

酶联免疫吸附分析法 测定食品中的黄曲霉毒素 B₁

(浙江贸易学校食品教研室, 金华 321000) 刘冬儿

摘 要 用酶联免疫吸附分析法测定食品中的黄曲霉毒素 B₁, 线性范围 0.25~5.0 ng/ml, 检测灵敏度达 0.015 μg/kg, 比薄层色谱法提高 300~400 倍, 回收率大于 89.2%, 精密度大于 7.67%。整个测定过程仅为 4h, 大大缩短了检测时间。

关键词 免疫分析 酶联免疫吸附分析法 黄曲霉毒素 B₁

中图分类号: TS207.4 文献标识码: A
文章编号: 1002-0306(2002)10-0079-03

AFTB₁ 是已知的 100 多种霉菌毒素中最稳定、毒性最大的毒素之一, 属强致癌物质, 它在 WHO 确定的重点研究毒物中被列为首位。随着人们对 AFTB₁ 的认识, 对其在食品中含量的要求也越来越高。采用薄层色谱(TLC)法检测存在检测灵敏度低、重现性差、操作繁琐、时间长且安全性差等缺点。本文采用酶联免疫吸附分析法, 结果表明, 此法线性范围好, 回收率、精密度高, 结果判断客观准确, 操作简单、容易掌握、实用性强, 弥补了经典化学分析方法和其它仪器测试手段的不足, 同时安全性高, 避免了与 AFTB₁ 的直接接触而引起的 AFTB₁ 的污染。

1 基本原理

酶联免疫法和其它免疫法一样, 都是以抗体和抗原的特异性结合为基础的, 其差别在于酶免疫方法以酶或者辅酶作为标记物, 标记抗原或者抗体, 用酶促反应的放大作用来显示初级免疫学反应。ELISA 也不例外, 但其最大的特点就是利用聚苯乙烯微量反应板(或球)吸附抗原或者抗体, 使之固相化, 加样品提取液和酶标 AFTB₁ 抗原[AFTB₁ 与辣根过氧化物酶(HRP)的结合物], 在其中进行免疫反应和酶促反应。加酶底溶液显色, 颜色的深浅取决于抗体和酶标 AFTB₁ 的结合量。样品中 AFTB₁ 多, 则被抗体结合的酶标 AFTB₁ 抗原就少。在 HRP 存在下, 酶底溶液中

的四甲基联苯胺(TMB)和过氧化氢发生氧化反应而使溶液显红色至橙黄色。用 2mol/L 硫酸中止反应, 用目视法或仪器法将样品孔与 AFTB₁ 标准限量孔比较, 判断或计算样品中 AFTB₁ 的含量。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

A 试剂 稀释液 甲醇-蒸馏水(7:93); B 试剂 AFTB₁ 标准物质(Siama 公司, 纯度 100%)溶液, 浓度 1.00 μg/L; C 试剂 酶标 AFTB₁ 抗原(AFTB₁-辣根过氧化物酶交联物, AFTB₁-HRP), AFTB₁-HRP 的摩尔比 < 2:1; D 试剂 酶标 AFTB₁ 抗原稀释液, 含 0.1% 牛血清白蛋白(BSA)的 pH7.5 的磷酸盐缓冲液(PBS); E 试剂 洗涤液, 含 0.05% 吐温-20 的 PBS 溶液; F 试剂 底物液 a: 四甲基联苯胺(TMB), 用 pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液配成, 浓度为 0.2g/L; G 试剂 底物液 b: 1ml pH5.0 乙酸钠-柠檬酸缓冲液中加入浓度为 0.3% 的过氧化氢溶液 28 μl; H 试剂 终止液, 浓度为 2mol/L 的硫酸溶液, 普通黄玉米 金华市武义地区生产。

分析天平 感量 0.01g; 培养箱 0~50±1℃; 微量连续可调取液器及吸头 10~20 μl; 冰箱 4~8℃; AFTB₁ 测定仪或酶标测定仪 含有波长 450nm 的滤光片; AFTB₁ 酶联免疫测试盒 包被抗体的聚苯乙烯微量反应板 24 孔。

2.2 试验方法

2.2.1 样品溶液的制备 称取粉碎后过 20 目筛的玉米样品 5g(准确到 0.01g)于磨口的 50ml 试管中, 加入 25ml 甲醇-水(5:5), 加塞振荡提取 10min, 过滤, 滤液按表 1 用 A 试剂作适当稀释。

2.2.2 限量测定

2.2.2.1 洗涤包被抗体的聚苯乙烯微量反应板 每次需用标准对照孔 3 个, 其余按测定样品数截取相应的板孔数。用 E 试剂洗涤液洗板 2 次, 洗去未交联的抗体及杂质。洗液不得外溢, 每次间隔 1min, 并放在吸水纸上拍干。

2.2.2.2 加试剂 按表 2 所列, 依次加入试剂和待测

收稿日期: 2002-03-31

作者简介: 刘冬儿(1962-), 女, 高级讲师, 研究方向: 食品检测与开发利用。

表1 根据样品中 AFB₁ 的限量制成样品稀释液

AFB ₁ 限量 (μg/kg)	样品滤液量 (ml)	甲醇-水(7/93) 量 ml	稀释倍数
≤5	0.20	-	不稀释
≤10	0.10	0.10	2
≤20	0.05	0.15	4
≤30	0.05	0.25	6
≤40	0.05	0.35	8
≤50	0.05	0.45	10

试样稀释液。

2.2.2.3 反应 放在 37℃恒温培养箱内反应 30min。

2.2.2.4 洗涤 将反应板从培养箱中取出,用 E 洗涤剂洗板 5 次,洗液不得溢出,每次间隔 2min,在吸水纸上拍干。

表2 限量测定

次序	试剂加入量	孔 号											
		1	2	3	4	5	6	7	8	...	24		
1	50μl	A	A	B	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	...	S ₂₁		
2	-	摇匀											
3	50μl	D	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
4	-	摇匀											

注:A-甲醇-水(7/93);B-1.00μg/L AFB₁ 标准液;

D-酶标 AFB₁ 抗原稀释液(含 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液);

C-酶标 AFB₁ 抗原(AFB₁-HRP); S-不同样品制备的样品溶液。

1 孔为空白孔; 2 孔为阴性孔;

3 孔为限量孔(含量为 5μg/kg); 4~12 孔为样品孔。

2.2.2.5 显色 每孔各加入底物 F 试剂和底物 G 试剂各 50μl,摇匀,在 37℃恒温培养箱内反应 15min。

2.2.2.6 终止 每孔加终止液 H 试剂 50μl 终止。

2.2.2.7 结果判定 目测法先比较 1~3 孔颜色。若 1 号孔接近无色,3 号孔最深,2 号孔次之,说明测定无误。这时比较试样孔与 3 号孔的颜色,若相当或浅为合格,若颜色深为超标,或直接以仪器法测定。

2.2.3 定量测定 若试样超标,则用 AFB₁ 测定仪或酶标测定仪在 450nm 波长处进行定量测定,通过绘制 AFB₁ 的标准曲线来确定试样中 AFB₁ 的含量。

将 50.00μg/L 的 AFB₁ 标准溶液用 A 试剂稀释成 0.00、0.01、0.10、1.00、5.00、10.00、20.00、50.00μg/L 的标准工作溶液,分别作为 B 试剂系列,按限量法测定步骤测得相应的吸光值 A,以 0.00μg/L 的 AFB₁ 浓度的 A₀ 值为分母,其它标准浓度的 A 值为分子的比值,

再乘以 100 为纵坐标,对应的 AFB₁ 标准浓度为横坐标,在半对数坐标纸上绘制标准曲线。根据试样的 A/A₀ 值乘以 100 的值在标准曲线上标查得对应的 AFB₁ 量,并按式(1)计算出试样中 AFB₁ 的含量。

试样中 AFB₁ 的含量(μg/kg)=PVn/m

式中 P:从标准曲线上查得的试样提取液中 AFB₁ 的含量 μg/L;

V:试样提取液体积 ml;

n:试样稀释倍数;

m:试样的质量 g。

3 结果与讨论

3.1 影响 ELISA 分析法的因素

因 ELISA 是利用抗体的选择性和标记酶的化学放大的灵敏性建立起来的,故应考虑的因素主要有:

3.1.1 抗原包被 将抗原固定于聚苯乙烯微量反应板中称之为包被,包被的质量是影响抗原-抗体反应的重要因素,本文操作时用牛血清白蛋白作载体。

3.1.2 非特异性反应 ELISA 中可以发生许多非特异性反应,严重干扰分析结果,选择适当抗体组合可明显减少这种反应的发生。实验中采用简单预处理,例如在包被液中加入牛血清白蛋白的封闭剂,往洗涤液中加入 Tween 20 来提高 ELISA 的特异性。

3.1.3 酶和抗体的偶联 酶和抗体偶联的好坏,直接影响试剂灵敏度。操作时采用的酶是辣根过氧化氢酶(HRP),与抗体偶联采用改良的高碘酸钠氧化法。

3.1.4 酶的底物 当酶标记抗体-抗原复合物和酶的底物相遇时,复合物中的酶水解底物,使无色的底物溶液生成有色的反应产物,然后根据颜色的深浅测出待测物。由此可看出,酶底物的选择对准确和迅速地显示结果影响很大。HRP 常采用 H₂O₂-邻苯二胺或 H₂O₂-邻联甲苯胺作为酶底物,由于反应产生颜色深浅与 H₂O₂ 的用量有关,因此在底物溶液的配制时应注意控制好 H₂O₂ 的用量。

3.1.5 洗涤 无论是免疫反应,还是酶促反应,每次反应后都要反复洗涤,这既保证了反应的定量关系,也除去了血清中的与反应无关的其它成分及游离酶复合物等。洗涤效果与检测结果密切相关。如果洗涤不充分,常引起结果的紊乱,最好做到洗涤的步骤标准化。

3.2 方法线性范围、检测灵敏度

本法采用辣根过氧化氢酶(HRP)标记高亲和力的黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)抗体,检测 AFB₁ 的线性范

(下转第 78 页)

表3 加标回收率和精密度

测定值(μg/L)	回收率(%)	标准偏差 S	变异系数 Cr(%)
样品+5μg/L(0.00μg/L)	4.22,4.50,4.52, 4.18,4.23,5.08	0.34	7.67
样品+10μg/L(0.00μg/L)	10.20,10.12,9.20,8.92,8.80,9.68	0.60	6.40
样品+20μg/L(0.00μg/L)	20.20,18.23,20.05,18.20,19.30,17.45	1.11	5.90

水分量,以 U 表示。

$$U = \frac{dW}{Ad\tau} = -\frac{dG}{Ad\tau} = -\frac{G_c dX}{Ad\tau} \quad (\text{kg/m}^2 \cdot \text{h})$$

式中的负号表示物料中的水分随着干燥时间的增加而减少。

dW ——物料表面汽化的水分量(kg);

A ——被干燥物料的表面积(m^2);

$d\tau$ ——干燥时间(h或s);

G_c ——绝对干物料的质量(kg);

G ——物料在某一瞬时的质量(kg);

X ——湿物料的干基含水量(%)。

3.4 干燥时间 τ

$$\tau = \int_0^\tau d\tau = -\frac{G_c}{A} \int_{X_1}^{X_2} \frac{dX}{U} \quad (\text{h})$$

X_1 ——物料初含水量(干基);

X_2 ——物料终含水量(干基)。

干燥所需的时间与物料量、干燥面积、物料的初、终速度有关。它适用于在恒定的干燥条件下,即空气的温度、湿度、速度不变情况下的计算。

3.5 干燥机理

箱式干燥设备干燥采用热空气作为干燥剂(介质)。当湿物料(火腿肠)受热进行干燥时,开始时水分较多地分布于物料表面,由于物料水分汽化是在表面进行,表面水分首先由液态转化为气态,此时湿热气体从物料表面向周围介质扩散,于是物料表面水分逐渐降低。干燥速率为表面汽化控制时,强化干燥操作就必须改善影响外部传递的因素,即提高介质温度,降低介质湿度,改善介质与物料之间的流动和接触都有利于提高干燥速率。

3.6 影响干燥的主要因素

3.6.1 温度 通常传热介质的温度愈高,热量向湿物料传递的速率也愈大,水分外逸加速。当湿物料中的水分以水蒸气状态从其表面外逸时,在其表面形成饱和水蒸气层,将阻碍物料表面水分蒸发速度。因此必须将饱和水蒸气排出,物料表面水分蒸发才得以继续进行。同时传热介质温度过高,也会影响食品的品质,所以食品干燥温度一般以不超过 $60\sim 70^\circ\text{C}$ 为宜。

3.6.2 空气湿度 空气作为干燥介质时,其湿度愈

小,物料的干燥速度愈快。这是因为物料脱水时是将其水分向周围扩散,并使其表面的水分始终要与其周围空气的湿度处于平衡状态。因此,降低空气的湿度,物料表面水分扩散加速。

3.6.3 空气流速 增加空气流速,不仅可以及时将聚集在物料表面附近的饱和湿空气带走,而且显著地加速了物料中水分的蒸发。空气流速愈快,其干燥速度愈快,干燥时间愈短。同时,空气流速过大,则会降低热能的利用,增加能量消耗。在本设备中采用回流装置,可更有效的利用热能。

3.6.4 蒸发面比值 蒸发面比值的增大,增加了物料同加热介质相互接触的表面积,为水分外逸提供了更多的途径,从而加速了物料干燥过程。物料蒸发面比值愈大,干燥效果愈好。

3.6.5 大气压力 在温度不变的条件下,大气压力越低,沸腾就越快。如在真空条件下加热脱水时,就可以在较低的温度条件下进行。

因此,要提高食品干燥速率,保证干燥温度,降低干燥介质湿度,增加空气流速是其重要途径。提高干燥速率的措施有:选择合适的物料粒度、厚度(增加物料的表面积);装载量(生产量)的控制;加热方式的选择;风量的控制;温度的控制。

4 结束语

箱式火腿肠干燥设备是一种专用干燥设备,它有以下特点:系统自动化程度高,操作简单;网状输送机的输送速度通过变频器可无级调速;冷、热风的温度可预设,并在系统运行过程中自动控制;风量的大小可通过调整电动风阀控制;设备结构紧凑、外观简洁美观;材料防锈、防腐,符合国家食品卫生安全标准。从双汇食品城、阜新肉联厂使用情况来看,设备的整个系统运行平稳、可靠,达到了设计及用户使用要求。

参考文献

- 1 张裕中,等.食品加工技术装备.中国轻工业出版社
- 2 徐景珩,等.未来十年中国食品和包装机械发展趋势.中国轻工业出版社
- 3 许占林,等.中国食品包装工程装备手册.中国轻工业出版社

(上接第 80 页)

围 $0.25\sim 5.0\text{ng/ml}$, 检测灵敏度达 $0.015\mu\text{g/kg}$,比薄层色谱法提高 $300\sim 400$ 倍,整个测定过程仅为 4h,大大缩短了检测时间。

3.3 回收率和精密度

由于样品中 AFTB_1 无法测得,我们只好采用加标样进行精密度和回收率试验,样品中加标后用本文方法测定,结果见表 3。

4 结论

本文用酶联免疫吸附(ELISA)分析法测定食品中的黄曲霉毒素 $\text{B}_1(\text{AFTB}_1)$,方法具有高特异性和灵敏度,较好的回收率和精密度,属于超微量分析技术,结果准确,可满足客户的要求。该方法操作简便,快速而且无 AFTB_1 污染。

参考文献(略)