



# 真菌毒素检测特点及注意事项

姬建生

# 主要内容

- 真菌毒素的特点
- 常用方法和技术
- 操作要点
- 注意事项

# 真菌毒素的特点

- 天然属性：非人为添加
- 危害性：致癌、致畸
- 低限值：ppb级别
- 不均匀性

# 快速检测方法

- 酶联免疫吸附法（ELISA法）
- 免疫吸附法（胶体金法）

# 快速检测方法

- GB/T 17480-2008 饲料中黄曲霉毒素BI的测定 酶联免疫吸附法
- LS/T 6111-2015 粮油检验 粮食中黄曲霉毒素BI测定 胶体金快速定量法
- LS/T 6108-2014 粮油检验 谷物中黄曲霉毒素BI的快速测定 免疫层析法
- NY/T 2550-2014 饲料中黄曲霉毒素BI的测定 胶体金法
- NY/T 2548-2014 饲料中黄曲霉毒素BI的测定 时间分辨荧光免疫层析法
- LS/T 6112-2015 粮食检验 粮食中玉米赤霉烯酮测定 胶体金快速定量法
- LS/T 6109-2014 粮油检验 谷物中玉米赤霉烯酮测定 胶体金快速测试卡法
- LS/T 6113-2015 粮油检验 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定 胶体金快速定量法
- LS/T 6110-2014 粮油检验 谷物中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定 胶体金快速测试卡法
- LS/T 6114-2015 粮油检验 粮食中赭曲霉毒素A测定 胶体金快速定量法
- SN/T 5026-2017 饲料中T-2毒素的测定 酶联免疫吸附法

# 大型仪器检测方法

- 液相色谱法（衍生化）
- 超高效液相色谱法
- 液相色谱-串联质谱法

# 大型仪器检测方法

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

GB 5009.24-2016 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素M族的测定

GB/T 30955-2014 饲料中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

NY/T 2071-2011 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和T-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

LS/T 6128-2017 粮油检验 粮食中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的测定 超高效液相色谱法

LS/T 6122-2017 粮油检验 粮油及制品中黄曲霉毒素含量测定 柱后光化学衍生 高效液相色谱法

SN/T 3868-2014 出口植物油中黄曲霉毒素B1、B2、G1、G2的检测 免疫亲和柱净化高效液相色谱法

GB 5009.209-2016 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定

GB/T 19540-2004 饲料中玉米赤霉烯酮的测定

GB/T 28716-2012 饲料中玉米赤霉烯酮的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

NY/T 2071-2011 饲料中黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和T-2毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

# 大型仪器检测方法

LS/T 6129-2017 粮油检验 粮食中玉米赤霉烯酮的测定 超高效液相色谱法

GB 5009.111-2016 食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定

GB/T 30956-2014 饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

LS/T 6127-2017 粮油检验 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 超高效液相色谱法

SN/T 3136-2012 出口花生、谷类及其制品中黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马毒素B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2毒素、HT-2毒素的测定

SN/T 3137-2012 出口食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、3-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇、15-乙酰脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其代谢物的测定 液相色谱-质谱/质谱法

GB 5009.240-2016 食品安全国家标准 食品中伏马毒素的测定

NY/T 1970-2010 饲料中伏马毒素的测定

LS/T 6130-2017 粮油检验 粮食中伏马毒素B1、B2的测定 超高效液相色谱法

GB 5009.118-2016 食品安全国家标准 食品中T-2毒素的测定

GB/T 19539-2004 饲料中赭曲霉毒素A的测定



# 大型仪器检测方法

GB/T 30957-2014 饲料中赭曲霉毒素A的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

GB/T 28718-2012 饲料中T-2毒素的测定 免疫亲和柱净化-高效液相色谱法

LS/T 6126-2017 粮油检验 粮食中赭曲霉毒素A的测定 超高效液相色谱法

LS/T 6133-2018 粮油检验 主要谷物中16种真菌毒素的测定 液相色谱-串联质谱法

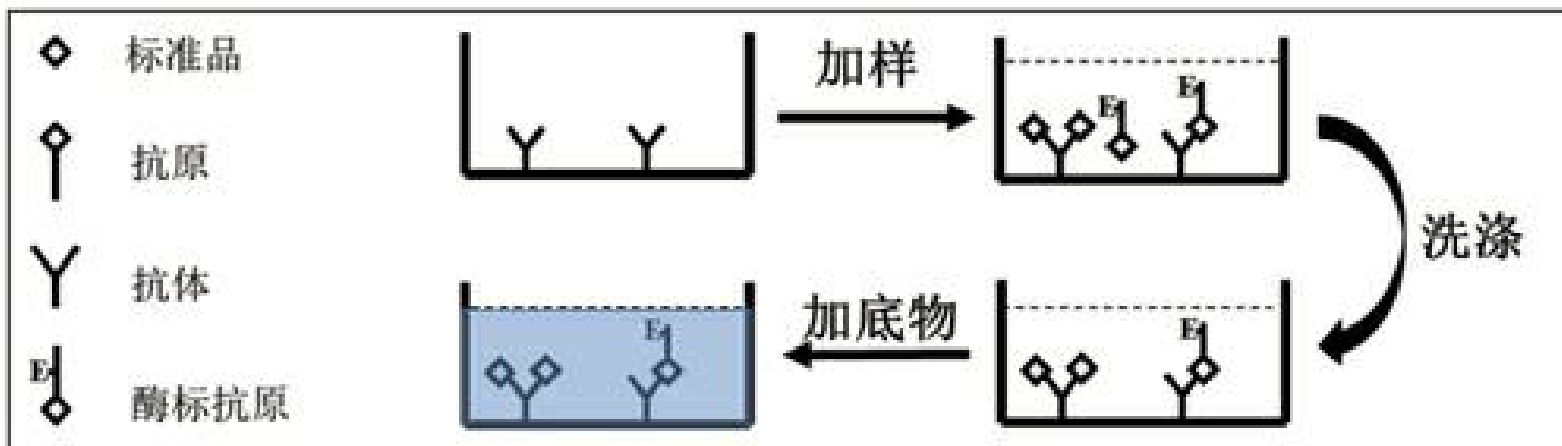
# 快速检测方法

快速检测真菌毒素一般采用免疫分析方法，此方法的理论基础为抗原抗体的特异性结合，酶联免疫法（ELISA）和免疫层析法等。

# 快速检测方法

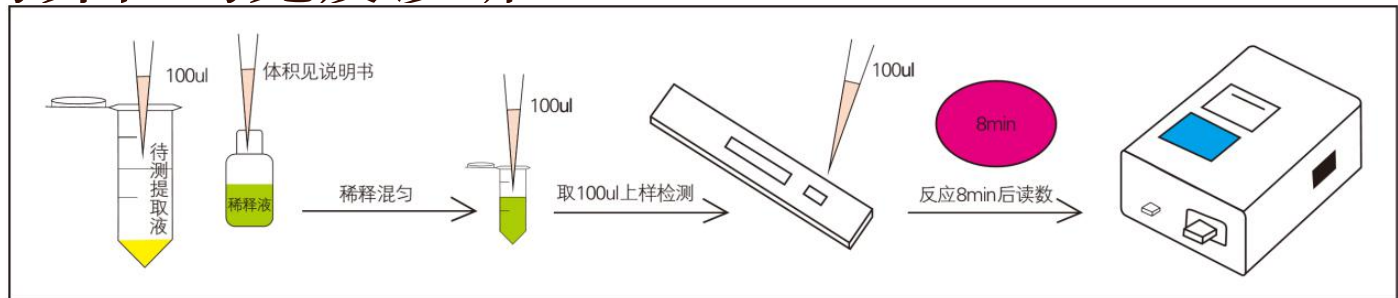
## • 酶联免疫法（ELISA）

将抗原或抗体固定到某种固相载体上（现在多为酶标板），并保持其免疫活性，然后将待测样品和酶标物（酶标抗体或酶标抗原）按不同步骤与固定的抗原或抗体进行反应，再然后将没有发生反应的物质洗去，最后加入酶的底物。底物在酶的催化下显色，最终通过显色程度进行定性或定量测定。有直接法、间接法、双抗体夹心法等。



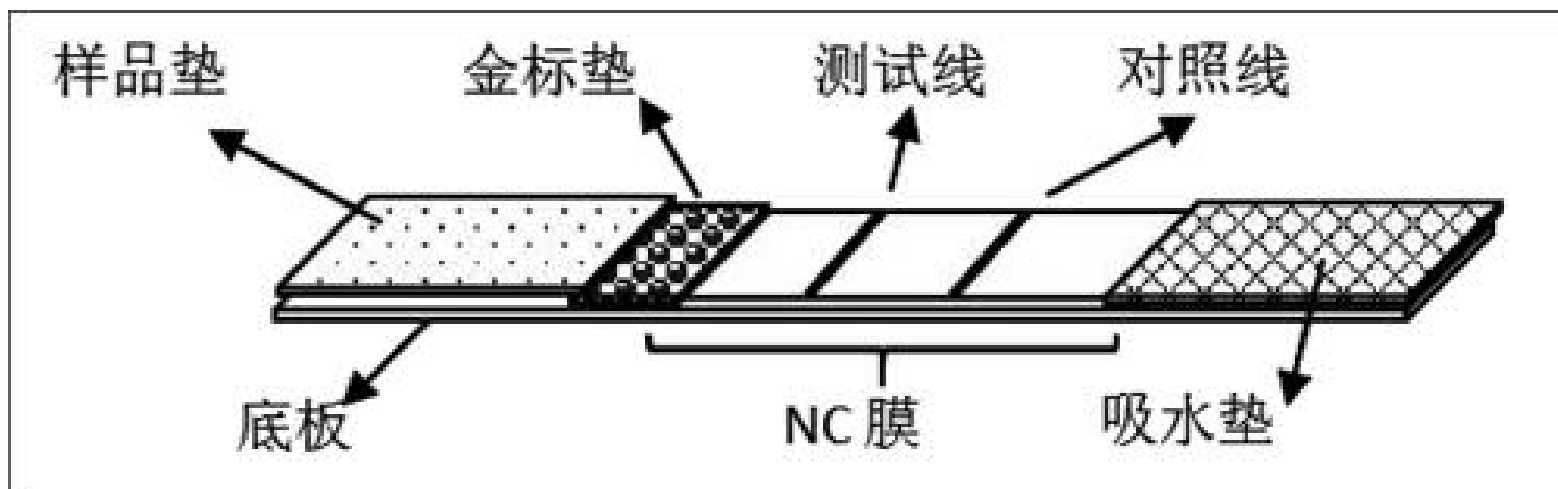
# 免疫层析法：

其原理是将特异抗体先固定于硝酸纤维素膜的某一区带，当干燥的硝酸纤维素一端浸入样品后，由于毛细管作用，样品将沿着膜向前移动，当移动至固定有抗体的区域时，样品中相应的抗原即与该抗体发生特异性结合，通过免疫胶体金或免疫酶染色可使该区域显示一定的颜色，从而实现特异性的免疫诊断。



# 快速检测方法

- 免疫层析法（胶体金）



# 快速检测方法

- 注意事项

1.上机注意有机相的比例：小于30%

2.操作手法：精、准、快

3.假阳性：如绿豆、红豆等含天然色素样品容易出现假阳性

# 操作要点

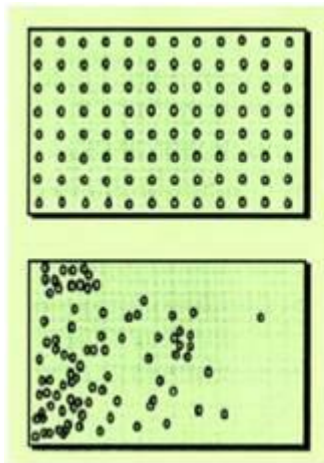
制备

•提取

•净化

•测定

- 采样**：采样步骤是真菌毒素检测中最大的变异或误差来源。
- 原因**：被污染的颗粒在大宗产品中的分布不均匀，尤其是农产品，少部分颗粒收到真菌毒素污染，但却含有较高的真菌毒素含量。
- 处理**：提高采样量能有效降低采样环节对检测结果的影响



蛋白质在样品中的分布情况

真菌毒素在样品中的分布情况

# 操作要点



- 国际标准组织（ISO）2009年颁布的谷物和谷物制 品的 扦样标准中还特别规定了真菌毒素检测时的 扦样程序， 被欧盟等同采用。
- 美国USDA-GIPSA在黄曲霉毒素检测程序手册中规 定了不 同批次类型谷物和谷物产品中黄曲霉毒素 检测的最小扦 样量。



# 操作要点：提取



- 溶剂系统：水+甲醇；水+乙腈
- 分散样品：均质、震荡、超声
- 分离：离心、过滤

# 操作要点：净化

制备

•提取

•净化

测定

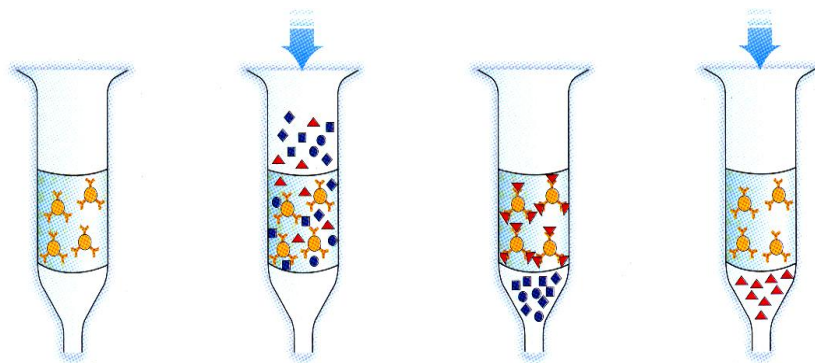
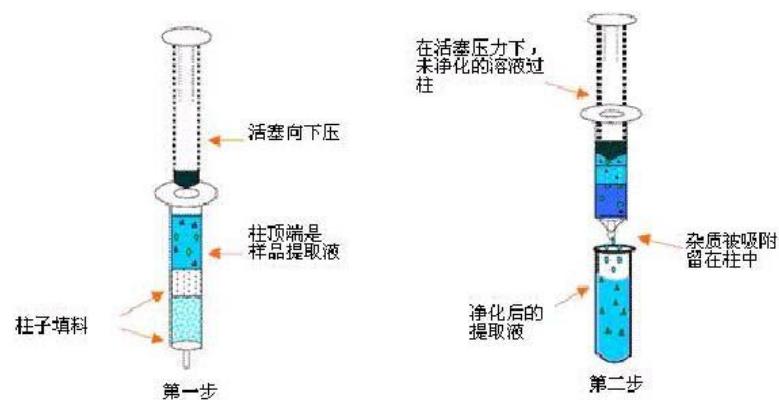
•目的：除去干扰杂质，保留待测组分

•多功能净化柱：

•免疫亲和净化柱：多合一

•免疫磁珠净化：

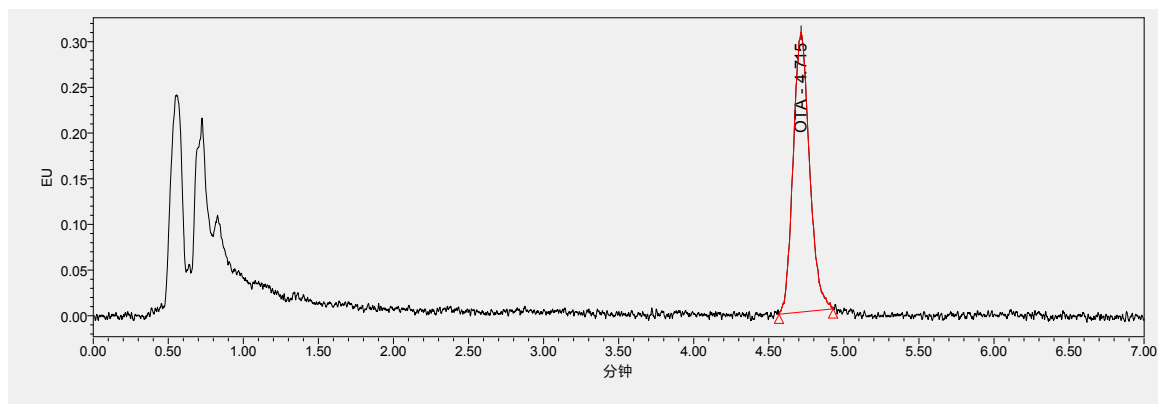
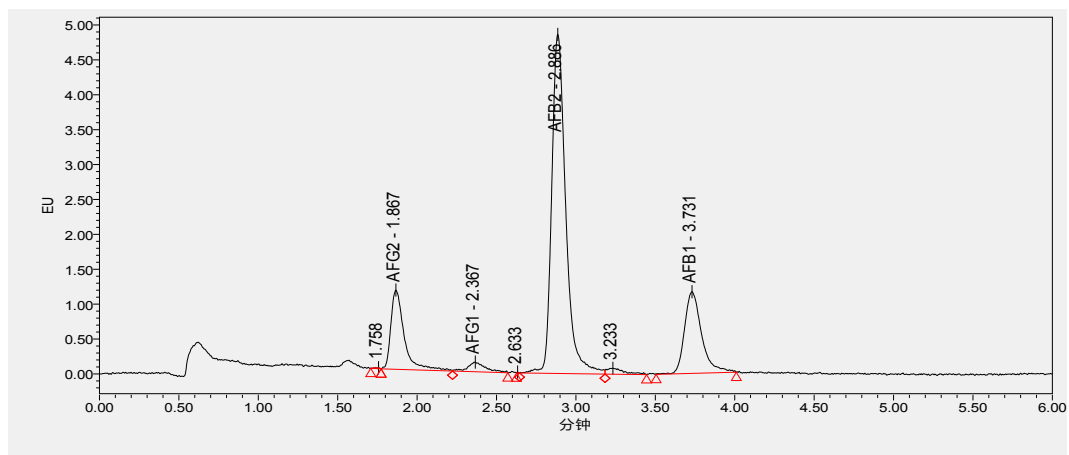
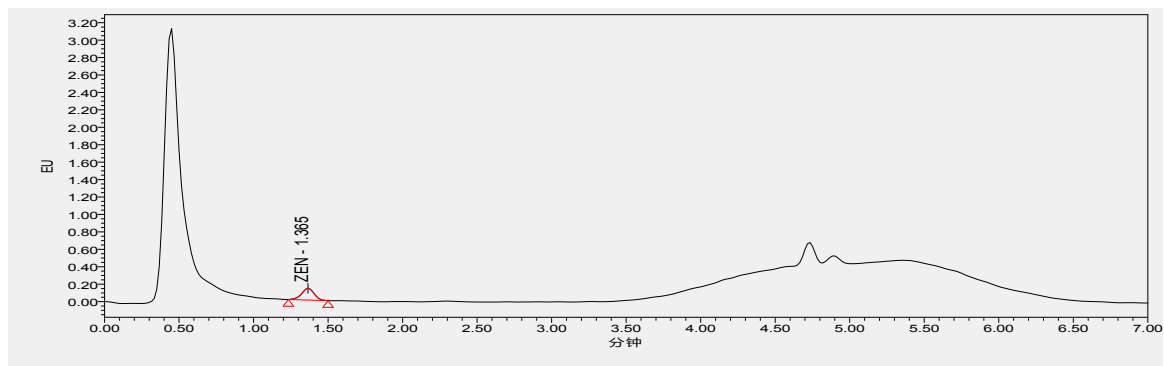
•同位素内标：

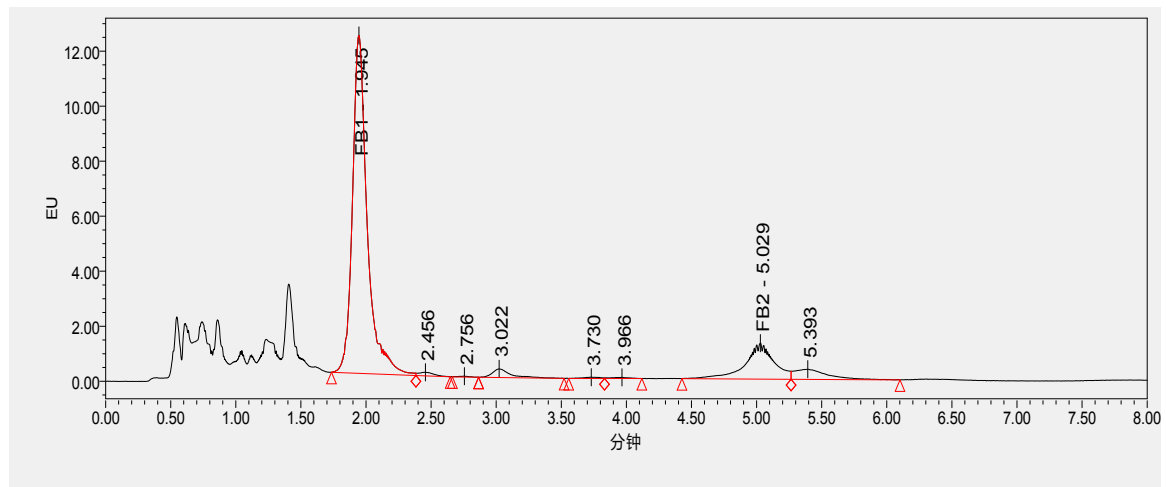
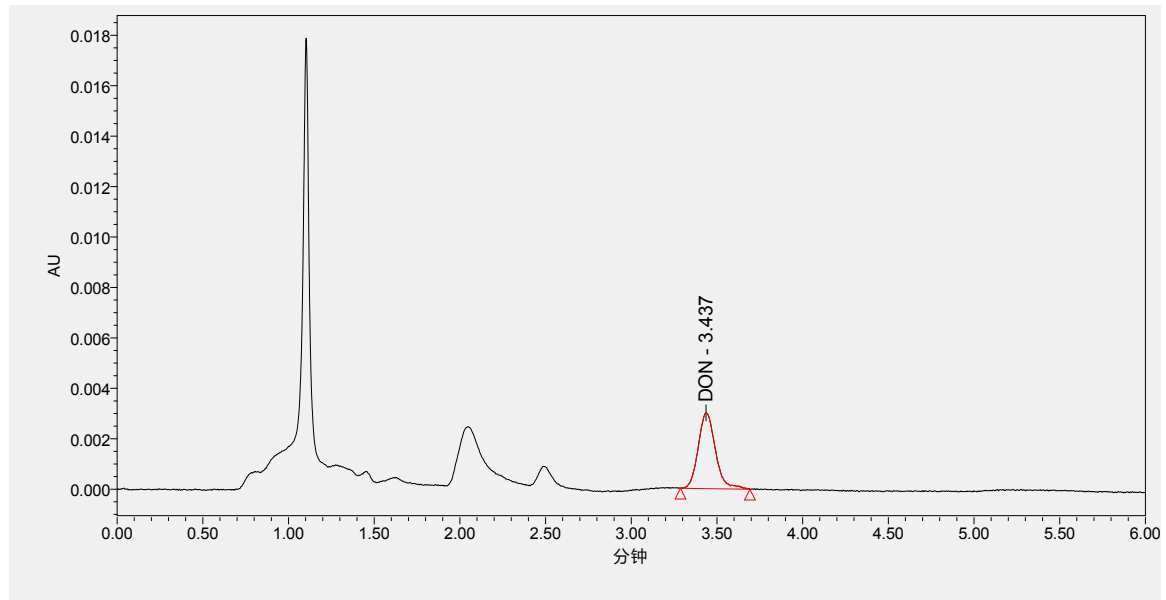


# 操作要点：上机



- 仪器选择：
- 仪器状态：
- 建立及优化方法：
- 数据分析及处理：





# 三合一免疫亲和柱

样品名称	本底值 (ng/mL)	加标值 (ng/mL)	加标浓度 (ng/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
AFB1加标1#	0	3.556	4.00	88.9	91.2
AFB1加标2#	0	3.735	4.00	93.4	
ZEN加标1#	0	40.077	40	100.2	100.3
ZEN加标2#	0	40.167	40	100.4	
DON加标1#	0	842	1000	84.2	83.2
DON加标2#	0	823	1000	82.3	

# 注意事项：质量控制

- 空白（试剂空白，基质空白）
- 测试样品
- 加标回收
- 质控样
- 标准系列溶液；

# 注意事项：

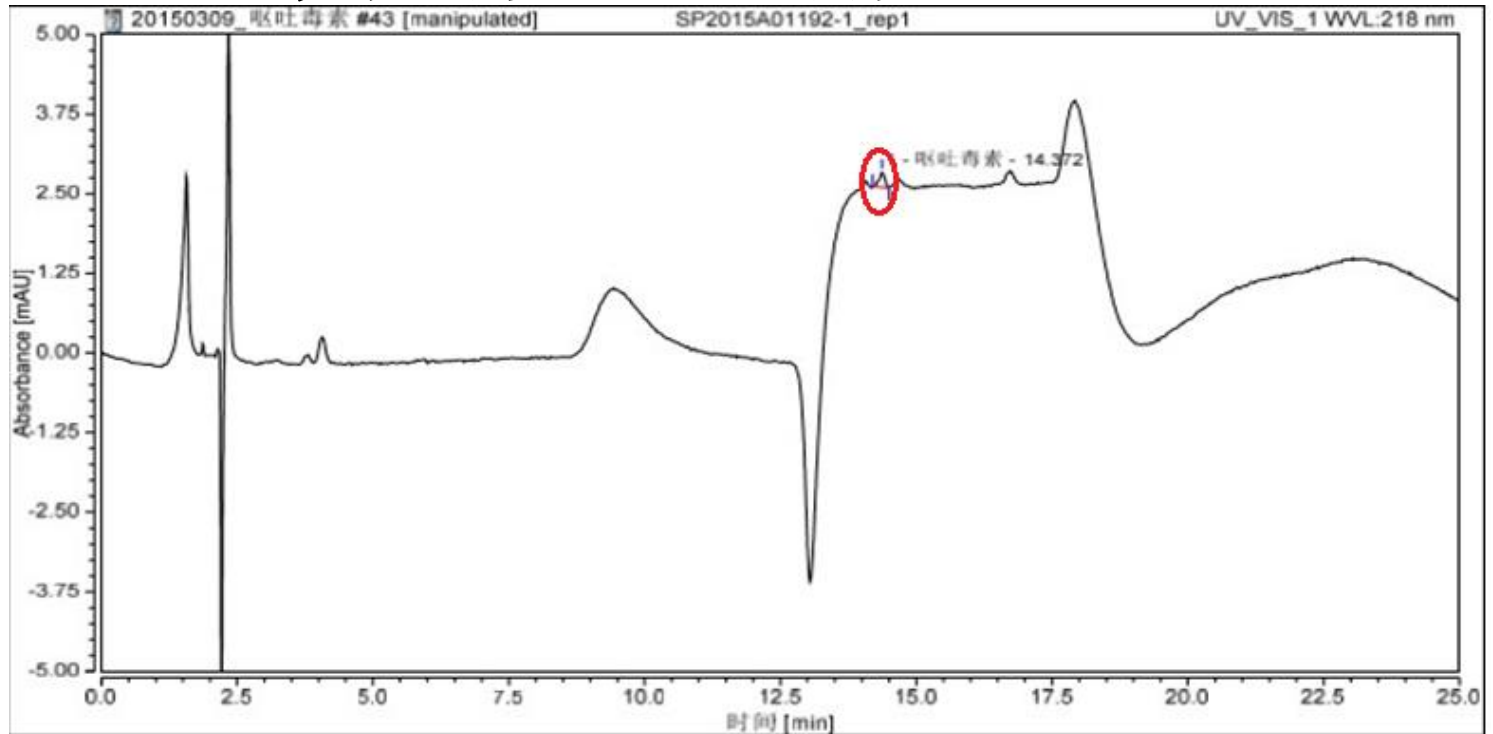
- 柱容量的验证

呕吐毒素柱容量：1000ng



# 注意事项：

- 溶剂和流动相的匹配性：  
呕吐毒素峰变宽或峰形差



# 注意事项：

- 上亲和柱的样品溶液要澄清
- 无浑浊或颗粒物
- 防止出现堵塞免疫亲和柱导致无法洗脱

# 注意事项：

- 易受真菌毒素污染的饲料原料：
  - 玉米：多种真菌毒素
  - 小麦：呕吐毒素和玉米赤霉烯酮
  - 小麦麸：呕吐毒素和玉米赤霉烯酮
  - 酒糟：呕吐毒素
  - 其他谷物如高粱等杂粮



谢 谢