

# 酶联免疫法测定苦荞制品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

兰珊珊, 陈锦玉, 邵金良, 杨芳, 刘宏程

(云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所, 云南昆明 650223)

**摘要:** 用酶联免疫法(ELISA)测定不同苦荞制品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>, 对如何防控苦荞制品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 进行探讨。在分析的4类产品中, 苦荞营养粉的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 含量最低, 其次是苦荞速溶片和苦荞醋, 苦荞米茶中最高。方法的检测灵敏度为 0.1 μg/kg, 平均回收率在 84.70~84.95%, 相对标准偏差小于 5%。结果表明, 酶联免疫法测定准确, 稳定性和重现性好, 可广泛应用于苦荞及其制品中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检测。

**关键词:** 苦荞制品; 酶联免疫; 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

文章编号: 1673-9078(2013)6-1417-1419

## Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Tartary Buckwheat Products by Enzyme-linked Immunosorbent Assay

LAN Shan-shan, CHEN Jin-yu, SHAO Jin-liang, YANG Fang, LIU Hong-cheng

(Institute of Quality Standard and Testing Technology, Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming 650223, China)

**Abstract:** The content of aflatoxin B<sub>1</sub> in tartary buckwheat products was detected with ELISA kit, and the prevention and control measures of aflatoxin B<sub>1</sub> were discussed. The aflatoxin B<sub>1</sub> content of tartary buckwheat nutrition power was the least in the 4 kinds of produces analyzed, followed by tartary buckwheat flast dissolving tablets and tartary buckwheat vinegar. The aflatoxin B<sub>1</sub> content of tartary buckwheat tea was the highest. The detection sensitivity was 0.1 μg/kg and the average spike recovery rate was 84.70~84.95%. The relative standard deviation was less than 5%. The results showed that the ELISA was accurate with good stability and reproducibility, so it can be applied to detect aflatoxin B<sub>1</sub> in tartary buckwheat products widely.

**Key words:** tartary buckwheat products; ELISA; aflatoxin B<sub>1</sub>

苦荞亦称鞑靼荞麦 (*F. tartaricum*), 属蓼科 (*Polygo naceae*) 荞麦属 (*Fagopyrum Gaenth*) 为药食兼用作物<sup>[1]</sup>。现代研究表明, 苦荞富含生物类黄酮、多肽、糖醇和D-手性肌醇等高活性功能成分, 营养价值高, 具有很好的食疗保健作用, 已受到食品营养界的广泛关注, 其制品的研究开发也取得了快速发展<sup>[2]</sup>。目前市场上常见的苦荞制品主要有苦荞米茶、苦荞营养粉、苦荞醋和苦荞速溶片等。但由于苦荞中脂肪含量较高, 加之不正确的储运和加工过程, 易引起霉变而导致其加工制品中含有黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)。食品安全国家标准 GB 2761-2011《食品中真菌毒素限量》规定, 谷物及其制品和醋、酿造醋(以粮食为主要原料)中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的允许量标准为 5.0 μg/kg, 而醋作为国家明文规定实行“市场准入制度”的五类食品之一, AFB<sub>1</sub> 也是必检项目。

收稿日期: 2013-01-17

作者简介: 兰珊珊 (1982-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事食品安全与检测相关研究

通讯作者: 刘宏程 (1975-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事食品安全研究

黄曲霉毒素 (Aflatoxin, AF/AFT) 是一类主要由黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 和寄生曲霉 (*Aspergillus parasiticus*) 产生的次级代谢产物, 极易污染花生、麦类、饲料等农畜产品, 对动物有剧烈的急性毒性和明显的慢性毒性, 具有很强的致突变、致畸、致癌作用<sup>[3]</sup>。现已分离出 B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、G<sub>1</sub>、G<sub>2</sub>、M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub> 等至少 17 种结构相似、特征已知的化合物, 其中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的毒性最强, 被世界卫生组织 (WHO) 列为已知的最强致癌化学物质之一<sup>[4]</sup>。本实验采用酶联免疫法 (ELISA) 对苦荞米茶、苦荞营养粉、苦荞醋和苦荞速溶片 4 种主要苦荞制品中的 AFB<sub>1</sub> 含量进行了测定, 并分析了不同苦荞制品中 AFB<sub>1</sub> 含量的区别, 以期为苦荞制品的加工和开发提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料与试剂

购买不同品牌的苦荞米茶、苦荞营养粉、苦荞醋和苦荞速溶片各 4 种; ELISA 定量检测黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 试剂盒, 北京百林康源生物技术有限责任公司; 所用

三氯甲烷、次氯酸钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、氯化钠、氯化钾、无水硫酸钠均为分析纯。

## 1.2 仪器与设备

Bio-Rad 680型酶标仪, 美国伯乐公司; HY-5型回旋式振荡器; 金诺分析天平(精确到0.01 g); 长风电热恒温水浴锅; 恒字PYX-DHS隔水式电热恒温培养箱; Thermo微量移液器。

## 1.3 方法

### 1.3.1 样品前处理

参考国家标准GB/T 5009.22-2003中的前处理方法。

苦荞米茶、苦荞营养粉、苦荞速溶片: 准确称取20.00 g样品于250 mL具塞锥形瓶中, 加入60 mL三氯甲烷, 盖塞后滴水封严, 150 r/min振荡30 min。静置后用快速定性滤纸过滤于50 mL烧杯中, 立即取12 mL滤液于75 mL蒸发皿中。65 °C水浴通风挥干。用2.0 mL甲醇-PBS (20+80) 溶液分三次(0.8 mL、0.7 mL、0.5 mL) 溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物, 移至小试管加盖振荡后静置待测。

苦荞醋: 准确称取10.00 g样品于小烧杯中, 加入0.40 g氯化钠, 移入分液漏斗中, 用15 mL三氯甲烷分次洗涤烧杯, 洗液并入分液漏斗中, 振摇2 min, 静置分层。放出三氯甲烷层, 经盛有10 g三氯甲烷湿润的无水硫酸钠的定量慢速滤纸过滤于50 mL蒸发皿中, 再加5 mL三氯甲烷于分液漏斗中, 重复振摇提取, 三氯甲烷层一并滤于蒸发皿中。将蒸发皿置于65 °C水浴通风挥干, 用2.0 mL甲醇-PBS (20+80) 溶液分三次(0.8 mL、0.7 mL、0.5 mL) 溶解并彻底冲洗蒸发皿中凝结物, 移至小试管加盖振荡后静置待测。

### 1.3.2 检测步骤

用490 mL蒸馏水稀释AFB<sub>1</sub>酶联免疫试剂盒中的PBS-T洗液。用稀释好的PBS-T洗液分别按1:140和1:200的比例稀释抗原抗体反应所需的抗体和酶标二抗。按2.25 mL蒸馏水+0.25 mL底物液A+1包底物+42 μL底物液B的比例配制显色液备用。

用145 μL稀释过的抗体与145 μL空白对照液混匀后作为阴性对照液。取145 μL样品提取液, 同样加入145 μL稀释过的抗体, 混匀静置后作为样品反应液。启封酶标板, 用PBS-T洗液洗板2次, 拍干备用。分别在酶标板适当孔位加入阴性对照液、样品反应液及空白对照液, 130 μL/孔, 37 °C孵育2 h, 倒掉反应液, PBS-T洗液洗板3次, 拍干。加入稀释后的酶标二抗, 100 μL/孔, 37 °C孵育1 h, 倒掉反应液, PBS-T洗液洗板5次, 拍干。将显色液加入酶标板, 100 μL/孔, 37 °C准确孵育15 min, 直接加入终止液40 μL/孔, 立即放入

酶标仪中。

酶标仪在490 nm波长处测定各孔OD值, 根据试剂盒配套软件, 计算出样品中AFB<sub>1</sub>的含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同苦荞制品中黄曲霉毒素B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 的含量

选取目前市场上消费较多的4种苦荞制品, 每种随机购买4个不同品牌的产品, 用1#~4#表示。测定其黄曲霉毒素B<sub>1</sub>含量, 结果如表1所示。

表1 各种苦荞制品中AFB<sub>1</sub>的含量

Table 1 Contents of aflatoxin B<sub>1</sub> in 4 tartary buckwheat products

样品名称	AFB <sub>1</sub> 含量/(μg/kg)				平均值 (μg/kg)
	1#	2#	3#	4#	
苦荞米茶	7.532	5.657	4.211	4.765	5.541
苦荞营养粉	1.816	ND	ND	1.332	0.787
苦荞速溶片	2.512	2.975	0.993	4.01	2.622
苦荞醋	4.117	3.963	4.418	4.022	4.13

注: ND 未检出

所测定的4大类苦荞制品共计16个样品中, 有两个苦荞营养粉样品未检出AFB<sub>1</sub>, 其他14个样品均有检出, 检出率较高, 达到87.5%。有两个苦荞米茶样品中AFB<sub>1</sub>检出量高于5.0 μg/kg, 分别为7.532 μg/kg和5.657 μg/kg, 在所有样品中的超标率为12.5%, 在此类样品中的超标率高达50%。苦荞醋样品虽均未超标, 但检出量也较高, 平均值为4.130 μg/kg。

### 2.2 ELISA方法评价

#### 2.2.1 灵敏度测定

以未检出AFB<sub>1</sub>的苦荞粉2#样品为样本, 按照1.3的实验方法, 以依次降低AFB<sub>1</sub>标准溶液在490 nm时的吸光度来确定最低检测浓度, 即检测的灵敏度<sup>[5]</sup>, 结果如表2所示。

表2 样品中AFB<sub>1</sub>的最低检测浓度

Table 2 Detection results of aflatoxin B<sub>1</sub> in tartary buckwheat nutrition power 2# at different spiked amounts

AFB <sub>1</sub> 浓度 (μg/kg)	OD <sub>490 nm</sub>			OD <sub>490 nm</sub> 均值
0	1.649	1.647	1.666	1.654
0.05	1.618	1.597	1.602	1.606
0.1	1.522	1.505	1.517	1.515
1	1.319	1.328	1.327	1.325

灵敏度是以测得最低浓度的OD值与0 μg/kg的OD值读数之差大于0.1来计算<sup>[6]</sup>。由表2可知, AFB<sub>1</sub>浓度在0.1 μg/kg时OD值为1.515, 与0 μg/kg时的OD值1.654的差值等于0.139, 大于0.1, 因此本法对

AFB<sub>1</sub> 的最低检出浓度为 0.1 μg/kg。

### 2.2.2 回收率实验

分别选取各种苦荞制品中 AFB<sub>1</sub> 检出量最高的样品(苦荞米茶 1#、苦荞营养粉 1#、苦荞速溶片 4#、苦荞醋 3#)做为试样,以 AFB<sub>1</sub> 标准品进行 1 μg/kg 浓度的加标,按 1.3 的方法处理并检测,测定回收率。同时以所有样品中 AFB<sub>1</sub> 含量最高的苦荞米茶 1#作为试样,准确添加 1、4、8 μg/kg 三个浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准溶液,按 1.3 处理并测定 AFB<sub>1</sub> 含量,计算回收率。每种样品及每个浓度均测定三次平行,结果见表 3、表 4。

表 3 不同样品中回收率实验结果

Table 3 Recovery rates of aflatoxin B<sub>1</sub> in 4 tartary buckwheat products

样品名称	原含量 (μg/kg)	添加量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	回收率 /%
苦荞米茶 1#	7.532	1	6.862 6.772 7.104	6.913	81.0
苦荞营养粉 1#	1.816	1	2.433 2.691 2.600	2.575	91.4
苦荞速溶片 4#	4.010	1	4.264 4.197 4.302	4.254	84.9
苦荞醋 3#	4.418	1	4.439 4.500 4.478	4.472	82.5

表 4 不同添加浓度回收率实验结果

Table 4 Recovery rates of aflatoxin B<sub>1</sub> in tartary buckwheat tea 1# at different spiked amounts

样品名称	原含量 (μg/kg)	添加量 (μg/kg)	测定值 (μg/kg)	平均值 (μg/kg)	回收率 /%
苦荞米茶 1#	7.532	1	6.862 6.772 7.104	6.913	81.0
		4	9.709 9.722 9.689	9.707	84.2
		8	13.819 13.782 13.840	13.813	88.9

由表 3 表 4 的结果可知,在不同样品中添加 1 μg/kg 的 AFB<sub>1</sub> 标准溶液,回收率在 81.0~91.4%之间,平均回收率为 84.95%;在同一样品中分别添加 1、4、18 μg/kg 的 AFB<sub>1</sub> 标准溶液,回收率在 81.0~88.9%之间,平均回收率 84.7%。说明 ELISA 法用于测定苦荞制品中的 AFB<sub>1</sub> 含量稳定性较好,完全能满足日常检测的需求。

### 2.2.3 重复性实验

表 5 重复性实验结果

Table 5 Results of 6 parallel determinations of aflatoxin B<sub>1</sub> in 4 tartary buckwheat products

样品名称	AFB <sub>1</sub> 测定值(μg/kg)	S	RSD/%
苦荞米茶	7.538 7.587 7.499 7.565 7.389 7.481	0.070	0.95
苦荞营养粉	1.867 1.702 1.844 1.800 1.913 1.895	0.077	4.2
苦荞速溶片	2.532 2.488 2.474 2.559 2.427 2.621	0.069	2.7
苦荞醋	4.232 4.330 4.294 4.208 4.318 4.070	0.097	2.3

以每种苦荞制品的 1#样品为试样,按 1.3 的实验流程提取并测定 AFB<sub>1</sub> 含量,每个样品重复 6 次,计算其

标准偏差(S)和相对标准偏差(RSD),结果见表 5。

结果由表 5 可知,对每种苦荞制品的 1#样品均重复测定 6 次 AFB<sub>1</sub> 含量,相对标准偏差(RSD)在 0.95~4.2% 之间,均在 5% 以下。说明用 ELISA 法测定苦荞制品中的 AFB<sub>1</sub> 含量重现性较好,结果准确。

## 3 结论

3.1 在测定的 4 大类苦荞制品中,苦荞米茶与苦荞米醋的 AFB<sub>1</sub> 检出量较高,这应该主要与加工过程有关,因此应不断开发更为合理的加工工艺,严格控制各个加工环节。同时苦荞原料在储藏和运输过程中,也应采取相应措施抑制霉菌的繁殖及产毒,如增加一定量的 N<sub>2</sub> 或 CO<sub>2</sub>, 减少贮藏仓库中 O<sub>2</sub> 的含量,保持原料干燥等,即可以在源头上控制 AFB<sub>1</sub> 含量。此外,消费者在选择苦荞制品时,也应选择正规厂家生产的产品。

3.2 随着人们对养生的重视,功能性食品越来越受到青睐,荞麦被认为是一种颇具开发前景的功能性食品配料。而黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 被 WTO 认定为 1A 类致癌物,因此有效控制苦荞制品中的 AFB<sub>1</sub> 含量并加强检测,严格市场准入制度,是苦荞制品在开发和加工过程中的一个关键环节。ELISA 法操作简便快捷,安全性高,污染少,检测成本低廉。本实验证实,该法用于检测苦荞制品中的 AFB<sub>1</sub> 含量灵敏度高,最低检出浓度为 0.1 μg/kg; 重现性和稳定性好,平均回收率为 84.70~84.95%,相对标准偏差(RSD)小于 5%。说明 ELISA 法可广泛应用于苦荞制品中 AFB<sub>1</sub> 的检测,不仅简单迅速且准确性高,宜普遍推广。

## 参考文献

- [1] 宾婕,刘洁,陈克麟,等.不同来源苦荞中芦丁和槲皮素的含量测定[J].现代食品科技,2011,27(1):117-119
- [2] Dan Li, Xiaolei Li, Xiaolin Ding. Composition and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from tartary buckwheat grains [J]. Food Sci. Biotechnol, 2010, 19(3): 711-716
- [3] 李姣,余之蕴,林耀文,等.月饼中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 检测前处理方法的改进[J].现代食品科技,2012,28(3):364-366
- [4] 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 B<sub>1</sub>,B<sub>2</sub>,G<sub>1</sub>,G<sub>2</sub>[J].现代食品科技,2011,27(8):1040-1042
- [5] 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 B<sub>1</sub>[J].食品科学,2009,30(10):245-247
- [6] 齐惠萍,吕建明,李常青.ELISA 法检测食醋中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 方法的改进[J].中国食品卫生杂志,2008,20(4):313-315