

文章编号:1009-038X(2004)04-0010-03

## ELISA 法检测红曲中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

龚燕<sup>1</sup>, 蔡建荣<sup>1</sup>, 赵晓联<sup>1</sup>, 黄国水<sup>2</sup>, 孙开禧<sup>2</sup>

(1. 江苏省微生物研究所, 江苏 无锡 214063; 2. 福建省连江县卫生防疫站, 福建 连江 350500)

**摘要:**探讨了红曲中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的提取方法,发现在传统提取方法甲醇/水溶液(体积比 1:1)直接提取的基础上加氯仿进行液液萃取后,进行 ELISA 法测定其含量,可以消除假阳性,同时提高了检测灵敏度.在加标质量分数分别为 2.5, 5, 10 μg/kg 时,加标回收率达到 101% ~ 146.8%,方法的重复性较好,变异系数小于 13%.样品最低检测限达 2.5 μg/kg.

**关键词:**红曲,提取方法,ELISA,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

中图分类号:TS 201.6

文献标识码:A

## Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Red Leaven by ELISA

GONG Yan<sup>1</sup>, CAI Jian-rong<sup>1</sup>, ZHAO Xiao-lian<sup>1</sup>, HUANG Guo-shui<sup>2</sup>, SUN Kai-xi<sup>2</sup>

(1. Jiangsu Institute of Microbiology, Wuxi 214063, China; 2. Health and Epidemic Prevention Station of Liangjiang City, Liangjiang 350500, China)

**Abstract:** The extraction method of aflatoxin B<sub>1</sub> in red leaven was studied in this paper. The results showed that 10 mL methanol and water solution of total 25 mL extract extracted by chloroform can eliminate negative error and improve the detection sensitivity. The recoveries of aflatoxin when B<sub>1</sub> spiked at 2.5 ~ 10 μg/kg could be at the range of 101% ~ 146.8% and the relative deviation is less than 13%. The detection low limit was 2.5 μg/kg.

**Key words:** red leaven; extraction method; ELISA; AFB<sub>1</sub>

红曲<sup>[1,2]</sup>又称红曲米,分布于我国福建、浙江、广州、江苏、台湾等省,其中福建省是我国红曲的主要产地,以古田红曲最为著名.由于红曲味甘、性温、无毒,是一种天然红曲色素和功能性食品的原料,具有医疗保健功能和抗菌防腐作用等,因此它在酿造、中药、食品、烹饪等领域的应用越来越广泛.随着人们健康意识的提高,红曲的食用安全性已成为关注的内容,而红曲中黄曲霉毒素(AFB<sub>1</sub>)也成为备受重视的检测项目之一.传统红曲的生产是以大米为原料,经过浸米、蒸饭、冷却后,接种红

曲霉(Monascus)发酵制成的.如果在红曲生产过程中原料发生霉变污染了黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>,那么红曲米中存在的 AFB<sub>1</sub>会直接危害人们的身体健康.为此,作者探讨了红曲中 AFB<sub>1</sub>的提取方法<sup>[3]</sup>,并用 ELISA 法检测其含量.

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要仪器与设备

酶标仪:MK3,芬兰雷勃公司制造;微量振荡器:MS2型,德国 IKA 制造;微量移液器:芬兰雷勃

收稿日期:2003-10-23;修回日期:2003-12-06.

基金项目:科技部农业成果转化资金项目(02EFN213)资助课题.

作者简介:龚燕(1974-),女,江苏无锡人,助理研究员,工学学士.

公司制造;恒温水浴锅:HH-S 金坛国盛实验仪器厂制造;分析天平:AB204-S 型,量程 10 mg~210 g,梅特勒·托利多公司制造;隔水式电热恒温培养箱:上海跃进医疗器械厂制造;其它:三角瓶(100 mL),分液漏斗(125 mL),蒸发皿(50 mL),移液管(25 mL),刻度试管(10 mL),定量滤纸。

## 1.2 试剂

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> ELISA 快速测试盒:无锡市生物技术公司研制;甲醇:分析纯,上海化学试剂公司生产;三氯甲烷:分析纯,天津市博迪化工有限公司生产;无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:分析纯;PBS 缓冲液(pH 7.4):Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.0 g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.25 g,NaCl 8.7 g,蒸馏水 1 L。

## 1.3 样品提取

样品由福建省连江县卫生防疫站提供。

方法一(传统方法)称取 2.5 g 样品于 100 mL 三角瓶中,准确加入 25 mL 甲醇/水(体积比 1:1)溶液,振荡 15 min,过滤,弃去 1/4 初滤液,收集试样滤液即为待测样品提取液。

方法二(改进方法)称取 2.5 g 样品于 100 mL 三角瓶中,准确加入 25 mL 甲醇/水(体积比 1:1)溶液,振荡 15 min,过滤,弃去初滤液。准确吸取 10 mL 滤液(相当于 1 g 样品)于 125 mL 分液漏斗中,加入 20 mL 三氯甲烷,加塞振摇 5 min,静置分层(约 30 min),放出下层三氯甲烷层,经盛有约 5 g 预先用三氯甲烷湿润的无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 定量慢速滤纸漏斗过滤于 50 mL 蒸发皿中,再加入 10 mL 三氯甲烷于分液漏斗中,重复振摇提取,三氯甲烷一并滤于蒸发皿中,最后用少量三氯甲烷洗涤过滤漏斗,洗液并入蒸发皿中。将蒸发皿放入通风橱,于 65 °C 水浴上通风挥干后,冷却,加入约 5 mL 甲醇溶液于蒸发皿中分多次溶解凝结物,将溶解物倒入 10 mL 刻度试管,再用甲醇溶液定容至 5 mL,然后再分多次用少量去离子水冲洗蒸发皿,将溶解液并入刻度试管中,最后用去离子水定容至 10 mL,即为待测样品提取液。

## 1.4 AFB<sub>1</sub> 标准溶液的制备

用甲醇将 AFB<sub>1</sub> 配制成 1 mg/mL 溶液,再用甲醇/PBS 溶液(体积比 1:4)稀释至约 10 μg/mL,紫外分光光度计测定溶液(361 nm 波长)的吸光度值,代入下式计算:

$$\rho = A \times M \times 1000 \times f / E$$

式中  $\rho$  为该溶液中 AFB<sub>1</sub> 的质量浓度(μg/mL); $A$  为测得的吸光度值; $M$  为 AFB<sub>1</sub> 的相对分子质量 312; $E$  为摩尔消光系数 21 800; $f$  为使用仪器的校正

正因素(1)。

根据计算将该溶液配制成 10 μg/mL 标准溶液,检测时用甲醇/PBS 溶液将该标准溶液稀释至所需的标准工作液质量分数(0.1,0.5,1,5,10 μg/kg)。

## 1.5 ELISA 法检测步骤

从冰箱中取出黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的 ELISA 快速测试盒,平衡至室温。用 1.5 mL 酶标抗原稀释液(D 试剂)稀释冻干酶标抗原(C 试剂),制成实验用酶标抗原溶液,准备好洗涤液。

用洗涤液洗板 2 次,拍干。选择两孔分别加入 50 μL AFB<sub>1</sub> 阴性对照液,50 μL AFB<sub>1</sub> 阳性对照液(若要作标准曲线,则选择数孔分别加入 AFB<sub>1</sub> 系列标准溶液),其余孔中各加入 50 μL 待测样品提取液,再加 50 μL 酶标抗原溶液于各孔中,摇匀,37 °C 孵育 30 min。甩干,洗涤 5 次,拍干。于各孔中分别加入 50 μL 基质液和 50 μL 显色剂,37 °C 显色 15 min。再于各孔中分别加入 50 μL 终止液,并在酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度值  $A$ 。

## 2 实验结果

### 2.1 线性范围

将 AFB<sub>1</sub> 标准工作液质量分数(0,0.1,0.5,1,5,10 μg/kg)依次加到酶标板的孔中,测吸光度值,以质量分数取对数为横坐标,  $A_i/A_0$  比值为纵坐标,绘制标准曲线(见图 1)。相关系数  $r = 0.9926$ ,线性方程  $y = -0.9415x + 8.123$ ,在 0.1~5 μg/kg 质量分数范围内呈良好线性关系。

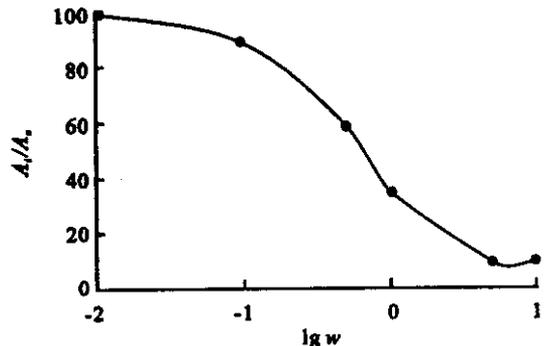


图 1 标准曲线

Fig. 1 Standard curve for AFB<sub>1</sub> quantitative analysis

### 2.2 回收率

称取一定量的样品,准确添加 AFB<sub>1</sub> 标准溶液,质量分数分别为 0.5,1,2.5,5,10 μg/kg,分别按照两个提取方法进行样品处理后,测定总 AFB<sub>1</sub> 含量,同时做空白样品,数据代入下式,计算回收率,结果

见表 1.

表 1 样品加标回收试验结果

Tab.1 The recoveries of AFB<sub>1</sub> spiked in sample

方法	原样品中 AFB <sub>1</sub> 质量分数/ ( μg/kg )	AFB <sub>1</sub> 质量 分数( μg/kg )	测定值/ ( μg/kg )	回收 率/%
方法一	14.27	0.5	17.51	648.0
		1	18.88	461.0
		2.5	22.03	310.4
		5	23.93	193.2
		10	19.80	198.0
方法二	7.24	0.5	8.53	258.0
		1	9.05	181.0
		2.5	10.91	146.8
		5	13.15	118.2
		10	17.35	101.1

表 2 重复性试验结果

Tab.2 Results of repetibility

样品 号	测 定 值( μg/kg )										平均值/ ( μg/kg )	标准 偏差	相对标准 偏差/%
1 <sup>#</sup>	7.36	7.11	7.33	7.25	7.19	7.18	7.28	7.13	7.05	7.38	7.22	0.13	12.05
2 <sup>#</sup>	5.45	5.33	5.49	5.30	5.51	5.25	5.28	5.39	5.41	5.55	5.43	0.13	12.58
3 <sup>#</sup>	12.82	13.01	12.75	12.90	12.87	12.93	12.69	12.64	12.89	12.70	12.82	0.12	11.43

### 3 讨 论

1) ELISA 法<sup>[4]</sup>在一定的质量分数内呈良好线性关系,重复性好,特异性强,灵敏度高,测定快速方便,并且一次可同时测定几十份样品,适用于食品、饲料、粮油、酒类等产品,已得到了广泛的应用。AFB<sub>1</sub><sup>[5]</sup>是常见霉菌——黄曲霉和寄生曲霉中产毒菌株的代谢产物,最易污染粮油食品,且污染频率最高。

2) 由于红曲中含有多种有效活性物质<sup>[6]</sup>,传统的提取方法——甲醇/水直接提取红曲米样品中的 AFB<sub>1</sub>,提取液粘性大,微量元素和色素干扰严

$$\text{回收率} = \frac{\text{总 AFB}_1 \text{ 质量分数} - \text{原样品 AFB}_1 \text{ 质量分数}}{\text{添加 AFB}_1 \text{ 质量分数}} \times 100\%$$

重,导致测定结果产生假阳性。而在传统提取方法的基础上,再经氯仿进行液液萃取后可以降低提取液的粘性,消除微量元素和色素的干扰,使测定结果更准确。

#### 2.3 重复性

结果表明,随着样品中 AFB<sub>1</sub> 添加量的降低,两种方法处理样品后测定结果均出现假阳性,且方法一比方法二测得结果的假阳性情况严重,因此采用方法二来提取红曲中的 AFB<sub>1</sub> 较好。从表 1 还可看出,样品的最低检测质量分数为 2.5 μg/kg。

以方法二处理样品 1<sup>#</sup> 2<sup>#</sup> 3<sup>#</sup>,并重复测定 3 份样品中的 AFB<sub>1</sub> 质量分数( n = 10 ),计算其标准偏差和相对标准偏差,结果见表 2。

从表 2 可看出,方法二处理样品后用 ELISA 法测定红曲中的 AFB<sub>1</sub> 来考察重复性,相对标准偏差小于 13%,说明采用此法提取红曲样品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 进行 ELISA 法检测重复性良好。

3) 虽然至今国家标准还没有明确限量规定红曲米中 AFB<sub>1</sub> 的质量分数,参照发酵食品的限量标准<sup>[7]</sup>为小于(或等于) 5 μg/kg。作者采用改进的提取方法,通过直接竞争酶联免疫吸附法来检测红曲样品中 AFB<sub>1</sub> 质量分数,其最低检测质量分数达 2.5 μg/kg,检测灵敏度低于国家标准,说明该方法是可行的。

### 参考文献:

- [1] 宫慧慧. 红曲与红曲色素的研究进展[J]. 武汉工业学院学报, 2002(1): 22-23.
- [2] 陈运中. 红曲的功能性及其应用[J]. 中国酿造, 2001(5): 5-6.
- [3] 卫生部食品卫生监督检验所. 食品卫生标准使用手册——理化检验方法[M]. 北京: 中国标准出版社, 1996. 137-149.
- [4] 龚燕, 赵春城, 张东升等. ELISA 法检测五类食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 前处理方法的改进研究[J]. 食品工业科技, 2003(4): 82-84.
- [5] 陈炳卿, 刘志城, 王茂起. 现代食品卫生学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 185-194.
- [6] 马美荣, 王正祥, 诸葛健. 红曲有效生理活性物质的研究现状及进展[J]. 酿造科技, 1999, (5): 26-27.
- [7] GB2761-81, 食品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 允许量标准[S].