

马芸,赵营,姜瑞,等. 乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量的酶联免疫法评价[J]. 江苏农业科学,2013,41(10):253-254.

# 乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量的酶联免疫法评价

马芸,赵营,姜瑞,吴燕,张峰峰

(农业部枸杞产品质量监督检验测试中心/宁夏农林科学院农业资源与环境研究所,宁夏银川 750002)

**摘要:**采用酶联免疫法测定生鲜牛乳和巴氏杀菌乳中黄曲霉毒素 M1 的含量,用加标回收率及精密度试验评价了结果的准确性及可靠性。结果表明,生鲜牛乳和巴氏杀菌乳的加标回收率平均值分别为 97.4%、94.1%,回收率相对标准偏差(RSD)分别为 1.7%、1.2%。生鲜牛乳和巴氏杀菌乳中黄曲霉毒素 M1 浓度分别为 4.33、4.39 ng/L,RSD 分别为 0.58%、0.33%。采用酶标仪测定乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量具有很好的准确性和精密度。

**关键词:**乳制品;酶联免疫法;黄曲霉毒素 M1

**中图分类号:** TS252.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)10-0253-02

黄曲霉毒素(aflatoxin,AF)是由多种霉菌如黄曲霉和寄生霉菌产生的有毒代谢物<sup>[1-2]</sup>。黄曲霉毒素衍生物包括 B1、B2、G1、G2、M1、M2 等<sup>[3]</sup>,其中 B1 毒性最强,M1、G1 次之,B2、G2、M2 较弱<sup>[4]</sup>。当饲料含水量超过 15% 时,黄曲霉毒素大量繁殖。奶牛进食含有黄曲霉毒素的饲料后,黄曲霉毒素 B1 通过羟基化被转化成黄曲霉毒素 M1,黄曲霉毒素 M1 相对稳定,牛奶常规处理方法如巴氏灭菌法对其没有影响,因此如果原奶中存在黄曲霉毒素 M1,其终端产品中也存在<sup>[5]</sup>。GB 9676—1988《牛乳及其制品中黄曲霉毒素 M1 限量卫生标准》规定,黄曲霉毒素 M1 限量值分别为:酸牛奶 ≤ 0.2 μg/kg、生鲜牛乳 ≤ 0.5 μg/kg、液态乳 ≤ 0.2 μg/kg。目前,黄曲霉毒素的检测方法主要包括层析法、色谱法、免疫法

等<sup>[3,5-8]</sup>。本研究以生鲜牛乳和巴氏杀菌乳为材料,通过酶联免疫法测定生鲜牛乳和巴氏杀菌乳中黄曲霉毒素 M1 含量,旨在为测定乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

生鲜牛乳,采自宁夏银川某奶牛场;巴氏杀菌乳,市售。

### 1.2 仪器及试剂

ELx808IU 酶标仪、感量 0.000 1 g 分析天平,100 μL 和 200 μL 多通道移液器,氮吹仪,离心机,黄曲霉毒素 M1 检测试剂盒。甲醇;清洗液(PBS-T):0.62 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O + 5.73 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O + 9 g NaCl,定容至 1 000 mL,再加 0.5 mL 吐温 20。

### 1.3 样品制备

将未处理的生鲜牛乳冷藏过夜,形成脂肪球。若样品为室温保存或样品在运输中已混合,将单位体积样品冷藏 1 ~

收稿日期:2013-07-04

作者简介:马芸(1967—),女,山东枣庄人,实验师,从事质量标准研究与农产品质量风险评估研究。E-mail:345797930@qq.com。

- [3] Li H B, Li Y L, Cheng J. Molecularly imprinted silica nanospheres embedded CdSe quantum dots for highly selective and sensitive optosensing of pyrethroids [J]. Chemistry of Materials, 2010, 22: 2451-2457.
- [4] 黄建勋,梁丽燕,陈润涛,等. 溴氰菊酯致突变性试验研究和评价[J]. 卫生毒理学杂志,2001,15(4):234-236.
- [5] Spinosa H S, Silva Y A, Nicolau A A, et al. Possible angiogenic effects of fenvalerate, a type II pyrethroid pesticide, in rats [J]. Physiology, Behavior, 1999, 67: 611-615.
- [6] Shi X, Liu J, Sun A, et al. Group-selective enrichment and determination of pyrethroid insecticides in aquaculture seawater via molecularly imprinted solid phase extraction coupled with gas chromatography-electron capture detection [J]. Journal of Chromatography A, 2012, 1227: 60-66.
- [7] Sharif Z, Man Y C, Hamid N A, et al. Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using solid phase extraction clean-up cartridges [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1127: 254-261.
- [8] García-Rodríguez D, Carro-Díaz A M, Lorenzo-Ferreira R A, et al. Determination of pesticides in seaweeds by pressurized liquid

extraction and programmed temperature vaporization-based large volume injection-gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2010, 1217: 2940-2949.

- [9] Sanusi A, Guillet V, Montury M. Advanced method using microwaves and solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of pyrethroid residues in strawberries [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1046(1/2): 35-40.
- [10] Rissato S R, Galhiane M S, Knoll F R, et al. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey; determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection [J]. Journal of Chromatography A, 2004, 1048(2): 153-159.
- [11] Lehotay S J. Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach for determining pesticide residues [J]. Pesticide Protocols, 2006, 19: 239-261.
- [12] Lehotay S J, Mastovská K, Yun S J. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices [J]. Journal of AOAC International, 2005, 88(2): 630-638.
- [13] 胡西洲,程运斌,胡定金. QuEChERS 法测定蔬菜中有机磷类农药多残留分析 [J]. 中国测试技术, 2006, 32(3): 132-133.

2 h, 2 000 r/min 离心 5 min, 弃上层脂肪, 使用下层脱脂牛奶用于检测。均质化牛奶: 因为均质化的脂肪球很难通过高速离心去除, 因此可直接用于检测。奶酪: 取 1 g 奶酪或浸软的奶酪置于有盖离心管中, 加入 5 mL 甲醇, 密闭, 混合 5 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 取 0.5 mL 上清液至试管, 用氮吹仪处理使甲醇挥发, 形成板固体黏性沉积物。加入 0.5 mL 试剂盒提供的空白脱脂牛奶, 剧烈涡旋 1 min, 静置 5 min, 取 2 份 200  $\mu$ L 牛奶提取物用于检测。

#### 1.4 方法

将所有试剂恢复至室温。移取 200  $\mu$ L 标准品或样品至微孔板, 每次移取均采用新枪头, 轻柔吹打混匀, 至少吹打 3 次, 记录标准品和样品的位置。用密封袋密封微孔板, 避免水分挥发, 室温避光孵育 2 h。将微孔板放入洗板机中, 用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 缓冲液 R 洗涤微孔, 重复 3 次。洗涤完成后, 将微孔板取出倒置于吸水纸上, 轻拍微孔板以去除残液。每孔分别加入 100  $\mu$ L 酶标记结合物, 摇匀, 密封微孔板, 室温避光孵育 15 min; 加入 100  $\mu$ L 底物溶液 (TMB) 至所有孔, 密封微孔板, 室温避光孵育 15 ~ 20 min; 加入 100  $\mu$ L 终止液至所有孔终止反应, 溶液颜色由蓝转黄。酶标仪工作条件: 检测波长 450 nm, 中速振动 0.025, 27  $^{\circ}$ C 延迟 0.025, 终点法正常读取吸光度。

#### 1.5 标准曲线绘制

根据试剂盒提供的黄曲霉毒素 M1 标准品的浓度系列, 分别移取 200  $\mu$ L 至相应的微孔板中进行测定, 结果见表 1。

表 1 标准系列吸光度

M1 浓度 (pg/mL)	吸光度	相对吸光度
0.0	1.894	100
5.0	1.835	96.88
10.0	1.666	87.96
25.0	1.269	67.00
50.0	0.988	52.16
100.0	0.675	35.64

注: 曲线相关系数  $r = -0.9963$ , 可满足检测的要求。

## 2 结果与分析

### 2.1 乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量测定结果可靠性评价

由表 2 可知, 在本底相对吸光度为 103.12, 加标量为 50.0 pg/mL 条件下, 生鲜牛乳中黄曲霉毒素 M1 的加标测定相对吸光度为 154.86 ~ 155.81, 回收率为 95.0% ~ 99.5%。在本底相对吸光度为 102.48, 加标量为 50.0 pg/mL 条件下, 巴氏杀菌乳中黄曲霉毒素 M1 的加标测定相对吸光度为 154.98 ~ 155.56, 回收率为 93.0% ~ 95.9%。说明采用酶联免疫法测定乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量回收率很高。生鲜牛乳和巴氏杀菌乳的平均回收率分别为 97.4% 和 94.1%, 二者相对标准偏差 (RSD) 分别为 1.7%、1.2%, 都低于 5%, 说明测定结果可靠性极高。

### 2.2 乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量测定结果精密度评价

为了评价乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量测定结果精密度, 对生鲜牛乳和巴氏杀菌乳分别选取 10 个样本测定。表 3 表明, 生鲜牛乳中黄曲霉毒素 M1 含量为 4.30 ~ 4.38 ng/L, 平均为 4.33 ng/L。巴氏杀菌乳黄曲霉毒素 M1 含量为 4.36 ~ 4.40 ng/L, 平均为 4.39 ng/L。生鲜牛乳和巴氏杀菌

乳中黄曲霉毒素 M1 测定结果的 RSD 值分别为 0.58%、0.33%, 远低于 5%, 说明测定结果的精密度极高。

表 2 乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量测定回收率

样品	本底 (相对吸光度)	加标量 (pg/mL)	加标测定值 (相对吸光度)	回收率 (%)	RSD (%)
生鲜牛乳	103.12	50.0	155.28	97.5	
	103.12	50.0	155.49	96.5	
	103.12	50.0	154.86	99.5	
	103.12	50.0	154.96	98.0	
	103.12	50.0	155.17	95.0	
	103.12	50.0	155.81	97.6	
	平均			97.4aA	1.7
巴氏杀菌乳	102.48	50.0	154.98	95.9	
	102.48	50.0	155.49	93.6	
	102.48	50.0	155.56	93.0	
	102.48	50.0	155.47	93.7	
	102.48	50.0	155.51	93.5	
	102.48	50.0	155.20	94.9	
	平均			94.1bB	1.2

注: 同列数据后不同大写字母表示差异极显著, 不同小写字母表示差异显著。

表 3 乳制品中黄曲霉毒素 M1 含量测定结果精密度评价

样品	浓度 (ng/L)	平均值 (ng/L)	RSD 值 (%)
生鲜牛乳	4.35, 4.30, 4.34, 4.33, 4.33,	4.33	0.58
	4.30, 4.35, 4.38, 4.31, 4.32		
巴氏杀菌乳	4.38, 4.40, 4.38, 4.36, 4.40,	4.39	0.33
	4.37, 4.39, 4.40, 4.38, 4.40		

## 3 结论

本研究表明, 生鲜牛乳和巴氏杀菌乳中黄曲霉毒素 M1 平均回收率分别为 97.4%、94.1%, 测定结果的相对标准偏差分别为 1.7%、1.2%, 测定结果可靠性高。生鲜牛乳和巴氏杀菌乳中黄曲霉毒素 M1 测定值平均分别为 4.33、4.39 ng/L, 相对标准偏差分别为 0.58%、0.33%, 测定结果精密度高。因此, 采用酶联免疫法检测黄曲霉毒素 M1 含量能够满足食品检验的要求。

## 参考文献:

- [1] 苏志明. 警惕黄曲霉毒素的危害[J]. 中国质量技术监督, 2006(3): 44-45.
- [2] 王长宇. 食品中黄曲霉毒素的处理措施[J]. 中国新技术新产品, 2010(5): 8.
- [3] 韩珍, 赵文红, 钱敏, 等. 黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 广东农业科学, 2011, 38(13): 93-96.
- [4] 叶盛群, 陈南南, 谌刚. 霉菌毒素吸附剂对牛奶中黄曲霉毒素 M1 含量的影响[J]. 饲料工业, 2012, 33(17): 17-18.
- [5] 张治淮, 曹杰, 申光荣. 黄曲霉毒素对奶牛的危害及防控措施[J]. 中国乳业, 2012(3): 50-53.
- [6] 孙翠萍, 万宇平, 王效东, 等. 黄曲霉毒素 M1 胶体金快速检测试纸条的研制[J]. 吉林畜牧兽医, 2013(1): 19-21.
- [7] 依桂华, 段林. 黄曲霉毒素检测的几种方法[J]. 养殖技术顾问, 2012(10): 151.
- [8] 王莹, 路晟, 柳家鹏. 黄曲霉毒素 M1 免疫亲和柱的制备及使用条件优化[J]. 中国奶牛, 2011(1): 44-46.