

食用油中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒的质量评价

叶雅真¹, 骆和东¹, 张淑琼¹, 叶子欢²

(1. 厦门市食品药品质量检验研究院, 福建 厦门 361012; 2. 同安区市场监督管理局, 福建 厦门 361100)

摘要:依据食药监办科[2017]43号《食品快速检测方法评价技术规范》和 KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测 胶体金免疫层析法》制定评价方案, 对目前福建省内应用较广的 4 种食用油中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测胶体金试剂盒产品进行质量评价。结果表明: 4 个品牌产品中, 只有 2 个品牌产品符合要求, 不同品牌产品的黄曲霉毒素 B₁ 检测效果存在差异。为确保食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的快检监管效果, 结合试剂盒评价结果和市场调研情况, 建议快检试剂盒产品须经质量评价合格再投入使用, 并不定期对产品进行跟踪评价。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 胶体金免疫层析; 食用油; 质量评价; 食品安全快速检测

中图分类号: TS227; TQ646

文献标识码: A

文章编号: 1003-7969(2022)02-0091-05

Quality assessment of kits for rapid detection of aflatoxin B₁ in edible oil

YE Yazhen¹, LUO Hedong¹, ZHANG Shuqiong¹, YE Zihuan²

(1. Xiamen Institute for Food and Drug Quality Control, Xiamen 361012, Fujian, China; 2. Market and Quality Supervision Commission of Tong'an Municipality, Xiamen 361100, Fujian, China)

Abstract: According to the technical specification on the assessment of food rapid detection (Food and Drug Administration Office [2017] No. 43) and the colloidal gold immunochromatographic method in the rapid detection of aflatoxin B₁ in edible oil (KJ 201708), the colloidal gold kit for rapid detection of aflatoxin B₁ in four kinds of edible oils widely used in Fujian province was evaluated. The results showed that among the four brand products, only two brand products met the requirements, and the detection effects of different brand products were different. In order to ensure the regulatory effect of rapid detection of aflatoxin B₁ in edible oil, combined with the evaluation results of the kit and market research, it was recommended that the products of the rapid detection kit should be put into use after passing the quality evaluation, and the products should be tracked and evaluated from time to time.

Key words: aflatoxin B₁; colloidal gold immunochromatography; edible oil; quality assessment; rapid detection for food safety

黄曲霉毒素是毒性极强的致肝癌物质, 于 1993 年被世界卫生组织 (WHO) 的癌症研究机构划定为 I 级致癌剂, 具有致癌、致畸、致突变作用, 其含量为 1 μg/kg 时即可诱发癌变^[1]。已发现的黄曲霉毒素有 20 多种, 其中黄曲霉毒素 B₁ 的毒性最大、致癌性最强^[2]。黄曲霉毒素对食品的污染主要存在于

粮食和油料中, 其中以花生、玉米、小麦和大米最为严重^[1,3]。黄建锋等^[4] 对全国 9 大城市花生油黄曲霉毒素 B₁ 的调查发现, 其平均超标率为 3.4%; 程恒怡等^[5] 对广西居民食用植物油黄曲霉毒素 B₁ 膳食暴露评估发现, 食用植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的超标率为 25.56%, 其中花生油中黄曲霉毒素 B₁ 的超标率达 31.51%; 邓幸飞等^[6] 对不同生产企业中花生原料和花生油中黄曲霉毒素 B₁ 的污染分析发现, 小作坊花生油中黄曲霉毒素 B₁ 的超标率为 11.8%。为此, 世界各国纷纷制定了食品中黄曲霉毒素的限量标准。GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品

收稿日期: 2021-02-24; 修回日期: 2021-03-30

基金项目: 厦门市市场监督管理局科技项目 (XMSJ202009)

作者简介: 叶雅真 (1982), 女, 高级工程师, 硕士, 主要从事食品检验与食品安全研究方面的工作 (E-mail) 297089562@qq.com。

中真菌毒素限量》中明确规定:黄曲霉毒素 B₁ 在花生油、玉米油中限量值为 20 μg/kg, 在除花生油、玉米油外的植物油脂中限量值为 10 μg/kg。

为加强食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的现场监管, 原国家食品药品监督管理总局于 2017 年 8 月 4 日批准并发布了 KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测 胶体金免疫层析法》^[7]。目前国内快检产品的生产门槛低, 各试剂盒厂家研发水平相差甚远, 生产工艺也不尽相同, 市场上的快检产品质量良莠不齐^[8-9], 且充斥着大量不合格产品, 既影响了检测结果的准确性, 也严重损害了食品快检在公众心目中的形象。因此, 开展食用油中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒的质量评价研究工作具有重要意义。

本文选取 4 种在福建省流通市场中占主要市场份额的食用油中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测胶体金试剂盒产品, 以花生油和大豆油为代表性基质, 依据食药监办科[2017]43 号《食品快速检测方法评价技术规范》^[10] 和 KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测 胶体金免疫层析法》^[7] 中性能指标要求制定评价方案, 进行统一的质量评价, 考察各品牌快检试剂盒的检测限、灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率和相对准确度等指标, 为食用油中黄曲霉毒素 B₁ 快检技术的运用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

A、B、C、D 4 个品牌黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒, 市售; 空白花生油、空白大豆油, 市售; 黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液 (GBW (E) 100302, 溶剂为甲醇, 1.96 μg/mL), 国家粮食局科学研究院; 食用油中黄曲霉毒素 B₁ 含量检测内部质控样品 (CFAPA - QC618B - 1), 大连中食国实检测技术有限公司; 黄曲霉毒素 B₁ 免疫亲和柱, Beacon 公司; 甲醇、乙腈, 色谱纯, 德国 Merck 公司; 氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、盐酸, 分析纯, 国药集团; 0.22 μm 有机过滤头, 津腾公司。

Waters e2695 高效液相色谱仪, Agilent ZORBAX Eclipse PLUS C18 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 美国 Millipore Milli - Q 超纯水处理系统, 德国 Sartorius 电子天平, 瑞士 Mettler - Toledo pH 计, 美国 Sigma 台式离心机, 德国 Eppendorf 移液枪, 多管涡旋混合仪。

1.2 实验方法

1.2.1 评价方法

依据食药监办科[2017]43 号《食品快速检测方

法评价技术规范》和 KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测 胶体金免疫层析法》中性能指标要求制定评价方案。试剂盒质量评价性能指标考察要求: 灵敏度应大于等于 99%; 特异性应大于等于 90%; 假阴性率应小于等于 1%; 假阳性率应小于等于 10%。检测限要求: 花生油为 20 μg/kg, 大豆油为 10 μg/kg。

评价用的空白花生油、空白大豆油经参比方法 (GB 5009.22—2016) 确证为黄曲霉毒素 B₁ 阴性。以空白花生油、空白大豆油为基质, 按 0、0.5、1.0、2.0 倍检测限水平添加黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液, 其中花生油配制成 0、10、20、40 μg/kg 4 个加标量的样品, 大豆油配制成 0、5、10、20 μg/kg 4 个加标量的样品。每个加标量有 50 个样品。采用参比方法对制备样品进行均一性和稳定性验证, 均一性和稳定性均符合要求的样品方可用于试剂盒质量评价。

试剂盒质量评价实验按照评价方案和各品牌黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒产品使用说明书规定的前处理方法和分析步骤进行。对所有测定结果进行分析, 统计各品牌黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒产品的假阴性率、假阳性率、灵敏度、特异性和相对准确度。其中, 灵敏度是阳性样品正确检测结果占阳性样品总数的比例, 特异性是阴性样品正确检测结果占阴性样品总数的比例, 假阴性率是阳性样品错误检测结果占阳性样品总数的比例, 假阳性率是阴性样品错误检测结果占阴性样品总数的比例, 相对准确度是检测结果正确的样品占样品总数的比例。检测限以下样品试剂盒快检的正确结果应为阴性, 否则为假阳性。

1.2.2 参比方法

参比方法为 GB 5009.22—2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》第三法高效液相色谱 - 柱后衍生法。

分析条件: 荧光检测器激发波长 360 nm, 发射波长 440 nm; 衍生方式为光衍生; 柱温 35 °C; 流动相为甲醇 - 乙腈 - 水 (体积比 30:10:60); 流速 1.0 mL/min; 等度洗脱; 进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 制备样品的均一性与稳定性

参照 CNAS - GL003:2018《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》中均匀性检验 - 单因子方差分析法和稳定性检验 - *t* 检验法评价制备的食用油加标样品的均一性和稳定性。用参比方法对制备样品进行均一性和稳定性验证, 同时使用食

用油中黄曲霉毒素 B₁ 含量检测内部质控样品 (CFAPA-QC618B-1) 对制备样品验证实验进行质控。

均一性考察 F 临界值 $F_{0.05(9,10)} = 3.02$ 。花生油中黄曲霉毒素 B₁ 加标量为 10、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 F 值分别为 1.26、1.88 和 2.41, 大豆油中黄曲霉毒素 B₁ 加标量为 5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 F 值分别为 1.65、2.19 和 1.31, 均小于 $F_{0.05}$, 表明在显著性水平 $\alpha = 0.05$ 时, 大豆油、花生油中黄曲霉毒素 B₁ 含量没有差异, 样品都是均匀的。

稳定性考察 t 临界值 $t_{0.05(10)} = 1.8125$ 。花生油中黄曲霉毒素 B₁ 加标量为 10、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 t 值分别为 1.3058、1.5020 和 0.9949, 大豆油中黄曲霉毒素 B₁ 加标量为 5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 t 值分别为 0.4162、0.7996 和 0.9256, 均小于 $t_{0.05}$, 表明在显著性水平 $\alpha = 0.05$ 时, 大豆油、花生油中黄曲霉毒素 B₁ 含量没有差异, 样品是稳定的。

制备样品的均一性和稳定性验证结果显示, 样品均一性、稳定性均符合要求, 可用于试剂盒质量评价。

2.2 试剂盒质量评价

选取在福建省流通市场中占主要市场份额的基于胶体金检测原理的食用油中黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒 A、B、C 和 D 4 个品牌产品进行评价。

A 品牌产品要求于 4~30℃ 阴凉避光干燥环境中储存, 室温检测; B 品牌产品未标识储存条件, 要求于 20~30℃ 检测; C 品牌产品要求于 2~30℃ 避光干燥环境中储存, 室温检测; D 品牌产品要求 2~30℃ 避光储存, 20~40℃ 检测。因此, 4 个品牌快检产品均储存于 6℃ 医用冷藏箱中, 控制检测环境温度在 20~30℃。

评价实验前, 检查 4 个品牌快检产品的包装、说明书、试剂和配套耗材等。所有产品外包装均完整, 密封膜均无破损, 产品说明书中基质适用范围和检测限均符合评价要求, 标签均完整, 试剂及配套耗材均齐全且密封均完好, 所有产品均在有效期内, 且距产品到期日均半年以上。

严格按照各品牌黄曲霉毒素 B₁ 快速检测试剂盒产品使用说明书规定的前处理方法和分析步骤进行评价样品检测, 4 个品牌试剂盒对加标样品的检测结果见表 1, 评价结果见表 2。

表 1 4 个品牌试剂盒对加标样品的检测结果

加标量	A 品牌		B 品牌		C 品牌		D 品牌									
	花生油	大豆油	花生油	大豆油	花生油	大豆油	花生油	大豆油								
	阳	阴	阳	阴	阳	阴	阳	阴								
0	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50		
0.5 倍检测限	50	0	50	0	0	50	32	18	0	50	17	33	0	50	0	50
1.0 倍检测限	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0
2.0 倍检测限	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0	50	0

表 2 4 个品牌试剂盒的评价结果

项目	A 品牌			B 品牌			C 品牌			D 品牌		
	阳	阴	总数	阳	阴	总数	阳	阴	总数	阳	阴	总数
阳性样品	200	0	200	200	0	200	200	0	200	200	0	200
阴性样品	100	100	200	32	168	200	17	183	200	0	200	200
总数	300	100	400	232	168	400	217	183	400	200	200	400
灵敏度(p+)%	100			100			100			100		
特异性(p-)%	50			84			91.5			100		
假阴性率(pf-)%	0			0			0			0		
假阳性率(pf+)%	50			16			8.5			0		
相对准确度/%	75			92			95.75			100		
评价结论	不合格			不合格			合格			合格		

由表 1、表 2 可知, 4 个品牌中, 只有 C、D 2 个品牌试剂盒所有指标符合要求, 不同品牌产品的检测效果存在差异, D 品牌试剂盒检测效果最好。4 个品牌试剂盒快检结果假阴性率均为 0%, 均符合假阴性率性能指标的考察要求 ($\leq 1\%$), 除 D 品

牌试剂盒外的另外 3 个品牌, 快检结果都出现了假阳性情况。A、B 2 个品牌试剂盒快检结果假阳性率分别为 50% 和 16%, 均大于 10%, 不符合要求。

表 3~表 6 为不同品牌试剂盒质量评价情况。

表3 A品牌试剂盒质量评价情况

加标量	花生油						大豆油					
	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数
0		50				50		50				50
0.5倍检测限					50	50					50	50
1.0倍检测限					50	50					50	50
2.0倍检测限					50	50					50	50

注:阴为T线颜色深于C线颜色;弱阴为T线颜色与C线颜色相当;弱阳为T线颜色略浅于C线颜色;阳为T线颜色浅于C线颜色;强阳为T线颜色几乎不显色。下同

表4 B品牌试剂盒质量评价情况

加标量	花生油						大豆油					
	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数
0	50					50	50					50
0.5倍检测限		50				50		18	32			50
1.0倍检测限			50			50			17	33		50
2.0倍检测限				50		50				50		50

表5 C品牌试剂盒质量评价情况

加标量	花生油						大豆油					
	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数
0	50					50	50					50
0.5倍检测限		50				50		33	17			50
1.0倍检测限			50			50			25	25		50
2.0倍检测限					50	50					50	50

表6 D品牌试剂盒质量评价情况

加标量	花生油						大豆油					
	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数	阴	弱阴	弱阳	阳	强阳	总数
0	50					50	50					50
0.5倍检测限	50					50	50					50
1.0倍检测限					50	50					50	50
2.0倍检测限					50	50					50	50

从表3可以看出,A品牌试剂盒对花生油和大豆油空白基质的快检结果为弱阴性,可能该品牌产品胶体金标记的抗原抗体不合适。

从表4和表5可以看出,B、C 2个品牌试剂盒胶体金标记的抗原抗体对0.5倍检测限和1.0倍检测限识别差异不大。B、C 2个品牌试剂盒提取步骤有个共同特点:同一品牌试剂盒,大豆油取样量为花生油取样量的2倍,加入提取液的体积一样。可能不同取样量黄曲霉毒素 B_1 的提取效率不同,且试剂盒胶体金标记的抗原抗体对0.5倍检测限和1.0倍检测限识别差异不大,导致提取效率对检测结果影响较大。在质量评价过程中,B品牌试剂盒还出现了同一块检测卡中同一条C线或T线深浅不一的情况,该情况可能是由生产工艺问题导致。

从表6可以看出,D品牌试剂盒的检测效果最

好,相对准确度为100%,且均符合所有性能指标要求。D品牌试剂盒胶体金标记的抗原抗体对0.5倍检测限和1.0倍检测限识别差异大,这一特点降低了检测假阳性风险,提高了检测准确度。

3 结论

本文通过统一制样,使用均一性、稳定性符合要求的评价样品,对市场采购的4个不同品牌适用于食用油中黄曲霉毒素 B_1 快速检测的胶体金试剂盒进行评价,通过对灵敏度、特异性、假阳性率、假阴性率的考察发现,只有C、D 2个品牌的黄曲霉毒素 B_1 快速检测试剂盒为符合KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B_1 的快速检测 胶体金免疫层析法》性能指标要求的合格产品,其中D品牌产品检测效果最好。然而在前期调研中,4个品牌公司均能提供权威检测机构出具的黄曲霉毒素 B_1 试剂盒的快检评

价报告,且评价报告中试剂盒评价结果均显示符合 KJ 201708《食用油中黄曲霉毒素 B₁的快速检测 胶体金免疫层析法》性能指标要求。前期调研情况与质量评价结果的差异更体现了开展质量评价工作的必要性。评价考察发现,胶体金标记的抗原抗体是决定检测效果的关键。后期市场调研发现,C、D 品牌公司具有较好的自主研发能力,能自主研发生产抗原抗体,有品类齐全的抗原抗体库,而 A、B 品牌公司使用的抗原抗体全靠外购。为确保食用油中黄曲霉毒素 B₁的快检监管效果,结合试剂盒评价结果和市场调研情况,建议快检试剂盒产品须经质量评价合格再投入使用,并不定期对产品进行跟踪评价。

参考文献:

- [1] 劳文艳,林素珍. 黄曲霉毒素对食品的污染及危害[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2011, 25(1): 64-69.
- [2] 李金. 有害物质及其检测[M]. 北京:中国石化出版社, 2001: 94-100.
- [3] 赵群,丛铎,徐振斌. 粮食中黄曲霉毒素 B₁检测方法的研究进展与展望[J]. 中国粮食经济, 2015(6): 59-60.
- [4] 黄建锋,姜侃,刘鹏鹏,等. 我国主要食品中黄曲霉毒素 B₁的调查分析[J]. 食品工业, 2016, 37(3): 295-297.
- [5] 程恒怡,钟延旭,陈杰,等. 广西居民食用植物油黄曲霉毒素 B₁膳食暴露评估[J]. 应用预防医学, 2017, 23(6): 451-454.
- [6] 邓幸飞,张燕,陈海燕,等. 花生原料及花生油中黄曲霉毒素 B₁的污染分析[J]. 广州化工, 2018, 46(3): 86-87.
- [7] 国家食品药品监督管理总局. 食用油中黄曲霉毒素 B₁的快速检测 胶体金免疫层析法:KJ 201708[EB/OL]. [2021-02-24]. <http://www.samr.gov.cn/spcjs/ksjcff/index.2.html>.
- [8] 成长玉,张敏,曹进,等. 食品快速检测方法在国内外的应用与管理比较[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(4): 401-404.
- [9] 叶雅真. 我国食品安全快检产品的现状和对策分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(12): 3719-3724.
- [10] 国家食品药品监督管理总局. 总局办公厅关于印发食品快速检测方法评价技术规范的通知:食药监办科[2017]43号[EB/OL]. [2021-02-24]. <http://law.pharmnet.com.cn/laws/detail.4026.html>.
- (上接第 69 页)
- [11] 徐硕,姜文清,邝咏梅,等. 细胞膜色谱技术应用于中药活性成分筛选的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(2): 274-277.
- [12] HOU X F, REN J, WANG S C, et al. Establishment of a high expression of α_{1A} adrenergic receptor cell membrane chromatography - HPLC method for screening target components from *Radix caulophylli*[J]. Chromatographia, 2010, 72(7/8): 635-640.
- [13] WANG C H, HE L C, WANG N, et al. Screening anti-inflammatory components from Chinese traditional medicines using a peritoneal macrophage/cell membrane chromatography - offline - GC/MS method [J]. J Chromatogr B, 2009, 877(27): 3019-3024.
- [14] 肖建辉. 麻疯树籽粕脱毒及其抗菌肽的细胞膜色谱制备法和抗菌机理的研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2012.
- [15] 唐亚丽. 家蝇抗菌肽的分离及对细菌壁膜和 DNA 的作用[D]. 江苏无锡:江南大学, 2009.
- [16] 王雪峰,陈越,赵琼,等. 响应面试验优化酶法制备辣木籽多肽工艺及其抑菌活性分析[J]. 现代食品科技, 2019, 35(1): 173-181.
- [17] 杨文博. 微生物学实验[M]. 北京:化学工业出版社, 2004.
- [18] 康洁. 营养型酵母细胞破壁方法的研究[J]. 商丘师范学院学报, 2018, 34(6): 27-33.
- [19] 李连连. 以硅胶为载体的苯丙氨酸解氨酶交联酶聚体的制备及性质研究[D]. 石家庄:河北科技大学, 2014.
- [20] BILGILI M S. Adsorption of 4-chlorophenol from aqueous solutions by xad-4 resin: isotherm, kinetic, and thermodynamic analysis [J]. J Hazard Mater, 2016, 137(1): 157-164.
- [21] 唐文婷. 基于肽-膜相互作用的模拟细胞膜法筛选抗菌肽的研究[D]. 江苏无锡:江南大学, 2014.
- [22] 李延盛,伊其光. 超声化学[M]. 北京:科学出版社, 2015.
- [23] HE L C, WANG S C, GENG X D. Coating and fusing cell membranes onto a silica surface and their chromatographic characteristics [J]. Chromatographia, 2001, 54(1): 71-76.
- [24] 刘小花,白海鑫,金秋,等. 壳聚糖-硅胶复合物对刚果红的吸附性能研究[J]. 广州化工, 2018, 46(24): 57-60.