

摘 要

贵州优质辣椒具有色泽红润、油分重、香味浓、辣味适中的特点，是开发辣椒系列制品的极好原料。目前，辣椒调味品现已成为贵州食品工业新兴产业，也是贵州出口食品的重要产品，已远销21个国家和地区。但辣椒调味品中AFB₁污染已成为阻碍出口的贸易壁垒，为了扩大辣椒调味品出口、确保产品质量、打破国外技术壁垒，发展贵州经济，保证食品安全和满足出口快速检测需要，需要建立一种灵敏度高、特异性强、简便快速、容易普及应用的方法来检测食品中黄曲霉毒素B₁ (AFB₁)。

本文采用 ELISA 方法检测辣椒调味品中的 AFB₁，针对辣椒调味品成分的复杂性，预处理过程中采用不同有机溶剂甲醇水溶液配比对 AFB₁ 进行提取优化，同时分析样品中 pH、含盐量和油脂等因素对 ELISA 法检测 AFB₁ 结果的影响。研究表明，应用 80% 甲醇水溶液提取 AFB₁，调整辣椒调味品 pH 值在 6~8 之间，控制辣椒调味品氯化钠含量在 10%~20% 范围，用石油醚将样品处理液中油脂提取可以较好消除检测干扰。通过对 ELISA 方法定量检测 AFB₁ 的可行性进行系统的研究和验证，建立了 ELISA 方法评价指标，确立了 ELISA 定量分析的质控参数，ELISA 分析方法的线性范围为 0.1μg/kg~10μg/kg，相关系数为 0.9921。向样品中分别添加 1μg/kg、5μg/kg、10μg/kg 3 个浓度水平的 AFB₁ 标准品，平均回收率分别为 78.25%，90.9%，84.55%，检测灵敏度为 0.01μg/kg。同时，应用 GB/T 18979-2003 食品中黄曲霉毒素的测定-免疫亲和层析净化高效液相色谱法与 ELISA 方法进行对照实验，并向样品中分别添加 1μg/kg、5μg/kg、10μg/kg 3 个浓度水平的 AFB₁ 标准品，平均回收率为 73.37%，88.47%，93.58%；两种方法质控参数均达到中华人民共和国进出口商品检验行业标准 SN/T 0001—1995 出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检测方法标准编写的基本规定。应用两种方法对样品测定值进行研究分析，拟合回归方程为： $y=0.9803x+0.1294$ 相关系数为：0.9786。从回归方程和相关系数中可以得出：ELISA 方法和 HPLC 方法相关性较好。从而证实了 ELISA 方法用于食品分析中的可行性。并对贵州出入境检验检疫局从贵州省辣椒调味品生产企业抽取的有代表性辣椒调味品 120 件进行 AFB₁ 的检验，检测结果表明，油辣椒系列 AFB₁ 含量为 1.693~3.025μg/kg，糟辣椒系列 AFB₁ 含量为 0.632~1.079μg/kg，香辣菜系列 AFB₁ 含量为

0.599~0.956 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，鸡辣椒系列 AFB₁ 含量为 1.119~1.874 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，风味豆豉系列 AFB₁ 含量为 3.979~6.391 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，肉丝豆豉系列 AFB₁ 含量为 3.614~4.696 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，辣三丁油辣椒系列 AFB₁ 含量为 1.917~2.742 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，初步掌握了辣椒调味品中 AFB₁ 污染情况。

本文对 ELISA 方法检测辣椒调味品中 AFB₁ 的不确定度依据分层建模理论进行了评定。并对样品的均匀性以及称量、提取、净化和仪器检测等过程中引起的不确定度进行了逐层分析，根据不同类型分别评定，其中称量的相对标准不确定度 2.91×10^{-5} ，样品稀释准备的相对标准不确定度 6.26×10^{-3} ，AFB₁ 标准品校准带来的相对标准不确定度 1.002×10^{-2} ，ELISA 实验操作过程的不确定度 2.85×10^{-2} ，酶标仪读数相对标准不确定度及数据处理带来的相对标准不确定度均为 5×10^{-3} ，通过分步计算和整体合成，辣椒调味品测定合成不确定度为 3.17%；在置信水平 95% 时，扩展不确定度为 6.34%；通过评定确定了检测结果置信范围，合理地表征被测量值的分散性。使附有不确定度说明的测量结果更加完整并具有一定意义。

本文分析辣椒调味品中 AFB₁ 影响因素，建立了快速、批量检测辣椒调味品中 AFB₁ 的方法，同时对检测结果进行不确定度评估，确定检测结果置信范围，并对贵州省贵阳市市场上购买的 120 件辣椒调味品样品进行 AFB₁ 的检验，初步掌握了贵州省贵阳市市场上辣椒调味品中 AFB₁ 污染情况。为扩大辣椒调味品出口、确保产品质量、打破国外技术壁垒，加快贵州经济发展做出一定贡献。

关键词：辣椒；调味品；黄曲霉毒素 B₁；ELISA；HPLC；不确定度

Abstract

The capsicum of Guizhou province has luster ruddy, high oil content, thick fragrance and Suitable hotness characteristics and so on. It is the extremely good raw material of the capsicum series product. At present, the capsicum has already been emerging industry of food industry in Guizhou, its also was exports food the important product, and has been sold in 21 countries and the area. To ensure food safety and the needs of output, the method of detecting aflatoxin, which is high sensitivity, strong specificity, simple, fast and easy to put into effect, is badly needed.

This article studied and evaluated the application of ELISA in tests of AFB₁ in capsicum flavor. Some factors that could bring errors to results were also analyzed. It was found that ELISA was of feasible way to detect of AFB₁ in capsicum flavor products. Some control parameters in quantitative analysis of ELISA were established. The results certified the feasibility of ELISA in detection of AFB₁ in capsicum flavor. ELISA showed linear range of 0.1 μ g/kg~10 μ g/kg. The related coefficient is 0.9921. Adding AFB₁ to capsicum flavor samples, the concentration is 1 μ g/kg, 5 μ g/kg and 10 μ g/kg separately. Average recovery rate is 78.25%, 90.9% and 84.55%. Sensitivity is 0.1 μ g/kg. Effect of pH, salted density and fat on the testing results of ELISA were also studied. The influence of these factors has certified in the results. However, these effects could be diminished when the extraction was leached with certain solvents before testing. The results would provide theory information to the foundation of extraction methods of AFB₁ in capsicum flavor sample.

The uncertainty of determination of aflatoxin B₁ by ELISA method in this paper is evaluated based on the theory of layer modeling evaluation. The model of each subvariable are established under the individual analysis of the uncertainty caused by the homogeneity of sample, the processes such as extraction, purification and instrumental detection etc. Synthesis uncertainty is 3.17%. Expansion uncertainty is 6.34%.

By comparison with the method of ELISA, we used GB/T 18979-2003 to determine aflatoxins content in food-Cleanup by immunoaffinity chromatography and

determination by high-performance liquid chromatography through the control experiment, and added AFB₁ to capsicum flavor samples, which concentration is 1μg/kg, 5μg/kg and 10μg/kg separately, then we gained average recovery rate that is 73.37%, 88.47% and 93.58% and the related coefficients 0.9786. Comparing through the experiment, the ELISA method and the HPLC method have better correlation. Therefore we confirmed the ELISA method used in food analysis is feasible. After determining the 120 capsicum flavor samples from the Guizhou Province by ELISA, they all reach national standards.

In view of the complexity of constituent of capsicum flavor in Guizhou, influencing factors of its AFB₁ have been analysed, the method of fast and batch determination of AFB₁, in this way, quality safety of capsicum flavor can be guaranteed, its export can be prompted, and it can do a certain contribution to the prosperity of Guizhou.

Key words: Capsicum flavor Aflatoxin B₁ ELISA HPLC Uncertainty

原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究曾做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名： 李飞 日期： 2007年6月

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解贵州大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权贵州大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名： 李飞 导师签名： 熊朝 日期： 2007年6月

第一章 前言

1.1 黄曲霉毒素的研究背景

早在一九一五年,人们就已经发现,油料作物的种子榨油后的油饼,发霉以后用作饲料时,会引起家畜中毒。一九四〇年人们发现,黄曲霉的培养物能使动物中毒。直到一九六〇年六月到八月间,英国英格兰南部及东部地区,有十万只火鸡,由于不知名的疾病,引起迅速死亡。因病因不明,定为“火鸡的 X 病”^[33]。后来又发现在小鸡、小鸭、野鸡、猪小牛和鱼类中,也发现类似的疾病。经病理检查发现,肝实质细胞退行性变,胆管上皮细胞异常增生。经过两年的研究发现,从饲料中分离出的黄曲霉所产生的荧光代谢物质造成了火鸡死亡,将其命名为黄曲霉毒素,该结果引起了全世界的轰动。这一结果开辟了真菌毒素毒理学和检测技术研究的热潮。

自从一九六〇年英国发现火鸡的黄曲霉毒素中毒症以来,世界各国对真菌毒素开展了大量的研究工作。一七一一年起,人们发现吃进污染麦角菌引起中毒开始到现在,在各种真菌毒素中,已发现毒性强的有黄曲霉毒素(Aflatoxin)、赭曲霉毒素(ochratoxin)、黄绿青霉素(citreoviridin)、红色青霉素 B(rubratoxin B)和青霉酸(penicillic acid)等。按目前的研究,黄曲霉毒素(B₁、G₁)、黄变米毒素(luteoskyrin)、展青霉素(patulin)和岛青霉毒素(islanditoxin)等六种可以使实验动物致癌。在这六种能致癌的真菌毒素中,黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)对人类和家畜的健康危害很大^[1, 2],其后许多学者证明黄曲霉毒素不但引起急性中毒,长期食用受其污染的食品可引起癌症,黄曲霉毒素 B₁是目前所有致癌物中最有害的一种^[34, 35, 36, 37]。具有很强的毒性、致癌性、致突变性和致畸毒性^[37, 38]。摄入后可引起人或家畜的急性或慢性真菌中毒症(Ilycotoxicosis)。

由于黄曲霉毒素对人、家畜和家禽的健康危害极大,甚至引起急性中毒导致死亡^[39],成为了最受人们注意的一种真菌毒素。近年来,美国、英国和日本等国对黄曲霉毒素都作了大量研究工作^[3],已在粮食、油料作物的种子、水果、干果、蔬菜、调味品、烟草、黄麻、乳类、乳制品、肉类、鱼虾类、发酵产品和饲料内,甚至在一些酒类和食品工业用的酶制剂中,都发现了黄曲霉毒素;并对黄曲霉毒素毒性和中毒机理做了系统研究。现在,有关黄曲霉毒素污染食品和饲料的管理条例已在美国、日本、欧盟付诸实施。世界卫生组织、美国、日本、欧盟等多次对食品和饲料中黄曲霉毒素的最大允许量做了严格规定。

我国于 20 世纪 70 年代初组织了 22 个省市的卫生防疫部门对当地生产的花生、花

生油、玉米、小麦和豆类等粮油食品共约 30000 份样品用 TLC 法测定了其中的 AFB₁。调查发现,花生、花生油和玉米中 AFB₁ 的污染最严重,大米、小麦和豆类 AFB₁ 的污染比较轻,南方的谷物受 AFB₁ 的污染比北方严重。1977 年测定了广西南宁 207 份玉米,有 165 份为 AFB₁ 阳性样品,阳性率为 79.7%。1978 年玉米的污染率为 40%,1983 年和 1984 年分别为 14.9%和 18.8%,AFB₁ 的水平依次为 310.0 μ g/kg、44.0 μ g/kg、16.4 μ g/kg 和 6.8 μ g/kg。1992 年的污染调查表明,AFB₁ 水平为 5.0~11.0 μ g/kg,仍有 55.6%的花生油检出 AFB₁,含量范围仅为 5.0~11.1 μ g/kg;有 5.6%的玉米品检出 AFB₁,含量范围为规定的限量范围^[4]。

近年来,世界各国对 AFB₁ 的限量标准逐年降低,有关部门将黄曲霉毒素的研究列为重点科研项目,在降低食品和饲料中黄曲霉毒素的同时,快速、准确的黄曲霉毒素检测方法的建立已取得初步进展。

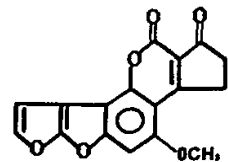
1.2 黄曲霉毒素的分布、产生及性质

1.2.1 黄曲霉毒素的分布范围

黄曲霉毒素分布的范围很广,凡是污染了能产生黄曲霉毒素的真菌的粮食、油料作物的种子、水果、干果、蔬菜、调味品、烟草、黄麻、乳类、乳制品、肉类、鱼虾类、发酵产品和饲料中,都有可能存在黄曲霉毒素。甚至在发现真菌、真菌丝体或孢子的食品和农副产品上,也找到了黄曲霉毒素。花生、玉米最易污染黄曲霉毒素,小米、高粱、木豆和白薯次之^[40]。资料表明,全世界每年约有 25%的谷物受到霉菌毒素的影响^[5]。因此对其必须给予足够重视。

1.2.2 黄曲霉毒素的种类及理化性质

黄曲霉毒素(Aflatoxins)是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉(*A.parasiticus*)和集峰曲霉(*A.nomius*)的某些产毒菌株产生的次级代谢产物,从一九六一年发现黄曲霉毒素以来,黄曲



霉毒素的种类越来越多。目前已经确定出结构的黄曲霉毒素有 B₁、B₂、G₁、G₂、M₁、M₂ 等 17^[41, 42, 43]种,并已经用化学方法合成出来。从化学结构上看,各种黄曲霉毒素彼此十分相似,含 C、H、O 三种元素,其基本结构都有一个二呋喃环和一个氧杂萘邻酮(coumarin, 香豆素);前者为毒素后者为致癌物质。黄曲霉毒素在紫外照射下能发出强烈的荧光^[6]。根据其在紫外光下发生荧光的颜色及薄层层析时 Rf 值的不同分别命名为黄曲霉毒素 B₁、B₂ 和 G₁、G₂。在 365nm 波长下 B₁、B₂ 呈蓝紫色荧光; G₁、G₂ 呈黄绿色荧光。

黄曲霉毒素的分子量为312~346。其中黄曲霉毒素B₁的化学结构式如图。黄曲霉毒素难溶于水，易溶于油、甲醇、丙酮和氯仿等有机溶剂，但不溶于石油醚、己烷和乙醚中。一般在中性及酸性溶液中较稳定，但在强酸性溶液中稍有分解，在pH9~10的强碱溶液中分解迅速。其纯品为无色结晶，耐高温，黄曲霉毒素B₁的分解温度为268℃，紫外线对低浓度黄曲霉毒素有一定的破坏性。

1.2.3 黄曲霉毒素的毒性与致癌性

黄曲霉毒素对包括家禽和家畜在内的若干动物具有强烈的毒性，其毒性作用主要是对肝脏的损害。黄曲霉毒素在食品和饲料中含1mg/kg以上就有剧毒，其毒性是氰化钾的10倍，为砒霜的68倍。大多数产毒黄曲霉菌产生黄曲霉毒素B₁的量比其它黄曲霉毒素多，而且黄曲霉毒素B₁在全部黄曲霉毒素中毒性最强^[7]。因此，1993年黄曲霉毒素被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)划定为I类致癌物^[44]，一般以B₁作为动物毒性试验。动物因种类、性别、年龄、营养状况不同对黄曲霉毒素B₁的敏感性有很大差异，最敏感的动物为雏鸭。动物急性中毒时主要表现为食欲下降，体重减轻，死后解剖肉眼可见肝脏出血、坏死；病理变化主要表现为肝实质细胞变性、坏死、脂肪浸润，纤维化及胆管上皮细胞增生，一次小剂量的黄曲霉毒素造成的生理变化是可以恢复的，如果多次重复摄入则可成不可恢复性病变。除肝脏外，其它脏器如脾、肾、辜等亦可引起退行性病变。

此外，美国Butler^[45]教授以黄曲霉毒素对大鼠进行了连续四代的繁殖试验，第一代和第二代的饲料中各含有黄曲霉毒素量0μg/kg、1μg/kg、10μg/kg，其它两代的饲料中含有10μg/kg浓度的黄曲霉毒素，并一直喂至21月龄。结果发现，喂低量的雌雄鼠的生存率比对照组(无毒的)高。三代的受孕率相似，仔鼠的存活率与断奶鼠的体重，不论其饲料中含黄曲霉毒素量为1μg/kg或10μg/kg，也不论喂养时间的长短，都无显著性差异。特别是，没有一只实验动物发生肝癌，只是饲以含黄曲霉毒素B₁100μg/kg达76周之久的大鼠肝脏损害率比对照组高。

黄曲霉毒素对实验动物的生物化学影响，一般认为可影响一些与肝脏有关的酶活性变化，如使血清中异柠檬酸脱氢酶、碱性磷酸酶、转氨酶的活性增高，有人还认为可影响酶和脂肪的代谢。

黄曲霉毒素可使鱼类和哺乳类动物诱发肝癌，其作用的靶器官主要为肝脏^[46]。它能够导致肝脏坏死、癌变、肺癌、结肠癌、胃癌、肾肿瘤等^[47]，引起急性和亚急性中毒，

各种动物对黄曲霉毒素致癌的敏感性不同,如以最低致癌剂量比较,鱼最敏感,在其饲料中含有黄曲霉毒素 B₁0.1 μ g/kg,9 个月后即可引起肝癌;大鼠饲料中含黄曲霉毒素 B₁15 μ g/kg,67 周后导致肝癌^[48]。大鼠致癌试验中,大剂量数次摄入和小剂量反复摄入都可导致大鼠发生肝癌,后者出现较前者迟,这说明黄曲霉毒素在致癌性上存在着“剂量与反应”的关系。关于猴的致癌试验,有报导一例雄猴,每日每公斤摄入典曲霉毒素 B₁0.02mg,5 年半年后发生巨大肝细胞癌^[49,50]。

黄曲霉毒素除主要可引发肝癌外,由于毒素侵入试验动物的途径不同,也可引起其它部位如肾、胃、支气管、腺体和皮下组织的癌肿。

美国 Butler^[51]教授曾将黄曲霉毒素 B₁ 与过去认为致癌性极强的一些化合物进行比较,对大白鼠经口摄入致肝癌量,黄曲霉毒素 B₁ 为 10 微克/天,而二甲基亚硝胺则需 750 微克/天,奶油黄为 9000 微克/天,由此可见黄曲霉毒素 B₁ 是已知致癌化学物质中的最强的一种。

1.3 黄曲霉毒素与人类和动物健康的关系

黄曲霉毒素虽然对动物有强烈的毒性和致癌性,而且有些食物确实受到污染,但对人类的危害,迄今为止,只有间接的验证,尚缺直接的证据。一些流行病学的调查和研究结果表明,世界上许多肝癌高发区,食品被黄曲霉毒素污染率较高。

江苏省启东市是全国肝癌发病率最高的地区,据一些专家研究显示这与当地人们对粮食储存方法不当,再加上气候温暖潮湿,粮食受黄曲霉菌污染所致^[8]。

我国台湾省曾发现三家农民 39 人中有 25 人中毒。发霉大米为可疑食物。大米深棕色,黄曲霉毒素 B₁ 含量最高者为 225.9 μ g/kg 及 182.4 μ g/kg。25 人中 3 个小孩死亡,但未做尸检,肝脏病不明。以该批霉米喂雏鸭,肝脏显示黄曲霉毒素中毒的病变^[52]。

非洲一名 15 岁儿童食用污染 AFB₁ 的木薯引起急性中毒死亡,经检测木薯中含 AFB₁1.7mg/kg。另一起为一名体重 10kg 儿童食用污染 AFB₁ 的米饭 2 天后死亡。经检测米饭中含 6mg/kg^[9]。

Abdulkadar (2000)报道^[53],1997年6月—1998年12月卡塔尔进口的可食性坚果受黄曲霉毒素B₁的严重污染,其中81份样品中受黄曲霉毒素B₁污染的有19份,含量范围为0.53~289 μ g/kg,1998年101份样品中有48份样品中黄曲霉毒素B₁含量在1.2~275 μ g/kg。

有关黄曲霉毒素在不同动物体内的代谢和引起的生物化学变化,已有一些综述性的报导^[54, 55, 56, 57]。但还有许多问题有待深入研究。阐明黄曲霉毒素在机体中的代谢情况,

对了解其中毒与致癌机理有一定的帮助。有关黄曲霉毒素 B₁ 的代谢情况, 现已初步明确以下几点:

动物摄取黄曲霉毒素 B₁ 后, 在体内形成代谢物 M₁。M₁ 是 B₁ 的羟基化衍生物, 最初在羊奶中发现, 故命名。牛、羊等动物食入含有黄曲霉毒素 B₁ 的饲料后, 其奶中即有 M₁ 排出, 研究发现 M₁ 有致癌性^[10]。其外观为白色或微黄色的粉末, 分子式为 C₁₇H₁₂O₇, 分子量为 328.3g/mol。经毒理学研究, AFM₁ 的 LD₅₀ = 0.3mg/kg (oral, duckling), 1987 年 WHO 将其定为一类致癌物, 是公认肝致癌物和 DNA 破坏剂^[58, 59, 60]。

动物摄入 B₁ 后, 在奶、尿液、血液中都有 B₁ 或其它代谢物检出。组织器官中以肝脏最为重要, 各种动物肝脏均有 B₁ 或其它代谢物出现, 肾、脾、肾上腺中亦可含有 B₁, 但在肝脏中的蓄积作用显著较其它组织高, 这可能由于肝脏是体内进行物质代谢过程的主要器官, 许多有毒物质往往在肝脏中进行代谢后, 再由肾脏排出, 因此尿液中亦有 B₁ 及其代谢物的出现。

1.4 黄曲霉毒素的预防及去毒

1.4.1 黄曲霉毒素预防

黄曲霉毒素对人和各类生物表现出很强的毒性, 而且有明显的致癌能力。因此, 关于黄曲霉毒素的预防的研究工作, 非常引人注目。食品和饲料中的黄曲霉及其毒素应以防霉为主。如前所述, 粮食中霉菌生长繁殖的条件主要是适宜的温度和水份, 尤其水份更为重要。因此, 最切实可行的防霉措施是控制粮食作物在收获后的水份含量。一般来说, 粮食作物在收获以后迅速把水份含量(一般可达 25%)降至 14%以下, 使环境相对湿度不超过 70%, 温度降至 10℃以下, 就可防止霉菌的生长与产毒。因此, 粮食作物在收获以后, 应避免长时间堆放在田间, 并应及时搬运到场地散开通风。特别是南方一些地区, 气候比较炎热潮湿, 收获后又经常遇到阴雨, 尽快设法使其干燥, 防止霉菌的繁殖, 尤为重要。

经验证明, 保持粮粒和花生外壳的完整, 可以有效地防止黄曲霉菌的侵染, 在收获、储存、运输各个环节中对这一点均应予以注意。

防止粮食在储存过程中的发热霉变, 目前还试用一些化学薰蒸剂, 如溴甲烷、二氯乙烷、环氧乙烷等。前两种是杀灭仓库害虫的薰蒸剂, 主要通过它们杀灭仓虫, 防止虫体表面沾染的霉菌菌丝孢子而播散; 环氧乙烷用来防霉, 效果较好, 据某单位试用, 每立方米用 100~200 克, 封闭数日, 可使米粒的霉菌数减少 90%以上, 并且效用可维持 4

个月，环氧乙烷为无色液体，沸点 10.7℃，易燃，挥发快，上述试验于开封后第五日即测不出残留量。但环氧乙烷对人体有毒，使用时需注意安全。

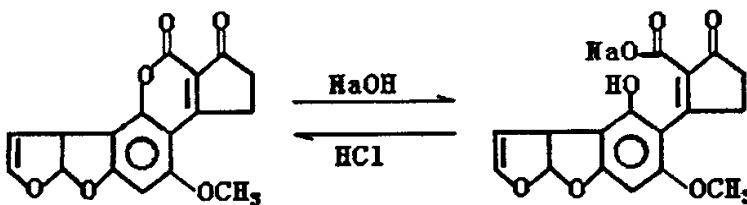
1.4.2 黄曲霉毒素去毒方法

对于已经含有黄曲霉毒素的食品和饲料，由于黄曲霉毒素十分耐热，加热到 200℃ 才能完全被破坏，因此一般烹调加工法均不能彻底破坏毒素。当粮食作物已被黄曲霉毒素污染时，如何去毒是一个复杂的问题，而且由于粮食作物数量大，种类多，也给去毒工作带来一定的困难。

目前去毒方法大部分研究国内尚处于试验阶段，当前实际应用的有以下几种：

a 人工或机械捡除霉粒：此法适用于花生仁，效果较好。由于黄曲霉毒素主要集中在霉坏、破损、皱皮及变色的花生粒中，因此只要从花生仁中挑除霉坏粒即可使黄曲霉毒素含量大为降低，经严格挑选后可达到容许量标准以下，有人试验 50 公斤花生仁，经挑选后霉粒控制在 30 粒以下，则其黄曲霉毒素含量可降至 5μg/kg 以下。其中花生也可以应用活性白土吸附法驱除花生油中的黄曲霉毒素达到同样效果。

b 植物油的碱去毒：油料作物的种子污染黄曲霉毒素后，榨出的油中亦含有毒素。用碱炼法去毒，能达到较满意的效果，而碱炼法本来就是油的一种精制方法。具体作法是用 1% 的烧碱精炼，再用水洗两次（10 份油用 1 份水），然后再用白陶土 90℃ 作用 5~30 分钟，油中的黄曲霉毒素含量可降至 5μg/kg 以下，碱炼法去毒的原理是 NaOH 可打破黄曲霉毒素 B₁ 的六碳环内酯，变成香豆素盐，其反应如下：



如加盐酸，香豆素盐可变为黄曲霉毒素 B₁，但香豆素盐溶于水，在水洗时可被洗去。

c 对于喂饲动物霉变较厉害的饲料时，可通过在饲料中添加蛋白质含量较高的鱼粉等饲料也可大大降低黄曲霉毒素对动物的危害。

d 生物脱毒法该法筛选某些微生物，利用其生物转化作用，使霉菌毒素破坏或转变为低毒物质。已经报道的微生物有无根根酶、米根酶、黑曲霉、枯草杆菌等对去除黄曲霉毒素有较好的效果。

e 辐射法紫外线或 γ-射线可有效地杀死霉菌和破坏黄曲霉毒素的化学结构，以达到

去毒的目的。用高压汞灯紫外线大剂量的照射，去毒率可达 97~99%。

f 添加维生素 C 维生素 C 可阻断黄曲霉毒素 B₁ 的环氧化作用从而阻止其氧化为活性形式的毒性物质。在日粮中添加一定量的维生素 C，再加上适当水平的氨基酸，是克服黄曲霉毒素中毒的有效方法。

g 黏结剂法 目前使用黏结剂在体外的黏结黄曲霉毒素 B₁ 功效已经得到肯定，主要的黏结剂有水合硅铝酸钠钙（HSCAS），黏土，沸石、膨润土、活性碳、蒙脱土等黏结剂。但 HSCAS 在体内的黏结效果同体外一样。黏结剂对黄曲霉毒素的黏结要达到好的效果，对黏结剂的最起码要求是具有多孔性，且其孔径在 0.015-0.090 毫米（150 埃-900 埃）范围内。

h 允许量标准的制订，食品中有害物质允许量的制订，除了对人民健康提供保障外，也还能促进食品的生产，保障人民的生活需要。黄曲霉毒素在食品中的允许量，许多国家也都向低的趋势发展，但这只有在防霉去毒的措施跟上后，允许量也才有减低的基础，世界卫生组织（WHO）建议自 1975 年 4 月 1 日起将 1970 年所规定的果实及其产品中的黄曲霉毒素的“可行性标准”（“actionable level”）由 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降至 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下，在将来随着检验水平的提高，限量标准将进一步下降。目前，我国对一般食品允许量是 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，在加入 WTO 后，容许量将下降到 0.1~1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

1.5 黄曲霉毒素的限量标准

由于黄曲霉毒素的危害及分布的广泛性，世界各国非常重视食品和饲料中存在黄曲霉毒素的问题。很多国家都普查了黄曲霉毒素的污染情况，并采取了一定的措施，制定了相关的标准。

世界卫生组织、联合国粮食和农业组织及国际儿童福利基金会于一九六六年规定食品中黄曲霉毒素的最高允许量为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[61]。一九七〇年起，世界卫生组织决定将食品中黄曲霉毒素的最高允许量由 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降低到 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。一九七五年又从 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 降低为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11]。1995 年世界卫生组织制定的食品中 AFB₁ 最高允许浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，婴儿食品中不得检出^[62]；美国联邦政府有关法律規定人类消费食品和奶牛饲料中的总黄曲霉毒素含量（指 B₁+B₂+G₁+G₂ 的总量）不能超过 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；欧盟国家的規定更加严格，要求人类生活消费品中的 AFB₁ 的含量不超过 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，总量不超过 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[63]。我国对 AFB₁ 的污染和控制也非常重视，曾组织专门人员对肝癌高发区的江苏、广西等省连续多年进行流行病学调查和监测，并在 1982 年颁布了粮油和发酵食品中的 AFB₁ 允许量标准。各国对食品

和饲料中黄曲霉限量正逐年降低，并根据本国情况制定了严格的标准。

下面是部分国家和地区制定的黄曲霉毒素限量标准，见表 1.1。

表 1.1 部分国家和地区对食品中黄曲霉毒素的最高允许含量^[12]

国家及地区	黄曲霉毒素	最高允许含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	国家及地区	黄曲霉毒素	最高允许含量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
国际食品法典(CAC)	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15	芬兰	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	5
美国	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15	哥伦比亚	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	20
欧盟	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	2(4)	墨西哥	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	20
阿根廷	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	5(20)	挪威	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	5
澳大利亚	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15	俄罗斯	B ₁	5
巴西	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	5(10)	新加坡	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	0(0)
中国	B ₁	20	印度	B ₁	30
中国香港	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	20	以色列	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	5(15)
中国台湾	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15	丹麦	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	2(4)
日本	B ₁	10	捷克	B ₁ (B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂)	5(10)
加拿大	B ₁ +B ₂ +G ₁ +G ₂	15	伊朗	暂无限量	

1.6 黄曲霉毒素分析方法概述

由于黄曲霉毒素具有毒性大、致癌力强、含量低（通常 0~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，即 0~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）和结构相似的特点，目前食品中 AFB₁ 限量已经成为限制出口的技术壁垒，为保障食用者健康及对出口贸易需要，提高 AFB₁ 的检测能力、发展快速准确灵敏的检测技术势在必行。自 60 年代以来，建立的检测方法已经达 30 余种，这些方法可分为五大类^[13]：一类是定性检测方法，主要是一些简单生物学方法（约 10 种，现在已停止使用）；第二类是半定量检测方法如薄层色谱法（TLC）；第三类是定量检测方法，包括建立在色谱基础上的理化方法，如液相色谱法（LC）、高效液相色谱法（HPLC）、和近年来新发展的质谱检测（MASS）；第四类是建立在免疫化学基础上的可快速测定的方法，如放射免疫测定（RIA）和酶联免疫测定方法（ELISA）；第五类是免疫化学和仪器分析结合的方法免疫亲和柱—荧光分光光度法、免疫亲和柱—HPLC 法^[14, 64, 65, 66]等。

1.6.1 薄层色谱法（TLC）

TLC 法是检测 AFB₁ 的最常用的方法，也是我国测定食品及饲料中 AFB₁ 的国家标准之一，其原理是试样中黄曲霉毒素 B₁ 经提取、浓缩、薄层分离后，在波长 365nm 紫外光下产生蓝紫色荧光，根据其在薄层上显示荧光的最低检出量来测定含量^[15]。TLC 有单向展开和双向展开法，其中双向展开法能进一步除去样品中的杂质，提高灵敏度，省

去了柱层析等净化操作步骤。由于 TLC 方法测定黄曲霉毒素 B₁ 不是很专一，样品中其他荧光物质的干扰，使其它杂质的 R_f 值与 Aft.B₁ 一致，造成测量误差，要确定是否是黄曲霉毒素，常常需要其它的实验来验证。

为提高 TLC 分辨率，高效薄层层析法（HPTLC）已广泛应用于一些样品的黄曲霉毒素的测定，Coker^[67]认为：利用 HPTLC 法分析黄曲霉毒素可根据分析样品，改变各种分析条件，如溶剂、进样技术、展开槽、检测方式等，以得到最佳效果。用双向 HPTLC 快速分析农产品中黄曲霉毒素，以苯-乙腈萃取，无水乙醚初展，再以 CHCl₃-二甲苯-丙酮展开，366nm 检测，可使 B₁、B₂、G₁、G₂ 的检出限达 0.8、0.4、0.7、0.4μg/kg。薄层扫描仪的出现，使 TLC 或 HPTLC 法实现了定性定量的自动化，而不需要目测最低黄曲霉毒素含量，展开后可选择一定波长，以标准品作对照，直接测定 Aft.B₁ 的含量，使分析速度加快。

虽然 TLC 法由于设备简单，成本低，易于普及到基层单位测定，国内外仍然使用，但由于该方法操作步骤多，样品前处理烦琐，并且提取和净化效果不够理想，提取液中杂质较多因而在展开时影响斑点的荧光度，导致灵敏度下降。但 TLC 法是 AFB₁ 的经典方法，仍为普通实验室的常用方法。

1.6.2 高效液相色谱分析法（HPLC）

HPLC 是近几年发展起来的检测 AFB₁ 方法，主要是用荧光检测器检测，在适宜的流动相条件下，采用反相 C₁₈ 柱，使多种黄曲霉毒素同时分离后，通过测量色谱峰的面积计算含量。SimonellaA 选用 C₁₈ 柱，乙酸-乙腈-异丙醇-水（1：5：5：39）为流动相，荧光检测器激发波长 352nm，发射波长 442nm，可分离测定黄曲霉毒素。G₁、G₂、B₁、B₂；Takahash 则利用 HPLC 法同时分离测定黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂、B_{2a}、G_{2a}6 种组分，整个分析操作可以在 15min 内完成。该方法的优点是特异性强、灵敏度高、定量准确，可同时分离多种黄曲霉毒素，操作简便，定量精确，适于大批量样品的分析。但所需仪器设备价格昂贵，而且前处理复杂，建立方法比较困难，操作时需要专门的技术人员。

1.6.3 酶联免疫法（ELISA）

ELISA 方法是上世纪 70 年代出现的新的免疫技术，利用免疫、酶及生化技术来检测 AFTB₁，开辟了 AFTB₁ 分析的新领域。最初由荷兰学者 VAN WEEMAN 和瑞典学者 ENGVALL 与 PERLMAN 几乎同时提出^[16]，主要用于病毒的检测；70 年代中后期开始

用于真菌毒素的检测^[68, 69]；伴随着单克隆抗体技术的产生，以单克隆抗体为基础建立的酶联免疫检测方法^[70, 71]随之而建立。其原理是样品中的黄曲霉毒素B₁与定量特异性抗体反应，多余的游离抗体与酶标板内的包被抗原结合，加入酶标记物和底物后显色，与标准比较来测定含量。该方法具有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测结果稳定准确、实验污染少，一次实验可检测多个样品，引起了全世界的关注。

1.6.3.1 影响 ELISA 分析法的因素

因 ELISA 是利用抗体的选择性和标记酶化学放大的灵敏度建立起来的，故应考虑的因素主要有：

a 抗原包被 将抗原固定于聚苯乙烯微量反应板中称之为包被，包被的质量是影响抗原—抗体反应的重要因素。

b 非特异性反应 ELISA 中可以发生许多非特异性反应，严重干扰分析结果，选择适当抗体组合可明显减少这种反应的发生。

c 酶和抗体的偶联 酶和抗体偶联的好坏，直接影响试剂灵敏度。

d 酶的底物 当酶标记抗体—抗原复合物和酶的底物相遇时，复合物中酶水解底物，使无色的底物溶液生成有色的反应产物，然后根据颜色的深浅测出待测物的含量。由此可看出，酶底物的选择对准确和快速显示结果影响很大。

1.6.3.2 酶联免疫分析法在食品卫生分析中的应用

真菌毒素在食品卫生理化检验项目中占有一定的比例，且日益受到人们的重视。过去普遍采用的是薄层层析法测定，由于该方法的局限性限制了应用。1977年，美国 Lawell^[72]首先采用了ELISA法来检测黄曲霉毒素，利用小分子黄曲霉毒素B₁结合蛋白质免疫动物得到抗黄曲霉毒素B₁。随后美国学者朱繁生教授，英国学者Morgen教授分别改进了直接法建立了间接竞争ELISA法。国内陈兰明等^[17]采用辣根过氧化酶标记高亲和力的AFB₁抗体，建立了直接竞争抑制ELISA快速筛选法。该法检测AFB₁线性范围0.25~5.0ng/mL，灵敏度12.5pg。由于ELISA检测AFB₁方法成功的建立，在检测食品和饲料中AFB₁上大大缩短了检测时间。1987年李秀芳等^[18]建立了直接竞争ELISA法，刘滨磊、计融等建立了间接ELISA法，并将该方法列入了2005年出版《食品卫生理化检验方法》的国家标准中，标准号为GB/T5009.22-2005。

美国的朱繁生、Wild教授，日本的Tsuboi^[73]教授分别建立了黄曲霉毒素M₁的ELISA检测方法；匈牙利Barma-Vetro教授，我国的阳传和教授等^[19]建立了T-2毒素和玉米赤

霉烯酮(F-2)的 ELISA 检测方法;朱繁生教授建立了赭曲霉毒素 A 的 ELISA 检测方法; Lou Jianlong 建立了杂色曲霉素的 ELISA 检测方法; Mcery. w, Trucesess 建立了脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)的 ELISA 检测方法; Azcona-Oliver 建立了腐马素毒素(FT)的 ELISA 检测方法;其中 T-2 毒素和 DON 的 ELISA 检测方法都被列入了我国的标准方法中,使我国的真菌毒素检测方法达到了国际先进水平,其标准号分为 GB/T14933-2003, GB/T14929-2003。

1.7 黄曲霉毒素检测方法的比较

TLC、HPLC、ELISA 3 种分析法的主要特点归纳见表 1.2。

表 1.2 TLC、HPLC、ELISA3 种分析法的主要特点

方 法	TLC	HPLC	ELISA
灵敏度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1~5	0.02	0.025~2.5
特异性	良	中	优
定量	半定量	定量	定量或半定量
实验接触毒素浓度	较高	较高	低
分析时间	长	短	短
样品处理	繁	繁	简单
安全性	差	较差	安全
检测成本	小	最大	较小

1.8 本课题的目的意义及主要内容

1.8.1 ELISA 检测辣椒调味品目的意义

辣椒作为一种重要的辛香调料一直备受人们喜爱,近年来辣椒较高营养价值和保健功效的研究证实更引起密切关注。贵州优质辣椒特点是色泽红润、油分重、香味浓、辣味适中,是开发辣椒系列制品的极好原料。辣椒调味品现已成为贵州食品工业新兴产业,也是贵州出口食品的重要产品,目前已远销 21 个国家和地区。辣椒调味品中 AFB₁ 污染已成为限制出口的主要因素。目前黄曲霉毒素检测方法不能满足对样品批量测定和快速检测的要求,为了扩大辣椒调味品出口、确保产品质量、打破国外技术壁垒,建立快速、灵敏、方便的检测 AFB₁ 方法势在必行。

为此,本研究旨在针对辣椒调味品 ELISA 法分析引起 ELISA 检测食品样品的误差因素,建立评价食品中黄曲霉毒素 B₁ ELISA 检测方法,并对市场上辣椒调味品 AFB₁ 污染

情况进行检测，初步掌握AFB₁污染状况。同时对分析方法进行不确定度评估，确定该检测的置信范围。技术路线图见图1.1。

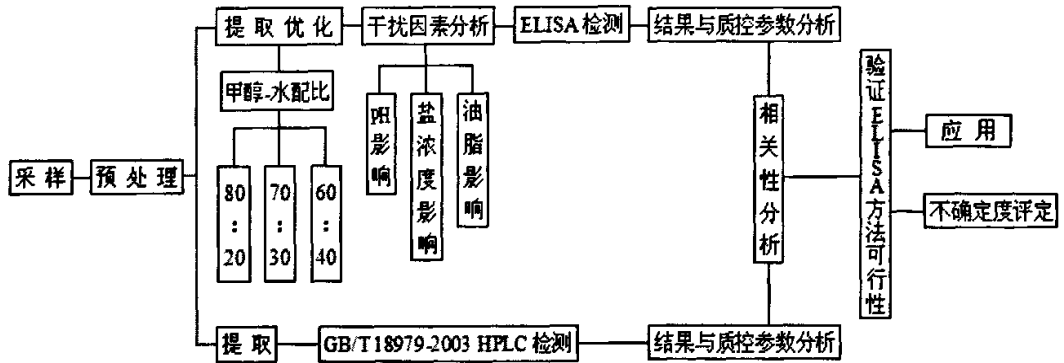


图1.1 实验技术路线

1.8.2 本实验主要研究内容

- ①ELISA 方法检测辣椒调味品中AFB₁质控参数建立和方法学评价；
- ②辣椒调味品中黄曲霉毒素B₁预处理方法优化；
- ③辣椒调味品中黄曲霉毒素B₁ELISA检测结果不确定度的评定；
- ④应用GB/T 18979-2003.HPLC检测辣椒调味品中AFB₁方法对照实验；
- ⑤应用上述最佳ELISA检测方法在实际中辣椒调味品中检测应用及分析；
- ⑥结论与展望。

第二章 ELISA方法检测辣椒调味品中AFB₁方法评价

2.1 引言

目前全世界对食品中黄曲霉毒素B₁ (AFB₁) 的限量标准非常重视, 国家质监总局近年做了明确规定, 针对食品中的调味品实行“市场准入”制度, 其中AFB₁是必检项目之一。欧盟、日本及美国等西方国家也对进出口本国的食品中黄曲霉毒素含量做了严格的限制。ELISA方法检测辣椒调味品中黄曲霉毒素具有灵敏度高, 特异性好, 操作简便、成本低廉, 对操作人员和环境污染少等特点。然而, 由于样品的复杂多样, 以及酶的不稳定性, 使得分析人员在检测食品样品时, 经常出现假阳性、假阴性结果。另外, 辣椒调味品中不同程度的含有酸碱离子、盐、和脂肪等成分, 严重干扰了黄曲霉毒素的提取和测定。所以在应用ELISA方法进行样品检测之前, 有必要探讨这几个主要因素对检测结果的影响, 以便提出消除这些影响的改进方法。

2.2 ELISA 检测原理

该方法建立的基本的原理是直接竞争ELISA, 具体描述如下: 黄曲霉毒素B₁ EIA微孔板含12个板条, 每个板条8孔。用兔抗鼠抗体IgG包被。特异性抗体(鼠抗黄曲霉毒素), 黄曲霉毒素标记的酶(酶结合物)和黄曲霉毒素B₁标准品或样品被加入到微孔后, 特异性抗体被牢固地结合在板条上的兔抗鼠抗体IgG上, 于此同时, 游离的黄曲霉毒素(在标准溶液或样品中)和酶结合物与特异性抗体竞争性结合。经过1小时孕育, 在洗涤步骤中除去非结合(酶标记)试剂。加入色原底物(四甲基联苯胺TMB), 在25℃反应30min, 结合的酶结合物可将无色的色原转化成为蓝色的产物。加入硫酸, 终止底物反应, 颜色由蓝变黄, 在450nm波长下检测吸光度值, 吸光度值与样品中黄曲霉毒素B₁浓度成反比, 见图2.1。

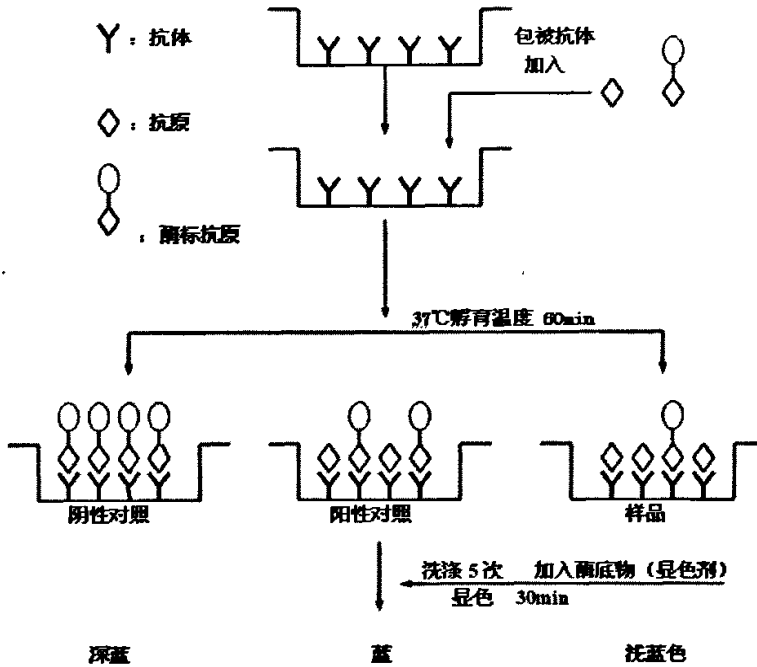


图 2.1 竞争酶联免疫吸附分析

2.3 材料和方法

2.3.1 主要仪器设备与材料

洗板机	产地：美国	规格型号：1575
酶标仪	产地：美国	规格型号：伯乐550
双温水浴摇床培养箱	产地：美国	规格型号：GEMINI
漩涡混合器	产地：中国	规格型号：XW—80A
电子天平	产地：美国	规格型号：BD202
颗粒粉碎机	产地：荷兰	规格型号：菲利普
移液器	产地：法国	规格型号：Gilson 100 μ L、200 μ L、1 mL
辣椒调味品	贵州出入境检验检疫局提供 来自出口生产企业	
黄曲霉毒素 B ₁ 检测试剂盒	产地：荷兰	EURO—DIAGNOSTICA 公司
黄曲霉毒素 B ₁ 标准品	产地：美国	Supelco 公司

2.3.2 标准溶液制备

a 标准品稀释缓冲液 将 2mL 100% 甲醇加入到 8mL 稀释缓冲液，即制成标准品稀

释缓冲液。

b 标准品溶液 加 2mL 标准品稀释缓冲液到冻干标准品管则黄曲霉毒素 B₁ 浓度为 1ng/mL; 制备成 0, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0ng/mL 的标准液, 系列标准液需 2~8℃ 避光放置。

c 黄曲霉毒素 B₁ 酶结合物溶液 在冻干酶结合物 (Aflatoxin-HRPO) 内加 4mL 稀释缓冲液, 充分混匀, 用后暗处 2~8℃ 保存; 若长期保存, 应分装后置于 -20℃ 保存。

d 黄曲霉毒素 B₁ 抗体溶液 在冻干抗体 (Anti-Aflatoxin) 内加的 4mL 稀释缓冲液, 充分混匀, 用后暗处 2~8℃ 保存; 若长期保存, 应分装后置于 -20℃ 保存。

e 洗涤缓冲液 (20×浓缩) 洗涤的缓冲液应在临用时现配。(如: 2mL 浓缩的洗涤缓冲液+38mL 蒸馏水)

2.3.3 采样

本实验所用样品系于 2005 年 9 月至 2006 年 9 月贵州出入境检验检疫局从贵州省辣椒调味品生产企业抽取的辣椒调味品, 根据国家取样相关标准, 采集有代表性的样品。

2.3.4 辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 提取方法

黄曲霉毒素 B₁ 的提取是黄曲霉毒素测定的一个重要步骤, 在天然食品原料中, 黄曲霉毒素的分布非常不均匀, 尤其是辣椒调味品这样的油状颗粒样品, 而且黄曲霉毒素并不集中在颗粒表面, 而是常常包埋在内部, 加之含量甚微, 所以给提取带来一定的难度。虽然黄曲霉毒素易溶于甲醇、氯仿、丙酮等有机溶剂, 难溶于水, 但研究证实, 在天然原料中的黄曲霉毒素主要结合在水溶性成分上^[20, 21], 所以应采用有机溶剂与水混溶的溶液体系进行提取。目前黄曲霉毒素 B₁ 的检测已经引起了全世界的广泛关注, 我国质监总局也于 2002 年做了明确规定, 针对调味品等食品实行“市场准入”制度, 其中 AFB₁ 是必检项目之一^[22]。黄曲霉毒素 B₁ 检测的准确度与毒素能否提取完全直接相关。对黄曲霉毒素的提取方法有甲醇-水溶液、丙酮-水溶液、氯仿-水溶液等, 而且相同的提取体系, 溶剂之间的配比也不尽相同, 本文以辣椒调味品为样品为材料, 对试剂盒中应用的甲醇-水溶液采用不同配比的提取方法对黄曲霉毒素 B₁ 做了详细的研究。首先采用不同的溶剂配比进行了高、中、低三个浓度的加标回收实验, 筛选出最优的辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 提取溶剂配比, 提高了 ELISA 检测方法的准确度。

将 50~100g 样品用粉碎机粉碎成粉末状, 准确称取 3.0g 均质样品加 9.0mL 不同配比的甲醇-水溶液, 室温下混合几分钟, 在振荡器上振摇几分钟 (1000 转/min), 静止 10

分钟后过滤，收集试样滤液，摇匀，即为待测样品提取液。甲醇-水溶剂配比设计如下：

甲醇-水（80：20，70：30，60：40）；根据不同提取溶剂配比进行四水平加标回收实验，在辣椒调味品中分别加入 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁ 标准品，分别用不同配比的提取剂提取。见表 2.1。

表 2.1 提取溶剂不同配比的提取效果评价

提取溶剂	添加 AFB ₁ 的量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
	1		5		10	
	平均检测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	平均检测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)	平均检测值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收率 (%)
甲醇-水 (80: 20)	3.072	82.7	7.452	91.5	11.48	86.1
甲醇-水 (70: 30)	3.677	80.2	7.185	86.2	11.15	82.8
甲醇-水 (60: 40)	3.658	78.3	7.11	84.7	11.18	83.1

上述实验结果可以看出：提取溶剂配比在（80：20）提取效果最好，符合试剂盒要求。

2.3.5 样品处理

为了考察酸碱离子、盐、脂肪等成分对 ELISA 测定结果的影响，在辣椒调味品样品提取前，做空白实验，加入已知浓度的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，分别添加这四种成分，

a 处理1：调 pH 值-通过添加醋酸和氢氧化钠，使得样品初提液 pH 值分别为 2.0，4.0，6.0，8.0 和 10.00。

b 处理2：调盐含量-通过添加氯化钠，使得样品初提液中氯化钠浓度分别为 5%，10%，20%，30%，40%。

c 处理3：调油脂含量-通过添加不同体积的大豆油，使得样品初提液中油脂浓度分别为 10%，20%，40%，60%，80% (V/V)。

2.3.6 ELISA 检测步骤

a 试剂的准备 从冰箱中取出黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒，恢复至室温（20~25 $^{\circ}\text{C}$ ）。同时，将样品按上述方法预处理；静止几分钟后过滤，取 50 μL 滤液，加入 150 μL 的稀释缓冲液，即得到含 20% 甲醇的溶液。再取 50 μL 即为 ELISA 检样溶液（检测最终结果需乘以稀释倍数 12）。

b 抗原抗体反应 选择数孔分别加入50μL AFB₁系列标准溶液(0, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0ng/mL), 其余孔中各加入50μL待测样品提取液, 随即在各孔中分别加入25μL酶结合物溶液, 再加入25μL酶抗体溶液于各版孔中, 封板, 摇匀1min, 然后37℃避光温育60min;

c 显色 将温育后的微孔板取出, 将微孔板放置于自动洗板机上洗板, 用洗涤缓冲液洗板完成5周期, 吸掉孔中液体, 再加入100μL显色底物溶液于各个板孔中, 室温(25℃)下温育30min。最后, 在各个板孔中加入100μL终止液。

d 测定 终止反应后, 立即用酶标仪在450nm波长处测定各孔OD值(参比波长为655nm), 并绘制标准曲线, 计算出样品中的AFB₁含量。

e 含量计算 从含有标准品和样品的板孔的各吸光值(OD)中, 减去空白孔的平均OD值。标准品和样品的OD值(复份的平均值)除以零标准的平均值, 再乘以100。零标准为100%(最大吸光度值), 其他OD值为最大吸光度的百分数。

$$\text{最大吸光度值}\% = \frac{\text{标准品或样品OD}}{\text{零标准OD}} \times 100\%$$

针对上面不同处理, 应用ELISA法测定450nm的吸光值A_i, 与不含有黄曲霉毒素的标准品配制液A₀的吸光值比较。同时与不添加任何成分的空白提取液对照。

2.3.7 加标样品的筛选

准确称取 3.0g 捣碎均匀辣椒调味品样品于 50mL 试管中(平行实验), 准确加入 9.0mL 甲醇(8+2)提取溶液:

- a 按处理 1 方法添加调整 pH 值;
- b 按处理 2 方法添加调整盐浓度;
- c 按处理 3 方法调整油脂浓度。

然后, 用微量振荡器振荡几分钟, 静止, 过滤。即为待测样品提取液。

2.4 结果与分析

2.4.1 样品测定

抽取某一辣椒调味品牌油辣椒。用 ELISA 方法对其进行检测, 重复测定 10 次, 确定其本底值。结果见表 2.2。

表 2.2 前处理按照上述方法进行预处理

样品编号	样品质量 m(g)	样品吸光值	空白吸光值	样品中 AFB ₁ 含量 (μg/kg)
1	3.007	0.527	0.002	2.756
2	3.003	0.523	0.002	2.892
3	3.004	0.519	0.002	2.941
4	3.010	0.550	0.002	2.586
5	3.008	0.500	0.002	3.137
6	3.001	0.506	0.002	3.098
7	3.009	0.525	0.002	2.869
8	3.007	0.534	0.002	2.765
9	3.006	0.514	0.002	2.789
10	3.012	0.507	0.002	2.879
平均值				2.875

应用上述处理方法，对加标样品重复测定 10 次，确定其平均本底值 2.875 μg/kg。

2.4.2 pH 值对 ELISA 测定结果的影响

本人应用 ELISA 方法做空白添加标准品实验，加入已知浓度的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 5.0 μg/kg，并添加醋酸、氢氧化钠溶液，调其 pH 值至 2、4、6、8、10，并做平行实验，检测结果见图 2.2。

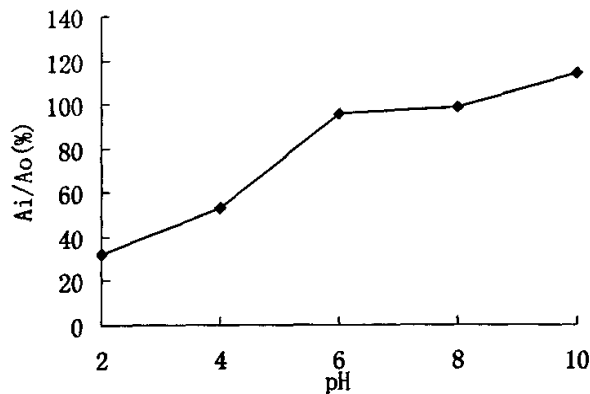


图 2.2 pH 值对 ELISA 法测定结果的影响

由图可以明显看出，样品 pH 值对结果的影响很大。当 pH 值小于 4 时， A_i/A_o 较低，结果显示假阳性；当 pH 值高于 8 时，结果偏阴性。初步研究表明，pH 值低的时候，酶的活性受到抑制，导致显色反应时颜色较浅，结果出现假阳性；pH 值高的时候，酶的活性受到一定的激活作用，使得结果出现假阴性。因此，应将待测样品液的 pH 值调整为 6~8，再进行提取和测定。经测定本人所选用的辣椒调味品 pH 值在 6~8 之间，故可排除 pH 值的

影响。

2.4.3 盐浓度对ELISA测定结果的影响

应用ELISA方法做空白添加标准品实验，加入已知浓度的黄曲霉毒素B₁标准溶液 5.0μg/kg，并添加0、5、10、20、30、40%浓度氯化钠溶液，并做平行实验，结果见图 2.3。

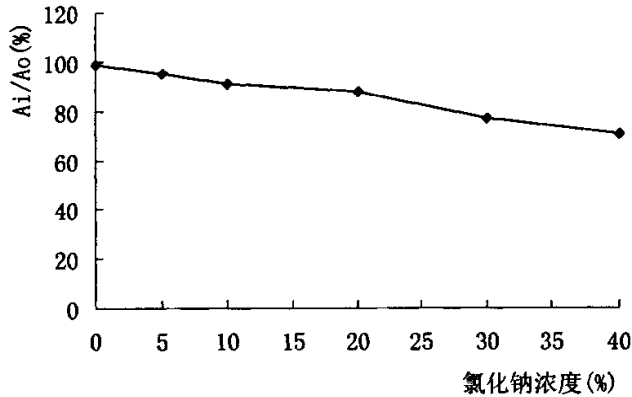


图 2.3 氯化钠浓度对ELISA法测定结果的影响

从盐浓度对 ELISA 测定的下图中可以看出，随着盐浓度的增大，测得的结果有偏向假阳性的趋势，但变化比较平稳，说明盐浓度对结果产生一定的影响。经测定，本实验采用的辣椒调味品氯化钠含量在 15%左右，故影响不大。

2.4.4 油脂对ELISA测定结果的影响

应用ELISA方法做空白添加标准品实验，加入已知浓度的黄曲霉毒素B₁标准溶液 5.0μg/kg，并添加0、10、20、40、60、80%浓度大豆油脂，经过平行实验得出检测结果见图2.4。

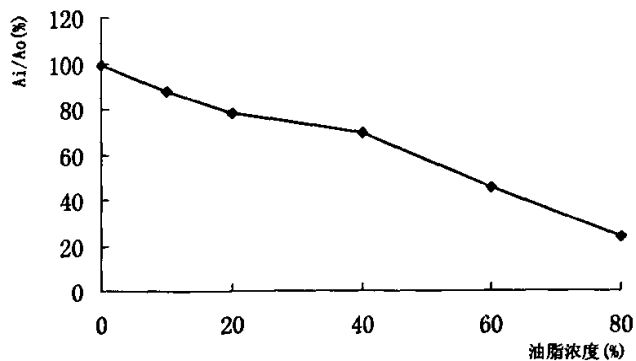


图 2.4 油脂浓度对ELISA测定结果的影响

大豆油脂的含量严重影响了 ELISA 的测定结果, 样品中随着油脂含量的增高, 结果偏阳性的程度增大。原因是样品提取液中油脂含量高, 很多乳附在抗体板条微空的四壁, 对抗原抗体反应产生一定屏蔽效应, 阻碍了酶标抗原和微空内抗体的竞争结合, 导致显色时颜色偏浅, 使得测定结果偏阳性。因此在检测含油脂多的样品时一定要除去过多的油脂。

2.5 讨论

通过上述对影响辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 提取主要因素中 pH 值、盐浓度、油脂的实验可以得出样品提取的最佳实验方案: 样品预处理时首先需要将 pH 值偏高或偏低的食品需用醋酸或氢氧化钠调至 6~8 之间; 提取时使用甲醇 (80 : 20) 溶液, 该配比既有利于黄曲霉毒素 B₁ 的提取, 又能降低样品中的含盐量; 同时, 使用等体积石油醚将样品初提液转移至 250mL 分液漏斗中, 加塞振摇 5min, 静置分层 (约 30min), 放出下层甲醇水提取液, 即为待测样品提取液。

ELISA 检测辣椒调味品中黄曲霉毒素不仅简便、快速, 并且检测限能够达到欧盟等西方国家的出口要求。但是, ELISA 法本身具有局限性, 检测结果会出现假阳性(阴性), 因此, 问题的关键是样品的预处理。由于 ELISA 方法中的酶的活性较敏感, 为了避免影响抗原抗体竞争结合, 某些特殊样品需经特殊处理, 以避免对酶活性的影响, 防止出现假阳性、假阴性, 提高测定准确性。针对辣椒调味品的实际情况: 预处理提取必须严格按照上述优化方法提取。这样才能最大程度的降低出现假阳性的几率。

2.6 定量分析质控参数

2.6.1 标准曲线及相关系数

向板孔中加入 50 μ L AFB₁ 系列标准溶液 (0, 0.0313, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0ng/mL), 随即在各孔中分别加入 25 μ L 酶结合物溶液, 再加入 25 μ L 酶抗体溶液于各版孔中, 封板, 摇匀 1min, 然后 37 $^{\circ}$ C 避光温育 60min; 在酶标仪上测其吸光值, 见表 2.3。

表 2.3 标准品吸光值与变异系数

标准品浓度 (ng/mL)	0	0.0313	0.0625	0.125	0.25	0.5	1.0
相对吸光值	1.409	1.286	1.197	0.840	0.594	0.266	0.123
	1.425	1.272	1.165	0.879	0.559	0.279	0.116
平均吸光值	1.417	1.279	1.181	0.859	0.576	0.273	0.119
变异系数 (%)	0.80	0.77	1.92	3.21	4.29	3.37	4.14

标准曲线方程为: $Abs=0.0853-0.8362\text{Log}(\text{Conc})$ 相关系数=0.9921。

2.6.2 回收率测定

称取一定量的代表性阴性辣椒调味品油辣椒, 准确添加 AFB₁, 标准溶液(高、中、低)三个浓度, 每个浓度平行四次测定, 按上述方法对各个样品进行提取后, 测定 AFB₁ 含量, 计算回收率, 结果如下表:

在确定本底值的辣椒调味品中分别添加 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 三个浓度测定 12 次, 计算回收率和批内变异系数, 结果见表 2.4。

表 2.4 回收率和批内变异系数

样品添加水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1	5	10
	3.649	8.569	11.319
添加样品测得值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3.606	8.970	10.872
	3.734	8.376	11.454
	3.641	8.797	11.676
平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	3.658	8.678	11.330
平均回收率 (%)	78.25%	90.9%	84.55%
变异系数 (%)		<10%	

从表中可以得出辣椒调味品添加标准的回收率在 78.25%~90.9%之间。

2.6.3 重复性测定

在标准曲线最适浓度范围内设定 AFB₁ 为 3 个浓度 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{L}$, 每个浓度取 9 份, 分别在同一块包被抗体的 EIA 微孔反应板中进行 ELISA 测定, 计算板内的相对标准偏差。结果见表 2.5。

表 2.5 板内的重复性

$\mu\text{g}/\text{L}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	RSD (%)
0.1	0.444	0.393	0.421	0.396	0.408	0.382	0.412	0.408	0.363	5.77%
1	0.065	0.060	0.067	0.061	0.060	0.060	0.063	0.063	0.071	5.95%
10	0.027	0.021	0.028	0.022	0.022	0.023	0.025	0.023	0.024	9.92%

从表中可以看出, 板内的相对标准偏差平均为 7.21%。

2.6.4 灵敏度测定

以空白为基底,把已知浓度的标准 AFB₁ 依次加到包被抗体的反应板中。AFB₁ 的浓度为: 0, 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 $\mu\text{g/L}$, 取 4 份平行, 用酶标仪测定 A 值。灵敏度是指测得最低浓度在 0.0~0.1 $\mu\text{g/L}$ 之间的 A 值与 0.0 $\mu\text{g/L}$ 测得的 A 值的差 > 0.1 读数, 这个浓度就是灵敏度最低值, 也就是最低检出量。结果见表 2.6。

表 2.6 灵敏度测定

AFB ₁ 浓度 ($\mu\text{g/L}$)	A ₄₅₀				平均值
0	1.510	1.523	1.558	1.566	1.539
0.0001	1.535	1.516	1.548	1.486	1.521
0.001	1.550	1.523	1.511	1.357	1.485
0.01	1.439	1.388	1.402	1.474	1.426
0.1	0.918	0.853	0.853	0.829	0.879
1	0.146	0.089	0.129	0.082	0.111
10	0.015	0.025	0.022	0.040	0.021

从表中可以看出最低检出限为 0.01 $\mu\text{g/L}$, 从表中数据可以看出, AFB₁ 浓度为 0.01 $\mu\text{g/L}$ 时 A 值为 1.426, 与 AFB₁ 为 0.0 $\mu\text{g/L}$ 的 A 值 1.539 之差 > 0.1, 此浓度可确定本方法的灵敏度, 通过计算其 AFB₁ 的最低检出量为 0.01 $\mu\text{g/kg}$ 。

2.7 结论

本试验建立了 ELISA 方法评价指标, 辣椒调味品添加标准的回收率在 78.25%~90.9% 之间, 板内的相对标准偏差平均为 7.21%, AFB₁ 的最低检出量为 0.1 $\mu\text{g/kg}$, 变异系数小于 10%, 质控参数均达到中华人民共和国进出口商品检验行业标准 SN/T 0001—1995 出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检测方法标准编写的基本规定^[23], 证实了 ELISA 方法用于贵州省辣椒调味品分析中的可行性。该方法能够简单、快速、批量筛选出含黄曲霉毒素 B₁ 辣椒调味品, 大大缩短了检测时间和成本, 具有灵敏度高、特异性强、精确度高、重复性好、污染少等优点, 适于推广应用。由于 ELISA 方法标准曲线线性范围为 0.03~1.0ng/mL, 故需要调整样品稀释浓度倍数使其浓度落在标准曲线线性范围内。

试验表明, 样品溶液的 pH、含盐量、油脂的含量都对检测结果有很大影响, 经过试验证明: 在辣椒调味品中 AFB₁ 时, 第一, 将预处理样品溶液 pH 值控制在 6~8 时最有利于提取; 第二, 用 80% 甲醇水溶液对辣椒调味品进行萃取, 使其 AFB₁ 萃取达到最大限度。

第三，用石油醚将样品处理液中油脂提取干净来降低这种干扰。同时，多次使用石油醚对样品中油脂提取同时，可以进一步减少色素干扰。

2.8 应用

应用上述实验优化的 ELISA 检测辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 方法，对贵州出入境检验检疫局从贵州省辣椒调味品生产企业抽取的有代表性辣椒调味品进行了系统的分析检测，共检测样品 120 个，检测结果见表 2.7。

表 2.7 不同辣椒调味品中 AFB₁ 含量检测范围

产品种类	样品数量	样品中 AFB ₁ 含量 (μg/kg) 检测范围
油辣椒	25	1.693~3.025
糟辣椒	15	0.632~1.079
香辣菜	15	0.599~0.956
鸡辣椒	15	1.119~1.874
风味豆豉	20	3.979~6.391
肉丝豆豉	15	3.614~4.696
辣三丁油辣椒	15	1.917~2.742

从检测结果中可以看出，油辣椒系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 1.693~3.025μg/kg，糟辣椒系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 0.632~1.079μg/kg，香辣菜系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 0.599~0.956μg/kg，鸡辣椒系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 1.119~1.874μg/kg，风味豆豉系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 3.979~6.391μg/kg，肉丝豆豉系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 3.614~4.696μg/kg，辣三丁油辣椒系列辣椒调味品中 AFB₁ 含量为 1.917~2.742μg/kg。

其中不同厂家同一种类产品 AFB₁ 含量有在一定范围内波动；送检调味品中风味豆豉系列调味品中 AFB₁ 明显高于其他系列辣椒调味品，根据上述实验结果进行深入研究发现：辣椒调味品中原料及工艺不同，对辣椒调味品中 AFB₁ 的影响起决定性作用。风味豆豉系列产品中 AFB₁ 含量偏高，初步推测是由于原料中干红辣椒、大豆油、豆豉在贮藏加工过程中由于条件不善容易受到霉菌污染，成为产生黄曲霉毒素的主要原因。

第三章 ELISA 法测定辣椒调味品不确定度评定

3.1 正确表示测量不确定度的意义

测量是科学技术、工农业生产、国内外贸易以至日常生活各个领域不可缺少的一项工作。测量的目的是确定被测量的值或获取测量结果。测量结果的质量（品质），往往会直接影响国家和企业的经济利益。食品检测与其他各个测量领域一样，在对被测量的值需要用一种方法表示该结果时，往往带有不确定性，使该结果具有一定的风险性。为了用一种通用的方法来正确表达和评价这种带有不确定性的检测结果，1995年由ISO、IEC和IFCC等7个国际化组织联合修改公布了《测量不确定度表示指南》（GUM）^[74]。1995年我国在等同采用GUM的基础上，也发布实施了JJF1059-1999《测量不确定度评定与表示》^[24]。例如：对出口食品卫生安全指标测定不准确，将会给我国进出口贸易带来重大的经济损失。同时也会严重影响人体的健康和安全。测量结果和由测量结果得出的结论，还可能成为执法和决策的重要依据。因此，当报告测量结果时，必须对其食品质量给出定量的说明，以确定测量结果的可信程度。测量不确定度就是对测量结果质量的定量表征，测量结果的可靠性很大程度上取决于其不确定度的大小^[25]。所以，测量结果必须附有不确定度说明才是完整并有意义的。

3.2 测量不确定度定义及分类

测量不确定度是与测量结果相关联的一个参数，用以表征合理地赋予被测量值的分散性。

尽管测量不确定度有许多来源，但按评定方法可将其分为二类：

a 不确定度的 A 类评定 用对观测列进行统计分析的方法来评定的标准不确定度，称为不确定度的 A 类评定，也称 A 类不确定度评定，有时可用 u_A 表示。

b 不确定度的 B 类评定 用不同于对观测列进行统计分析的方法来评定的标准不确定度，称为不确定度的 B 类评定，也称 B 类不确定度评定，有时可用 u_B 表示^[26]。

3.3 测量不确定度数学模型的建立

所谓建立数学模型，就是根据被测量的定义和测量方案，确立被测量与有关量之间的函数关系。通常，一个被测量可能要依赖若干个有关量，只有确定了所依赖的个有关量的值，才能得出被测量的值；只有评定了所以来各量的不确定度，才能得出被测量值的不确定度。所以，也可以说，数学模型实际上给出了被测量测得值不确定度的主要来源评定流程图见图 3.1。

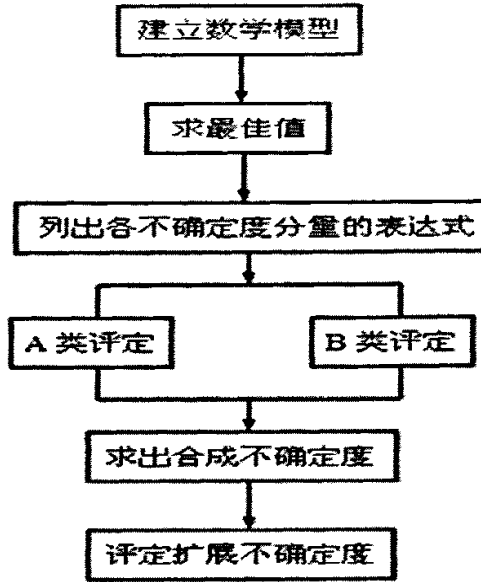


图 3.1 不确定度评定流程图

根据不同浓度的校准标准溶液的吸光度在一定范围内与浓度对数成线性关系，确定数学模型：

$$y = a + bx \quad (1) \quad \bar{X} = \frac{(y_x - a)}{b} \quad (2)$$

式中： y —表示酶标分析仪的吸光读数， A ； a —表示标准曲线的截距， A ； b —表示标准曲线的斜率， A/ng ； \bar{X} —表示被测样品液中黄曲霉毒素 B₁ 的平均含量， $\mu\text{g}/\text{kg}$ ； y_x —表示被测样品的吸光度， A 。

3.4 测量不确定度的来源

a 取样带来的不确定度。测量样品可能不代表所定义的被测对象，例如局部采样对样本整体不具代表性或者被检样品自抽样以来随时间产生的分解转化等，这都可能对最终结果的不确定度形成影响。

b 被测样品由于提取或分离的不完全带来的不确定度。另外，在采样和样品提取制备过程中的玷污以及样品变质，样品之间的交叉玷污和来自实验室环境的污染，也会成为不确定度的来源。

c 在测量过程中环境条件的影响，如容量玻璃器具校准与使用温度不同所带来的不确定度。

d 称量和容量仪器的不确定度。如移液器、量筒本身具有的标准偏差，以及测量仪

器的分辨率或灵敏度所带来的不确定度，如温度控制中的实际温度与设定温度的差异，酶标仪的分析读数中的滞后影响等。

e 标准物质所给定的不确定度以及标准物质在使用过程中产生的变化而引起的不确定度。

f 在测量方法和过程中的某些近似和假设，如使用直线来校准一段弯曲的响应曲线，数据计算中的舍入等；还包括数据处理换算中使用的常数或其他参数的值所具有的不确定度。

g 人员读数不准或操作中的随机失误带来的不确定度。在以上不确定度的主要来源中，要根据各检测平台，检测样品，检测者等的实际情况分析评定这样因素对总不确定度的贡献，这样可适当简化不确定度的求算步骤。

3.5 ELISA 检测辣椒调味品中 AFB₁ 的不确定度分析

下面应用 ELISA 检测方法检测贵州省出口辣椒调味品中的 AFB₁ 含量，根据国家质量技术监督局批准发布的 JJF1059-1999 质量技术规范《测量不确定度评定与表示》来计算 ELISA 检测辣椒调味品样品过程中的总不确定度 U_C 。

采用 ELISA 检测样品一般经过以下主要程序：称样？样品准备（含溶液配制、稀释等操作）？ELISA 检测（标准品校准、含加样、调温、计时等操作）？酶标仪读数？结果计算。每个步骤的不确定度有各自的特点，对总不确定度的贡献也不一样，见图 3.2。

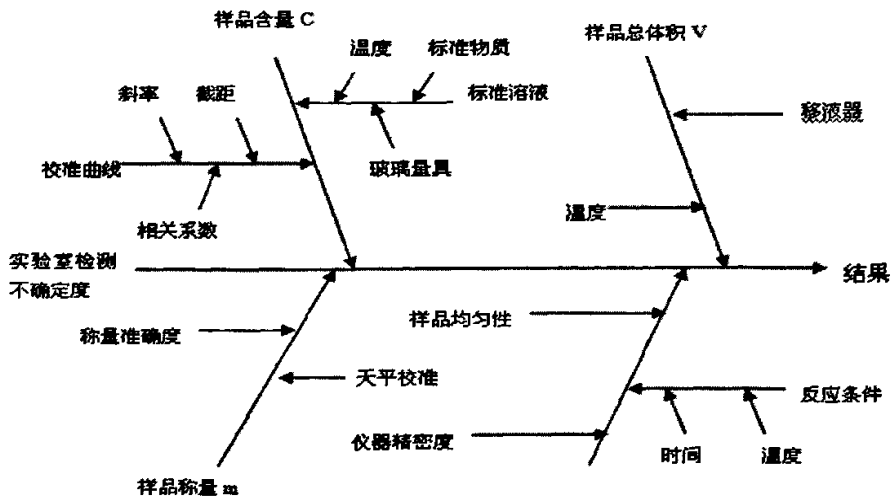


图 3.2 不确定度评定中引起的因素

3.5.1 样品称量 m 的相对标准不确定度 $U_{C(m)}_{rel}$

按使用说明书进行操作，样品称取 3.0g，为计算方便，设实际称量为 3.000g。天平（FA1640S）称量不确定度来自两个方面：

一方面是称量的变动性，在 50g 以内，变动性标准偏差为 0.07mg；

另一方面是天平校正产生的不确定度，按天平检定证书给出的在 95%置信度时为 ±0.1mg，换算成标准偏差为 $\frac{0.1}{1.96} = 0.052$ 。

将此两项合成得出称样的相对标准不确定度为：

$$U_{C(\text{称样})rel} = \frac{\sqrt{(0.07 \times 10^{-3})^2 + (0.052 \times 10^{-3})^2}}{3.000} = 2.91 \times 10^{-5}$$

3.5.2 样品稀释准备的相对标准不确定度 $U_{C(\text{样品})rel}$

a 甲醇纯度的不确定度 $U_{C(\text{甲醇})rel}$

甲醇纯度为 (99.9±0.1) %，按均匀分布转换成标准偏差即相对标准不确定度为：

$$U_{C(\text{甲醇})rel} = \frac{0.001}{\sqrt{3}} = 0.0058$$

b 配制甲醇水提取液体积的相对标准不确定度 $U_{C(V_{\text{提取液}})rel}$

采用 10mL A 级单标移液管进行操作（见表 3.1）：先取 80mL 甲醇于 100mL 容量瓶中，定容到刻度线，然后移取 9mL 甲醇水提取液到样品中进行 AFB₁ 提取，整个过程的标准不确定度来源为：

第一，容量瓶体积的不确定度，按检定证书给定为 ±0.10，按照均匀分布换算成标准偏差为： $\frac{0.10}{\sqrt{3}} = 0.0577mL$

第二，充满液体主容量瓶刻度的变动性，可通过重复称量测定进行统计，例如重复 10 次称量统计标准偏差为 0.067mL。

第三，容量瓶和溶液的温度与校正时的温度不同引起的体积不确定度。假设温差为 3℃，对水体积膨胀系数为 $a = 2.1 \times 10^{-4}/^{\circ}C$ ，则 95%置信概率（ $K = 1.96$ ）时体积变化的区间为： $\pm 100 \times 3 \times 2.1 \times 10^{-4} = \pm 0.0630mL$ ，换算成标准偏差为 $0.0630/1.96 = 0.0321mL$ 。

将以上三项合成，则：

$$U_{C(V_{\text{提取液}})rel} = \sqrt{(0.0115)^2 + (0.067)^2 + (0.0577)^2 + (0.0321)^2} \\ = 9.477 \times 10^{-2} mL$$

则

$$U_{C(v_{\text{提取液}})_{\text{rel}}} = \frac{9.477 \times 10^{-2}}{100.00} = 9.477 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

表 3.1 常用玻璃仪器引起的不确定度^[27]

玻 璃 器 具	最大允差 mL	标准不确定度	相对标准不确定度
10mL 单标线吸管 A 级	±0.020	0.0115	$u_1 = 1.15 \times 10^{-3}$
100mL 单标线容量瓶 A 级	±0.10	0.0577	$u_2 = 5.77 \times 10^{-4}$
10mL 单标线吸管 A 级	±0.020	0.0115	$u_3 = 1.15 \times 10^{-3}$

c 移液枪稀释样品带来的不确定度 $U_{C(\text{稀释})_{\text{rel}}}$

造成的不确定度呈均匀分布^[75]，移液枪在其测量范围 10~100 μL (V_0) 内的最大允差为 $\pm 0.1\mu\text{L}$ ，由此带来的标准不确定度 $u_1 = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.0577 \mu\text{L}$ ，使用的加样体积为 50 μL ，

150 μL ，故其相对标准不确定度为：

$$u_{\text{rel1}} = 0.0577/50 = 0.0012, \quad u_{\text{rel2}} = \frac{0.0577}{100} + \frac{0.0577}{50} = 0.0018,$$

则： $U_{C(\text{稀释})_{\text{rel}}} = \sqrt{(u_{\text{rel1}})^2 + (u_{\text{rel2}})^2} = \sqrt{(0.0012)^2 + (0.0018)^2} = 2.163 \times 10^{-3} \text{ mL}$ ，标准不确定度以最大偏差估计，其自由度可取为无穷大，即， $V_1 = V_2 = \infty$

将以上三项合成，

则

$$U_{C(\text{提取})_{\text{rel}}} = \sqrt{(0.0058)^2 + (9.477 \times 10^{-4})^2 + (2.163 \times 10^{-3})^2} = 6.26 \times 10^{-3}$$

3.5.3 AFB₁ 标准品校准带来的相对标准不确定度 $U_{C(\text{标准})_{\text{rel}}}$

AFB₁ 标准品的不确定度有以下几部分组成：第一部分是通过对测量数据的标准偏差，测量次数及要求的置信水平按统计方法计算得出的；第二部分是通过对测量因素分析，估算出其大小；第三部分是物质的不均匀性和不稳定性所引起的；第四部分是 AFB₁ 标准品的称量、稀释等操作带来的不确定度。

我们将 $U_{C(\text{标准稀释})_{\text{rel}}}$ 简化为两方面：一方面是 AFB₁ 标准品母液浓度的相对标准不确定度为： $u_{(\text{标准品})_{\text{rel1}}} = \frac{0.02}{2.02} = 0.0099$ ；另一方面，是稀释 AFB₁ 标准品母液所带来的相对标

准不确定度 $U_{C(\text{标准稀释})rel}$ ，移液枪在其测量范围 1000 μL (V_0) 内的最大允差为 $\pm 1\mu\text{L}$ ，

由此带来的标准不确定度 $u_1 = \frac{1}{\sqrt{3}} = 0.5774 \mu\text{L}$ ，使用的加样体积为 1000 μL 稀释次数为 7

次，则其相对标准不确定度为：

$$u_{(\text{移液器})rel} = 0.5774/1000 = 5.77 \times 10^{-4},$$

$$U_{C(\text{标准稀释})rel} = 7 \times u_{(\text{移液器})rel} = 4.04 \times 10^{-3}$$

则

$$U_{C(\text{标准})rel} = \sqrt{(0.0099)^2 + 7 \times (5.77 \times 10^{-4})^2} = 1.002 \times 10^{-2}$$

3.5.4 ELISA 实验操作过程的不确定度 $U_{C(\text{实验})rel}$

a 微量移液器加样 $U_{C(\text{加样})rel}$

同 $U_{C(\text{稀释})rel}$ 计算类似，用最大允差为 $\pm 0.1\mu\text{L}$ ，微量移液器 100 μL (V_0) 使用的加样体积为 50 μL ，25 μL ，25 μL ，100 μL ，100 μL ，共计每孔 5 次，其测量范围内的由此

带来的标准不确定度 $u_1 = \frac{0.1}{\sqrt{3}} = 0.0577 \mu\text{L}$ ，所带来的相对标准不确定度为：

$$u_{rel11} = 0.0577/50 = 0.0012, \quad u_{rel22} = 0.0577/25 = 0.0023, \quad u_{rel33} = 0.0577/25 = 0.0023,$$

$$u_{rel44} = 0.0577/100 = 0.0006,$$

$$u_{rel55} = 0.0577/100 = 0.0006,$$

则

$$U_{C(\text{加样})rel} = \sqrt{(u_{rel11})^2 + (u_{rel22})^2 + (u_{rel33})^2 + (u_{rel44})^2 + (u_{rel55})^2} = 3.57 \times 10^{-3}$$

b 反应温度带来的相对标准不确定度 $U_{C(\text{温度})rel}$

使用隔水式恒温摇床培养箱来获得 ELISA 的反应温度为 37 $^{\circ}\text{C}$ 暗处温育 60min，25 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30min，根据隔水式恒温摇床培养箱的技术指标，其温度变动范围为 $\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ，按照均

匀分布换算成标准偏差为 $\frac{1.0}{\sqrt{3}} = 0.58^{\circ}\text{C}$ ，则：

则

$$U_{C(\text{温度})rel} = \sqrt{\left(\frac{0.58}{37}\right)^2 + \left(\frac{0.58}{25}\right)^2} = 0.0280$$

c 反应时间的相对标准不确定度 $U_{C(\text{时间})rel}$

在 ELISA 实验过程中, 反应时间也可能产生不确定度。根据日常实验的经验, 取反应时间变动范围为 $\pm 10\text{ s}$, 按照均匀分布换算成标准偏差为:

$$\frac{10}{\sqrt{3}} = 5.8\text{ s}$$

$$\text{则 } U_{C(\text{时间})rel} = \sqrt{\left(\frac{5.8}{60 \times 60}\right)^2 + \left(\frac{5.8}{30 \times 60}\right)^2} = 3.60 \times 10^{-3}$$

将上述三项相对标准不确定度合成,

则

$$\begin{aligned} U_{C(\text{实验})rel} &= \sqrt{\left(U_{C(\text{加样})rel}\right)^2 + \left(U_{C(\text{温度})rel}\right)^2 + \left(U_{C(\text{时间})rel}\right)^2} \\ &= \sqrt{\left(3.57 \times 10^{-3}\right)^2 + (0.0280)^2 + \left(3.60 \times 10^{-3}\right)^2} = 2.85 \times 10^{-2} \end{aligned}$$

3.5.5 酶标仪读数相对标准不确定度 $U_{C(\text{酶标仪})rel}$

从伯乐 550 酶标仪的技术指数中, 我们可以计算出它在分析读数时的不确定度。伯乐 550 酶标仪在 1~1.5 吸光度单位内的不确定度为 0.5%, 则:

$$U_{C(\text{酶标仪})rel} = 0.005$$

3.5.6 数据处理带来的相对标准不确定度 $U_{C(\text{计算})rel}$

在 ELISA 检测数据的最后处理时, 我们往往要做某些假设。因为我们所采用的 AFB₁ 标准点是有限的, 不管是手工作图还是电脑绘制曲线, 实际上都是一种近似的数据表达。我们通过所得到的标准曲线图形来读取和计算辣椒调味品中的 AFB₁ 含量, 在这个过程中, 我们就作了假设, 假设我们得到的标准曲线图形就是真实的标准图形, 这里就带来了数据处理上的不确定度。这个不确定度, 可以通过线性相关系数来反映。

我们所测量的样品中的 AFB₁ 含量值总是在一段标准曲线区间 (0.03~1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 呈线性关系), 则该段区间的曲线的线性相关系数就表征了该含量的不确定度。

根据实验过程中经验数据, $r=0.995$, 则近似 $U_{C(\text{计算})rel}=0.005^{[28]}$ 。

3.6 合成不确定度 $U_{C(\text{合成})rel}$

将各个分量进行不确定度合成, 结果见表 3.2。

表 3.2 合成不确定度各个分量

标准不确定度分量	不确定度来源	类型	相对标准不确定度	比重 (%)		
$U_{C(\text{称样})rel}$	$U_{\text{变动性}}$	A	0.07×10^{-3}	2.91×10^{-5}	0.053%	
	$U_{\text{天平校准}}$	A	0.052×10^{-3}			
$U_{C(\text{提取})rel}$	$U_{C(\text{甲醇})rel}$		B	0.0058	6.26×10^{-3}	11.42%
	$U_{C(\text{提取液})rel}$	$U_{\text{单罐取量}}$	B	0.0115		
		$U_{\text{容量瓶}}$	B	0.067		
		$U_{\text{容量瓶变动性}}$	A	0.0577		
		$U_{\text{容量瓶体积温度变动性}}$	A	0.0321		
$U_{\text{稀释率}}$		B	2.163×10^{-3}			
$U_{C(\text{标准})rel}$	$U_{\text{标准品}}$		B	0.0099	1.002×10^{-2}	18.28%
	$U_{\text{标准稀释}}$		B	4.04×10^{-3}		
$U_{C(\text{实验})rel}$	$U_{\text{加样}}$		A	3.57×10^{-3}	2.85×10^{-2}	51.99%
	$U_{\text{温度}}$		B	0.0280		
	$U_{\text{时间}}$		B	3.60×10^{-3}		
$U_{C(\text{酶标仪})rel}$	—		B	0.005		9.12%
$U_{C(\text{计算})rel}$	—		B	0.005		9.12%

将上述各项分相对标准不确定度进行合成，则得到 ELISA 测定辣椒调味品中 AFB₁ 含量的合成不确定度。

$$U_{C(\text{合成})rel} = \sqrt{U_{C(\text{称样})rel}^2 + U_{C(\text{甲醇})rel}^2 + U_{C(\text{提取})rel}^2 + U_{C(\text{标准})rel}^2 + U_{C(\text{实验})rel}^2 + U_{C(\text{酶标仪})rel}^2 + U_{C(\text{计算})rel}^2} = 3.17 \times 10^{-2}$$

3.7 扩展不确定度

将合成标准不确定度乘以给定概率的包含因子，得到扩展不确定度，取包含因子 $K=2$ （置信水平 $p=0.95$ ），

则：总不确定度： $U_{C(\text{总})} = K \times U_{C(\text{合成})rel} = 2 \times 3.17 \times 10^{-2} = 6.34 \times 10^{-2} = 6.34\%$

3.8 测量不确定度报告与表示

ELISA 法对辣椒调味品中 AFB₁ 含量测定结果为：

$X=2.875 (1 \pm 0.0634) \mu\text{g}/\text{kg}$, 置信概率 $p=95\%$,

或 $X=(2.875 \pm 0.1823) \mu\text{g}/\text{kg}$, 置信概率 $p=95\%$ 。

3.9 讨论

从上述不确定度分析可以看出, 采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测辣椒调味品中的 AFB₁ 含量, 在置信水平 p 为 0.95 时, 其相对不确定度为 6.34%。

由表 3.2 中可以看出, 影响测量结果的不确定度的分量主要是 ELISA 方法检测过程, 即加样量、温度、时间实验操作过程的准确性引起, 其次是标准溶液配制, 样品的提取, 酶标仪和计算的影响, 而样品称量的不确定度可以忽略。通过对辣椒调味品测量结果不确定度的分析与计算, 可知, 在样品的测量过程中, 注意样品处理操作过程的规范性, 可进一步减少测量结果的不确定度。

与其他分析方法的相对不确定度 2%~5% 相比较而言, 使用酶联免疫吸附法的相对不确定度较大, 这与 ELISA 方法本身的特性有关。具体有以下几点:

第一, ELISA 方法结合了抗原抗体的免疫反应和酶的高效催化反应, 检测限可达 pg 级, 且特异性好, 同其他方法相比, 在检测痕量物质方面具有明显的优点, 而痕量物质的检测必然伴随着较大的不确定度;

第二, 该方法需使用多种生化及免疫学、分子生物学试剂, 如: AFB₁ 标准品, 酶标抗原, 抗体, TMB, 等等。这些试剂可能产生的不稳定性对实验结果也会带来直接影响。而其他分析检测方法则没有这种情况;

第三, ELISA 方法在使用时, 还受到反应温度、反应时间、洗涤效果、人员操作等其他因素的影响, 这也是不确定度的重要来源。

综上所述, ELISA 方法适合于微量物质的检测, 适合于大批量样品的快速筛选检测, 在食品质量检测检验中有广泛的应用前景。

3.10 测量不确定度在分析测试结果判定中的应用

在食品检验中, 通常需要对检验结果是否符合标准 (国标) 规定做出判断。如图 3.3。

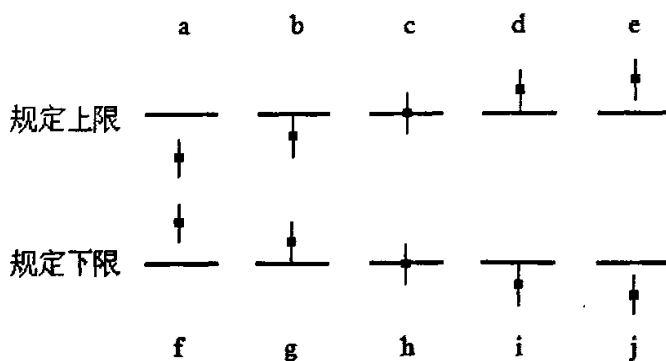


图 3.3 测量不确定度与测量结果的关系

当检测结果向上（或向下）扩展不确定度半宽度($1/2U$)后，其结果仍在规定的限度之内，则符合规定要求（图 3.3a, f）；当向下（或向上）扩展不确定度半宽度后，其结果仍超出上限（下限），则不符合规定要求（图 3.3e, j）；但当检验结果恰好是标准要求的极限值（图 3.3b, g），或者将检验结果向上（或向下）扩展不确定度半宽度，跨越了标准的极限值时（图 3.3c, d, h, i），应充分考虑测量不确定度的影响，此种情况出现时，样品应该进行重试且在做出是否符合标准规定时应允许充分考虑测量不确定度。

第四章 HPLC方法检测辣椒调味品中 AFB₁

4.1 前言

应用 GB/T 18979-2003 食品中黄曲霉毒素的测定, 免疫亲和层析净化高效液相色谱法进行对照实验。

4.2 高效液相色谱概述

高效液相色谱分析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 是 20 世纪 60 年代末期在经典柱色谱分析法的基础上于近年来迅速发展起来的一种快速分离分析技术^[29]。它综合了色谱技术的新成就, 引用了气相色谱的理论, 采用了先进仪器设备, 具有适用广、选择性宽、分离性能好、分析速度快、灵敏度高、结果精确、操作自动化等突出特点。高效液相色谱法不受样品的沸点、热稳定性、分子量的限制, 只要求把样品制成溶液, 从低分子到高分子都在适用范围之内 (约在化合物总数的 75~80%), 而且回收较容易。

4.3 免疫亲和层析净化高效液相色谱检测方法^[30]

4.3.1 方法提要

试样经过甲醇-水提取, 提取液经过滤、稀释后, 滤液经过含有黄曲霉毒素特异抗体的免疫亲和层析净化, 此抗体对黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 具有专一性, 黄霉毒素交联在层析介质中的抗体上。用水或吐温-20/PBS 将免疫亲和柱上杂质除去, 以甲醇通过免疫亲和柱洗脱, 洗脱液通过带荧光检测器的高效液相色谱仪柱后碘溶液衍生测定黄曲霉毒素的含量。

4.3.2 仪器和设备

a 实验室常规仪器、设备。

高速均质器: 18000r/min~22000r/min 产地: 中国 (JJF-II)

黄曲霉毒素免疫亲和柱 产地: 美国 (VICAM)

玻璃纤维滤纸: 直径 11cm, 孔径 1.5 μ m

玻璃注射器: 20mL 产地: 中国

玻璃试管: 直径 12mm, 长 75mm, 无荧光特性

高效液相色谱仪: 具有 360nm 激发波长和大于 420nm 发射波长的荧光检测器

岛津 产地: 日本 LC-10ATvp

空气压力泵

微量注射器：100 μ L

色谱柱：C₁₈ 柱（柱长 150nm，内径 4.6nm，填料直径 5 μ m）

甲醇溶液：（80+20）

b 高效液相色谱条件

流动相：甲醇-水（45+55）；流速：0.8mL/min；柱后衍生化系统衍生溶液：0.05% 碘溶液；

衍生溶液流速：0.2mL/min；反应管温度：70℃；反应时间：1min。

4.3.3 样品制备

a 提取

用电子天平准确称取辣椒调味品 25.0g 于 200mL 烧杯中，先加入 5.0g 氯化钠，再加入 100mL 甲醇-水（80+20）溶液，然后将其转移到均质器高速搅拌提取 3min。定量滤纸过滤，准确移取 15.0mL 滤液并加入 30.0mL 水稀释，用玻璃纤维滤纸过滤 1~2 次，至滤液澄清，备用。

b 净化

将免疫亲和柱连接于 10.0mL 玻璃注射器下。准确移取 10.0mL 辣椒调味品提取液注入玻璃注射器中，将空气压力泵与玻璃注射器连接，调节压力使溶液以约 6mL/min 流速缓慢通过免疫亲和柱。用 10mL 0.1% 的吐温-20/PBS 清洗，再以 10mL 水清洗柱子两次，弃去全部流出液，并使 2mL~3mL 空气通过柱体。准确加入 1.0mL 色谱级甲醇洗脱，流速为 1mL/min~2mL/min，收集全部洗脱液于玻璃试管中，供检测用。

4.3.4 质控参数测定

4.3.4.1 标准曲线制备

取上述 AFB₁ 标准品溶液稀释成浓度为：1.0，2.5，5.0，7.5，10ng/mL，用进样器分别吸取 20 μ L AFB₁ 标准品稀释液注入高效液相色谱仪，在上述色谱条件下测定标准溶液的响应值（峰高或峰面积），进一步拟合成 AFB₁ 标准曲线，见图 4.1。

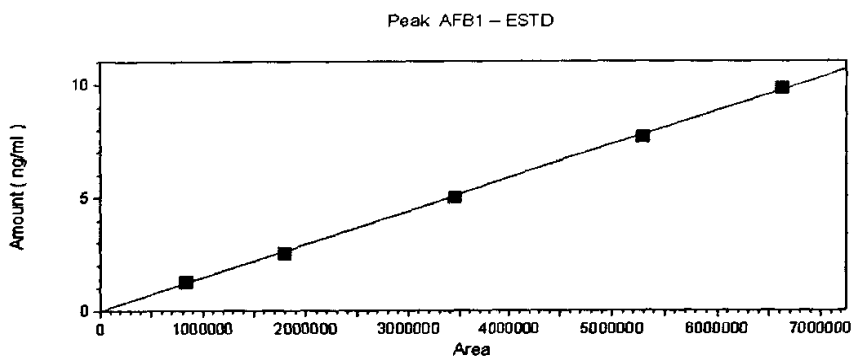


图 4.1 标准曲线

线性关系：在 0.0~10 ng/mL 范围，标准曲线方程为： $y=1.47052e-006x+0$

经过高效液相色谱仪拟合得相关系数为： $R=0.999921$ 。

4.3.4.2 HPLC 法加标样品测定

取辣椒调味品样品洗脱液 1.0mL，用进样器吸取 20 μ L 辣椒调味品洗脱液注入高效液相色谱仪，在上述色谱条件下测定标准溶液的响应值（峰高或峰面积），得到样品液中黄曲霉毒素 B₁ 浓度 c 的高效液相色谱图。见图 3.2。

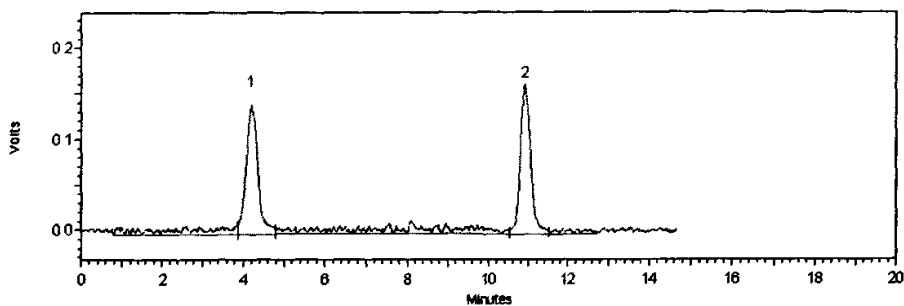


图 4.2 黄曲霉毒素 B₁ 的标准谱图

1—为溶剂峰 2—为 AFB₁

经过与黄曲霉毒素标准溶液谱图比较响应值得到辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 的浓度 AFB₁ 的含量为：见表 4.1 (μ g/kg)：

表 4.1 HPLC 法加标样品测定值

样品编号	1	2	3	4	5	6	\bar{X}
结果(X _i)	2.618	2.749	2.739	2.818	2.597	2.741	2.71

从表中得出，加标样品平均测定值为 2.71 μ g/kg。

4.3.4.3 加标回收率测定

加标回收的载体是样品油辣椒，本底值为 2.71 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，在样品中分别加 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，AFB₁ 标准品溶液，见图 4.3，4.4，4.5，表 4.2。

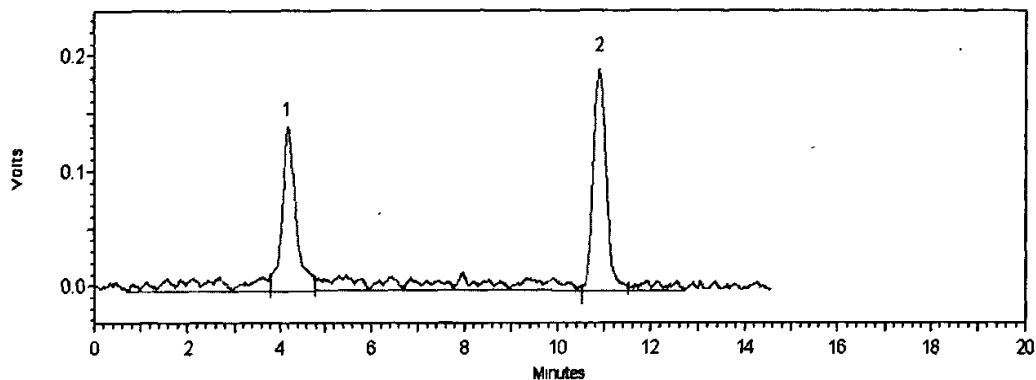


图 4.3 添加 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁
1—为溶剂峰 2—为 AFB₁

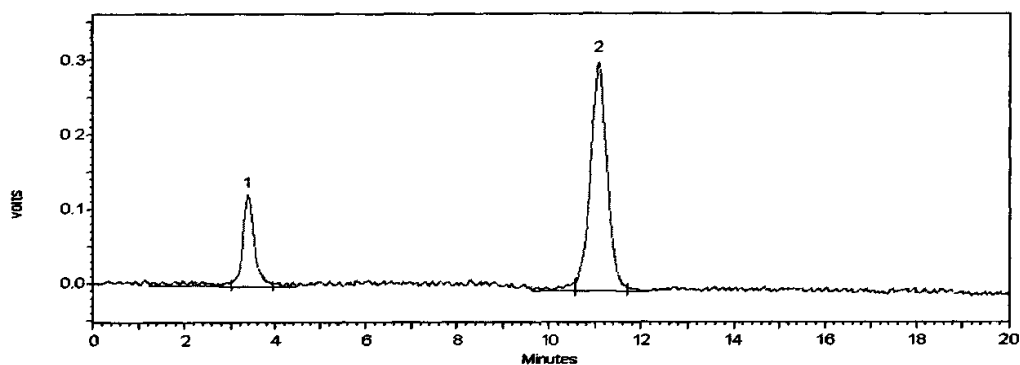


图 4.4 添加 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁
1—为溶剂峰 2—为 AFB₁

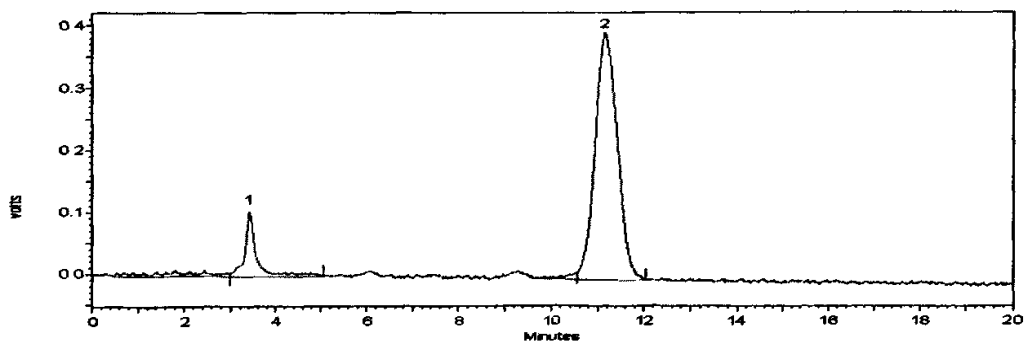


图 4.5 添加 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ AFB₁
1—为溶剂峰 2—为 AFB₁

表 4.2 HPLC 检测样品油辣椒中加标 1、5、10AFB₁μg/kg 回收率

编号 (六平行)	加标浓度 (μg/kg)	检测终浓度 (μg/kg)	HPLC 回收率	平均回收率
1	1	3.467	75.7%	75.53%
1		3.403	69.3%	
1		3.553	84.3%	
1		3.508	79.8%	
1		3.440	73.0%	
1		3.421	71.1%	
2	5	7.381	90.12%	87.8%
2		7.162	85.74%	
2		7.104	84.58%	
2		7.208	86.66%	
2		7.295	88.4%	
2		7.441	91.3%	
3	10	11.718	90.08%	90.82%
3		12.331	96.21%	
3		11.908	91.98%	
3		11.623	89.13%	
3		11.393	86.83%	
3		11.779	90.69%	
总平均回收率				84.72%

从表中可以得出，向加标样品中分别加1μg/kg、5μg/kg、10μg/kgAFB₁标准品溶液，HPLC方法检测回收率分别为75.53%、87.8%、90.82%，平均回收率达到84.72%。

4.3.5 ELISA法与GB/T 18979-2003 HPLC方法测定AFB₁结果的相关性

分别采用HPLC方法与ELISA方法对贵州出入境检验检疫局从贵州省辣椒调味品生产企业抽取有代表性的辣椒调味品10份样品进行ELISA方法测定，测定结果见表4.3，

4.4。

表 4.3 HPLC 对照样品测定值

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果(X _i)	3.626	2.622	0.441	2.845	4.356	3.627	4.137	5.247	6.476	4.023

表4.4 ELISA法对照样品测定

样品编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
结果(X _i)	3.568	2.701	0.436	2.618	4.431	3.032	4.227	5.449	6.233	4.137

依据ELISA方法与HPLC方法检测数据，通过拟合方法来确定这两种方法的相关性，结果见图4.6。

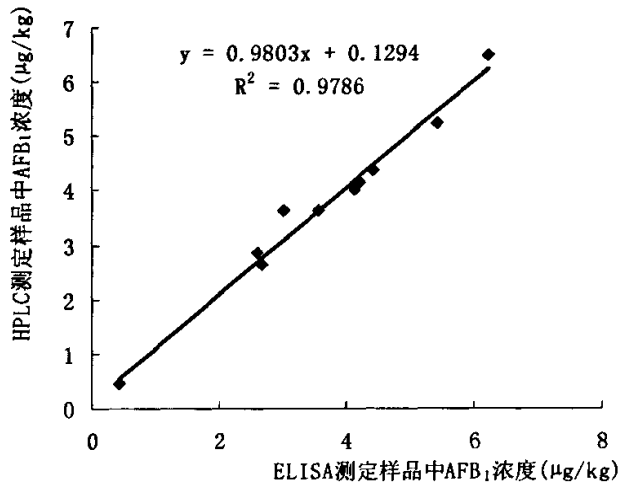


图 4.6 ELISA 测定样品中 AFB₁ 含量与 HPLC 方法的相关性

结果表明这两种方法存在良好的线性相关，回归方程为 $y = 0.9803x + 0.1294$ ，相关系数为：0.9786。

4.4 结论

通过与 GB/T 18979-2003 HPLC 方法对照，相关系数达到了 0.99921，平均回收率为 84.72。质控参数均达到中华人民共和国进出口商品检验行业标准 SN/T 0001—1995 出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检测方法标准编写的基本规定。应用 ELISA 方法和 HPLC 方法分别对照样品进行检测，依据检测数据进行相关性拟合，回归方程为： $y = 0.9803x + 0.1294$ 相关系数为：0.9786。从回归方程和相关系数中可以看出：ELISA 方法与 HPLC 方法相关性良好，AFB₁ 检测结果相一致。证实了建立的 ELISA 方法用于贵州省辣椒调味品分析中的可行性。该方法能够简单、快速、批量筛选出含 AFB₁ 辣椒调味品，大大缩短了检测时间和成本，具有灵敏度高、特异性强、精确度高、重复性好、污染少等优点，适于推广应用。

第五章 结论与展望

5.1 结论

5.1.1 本实验建立了 ELISA 方法检测辣椒调味品中 AFB₁ 含量评价指标, 验证了 ELISA 方法用于辣椒调味品中 AFB₁ 分析的可行性, 证实了样品溶液中 pH、含盐量、油脂等因素对响 ELISA 法测量辣椒调味品中 AFB₁ 检测结果带来的影响。实验证明: 控制辣椒调味品处理液 pH 值在 6.0~8.0 之间, 氯化钠含量控制在 10~20%左右, 用石油醚提取样品油脂后, 就可以将上述影响因素降至最低。

5.1.2 对 ELISA 法检测辣椒调味品中黄曲霉毒素进行了不确定度的评定, 分析产生不确定度的原因, 求出被测量的最佳值, 列出数学模型后, 对各不确定度分量分别进行评定, 再将不确定度分量进行合成, 计算扩展不确定度后正确给出不确定度报告。依照上述方法本人采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测辣椒调味品中的 AFB₁ 含量, 在置信水平 p 为 0.95 时, 其扩展不确定度为 6.34×10^{-2} 。从评定过程得出, 做好测量不确定度评估重点在于对检测方法、原理的理解、检测技术的掌握及检验经验的积累和运用, 找出产生不确定度的影响因素, 掌握不确定度评估的基本原则和评估方法。

5.1.3 通过 GB/T 18979-2003 免疫亲和层析净化高效液相色谱检测方法检测食品中 AFB₁ 进行了、实验, 质控参数中总平均回收率为 84.14%, 相关系数 0.999921, 标准曲线方程 $y=147052e-006x+0$ 。同时对 HPLC 方法与 ELISA 方法进行了验证实验, 通过对检测数据进行相关性分析, 拟合线性回归方程 $y = 0.9803x+0.1294$, 相关系数为 0.9786; 说明两种方法检测辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 的相关性良好, 从而证实了已建立的 ELISA 方法用于辣椒调味品分析的可行性。

5.1.4 本人根据建立的 ELISA 方法对贵州出入境检验检疫局在贵州省食品企业抽检有代表性出口辣椒调味品 120 件进行测定, 油辣椒系列 AFB₁ 含量为 1.693~3.025 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 糟辣椒系列 AFB₁ 含量为 0.632~1.079 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 香辣菜系列 AFB₁ 含量为 0.599~0.956 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 鸡辣椒系列 AFB₁ 含量为 1.119~1.874 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 风味豆豉系列 AFB₁ 含量为 3.979~6.391 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 肉丝豆豉系列 AFB₁ 含量为 3.614~4.696 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 辣三丁油辣椒系列 AFB₁ 含量为 1.917~2.742 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 初步掌握了辣椒调味品中 AFB₁ 污染情况。其中抽检样品均小于 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 并已出口美国、日本、欧洲国家。

5.2 展望

目前已经建立 ELISA 检测辣椒调味中 AFB₁ 方法已在检测中使用, 下一步准备对辣椒调味中三种原料中干红辣椒、大豆油、豆豉在制备过程中最容易受到霉菌的侵染进行系统分析, 确定 AFB₁ 的主要来源。

5.2.1 干红辣椒中 AFB₁ 分析

辣椒在采摘、晾晒、贮藏、运输等过程中, 由于环境条件及水分控制等问题, 极易引起霉变及霉菌毒素污染。所以, 原料干红辣椒为辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 的主要来源, 同时由于干红辣椒皮轻薄, 而且皮壳部位正是霉菌易生长繁殖的地方^[1], 所以, 在加工和检测过程中一定要将霉变干红辣椒剔除, 这样才能最大限度降低黄曲霉毒素含量。

5.2.2 大豆油中 AFB₁ 分析

大豆原料及其生产工艺中压榨、精炼、贮藏过程中很容易被黄曲霉毒素 B₁ 污染。大豆油成为辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 的另一主要来源, 因此, 在大豆油选择上严格按照国家标准规定不大于 10μg/kg, 这样才能减少大豆油对辣椒调味品中黄曲霉毒素的污染。

5.2.3 豆豉中 AFB₁ 分析

豆豉起源于我国先秦时代^[32], 其以大豆为原料经微生物发酵而制成的发酵豆制品, 一般是采用自然接种制曲的方法制作, 发酵过程一直是开放式的, 发酵过程的微生物主要是由空气中的微生物、工器具和操作不严格带来的。而豆豉是一种高蛋白食品, 其感染病原微生物和存在产毒微生物的几率是相当大的。因此, 原料豆豉成为辣椒调味品中黄曲霉毒素 B₁ 的主要来源, 在原料选择上对豆豉要严格控制。

通过对生产原料及工艺中 AFB₁ 做进一步研究, 找出辣椒调味品中 AFB₁ 的主要来源, 根据黄曲霉毒素的来源提出最佳控制方法, 达到减少辣椒调味品中 AFB₁ 污染的目的, 促进贵州辣椒调味品市场的出口, 为贵州经济繁荣做出贡献。

参考文献:

- [1] 孟昭赫, 张国柱, 宋圃菊. 真菌毒素研究进展. 人民卫生出版社, 1979.
- [2] 潘崴, 庞广昌. 黄曲霉毒素与食品安全. 食品研究与开发. 2004, 25(6): 11~13
- [3] 焦炳华, 谢正. 现代微生物毒素学. 福州: 福建科学技术出版社, 2000: 339~374.
- [4] 金征宇, 等. 食品安全导论. 化学工业出版社, 2005: 270~271.
- [5] 聂晶, 等. 黄曲霉毒素 M₁ 研究进展. 国内外医学分册, 1992, 3: 159~161.
- [6] 沈文. 食品中杂色曲霉毒素的测定方法, 食品卫生检验方法注解. 北京: 卫生部食品卫生监督检验所出版, 1987: 177~179.
- [7] 蒋成, 陶义训. 酶联免疫测定法. 北京人民卫生出版社, 1984.
- [8] 曹卫中, 陈勇. 崇明县居民肝癌死亡分析. 中国公共卫生. 2000, 16(7): 634
- [9] 吴永宁. 现代食品科学. 化学工业出版社, 2003: 284.
- [10] 袁森泉. 霉菌毒素污染饲料的处理方法. 广东饲料. 1999, 3: 1~3.
- [11] 局乃琥. 黄曲霉毒素. 轻工业出版社, 1980: 30.
- [12] 王晶, 王林, 黄晓蓉. 食品安全快速检测技术. 北京: 化学工业出版社, 2002: 91~94.
- [13] 赵飞, 焦彦朝, 连宾, 等. 黄曲霉毒素研究进展. 贵州农业科学. 2006(5): 124.
- [14] 李佐卿, 等. 免疫亲和柱 HPLC 快速测定蜂蜜中黄曲霉毒素 B₁, B₂, G₁, G₂. 光谱实验室, 2001, 18(1): 28~31.
- [15] GB/T5009.22-2003, 食品中黄曲霉毒素的测定.
- [16] 陶义川. 酶联免疫测定法. 北京: 人民出版社, 1984.
- [17] 焦奎, 张书圣. 酶联免疫分析技术及应用. 化学工业出版社, 2004: 121.
- [18] 李秀芳, 等. 酶联免疫吸附法测定玉米中 AFB₁ 的研究. 卫生研究. 1987. 16(1): 29~31.
- [19] 阳传和, 等. 小麦中 T-2 毒素酶联免疫吸附测定法. 环境科学学报. 1992, 12(3): 372~374.
- [20] 陈兰明, 陈永萱. 黄曲霉毒素 B₁ 直接竞争抑制 ELISA 快速筛选法的建立. 南京农业大学学报. 1998, 21(4): 62~65.
- [21] 高懿. 现代商检科技. 1999, 9(1): 5.
- [22] 国质检监[2002]192号. 关于印发小麦粉等5类食品生产许可证实施细则的通知国家质量监督检验检疫总局, 2002-07-21.
- [23] SN/T 0001—1995 出口商品中农药、兽药残留量及生物毒素检测方法标准编写的基

本规定。

- [24] 国家质量技术监督局. JJF1059-1999 测量不确定度评定与表示. 北京: 中国计量出版社, 1999.
- [25] 国家质量技术监督局. 测量不确定度评定与表示指南. 北京: 中国计量出版社, 2000.
- [26] 中国实验室国家认可委员会. 实验室认可与管理基础知识. 北京: 中国计量出版社, 2003: 66.
- [27] 中华人民共和国国家计量技术规程. JJG196-1990 常用玻璃量器. 北京: 中国计量出版社, 2000.
- [28] 赵春城, 等. 应用酶联免疫吸附法的实验不确定度分析. 检测技术. 2004(11): 33.
- [29] 夏立娅. 仪器分析. 中国计量出版社, 2006: 251.
- [30] GB/T18979-2003. 食品中黄曲霉毒素的测定. 免疫亲和柱层析净化高效液相色谱法和荧光光度法.
- [31] 彭健. 干红辣椒中黄曲霉毒素 B₁ 的判定. 中国调味品. 2002(2): 33.
- [32] 黄欣, 邓放明. 豆豉的研究进展. 中国食物与营养. 2006(11): 22.
- [33] Hussein S. Hussein, Je frey M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 2001, 167: 101~103.
- [34] Antonio FM, Renata RC, Myrna S. Occurrence of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in cooked food components of whole meals marketed in fast food outlets of the city of Sao Paulo, SP, Brazil. Food Addit Contam, 2001, (5): 445.
- [35] Ashworth, L., J.Amer. Oil Chem. Soc, 1971, 48: 129.
- [36] Yamazaki, M., et al., Appl. Microbiol, 1970, 20:452.
- [37] Eaton DL, Callagher EP. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1994, 34: 135~172.
- [38] Chu F S. Mut Rcs, 1991, 259: 291~306.
- [39] Boutibonnes, P., Jacquet, J., C. R. Soc BIOL, 1969, 163: 1119.
- [40] Campbell, T. C., Stoloff, L., J. Agr. Food Chem, 1974, 22: 1006.
- [41] Miguel MJ, Lucia MVS, Eduardo SS, et al. Aflatoxins, ochratoxin and zearalenone in Brazilian corn cultivars. J Sci Food Agri, 2001, 81: 1001.
- [42] Hassan G, Lloyd BB. Aspergillus and A. parasiticus: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds. J Food Prot, 1995, 58(12): 1395~1404.
- [43] Schuller, P. L., et al., J.Assoc. Offic. Anal. Chem, 1976, 59: 1315.

- [44] Elisabete YS, Mario A, Fabia Y, et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co₂occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Addit Contam*, 2001, 18(8): 719~729.
- [45] Butler, W. H.: "Mycotoxins in Human Health". 1971: 141.
- [46] Patricia A, Jin BW, Zhu YR, et al. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin₂DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (25): 14601~14606.
- [47] Huang J W. Kuhlman E G Fungi associated with dampingoff of Slash pine seedling in Georgia(USA) plant Disease, 1990 T 4: 27~30.
- [48] Wogan, G N. et al: *Cancer Res.* 1967, 27: 2370.
- [49] Shank, R. C.: *Food and Cosmet. Toxicol.* 1971, 9: 501.
- [50] Becroft, P. M. et al: *Brit. Med. J.* 1972, 4: 117.
- [51] Wogan, G N.: *Bact. Rev.* 1966(30): 460.
- [52] Tung, T. C. et al: *J. of Vitaminology*, 1968, 14: S48.
- [53] A. H. W. Abdulkadar, Abdulla Al-Ali and Jassim Ai-Jedah. Aflatoxin contamination in edible nuts imported in Qatar. *Food Control.* 2000, 11(2): 157~160.
- [54] Wogan, G N. et al: *Ann. New York Acad. Sci*, 1970, 174: 723.
- [55] Wogan, G N. et al: *Ann. In Adrances in Environmental Science and Technology* vol. II. 1971, p. 321.
- [56] Patterson, D. S. P. et al: *Food Cosmet. Toxincol*, 1970, 8: 43.
- [57] Detroy, R. W. et al: "Microbial Toxins" vol. VI, 1971, p. 135.
- [58] S. Nesheim, M. W. Trucksess, S. W. Page, *J. AOAC Int.* 1999, 82: 251~258.
- [59] J. M. Daniels, L. Liu, R. K. Stewart, T. E. Massey, *Carcinogenesis*, 1990, 11: 823~827.
- [60] J. M. O. Moss, *Int. Biodet. Biodegr.* 2002.
- [61] World Health Organization, *Technical Reports Ser. No.399, Microbiological Aspects of Food Hygiene*, Geneva, 1968, p. 21.
- [62] Trucksess MW, Dombrink2Kurtzman MA, Tournas VH, et al. Occurrence of aflatoxins and fumonisins in Incaparina from Guatemala. *Food Addit Contam*, 2002, 19 (7): 671~675.
- [63] Candlish AAG, Pearson SM, Aidoo KE, et al. A surey of ethnic foods for microbial quality and aflatoxin content. *Food Addit Contam*, 2001, 18(2): 129~136.

- [64] "Natural Poisons" Chap 26. official Method of Analysis. Association of official Analytical Chemists. 1984(26): 14~25.
- [65] W. J. Bachman and J. T. Stewart. HPLC Postcolumn Derivatization Techniques. Lc-Gc. 1989(38): 7, 7.
- [66] J. Jaimez, et al. Application of the assay of Aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. Journal of chromatography A, 2000, 882: 1~10.
- [67] Dawlatana, M., Coker, M. D., Nagler, M. J., Blunden, G. British Journal of Biomedical Sciences 1996, 55, 84~85.
- [68] Chu F S Usno I. Appl and Environ Microbiol. Published by the American Society for Microbiology, 1977(5): 1125~1128.
- [69] Peter, M, Scottand Guillaume A. L. Journal Of AOAC International, 1997, 800: 1229~1234.
- [70] Chu F S, et al. preparation and characterization of aflatoxin B₁-O-carboxymethyl oxime. J Assoc Off Anal Chem, 1977, 60(6): 791.
- [71] Chu F S, et al. production of antibody against aflatoxin B₁ Appl. Environ. Microbiol, 1977, 33(5): 1125.
- [72] Lawellin D W et al.: Enzyme-linked Immunosorbent Analysis of Aflatoxin B₁. Appl Environ Microbiol 1977, 34: 94~96.
- [73] M. J. Albert. Enteric adenoviruses. Archives of Virology. 1986, 88: 1~2.
- [74] BIPM; IEC; IFCC; ISO; IUPAC; IUPAP; OLML, Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM). 1st edition, the International Organization for standardization, Geneva, 1995.
- [75] Technical data of Eppendorf Instruction Manual, 2000: 24.

致 谢

在贵州大学三年紧张而充实的研究生学习生活中，我的导师焦彦朝研究员和连宾研究员自始至终无论在学习上还是科研上都给予了我悉心的关怀和指导，焦导师和连导师渊博的学识和科学的思维方法使我深受教育和启发，他们深厚的专业功底，开拓创新的精神使我由衷地敬佩。焦导师和连导师谦逊、宽厚的为人风范为我树立了榜样！这三年中我不仅学到了很多知识，更学到了做人的道理，使我完成学业的同时，也得到了全面的发展和提高。

本研究是在导师焦彦朝研究员和连宾研究员的悉心指导下完成的。从论文的选题、资料收集、实验设计、实验实施到论文的撰写，无不倾注着导师的心血。导师渊博的知识和严谨的治学态度及崇高的师德让我受益匪浅。

饮水思源！在此论文完成之际：

感谢贵州大学化学工程学院为我提供攻读硕士学位的机会，感谢贵州出入境检验检疫局领导为我提供了优越的实验条件。感谢贵州出入境检验检疫局李颖老师，蔡秋老师，朱明老师，李春萍老师，舒丹丘老师在实验过程中给我的大力支持和帮助。在这里，我要重点感谢我的导师焦彦朝研究员和连宾研究员，如果没有两位导师的心血付出，就不会有我今天的研究论文的完成；如果没有两位导师在生活上所给予的无私关怀，也就不会实现我今天的梦想，学生由衷地表示最诚挚的谢意！

感谢每一个关心和帮助过我的老师和同学们！

特别感谢我的家人给我无微不至关怀，衷心感谢他们多年来给予我深深的理解和默默无闻的支持！

值此论文付梓之际，感谢所有关心帮助我的老师、同学、亲戚、朋友，没有你们的支持，将不会有我今天的成果。谢谢你们！

附 录

研究生期间发表的论文:

- 1、赵飞, 焦彦朝, 连宾, 刘晶. 黄曲霉毒素研究进展. 贵州农业科学. 2006(5): 123~126.
- 2、焦彦朝, 赵飞. 增强检验检疫能力 积极应对外来生物入侵. 贵州农业科学. 2006(5): 129~133.
- 3、田永峰, 吴天祥, 胡晓瑜, 赵飞. 乳酸菌在酿造和食品工业上的应用. 酿酒科技. 2007(4): 90~93.

研究生期间助研情况:

应用酶联荧光技术快速检测辣椒调味品葡萄球菌肠毒素, 借助微型全自动荧光酶标分析仪建立同步 (即: 一次可筛选辣椒调味品中一型或多型葡萄球菌肠毒素) 简便、快速、高灵敏度的方法, 检测时间只需 2 小时 (含样本处理时间), 灵敏度达到同类研究的先进水平。即: 1 μ g/kg。