

酶联免疫法检测复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 含量

胡成国*, 宋春宏, 顾文佳, 葛宇

(上海质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: **目的** 酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)快速检测复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。**方法** 用 70%甲醇水溶液提取非含油型复合调味料中的黄曲霉毒素 B₁ 待测液, 含油型复合调味料则首先加入石油醚将油萃取出来, 后加入 70%甲醇水溶液抽提。使用酶联免疫法进行定量限、回收率与重复性等实验。**结果** 使用不同前处理的检测结果的定量限为 3 μg/kg, 相对标准偏差分别为 2.06%和 2.73%; 回收率范围在 90%~110%之间; 重复性平均值分别为 10.77 μg/kg 和 10.84 μg/kg, 相对标准偏差分别为 3.89%和 2.44%。**结论** 复合调味料通过不同的前处理方法, 后使用酶联免疫法检测复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 结果准确, 重复性较好。

关键词: 复合调味料; 前处理; 黄曲霉毒素 B₁; 酶联免疫吸附法

Determination of aflatoxin B₁ in compound seasoning by competitive enzyme-linked immunosorbent assay

HU Cheng-Guo*, SONG Chun-Hong, GU Wen-Jia, GE Yu

(Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To detect the content of aflatoxin B₁ in compound seasoning rapidly by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** Aflatoxin B₁ in non-oil-containing compound seasoning was extracted by 70% methanol aqueous solution, while oil-containing compound seasoning was extracted by adding petroleum ether to extract oil first, and then 70% methanol aqueous solution was added to extract. The quantitative limit, recovery rate and repeatability were tested by enzyme linked immunosorbent assay. **Results** The quantitative limit of detection results with different pretreatment was 3 μg/kg, and the relative standard deviations were 2.06% and 2.73%, respectively. The recovery rate ranged from 90% to 110%. The average repeatability was 10.77 g/kg and 10.84 g/kg respectively, and the relative standard deviations were 3.89% and 2.44% respectively. **Conclusion** After different pretreatment methods, the enzyme-linked immunosorbent assay is used to detect aflatoxin B₁ in the compound seasoning. The results were accurate and reproducible.

KEY WORDS: compound seasoning; pretreatment; aflatoxin B₁; competitive enzyme-linked immunosorbent assay

基金项目: 上海市食品质量安全检测与评价专业技术服务平台(18DZ2292400)

Fund: Supported by Shanghai Food Quality and Safety Inspection and Evaluation Professional Technical Service Platform (18DZ2292400)

*通讯作者: 胡成国, 硕士, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: hucg@sqi.org.cn

*Corresponding author: HU Cheng-Guo, Master, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technical Research, Shanghai, 200233, China. E-mail: hucg@sqi.org.cn

1 引言

黄曲霉毒素 B₁(aflatoxins B₁, AFT B₁)是一种由黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)、寄生曲霉菌(*A. Parasiticus*)或集峰曲霉菌(*A. Nomius*)等真菌产生的次生代谢物^[1-3]。黄曲霉毒素 B₁ 易溶于油及多种极性有机溶剂, 包括氯仿、甲醇、乙醇、丙醇、乙二甲基酰胺, 不溶于石油醚、乙醚和己烷等。黄曲霉毒素 B₁ 广泛存在于谷物、坚果、油料作物和其他食品或者饲料中^[4-6]。黄曲霉毒素 B₁ 的结构为二氢呋喃氧杂萜邻酮的衍生物, 含有一个双呋喃环和一个氧杂萜邻酮(香豆素)^[7,8]。黄曲霉毒素 B₁ 在体内经细胞内质网中的细胞色素 P450 混合功能氧化酶的作用下发生羟基化等作用形成黄曲霉 M₁ 等物质, 黄曲霉毒素 B₁ 及其代谢产物黄曲霉毒素 M₁ 是可能导致人类肝癌疾病的强致癌物^[9-11]。谷物在生长, 储存, 加工过程中会被真菌污染而产生毒素, 或者动物进食被污染的饲料时, 其乳制品也会含有黄曲霉毒素^[8,12]。

我国于 2017 年 6 月 23 日实施的 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》^[13] 中对于黄曲霉毒素 B₁ 的检测提供了 5 种方法。这其中主要可以分为 3 大类: 第 1 类是液相色谱法, 第 2 类为薄层色谱法, 第 3 类为酶联免疫法。其中液相色谱法所用设备较昂贵, 前处理所使用的亲和柱等材料费用高, 检测周期较长。薄层色谱法干扰大, 周期长, 操作复杂^[14], 而酶联免疫法是目前国际上测定黄曲霉毒素 B₁ 的常用方法, 具有灵敏度高, 特异性好, 测定步骤简单、快速和操作安全等特点^[13]。

复合调味料由于其种类繁多, 成分复杂, 目前对于复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫法的检测只能根据 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》^[13] 的第 4 法进行检测, 但标准和试剂盒中并没有专门针对复合调味料检测的前处理方法, 对于复合调味料的前处理也只能依据样品形态等进行处理, 具有一定的主观性和随意性, 造成检测结果的不稳定性。本研究根据黄曲霉毒素 B₁ 易溶于油难溶于石油醚的特点, 结合试剂盒前处理方法, 选择将复合调味料分为含油型复合调味料(产品中脂肪含量大于 10%的复合调味料)和非含油型复合调味料, 其中对非含油型复合调味料中的黄曲霉毒素 B₁ 待测液直接用 70%甲醇水溶液提取, 而含油型复合调味料首先加入石油醚将油萃取出来, 后加入 70%甲醇水溶液抽提, 建立了一种通用、快速、准确的酶联免疫方法, 用于检测复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 含量, 以期检测机构和企业快速检测复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 含量提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

TECAN SPARK 多功能酶标仪[帝肯(上海)贸易有

限公司]; S220K 酸度计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; Vortex-Genie2 振荡器(美国 Scientific Industries 公司); 5415D 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

甲醇、石油醚(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒(德国 R-Biopharm 公司); 黄曲霉毒素标准品(加拿大 Pro-Lab 公司)。

复合调味料为超市常见复合调味料, 分别为鲜味辣油(含油型复合调味料)和葱姜料酒(非含油型复合调味料)。

2.2 实验原理

利用黄曲霉毒素 B₁ 易溶于油及多种极性有机溶剂, 如甲醇, 不溶于石油醚的特点, 其中非含油型复合调味料中的黄曲霉毒素 B₁ 待测液直接用 70%甲醇水溶液提取, 含油型复合调味料首先加入石油醚将油萃取出来, 然后加入 70%甲醇水溶液抽提, 黄曲霉毒素 B₁ 溶解于 70%甲醇水溶液中。黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒采用竞争性酶联免疫分析定量方法检测样品中的黄曲霉毒素 B₁ 含量。通过添加已知浓度的标准物质, 确定能够可靠检出的最小的浓度, 获得方法的定量限。通过添加不同已知浓度的标准物质, 获得方法的回收率和重复性, 并通过计算回收率和回收率的相对标准偏差确定方法的准确性。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

(1) 非含油型复合调味料

取至少 100 g 样品摇匀, 称取 5.0 g 样品, 加入 25 mL 甲醇水溶液(70%甲醇), 振荡 3 min, 用滤纸过滤或者 3500×g 离心 10 min。取 1 mL 上清液用 1 mL 蒸馏水或者去离子水稀释。取 50 μL 稀释液进行分析。

(2) 含油型复合调味料

取至少 100 g 样品摇匀, 称取 5.0 g 样品, 用 20 mL 石油醚分次将试样转移到 125 mL 分液漏斗中, 准确加入 25.0 mL 甲醇水(70%甲醇)溶液, 加塞振摇 5 min, 静置分层, 放出下层甲醇水提取液。取 1 mL 上清液溶液用 1 mL 蒸馏水或者去离子水稀释。取 50 μL 稀释液进行分析。

2.3.2 分析方法

(1) 实验前将所有试剂和所需的微孔板放置于室温(20~25 °C), 加入 1 L 去离子水制备洗脱缓冲液。

(2) 加入 50 μL 标准液或者样品稀释液到微孔中。

(3) 加入 50 μL 酶连接物到每个微孔中。

(4) 加入 50 μL 抗体到每个微孔中。混匀后, 室温(20~25 °C)孵育 30 min。

(5) 倒掉孔中的液体, 将微孔板在吸水纸上拍打 3 次以保证完全去除孔中的液体, 用加入洗涤缓冲液 250 μL,

再次倒掉孔中的液体。如此反复 3 次。

(6)加入 100 μL 底物/发色剂到微孔中,充分混合后在室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)条件下暗处孵育 15 min。

(7)加入 100 μL 反应终止液,充分混合后 15 min 内于 45nm 处测量吸光度值。

(8)使用德国拜发公司的 RIDA SOFT Win 软件对结果进行分析。

3 结果与分析

3.1 定量限

本方法灵敏度为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 试剂盒标准曲线范围为 1~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 根据 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》^[15]和 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》^[13]中第 4 法酶联免疫吸附筛查法,定量限为在某一基质中能够可靠的检出并定量分析的量,本方法将定量限设定为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。黄曲霉毒素 B₁定量限数据见表 1。

分别以含油性复合调味料和非含油性复合调味料为

本底,在加标浓度为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,检测结果分别为 3.14 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$,计算得标准偏差分别为 2.06%和 2.73%,检测结果能够正确地反映加标浓度。故此方法定量限为 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

3.2 回收率

试剂盒检测范围为 1~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 分别以含油性复合调味料和非含油性复合调味料为本底,添加黄曲霉毒素 B₁浓度为 3.00、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每个浓度 7 个重复,黄曲霉毒素 B₁回收率见表 2。

从以上数据可知,样品中含油性复合调味料和非含油性复合调味料本底黄曲霉 B₁含量未检出,加标浓度在 3、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 是回收率范围在 90%~110%之间,符合标准要求。

3.3 重复性

以含油性复合调味料和非含油性复合调味料为本底,添加浓度为 10.00 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 各重复检测 7 组数据,作为重复性测试,计算标准偏差,黄曲霉毒素 B₁重复性数据见表 3。

表 1 黄曲霉毒素 B₁定量限结果

Table 1 Results of limit of quantitation of aflatoxin B₁

	加标检测结果/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$					加标平均值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	相对标准偏差/%
含油性复合调味料	3.16	3.12	3.10	3.17	3.18	3.14	2.06
	3.05	3.18	3.26	3.12	3.07		
非含油性复合调味料	3.20	3.09	3.17	3.06	3.04	3.08	2.73
	3.01	3.18	3.00	3.03	2.97		

表 2 黄曲霉毒素 B₁回收率结果

Table 2 Recovery of aflatoxin B₁

样品类型	加标浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	平均检测结果/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%
含油性复合调味料	0	未检出(<1)	/
含油性复合调味料	3.00	3.14	104.58
含油性复合调味料	5.00	4.86	97.23
含油性复合调味料	10.00	10.77	107.74
含油性复合调味料	20.00	18.14	90.69
非含油性复合调味料	0	未检出(<1)	/
非含油性复合调味料	3.00	3.11	103.57
非含油性复合调味料	5.00	4.64	92.83
非含油性复合调味料	10.00	10.84	108.44
非含油性复合调味料	20.00	19.40	97.01

表 3 黄曲霉毒素 B₁ 重复性结果
Table 3 Repeatability of aflatoxin B₁

样品类型	检测结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)			平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	相对标准偏差/%
含油性复合调味料	11.11	10.70	10.8	10.77	3.89
	11.28	10.34	10.97		
非含油型复合调味料	10.74	10.70	10.94	10.84	2.44
	11.25	10.77	11.01		

检测 7 组数据相对标准偏差为 3.89% 和 2.44%，满足 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》^[15] 中重复性要求，满足日常检测需求。

4 结 论

复合调味料成分复杂，原料多种多样，在很多调味料中，特别是发酵类的复合调味料中，黄曲霉毒素 B₁ 的风险较高^[16-18]。本方法探索根据复合调味料的特点和黄曲霉毒素 B₁ 在不同溶剂的溶解性，使用不同的前处理方法，能够比较准确的检测复合调味料中黄曲霉毒素 B₁ 的含量。并按照 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法确认和验证指南》要求，同样的检测方法在对不同基质的样品进行检测时需要重新验证方法的定量限、重复性等关键指标，以确保该方法可以用于该类样品的检测。本研究选择了含油性和非油性的两类调味料产品，验证使用不同的前处理方法，检测方法的定量限、重复性等指标没有受到影响，符合标准要求，能够达到日常检测的要求。

参考文献

- 王君, 刘秀梅. 部分市售食品中总黄曲霉毒素污染的监测结果[J]. 中华预防医学杂志, 2006, (1): 33-37.
Wang J, Liu XM. Surveillance on contamination of total aflatoxins in corn, peanut, rice, walnut and pine nut in several areas in China [J]. Chin J Prev Med, 2006, (1): 33-37.
- 周凯, 徐振林, 曾庆中, 等. 花生(油)中黄曲霉毒素的污染、控制与消除[J]. 中国食品学报, 2018, 18(6): 229-239.
Zhou K, Xu ZL, Zeng QZ, et al. Aflatoxin in peanut (oil): A review on the contamination survey, control and elimination methods [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2018, 18(6): 229-239.
- 翟雪华. 粮油食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 现代食品, 2019, (1): 120-121.
Zhai XH. Research progress on detection methods of aflatoxins in cereals, oils and foods [J]. Mod Food, 2019, (1): 120-121.
- 韩伟, 向红莉. 谷物中黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J]. 现代食品, 2018, 11(21): 122-124.
Han W, Xiang HL. Research progress on the detection method of aflatoxin in grains [J]. Mod Food, 2018, 11(21): 122-124.
- 武洪东. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品界, 2018, (10): 96.
Wu HD. Research progress on detection methods of aflatoxins food ind [J]. Food More, 2018, (10): 96.
- 赵群, 丛锋, 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.
Zhao Q, Cong D, Xu ZB. Research progress on detection methods of aflatoxins B₁ in cereals [J]. Chin Gra Eco, 2015, (6): 59-60.
- 李少晖, 任丹丹, 谢云峰, 等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(4): 1107-1115.
Li SH, Ren DD, Xie YF, et al. Research progress on determination methods of aflatoxins in foodstuffs [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(4): 1107-1115.
- 李龙飞. 牛乳中黄曲霉毒素 M₁ 检测方法的研究进展[J]. 乳业科学与技术, 2016, 39(3): 39-43.
Li LF. A review on methods used for aflatoxin M₁ detection in milk [J]. J Dairy Sci Technol, 2016, 39(3): 39-43.
- 翟晓瑞, 李燕. 乳品中黄曲霉毒素 M₁ 残留检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(6): 2309-2313
Zhai XR, Li Y. Research progress of detecting methods of aflatoxin M₁ in dairy products [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(6): 2309-2313.
- 刘利晓, 张亮, 向艳娥, 等. 饲料中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2016, 37(3): 33-35.
LIU LX, Zhang L, Xiang YE et al. Research progress on the detection method of aflatoxin in feeds [J]. Anim Husb Feed Sci, 2016, 37(3): 33-35.
- 蒿艳蓉, 苏建家. 黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)体内代谢研究进展[J]. 现代预防医学, 2009, 36(1): 146-149.
Gao YR, Su JJ. Research progress of metabolism of aflatoxin B₁ in vivo [J]. Mod Pre Med, 2009, 36(1): 146-149.
- 王重阳, 吴小慧, 张喆昌, 等. 酶联免疫法检测混合植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(4): 881-885.
Wang CY, Wu XH, Zhang ZC et al. Determination of aflatoxin B₁ in mixed vegetable oil by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(4): 881-885.
- 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[S].
GB 5009.22-2016 National food safety standard-Detection of aflatoxin groups B and G in food [S].
- 柳其芳. 酶联免疫吸附法和薄层色谱法联合分析黄曲霉毒素 B₁ 的研究[J]. 中国热带医学, 2006, (2): 246-248.
Liu QF. Study on the detection of aflatoxin B₁ by ELISA and thin layer chromatography [J]. Chin Tro Med, 2006, (2): 246-248.
- GB/T 27417-2017 合格评定化学分析方法确认和验证指南[S].

GB/T 27417-2017 Conformity assessment verification and validation of methods on chemical analysis [S].

Chem, 2009, 395(5): 1291-1299.

(责任编辑: 王 欣)

[16] Zhang L, Xu WZ, Yue P, *et al.* High occurrence of aflatoxin B₁ in Pixian doubanjiang, a typical condiment in Chinese cuisine [J]. Food Control, 2020, 110: 1-3.

[17] Zhao XB, Donald WS, Yue TL. Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: Point and probability risk assessments for aflatoxin B₁ [J]. Food Control, 2013, 33(2): 366-377.

[18] Whitaker TB, Trucksess MW, Weaver CM, *et al.* Sampling and analytical variability associated with the determination of aflatoxins and ochratoxin A in bulk lots of powdered ginger marketed in 1-lb bags [J]. Anal Bioanal

作者简介



胡成国, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。

E-mail: hucg@sqi.org.cn

“食品加工过程中有毒有害物质分析”专题征稿函

食品加工过程中有时会形成有毒有害物质, 如丙烯酰胺、杂环胺、三氯丙醇等, 以及以铅、砷、汞等有害矿物质元素为代表的环境污染物。随着全球对食品安全问题的关注, 食品的化学安全问题已成为同行关注的热点领域。

鉴于此, 本刊特别策划了“食品加工过程中有毒有害物质分析”专题, 由西华大学杨潇教授担任专题主编, 主要围绕食品加工产生的有毒有害物质分析与代谢机理、分析检测方法、安全性评价、产生途径、形成机理、控制方法、毒性干预、分离分析等方面或您认为有意义的相关领域展开论述和研究, 综述及研究论文均可。本专题计划在 2020 年 8~9 月出版。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及专题主编四川农业大学杨潇教授特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2020 年 6 月 30 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**食品加工过程中有毒有害物质分析**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **食品加工过程中有毒有害物质分析**)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **食品加工过程中有毒有害物质分析**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部