

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

王 晶<sup>1</sup> 张 鹏<sup>2</sup> 张艺兵<sup>2</sup> 王 雄<sup>3</sup>

(1. 国家标准物质研究中心,北京 100013;2. 青岛出入境检验检疫局,山东 青岛 266002;3. 北京中检维康技术有限公司,北京 100044)

**摘 要:**为检测酱油和醋中黄曲霉毒素的含量,建立了免疫亲和层析净化荧光光度法。试样由甲醇-水提取,提取液被过滤、稀释后,上交联着黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 特异抗体的免疫亲和层析柱净化。以甲醇通过免疫亲和层析柱洗脱,溴溶液衍生,荧光光度计测定衍生物的黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量。酱油和醋中检出限分别为 2.5 μg/kg 和 1 μg/kg。添加回收率在 85 %以上。该方法准确、简单、快速、安全。

**关键词:**分光光度法;黄曲霉毒素类;调味品

Determination of aflatoxins in soy sauce and vinegar by fluorometry coupled with immunoaffinity column

Wang Jing, et al.

(National Research Center for Certified Reference Materials, Beijing 100013, China)

**Abstract:** Aflatoxins in soy sauce and vinegar were determined by a fluorometric method after cleaned-up by immunoaffinity column. The samples were extracted with CH<sub>2</sub>OH-H<sub>2</sub>O and then filtered, diluted with water, and cleaned up by an immunoaffinity column containing monoclonal antibody specific for aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>. After washing with CH<sub>2</sub>OH to remove aflatoxins from attached antibodies, the total aflatoxins (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>) were reacted with bromine solution (SFB) and determined immediately by fluorometry. The detection limits for soy sauce and vinegar analysis reached 2.5 μg/kg and 1.0 μg/kg respectively. And the recoveries are more than 85 %. This method is accurate, simple, rapid and safe.

**Key Words:** Spectrophotometry; Aflatoxins; Condiments

1993 年,世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构把黄曲霉毒素划定为 Ⅰ类致癌物。由于黄曲霉毒素与环境因素密切相关,是一种天然的毒素,普通的食物处理方法不会减少黄曲霉毒素的含量,因此国际上对黄曲霉毒素的限量要求也日益严格,规定了黄曲霉毒素含量的限量国际标准。

目前我国传统的黄曲霉毒素分析一般采用薄层色谱(TLC)法、高效液相色谱(HPLC)法,还有酶联免疫吸附法(Enzyme linked immunosorbent assay ELISA)。为了减少样品前处理的操作繁琐、复杂和缩短处理时间,目前国际上普遍采用免疫亲和层析柱(Immunoaffinity Column, IAC)净化方法。免疫亲和层析净

化荧光光度法(IAC/SFB法)具有分析快速简便的特点,一个样品只需 10~15 min,能达到定量准确又快速的要求。<sup>[1-3]</sup>目前还没有采用免疫亲和层析净化荧光光度法快速测定酱油和醋中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量的报道。本文介绍一个免疫亲和层析净化,荧光光度法快速测定酱油和醋中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量的方法。

1 理论部分

试样由甲醇水提取,提取液经过过滤、稀释后,过键合有黄曲霉毒素特殊抗体的免疫亲和柱净化,

本课题为中国国家标准化管理委员会国家标准制修订规划工作[2001](B-424-2001-043, B-424-2001-044)

作者简介:王晶 女 高工

This work was the part of Formulate and Revise Program of the National Standards of the Standardization Administration of China[2001]. (B-424-2001-043, B-424-2001-044).

此抗体对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 具有专一识别能力,黄曲霉毒素键合在分离柱中的抗体上。用蒸馏水将免疫亲和柱上杂质除去,以甲醇通过免疫亲和柱洗脱,加入溴溶液衍生,以提高测定灵敏度。荧光光度计测定洗脱液中的黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量。

2 材料与方法

2.1 试剂

除特殊说明外,试剂为分析纯,水为重蒸馏水。  
甲醇(CH<sub>3</sub>OH) 色谱级。0.05 mol/L 硫酸 取 2.8 mL 浓硫酸,缓慢加入适量水中,冷却后定容至 1 000 mL。磷酸盐缓冲溶液(pH7)。硫酸奎宁(C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)。吐温-20/PBS 溶液(0.1%)。溴储备液(0.01%) 称取适量溴,溶于水,配成 0.01%的储备液,避光保存。溴水使用液(0.002%) 取 10 mL 0.01%的溴溶液加入 40 mL 水混匀,于棕色瓶中保存备用,需现用现配。荧光光度计校准溶液 称取 3.40 g 硫酸奎宁(C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O)用 0.05 mol/L 硫酸溶液稀释至 100 mL,此溶液荧光光度计读数相当于 20 μg/L 黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)标准溶液。

2.2 主要仪器

荧光光度计,高速均质器,玻璃纤维滤纸(直径 11 cm,孔径 1.5 μm),免疫亲和柱,内含单株抗体对黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub> 具有专一性,玻璃试管(12 mm ×75 mm,无荧光特性),均为美国 Vicam 公司。

2.3 试样提取方法

2.3.1 酱油 称取试样 50.0 g 于 250 mL 具塞锥形瓶中,加入 2.5 g 氯化钠及甲醇 - 水(8 + 2)至 100 mL,以均质器高速搅拌提取 1 min。过滤,移取 10.0 mL 滤液并加入 40.0 mL 水稀释,用玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,至滤液澄清,备用。

2.3.2 食醋 称取 5.0 g 试样,加入 1.0 g 氯化钠,以 pH 的磷酸盐缓冲溶液稀释至 25 mL,混匀,过滤。取 10.0 mL 滤液加入 10.0 mL 缓冲液,混匀。以玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次,直至澄清,备用。

2.4 净化方法

将免疫亲和柱连接于 20 mL 玻璃针筒下。准确移取 10 mL 试样滤液过免疫亲和柱,用 10 mL 0.1%的吐温-20/PBS 清洗。再以 10 mL 水清洗柱子 2 次,弃去全部流出液,并使 2~3 mL 空气通过柱体。准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱液洗脱,流速为 1~2 mL/min,收集全部洗脱液于玻璃试管中,供检测用。

2.5 测定方法

2.5.1 荧光光度计校准

在激发波长 360 nm,发射波长 450 nm 条件下,以 0.05 mol/L 硫酸溶液为空白,调节荧光光度计的荧光强度值读数为 0.0;以校准溶液调节荧光光度计的荧光强度值读数为 20.0。

2.5.2 样液测定

取上述洗脱液加入 1.0 mL 0.002%溴溶液,混匀,静置 1 min,按 2.5.1 条件进行操作,立即从荧光光度计上读取试样甲醇洗脱液中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)的浓度。同时用水进行空白试验。

2.6 结果计算

检测结果按下列公式计算,计算结果需扣除空白值。

$$X = \frac{(c - c_0) \cdot V}{W}$$

式中: X—试样中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量,μg/kg; c—试样中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)的含量,μg/L; c<sub>0</sub>—空白试样中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)的含量,μg/L; V—最终甲醇洗脱液体积,mL; W—最终净化洗脱液中所含的试样质量,g。

3 结果与讨论

3.1 最小检出限

在上述分析条件下,免疫亲和荧光光度法测定酱油和醋中的黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量,检出限分别为 2.5 μg/kg 和 1 μg/kg。

3.2 准确度和精密度

分别对酱油和醋进行 3 个水平浓度添加回收率

表 1 免疫亲和柱荧光光度法测定酱油中黄曲霉毒素(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量的回收率和精密度 %

| 添加浓度<br>μg/kg | 实测值<br>μg/kg | 回收率   | 平均回收率 | 相对标准差<br>RSD |
|---------------|--------------|-------|-------|--------------|
| 2.5           | 2.1          | 84.0  | 89.3  | 11.9         |
|               | 2.5          | 100.0 |       |              |
|               | 2.2          | 88.0  |       |              |
|               | 2.3          | 92.0  |       |              |
|               | 2.5          | 100.0 |       |              |
|               | 1.8          | 72.0  |       |              |
| 5.0           | 4.8          | 96.0  | 100.0 | 4.6          |
|               | 4.7          | 94.0  |       |              |
|               | 5.0          | 100.0 |       |              |
|               | 5.3          | 106.0 |       |              |
|               | 5.2          | 104.0 |       |              |
|               | 5.0          | 100.0 |       |              |
| 10.0          | 10.0         | 100.0 | 103.5 | 7.6          |
|               | 11.0         | 110.0 |       |              |
|               | 10.0         | 100.0 |       |              |
|               | 9.1          | 91.0  |       |              |
|               | 11.0         | 110.0 |       |              |
|               | 11.0         | 110.0 |       |              |

表2 免疫亲和柱荧光光度法测定醋中黄曲霉毒素  
(B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + G<sub>1</sub> + G<sub>2</sub>)含量的回收率和精密度 %

| 添加浓度<br>μg/kg | 实测值<br>μg/kg | 回收率   | 平均回收率 | 相对标准差<br>RSD |
|---------------|--------------|-------|-------|--------------|
| 1.0           | 0.95         | 95.0  | 97.3  | 6.3          |
|               | 0.97         | 97.0  |       |              |
|               | 0.93         | 93.0  |       |              |
|               | 1.00         | 100.0 |       |              |
|               | 1.10         | 110.0 |       |              |
|               | 0.97         | 97.0  |       |              |
|               | 0.89         | 89.0  |       |              |
| 2.0           | 1.7          | 85.0  | 89.3  | 3.6          |
|               | 1.8          | 90.0  |       |              |
|               | 1.8          | 90.0  |       |              |
|               | 1.7          | 85.0  |       |              |
|               | 1.9          | 95.0  |       |              |
|               | 1.8          | 90.0  |       |              |
|               | 1.8          | 90.0  |       |              |
| 5.0           | 4.5          | 90.0  | 86.9  | 5.1          |
|               | 4.3          | 86.0  |       |              |
|               | 4.2          | 84.0  |       |              |
|               | 4.0          | 80.0  |       |              |
|               | 4.5          | 90.0  |       |              |
|               | 4.7          | 94.0  |       |              |
|               | 4.2          | 84.0  |       |              |

试验,重复操作6次和7次试验,回收率试验平均值和相对标准差结果见表1、表2。平均回收率在85%以上。其中酱油的添加平均回收率89.3%~103.5%,相对标准差4.6%~11.9%,醋的添加平均回收率为86.9%~97.3%,相对标准差为3.6%~6.3%。

参考文献:

[1] 台湾标准.CNS 4090 ,N6. 97. 1997. 食品中黄曲霉毒素检验法[S].  
[2] AOAC official methods of analysis[J]. Supplement march 1995.  
[3] Mary W Trucksess ,Michael E Stack ,Stanley Nesheim ,et al. Immunoaffinity column coupled with solution fluorometry or liquid chromatography postcolumn derivatization for determination of aflatoxins in corn ,peanuts ,and peanut butter :collaborative study[J].J ASSOC OFF ANAL CHEM,1991 ,74(1) : 81 —88.

[收稿日期:2002 - 08 - 20]

中图分类号:R15;O657. 31;Q949. 32 文献标识码:B 文章编号:1004 - 8456(2003)05 - 0412 - 03

微型核反应堆超热中子活化分析食品中的微量砷

张 瑛 刘岚铮 刘素华  
(济南市疾病预防控制中心,山东 济南 250013)

摘 要:为提高食品中微量砷的检测能力,利用在微型核反应堆安装的超热辐射孔道对样品进行照射降低样品的本底值后测定食品中的微量砷。方法的检出限为  $6.7 \times 10^{-9}$  g, RSD = 4.3%,样品的回收率在98%以上。微型核反应堆超热中子活化分析法可用于食品中微量砷的检测。  
关键词:中子活化分析;食品;砷

Miniature neutron source reactor epithermal neutron activation analysis for trace arsenic in food

Zhang Ying ,et al.

(Jinan municipal center for disease prevention and control ,Shandong Jinan 250013 ,China)

Abstract: To increase the detectable level of trace ,samples were irradiated by epithermal irradiation tube of miniature neutron source reactor to decrease effect of basis ,then the trace arsenic was detected in food. The detectable limit of this method is  $6 \times 10^{-9}$  g, RSD = 4.3 %,recovery rate >98 %. This method is suitable for determination of microscopic arsenic in food.

Key Words: Neutron Activation Analysis ;Food ;Arsenic

一般测定食品,样品大都需要提前消化处理,如果试剂纯度不够,容易造成试剂空白值高,如果消化

温度过高,就有可能造成样品中砷的损失,影响测定结果。微型核反应堆中子活化分析,具有灵敏度高、准确度好、精密度高、无试剂空白、分析元素广及操作简单等优点,在地质学、生物学、环境科学中被广

作者简介:张 瑛 女 主管技师