

酶联免疫法检测酱油中的黄曲霉毒素 B₁

李江^{1*}, 李晓明¹, 蔡艳¹, 田秀梅², 张娟¹, 龙顺荣¹

(1. 广东产品质量监督检验研究院, 国家食品质量监督检验中心(广东), 佛山 528300;

2. 北京华安麦科生物技术有限公司, 北京 102200)

摘要: **目的** 建立酶联免疫法检测酱油中黄曲霉毒素 B₁(Aflatoxin B₁, AFB₁)的分析方法。 **方法** 酱油样本经纯乙腈(料液比=1:2, V:V)提取, 再做 1:9 稀释, 通过酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定样本中 AFB₁。 **结果** 当加标浓度为 2 μg/kg 和 5 μg/kg 时, 纯乙腈对酱油中 AFB₁ 的提取回收率结果分别为 121.3%和 106.5%; 方法检出限为 1 μg/kg。与国标方法检测结果的相对标准偏差小于 10%。 **结论** 本方法准确、灵敏度高, 可适用于酱油中 AFB₁ 的检测。

关键词: 酶联免疫法; 酱油; 黄曲霉毒素 B₁

Detection of aflatoxin B₁ in soy sauce by enzyme linked immunosorbent assay

LI Jiang^{1*}, LI Xiao-Ming¹, QI Yan¹, TIAN Xiu-Mei², ZHANG Juan¹, LONG Shun-Rong¹

(1. Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, China National Quality Supervision and Testing Center for Foods, Foshan 528300, China; 2. Beijing Huaan Magnech Bio-Tech Co., Ltd., Beijing 102200, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the detection of aflatoxin B₁ in soy sauce by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Methods** Soy sauce was extracted with acetonitrile (1:2, V:V), and processed with 1:9 dilution, and then the content of AFB₁ in samples was determined by ELISA. **Results** When the spiked concentrations were 2 μg/kg and 5 μg/kg, the recoveries of AFB₁ in soy sauce extracted by pure acetonitrile were 121.3% and 106.5%, respectively. The limit of detection was 1 μg/kg. Compared with the national standard method, the relative standard deviation of result was less than 10%. **Conclusion** This method is accurate and sensitive, which is suitable for the detection of AFB₁ in soy sauce.

KEY WORDS: enzyme linked immunosorbent assay; soy sauce; aflatoxin B₁

1 引言

黄曲霉毒素是黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)产毒菌株代谢产物的总称, 属于真菌毒素^[1,2], 黄曲霉毒素 B₁(aflatoxin B₁, AFB₁)是剧毒物质, 其毒性是氰化钾的 10 倍, 砒霜的 68 倍^[3], 具有极强的致癌

性和致突变性^[4]。人或动物在摄入被黄曲霉毒素 B₁ 污染的食品后, 经新陈代谢会转变为黄曲霉毒素 M₁、P₁ 等物质, 从而影响人类健康^[5,6]。目前依据黄曲霉毒素化学结构和产生衍生物的不同并通过系统鉴定的有 17 种, 其中 AFB₁、B₂、G₁、G₂、M₁ 等几种危害性较大^[7,8], 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的癌症研究机构已于 1993 年将

基金项目: 国家质检总局项目(2013QK281)

Fund: Supported by the Project of National Bureau of Quality Inspection (2013QK281)

*通讯作者: 李江, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全风险评估和毒理学研究。E-mail: 125860258@qq.com

*Corresponding author: LI Jiang, Master, Engineer, Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Foshan 528300, China. E-mail: 125860258@qq.com

黄曲霉毒素划定为 I 类致癌物质^[9]。

很多国家对 AFB₁ 已制定严格限量标准^[10]。目前所采用的黄曲霉毒素常规分析方法主要有薄层色谱法(thin layer chromatograph, TLC)^[11,12]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[13,14]、高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[15]及酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)等^[16]。

酱油是用黄豆或黑豆等原料发酵制成,是家庭生活常用调味品,但生产原辅料、酿制过程中易引入 AFB₁,导致成品酱油中含有微量 AFB₁。我国卫生指标中要求酱油中的 AFB₁ ≤ 5 μg/kg^[17], GB/T 5009.22-2003《食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定》^[18]和 GB/T 5009.23-2006《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定》^[19]中对酱油 AFB₁ 的提取都要用到三氯甲烷,提取液还需 65 °C 水浴锅通风挥干或浓缩蒸馏器减压蒸干,耗时长且操作步骤繁琐;TLC 法虽然简便,但灵敏度差;HPLC 虽然灵敏度高,但样品前处理烦琐,检测时间长,对酱油和醋等调味品还不是很适用;而 ELISA 法由于其快速灵敏、准确、操作简便、无需贵重仪器设备且对样品纯度要求不高等优点,特别适用于大批量酱油样品的检测^[20]。本研究拟采用 ELISA 法检测酱油中的 AFB₁ 含量,旨在为 AFB₁ 的相关检测和监管提供参考。

2 材料与方法

2.1 试剂与仪器

甲醇、乙腈(分析纯,广州化学试剂厂);

MULTISKAN MK3 酶标仪(美国 Thermo 公司); Thermo 高速离心机(美国 Thermo 公司); G&G 电子天平(深圳市海恒精密工具有限公司)。

黄曲霉毒素 B₁ 标准品、黄曲霉毒素 B₁ ELISA 检测试剂盒(北京华安麦科生物有限公司)

酱油样本,市售。

2.2 实验方法

2.2.1 样品前处理

分别采用 60%、80% 的甲醇-水、乙腈-水及纯甲醇、乙腈作为样本提取液,提取步骤为:称取 25.0 g 酱油样本到分液漏斗中,加入 50.0 mL 上述不同浓度提取液,在振荡器上振摇 10.0 min,然后将混合提取液放入 10.0 mL 离心管中,4000 r/min 离心 5.0 min,再用定量滤纸过滤;取 100 μL 滤液到 2.0 mL 离心管,加入 900 μL 磷酸盐缓冲液(pH=6.5)做 1:9 稀释,即为样本待测液。

2.2.2 ELISA 检测样本中 AFB₁

将酶联免疫试剂盒从冷藏环境中取出,置于室温(20~25 °C)平衡 30 min,取出微孔板,将样本和标准品对应

微孔按序编号,并记录标准孔和样本孔所在的位置;加入标准品或样本 50 μL 到对应的微孔中,加入 AFB₁ 酶标物 50 μL/孔,再加入 AFB₁ 抗试剂 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用避光膜盖住板,置室温环境中反应 15 min;反应时间结束,小心揭开膜,将微孔内液体甩干,用洗涤液 300 μL/孔,充分洗涤 5 次,每次间隔 10 s,然后在吸水纸上拍干;加入底物显色液 100 μL/孔,轻轻振荡混匀,用避光膜盖好,置室温环境反应 5 min;反应时间结束,加入终止液 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪波长 A₄₅₀/A₆₃₀ 处测定每孔 OD 值。

2.3 定量分析方法

采用试剂盒专用的分析软件对结果进行分析,该试剂盒标示灵敏度为 0.03 μg/kg,变异系数小于 10%。最终检测结果应以该方法对应的稀释倍数换算。稀释倍数的确定应以酱油是否溶于提取液进行区分,若酱油溶于提取液则酱油所占的体积应考虑进稀释倍数,若采用纯乙腈提取,由于酱油中盐含量较高,酱油于乙腈不互溶,因此稀释倍数确定时则不考虑酱油所占的体积。

3 结果与分析

3.1 提取溶剂的选择

用不同浓度的甲醇、乙腈对空白基质酱油样本通过纯乙腈(料液比=1:2, V:V)提取,1:9 水稀释,得到 AFB₁ 加标回收率的结果(见表 1)。由表 1 可知,纯乙腈对酱油的提取较为理想,平均回收率为 121.3%和 106.5%,因此选纯乙腈为最佳提取溶剂。

3.2 前处理优化

3.2.1 提取比例的优化

为使检测结果更加准确,对提取比例和稀释比例进行优化,考虑方法检出限不能过高的原因,因此选取 1:1、1:2 和 1:3(V:V)为不同提取比例,稀释比例固定为 1:9 条件下的检测结果,由结果可以看出当提取比例为 1:2,稀释比例为 1:9 的条件下回收率最好,且整个方法的稀释倍数为 20 倍,检出限满足要求(见表 2)。

3.2.2 稀释比例的优化

由于整个酶联免疫反应体系能耐受的有机溶剂浓度有限,一般不超过 10%,因此进一步对稀释比例进行确认,分别采用 4 个稀释倍数进行测定(见表 3)。由表 3 可以看出,当稀释比例为 1:5 时,样本有机溶剂含量超过 10%,由于有机溶剂对反应体系中酶标物和抗试剂等蛋白成分的破坏,影响了抗原抗体的结合,因此回收率偏高,该稀释比例不合适;而随着稀释比例的增大,对回收率无影响,但考虑到方法检出限,确定稀释比例为 1:9,样本稀释倍数为 20 倍,为最优稀释比例。

表 1 不同浓度提取溶剂的回收率结果(n=6)
Table 1 Results of recoveries under different concentrations of extraction solvent (n=6)

提取溶剂	加标浓度(μg/kg)	检测值(μg/kg)	平均回收率(%)	RSD(%)
60% 甲醇	2.0	4.3	216.4	5.2
	5.0	8.9	178.5	6.5
80% 甲醇	2.0	3.7	187.2	3.1
	5.0	7.7	153.9	7.9
纯甲醇	2.0	3.8	192.4	5.5
	5.0	8.0	159.1	9.7
60% 乙腈	2.0	6.3	315.7	5.6
	5.0	17.3	345.7	8.4
80% 乙腈	2.0	3.6	178.2	10.3
	5.0	9.0	179.0	5.5
纯乙腈	2.0	2.4	121.3	6.8
	5.0	5.3	106.5	4.6

表 2 不同提取比例的回收率结果(n=6)
Table 2 Recoveries under different extract ratio (n=6)

提取溶剂	提取及稀释比例	加标浓度(μg/kg)	检测值(μg/kg)	回收率(%)	RSD(%)	稀释倍数
纯乙腈	1: 1 提取 1:9 稀释	2.0	2.4	120.0	5.6	10 倍
		5.0	7.7	154.0	9.7	
	1: 2 提取 1:9 稀释	2.0	2.1	105.0	8.5	20 倍
		5.0	5.1	102.0	6.4	
	1: 3 提取 1:9 稀释	2.0	3.1	155.0	6.4	30 倍
		5.0	6.9	138.0	3.8	

3.3 检出限

用试剂盒分别检测 20 份采用液相色谱方法测定为阴性的样本, 计算样本中 AFB₁ 的含量, 方法的检出限等于阴性空白样本的检测平均值加上阴性样本检测浓度的 3 倍标准偏差, 检测结果见表 4。

3.4 与国标(GB)方法的比较

为确定方法的准确性, 选取已知浓度的 4 个酱油阳性样本进行结果比较(见表 5)。由表 5 结果可以看出, 本研究方法 与 国 标 液 相 方 法 符 合 良 好, 相 对 标 准 偏 差 小 于 10%, 说明该方法能够对酱油样本中 AFB₁ 进行定量检测。

4 结 论

本研究用酶联免疫法来检测酱油样本中的 AFB₁, 通过对 ELISA 检测体系的优化, 样品用纯乙腈 1:2 提取, 提取液再以 1:9 水稀释, 该方法准确性高, 精密度均小于 10%。当前国标方法中第一法对黄曲霉毒素 B₁ 的检出限为 5 μg/kg, 而本方法的检出限为 1 μg/kg。本方法从检出限、样品前处理上都优于国标方法, 且在保证检测结果准确性的同时, 大幅度简化了实验步骤, 避免了实验人员使用过多有毒有害溶剂, 可为进一步探究其他食品中 AFB₁ 的酶联免疫检测奠定基础。

表 3 不同稀释比例的回收率结果
Table 3 Recoveries under different dilution ratios

提取方法	稀释比例	加标浓度(μg/kg)	检测值(μg/kg)	回收率(%)	RSD(%)	稀释倍数
纯乙腈 1:2 提取	1:5 稀释	2.0	3.8	188.3	5.4	12 倍
		5.0	8.7	173.8	6.4	
	1:9 稀释	2.0	2.3	115.0	3.5	20 倍
		5.0	5.4	108.3	6.7	
	1:15 稀释	2.0	2.6	131.3	5.7	32 倍
		5.0	5.7	114.0	6.9	
	1:19 稀释	2.0	2.3	112.6	2.5	40 倍
		5.0	6.0	120.5	8.2	

表 4 方法检出限的结果
Table 4 Results of the detection limit

处理方法	样本检测平均浓度(μg/kg)	标准偏差	检测限(μg/kg)
1: 2 乙腈提取, 1:9 水稀释	0.17	0.28	1.0

表 5 试剂盒方法与 GB 方法检测结果对比
Table 5 Comparison of results between kit method and GB method

样本名称	液相检测值(μg/kg)	本方法检测值(μg/kg)	符合率(%)	RSD(%)
酱油 1 号	4.1	4.5	109.8%	8.5
酱油 2 号	8.3	9.6	115.7%	3.2
酱油 3 号	16.5	19.8	120.1%	8.4
酱油 4 号	3.8	3.2	84.2%	6.2

参考文献

[1] Ardic M, Karakaya Y, Atasever M, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ levels in deep red ground pepper (isot) using immune affinity column combined with ELISA [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46: 1596–1599.

[2] Creppy E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe [J]. Toxicol Lett, 2002, 127: 19–28.

[3] 李培武, 马良, 杨金娥, 等. 粮油产品黄曲霉毒素 B₁ 检测技术研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(3): 404–408.
Li PW, Ma L, Yang JE, *et al.* A review on analytical methods for aflatoxin B₁ in grains and oilseeds products [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2014, 36(3): 404–408.

[4] 徐洲, 谭书明, 焦彦朝, 等. 酶联免疫法测定干辣椒中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品科学, 2009, 30(10): 245–247.
Xu Z, Tan SM, Jiao YC, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in dry capsicum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Food Sci, 2009, 30(10): 245–247.

[5] 王彩云, 王政纲, 云战友. 酶联免疫法测定食品和饲料中的黄曲霉毒素[J]. 食品工程, 2007, (4): 58–60.
Wang CY, Wang ZG, Yun ZY. Detecting aflatoxin in food and feed by ELISA [J]. Food Eng, 2007, (4): 58–60.

[6] Kaniou GI, Eleftheriadou A, Mouratidou T, *et al.* Determination of aflatoxin M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese [J]. Food Control, 2005, 16: 257–261.

[7] 赵飞, 焦彦朝, 连宾, 等. 黄曲霉毒素检测方法的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2005, 34(5): 123–126.
Zhao F, Jiao YC, Lian B, *et al.* Research progress in determination methods of aflatoxins [J]. Guizhou Agric Sci, 2005, 34(5): 123–126.

[8] 刘冬儿. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品工业科技, 2002, 23(10): 78–80.
Liu DE. Determination of AFTB₁ in foods by ELISA [J]. Sci Technol Food Ind, 2002, 23(10): 78–80.

[9] Sheijooni FN, Hassan J, Yousefi R, *et al.* Determination of aflatoxin B₁ in cereals by homogeneous liquid-liquid extraction coupled to high performance liquid chromatography-fluorescence detection [J]. J Separat Sci, 2011, 34: 1333–1337.

[10] Roderick N, Hikoya H, Vibeke B, *et al.* Chemopreventive properties of chlorophylls towards aflatoxin B₁: a review of the antimutagenicity and anticarcinogenicity data in rainbow trout [J]. Mutat Res, 1998, 399: 245–253.

- [11] Stroka J, Anklaam E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography [J]. J Chromatogr A 2000, 904(2): 263–268.
- [12] Stroka J, Otterdijk RV, Anklaam E. Immunoaffinity column clean-up prior to thin-layer chromatography for the determination of aflatoxins in various food matrices [J]. J Chromatogr A, 2000, 904(2): 251–256.
- [13] Blesa J, Soriano JM, Molto JC. Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography [J]. J Chromatogr A 2003, 1011: 49–54.
- [14] 彭晓俊, 曾勤, 庞晋山, 等. 自制混合型固相萃取柱-高效液相色谱法同时测定食品中黄曲霉毒素 B₁、M₁[J]. 分析测试学报, 2013, 32(8): 958–962.
- Peng XJ, Zeng Y, Pang JS, *et al.* Determination of aflatoxin B₁, M₁ in foods using homemade mixed solid phase extraction column coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(8): 958–962.
- [15] 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): 513–518.
- L XM, Li XM, W 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): 513–518.
- [16] Kolosova AY, Shim WB, Yang ZY. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples [J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(1): 286–294.
- [17] GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
- GB 2761-2011 National food safety standard-Maximum levels of mycotoxins in foods [S].
- [18] GB/T 5009.22-2003 食品中黄曲霉毒素 B₁ 的测定[S].
- GB/T 5009.22-2006 Determination of aflatoxins B₁ in foods [S].
- [19] GB/T 5009.23-2006 食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定[S].
- GB/T 5009.23-2006 Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂ in foods [S].
- [20] Tudorache M, Bala C. Sensitive aflatoxin B₁ determination using a magnetic particle- based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Sensors, 2008, 8: 7571–7580.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介

李 江, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全风险评估和毒理学研究。
E-mail: 125860258@qq.com