

Helica Biosystems, Inc

1527 W. Alton Ave

Santa Ana, CA 92704



Phone: 714-578-7830

Fax: 714-578-7831

Email: info@helica.com

ELISA法定量检测各类商品中黄曲霉毒素B1时存在的基质效应

Quantitation of Aflatoxin B1 by ELISA in Commodities that

Pose a Matrix Effect

Thu Hyunh, Ph.D., Chritina Ly, Peter Knight, Ph.D, and Wondu Wolde-Mariam
(Presented at AOAC 126th Annual Meeting, Oct 1, 2012)

摘要

黄曲霉毒素 B1 是存在于各类食品和饮料中主要的真菌毒素残留和致癌物质。酶联免疫吸附测定 (ELISA) 已长期用于定量检测真菌毒素的含量, 因为它们操作简单、快速, 可高通量检测。另外, ELISA 比较轻便, 并可用于一些需要快速出具真菌毒残留检测结果的领域。ELISA 的一个缺点是基质效应, 有些商品中的成分可能会干扰该测定, 并导致比预期值高或低。以前, 我们开发了一种黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒用来定量检测小麦, *snaplage*, 玉米, 干草, 辣椒, 开心果, 花生的黄曲霉毒素 B1 残留。在此次研究中, 我们扩展了可以用黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒测试的商品列表。我们研究了使用这种试剂盒准确定量检测广泛的粮食商品包括常见的烹饪调料、油、烹饪酱油和动物饲料的黄曲霉毒素 B1。通过对各种商品的提取方法的稍作调整, 这些商品的黄曲霉毒素 B1 回收率可以达到 80% 或更高。简言之, 我们已经开发出最小基质效应的, 可以检测多种商品的一种黄曲霉毒素 B1 试剂盒。结论是, 黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒是用来监测和确保世界范围内的食品安全的一种廉价的, 并且非常有价值的工具。

材料和方法:

材料:

黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒是在实验室条件下准备的 (HELICA 生物系统公司, 圣安娜, CA)。乙腈和黄曲霉毒素 B1 (AFB1) 标准品采购自 Sigma 公司 (圣路易斯, 密苏里州)。所有的调料, 油, 酱油, 和动物饲料是从当地市场或食品供应商店 (圣安娜, CA) 获得。

方法:

提取和稀释

在加标回收研究中, 对饲料和香菜种子进行细磨。对于饺子酱油、食用油和普通酱油, 样品进行加标并涡旋后立即提取。对于所有其他商品, 提取之前, 对已添加有 AFB1 的商品在室温过夜干燥。

将样品按照标准方案提取（图 1）。一定量或一定体积的样品转移到容器中，并与提取溶剂混合。对于固体商品，用于分析的样品量为 2-20g。对于油和酱油，用于分析的样品为 10-20 毫升。经过与 100-200mL 80%乙腈短时间混合后，离心样品，收集上清液用于分析。进行分析之前用 PBS-T 稀释样品。



ELISA 方法

ELISA 实验需要根据制造商的说明书（HELICA Biosystems 公司，圣安娜，CA）进行操作。简单地说，使用之前 ELISA 试剂盒所有试剂需要恢复至室温。将 200 μ L 稀释液转移到相应的混合微孔中。100 μ L 的标准品或样品分别移至相应的混合微孔中，并混合。将 100 μ L 混合液转移到相应的抗体包被的微孔中，每份两个平行样，并在室温下温育 30 分钟。用 PBS-T 将微孔洗涤三次并拍干。100 μ L 黄曲霉毒素 HRP 藕合物加入到各包被抗体的微孔中，并在室温下孵育 30 分钟。用 PBS-T 将孔洗涤三次，并拍干。100 μ L 的 TMB 底物加入每个微孔中并室温下温育 10 分钟。100 μ L 终止溶液加入到每个孔中。用 StatFax2100（Awareness Technology Inc，棕榈市，佛罗里达州）在 450nm(630nm)波长下读取吸光度值。

计算与分析

%B/B₀ 的计算是通过样品 OD 值除以 0ppb 标准品 OD 值再乘以 100 所得的百分比。标准品浓度的对数值沿着 x 轴绘制。相应的 %B/B₀ 值沿着 y 轴绘制。ReaderFit 软件(Hitachi Solutions America Ltd，旧金山，CA) 可用于绘制拟合标准曲线（四参数拟合方程），再利用标准曲线读出加标样品浓度值。计算最终浓度时稀释因素考虑在内。

为了评估基质干扰，空白样品和商品提取液分别进行 20 次重复的检测。使用 Microsoft Excel 进行 Student's t-检验分析，以确定商品提取液和单独的提取溶剂各自测定值的平均值之间是否存在统计学显著差异。p 值小于 0.05 被认为是显著差异。

计算检测限时首先得出 20 次重复的空白样品的平均值，减去 2 倍的空白样品的标准偏差值，以获得 %B/B0。用 %B/B0 从标准曲线上获得检测浓度极限。

%回收率计算是将不同浓度的 AFB1 添加到样品中，通过检测得出 AFB1 浓度并除以 AFB1 加标量再乘以 100%。

结果与讨论:

AFB1 一直被公认为是整个经济发展中世界食物供应中存在的有害污染物 (1)。已有几种的商业 ELISA 试剂盒被开发以检测食物中的 AFB1。但是，ELISA 用于食品分析的一个主要挑战是基质效应，某些商品中的干扰物质阻碍酶的活性或降低抗体和抗原 (2) 之间的相互作用。以前，我们开发了对于各种不同的基质干扰最小的一种 ELISA 试剂盒，用于定量检测玉米，小麦，干草，snaplage，红辣椒，开心果和花生中的 AFB1。由于 AFB1 在饮食主要食品和农产品中广泛的无处不在的性质，我们评估了黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒对于许多发展中国家普遍存在的黄曲霉毒素 B1 残留水平的饲料和食品的检测能力 (3-4)。

首先，我们确认了进行研究的商品是否有基质干扰。根据表 1，各商品的测试结果平均值与提取溶剂测试平均值之间并没有表现出显著统计学差异，因为所有的 p 值均大于 0.05。实验结果通过这些特定矩阵证明了基质干扰不存在。

表 1 - 基质干扰的评估与 LOD 的确立

基质 Matrix		p-value ^a	LOD (ug/kg)
Chili Powder	辣椒粉	0.279	0.0176
Cilantro Seed	香菜种子	0.959	0.0184
Coriander Powder	芫荽粉	0.746	0.0163
Corn Oil	玉米油	0.991	0.0102
Peanut Oil	花生油	0.942	0.0116
Safflower Oil	红花油	0.322	0.0172
Sesame Oil	香油	0.301	0.0108
Vegetable Oil	植物油	0.976	0.0111
BBQ Sauce	BBQ 酱	0.864	0.0106
Char Siu Sauce	叉烧酱	0.584	0.0160
Chili Sauce	辣酱油	0.584	0.0079
Dumpling Sauce	饺子酱	0.219	0.0111
Hoisin Sauce	海鲜酱	0.874	0.0135
Hunan Sauce	湖南酱	0.600	0.0126
Oyster Sauce	蚝油	0.573	0.0154
Plum Sauce	梅子酱	0.121	0.0046
Shrimp Paste	虾酱	0.382	0.0069
Soy Sauce	普通酱油	0.130	0.0061
Animal Feed	动物饲料	0.963	0.009

^a 当 p-value < 0.05 可视为具有显著的统计学差异。

由于这些商品并没有表现出基质干扰，我们接着进行了加标和回收率研究。这些受评估的样品中添加了三个不同浓度水平的 AFB1，并计算了回收率。对于每个加标浓度水平，普

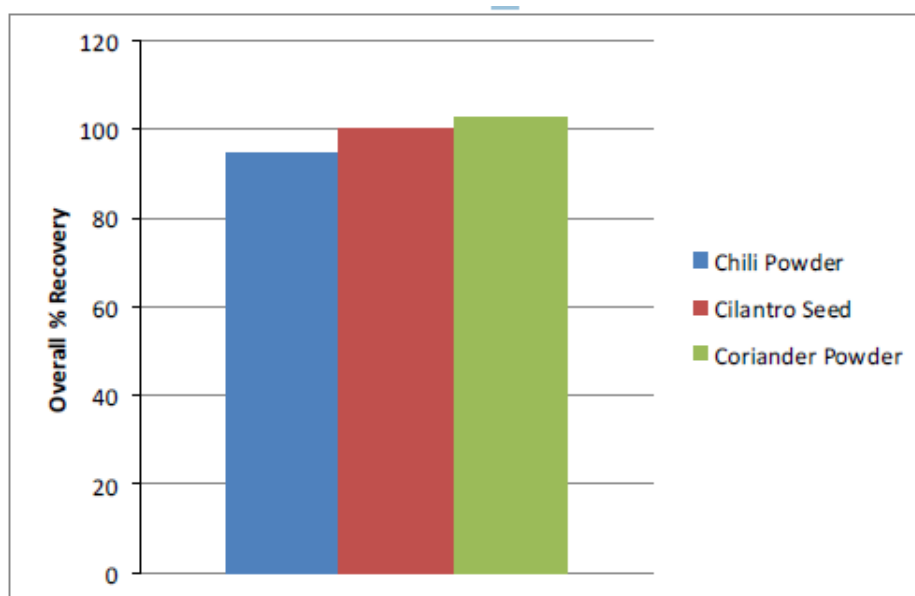
通烹饪调料包括辣椒粉，香菜种子，和芫荽粉显示出 88.3-110.1%的极好回收率（表 2）。此外，辣椒粉，香菜种子，和芫荽粉各自的总体%回收率分别为 95.0%，100.6%和 102.6%，分别为（图 2）。

表 2 - 方法精度和常见调料中黄曲霉毒素 B1 的回收率

基质		加标水平(mg/kg)	重复性 (%CV)	回收率(%)
Matrix		Spike level ^a	Repeatability	Recovery
Chili Powder	辣椒粉	2.5	7.21	100.48
		5	3.57	96.2
		10	3.03	88.28
Cilantro Seed	香菜种子	2.5	5.24	95.48
		5	3.57	96.2
		10	2.76	110.08
Coriander Powder	芫荽粉	2.5	3.96	99.44
		5	5.49	100.3
		10	7.92	108.02

^a 每个浓度水平五个平行样

图 2 - 调料中黄曲霉毒素 B1 的总体%回收率



此外，我们研究了常见的家庭食用油，包括玉米油，花生油，红花油，芝麻油，和植物油。在最初的研究中，我们对加标油进行了标准的 10 分钟提取方案。然而，%回收率为 54-72%（未列出数据）。当延长提取时间至 30 分钟时，我们能够实现更好的回收率。每个浓度水平的每个样品的%回收率在 80.3-116.4%（表 3）之间。玉米油，花生油，红花油，芝麻油，和植物油，总体%回收率分别为为 99.0，103.7，104.7，94.4 和 105.9%，（图 3）。延长提取时间可使提取溶剂与粘性样品更好的混合彻底，从而达到更好的回收率。

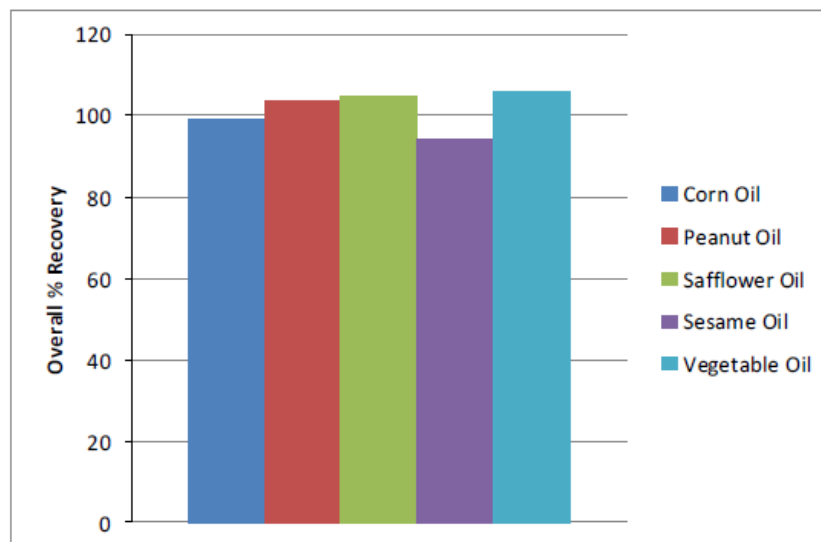
表 3 - 方法的精度和食用油黄曲霉毒素 B1 回收率

基质		加标水平(mg/kg)	重复性 (%CV)	回收率(%)
Corn Oil	玉米油	10	9.08	97.23

		20	7.26	87.53
		40	9.21	112.30
Peanut Oil	花生油	10	3.87	108.12
		20	9.80	89.58
		40	5.91	113.45
Safflower Oil	红花油	5	4.62	107.64
		10	6.33	93.00
		20	6.54	113.49
Sesame Oil	香油	5	5.71	101.84
		10	6.26	80.30
		20	4.82	101.07
Vegetable Oil	植物油	5	4.85	107.88
		10	11.83	93.3
		20	4.70	116.44

^a 每个浓度水平五个平行样

图 3 - 食用油黄曲霉毒素 B1 的总体%回收率



30 分钟的提取时间并不仅限于烹饪油。几种常见的烹饪酱油需要与提取溶剂的更长作用时间，以达到更好的回收率。每种烹调酱油的每个浓度水平的回收率示于表 4 中。特别是，烧烤酱、饺子酱、海鲜酱、湖南酱、梅子酱、虾酱、酱油的总体回收率分别为为 101.88，129.28，105.18，100.7，115.82，103.28，和 112.92%，（图 4）。其他调料，如叉烧，辣椒，和牡蛎需要 10 分钟或更少的提取时间，以实现总体回收率分别达到 122.50，115.0，和 117.63%（图 4）。总体而言，食用油和酱汁的提取效果通过简单地延长提取时间得到加强。

表 4 - 方法的精度和常见调味料黄曲霉毒素 B1 的回收率

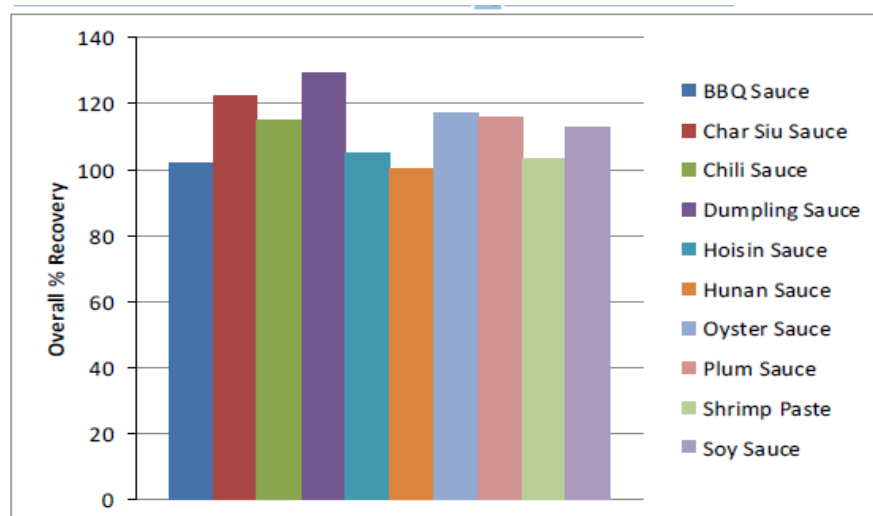
Table 4 - Method precision and recovery of aflatoxin B1 in common sauces

基质		加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性 (%CV)	回收率 (%)
Matrix		Spike level	Repeatability	Recovery
BBQ Sauce	BBQ 酱	2.5	9.18	105.03

		5	6.72	99.55
		10	7.81	101.06
Char Siu Sauce	叉烧酱	2.5	9.87	120.10
		5	9.70	120.68
		10	8.29	126.72
Chili Sauce	辣酱油	2.5	6.55	115.96
		5	8.44	104.96
		10	3.88	124.27
Dumpling Sauce	饺子酱	2.5	7.73	157.76
		5	9.27	100.37
		10	7.05	129.70
Hoisin Sauce	海鲜酱	2.5	6.98	99.57
		5	5.87	107.75
		10	6.15	108.22
Hunan Sauce	湖南酱	2.5	6.63	101.00
		5	2.86	105.75
		10	5.78	95.36
Oyster Sauce	蚝油	2.5	9.09	116.05
		5	5.18	111.49
		10	6.95	125.37
Plum Sauce	梅子酱	2.5	9.55	107.06
		5	9.64	119.25
		10	6.03	121.15
Shrimp Paste	虾酱	2.5	7.90	112.85
		5	8.47	93.23
		10	10.44	103.78
Soy Sauce	酱油	2.5	5.75	109.63
		5	7.44	103.63
		10	6.25	125.97

^a 每个浓度水平五个平行样

图 4 - 烹饪调料黄曲霉毒素 B1 的总体%回收率



最后，我们评估了饲料中 AFB1 的回收率，加标量为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。其中%回收率分别为 101.6，104.9 和 113.6%（表 5）。AFB1 的三个浓度的总体回收率为 106.7%。总之，黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒，可用于动物饲料常规检测。

表 5 - 方法的精确度和动物饲料中黄曲霉毒素 B1 的回收率

基质	加标水平 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	重复性 (%CV)	回收率 (%)
Matrix	Spike level	Repeatability	Recovery
Animal Feed 饲料	50	6.1	101.6
	100	4.84	104.88
	200	8.59	113.64

^a 每个浓度水平五个平行样

结论

我们成功开发了低基质试剂盒，只需这一种 ELISA 试剂盒便能定量检测广泛的不同商品中的 AFB1。对每一个特定的商品，我们调整了现有的标准检测方案，从而实现了对这些广泛的人类食品和动物饲料中 AFB1 检测的良好的回收率。特别是，调整提取时间对于获得更好的回收率是非常关键的。由于黄曲霉毒素 B1 低基质 ELISA 试剂盒不存在显著基质干扰，适合用于各种商品的大量样品的常规筛查。此次研究回收率达到 80%或更好，因此该方法的性能是令人满意的。

参考文献

REFERENCES:

1. Kensler, T.W., Roebuck, B.D., Wogan, G.N., and Groopman, J.D. (2011) Aflatoxin: A 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol Sci* 120(S1):S28-S48.
2. Lee, N.A., Wang, S., Allan, R.D., and Kennedy, I.R. (2004) A rapid aflatoxin B₁ ELISA: Development and validation with reduced matrix effects for peanuts, corn, pistachio, and soybeans. *J Agric Food Chem* 52(10):2746-2755.
3. Ee Ok, H., Kim, H.J., Bo Shim, W., Lee, H., Bae, D.-H., Chung, D.-H., and Chun, H.S. (2007) Natural occurrence of aflatoxin B₁ in marketed foods and risk estimates of dietary exposure in Koreans. *J of Food Prot* 70(12):2824-2828.
4. Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., and Aggarwal, D (2004) Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80(5):1106-1122.