

## 实验技术与方法

ELISA 法检测食醋中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 方法的改进

齐惠萍 吕建明 李常青

(太原市疾病预防控制中心,山西 太原 030001)

**摘要:**目的 优化试样提取条件,建立测定食醋中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 的新的前处理方法。方法 将适量试样调酸后用甲醇+水直接定容,振荡、离心作为食醋试样的前处理方法,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定。结果 改进后方法灵敏度达 0.1 μg/kg,平均回收率在 79.1%~95.5%,相对标准偏差小于 6.4%。结论 研究建立的新的前处理方法,简化了提取过程,并获得了优化的实验参数,可满足国标对食醋中的 AFB<sub>1</sub> 规定的安全限量的检测要求。

**关键词:**醋酸;黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>;酶联免疫吸附测定

### Improvement on Pretreatment Method of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Vinegar with Enzyme-linked Immunosorbent Assay

QI Hui-ping, LI Jian-ming, LI Chang-qing

(Taiyuan Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanxi Taiyuan 030001, China)

**Abstract:** **Objective** To optimize extractive conditions of samples, and to establish a new pretreatment method of aflatoxin B<sub>1</sub> in vinegar. **Method** The sufficient samples were directly metered volume by methanol-water after adjusting its acidity, and then vibrated and centrifuged, and determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The sensibility of the method reached 0.1 μg/kg. The average recovery was from 79.1% to 95.5%. The relative standard deviation was smaller than 6.4%. **Conclusion** The new pretreatment method could simply extractive procedures, and optimized experiment parameters. It could meet the detecting requirements of safety dose of AFB<sub>1</sub> in vinegar stipulated by national standard.

**Key word:** Acetic Acid; Aflatoxin B<sub>1</sub>; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

检测。

在实际检测中比色法的不便之处突出,有颜色的样品比色法检测出的数据容易偏离,用滴定法其检测数据往往偏高,用高效液相色谱法可以检测我们工作中所遇到的所有样品,没有发现因其他维生素干扰所出现的问题。

流动相、样品和标准品提取试剂使用的都是 0.1% 的草酸,既方便又容易得到。且试样处理过程操作简单,简化了实验过程。0.1% 草酸流动相溶液 pH=2.5,其值在色谱柱最适宜的操作范围之内,但考虑到 pH 值较低,从保护色谱柱角度出发,色谱柱用后用水清洗 30 min,再用甲醇冲洗 30 min。

本实验方法适用于保健食品中片剂、胶囊、口服

液、颗粒冲剂剂型;饮料中固体饮料、液体饮料、浓缩饮料、营养饮用水等。

整个检测过程注意适当避光。

#### 参考文献

- [1] 高申. 食品中维生素 C 含量的测定[J]. 天津化工, 2002, (4): 39-40.
- [2] 冯德明,周晓霞. 用高效液相色谱法测定饮料中维生素 C 的含量[J]. 饮料工业, 2003, (1): 43-44.
- [3] 吴增茹,宋曙辉,武兴德,等. 高效液相色谱法测定苋菜等有色样品的维生素 C[J]. 现代仪器使用与维修, 1998, (4): 43-46.
- [4] 雍莉,黎源倩,李敏,等. 高效液相色谱法快速测定保健食品和果蔬中的 VitC[J]. 现代预防医学, 2005, (3): 247-248.

[收稿日期:2007-12-28]

中图分类号:R15;O657.72 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2008)04-0311-03

作者简介:齐惠萍 女 副主任技师

我国于2002年7月由国家质监局下文<sup>[1]</sup>,针对小麦粉、玉米、食用油、酱油、醋五类食品实行“市场准入制度”,而其中黄曲霉毒素 $B_1$ ( $AFB_1$ )是必检项目之一,在GB/T 5009.22—2003中,第一法为薄层法,试样处理繁琐,毒性大,灵敏度低( $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ )。而国标第二法为ELISA法,成本低廉,灵敏度高( $0.01 \mu\text{g}/\text{kg}$ )<sup>[2]</sup>,操作简便并为大多数检测机构所采用。但按GB/T 5009.22—2003方法用三氯甲烷提取,操作步骤较繁,尤其在处理食醋试样时乳化现象非常严重,加入氯化钠、甲醇破乳效果不佳,从而影响检测结果。本工作重点针对食醋的前处理方法进行了改进,取得了较理想的效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与设备

黄曲霉毒素 $B_1$ 酶联免疫定量测试盒 江苏微生物研究所有限责任公司;酶标仪 RT-2100-C 深圳雷杜有限公司;XK-96型微量振荡器 姜堰市新康医疗器械有限公司;恒温培养箱 DNP-9052 上海精宏实验设备有限公司;微量移液器 上海求精生化试剂仪器有限公司;低速离心机 KDC-40 科大创新股份有限公司中佳公司;SHZ-B水浴恒温振荡器 上海跃进医疗器械厂;甲醇(分析纯) 天津化学试剂二厂;三氯甲烷(分析纯) 天津化学试剂一厂;无水硫酸钠(分析纯) 天津天河化学试剂厂;氯化钠(分析纯) 北京化工厂;磷酸盐缓冲液(pH 7.4) 按GB/T 5009.22—2003配制。

1.2 样品来源 太原市场上随机购买10份食醋。

### 1.3 试样提取

1.3.1 改进方法 准确称取10.0 g试样于小烧杯中,移入50 ml容量瓶,再以约10 ml水分次洗涤小烧杯,洗液并于容量瓶。滴加10 mol/L氢氧化钠,调pH为7.0左右。准确加入25.0 ml甲醇,蒸馏水定容至50 ml,最后倾于150 ml具塞三角瓶中振荡15 min。取3~5 ml于离心管内,2500 r/min离心2 min。取上清液备用。

1.3.2 国标方法 参照国标GB/T 5009.22—2003方法操作<sup>[2]</sup>。

### 1.4 ELISA法检测步骤

1.4.1 试剂的准备 从冰箱中取出 $AFB_1$ 酶联免疫试剂盒,平衡至室温。用1.5 ml酶标稀释冻干酶标抗原,制成实验用酶标抗原溶液,准备好洗涤液。洗涤液清洗抗体反应板2次,拍干备用。

1.4.2 抗原抗体反应 选择数孔分别加入50  $\mu\text{l}$ 系列标准溶液(0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 ng/ml),其余孔中各加入50  $\mu\text{l}$ 待测试样提取液,同时选择两孔

分别做阴性对照和空白对照,随即在各孔中加入50  $\mu\text{l}$ 酶标抗原溶液,摇匀,37  $^{\circ}\text{C}$ 温育30 min。

1.4.3 显色 将温育后的抗体板甩干,洗涤4次,拍干。各孔中分别加入50  $\mu\text{l}$ 底物液和50  $\mu\text{l}$ 显色剂。37  $^{\circ}\text{C}$ 显色15 min。往各孔中分别加入50  $\mu\text{l}$ 终止液。

1.4.4 测定 酶标仪在450 nm波长处测定各孔A值,并绘制校正曲线,计算出样品中 $AFB_1$ 的含量。

## 2 结果

### 2.1 校正曲线

以试剂盒提供的0.00、0.10、0.25、0.50、1.00、2.00 ng/ml标准工作溶液,按1.4步骤测定相应的A值,以标准液浓度的常用对数为横坐标,各标准液孔A值与标准浓度0.00 ng/ml的 $A_0$ 值的比值( $A$ 标准液/ $A_0$  ng/ml)为纵坐标绘制(见图1)并进行回归计算,得线性方程为 $y = -0.4245x + 0.3131$ , $r = 0.9980$ ,表明在此浓度范围内线性关系良好。

### 2.2 最低检出限

以空白试样加标实验来确定最低检测浓度,按方法1.4步骤,分别配制,结果如表1所示。

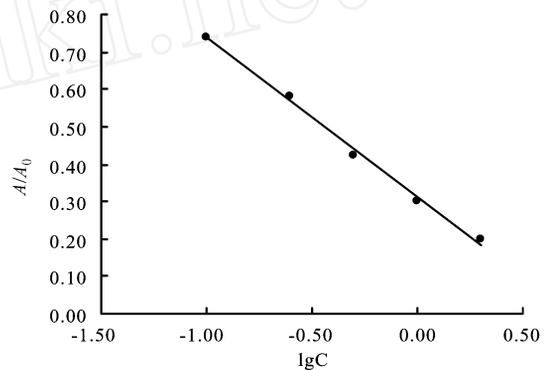


图1  $AFB_1$ 校正曲线

表1 样品中 $AFB_1$ 的最低检测浓度

$AFB_1$ 浓度( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	$A_{450}$	均值 $A_{450}$
0.00	1.484	1.479
0.05	1.395	1.392
0.10	1.152	1.156
1.00	0.487	0.477

灵敏度是以测得最低浓度的A值与0.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之差读数 $>0.10$ 计算,本法最低检测浓度为0.10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2.3 回收率

2.3.1 方法改进前后试样回收率比较 选取5份食醋试样,以 $AFB_1$ 标准品进行1.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度的加标,1.3.1、1.3.2分别提取处理,按1.4 ELISA法检测步骤测定回收率(见表2)。

由表2可见,改进方法处理试样加标回收率在

表 2 方法改前进后回收率比较

样品编号	原含量(μg/kg)	添加量(μg/kg)	测定值 (n=3)			平均值(μg/kg)	回收率(%)	平均回收率(%)	
改进方法	1	0.99	1.00	1.66	1.78	1.91	1.78	79.1	
	2	1.57	1.00	2.33	2.51	2.31	2.38	81.4	
	3	2.44	1.00	3.49	3.20	3.30	3.33	88.6	86.3
	4	1.48	1.00	2.43	2.39	2.22	2.34	86.9	
	5	1.61	1.00	2.41	2.56	2.72	2.56	95.5	
国标方法	1	0.83	1.00	1.49	1.60	1.57	1.55	72.4	
	2	1.30	1.00	1.91	1.83	2.00	1.91	61.8	
	3	2.14	1.00	3.12	2.85	2.91	2.96	82.2	73.7
	4	1.28	1.00	1.97	1.85	2.03	1.95	67.0	
	5	1.42	1.00	2.26	2.12	2.43	2.27	85.0	

79.1%~95.5%之间,平均回收率 86.3%;而国标方法处理试样的加标回收率在 61.8%~85.0%之间,平均回收率 73.7%。可以看出,改进方法的回收率明显高于国标法,这是由于国标法三氯甲烷抽提过程中乳化严重,有时甚至过于粘稠使得过滤困难。之后用 20%甲醇+磷酸缓冲液 3 次溶解凝结物,不仅繁琐,而且凝结物不易全部溶解,粘附于蒸发皿壁上,在转移过程中造成损失,这是导致方法回收率降低原因之一。

#### 2.4 重复性

选 1 号试样,以改进后的方法提取,按步骤 1.4 重复测定试样中的 AFB<sub>1</sub> 含量 (n=10),测定值分别为 1.03、1.00、0.98、1.07、0.92、0.95、0.98、1.11、0.93、1.01 μg/kg,平均值 0.99 μg/kg。标准偏差 0.063,相对标准偏差 6.4%。

### 3 讨论

ELISA 法具有特异性强、灵敏度高、试样前处理简单(提取后可直接测定,不需要净化处理),一次可以同时测定数十个样本,而且实验室用仪器较为简单,一般实验室可完成的优点,已成为测定 AFB<sub>1</sub> 的首选方法。

但由于样品的复杂性,若前处理不当,试样中的盐分、酸碱性、金属离子等对 ELISA 检测结果会有影响<sup>[3]</sup>,特别是在提取过程中若出现乳化现象,会使杂质等影响因素不能有效地消除。用三氯甲烷处理食醋样时,因醋的酸度很大,乳化现象非常严重;而经调酸处理后,用甲醇+水对试样简单稀释,不存在乳化现象,省去了后面三氯甲烷进行重复提取的步骤,获得比较满意的结果,简化了提取过程,降低了实验成本,从而提高了工作效率,同时减少了有机溶剂对实验室和实验人员的污染。

在太原市场上购买的 10 份食醋样品中有 8 份检出 AFB<sub>1</sub>,检出的浓度范围为 0.36~0.68 μg/kg,但含量均未超过国家标准 5.00 μg/kg。

#### 参考文献

- [1] 国质检监[2002]192号. 关于印发小麦等 5 类食品生产许可证实施细则的通知[S]. 国家质量监督检验检疫总局, 2002-07-21.
- [2] GB/T 5009.22—2003. 食品卫生检验方法理化部分(一)[S].
- [3] 赵晓联,赵春城,钮伟民,等. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 误差分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 11(4): 473-474.

[收稿日期:2007-12-24]

中图分类号:R15;R466.5 文献标识码:B 文章编号:1004-8456(2008)04-0313-03

[上接 ]

食品安全宣传的形式、内容、对象、效果;9 灾区食品卫生监督、检验的设备、仪器、试剂等要求;10 食品卫生救灾人员的配备和人员装备配备;11 灾区集体供餐的食品安全问题;12 消杀药品可能引起的食品污染问题;13 如何评估地震灾区的食品安全;14 地震灾区食品安全预案应涉及的内容;15 如何协调地震灾区的食品安全管理;16 地震灾区食源性疾病预防控制;17 地震灾区不安全食品及变质食品的控制、处理。

《食品安全法(草案)》在正式出台前公开征求意见,这是我国食品安全法制管理的一件大事,相对于《食

[下转第 321]