

茶叶中黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法研究

吴国华¹, 赵榕¹, 里南², 王雄^{2*}

(1. 北京市疾病预防控制中心, 北京 100029; 2. 北京中检维康生物技术有限公司, 北京 100044)

摘要: **目的** 针对茶叶中黄曲霉毒素 B₁ 的检测, 对比胶体金免疫层析法、高效液相色谱、酶联免疫法的差异。**方法** 以红茶、绿茶、花茶为基质, 进行方法验证。并选取具有代表性的红茶、绿茶、乌龙茶、及花茶、萃取茶、药用保健茶分别用不同的方法检测。**结果** 改良后的液相法和胶体金免疫层析法准确度和精密度较高, 酶联免疫法存在假阳性。随机检测 11 种茶叶仅有一种检出黄曲霉毒素 B₁。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 茶叶; 定量检测

Determination methods of aflatoxin B₁ in tea

WU Guo-Hua¹, ZHAO Rong¹, LI Nan², WANG Xiong^{2*}

(1. Beijing Centers for Diseases Control and Prevention, Beijing 100013, China;
2. Beijing Clovertech Limited Company, Beijing 100044, China)

ABSTRACT: Objectives To compare the three different methods for the determination of aflatoxin B₁ in tea samples, including gold immune chromatography assay (GICA), high performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** Method validation was done based on black tea, green tea and jasmine tea. And black tea, green tea, oolong tea, jasmine tea, extracted tea, medicinal health tea as representatives were detected with different methods. **Results** Both of optimized GICA and HPLC achieved high accuracy and precision. ELISA assay produced fake positive. Only one of eleven tested samples had aflatoxin B₁ in random test.

KEY WORDS: aflatoxins B₁; tea; quantitative detection

1 引言

黄曲霉毒素是一组化学结构类似的二呋喃香豆素衍生物^[1], 已被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为类致癌物。黄曲霉毒素广泛存在于农产品及其加工产品、乳及乳制品中, 并已引起广泛关注。我国^[2]和国际上许多国家都已制定粮食和食品中黄曲霉毒素的相关限量标准。我国是茶叶产销大国, 而目

前尚无茶叶中黄曲霉毒素的限量标准。2011 年有调查发现普洱茶中黄曲霉毒素检出率较高^[3], 茶叶成为新的被污染对象引起注意。目前检测茶叶中黄曲霉毒素的方法主要有液相色谱法^[4-6]、超高效液相色谱法^[7]、荧光光度法^[6]、酶联免疫法、胶体金免疫层析法等。这些方法有些存在前处理复杂的问题, 有些甚至存在假阳性。为此, 本研究通过几种典型茶叶的验证试验, 对比不同方法的差异, 并对前人液相方

基金项目: 质检公益性行业科研专项(201210086)

Fund: Supported by Special Fund for AQSIQ-Scientific Research in the Public Interest (201210086)

*通讯作者: 王雄, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测与超微量分析化学。E-mail: wangx@clovertex.com

*Corresponding author: WANG Xiong, Senior Engineer, Beijing Clovertech Limited Company, No.56A South Street, Zhongguancun, Fangyuan Mansion, Suite B0201, Beijing 100044, China. E-mail: wangx@clovertex.com

法的前处理方法加以改善以提高检测准确度。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

红茶、绿茶、乌龙茶、及花茶、萃取茶、药用保健茶等,购于超市。

黄曲霉毒素 B₁ 标准品(3 μg/mL, 美国 Sigma 公司); 黄曲霉毒素免疫亲和柱(IAC-SEP[®]AFLA, 北京中检维康技术有限公司); 胶体金免疫层析定量快检卡(iCheck AFLA, 北京中检维康技术有限公司); 甲醇(提取用): 分析纯, 上海国药有限公司; 甲醇(液相用): 色谱级, 美国 JT.Baker 公司。

2.2 仪器设备

高效液相色谱仪(日本 HITACHI 公司); 荧光检测器(日本 HITACHI 公司); 旋转混合器(RE-52AA, 上海振捷); 氮吹仪(DCY-12S, 青岛海科); 免疫亲和柱泵流系统(6 位泵流操作架, 北京中检维康技术有限公司); 酶标仪(MK-3Ex, 北京中检维康技术有限公司); 快检仪(iCheck-III, 北京中检维康技术有限公司)。

2.3 仪器条件

液相色谱条件: 色谱柱: Cloversil-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(45:55, v:v); 流速: 1.0 mL/min; 检测器: 荧光检测器, 激发波长 360 nm, 发射波长 440 nm; 进样体积: 20~100 μL; 光化学衍生化系统: Aura PHRED(连接于色谱柱后, 色谱柱与荧光检测器之间)。

酶标仪条件: 检测波长 450 nm, 参考波长 630 nm。

2.4 实验方法

2.4.1 免疫亲和层析净化-高效液相色谱法

(1) 标准曲线

分别以甲醇稀释 0.5、1.0、5.0、10、20 ng/mL 的标准系列, 依次进样, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标绘制标准曲线。

(2) 样品提取及稀释

准确称取试样 5.0 g, 加入 0.5 g 氯化钠, 50.0 mL 60%乙腈-水, 混合均匀。用摇床混合 30 min 或旋转混合器混合 15 min, 槽纹滤纸过滤, 准确移取 5.0 mL 滤液并加入 20.0 mL 0.1%的吐温/PBS 稀释, 用玻璃

纤维滤纸过滤, 至滤液澄清, 备用。加标样品加标后放置 4 h 再进行提取操作。

(3) 样品的净化

将免疫亲和柱连接于 20 mL 玻璃注射器下。准确移取 15.0 mL 样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 2 mL/min(1 滴/秒)流速缓慢通过免疫亲和柱, 直至 2~3 mL 空气通过柱体。以 2~3 mL/min(1~2 滴/秒)流速用 10 mL 0.1%的吐温/PBS 淋洗柱子 1 次, 再以 10 mL 水淋洗柱子 1 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 色谱级甲醇洗脱, 流速为 1~2 mL/min(1 滴/秒), 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 加入 1.0 mL 纯水, 混匀, 供检测用。

2.4.2 酶联免疫法

标准曲线浓度: 0、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 ng/mL。检测操作步骤参照产品说明书: 取 5.0 g 样品加入 25.0 mL 70%甲醇-水, 振荡 10 min 后过滤, 吸取滤液加入稀释缓冲液混匀后依此进行点板、孵育、洗板, 显色后终止反应, 于酶标仪中读取结果。

2.4.3 胶体金免疫层析法

标准曲线内置, 无需配置。检测操作步骤参照产品说明书: 样品经提取后将提取液点入胶体金免疫层析定量快检卡, 恒温(37 °C)温育 10 min 后放入快检仪读取结果。

3 结果与分析

3.1 方法验证

在线性范围内, 液相法的标准曲线相关系数 $R^2=0.9992$, 酶联免疫法零点 OD 值大于 1.8, 浓度变异系数小于 0.5%。选择三种经液相色谱法和胶体金免疫层析法检测低于检出限的样品, 分别加入不同水平的黄曲霉毒素 B₁。由于目前我国及国际上均没有茶叶中黄曲霉毒素的限量标准, 故参考国标^[2]食品中黄曲霉毒素的最低限量 5 μg/kg, 及其 2 倍值 10 μg/kg 进行加标回收实验。加标样品经各自的检测方法检测后计算回收率和相对标准偏差(RSD, %)。由于用酶联免疫法未检测出黄曲霉毒素 B₁ 含量较低的样品, 故未做方法验证。从下表的结果可以看出, 改良后的液相色谱法和胶体金免疫层析法准确度和精密度较高。胶体金方法的稳定性较好, 基本排除了基质干扰。

表 1 茶叶黄曲霉毒素 B₁ 加标回收结果(n=3)
Table 1 Recovery results of aflatoxin B₁ spiked tea (n=3)

样品基质	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	液相法			胶体金法		
		平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	RSD(%)	平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	RSD(%)
红茶	10	9.37	93.7	5.74	9.43	94.3	8.97
	5	4.78	95.6	10.3	4.14	82.7	12.4
花茶	10	9.83	98.3	3.72	8.95	89.5	5.21
	5	4.56	91.2	6.83	4.02	80.3	3.28
绿茶	10	8.74	87.4	7.85	9.25	92.5	7.83
	5	4.61	92.2	8.26	4.67	93.4	5.42

表 2 茶叶黄曲霉毒素 B₁ 含量检测结果($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Table 2 Test results of aflatoxin B₁ content in tea

样品	液相	胶体金	酶联	样品	液相	胶体金	酶联
红茶-1	ND	ND	34.9	花茶-1	ND	ND	30.8
红茶-2	ND	ND	32.1	花茶-2	ND	ND	26.7
绿茶-1	ND	ND	27.8	萃取茶-1	ND	ND	24.2
绿茶-2	ND	ND	20.1	萃取茶-2	ND	ND	32.9
绿茶-3	ND	ND	27.8	保健茶	0.28	ND	30.2
乌龙茶	ND	ND	20.3				

注：ND 代表未检出。

表 3 优化前后的液相方法检测结果对比
Table 3 Contrast results of before and after optimized liquid chromatography detection

样品基质	加标水平($\mu\text{g}/\text{kg}$)	优化后(n=3)		优化前(n=2)	
		平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)	平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率(%)
红茶	10	9.37	93.7	4.43	44.3
	5	4.78	95.6	1.76	35.2
绿茶	10	8.74	87.4	6.25	62.5
	5	4.61	92.2	2.83	56.6

3.2 样品检测

采用三种方法检测红茶 2 种、绿茶 3 种、乌龙茶 1 种、花茶 2 种、萃取茶 2 种、药用保健茶 1 种。通过结果对比发现，酶联免疫法检测假阳性率很高。可能是茶叶中的色素等物质对酶的显色造成干扰，导致最终吸光度降低，结果偏高。同时发现所检测 11 种茶叶检出率不高，液相仅检出 1 种茶叶含有黄曲霉

毒素 B₁，而胶体金法由于检出限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，所有样品均未检出。

3.3 液相方法优化

采用本研究优化的液相方法与标准中的液相方法^[6,8]对比可以看出，标准方法在茶叶(红茶、绿茶)中适用性比较局限，回收率结果不理想。经过优化后的方法更适合茶叶样品中黄曲霉毒素 B₁ 的检测。

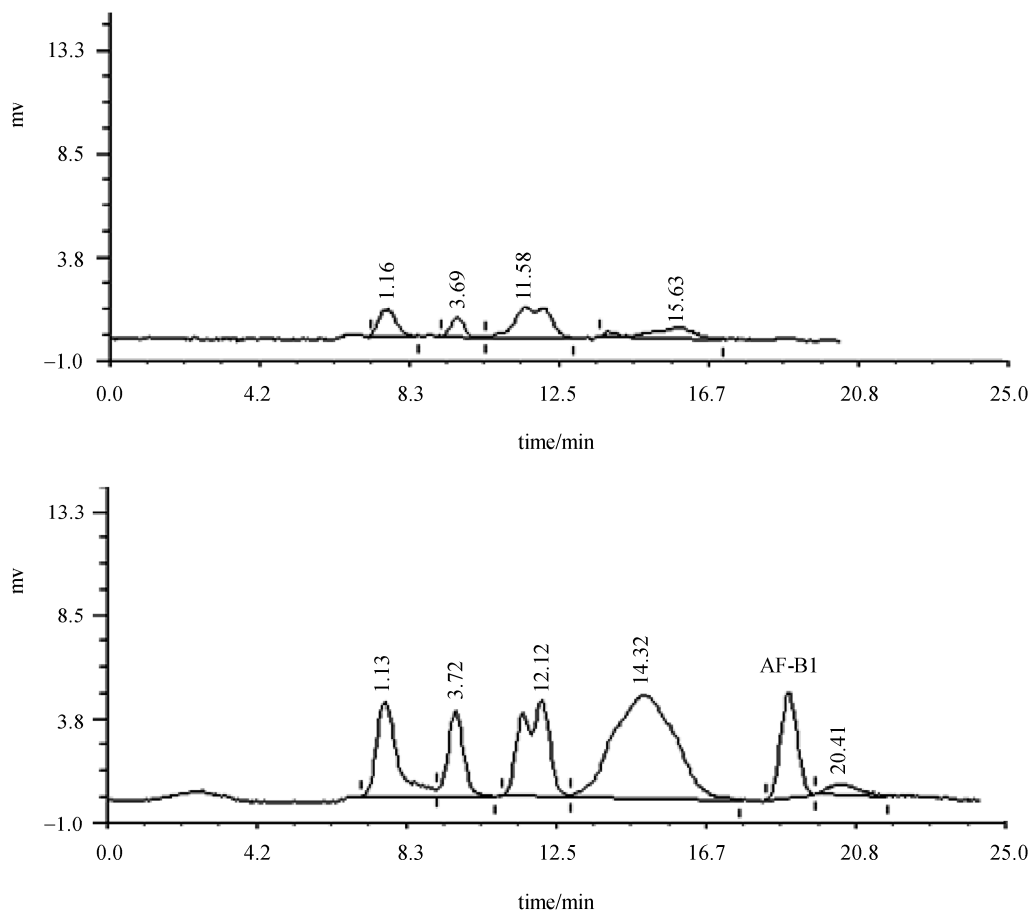


图 1 方法优化后的红茶本底(上)与加标 5 µg/kg(下)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank tea (up) and blank tea spiked 5 µg/kg AFB₁ (down) after optimization.

4 结 论

采用酶联免疫法检测茶叶中的黄曲霉毒素 B₁ 普遍存在假阳性, 容易造成误判。改良后的液相色谱法茶叶中黄曲霉毒素 B₁ 的检出限为 0.3 µg/kg, 稳定性和准确性较好, 比标准方法在检测茶叶样品时的回收率提高 24.9% 以上, 适用性更强, 可以推广使用。且与同类方法比较具有前处理简单, 无需固相萃取小柱净化^[5,7]。作为一种样品初筛方法, 胶体金免疫层析法在检测茶叶黄曲霉毒素的应用上表现出可以同液相方法媲美的优良性能。该方法操作简单, 节约时间和耗材, 但不足是检测下限比较高(2.5 µg/kg)。通过此次小规模调查也发现, 检测的 11 种样品均不含或只含较低含量的黄曲霉毒素 B₁, 与 1998 年克罗地亚^[9]的调查结果相近(11 份样品仅 1 份检出), 比 2012 年广州^[3]的调查结果(70 份检出率 100%, 大于 5

µg/kg 的达 11.4%) 乐观。同时更有调查表明^[10]茶叶可通过抑制 aflR 和 aflS 转录抑制黄曲霉毒素产生。有关科研工作者可进一步开展调查以确定茶叶中黄曲霉毒素的污染情况。

参考文献

- [1] 张义兵, 鲍蕾, 褚庆华. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
Zhang YB, Bao L, Chu QH. Test analysis of mycotoxins in agricultural products [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
- [2] GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. China Standard GB2761-2011 Maximum levels of mycotoxins in foods [S].
- [3] 陈建玲, 李文学, 杨光宇, 等. 广州某茶叶市场普洱茶中多种生物毒素污染现状调查[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(1): 68-71.

- Chen JL, Li WX, Yang GY, *et al.* Contamination of pu'er tea in Guangzhou tea market [J]. *Carcinogen Teratogen Mutagen*, 2011, 23(1): 68–71.
- [4] 陈家华. 高效液相色谱测定茶叶中黄曲霉毒素[J]. *中国茶叶*, 1991, 13(1): 10–11.
- Chen JH. Determination of aflatoxin in Tea by HPLC [J]. *China Tea*, 1991, 13(1): 10–11.
- [5] 赵浩军, 王坤, 杨卫花, 等. 高效液相色谱柱后光化学反应-荧光检测茶叶中黄曲霉毒素 B₁[J]. *茶叶科学*, 2013(3): 237–241.
- Zhao HJ, Wang K, Yang WH, *et al.* Determination of Aflatoxins B₁ in Tea by High Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detector with Post-column Photochemical Reaction [J]. *J Tea Sci*, 2013(3): 237–241.
- [6] SN/T 3263-2012 出口食品中黄曲霉毒素残留量的测定[S].
- SN/T 3263-2012 Determination of aflatoxins residues in foods for export [S].
- [7] 付朝晖, 黄雪祥, 闵顺耕. 超高效液相色谱法快速测定发酵茶叶中的黄曲霉毒素[J]. *分析试验室*, 2009, 28(6): 112–115.
- Fu CH, Huang XX, Min SG. Rapid Determination of Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in fermented tea by ultra performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Lab*, 2009, 28(6): 112–115.
- [8] 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和荧光光度法[S].
- GB/T 18979-2003 Determination aflatoxins content in food-Cleanup by immunoaffinity chromatography and determination by high-performance liquid chromatography and fluorometer [S].
- [9] Halt M. Moulds and mycotoxins in herb tea and medicinal plants [J]. *Eur J Epidemiol*, 1998, 14(3): 269–274.
- [10] Mo HZ, Zhang H, Wu QH, *et al.* Inhibitory effects of tea extract on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* [J]. *Appl Microbiol*, 2013, 56(6): 462–466.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介

吴国华, 主任检验师, 研究方向为食品安全与营养检测。
E-mail: wugh0410@163.com

王雄, 博士, 高级工程师, 研究方向为食品安全检测与超微量分析化学。
E-mail: wangx@clovertex.com