

ELISA 法检测五类食品中黄曲霉毒素 B₁ 前处理方法的改进研究

江苏省微生物研究所, 无锡 214036) 龚 燕 赵春城 张东升 赵晓联

摘 要 用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测五类食品 (酱油、醋、面粉、大米、食用油) 中黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 含量, 关键在于样品的前处理。本文针对五类食品中 AFB₁ 的前处理作了方法学研究。结果表明, 改进后的前处理使检测灵敏度达 0.1 μg/kg, 在 0.1~10 μg/kg 之间呈良好线性关系, 平均回收率在 75%~170% 之间。

关键词 酶联免疫吸附法 黄曲霉毒素 B₁ 前处理 改进

Abstract The key to determination of Aflatoxin B₁ in five kinds of foods (soysauce, vinegar, flour, rice and edible oil) by ELISA is sample pretreatment. The evaluation of methodology was studied in this paper according to the pretreatment of the five kinds of foods. Results showed that the determination sensitivity was 0.1 μg/kg after improved pretreatment. The linear range was 0.1~10 μg/kg. The average recovery rate was 75%~170%.

Key words ELISA; Aflatoxin B₁; pretreatment; improvement

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306 (2003)04-0082-03

分析检测

我国于 2002 年 7 月由国家质监总局下文^[1], 针对小麦粉、大米、食用油、酱油、醋五类食品实行‘市场准入’制度, 而其中 AFB₁ 是必检项目之一, 采用的是酶联免疫吸附法 (ELISA 法)^[2], 这方面的应用报道也很多^[3-8], 但由于食品样品的复杂, 样品的前处理直接影响检测结果。为此, 本文对五类食品中 AFB₁ 的 ELISA 检测方法作了方法学研究, 重点针对各类样品的前处理方法进行了改进研究, 得到的结果较理想。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

ELISA 快速测试盒 无锡生物技术公司研制; 甲醇 分析纯, 上海化学试剂公司; 三氯甲烷 分析纯, 天津市博迪化工有限公司; 石油醚 分析纯, 镇江市化剂厂; 无水 Na₂SO₄、NaCl 分析纯。

收稿日期: 2002-12-23

作者简介: 龚燕 (1974-), 女, 本科, 实习研究员。

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目。

酶标仪 MK3 芬兰雷勃公司; 小型粉碎机 IKA 德国; 微量振荡器 MS2 型 IKA 德国; 微量移液器 芬兰雷勃公司; 恒温水浴锅 HH-S 金坛国盛实验仪器厂; 分析天平 AB204-S 型, 量程 10mg~210g, 梅特勒·托利多公司; 隔水式电热恒温培养箱 上海跃进医疗器械厂; 烧杯 (5mL), 三角瓶 (100mL), 分液漏斗 (50mL), 蒸发皿 (50mL), 移液管 (5mL), 容量瓶 (50mL), 定量滤纸。

1.2 样品采集

本实验所做样品系于 2002 年 11 月份从无锡、西安、汉中、长沙四市的超市中随机购买所得, 共计 26 件样品。其中酱油 7 件, 醋 7 件、大米 5 件、面粉 4 件、食用油 3 件。

1.3 样品提取

1.3.1 国标方法 按照国标 (GB/T 5009.22-1996) 的方法操作, 发现面粉、醋、大米用三氯甲烷提取, 操作步骤较繁。其中在处理醋样时加入三氯甲烷后, 乳化现象很严重, 用 NaCl 破乳效果不佳, 从而影响检测结果; 而酱油、食用油在操作中用甲醇水提取后, 操作步骤繁琐, 检测误差较大。

1.3.2 改进方法

1.3.2.1 酱油 称取 5.0g 样品于 25mL 小烧杯中, 用 5mL 蒸馏水将试样转移至 250mL 分液漏斗中, 加入 20mL 三氯甲烷。若出现乳化现象, 加入 1g NaCl 破乳, 加塞振摇 5min。静置分层 (约 30min), 放出下层三氯甲烷层, 经盛有约 5g 预先用三氯甲烷湿润的无水 Na₂SO₄ 定量慢速滤纸漏斗过滤于 50mL 蒸发皿中, 再加入 10mL 三氯甲烷于分液漏斗中, 重复振摇提取, 三氯甲烷一并滤于蒸发皿中, 最后用少量三氯甲烷洗涤过滤漏斗, 洗液并入蒸发皿中。将蒸发皿放入通风橱, 于 65℃ 水浴上通风挥干后, 冷却。准确加入 25mL 甲醇水 (+1) 溶液, 将凝结物充分溶解, 即为待测样品提取液。

1.3.2.2 醋 准确吸取 10mL 试样于 50mL 容量瓶

中,先加 10~12mL 蒸馏水,摇匀,再边振摇边滴加 10mol/L NaOH,调 pH 为 7.0 左右。准确加入 25mL 甲醇,最后用蒸馏水定容至 50mL,于振荡器上振荡 15min,即为待测样品提取液。

1.3.2.3 面粉 称取 5.0g 面粉样于 100mL 三角瓶中,准确加入 25mL 甲醇水 (+1) 溶液,振荡 15min,过滤,弃去 1/4 初滤液,收集试样滤液,即为待测样品提取液。

若出现假阳性现象,用三氯甲烷提取,方法为称取 5.0g 面粉样于 100mL 三角瓶中,准确加入 25mL 甲醇水 (+1) 溶液,振荡 15min,过滤,弃去初滤液。准确吸取 5mL 滤液 (相当于 1g 样品) 于 250mL 分液漏斗中,加入 20mL 三氯甲烷,加塞振摇 5min,静置分层 (约 30min),放出下层三氯甲烷层,经盛有约 5g 预先用三氯甲烷湿润的无水 Na_2SO_4 定量慢速滤纸漏斗过滤于 50mL 蒸发皿中,再加入 10mL 三氯甲烷于分液漏斗中,重复振摇提取,三氯甲烷一并滤于蒸发皿中,最后用少量三氯甲烷洗涤过滤漏斗,洗液并入蒸发皿中。将蒸发皿放入通风橱,于 65℃ 水浴上通风挥干后,冷却。准确加入 5mL 甲醇水 (+1) 溶液,充分溶解凝结物,即为待测样品提取液。

1.3.2.4 大米 称取 5.0g 大米样 (已粉碎) 于 100mL 三角瓶中,准确加入 25mL 甲醇水 (+1) 溶液,振摇 15min,过滤,弃去 1/4 初滤液,收集试样滤液,用试剂盒中的 A 试剂将一定量的滤液稀释到 1 倍,摇匀,即为待测样品提取液。

1.3.2.5 食用油 称取 5.0g 油样于 25mL 小烧杯中,用 20mL 石油醚或正己烷将试样转移至 250mL 分液漏斗中,准确加入 25mL 甲醇水 (+1) 溶液,加塞振摇 5min,静置分层,放出下层甲醇水提取液。将甲醇水提取液按表 1 进行稀释。

表 1 甲醇水稀释方案

食用油中 AFB ₁ 限量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	试样提取液(mL)	A 试剂 (mL)	稀释倍数
≤ 5	0.5	0	1
≤ 10	0.10	0.10	2
≤ 20	0.10	0.30	4

将稀释后的溶液摇匀,即为待测样品提取液。

1.4 AFB₁ 标准溶液的制备

用甲醇将 AFB₁ 配制成 1mg/mL 溶液,再用甲醇-PBS 溶液 (10+80) 稀释至约 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,紫外分光光度计测定溶液 (61nm 波长) 的光密度值,代入下式计算:

$$X = A \times M \times 1000 \times f / E$$

式中 X—该溶液中 AFB₁ 的浓度, $\mu\text{g}/\text{mL}$;

A—测得的光密度值;

M—AFB₁ 的分子量, 312;

E—摩尔消光系数, 21800;

f—使用仪器的校正因素。

根据计算将该溶液配制成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准溶液,检测时,用甲醇-PBS 溶液将该标准溶液稀释至所需浓度(0.05、0.1、0.5、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。

1.5 ELISA 法检测步骤

从冰箱中取出黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒,平衡至室温。用 1.5mL 酶标稀释液稀释冻干酶标抗原,制成实验用酶标抗原溶液,准备好洗涤液。

用洗涤液洗板 2 次,拍干。选择两孔分别加入 50 μL AFB₁ 阴性对照液, 50 μL AFB₁ 阳性对照液。若要作标准曲线,则选择数孔分别加入 AFB₁ 系列标准溶液,其余孔中各加入 50 μL 待测样品提取液,再加 50 μL 酶标抗原溶液于各孔中,摇匀, 37℃ 孵育 30min。甩干,洗涤 5 次,拍干。往各孔中分别加入 50 μL 基质液和 50 μL 显色剂, 37℃ 显色 15min。往各孔中分别加入 50 μL 终止液,并在酶标仪 450nm 波长处测定各孔吸光度值 A。

2 实验结果

2.1 最低检测浓度

以空白样品加标实验来确定最低检测浓度,按方法 1.5 步骤,分别配制,结果如表 2 所示。

表 2 样品中 AFB₁ 的最低检测浓度

AFB ₁ 浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	A ₄₅₀				均值 A ₄₅₀
0	1.30	1.35	1.29	1.31	1.31
0.05	1.24	1.30	1.27	1.25	1.25
0.1	1.05	1.10	1.03	1.06	1.06
1	0.64	0.66	0.62	0.64	0.64

该方法的灵敏度是指测得最低浓度的 A 值与 0.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 测得的 A 值之差 > 0.1 读数,这个浓度就是最低检测浓度。从表 2 中数据可以看出,最低检测浓度可达 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2 回收率

称取一定量的代表性样品,准确添加 AFB₁ 标准溶液 (高、中、低) 三个浓度,每个浓度平行三次测定,同时做样品空白,按步骤 1.3.2 中的各个提取方法提取后,测定总 AFB₁ 含量,数据代入下列公式,计算回收率,结果如表 3 所示。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{总的 AFB}_1 \text{ 含量} - \text{原样品中 AFB}_1 \text{ 含量}}{\text{添加 AFB}_1 \text{ 的量}} \times 100\%$$

由表 3 可以看到,各种样品多次加标测定的平均回收率在 75%~170% 之间。

2.3 重复性

以加标 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 为例,按步骤 1.3.2 重复测定样品中的 AFB₁ 含量 (n=10),计算其标准偏差 S 和相对标准偏差 CV%,结果如表 4 所示。

表 4 表明,该方法测定五类食品的重复性 (CV%) 均小于 7.0%。

2.4 线性范围

表3 样品加标回收试验结果

样品名称	酱油			醋			面粉 甲醇水法)			面粉(三氯甲烷法)			大 米			食用油		
原含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.25			0.60			未检出			未检出			未检出			未检出		
添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	10	0.1	1	0	0.1	1	10
测 1	0.34	1.01	7.95	0.78	1.48	11.5	0.14	0.83	9.00	0.18	0.84	7.80	0.13	1.06	11.0	0.17	0.82	8.00
定 2	0.37	1.04	7.85	0.76	1.48	9.40	0.15	0.84	8.20	0.14	0.76	8.40	0.11	1.08	8.70	0.19	0.78	7.50
值 3	0.33	1.10	7.45	0.75	1.44	10.3	0.17	0.79	8.50	0.16	0.80	7.50	0.09	1.04	9.70	0.16	0.75	8.50
平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.347	1.05	7.75	0.76	1.47	10.4	0.15	0.82	8.60	0.16	0.80	7.90	0.11	1.06	9.70	0.17	0.78	8.00
平均回收率 (%)	97	80	75	160	87	98	150	82	86	160	80	79	110	106	97	170	78	80

表4 样品重复性试验结果

样品	测定值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)										标准偏差	相对标准偏差 (%)
醋	0.88	0.88	0.84	0.85	0.89	0.83	0.79	0.86	0.80	0.81	0.035	4.2
大 米	1.06	1.08	1.04	1.05	1.10	1.01	1.09	1.06	1.11	1.10	0.032	3.0
面 粉	0.83	0.84	0.79	0.86	0.81	0.78	0.75	0.83	0.89	0.80	0.041	5.0
食用油	0.84	0.76	0.80	0.82	0.85	0.75	0.77	0.86	0.83	0.78	0.039	4.9
酱 油	0.82	0.78	0.75	0.77	0.72	0.74	0.80	0.81	0.76	0.79	0.032	4.1
	0.76	0.79	0.85	0.72	0.81	0.70	0.75	0.77	0.82	0.73	0.048	6.2

将 AFB_1 标准溶液浓度 0、0.1、0.5、1.5、10、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$ 依次加到酶标板的孔中,测定吸光度值,以浓度对数为横坐标, A_i/A_0 的比值为纵坐标,绘制标准曲线(见下图)。计算后得,在 $0.1\sim 10\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度范围内呈线性关系,相关系数为 $r=0.9906$,线性方程为 $y=-35.882x+51.597$ 。

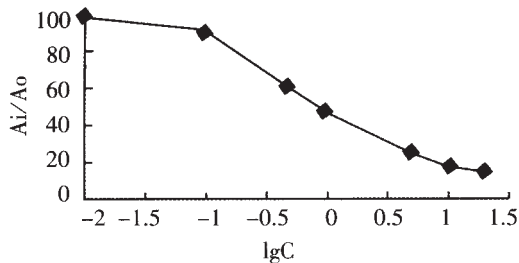


图1 标准曲线

3 讨论

3.1 目前,食品中 AFB_1 的分析方法主要有薄层色谱法(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、酶联免疫吸附法(ELISA)。前二种方法分析步骤多、费时、仪器昂贵、难以普及,而且提取样品时用苯-乙腈溶解,毒性较大,对环境造成较大污染。而 ELISA 法特异性强、灵敏度高、重现性好、测定方便,其他荧光物质、色素、结构类似物对检测无干扰,整个测定过程仅需 2h,并且一次可同时测定几十份样品。该法适用于食品、饲料、粮油、酒类等产品,已得到了广泛的应用。

3.2 由于样品的复杂多样性,若前处理不当,样品中的盐分、酸碱性和金属离子等对 ELISA 检测结果会有影响^[9],特别是在提取过程中会出现乳化现象,严重的乳化层使测定结果出现假阳性,主要是因为乳化层使杂质等影响因素不能有效地消除。因此,本研究改进了前处理方法,在乳化液中加入一定量的无机盐类电解质^[10],扩散层中的阳离子具有排斥作用,当电解质浓度达到一定值时,阳离子聚集在吸附层中,

导致双电层的破坏,降低电动电位,引起絮凝,可使乳化液发生界面分层而遭到破坏。

3.3 样品醋的酸度很大,加入氯化物来消除乳化效果差,经调酸处理后,不存在乳化,提高了提取效果。

3.4 用甲醇水提取的面粉用 ELISA 法检测时,若出现假阳性结果,可能是面粉中加入的添加剂成分多,如漂白剂、品质改良剂、化学膨松剂及营养强化剂等,这些添加剂中含有 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属离子均影响结果。此时应该用三氯甲烷法提取样品来消除此干扰。

参考文献

- 1 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
- 2 卫生部食品卫生监督检验所编著.食品卫生标准使用手册理化检验方法(第一辑)
- 3 陈晓玲,等.酶联免疫吸附法(ELISA)检测食用油中黄曲霉毒素 B_1 .中国卫生检验杂志,2000,10(1):59~60
- 4 顾鸣,等.出口农产品中黄曲霉毒素 B_1 的快速检测法-竞争酶联免疫吸附分析法.食品检验技术,2000(1):3~5
- 5 符金华.饲料中黄曲霉毒素 B_1 的酶联免疫测试法.中国饲料,1998,14:20~21
- 6 刘兆霖.ELISA 法快速检测食品、饲料中 AFB_1 .中国卫生检验杂志,2001,11(4):335~365
- 7 熊剑娟.酶联免疫吸附方法测定酱油中黄曲霉毒素 B_1 .中国调味品,1999(4):27
- 8 郑妹凤.ELISA 法快速检测黄曲霉毒素 B_1 .安徽预防医学杂志,1999,5(3):283
- 9 赵晓联,等.酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B_1 误差分析.中国卫生检验杂志,2001,11(4):473~474
- 10 刘宏.电解质破乳特性研究.江苏理工大学学报(自然科学版),2000,21(2):27~29