

酶联免疫法检测混合植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量

王重阳¹, 吴小慧^{1*}, 张喆昌¹, 魏鸿媛¹, 金珠¹, 汤晶晶¹, 王丹²

(1. 蒙牛乳业(马鞍山)有限公司, 马鞍山 243000; 2. 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 010000)

摘要: **目的** 建立酶联免疫法测定混合植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量的分析方法。**方法** 采用直接竞争酶联免疫吸附法对样品进行测定。样品经甲醇溶液提取, 提取的抗原及黄曲霉毒素 B₁ 标记物与微孔板上的黄曲霉毒素 B₁ 特异性单克隆抗体竞争结合, 洗涤除去未结合杂质。将底物加入孵育, 产生蓝色产物, 加入终止液终止反应蓝色产物变成黄色产物, 450 nm 处测量吸光度。**结果** 本方法在 2 h 内完成混合植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量的测定。黄曲霉毒素 B₁ 的加标浓度在 1.0~20.0 μg/kg 之间的回收率为 76.5%~120.2%, 方法定量限为 1.00 μg/kg。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合测定混合植物油中黄曲霉毒素 B₁。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 直接竞争酶联免疫吸附法; 混合植物油

Determination of aflatoxin B₁ in mixed vegetable oil by enzyme-linked immunosorbent assay

WANG Chong-Yang¹, WU Xiao-Hui^{1*}, ZHANG Zhe-Chang¹, WEI Hong-Yuan¹, JIN Zhu¹,
TANG Jing-Jing¹, WANG Dan²

(1. Mengniu Dairy (Ma'an Shan) Co., Ltd., Ma'an Shan 243000, China; 2. Inner Mongolia Mengniu Dairy (Group) Limited by Share Ltd., Hohhot 010000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of aflatoxin B₁ in mixed vegetable oil by enzyme immunosorbent assay. **Methods** The samples were determined by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay. The samples were extracted by methanol solution, the extracted antigen was competitive bound with the aflatoxin B₁ marker and the specific monoclonal antibody against aflatoxin B₁ on the microporous plate, and the unbound impurities were removed by washing. When the substrate was incubated, producing blue product, and the blue product was changed into yellow product by adding the termination solution. The absorbance was measured at 450 nm. **Results** The determination of aflatoxin B₁ content in mixed vegetable oil was finished within 2 hours by this method. The recoveries of aflatoxin B₁ were 76.5%-120.2% when the concentration of aflatoxin B₁ was between 1.0-20.0 μg/kg, and the limit of detection was 1.00 μg/kg. **Conclusion** This method is rapid, accurate, sensitive, which is suitable for the determination of aflatoxin B₁ in mixed vegetable oil.

KEY WORDS: aflatoxin B₁; direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay; mixed vegetable oil

1 引言

黄曲霉毒素是一种由曲霉属(*Aspergillus flavus*)和寄生

曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等霉菌产生的次级代谢物^[1]。该毒素广泛存在于谷物、坚果、棉籽和其他食品或饲料中。黄曲霉毒素的基本结构为二呋喃环和香豆素, 黄曲霉毒素

*通讯作者: 吴小慧, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测方法。E-mail: wuxiaohuil@mengniu.cn

*Corresponding author: WU Xiao-Hui, Assistant Engineer, Mengniu Dairy (Ma'an Shan) Co., Ltd., Ma'an Shan 243000, China. E-mail: wuxiaohuil@mengniu.cn

B₁ 是二氢呋喃氧杂萘邻酮的衍生物^[2,3], 含有一个双呋喃环和一个氧杂萘邻酮, 前者为基本毒性成分结构, 后者属于引起致癌性作用的有效基团^[4]。黄曲霉毒素具有强烈致癌性, 与许多人类疾病相关, 包括肝癌、黄曲霉毒素中毒、雷氏症候群、慢性肝炎、肝坏死以及肝硬化等肝脏疾病^[5]。谷物在生长、收割和储藏的过程中会被真菌污染而产生毒素, 当动物进食被污染的饲料时, 会接触黄曲霉毒素。

我国于 2005 年 10 月 1 日期实施的《食用植物油卫生标准》中明确规定植物油中黄曲霉毒素 B₁ 的标准为 10 μg/kg^[6]。食品生产企业在生产中的所用部分原料必须检测黄曲霉毒素后进行使用。目前, 已有的检测黄曲霉毒素含量的方法主要分为 2 类: 一类是以色谱技术为基础的理化检测方法, 即生物鉴定法和仪器检测法^[7]; 另一类是应用免疫层析技术的化学检测方法。其中, 以色谱技术为基础的薄层色谱法^[8,9]周期长、操作过程复杂、所需试剂繁多且毒性大; 高效液相色谱法^[10,11]和液相色谱-质谱联用法^[12,13]所用仪器昂贵, 前处理需要使用的免疫亲和柱费用高, 因此检测成本大, 不适用于工厂生产中大批量检测; 免疫层析技术中的酶联免疫吸附法^[14,15]快速、灵敏、准确、操作简单、成本低, 适用于工厂、医院等大批量的筛选和检测。本研究建立了一种准确、快速的酶联免疫方法, 用于检测混合植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量, 以期检测机构快速检测植物油中黄曲霉毒素 B₁ 含量提供参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

ELX50 酶标仪/洗板机(美国伯爵仪器有限公司); NEOFUGE23R 离心机(上海力申科技有限公司); AL204 电子天平、SevenEasy 酸度计(梅特勒-托利多仪器有限公司); MS3 basic 振荡器(广州仪科实验室技术有限公司)。

甲醇(色谱纯, 美国 Fisher Scientific 公司); 黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒(美国 Helica Biosystems 公司)。

植物油为课题组前期实验获得。

2.2 实验原理

黄曲霉毒素 B₁ 低基质检测试剂盒采用固相直接竞争性酶联免疫分析测定方法检查样品中的黄曲霉毒素。与黄曲霉毒素 B₁ 高亲和力的特异性抗体预先被包被于聚苯乙烯微孔板中。黄曲霉毒素 B₁ 用 50%甲醇、80%甲醇或 80%乙腈抽提得到。如果黄曲霉存在, 它将与包被的特异性抗体结合。随后, 加入的辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的黄曲霉毒素 B₁ 与没有被样品或标准品中黄曲霉毒素结合的特异性抗体位点结合。孵育一定时间后, 倒去微孔中的溶液, 洗掉未结合的物质。然后加入底物, 在酶的作用下颜色变为蓝色。颜色与酶结合物的

量呈正比例关系, 与样品或者标准品中黄曲霉毒素的含量呈反比例关系。因此, 随着标准品和样品中黄曲霉毒素含量的增加, 微孔颜色会逐渐变浅。加入终止液后微孔颜色由蓝色变成黄色。在 450 nm 波长下读取吸光度值, 通过标准溶液浓度和对应的吸光度值绘制标准曲线, 从而确定样品中黄曲霉毒素的含量。

2.3 实验方法

2.3.1 样品前处理

(1) 采样

称取 2.0 g 混合植物油(若样品常温状态呈固态时, 在称量前需水浴加热融化至液态, 同时在提取过程确保样品不会凝固, 否则会导致待测物提取不完全)于 50 mL 离心管中。

(2) 提取

加入 20 mL 甲醇混合, 强力振荡 5~15 min, 调 pH 中性(6.7~7.0 左右), 室温(20~30 °C)。

(3) 试样制备

取上清液与稀释后的洗涤缓冲液(黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒配备)按照 1:4(V:V)比例稀释后, 稀释液进行检测(稀释倍数为 50)。

2.3.2 实验步骤^[16]

(1)使用前所有试剂放置室温回温(19~27 °C)。加 1 L 蒸馏水制备洗涤缓冲液, 并储存于冰箱。

(2)取出需要数量的抗体包被微孔和相同数量的稀释用微孔。

(3)每个稀释用微孔中加入 200 μL 的样品稀释缓冲液。

(4)每个稀释孔中分别加入 100 μL 的标准溶液和样品滤液, 反复吹吸至少 3 次。注意: 标准溶液孔和样品滤液孔应做好标记。

(5)从稀释孔中转移 100 μL 液体至对应的抗体包被孔中, 室温孵育 30 min。稀释微孔中液体可足够做平行样检测。

(6)弃掉内容物后, 用洗涤缓冲液注满微孔后弃掉, 如此反复洗涤 3 次。

(7)微孔朝下放置于吸水纸上, 去掉所有残留的水分。

(8)每孔加入 100 μL 的 HRP 标记的酶结合物试剂, 室温避光孵育 30 min。

(9)重复步骤(6)和(7)。

(10)每孔加入 100 μL 的底物试剂, 室温避光孵育 10 min。

(11)按照相同的顺序加入 100 μL 终止液。

(12)读书 450 nm 波长下每个微孔的吸光度值, 记录结果。

(13)设置零标准液的吸光度值为 100%(B₀), 计算标准液对应的吸光度值的百分数(%B/B₀)。

3 结果与分析

续表 2

3.1 方法检出限

本方法为半定量检测, 黄曲霉毒素 B₁ 试剂盒灵敏度是 0.02 μg/kg, 试剂盒标准曲线检测范围为 0.02~0.4 μg/kg (具体曲线范围根据自己选取的标准品浓度而定), 方法稀释倍数 50 倍, 混合植物油的检出限为 1 μg/kg。黄曲霉毒素 B₁ 检出限参数见表 1。

表 1 黄曲霉毒素 B₁ 检出限实验结果
Table 1 Results of limit of detection of aflatoxin B₁

加标浓度/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	回收率%
本底	0.6	/
	1.0350	103.50
1.00	0.9155	91.55
	1.2560	125.60
	1.1857	118.57

通过上述数据可以看出: 以混合植物油为本底, 在加标浓度为 1 μg/kg 时, 其回收率能达到 91.5%~125.6%, 满足日常检测的需求。此方法的检出限设定为 1 μg/kg。

3.2 回收率

试剂盒标准曲线检测范围为 0.02~0.4 μg/kg(具体曲线范围根据自己选取的标准品浓度而定), 样品稀释倍数为 50 倍, 混合植物油的检测范围为 1.0~20.0 μg/kg。

以混合植物油为基底, 添加黄曲霉毒素 B₁ 浓度分别为 1、1.5、2、2.5、3、5、6、8、10、12、15、18、20 倍检出限, 添加浓度覆盖整条曲线, 同时检测平行实验, 黄曲霉毒素 B₁ 回收率测试参数见表 2。

表 2 黄曲霉毒素 B₁ 回收率结果
Table 2 Recoveries of aflatoxin B₁

加标浓度/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	回收率/%
1.0	1.0350	103.4
	0.9155	91.5
1.5	1.4193	94.6
	1.5312	102.1
2.0	2.0159	100.8
	2.1145	105.7
2.5	3.0051	120.2
	2.8270	113.1
3.0	2.6530	88.4
	2.7230	90.8
5.0	4.3873	87.7
	4.2948	85.9

加标浓度/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	回收率/%
6.0	5.5289	92.1
	5.6310	93.8
8.0	7.0309	87.9
	7.2139	90.2
10.0	8.3866	83.9
	8.2808	82.8
12.0	10.0913	84.1
	9.9748	83.1
15.0	12.4112	82.7
	12.2314	81.5
18.0	13.7618	76.5
	13.8854	77.1
20.0	15.3929	77.0
	15.5539	77.8

从上表数据分析其回收率, 以混合植物油为本底, 在加标浓度在 1.0~20.0 μg/kg 之间时, 共检测 13 组回收率, 范围为 76.5%~120.2%, 满足日常检测的需求。

3.3 精密度

以植物油为本底, 添加浓度为国家标准限量 10 μg/kg, 重复检测 20 组数据, 作为精密度测试, 黄曲霉毒素 B₁ 精密度测试参数见表 3。

表 3 黄曲霉毒素 B₁ 精密度结果
Table 3 Precision of aflatoxin B₁

加标浓度/(μg/kg)	回收率/%	检测值/(μg/kg)	精密度/%
本底		未检出(<1 μg/kg)	/
植物油+10 μg/kg B ₁	75.4	7.5445	3.88
植物油+10 μg/kg B ₁	78.1	7.8144	
植物油+10 μg/kg B ₁	77.1	7.7077	
植物油+10 μg/kg B ₁	79.1	7.9149	
植物油+10 μg/kg B ₁	84.9	8.4938	
植物油+10 μg/kg B ₁	80.2	8.0181	
植物油+10 μg/kg B ₁	80.5	8.0468	
植物油+10 μg/kg B ₁	72.9	7.2923	
植物油+10 μg/kg B ₁	75.1	7.5110	
植物油+10 μg/kg B ₁	77.6	7.7606	
植物油+10 μg/kg B ₁	77.7	7.7696	
植物油+10 μg/kg B ₁	77.5	7.7518	
植物油+10 μg/kg B ₁	84.1	8.4085	
植物油+10 μg/kg B ₁	79.7	7.9709	
植物油+10 μg/kg B ₁	78.9	7.8872	
植物油+10 μg/kg B ₁	76.5	7.6467	
植物油+10 μg/kg B ₁	83.9	8.3875	
植物油+10 μg/kg B ₁	77.9	7.7874	
植物油+10 μg/kg B ₁	81.3	8.1340	
植物油+10 μg/kg B ₁	78.0	7.7964	

通过上述精密度数据可以看出,检测 20 组数据的精密度为 3.88%,满足 GB/T 27404-2008《实验室质量控制规范 食品理化检测》^[17]F.3 精密度中的要求,即当被测组分含量在 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,实验室内变异系数 $\leq 21\%$ 。同时 20 组数据的回收率在 72.9%~84.9%之间,满足日常检测的需求。

3.4 抗干扰实验

抗干扰实验主要是检测试剂盒对样品中不同干扰物质的抗干扰性。取植物油为本底,另外再向其中添加混合抗生素、混合激素、混合掺假物、抑菌剂以及黄曲霉毒素 M_1 。然后在以上 6 种样品中添加高标浓度标准品,黄曲霉毒素 B_1 抗干扰实验参数见表 4。

表 4 黄曲霉毒素 B_1 抗干扰实验结果
Table 4 Anti-jamming results of aflatoxin B_1

称量植物油质量/g	实验种类	样品信息	黄曲霉毒素 B_1 加标浓度/ $\mu\text{g}/\text{kg}$	回收率/%	检测值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
2.0065	混合抗生素抗干扰实验	添加氯霉素 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 四环素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	/	/	0.5
2.001		添加氯霉素 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 四环素 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 10	132.2 136.6	13.2231 13.6603
2.0016	混合激素抗干扰实验	添加克伦特罗 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 莱克多巴胺 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	/	/	0.6
2.0097		添加克伦特罗 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 莱克多巴胺 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9.95 9.95	84.0 81.3	8.3579 8.0878
2.0069	混合掺假物抗干扰实验	添加亚盐 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加氯化钠 0.1 g	/	/	0.5
2.0111		添加亚盐 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加氯化钠 0.1 g	9.94 9.94	79.1 84	7.8661 8.3509
2.0102	抑菌剂抗干扰实验	添加 30% 双氧水 100 μL	/	/	0.6
2.0061		添加 30% 双氧水 100 μL	9.97 9.97	129.4 130.2	12.906 12.9768
2.0018	黄曲霉毒素 M_1 抗干扰实验	添加黄曲霉毒素 $M_{10.35}$ $\mu\text{g}/\text{kg}$	/	/	0.7
2.0111		添加黄曲霉毒素 $M_{10.35}$ $\mu\text{g}/\text{kg}$	9.94 9.94	85.7 89.4	8.5154 8.8851
2.0019	正常样品实验	/	/	/	0.7
2.0009		/	10 10	86.9 88.1	8.6953 8.8127

通过数据可以看出: 6 组干扰物质均未出现假阳性,同时 6 组实验数据的回收率在 79.1%~136.6%之间,满足日常检测的需求。

4 结论

本方法的方法检出限、回收率、精密度、抗干扰实验均能满足测量要求,可应用于混合植物油中黄曲霉毒素 B_1 含量的测定。

参考文献

- [1] 蔡飞, 高微微, 李红玲, 等. 中药上黄曲霉毒素的污染现状与防除技术[J]. 中国中药杂志, 2010, (19): 2503-2507.
- [2] 陈建民, 张雪辉, 杨美华, 等. 黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(24): 1890-1894.
- [3] 谢体波, 刘红, 陆苇, 等. 间接竞争 ELISA 检测试剂盒测定粮油食品中黄曲霉毒素 B_1 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(7): 2834-2839.
- [4] 许菲菲, 刘亚丽, 田富饶. 黄曲霉毒素检测方法研究[J]. 化学分析计

Cai F, Gao WW, Li HL, *et al.* Pollution status and control technology of aflatoxin in traditional Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med, 2010, (19): 2503-2507.

Chen JM, Zhang XH, Yang MH, *et al.* Progress in the detection methods of aflatoxin [J]. China J Chin Mater Med, 2005, 30(24): 1890-1894.

Xie TB, Liu H, Lu W, *et al.* Determination of aflatoxin B_1 in cereals and oils by indirect competition ELISA detection kit [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(7): 2834-2839.

Xie TB, Liu H, Lu W, *et al.* Determination of aflatoxin B_1 in cereals and oils by indirect competition ELISA detection kit [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(7): 2834-2839.

Xu FF, Liu YL, Tian FR. Aflatoxin detection method research [J]. Chemical Analysis

- 量, 2010, (5): 93-94.
- Xu FF, Liu YL, Tian FR. Study on detection methods of aflatoxin [J]. Chem Anal Meter, 2010, (5): 93-94.
- [5] 王君, 刘秀梅. 食品中真菌毒素危险性分析的方法及现状[J]. 中华预防医学杂志, 2005, (6): 430-433.
- Wang J, Liu XM. Current situation and analysis method of the risk of mycotoxins in food [J]. Chin J Prev Med, 2005, (6): 430-433.
- [6] GB 2716-2005 中华人民共和国国家标准 食用植物油卫生指标[S]. GB 2716-2005 People's Republic of China national standard- Health index of edible vegetable oil [S].
- [7] 李岩松, 周玉, 谭建华. 真菌毒素快速分析方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2006, (1): 126-128.
- Li YS, Zhou Y, Tan JH. Advances in rapid analysis of mycotoxin [J]. Chin J Health Lab Technol, 2006, (1): 126-128.
- [8] Stroka J, Anklam E. Development of a simplified densitometer for the determination of aflatoxins by thin-layer chromatography [J]. J Chromatogr A, 2000, 904(2): 263-268.
- [9] 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, 6(2): 246-248.
- Liu QF. Study on the detection of aflatoxin B₁ by ELISA and thin layer chromatography [J]. China Trop Med, 2006, 6(2): 246-248.
- [10] 彭晓俊, 曾勋, 庞普山, 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 X, Pang PS, *et al.* Simultaneous determination of aflatoxin B₁, M₁ in food by high performance liquid chromatography with self-made mixed solid phase extraction column [J]. J Instrum Anal, 2013, 32(8): 958-962.
- [11] 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.
- [12] Shejjooni-Fumani N, 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.
- [13] 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.
- Liu XM, Li XM, Wang F, *et al.* Determination of 4 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ in edible vegetable oils by ultra high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2012, 3(5): 513-518.
- [14] 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.
- [15] 龚燕, 赵春城, 张东升, 等. 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[J]. 食品工业科技, 2003, 24(4): 82-84.
- Gong Y, Zhao CC, Zhang DS, *et al.* Improvement of pretreatment of aflatoxin B₁ in five kinds of foods by ELISA method [J]. Sci Technol Food Ind, 2003, 24(4): 82-84.
- [16] 美国 Helica 黄曲霉毒素 B₁ 检测试剂盒 [EB/OL]. [2010-10-18]. <http://blog.163.com/reagen5@126/blog/static/169929154201091842419495/2010-10-18>.
- Helica aflatoxin B₁ detection kit [EB/OL]. [2010-10-18]. <http://blog.163.com/reagen5@126/blog/static/169929154201091842419495/2010-10-18>.
- [17] GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测[S]. GB/T 27404-2008 Criterion on quality control of laboratories-Chemical testing of food [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



王重阳, 主要研究方向为食品质量与安全检测方法。

E-mail: wuxiaohui1@mengniu.cn



吴小慧, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测方法。

E-mail: wuxiaohui1@mengniu.cn