

黄曲霉毒素及其检测方法综合介绍

一、黄曲霉毒素介绍

黄曲霉毒素(aflatoxin, 简称为 AF)是到目前为止所发现的毒性最大的真菌毒素。它可通过多种途径污染食品和饲料, 直接或间接进入人类食物链, 威胁人类健康和生命安全, 对人体及动物内脏器官尤其是肝脏损害严重, 该毒素是黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株的代谢产物, 普遍存在于霉变的粮食及粮食制品中。黄曲霉毒素十分耐热, 加热至 230℃才能被完全破坏, 因此一般烹饪加工也不易消除。

二、黄曲霉毒素对人体的危害

1、引起急、慢性中毒:

黄曲霉毒素是剧毒物质, 其毒性相当于氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍。黄曲霉毒素属肝脏毒, 除抑制 DNA、RNA 的合成外, 也抑制肝脏蛋白质的合成, 黄曲霉毒素引起人类的急性中毒事件, 国内外均有许多报导, 最典型的是印度的霉变玉米事件, 该事件直接导致了数十人丧生, 数百人患上不同类型的肝脏疾病。

2、致癌性:

黄曲霉毒素有极强的致癌性, 长期摄入黄曲霉毒素会诱发肝癌。它诱发肝癌的能力比二甲基亚硝胺大 75 倍, 是目前公认的致癌性最强的物质之一。另据世界卫生组织报导, 黄曲霉毒素含量在 30—50ug/kg 时为低毒, 50—100ug/kg 时为中毒, 100—1000ug/kg 时为高毒, 1000ug/kg 以上为极毒。鉴于黄曲霉毒素对人类的巨大危害性, 我国对其在食品中的含量作了严格规定, 其中, 乳制品中黄曲霉毒素最高允许量为 5ug/kg (即 5ppb)。

三、黄曲霉毒素的种类

黄曲霉毒素主要有 4 种: 即 B1、B2、C1、G2, 其中 B1 被认为是主要的有毒物质, 有 2 种这些毒素的代谢产物 M1 和 M2。其中黄曲霉毒素 B1 主要存在于农产品, 动物饲料, 中药等产品中; 黄曲霉毒素 M1 是动物摄入黄曲霉毒素 B1 后在体内经羟基化代谢的产物, 一部分从尿和乳汁排出, 一部分存在于动物的可食部分, 如乳、肝、蛋类、肾、血和肌肉中, 其中以乳最为常见。黄曲霉毒素 M1 的毒性和致癌性与黄曲霉毒素 B1 的基本相似。由于牛乳及其制品是人类、特别是婴儿的主要食品, 所以其危害性更大。

四、最新政策及国标 (含国外一些政策)

1、自 2003 年 8 月 1 日起, 凡在我国境内从事米、面、油、酱油、醋生产加工的企业, 其产品须经检验合格后方可上市。国家质检总局发布的《关于印发小麦粉等 5 类食品生产许可证实施细则的通知》中明确规定, 黄曲霉毒素 B1 必须检测。

2、在第八期《中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局公报》中发布关于黄曲霉毒素检测方法的最新国标:

(1)、GB/T 18979-2003 《食品中黄曲霉毒素的测定——免疫亲和层净化高效液相色谱法和荧光光度法》

(2)、GB/T 18980-2003 《乳和乳粉中黄曲霉毒素 M1 的测定——免疫亲和层净化高效液相色谱法和荧光光度法》

以上两项国标均在 2003 年 8 月 1 日开始实施

3、2002 年 2 月 4 日欧盟决议对从中国进口或委托从中国进口的花生和花生制品实施黄曲霉毒素强制性检测的特殊条件

五、中国及国际上对黄曲霉毒素的检测标准

1、主要国家：

| 品名 | 中国标准 | 美国标准 | 欧盟 |
|--|------------------------------------|------------------------------------|--|
| 玉米、花生、花生油，坚果和干果（核桃、杏仁） | $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 2、4、5、8、10、15 \mu\text{g/kg}$ (ppb) |
| 玉米及花生仁制品（按原料折算） | $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 20 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 2、4、5、8、10、15 \mu\text{g/kg}$ (ppb) |
| 大米、其它食用油（香油、菜子油、大豆油、葵花油、胡麻油、茶油、麻油、玉米胚芽油、米糠油、棉籽油） | $\leq 10 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 10 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 2、4 \mu\text{g/kg}$ (ppb) |
| 其它粮食（麦类、面粉、薯干）、发酵食品（酱油、食用醋、豆豉、腐乳制品）、淀粉类制品（糕点、饼干、面包、裱花蛋糕） | $\leq 5 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 5 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | 不得检出 |
| 牛乳及其制品（消毒牛乳、新鲜生牛乳、全脂牛奶粉、淡炼乳、甜炼乳、奶油）、黄油、新鲜猪组织（肝、肾、血、瘦肉） | $\leq 0.5 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 0.5 \mu\text{g/kg}$ (ppb) | $\leq 0.05 \mu\text{g/kg}$ (ppb) |

2、其他

- (1)、WHO / FAO 标准。国际卫生组织 (WHO) / 世界粮农组织所属的食品法典委员会 (CAC) 推荐食品、饲料中黄曲霉毒素最大允许量标准为总量 (B1+B2+G1+G2) 小于 $15 \mu\text{g/kg}$ ；牛奶中 M1 的最大允许量为 $0.5 \mu\text{g/kg}$
- (2)、南非标准。1990 颁布了黄曲霉毒素的最大允许标准：食品中黄曲霉毒素总量小于 $10 \mu\text{g/kg}$ ，其中黄曲霉毒素 B1 小于 $5 \mu\text{g/kg}$ 。
- (3)、其他标准。印度标准是花生中黄曲霉毒素 B1 小于 $30 \mu\text{g/kg}$ ；越南和阿根廷的标准为黄曲霉毒素 B1 小于 $20 \mu\text{g/kg}$ 。

六、黄曲霉毒素检测方法

测定黄曲霉毒素_{M₁}的方法有薄层色谱法、高效液相色谱法、酶联免疫吸附测定法、质谱法、放射免疫测定法。这些方法或多或少都具有如下不足之处：

- (1)、在操作过程中，需要使用剧毒的黄曲霉毒素_{M₁}作为标定标准物，对操作人员造成巨大的油污危险，而且黄曲霉毒素_{M₁}标准物质购买十分困难。
- (2)、操作过程烦琐、复杂、时间长，劳动强度大。
- (3)、仪器设备昂贵、笨重、操作复杂，难以实现现场快速分析。
- (4)、灵敏度较差，重复性很难得到满意结果。

在上面第四项中提到的最新国标方法“免疫亲和柱法”较好的解决了上面的不足，该方法可以采用配套的荧光仪进行检测，也可以和高效液相色谱法结合，解决标准物污染和操作过程繁复等问题。同时该方法有着较好的权威性和通用性，且为国外多个组织认可，被列为标准方法，如：

美国公职分析化学家协会 (AOAC)
美国农业部联邦谷物检测中心 (FGIS)
国际纯粹与应用化学协会 (IUPAC)
美国食品药品监督管理局 (US-FDA)
美国农业部 (USDA)

同时在国内被认证的机构：

中国出入境检验检疫局 (CIQ)

七、黄曲霉毒素检测——“免疫亲和柱法”方法简介

为了开发一种简单、快速、灵敏、准确的分析方法,美国 VICAM(维康)公司与哈佛大学、麻省理工学院、约翰-霍普金斯大学、AOAC、FDA、FGIS、美国农业部等著名大学和政府机构通力合作,发明研制了一系列以单克隆免疫亲和柱为分离手段,用荧光计、紫外灯作为检测工具的分析方法。该项技术有以下特点:

- 1、认证机构广泛,通用性强(见第六项)
- 2、分析速度快,一个样品只需 10—15 分钟,其他传统的方法要做到定量分析需要几小时至几天的时间。
- 3、灵敏度高,测定范围广泛(0—300ppb),用荧光计可以测定 0.1ppb 的黄曲霉毒素 M1,用 HPLC 可以检测出 10ppt 的黄曲霉毒素 M1。
- 4、采用单克隆免疫技术,可以特效性地将黄曲霉毒素和其他真菌毒素分离出来,分离效率和回收率高,正确性和可靠性强。
- 5、仪器轻便容易携带,自动化程度高,操作简单,直接读出测试结果,对实验操作人员要求不高,可以在小型实验场所使用。
- 6、不需要剧毒的黄曲霉毒素和其他真菌毒素标准物来标定,所以在整个实验过程中,绝对安全可靠。

目前,美国花生农场主、加工厂、官方检测机构 90%以上均采用维康技术分析黄曲霉毒素,维康技术在全世界 110 个国家和地区得到了广泛的应用。

在中国的典型用户有:检验检疫系统(山东、威海、日照、临沂、石岛、潍坊、天津、塘沽、河南、辽宁、大窑湾、锦州、唐山、北京、汕头、安徽、上海、厦门、平凉、岚山、湖北、广州、珠海), CDC(北京、上海)、质检系统(上海、山西、潍坊、淄博、西安、哈尔滨),国家饲料检测中心(北京)、国家粮油检测中心(北京)、成都粮科所、天津农科院、农业部农产品检测中心(新疆)、上海兽医站、李锦记(广东)、辽宁粮油外贸、山东华盛、东海粮油、安徽弘安、长生植物油、宏大油脂、文登粮油、文登昆俞、日照东方、日照东盛、日照中谷粮油、日照粮油、日照东粤、日照亚泰、五莲粮油、兴安粮油、莒县山孚、莒县粮食局、日照海纳、日照盛康、莒县春园、烟台平孚、烟台枫林、烟台金陵、水道粮管所、烟台大成、烟台大江、烟台新瑞、烟台天府、烟台澳华、招远粮油、莱阳鲁花、荣成副食品、中孚粮油、威海正昌、宏昆食品、威海华隆、威海黄海、润德粮油、青岛佳安、青岛佳德、青岛佳景、青岛东方、青岛兴华、青岛金华、青岛锐盛、青岛盛德、莱西花生、莱西松旺、胶州恒升、胶州供销、临沂裕隆、莒南花生协会、莒南优盛、莒南正大、莒南四海、沂水宝盛、临沂天望、临沂绿地、临沂中盛、诸城粮油、诸城供销、安丘外贸、唐山南光、唐山天申、廊坊普瑞纳、镇江嘉吉、嘉兴嘉吉、上海味好美、同仁堂等,(烟台、济南、广东、宁波、吉林、山西、黑龙江、河北、江苏、淮安、福建和甘肃检验检疫局、SFDA、上海药检、深圳南山 CDC、广东 CDC、上海 SGS、医科院药植所、天津雀巢、商检所、浙大饲料所、大连质检、辽宁质检、临沂质检、日照质检、青岛通标、青岛嘉里、河南农科院、湖北绿色产品检测中心使用的是亲和柱+HPLC 法)。

可以检测的样品包括:大米、面粉、酱油、植物油、醋、牛奶、奶制品、花生、花生酱、花生油、核桃、胡桃、杏仁、咖啡、玉米、蜂蜜、谷物、高粱、大豆、酱、蔬菜、胡椒、辣椒、中药材、烟草、啤酒、小麦、棉籽、燕麦、饲料等。

八、可以测试的其他真菌毒素

该方法适用广泛,利用同一台仪器和相似的分析方法还可检测出赭曲霉毒素,伏马毒素、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素、T-2 毒素及橘青霉毒素等。

快速、准确的检测食品中的真菌毒素

黄曲霉毒素免疫亲和柱分析法(IAC-AFLATEST)是美国维康(Vicam)公司的专利技术,1994 年被 AOAC(美国公职分析化学家协会) 批准为最新的官方方法(编号为: 991.31), 同时, 它也是美国农业部联邦谷物检测中心(证书编号为: FGIS91-103-13),IUPAC(国际纯粹与应用化学协会)US-FDA(美国食品药品行政署)和 USDA(美国农业部)认证的官方方法.经山东商检局科技工作者的努力,黄曲霉毒素免疫亲和柱分析法(IAC-AFLATEST)已经被制定为中国出入境检验检疫局(CIQ)新的行业标准。

以前, 黄曲霉毒素分析一般采用薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)和酶联吸附免疫法(ELISA)。TLC 虽然简便, 但灵敏度差; HPLC 虽然灵敏度高, 但样品处理烦琐, 操作复杂, 仪器昂贵.ELISA 重复性差试剂寿命短需要低温保存。此外, 这些方法都有共同的不足之处:

- (1) 在操作过程中, 需要使用剧毒的真菌毒素作为标定标准物, 有对操作人员造成巨大沾污的危险。
- (2) 在对样品进行预处理过程中, 需要使用多种有毒、异味的有机溶剂, 不仅毒害操作人员, 而且污染环境。
- (3) 操作过程烦琐、时间长, 劳动强度大。
- (4) 仪器设备复杂、笨重, 难以实现现场快速分析。
- (5) 灵敏度较差, 无法满足欧盟等国的标准要求。

为了开发一种简单、快速、灵敏、准确的分析方法,美国维康(Vicam)公司与哈佛大学、麻省理工、约翰-霍普金斯大学、AOACFDA、FGIS、美国农业部等著名大学和政府机构通力合作, 研制发明了一系列的以单克隆免疫亲和柱为分离手段,用荧光计,紫外灯作为检测工具的分析方法.维康技术具有如下特点:

- 1) 是 AOAC(美国职业分析家协会)、IUPAC(国际纯粹与应用化学协会)、USDA-FGIS(美国农业部联邦谷物检测中心)、USDA-GIPSA(美国农业部谷物检测、包装、贮存行政署)认证的官方方法, 其检测结果在世界各地均能得以认可。
- 2) 分析速度快, 一个样品只需 10-15 分钟, 而其它传统方法均需要几个小时至几天时间。
- 3) 灵敏度高, 测定范围宽(0.1-300ppb), 用 HPLC 检测可以测定 10ppt 的黄曲霉毒素 M1。
- 4) 采用单克隆抗体免疫技术,可以特效性地将黄曲霉毒素或其它真菌毒素分离出来,分离效率和回收率高,正确性和可靠性强。
- 5) 仪器设备轻便容易携带,自动化程度高,操作简单,直接读出测试结果,高中文化水平者即可胜任,可以在小型实验室或现场使用
- 6) 不需要剧毒的黄曲霉毒素及其它真菌毒素标准物来标定,所以整个试验操作过程中,绝对安全可靠。
- 7) 利用同一台仪器和相似的分析方法, 还可以检测赭曲毒素、伏马毒素、玉米赤霉烯酮、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (DON 或称呕吐毒素)、T-2 毒素和橘青霉毒素。

4 系列真菌毒素分析仪及其整套系统图示：



| 序号 | 描述 | 定货号 | 序号 | 描述 | 定货号 |
|----|----------|-------|----|------------|-------|
| 1 | 4 系列荧光计 | G8000 | 13 | 甲醇分配器 | 20501 |
| 2 | 槽纹滤纸 | 31240 | 14 | 打印纸 | G8100 |
| 3 | 一次性塑料漏斗 | 36020 | 15 | 一次性塑料移液器 | 20652 |
| 4 | 一次性塑料烧杯 | 36010 | 16 | 500ml 洗瓶 | 20700 |
| 5 | 不锈钢均质器 | 20200 | 17 | 一次性测试管 | 34000 |
| 6 | 玻璃混合器 | 20300 | 18 | Kim-wipe 纸 | 31967 |
| 7 | 泵流操作架 | 21020 | 19 | 显色液分配器 | 20600 |
| 8 | 500ml 量筒 | 20501 | 20 | 实验操作指南录像带 | |
| 9 | 微纤维滤纸 | 31955 | 21 | 英文实验操作手册 | |
| 10 | 50 毫升量筒 | 20600 | 22 | 试管架 | 21010 |
| 11 | 显色液 | 32010 | 23 | 标准物 | 33020 |
| 12 | 电子称 | 20100 | 24 | 玻璃注射器 | 34010 |

4 系列真菌毒素分析仪的技术指标:

| | |
|----------------|---|
| 仪器系统 | |
| 尺寸大小 | 36cm 宽 30cm 长 18cm 高 |
| 重量 | 仪器 6.6 公斤, 带包装 9.3 公斤 |
| 光源 | 氙灯脉冲光 |
| 灯寿命 | 大于 10,000,000 次 |
| 检测器 | 硅光电管 |
| 波长选择 | 340-700 nm |
| 稳定性 | 8 小时内读数漂移小于 1.0% |
| 响应时间 | 6 秒 |
| 量程范围 | 自动, 1000、100、10、1、0.1PPB |
| 精度 | ±3PPT 或 ±0.5% 读数 |
| 准确度 | 10PPT 或 ±1.0% 读数 |
| 标定 | 应用参比物, 进行自动标定 |
| 样品测试管 | Φ12cm, 长 75cm 玻璃管或标定管 |
| 样品体积 | 至少 1 ml |
| 数据处理 | |
| 数据的输入 | 触摸键盘, 英文数字功能键 |
| 显示 | 1 行 20 字符 |
| 打印机 | 24 列字符打印机 (内置) |
| 数据换算 | 单点或线形回归 |
| 储存容量 | 32K RAM, 128K ROM |
| 计算机接口 | RS-232, DB-9 连接线 |
| 时钟 | 日期和时间 |
| 电源/环境条件 | |
| 电源 | 100, 120, 220, 240 VAC ±10%, 50/60 Hz, 开关选择 |
| 环境温度 | 5-35 °C |
| 环境湿度 | 10-90%, 不结露 |

该系统:

1. 测定黄曲霉毒素符合 GT/18979-2003, 检测范围 0-300PPB, 检测限 1PPB。测定一个样品 15 分钟; 不需要有毒的黄曲霉毒素作为标准, 操作安全可靠, 简单便捷。200 组数据内存。带内置打印机和数据处理系统, 直接显示、打印测定结果。
2. 测定黄曲霉毒素 M1 符合 GT/18980-2003, 检测范围 0-2PPB, 检测限 0.1PPB。测定一个样品 15 分钟; 不需要有毒的黄曲霉毒素 M1 作为标准, 操作安全可靠, 简单便捷。200 组数据内存。带内置打印机和数据处理系统, 直接显示、打印测定结果。
3. 可以扩展测定如下真菌毒素:

| 被测毒素 | 被测商品 | 检测范围(检测限) | 标准编号 |
|---|---|-----------------------------------|--|
| Aflatoxin 黄曲霉毒素 (B1, B2, G1, G2 & M1) | 大米、面粉、酱油、醋、植物油、花生、花生酱、花生油、核桃、胡桃、杏仁、咖啡、玉米、蜂蜜、谷物、高粱、大豆、大豆酱、蔬菜、胡椒、辣椒、烟草、发酵酒、小麦、棉籽、燕麦、饲料、中药 | 0-300ppb (1ppb) | GB/T 18979-2003 SN/T 1101-2002 AOAC 991. 31 AOAC 999. 07 FGIS 91-103-B |
| Aflatoxin B 黄曲霉毒素 B | 同上 | 0-300ppb (1ppb) | GB/T 18979-2003 AOAC 999. 07 AOAC 2000. 16 |
| Aflatoxin M1 黄曲霉毒素 M1 | 牛奶、奶制品、奶粉 | 0-2ppb (0. 1ppb) | GB/T 18980-2003 AOAC 2000. 08 |
| Deoxynivalenol 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(或称呕吐毒素) | 小麦、大麦、玉米、谷物、饲料 | 0-50ppm (0. 5ppm) | FGIS 2002-104 J. of Chromatography A, 859(1999)23-28 |
| Fumonisin 伏马毒素 | 高粱、玉米、啤酒、饲料 | 0-10ppm (0. 25ppm) | AOAC 2001. 04 FGIS 2003-102 |
| Ochratoxin A 赭曲毒素 A | 小麦、大麦、绿咖啡、啤酒、可可粉、玉米、谷物、饲料、葡萄干、坚果、高粱 | 0-100ppb(1ppb) HPLC 法 0. 25ppb | AOAC 2000. 03 AOAC 2000. 09 AOAC 2001. 01 |
| Zearalenone 玉米赤霉烯酮 | 小麦、大麦、高粱、玉米、啤酒、饲料 | 0-5ppm (0. 1ppm) | J. AOAC, 84(5), 1453-59 (2001); J. AOAC, 82(6), 1364-68 (1999) |