

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利说明书

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

专利号 ZL 200510018555.X

[45] 授权公告日 2007年6月20日

[11] 授权公告号 CN 1322327C

[22] 申请日 2005.4.15

[21] 申请号 200510018555.X

[73] 专利权人 中国农业科学院油料作物研究所  
地址 430062 湖北省武汉市武昌区徐东二  
路2号

[72] 发明人 李培武 张文 丁小霞 杨金娥  
谢立华 杨湄 李光明

[56] 参考文献

US4818687A 1989.4.4

CN1588068A 2005.3.2

EP1407272 A1 2004.4.14

"黄曲霉毒素 B1 测定方法的探讨" 杨一  
刚,科技情报开发与经济,第14卷第8期 2004

"免疫亲和柱-荧光分析法测定鲜乳和乳粉  
中的黄曲霉毒素 M1" 褚庆华,徐超一,刘岩  
等,检验检疫科学,第13卷第2期 2003

"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,张鹏,张艺兵  
等,实验技术与方法,第15卷第5期 2003

审查员 吴江明

[74] 专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公  
司

代理人 胡建平

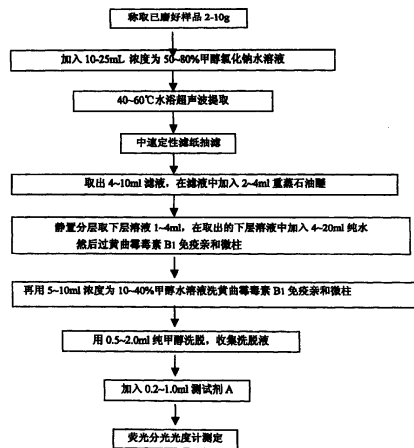
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

[54] 发明名称

一种黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种对食品以及饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法。取 2~10g 已磨细待测样品放入具塞试管,加入 10~25ml 浓度为 50~80% 的甲醇氯化钠水溶液,在 40~60℃ 水浴中超声波提取,中速定性滤纸抽滤,取出 4~10ml 滤液;在滤液中加入 2~4ml 重蒸石油醚,振荡混匀,静置分层,取下层溶液 1~4ml,在取出的下层溶液中加入 4~20ml 纯水,然后过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱,再用 5~10ml 浓度为 10~40% 甲醇水溶液洗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱,尔后用 0.5~2.0ml 纯甲醇洗脱,收集洗脱液,在洗脱液中加入 0.2~1.0ml 测试剂 A,放入荧光分光光度计或类似测量仪器测定。本发明的特点是样品处理和检测较为简便,检测的精度和稳定性较高,检测时间短,安全性高,可适于快速检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>。



1、一种黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于取 2~10g 已磨细待测样品放入具塞试管，加入 10~25ml 浓度为 50~80% 的甲醇氯化钠水溶液，在 40~60 °C 水浴中超声波提取，中速定性滤纸抽滤，取出 4~10ml 滤液；在滤液中加入 2~4ml 重蒸石油醚，振荡混匀，静置分层，取下层溶液 1~4ml，在取出的下层溶液中加入 4~20ml 纯水，然后过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，再用 5~10ml 按体积比浓度为 10~40% 甲醇水溶液洗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，尔后用 0.5~2.0ml 纯甲醇洗脱，收集洗脱液，在洗脱液中加入 0.2~1.0ml 测试剂 A，放入荧光分光光度计，所述的浓度为 50~80% 甲醇氯化钠水溶液是将 500~800 ml 甲醇和重量为 10~20 克的氯化钠用纯水定容至 1000ml 制成；所述的测试剂 A 由按重量体积比浓度为 1~5% 磷酸二氢铵(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)溶液和 0.01~0.1% 氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液按 1 : 2 体积混合而成。

2、按权利要求 1 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱由氨基修饰的硅胶颗粒偶联黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 多克隆抗体于玻璃微柱中装填而成。

3、按权利要求 2 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱所用玻璃微柱的规格为  $\Phi 2\sim 10\text{mm} \times 40\sim 100\text{mm}$ 。

4、按权利要求 2 或 3 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于每克氨基修饰的硅胶颗粒含 1.0~3.0 毫克黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 多克隆抗体。

5、按权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的浓度为 10~40% 甲醇水溶液是将 100~400 ml 甲醇用纯水定容至 1000 ml 制成。

6、按权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的重蒸石油醚由分析石油醚重蒸而成。

7、按权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的纯水是将去离子水用超纯水器纯化而成。

8、按权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的在 40~60 °C 水浴中超声波提取的时间为 3~5 分钟。

9、按权利要求 1 或 2 所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法，其特征在于所述的测试剂 A 由按重量体积比浓度为 2~3% 磷酸二氢铵溶液和 0.03~0.05% 氯化汞溶液按 1 : 2 体积混合而成。

## 一种黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法

### 技术领域

本发明涉及一种对食品以及饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法。

### 背景技术

真菌毒素是产毒真菌分泌产生的次生代谢产物，是能引起人畜各种损害的天然有毒化合物。在已经发现的真菌毒素中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (aflatoxin B<sub>1</sub>, 简称 AFB<sub>1</sub>) 是毒性最强的真菌毒素，其毒性、致癌性和污染频率均居生物毒素的首位。它污染食品及饲料后，直接或间接进入人类食品链，威胁人类的健康和生命安全，危害程度与黄曲霉毒素的摄入量成正比。黄曲霉毒素广泛存在于大米、玉米、花生、芝麻、大豆、菜籽等农产品和鱼肉等食品中，其污染食品及饲料的环节多，为此世界各国都规定了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 在食品及饲料中的最大允许含量并作为强制性标准，因此加强对食品及饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检测、特别是速测，以便及时了解和掌握食品及饲料的卫生信息，是增强食品安全性的一个重要环节。

现有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检测方法包括薄层层析法、精密仪器分析法和免疫学分析法。其中薄层层析法是检测黄曲霉毒素最常用的检测方法，不需要特殊的仪器设备，一般实验室都可进行，但试剂用量大、操作繁琐、其它组分干扰严重、准确性差，不能准确定量，且对实验人员和环境的污染危害较大，不适合于现场快速检测。精密仪器分析法包括荧光分光光度法和高效液相色谱法，其灵敏度高，准确性好，但仪器昂贵，要求黄曲霉毒素样品纯化程度高，样品前处理过程繁琐，耗时长，对实验环境要求高，难以实现快速检测。免疫学分析法包括酶免疫法、放射免疫法和时间分辨荧光法，酶免疫法，具有特异性强、灵敏度高、成本低、适于批量检测等优点，但一般为定性或半定量方法，在检测成分复杂的农产品中黄曲霉毒素时易受干扰，并存在假阳性的比例较高，检测准确度不高等缺点。放射免疫法与酶免疫法相似，但放射免疫法还存在放射污染，对操作者及环境容易带来额外不利影响，现应用较少。时间分辨荧光法是近年已有应用，检测灵敏度比前两者更高，但前处理仍较复杂，且所需仪器昂贵，限于医学临床诊断领域使用。

### 发明内容

本发明所要解决的技术问题是针对上述现有技术存在的不足而提供一种样品处理和检测较为简便，检测的精度和稳定性较高，检测时间短，安全性高，可适于快速检测的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的速测方法。

本发明为解决上述提出的问题所采用的技术方案为：取 2~10g 已磨细待测样品放入具

塞试管，加入 10~25ml 按重量体积比浓度为 50~80%的甲醇氯化钠水溶液，在 40~60 °C 水浴中超声波提取，中速定性滤纸抽滤，取出 4~10ml 滤液；在滤液中加入 2~4ml 重蒸石油醚，振荡混匀，静置分层，取下层溶液 1~4ml，在取出的下层溶液中加入 4~20ml 纯水，然后过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，再用 5~10ml 按体积比浓度为 10~40%甲醇水溶液洗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，尔后用 0.5~2.0ml 纯甲醇洗脱，收集洗脱液，在洗脱液中加入 0.2~1.0ml 测试剂 A，放入荧光分光光度计或类似测量仪器测定。所述的浓度为 50~80%甲醇氯化钠水溶液是将 500~800 ml 甲醇和重量为 10~20 克的氯化钠用纯水定容至 1000ml 制成；所述的测试剂 A 由按重量体积比浓度为 1~5%磷酸二氢铵(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)溶液和 0.01~0.1%氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液按 1 : 2 体积混合而成。

按上述方案，所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱由氨基修饰的硅胶颗粒（微球）偶联黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 多克隆抗体于玻璃微柱中装填而成；所述的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱所用玻璃微柱的规格为 Φ 2~10mm × 40~100mm。

按上述方案，所述的浓度为 10~40%甲醇水溶液是将 100~400 ml 甲醇用纯水定容至 1000 ml 制成；所述的重蒸石油醚由分析石油醚重蒸而成；所述的纯水是将去离子水用超纯水器纯化而成。所述的在 40~60 °C 水浴中超声波提取的时间可为 3~5 分钟。所述静置分层的时间可为 2~5 分钟。

本发明采用抗体连接微球技术，经超声波提取，石油醚萃取来去除杂质，进行快速简便的前处理，然后通过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱分离纯化黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>，提高黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测的特异性和灵敏度，缩短测试时间，以适于黄曲霉毒素定量快速检测。

本发明的有益效果在于：

- (1) 操作简单、测定快速。样品处理简单，自动化程度高，可批量测定，整个测定时间仅需 20~30 分钟/样次，而其它传统方法均需要几个小时至几天时间。
- (2) 性能稳定，技术指标先进。采用抗体免疫技术，可以特效性地将黄曲霉毒素分离出来，分离效率和回收率高，正确性和可靠性强，灵敏度高，可定量测定，最低检测限可为 0.1 μg/kg，特异性高，重复性好，回收率可达 90%。
- (3) 污染少，安全性高。该方法所需有机试剂和其他有毒试剂少，大大减小了对操作人员和环境的污染。
- (4) 与小型专用荧光分光测量仪配置使用可实现黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的现场速测，有利于一线工作人员对食品卫生的及时检测和监控。

## 附图说明

图1为本发明速测方法的流程框图。

## 具体实施方式

下面结合附图进一步说明本发明的实施例。

实施例1：称取10g已磨细大米样品放入具塞试管，加入20ml浓度为50~60%甲醇氯化钠水溶液，甲醇氯化钠水溶液中按重量计含1~2%氯化钠，在50℃水浴中超声波提取3分钟，再用中速定性滤纸抽滤，抽出10ml滤液；在滤液中加入2~4ml重蒸石油醚，振荡混匀，静置2分钟后取下层溶液4ml，在取出的下层溶液中加入20ml纯水，然后过黄曲霉毒素B<sub>1</sub>免疫亲和微柱，所述的黄曲霉毒素B<sub>1</sub>免疫亲和微柱所用玻璃微柱的规格为Φ2~4mm（内径）×60mm（长度），每克氨基修饰的硅胶颗粒（微球）含1.0~3.0毫克黄曲霉毒素B<sub>1</sub>多克隆抗体；再用5ml浓度为10~40%甲醇水溶液洗黄曲霉毒素B<sub>1</sub>免疫亲和微柱2次，然后用1.0ml纯甲醇洗脱，收集洗脱液，加入0.2ml测试剂A，所述的测试剂A由2~3%磷酸二氢铵(NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)溶液和0.03~0.05%氯化汞(HgCl<sub>2</sub>)溶液按1:2体积混合而成；放入荧光分光光度计测定。根据黄曲霉毒素B<sub>1</sub>荧光分光光度计测定标准溶液，绘制标准曲线，定量计算得所测大米中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>含量为0.5μg/kg。

实施例2：称取8.0g已磨碎山东大花生样品放入具塞试管，加入25ml浓度为80%甲醇氯化钠水溶液，甲醇氯化钠水溶液中按重量计含1.8%氯化钠，在60℃水浴中超声波提取5分钟，用中速定性滤纸抽滤，抽出5ml滤液；在滤液中加入3ml重蒸石油醚，振荡萃取，静置2分钟后取下层溶液1ml，将取出的下层溶液加入4ml纯水，然后过黄曲霉毒素B<sub>1</sub>免疫亲和微柱，再用10ml浓度为10%甲醇水溶液洗黄曲霉毒素B<sub>1</sub>免疫亲和微柱2次，然后用2.0ml纯甲醇洗脱，收集洗脱液，加入1.0ml测试剂A，放入荧光分光光度计测定。根据黄曲霉毒素B<sub>1</sub>荧光分光光度计测定标准溶液，绘制标准曲线，定量计算得所测大米中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>含量为2.8μg/kg。

实施例3：称取2.0g植物油样品放入具塞试管，加入10ml浓度为70%甲醇氯化钠水溶液，甲醇氯化钠水溶液中按重量计含1.5%氯化钠，在40~60℃水浴中超声波提取3分钟，用中速定性滤纸抽滤，抽出8ml滤液；在滤液中加入4ml重蒸石油醚，振荡萃取，静置2-3分钟后取下层溶液2ml，在取出的下层溶液中加入8ml超纯水，然后过黄曲霉毒素

B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，再用 5ml 浓度为 10% 甲醇水溶液洗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，尔后用 1.0ml 纯甲醇洗脱，收集洗脱液，加入 0.5ml 测试剂 A，放入荧光分光光度计测定。根据黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 荧光分光光度计测定标准溶液，绘制标准曲线，定量计算得所测大米中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量为 1.2 μg/kg。

实施例 4：称取 5.0g 已磨碎混匀猪饲料样品放入具塞试管，加入 15ml 浓度为 60% 甲醇氯化钠水溶液，甲醇氯化钠水溶液中按重量计含 1.0% 氯化钠，在 50 °C 水浴中超声波提取 5 分钟，用中速定性滤纸抽滤，抽出 6ml 滤液；在滤液中加入 3ml 重蒸石油醚，振荡萃取，静置 2 分钟后取下层溶液 3ml，将取出的下层溶液加入 6ml 纯水，然后过黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱，再用 10ml 浓度为 15% 甲醇水溶液洗黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和微柱 2 次，然后用 1.0ml 纯甲醇洗脱，收集洗脱液，加入 1.0ml 测试剂 A，放入荧光分光光度计测定。根据黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 荧光分光光度计测定标准溶液，绘制标准曲线，定量计算得所测猪饲料中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量为 3.2 μg/kg。

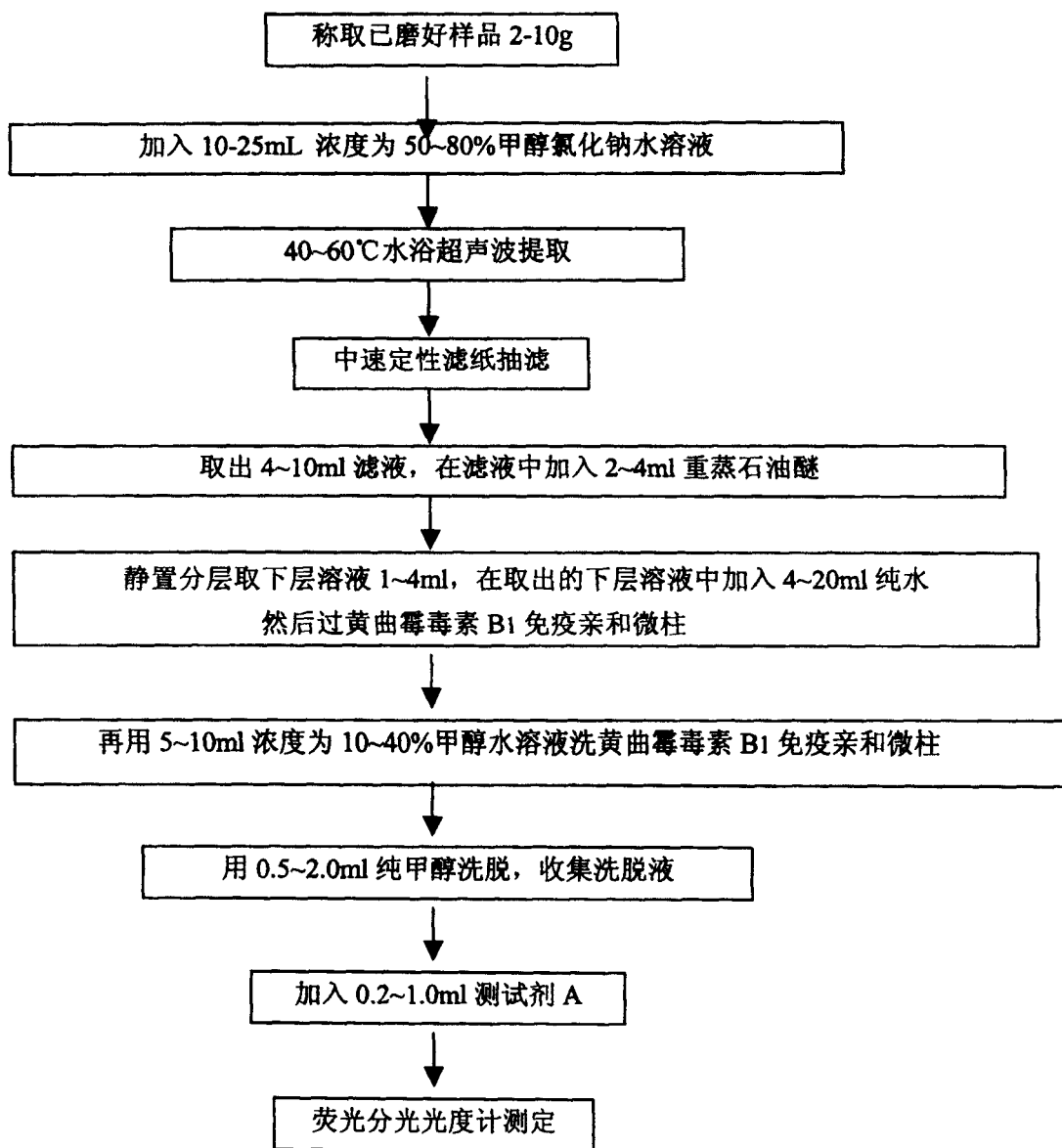


图 1

专利名称(译)	一种黄曲霉毒素B1的速测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1322327C</a>	公开(公告)日	2007-06-20
申请号	CN200510018555.X	申请日	2005-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业科学院油料作物研究所		
[标]发明人	李培武 张文 丁小霞 杨金娥 谢立华 杨涓 李光明		
发明人	李培武 张文 丁小霞 杨金娥 谢立华 杨涓 李光明		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/531 G01N21/64		
代理人(译)	胡建平		
审查员(译)	吴江明		
其他公开文献	CN1673746A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种对食品以及饲料中黄曲霉毒素B1的速测方法。取2~10g已磨细待测样品放入具塞试管，加入10~25ml浓度为50~80%的甲醇氯化钠水溶液，在40~60℃水浴中超声波提取，中速定性滤纸抽滤，取出4~10ml滤液；在滤液中加入2~4ml重蒸石油醚，振荡混匀，静置分层，取下层溶液1~4ml，在取出的下层溶液中加入4~20ml纯水，然后过黄曲霉毒素B1免疫亲和微柱，再用5~10ml浓度为10~40%甲醇水溶液洗黄曲霉毒素B1免疫亲和微柱，尔后用0.5~2.0ml纯甲醇洗脱，收集洗脱液，在洗脱液中加入0.2~1.0ml测试剂A，放入荧光分光光度计或类似测量仪器测定。本发明的特点是样品处理和检测较为简便，检测的精度和稳定性较高，检测时间短，安全性高，可适于快速检测黄曲霉毒素B1。

