

# 月饼中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>检测前处理方法的改进

李姣, 余之蕴, 林耀文, 刘海卿

(广东产品质量监督检验研究院, 广东顺德 528300)

**摘要:** 通过对伍仁、蛋黄莲蓉、枣泥、水果、火腿、冰皮和吞拿鱼七种口味, 共70批次月饼进行甲醇-水(1:1, V/V)和三氯甲烷二次抽提两种处理方法对比, 结果显示两种方法检测仅伍仁和吞拿鱼月饼差异显著, 其余不显著。甲醇水提取方法检测结果重复性良好, 加标回收率为84.0%~114.7%, 提高了月饼黄曲霉毒素B<sub>1</sub>的检测效率。

**关键词:** 月饼; 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>; ELISA法

**文章篇号:** 1673-9078(2012)3-364-366

## Optimization of the Extraction Method of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Moon Cake

LI Jiao, SHE Zhi-yun, LIN Yao-wen, LIU Hai-qing

(Guangdong Testing Institute for Product Quality Supervision, Shunde 528300, China)

**Abstract:** A study was conducted to optimize extraction method of Aflatoxin B<sub>1</sub> from eight kinds of moon cake (mixed nuts, lotus seed with egg yolk, jujube paste, fruit, ham, snowy, and tuna) through ELISA. The detection results by two methods showed no significant difference except the detection in Mixed Nuts and Tuna. Better extraction efficacy was found using 50% methanol/water solution. The average recovery rate was 84.0%~114.7%. The method could improve the detection efficiency of aflatoxin B<sub>1</sub> of moon cake.

**Key words:** moon cake; aflatoxin B<sub>1</sub>; ELISA

黄曲霉毒素是由黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus*)等侵染农产品、食品、饲料等产生的一类次生代谢物<sup>[1]</sup>。目前已分离到的黄曲霉毒素及其衍生物有20多种, 其中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)的致癌性最强, 化学性质稳定, 一般烹调和食品加工手段如炒、烘、熏等对其产生的破坏性甚小。其致癌力是奶油黄的900倍, 比二甲基亚硝胺诱发肝癌的能力大75倍, 比3,4-苯并芘大4000倍<sup>[2]</sup>; 其毒性为氯化钾的10倍, 砒霜的68倍<sup>[3]</sup>。

香港食品卫生组织1998~2000年度对粮油食品中AFB<sub>1</sub>的含量调查显示<sup>[4]</sup>, 526份样品的污染率为7.6%, 其中花生及其制品中AFB<sub>1</sub>平均含量为1.45 μg/kg, 污染率由高到低的顺序是植物油和脂肪食品(46.6%)、花生及花生制品(21.9%)、谷物及谷物食品(17.5%)、其他食品(14.0%)。因此及时检测AFB<sub>1</sub>已成为世界各国都非常重视的问题。

目前检测AFB<sub>1</sub>主要有3种方法<sup>[5]</sup>: 薄层法、酶联免疫法(ELISA法)<sup>[6]</sup>、液相色谱质谱串联法<sup>[7]</sup>。其中薄层法样品处理繁琐, 毒性大, 最低检测限只有5 μg/kg; 液相检测成本昂贵, 样品前处理复杂; 酶联免疫法, 成本低廉, 灵敏度高, 测定步骤简便、快速, 因此被广泛应用。月饼因含有大量油脂、糖分、蛋白质, AFB<sub>1</sub>污染可能性较大。由于月饼节令性较强, 短

时间内需完检, 同时因其口味众多, 粘度大, 前处理繁琐, 给检测造成较大压力。本文旨在研究简化AFB<sub>1</sub>提取过程, 为月饼的AFB<sub>1</sub>检测提供参考。

### 1 材料与方

#### 1.1 材料

月饼, 随机购于广东省某超市, 品种包括伍仁、蛋黄莲蓉、枣泥、水果、火腿、冰皮和吞拿鱼七种口味, 各10批次共70批次; 甲醇、三氯甲烷、无水硫酸钠均为分析纯。

#### 1.2 仪器

酶标仪, 美国热电MK3; SHA-B水浴恒温振荡器; 隔水式恒温培养箱, 上海一恒科技有限公司; 黄曲霉毒素B<sub>1</sub>检测试剂盒, 江苏省苏微微生物研究有限公司。

#### 1.3 样品提取方法

##### 1.3.1 国标方法

参照国标(GB/T 5009.22-2003), 准确称取20.0 g粉碎样品于250 mL具塞锥形瓶中, 加入100 mL的甲醇-水(55:45)提取液和30 mL正己烷, 振荡30分钟, 过滤于125 mL分液漏斗中, 静置分层, 放出下层清液于烧杯中, 准确量取20 mL滤液(相当于4 g样品)于125 mL分液漏斗中, 加入20 mL三氯甲烷, 加塞振荡2分钟, 静置分层, 经盛有约10 g预先用三氯甲烷湿润的无水

收稿日期: 2011-12-15

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>定量快速滤纸过滤于蒸发皿中,再加5 mL三氯甲烷于分液漏斗中,重复提取,将三氯甲烷层一并滤于蒸发皿中,最后用少量的三氯甲烷洗涤无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>过滤器,洗液滤于蒸发皿中,将蒸发皿放入通风橱于65 °C水浴挥干,用10 mL甲醇-PBS (2:8)将凝结物分三次溶解,制作样品提取液A。

### 1.3.2 改进方法

准确称取5.0 g月饼于250 mL具塞锥形瓶中,加入25.0 mL的甲醇-水 (V/V, 1:1) 提取液,振荡器上振荡15 min (700 r/min),用定性快速滤纸过滤,为样品提取液B。

### 1.4 样品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub>含量计算

根据样品孔的OD值,在标准曲线上查出浓度值C后,根据以下公式计算出样品中的AFB<sub>1</sub>的含量:

$$AFB_1 \text{ 的含量} = C \times V \times K / M$$

注:式中C-由标准曲线查出的浓度值;V-样品提取液的体积;K-样品提取液的稀释倍数;M-称取样品的质量。

### 1.5 回收率计算

$$\text{回收率} = \frac{\text{样品总AFB}_1 \text{ 含量} - \text{样品原AFB}_1 \text{ 含量}}{\text{AFB}_1 \text{ 添加量}} \times 100\%$$

### 1.6 数据处理方法

Excel 2003软件,采用LSD法对数据进行方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 标准曲线图

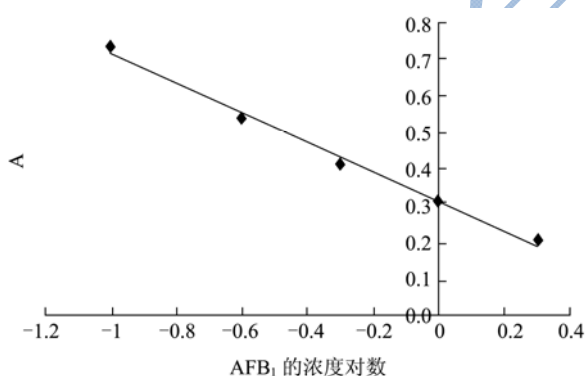


图1 AFB<sub>1</sub>标准曲线

Fig.1 Calibration curve of AFB<sub>1</sub>

黄曲霉毒素B<sub>1</sub>标准品浓度分别为: 0、0.1、0.25、0.5、1.0、2.0 μg/L,吸光度为y轴,得到标准曲线图,见图1。线性关系为 $y = -0.4011x + 0.3122$ ,  $R^2 = 0.9919$ 。

AFB<sub>1</sub>易溶于甲醇、氯仿、丙酮等有机溶剂,难溶于水。但研究证实,在天然原料中的黄曲霉毒素主要结合在水溶性成分上<sup>[8]</sup>,所以应采用有机溶剂与水混溶的溶液体系进行提取。据赵晓联<sup>[9]</sup>报道当稀释度为5倍时,即样品测定液中甲醇含量为26%时,加样回收率接近100%。因此,确定样品量为5.0 g,加入25.0 mL甲醇

水 (1:1, V/V) 提取AFB<sub>1</sub>。

### 2.2 两种前处理检测结果比较

对伍仁、蛋黄莲蓉、枣泥、水果、火腿、冰皮和吞拿鱼七种口味,共70批次月饼进行甲醇水 (1:1, V/V) 和国标方法处理对比,结果显示70批次不同口味月饼黄曲霉毒素B<sub>1</sub>含量均在国标限量 (5 μg/kg) 以下。使用甲醇水 (1:1, V/V) 溶解提取比三氯甲烷净化处理后的样品检测值稍高,仅伍仁和吞拿鱼月饼差异显著外,其余口味差异均不显著,具体数据见表1。

样品基质中的一些有机化合物可与抗体分子相互作用,另外有些大分子蛋白、色素、油脂类化合物能非特异性吸附在聚苯乙烯微空板条上,对抗原抗体反应产生一定屏蔽效应,阻碍了酶标抗原和微空内抗体的结合,从而导致检测结果偏高。有报道随着样品中油脂含量的增高,结果偏阳性的程度加剧,油脂含量达40%时,检测值为原来的1.5倍<sup>[9]</sup>。同时面粉中加入的添加剂成分,如品质改良剂、化学膨松剂及营养强化剂等,这些添加剂与Fe<sup>3+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>等金属离子均可能影响结果<sup>[10]</sup>。

月饼中伍仁和吞拿鱼脂肪含量较高,达30%,故未经三氯甲烷二次净化的提取液中油脂等干扰物质较多导致了结果偏高。

表1 月饼不同前处理方法AFB<sub>1</sub>检测值

Table 1 The testing result of AFB<sub>1</sub> in mooncake after different

名称	提取液A/(μg/kg)	提取液B/(μg/kg)	RSD/%
伍仁月饼	1.36±0.10	1.97±0.06	26.07
蛋黄莲蓉月饼	0.97±0.09	1.01±0.15	2.85
枣泥月饼	0.89±0.11	0.99±0.14	7.26
水果月饼	0.78±0.07	0.86±0.09	7.47
火腿月饼	1.00±0.12	1.14±0.11	9.46
冰皮月饼	0.64±0.05	0.72±0.06	8.28
吞拿鱼月饼	1.53±0.57	2.47±0.96	33.14

### 2.3 两种前处理回收率比较

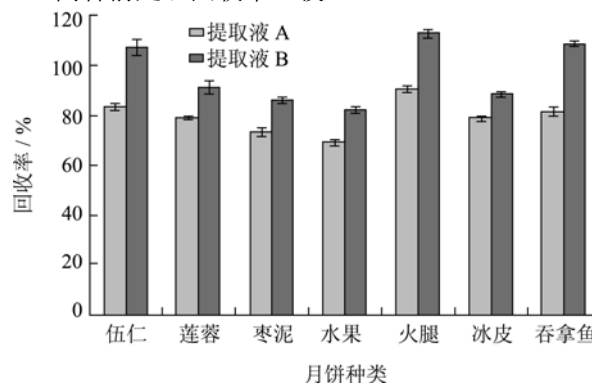


图2 两种不同前处理回收率比较

Fig.2 The comparative recoveries of two different treatment

随机选取伍仁、蛋黄莲蓉、枣泥、水果、火腿、冰皮和吞拿鱼七种口味月饼各一件,以5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度加标,对两种不同前处理回收率比较,具体见图2。甲醇水提取 $\text{AFB}_1$ 加标回收率为84.0~114.7%,而三氯甲烷净化加标回收率为70.34~92.2%。可见,甲醇水直接提取显著提高回收率。

其中,伍仁、火腿和吞拿鱼三种口味甲醇水回收率较大,可能因其脂肪含量较高,非特异性反应影响ELISA分析系统的灵敏度,限制了低水平 $\text{AFB}_1$ 含量的样品的检测。

### 3 结论

3.1 月饼因含有大量油脂、糖分、蛋白质, $\text{AFB}_1$ 污染可能性较大。本文直接采取甲醇水(1:1, V/V)提取 $\text{AFB}_1$ ,通过对伍仁、蛋黄莲蓉、枣泥、水果、火腿、冰皮和吞拿鱼七种口味,共70批次月饼进行两种方法处理对比,结果显示甲醇水(1:1, V/V)直接提取比三氯甲烷二次抽提处理后的样品检测值稍高,仅伍仁和吞拿鱼月饼差异显著,其余口味差异均不显著,本实验在加标回收试验中,回收率达到84%以上,重复性良好。

3.2 月饼中 $\text{AFB}_1$ 的ELISA法检测,直接以甲醇水(1:1, V/V)提取,若超出国标限值,再进行三氯甲烷净化,可降低有机试剂的污染,提高月饼 $\text{AFB}_1$ 的检测效率。

### 参考文献

- [1] K T Devi, M A Mayo, K L N Reddy, et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for aflatoxin  $\text{B}_1$  [J]. The Society for Applied Microbiology, 1999, 29: 284-288
- [2] 高鹤娟. 食品中黄曲霉毒素的测定[J]. 食品卫生检验方法注解, 北京: 卫生部食品卫生监督检验所出版, 1987, 153
- [3] CAST. Mycotoxins: risks in Plant, animal and humans. (Richard J.L., Payne, G A. eds). Council of Agricultural Science and Teehnology (CAST) Task Force Report Ames, Iowa, 2003, 139-199
- [4] Aja-Nwachuke J. Emejuaiwe S.O. Aflatoxin-producing fungi associated with maize[J]. Environmental Toxicolog, 2001, 9(1): 17-23
- [5] GB/T 5009.22-2003. 食品卫生检验方法理化部分(一)[S]
- [6] 邱杨, 刘建丽, 赵丽. 食品中黄曲霉毒素 $\text{B}_1$ 的抽查检验与安全评价[J]. 现代食品科技, 2008, 24(10): 1055-1057
- [7] 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 $\text{B}_1$ 、 $\text{B}_2$ 、 $\text{G}_1$ 、 $\text{G}_2$ [J]. 现代食品科技, 2011, 27(8): 1040-1042
- [8] 陈兰明, 陈永莹. 黄曲霉毒素 $\text{B}_1$ 直接竞争抑制ELISA快速筛选法的建立[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(4): 62-65
- [9] 赵晓联, 赵春城, 钮伟等. 酶联免疫吸附法测定 $\text{AFB}_1$ 误差分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(1): 60-62
- [10] 龚燕, 赵春城, 张东升等. ELISA 法检测五类食品中黄曲霉毒素前处理方法的改进研究[J]. 食品工业科技, 2003, 4: 82-84