鲀	21	91.5	152.5	166.6	454.5	52.38
横纹东方鲀	22	12.3	27.8	225.6	106.6	22.73
暗纹东方鲀	24	58.1	77.7	133.6	233.1	50.00
紫色东方鲀	1				81.6	100.00
墨绿东方鲀	4	46.3	92.6	199.9	185.2	25.00

4.2.3 成果的先进性 本研究成果填补了国内缺乏快速灵敏检测 TTX 方法和装置的空白,目前国内市场上未见有商品化进口和国产同类产品。研制的试剂盒对食品监督检验机构现场监测、食品生产企业自检、餐饮业餐前检验意义非常,可为避免禁止鲜售河豚造成的资源浪费、预防河豚鱼中毒、保障消费者的健康提供重要技术保障,具有很好的推广价值。其中“TTX ELISA 检测方法及其可食鱼种筛选的研究”作为“食品中残留物监测技术研究”内容的一部分,2003 年获中华医学科技进步三等奖。

4.3 伏马菌素 B<sub>1</sub> 免疫检测方法和装置的研究

4.3.1 伏马菌素 B<sub>1</sub> ELISA 检测方法的建立和试剂盒的研制 在获得抗伏马菌素 B<sub>1</sub> 单克隆抗体的基础上,建立了检测伏马菌素 B<sub>1</sub> 的间接竞争性 ELISA 方法,方法的最低检出浓度为 5 ng/ml,50%抑制浓度为 138.95 ng/ml,线性范围 20~500 ng/ml。同时建立了以甲醇+水(80+20)为提取溶剂从粮食中提取伏马菌素 B<sub>1</sub> 的简单方法,在 50、200 和 500 ng/ml 水平的加标回收率范围为 75.24%~117.65%,平均回收率 101.1%,相对标准偏差 9.71%~15.66%,平均相对标准偏差为 11.96%,并在此基础上研制出伏马菌素 B<sub>1</sub> ELISA 试剂盒。试剂盒分 3 种规格:24 孔、48 孔和 96 孔。反应孔可拆卸,可测单份样品,亦可测多份样品,每次检测需要 6 个标准孔(定量测定),若半定量测定则只需要 2 个标准孔,试剂盒批内 RSD < 10%,批间 RSD < 15%。

此外进行了免疫亲和层析柱荧光光度法、HPLC 和 ELISA 3 种方法检测盲样和自然样品中伏马菌素

B<sub>1</sub> 的对比试验,结果显示,与免疫亲和柱荧光光度法一样,ELISA 试剂盒对盲样中伏马菌素 B<sub>1</sub> 检测结果在标示范围内,而与 HPLC 检测结果差异无显著性。

4.3.2 试剂盒的应用 用研制的试剂盒对广东、广西、湖南、湖北 4 省 2003 年产的玉米、大米样品进行了检测,结果表明,32 份玉米样品中均检出伏马菌素 B<sub>1</sub>,阳性率为 100%,含量在 0.59~12.64 μg/g 范围内;29 份大米样品中 12 份伏马菌素 B<sub>1</sub> 阳性,阳性率为 37.9%,含量范围 0.41~1.37 μg/g。此外还对来自黑龙江、安徽、新疆 3 省的玉米样品进行了检测,结果在 156 份玉米中,34 份(21.79%)检出伏马菌素 B<sub>1</sub>,毒素含量范围 0.18~31.32 μg/g。

4.3.3 国内外伏马菌素 B<sub>1</sub> ELISA 检测方法各项技术指标比较 所建 ELISA 检测方法与国际同类方法的比较见表 3。由表 3 可见,试剂盒各项指标均达到国际同等水平。

表 3 ELISA 检测伏马菌素 B<sub>1</sub> 各项技术指标比较

国家	研究者	抗体	方法	检测范围	最低检出限
美国	Azconar-Olivera	PcAb	间接竞争法	—	0.1 μg/ml
日本	Satoshi Fukuda	McAb	酶标抗原直接竞争	0.5~5 μg/ml	0.5 μg/ml
美国	Chu F. S	PcAb	—	—	10 ng/ml
美国	Chu F. S	McAb	—	—	50 ng/ml
中国	本研究方法	McAb	酶标抗体直接竞争	5~5000 ng/ml	5 ng/ml

注:“—”表示作者发表的文章中未交待该项指标

4.3.4 伏马菌素 B<sub>1</sub> 免疫亲和柱的研制 以单克隆抗体为基础研制出的用于粮食中伏马菌素 B<sub>1</sub> 前处理的免疫亲和柱的主要技术参数。

柱凝胶 琼脂糖凝胶,单克隆抗体偶联于琼脂糖凝胶。

柱容量 每支免疫亲和柱含抗体 3.06 mg;伏马菌素 B<sub>1</sub> 上样 10 μg 时柱吸附率为 100%;上样 15 μg 时的吸附率降为 90.90%。

洗脱条件 20%、40% 甲醇不能将结合在亲和柱上的伏马菌素 B<sub>1</sub> 洗脱下来,60%、80% 甲醇也只能洗脱少量伏马菌素 B<sub>1</sub>,100% 甲醇可将伏马菌素 B<sub>1</sub> 完全洗脱。

使用次数 用甲醇洗脱后的亲和柱马上用 PBS 缓冲液再生,4 保存条件下可重复使用 3 次以上。

有效期 制备好的免疫亲和柱于 PBS 缓冲液中 4 保存,6 个月后依然保持良好活性。

回收率 90%。

流速 1 滴/s,最大使用体积 1 ml。

#### 4.4 中毒控制中常见毒物快速测定技术的研究

4.4.1 20 种毒物快速检测方法研究 本研究依据国家标准方法或国际最新研究进展,并结合现场条件进行简化和改良,建立了一套完整的快速检测食品和中毒样品中亚硝酸盐、甲醇、桐油、磷化物、氰化物、敌鼠、杂醇油、组胺、锰、砷、有机磷农药、苯并(a)芘、酸度、生物碱、巴比妥、安妥、铅、汞、镉、硝酸盐 20 种指标的方法。其中对亚硝酸盐、甲醇、桐油、磷化物、氰化物、敌鼠、杂醇油、组胺、锰、有机磷农药、酸度、铅、汞、硝酸盐等 14 个指标可以实现定量检测。所建方法适应范围广,可对包括普通食品、中毒样品、生物样本(血、尿等体液和生物组织)等诸多样品中的毒物进行检测。

4.4.2 智能型微型光电检测仪和光反射传感器的研制 自行设计研制出与检测上述毒物配套使用的灵敏、稳定、可靠的多功能智能型光电检测仪。光电检测仪具有体积小(大小为 160 mm × 110 mm × 30 mm)、重量轻(包括电池在内仅 0.4 kg)、精密度和灵敏度达到 721 分光光度计水平(灵敏度 > 4.5 × 10<sup>-3</sup>、准确度 ±0.5%)、结果的重复性好、可在 0~40 环境中使用、比色池口径为 12 mm × 12 mm × 30

mm、携带方便、操作简便、实验室内和现场均可使用(可使用6V稳压电源或4节5号碱性电池,工作电流100mA)、特别适应于现场检测等特点。在本研究建立的20种毒物快速检测方法中,光电检测仪可与包括亚硝酸盐、甲醇、桐油、磷化物、氰化物、敌鼠、杂醇油、组胺、锰等在内的9种毒物快速检测方法配套使用以实现定量测定。

此外,将检测试纸法的试剂固定化技术与光反射传感器技术联用,研制出用于多种毒物(如有机磷、铅、汞、镉、硝酸盐等)检测的光反射传感器,从而使检测更加灵敏、准确、快速、简便,实现了定量数字化,为及时、准确判断中毒原因,加强食品卫生管理,进行现场监督检验提供了技术支持。

4.4.3 毒物检测箱的设计与加工组装 在建立20种毒物快速检测方法的基础上,根据方法所使用的试剂、器具以及方便现场操作要求等,经过多方案的设计、加工、比较,组装出以铝合金材料做箱体、类似手提式公文箱型、内部配有活动支架、并对某些测定项目采用试纸盒形式、方便检测者使用、特殊器具采取定做和自制相结合的1型和2型两种毒物检测箱,1型为检测方法与智能型微型光电比色计联用,2型为检测试纸与光反射传感仪联用。1型毒物检测箱

大小为45.7cm×33.4cm×14cm,2型大小为35cm×25cm×12cm,每个检测箱重为4kg。箱盖内侧用浅蓝色布料帖饰,并缝制有一定规范的装具袋,以便组装器件的定位。根据玻璃器具易碎的特点,选用防潮、防震、耐腐蚀材料并进行分隔定位,防止了组件之间互相磨损。

4.4.4 成果的先进性和与国内外产品的比较 本研究建立的20种毒物的前处理和快速检测方法可快速完成蔬菜和粮食中农药残留、酒中甲醇、食用油中的桐油、肉制品中亚硝酸盐及多种食品中的重金属、氰化物、鼠药等检测,应用范围不仅涵盖了日常生活中的大多数食品,更为可贵的是也适应于各类中毒样品(包括血、尿、生物组织等生物样品)中有毒物质的检测。所建方法具有灵敏、快速的特点,检测结果与国标法相比差异无显著性( $P > 0.05$ )、但检测时间较国标法缩短50%以上,检测成本降低60%~99%,现场样品检测可在1.5h内出结果,20种毒物快速检测方法各项指标与国标法的比较见表4。本研究成果将检测方法与智能化微型光电检测仪和光反射传感器配套使用从而实现中毒食品的现场自动化快速定量检测,在国内尚未见文献报道。

便携式智能化微型光电检测仪和光反射传感器

表4 20种毒物快速检测方法的有关指标

被测物	测试时间		最低检出限	回收率范围(%)	RSD(%)	检测费用比较(RMB,元)	
	本法	国标法				本法	国标
亚硝酸盐	30min	4h	0.16mg/kg	76~85	8.83	4.0	40.0
甲醇	50min	8h	0.004g/100ml	94~105	1.2~5.6	6.0	50.0
桐油	20min	20min	1.0g/kg	85~102	6.9	2.0	30.0
磷化物	1h	12h	0.02mg/kg	85~95	7.9	6.0	100.0
氰化物	1h	12h	0.5mg/kg	84~106	5.7	6.0	100.0
敌鼠	30min	4h	0.025g/kg	80~102	3.5~9.6	4.0	40.0
杂醇油	20min	2h	0.002g/100ml	80~84	4.5~5.6	4.0	40.0
组胺	30min	1h	0.7mg/100g	85~102	5.5	4.0	40.0
锰	40min	6h	0.5mg/L	79~99	7.5	4.0	40.0
砷	30min	6h	0.2mg/kg	75	6.6~7.1	6.0	100.0
苯并(a)芘	1h	12h	0.002μg	69~83	7.9~13.0	10.0	200.0
铅	40min	6h	2.0mg/L	—	4.1	10.0	100.0
汞	40min	6h	0.1mg/kg	97~103	3.5	10.0	100.0
镉	40min	6h	0.5mg/L	95~100	—	10.0	100.0
硝酸盐	1.5h	12h	0.2mg/L	83~91	2.5~3.7	10.0	80.0
巴比妥	15min	30min	40μg	—	—	2.0	20.0
酸度	30min	40min	—	—	5.9	1.0	5.0
生物碱	15min	15min	$10^{-3} \sim 10^{-7}g$	—	—	1.0	20.0
安妥	20min	30min	0.02mg/ml	—	—	2.0	20.0
有机磷	40min	6h	0.05mg/L	81~115	—	10.0	150.0

注:“—”无该项指标。

的研制,克服了其它类型的分光光度计结构庞大,无法适应现场检测的缺憾。国外多见有单项的卫生检测仪器法研究,主要是对高效液相色谱仪、气相色谱仪、原子吸收仪及其它仪器分析方法在食品卫生检测中的应用研究,均属实验室仪器方法的改进,不能用于现场检测;国内也有一些小型光电检测仪的研究,但这些检测仪需在实验室进行,且没有与食品卫生检验指标相结合。2个仪器的研制,使检测快速、准确,提高了工作效率,经文献检索国内外未见光电检测仪及光反射传感器进行食品中毒物快速检测的报道,属国内领先。

集检测方法、器材、试剂、检测试纸与光反射传感器联用、微型检测仪组合为一体的携带方便、科学合理、便于现场使用的毒物检测箱的研制,必将为食品监督管理部门在现场及时、准确地判断食品是否卫生安全、全面提升我国食品卫生监督检测能力,预防和现场处理重大食品污染、食物中毒、食品安全恐怖事件和其它突发性公共卫生事件提供技术支持,整体水平处于国内领先地位,国内外尚未发现与该成果相同的装备。

## 5 项目取得的成果及成果转化

研制出了检测 AFB<sub>1</sub> 的 2 个 ELISA 试剂盒并商品化生产,建立了 2 条 AFB<sub>1</sub> ELISA 试剂盒生产线,一条年产量 1.5 万盒,另一条年产量 2 000 盒,所生产的试剂盒已在全国卫生、农业、质检等食品监督检验部门使用。在全国的“毒大米事件”、“陈化粮事件”、每年的“3.15”活动以及各大部委组织的食品安全相关活动中发挥作用。

产生了 1 项国家标准 (GB/T 5009.22—2003) 和 1 项企业标准 (标准号为 Q/320000HL05—2003)。

在国内率先研制出检测河鲈鱼中 TTX 的 ELISA 检测试剂盒并用于食物中毒预防控制中。

在国内率先研制出检测粮食中伏马菌素 B<sub>1</sub> 的 ELISA 检测试剂盒并用于实践。

自行设计研制出多功能智能化微型光电比色计和光反射传感器。

建立了 1 套较完整的用于现场快速检测食品和中毒样品中 20 种毒物的方法,并将检测方法与多功能智能型微型光电比色计和光反射传感器配合使用,从而达到现场智能化和自动化快速定量检测。

研制出用于中毒现场使用的毒物检测箱,建立了年产量 2 000 套的毒物检测箱生产线;该检测箱目前已在军队和地方的食品生产企业、超市、大中小学校食堂、宾馆饭店等数百家单位应用,在全国若干次食物中毒事件中中毒原因调查和抢救中毒人员,保

障“两会”和“神舟”系列飞船全体参试人员的饮食安全中发挥了重要作用。

申请专利 5 项,现已批准 2 项。

获奖 2 项。其中“AFB<sub>1</sub> 酶联免疫法检测技术研究及试剂盒开发”2003 年度获无锡市科技进步三等奖,而“TTX ELISA 检测方法、高效液相检测方法及可食鱼种筛选的研究”和“AFB<sub>1</sub> ELISA 检测方法及粮食中污染状况调查的研究”2 部分内容作为“食品中残留物监测技术研究”项目的一部分,2003 年获中华医学科技进步奖三等奖。

从课题实施至验收,在国内外杂志上共发表文章 28 篇。

## 6 发表文章

在国内外杂志、书籍上发表与该课题内容相关的文章有:

- (1) 李凤琴. 真菌毒素分析及质量控制[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(5): 265-272.
- (2) 李凤琴. 真菌毒素的污染[A]. 见:吴永宁,主编. 现代食品安全科学[C]. 北京:化学工业出版社, 2003, 279-327.
- (3) 郑铁松,钟文辉. 高效液相色谱法测定食品中的伏马菌素[J]. 食品科学, 2004, 24(3): 135-138.
- (4) 郑铁松,钟文辉. 柱前衍生-HPLC 法测定食品中的伏马菌素[J]. 食品工业科技, 2004, 25(10): 133-135.
- (5) 黄金林,焦新安,王丽丽,等. 应用间接竞争抑制酶联免疫吸附试验检测 TTX[J]. 中华医药杂志, 2004, 4(10): 872-873.
- (6) 李世平,焦新安,黄金林,等. TTX 两种定量检测方法的比较研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2004, 25(2): 58-60.
- (7) 崔建洲,宫庆礼,顾谦群. 一种高效制备 TTX (TTX) 方法的研究[J]. 高技术通讯, 2005(已接受).
- (8) 宫庆礼,崔建洲,刘明,等. 运用 HACCP 方法对河鲈鱼安全食用的管理[J]. 中国水产, 2003, 2: 72-75.
- (9) 宫庆礼,崔建洲,黄海龙,等. 河鲈鱼的安全食用研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(4): 346-348.
- (10) 宫庆礼,黄海龙,崔建洲. 河鲈鱼毒素的色谱检测[J]. 水产养殖, 2002, 1: 17-18.
- (11) 龚燕,蔡建荣,赵晓联,等. ELISA 法检测红曲中的 AFB<sub>1</sub> [J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(4): 10-12.
- (12) 蔡正森,钟文辉,张东升,等. ELISA 法和 HPLC 法检测粮油食品中 AFB<sub>1</sub> 含量的比较研究[J]. 中国

卫生检验杂志, 2004, 14(3):302-304.

(13) 龚燕, 赵春城, 张东升, 等. ELISA 法检测五类食品中 AFB<sub>1</sub> 前处理方法的改进研究[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4):82-84.

(14) 赵春城, 赵晓联, 蔡正森. 有机相萃取法消除 ELISA 检测 AFB<sub>1</sub> 假阳性的研究[J]. 饲料工业, 2003, 24(3):40-43.

(15) 路茂林, 蔡建荣, 赵晓联, 等. 标记免疫技术在食品分析中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(1):60-62.

(16) 房彦军, 周焕英, 杨伟群, 等. 试纸—光电检测仪快速测定食品中亚硝酸盐的研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(1):18-21.

(17) 方邢有, 高志贤. 食品中污染物快速检测方法的进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(2):254-256.

(18) 王红勇, 高志贤, 房彦军, 等. 污染食品中桐油的快速检测法研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(6):714-715.

(19) 王民, 糜漫天, 高志贤. 食品中镉的快速检测方法研究[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(7):640-642.

(20) 周焕英, 高志贤, 崔晓亮. 试纸法在食品、水质及其它快速检测中的应用[J]. 解放军预防医学杂志, 2003, 21(2):148-151.

(21) 王宗贤, 高志贤, 马成林. 有机磷检测方法的研

究进展[J]. 中国卫生检验杂志. 2003, 13(4):401-403.

(22) 高志贤, 晋晓勇, 房彦军. 流动注射分析技术及其在食品分析中的应用[J]. 卫生研究, 2003, 32(1):78-80.

(23) 周焕英, 高志贤, 房彦军, 等. 试纸—光电检测仪检测法快速定量测定铅[C]. 2003 天津市食品科技论坛暨天津市食品学会第六届年会论文集 2003, 7-9.

(24) 王红勇, 高志贤. 污染食品中敌鼠的快速检测法研究[C]. 2003 天津市食品科技论坛暨天津市食品学会第六届年会论文集, 2003, 9-11.

(25) 房彦军, 高志贤, 周焕英, 等. 试纸—光电检测仪法快速测定食品中亚硝酸盐的研究[C]. 天津市食品科技论坛暨天津市食品学会第六届年会论文集, 2003, 11-13.

(26) 晋晓勇, 高志贤, 陈慧. 压电生物传感器及其研究进展[J]. 生命的化学, 2002, 22(4):385-387.

(27) 王红勇, 高志贤, 陶贵全, 等. 白酒中甲醇的简易检测法研究[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(6):740.

(28) Yan-Jun Fang, Hui Chen, Zhi-Xian, et al. Flow injection determination of nitrite in food samples by dialysis membrane separation and photometric detection [J]. Intern J Environ Anal Chem, 2002, 82(1):1-6.

[收稿日期:2005-06-06]

中图分类号:R15 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2005)04-0294-09

请登录“食品安全快速检测网”<http://www.bjzw.com>

寻找你需要的食品安全快速检测方法与设备



中卫牌



## 食品安全快速检测箱

◀中卫牌“食品安全快速检测箱”,由中国疾病预防控制中心营养与食品安全所研制、北京中卫食品卫生科技公司出口

◀40多种快速检测项目,最慢的不超过30分钟出结果

◀新产品:苏丹红快速检测盒、甲醇速测盒、蜂蜜速测设备

◀本公司以严谨的科学态度,强烈的社会责任感,赢得全国众多使用单位的信赖

<http://www.bjzw.com>

网址是“北京中卫”汉语拼音第一个字母的缩写

北京中卫食品卫生科技公司

电话:010-67731470,67791293

地址:北京市朝阳区潘家园南里7号

传真:010-87714803

邮编:100021

E-mail:bjzw@vip.163.com

广告