

4种黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒 与液相法检测结果比较

胡玲玲¹, 项瑜芝¹, 蔡增轩², 任一平^{1,2*}

(1. 浙江工业大学化学工程与材料学院, 杭州 310014; 2. 浙江省疾病预防控制中心, 杭州 310051)

摘要: **目的** 综合评价 4 种不同厂家的黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒。**方法** 选择几种食品基质(婴幼儿米粉、花生酱、酱油), 分别用 R-Biopharm, Romer, Helica 和华安麦科的黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒检测, 将测定结果与液相色谱法测得结果进行比对。**结果** 通过与液相色谱法测得结果比较, 华安麦科试剂盒只适合检测婴幼儿米粉样品。Helica 和 R-Biopharm 试剂盒能检测多种基质, 而 Helica 试剂盒检测结果与液相相符度低, R-Biopharm 试剂盒检测米粉时, 本底较高。Romer 试剂盒适用于花生酱和酱油样品。**结论** 为了得到最佳的检测结果, 针对不同的样品基质, 应选择合适的试剂盒。当用酶联法检测出阳性样品时, 需用液相色谱法确认。

关键词: 黄曲霉毒素; 酶联免疫法; 液相色谱法

A comparative study on 4 kinds of aflatoxin B₁ assay kits and liquid chromatography

HU Ling-Ling¹, XIANG Yu-Zhi¹, CAI Zeng-Xuan², REN Yi-Ping^{1, 2*}

(1. College of Chemical Engineering and Materials Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou 310051, China)

ABSTRACT: Objective To compare and evaluate 4 kinds of aflatoxin B₁ assay kits and liquid chromatography. **Methods** Three sample matrixes (infant formula rice flour, peanut butter and soy bean sauce) were detected using RIDASCREEN[®] aflatoxin B₁ assay, AgraQuant[®] aflatoxin B₁ assay, Helica low matrix aflatoxin B₁ assay and Huaan magnech aflatoxin B₁ assay, and then compared the analysis results with those by liquid chromatography. **Results** By contrast, Huaan magnech aflatoxin B₁ assay applied to only the infant formula rice flour. HELICA low matrix aflatoxin B₁ assay and RIDASCREEN[®] aflatoxin B₁ assay could detect more sample matrixes, but the analysis results of Helica low matrix aflatoxin B₁ assay were inconsistent with those by liquid chromatography, the background of RIDASCREEN[®] aflatoxin B₁ assay was higher. AgraQuant[®] aflatoxin B₁ assay were applied to peanut butter and soybean sauce. **Conclusion** In view of the different of the sample matrix, the suitable assay kit needed to be chosen to get the best analysis results. When the results of ELISA were positive, the HPLC method was needed for further validation.

KEY WORDS: aflatoxin; enzyme-linked immunosorbent assay; liquid chromatography

*通讯作者: 任一平, 本科, 教授级高级工程师, 研究方向为卫生理化检验技术及食品安全检测技术。E-mail: renyiping@263.net

*Corresponding author: REN Yi-Ping, Professorate Senior Engineer, Zhejiang Provincial Center for Disease Prevention and Control, No.3399, Bingsheng Road, Binjiang District, Hangzhou 310051, China. E-mail: renyiping@263.net

1 引言

黄曲霉毒素是由黄曲霉和寄生曲霉在生长后期分泌产生的一类次生代谢产物,是一类毒性极强的物质^[1],其毒性是氰化钾的10倍。黄曲霉毒素是一种强烈的肝脏毒,对肝脏有特殊亲和性并有致癌作用。它主要强烈抑制肝脏细胞中RNA的合成,破坏DNA的模板作用,阻止和影响蛋白质、脂肪、线粒体、酶等的合成与代谢,干扰动物的肝功能,导致突变、癌症及肝细胞坏死。

黄曲霉毒素主要污染粮油食品,如花生、玉米、大米、小麦、酱油、坚果等。在天然污染食品中,以黄曲霉毒素 B₁ 最为常见,且毒性最大^[2]。新制定的国家标准^[3]GB2761-2011 食品中真菌毒素限量中已经明确指出各类食品中黄曲霉 B₁ 的限量,且规定特殊膳食食品中黄曲霉毒素 B₁ 限量为 0.5 μg/kg。因此,选择一种灵敏度高,操作简单的检测方法非常必要。

目前,黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法主要有酶联免疫法^[4-7](enzyme-linked immunosorbent assay)、高效液相色谱法^[8-11],液相色谱串联质谱法^[12-16]等。酶联免疫法和高效液相色谱法是企业最为常用的两种检测方法。ELISA 法具有操作简单,灵敏度高等优点,是一种理想的快速筛选方法,但由于存在交叉反应,易出现假阳性。HPLC 法灵敏度高,定量准确,但样品前处理较为烦琐,劳动强度大。本研究选取了婴幼儿米粉样品,花生酱,酱油等样品,分别用液相法和酶联法进行检测,将不同厂家黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒的测定结果与液相法测得结果相比较,以评估 4 种黄曲霉毒素试剂盒的适用性。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

R-Biopharm 酶标仪(内置波长 450 nm); Waters 超高压液相色谱仪 ACQUITYTM, 配自动进样器和荧光检测器; 固相萃取装置(20pos 16 mm × 100 mm, 美国 Waters 公司); 黄曲霉毒素免疫亲和柱(美国 Romer 公司); Allegra 64R 型离心机(美国 Beckman Coulter 公司); 微量可调 8 通道移液器(30~300 μL); 50 mL PP 材料离心管(美国 Labcon 公司); 涡旋振荡器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

R-Biopharm 黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒, Romer 黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒, Helica 黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒, 华安麦科黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒, 黄曲霉毒素 B₁ 标准品(美国 Romer 公司); 甲醇、乙腈、正己烷(色谱纯); 氯化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、氯化钾、吐温-20(分析纯); 婴幼儿米粉、花生酱、酱油样品(购自市场)。

2.2 试验用溶液

70%甲醇水溶液: 在 700 mL 甲醇中加入 300 mL 水; 84%乙腈水溶液: 在 840 mL 乙腈中加入 160 mL 水; 90%乙腈水溶液: 在 900 mL 乙腈中加入 100 mL 水; 50%乙腈甲醇混合溶液: 在 500 mL 乙腈中加入 500 mL 甲醇。

PBS 缓冲溶液: 称取 8.0 g 氯化钠, 1.2 g 磷酸氢二钠, 0.2 g 磷酸二氢钾, 0.2 g 氯化钾, 用 900 mL 纯水溶解, 然后用浓盐酸调节 pH 值至 7.4, 最后用纯水稀释至 1000 mL。

1%吐温的 PBS 溶液: 吸取 10 mL 吐温-20, 用 PBS 缓冲溶液稀释至 1000 mL。

黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液: 取黄曲霉毒素 B₁ 标准品(1 mg/mL)100 μL, 用乙腈稀释至 10 mL, 在 -20 °C 冰箱内保存、备用, 临用前用紫外分光光度计校正。

2.3 样品预处理

2.3.1 酶联法预处理

称取 3.0 g 样品, 加入 9 mL 60%甲醇溶液, 涡旋 5 min, 8000 r/min 离心 5 min, 取 100 μL 上清液, 用 300 μL 样品稀释液进行稀释, 备用(以华安麦科试剂盒为例, 其他试剂盒需按照试剂盒中所提供方法)。

2.3.2 液相法预处理

样品提取: 取 5.0 g 样品, 加入乙腈/水(84:16, v:v) 20 mL, 涡旋 1 min, 超声 0.5 h, 8000 r/min 离心 5 min, 取 4 mL 上层清液, 加 1%吐温的 PBS 溶液稀释至 50 mL, 液体备用。

样品净化: 先将免疫亲和柱内液体排光, 在免疫亲和柱上接一个 50 mL 的注射器, 将提取的液体上黄曲霉毒素免疫亲和柱, 上样完后, 用 10 mL PBS 溶液淋洗柱子 1 次, 抽干, 再用 5 mL 的甲醇洗脱, 吹干, 收集洗脱液, 并氮吹干, 用 1.0 mL 乙腈水(90:10, v:v)溶液溶解残渣, 过 0.22 μm 滤膜并收集滤液, 备用。

2.4 样品检测

2.4.1 酶联法检测

将所需试剂从冷藏环境中取出,置于室温(20℃~25℃)平衡30 min以上,注意每种液体试剂使用前均须摇匀。取出需要数量的微孔板,将不用的微孔放入自封袋,保存于2℃~8℃。编号:将样品和标准品对应微孔按序编号,每个样品和标准品做2孔平行,并记录标准孔和样品孔所在的位置。

加标准品/样品:加标准品/样品50 μL/孔到对应的微孔中,然后加入抗试剂50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30 min。

洗板:小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 μL/孔,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干。

加酶标物:加入酶标物100 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15 min,取出重复洗板步骤。

显色:加入底物液A液50 μL/孔,再加底物液B液50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15~20 min。

测定:加入终止液50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处,测定每孔OD值。(以华安麦科试剂盒为例,其他试剂盒需按照试剂盒中所提供方法)。

2.4.2 液相法检测

按下列色谱条件,取20 μL,进UPLC-FLD检测分析。色谱柱:Waters ACQUITY UPLC™ BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm)。流动相:A相:水,B相:乙腈-甲醇。等梯度洗脱条件:A:65%,B:35%。流速:

0.3 mL/min。柱温:40℃。进样量:10~20 μL。荧光检测器:激发波长:365 nm,发射波长:436 nm。

3 结果与讨论

3.1 试剂盒之间的比较

3.1.1 定量限

根据国家真菌毒素限量食品安全基础标准^[4]GB2761-2011的规定,婴幼儿米粉、酱油、花生酱样品中黄曲霉毒素B₁的限量分别为0.5、5.0、20.0 μg/kg。因此,为了满足婴幼儿米粉最低限量的要求,所选试剂盒定量限最好在0.5 μg/kg以下。

参考各厂家所给出的检测定量限(表1)。本实验中选择较简单的阴性婴幼儿米粉样品作为基质,添加4个不同浓度的黄曲霉毒素B₁标准品,做3个平行,按照各家酶联试剂盒所给的操作方法进行试验,通过测得米粉中的黄曲霉毒素B₁含量,来考察酶联试剂盒是否能满足检测要求。实验测定结果见表1,由结果可知,Romer的酶联免疫试剂盒不能满足婴幼儿米粉的检测,但能达到更低的定量限。华安麦科、Helica和R-Biopharm的酶联免疫试剂盒定量限均可满足婴幼儿米粉检测要求,华安麦科的定量限最低且偏差较小,更适合用于婴幼儿米粉的检测。

3.1.2 试剂盒回收率

本实验中选择两种阴性基质(婴幼儿米粉、花生酱)进行试验,分别添加3个不同浓度的黄曲霉毒素B₁标准品,每个添加浓度平行3份,按各家酶联试剂盒所给说明书进行实验操作,测得各加标样品的吸光度,经计算得到加标样品浓度,结果见表2。Romer公司的试剂盒,不适合检测限量要求低的婴

表1 不同厂家酶联免疫试剂盒定量限
Table 1 LOQ of different manufacturer ELISA kits(μg/kg, n=3)

试剂盒标注定量限(μg/kg)	华安麦科		Helica		R-Biopharm		Romer	
	0.12		0.6		0.5		2.0	
加标量(μg/kg)	实测值	RSD	实测值	RSD	实测值	RSD	实测值	RSD
0.12	0.13	20.4	-	-	0.31	34.5	-	-
0.5	0.51	10.5	0.40	15.6	0.47	11.2	-	-
1.0	1.19	8.7	0.87	11.8	0.88	10.1	0.97	35.4
2.0	2.86	7.4	2.05	19.2	2.26	6.3	1.89	24.5

-表示未检出

幼儿米粉样品,仅适合检测花生酱样品。而华安麦科、R-Biopharm 和 Helica 公司的试剂盒可用于婴幼儿米粉样品的检测。3 家试剂盒相比较,华安麦科公司试剂盒定量限最低,能检测低于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 含量的样品,针对大米基质测定实用性更好,但由于只适用于检测大米类基质,检测基质范围较窄,而 Helica 和 R-Biopharm 公司的试剂盒,能适用检测多种基质,但对于低于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的婴幼儿米粉样品,检测结果存在一定偏差。

3.2 酶联法与液相色谱法比较

在本实验中,挑选了婴幼儿米粉、花生酱和酱油样品,分别用不同厂家的黄曲霉毒素 B₁ 酶联试剂盒

和液相色谱法进行检测,结果见表 3。结果表明,对于婴幼儿米粉样品,华安麦科试剂盒本底干扰低,相对于液相色谱法含量,偏差为 12.2%~15.0%。Helica 和 R-Biopharm 试剂盒本底干扰较高,相对于液相色谱含量,偏差分别为 15.0%~28.6%和 2.0%~72.0%,选择华安麦科公司试剂盒更佳。对于花生酱样品,R-Biopharm 试剂盒检测结果偏阳性,偏差为 0.4%~13.1%,Romer 试剂盒检测结果偏阴性,偏差为 16.7%~34.4%,Helica 试剂盒检测结果偏阴性,偏差为 27.4%~41.9%,选择 R-Biopharm 试剂盒更佳。对于酱油样品,Helica 和 R-Biopharm 公司的试剂盒本底偏高,Romer 公司试剂盒更佳。

表 2 样品回收率
Table 2 Recovery rate of samples($\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$)

样品	加标量	华安麦科			Helica			R-Biopharm			Romer		
		实测值	回收率(%)	RSD	实测值	回收率(%)	RSD	实测值	回收率(%)	RSD	实测值	回收率(%)	RSD
米粉	0.3	0.36	120.0	11.9	-	-	-	0.45	150.0	20.1	-	-	-
	0.5	0.51	102.0	10.5	0.40	80.0	15.6	0.47	94.0	11.2	-	-	-
	2.0	2.86	143.0	7.4	2.05	102.5	19.2	2.26	113.0	6.3	1.89	94.5	24.5
花生酱	5.0	—	—	—	3.23	64.6	8.9	6.14	122.8	8.2	5.99	119.8	8.5
	10.0	—	—	—	8.11	81.1	13.3	12.34	123.4	10.7	13.8	137.6	7.9
	20.0	—	—	—	15.2	76.1	12.0	26.87	134.4	7.4	28.3	141.5	3.6

—表示未检测,-表示未检出

表 3 不同基质样品含量
Table 3 Different matrix sample content($\mu\text{g}/\text{kg}$, $n=3$)

样品	华安麦科	Helica	R-Biopharm	Romer	液相色谱法
米粉 1	1.61±0.09	1.19±0.15	1.20±0.10	-	1.40±0.05
米粉 2	-	0.14±0.06	0.26±0.15	-	-
米粉 3	0.43±0.08	0.35±0.19	0.48±0.08	-	0.49±0.03
米粉 4	0.22±0.05	0.22±0.10	0.43±0.06	-	0.25±0.03
花生酱 1	-	1.22±0.43	-	-	-
花生酱 2	-	1.40±0.26	2.61±0.31	1.58±0.20	2.41±0.10
花生酱 3	-	45.47±9.40	70.82±8.20	52.16±6.34	62.62±4.32
酱油 1	-	1.39±0.22	3.12±0.42	0.49±0.11	-
酱油 2	-	1.21±0.32	2.35±0.19	0.56±0.08	-

4 结 论

本研究主要比较了不同厂家的黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫试剂盒, 并将试剂盒所测得结果与液相色谱法结果进行比对。结果表明, 酶联免疫法是一种快速筛选方法, 对不同基质的检测差异性较大, 因此针对不同的样品基质, 需要合理选择酶联免疫试剂盒。由于市场上酶联免疫试剂盒质量参差不齐, 在对相应基质进行检测之前, 应参考相关标准, 对试剂盒的定量限和回收率进行验证, 以确保结果的准确性。由于酶联免疫中存在的交叉反应, 可能出现假阳性现象。因此, 当检测过程中出现阳性样品时, 需要用液相色谱法进行确认。

参考文献

- [1] 何学超, 冯永建, 道林, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 液相色谱法检测技术比较分析[J]. 粮食储藏, 2008, 37(5): 36-40.
He XC, Feng YJ, Dao L, *et al.* Comparison and analysis of the methods for determination of AFTB₁ by HPLC [J]. Grain Stor, 2008, 37(5): 36-40
- [2] 龚珊, 任正东, 潘静, 等. HPLC 测定玉米中黄曲霉毒素 B₁ 前处理提取方法的探讨[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2012, 33(1): 57-58.
Gong S, Ren ZD, PAN J, *et al.* Study on sample pretreatment method for determining AFT B₁ in maize by HPLC [J]. J Henan Univ Tech (Nat Sci), 2012, 33(1): 57-58
- [3] GB2761-2011. 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2011.
GB2761-2011. Maximum levels of mycotoxins in foods [S]. Beijing: Ministry of Health of the People's Republic of China, 2011
- [4] 卢安根, 莫建光, 杜寒春, 等. 酶联免疫法快速检测牛奶及其制品中的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 广西科学院学报, 2010, 26(3): 306-308.
Lu AG, Mo JG, Du HC, *et al.* Application of ELISA for rapid detection aflatoxin B₁ in milk and dairy products [J]. J Guangxi Acad Sci, 2010, 26(3): 306-308.
- [5] Mustafa A, Yakup K, Mustafa A. Determination of aflatoxin B₁ levels in deep-red ground pepper(isot) using immunoaffinity column combined with ELISA [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46: 1596-1599.
- [6] 齐惠萍, 吕建明, 李常青. ELISA 法检测食醋中黄曲霉毒素 B₁ 方法的改进[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(4): 313-315.
Qi HP, Lv JM, Li CQ. Improvement on pretreatment method of aflatoxin b₁ in vinegar with enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Chin J Food Hyg, 2008, 20(4): 313-315
- [7] 王雄, 王艳斐, 果旗, 等. 黄曲霉毒素直接竞争法 ELISA 试剂盒的研制及其在花生和花生制品中的应用[J]. 中国饲料, 2010, 16: 37-39.
Wang X, Wang YF, Guo Q, *et al.* Application of the directness competition ELISA kit for determination aflatoxin content in peanut and peanut products[J]. Chin Feed, 2010, 16: 37-39.
- [8] Xubo Z, Donald WS. Quantification of aflatoxin risk associated with Chinese spices: point and probability risk assessments for aflatoxin B₁ [J]. Food Cont, 2013, 33: 366-377.
- [9] 张雪辉, 陈建民. 免疫亲和柱净化 HPLC 柱后溴衍生化方法检测中药中黄曲霉毒素[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(3): 182-184.
Zhang XF, Chen JM. HPLC analysis of aflatoxins in medicinal herb extracts by immunoaffinity column cleanup and post-column bromination [J]. Chin J Chin Mater Med, 2005, 30(3): 182-184.
- [10] Yazdanpanah H, Zarghi A. Analysis of aflatoxin B₁ in Iranian foods using hplc and a monolithic column and estimation of its dietary intake [J]. Iranian J Pharm Res, 2013, 12: 81-87.
- [11] 马占峰. 免疫亲和柱净化-在线柱后光化学衍生-高效液相色谱-荧光检测法快速测定食品中的黄曲霉毒素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(6): 210-211.
Ma ZF. Fast determination of aflatoxins in food by HPLC with fluorescence detection after immunoaffinity column with online post-column photochemical derivatization [J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(6): 210-211
- [12] 刘晓茂, 李学民, 王飞, 等. 超高压液相色谱-串联质谱法测定食用植物油中 4 种黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂[J]. 食品安全质量检测学报, 2012, 3(5): 514-518.
LIU XM, LI XM, WANG F, *et al.* Determination of aflatoxin B₁, B₂, G₁ and G₂ in edible vegetable oil by ultra pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(5): 514-518 .
- [13] Ren YP, Zhang Y, Shao SL, *et al.* Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2007, 1143: 48-64.
- [14] 王秀斌, 李培武, 杨扬, 等. 液相色谱-三重串联四极杆质谱测定粮油中的黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2011, 29(6): 517-522.
Wang XP, Li PW, Yang Y, *et al.* Determination of aflatoxins in cereals and oils by liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2011, 29(6): 517-522.
- [15] Huang BF, Han Z, Cai ZX, *et al.* Simultaneous determination of

aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Anal Chem Acta, 2010, 662(1): 62-68.

- [16] 冯伟科, 罗佳玲, 赖毅东. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定花生制品中的黄曲霉毒素 B1、B2、G1、G2 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(8): 1040-1042, 927.

Feng WK, Luo JL, Lai YD. Simultaneous determination of aflatoxin B1, B2, G1 and G2 in peanuts by HPLC-MS [J]. Mod Food Sci Tech, 2011, 27(8): 1040-1042, 927.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



胡玲玲, 硕士研究生, 主要研究方向为食品中真菌毒素检测。

E-mail: 15858229967@163.com



任一平, 本科, 教授级高级工程师, 主要研究方向为卫生理化检验技术、食品安全检验技术。

E-mail: renyiping@263.net