

林 巧. 苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取工艺的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 302–305.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.109

苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取工艺的优化

林 巧

(西昌学院, 四川西昌 615000)

摘要:基于 ELISA 检测方法, 对苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取工艺进行优化, 寻求苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 最佳提取条件。通过空白加标回收试验、样品加标回收试验, 证明 ELISA 检测方法的可行性, 对料液比、超声时间、超声振幅 3 个变量进行正交试验。结果表明, 用 ELISA 检测黄曲霉毒素 B₁ 的方法是切实可行的, 在提取液溶剂配比甲醇: 水为 6: 4、料液比为 1: 5、最佳超声时间 15 min、最佳超声振幅 15Φ 的条件下能得到最佳提取效果。

关键词:苦荞麦; 提取; 黄曲霉毒素 B₁; ELISA

中图分类号: R284.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0302-03

苦荞麦会在贮藏加工过程中污染黄曲霉毒素, 黄曲霉毒素毒性极强, 远远高于氰化物、砷化物和有机农药的毒性, 其中以黄曲霉毒素 B₁ 毒性最大。ELISA 试验是一种特异性强, 敏感性高, 重复性好的试验方法。本试验采用 ELISA 检测苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁, 为了加强黄曲霉毒素的溶解度及扩散, 有利于毒素的提取完全, 利用超声波辅助提取。本试验研究了不同条件对苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取效果的影响, 通过 ELISA 试剂盒对黄曲霉毒素 B₁ 含量进行测定, 对提取方法中溶剂配比、料液比、超声时间、超声频率进行优化, 从而得到黄曲霉毒素 B₁ 的最佳提取方法。

1 材料与方法

1.1 材料

苦荞麦麸: 从西昌航飞科技发展有限公司采集苦荞麦麸皮粉。

1.2 仪器设备

酶标仪, 美国热电公司生产; MS2 型微量振荡器, 德国 IKA 公司生产; 微量移液器, 芬兰雷勃公司生产; 超声波细胞粉碎机, 浙江宁波新芝生物科技股份有限公司生产; 恒温培养箱, 上海悦丰仪器仪表有限公司生产。

1.3 试剂

ELISA 试剂盒, 北京华安麦科生物技术有限公司; 甲醇、无水乙醇、三氯甲烷、分析纯。

1.4 试验方法

1.4.1 空白溶剂加标回收试验 将溶剂甲醇和水按 1: 9、8: 2、7: 3、6: 4、5: 5 的比例配制。在空白提取溶剂中加入不同量的黄曲霉毒素 B₁ 标准品, 使其每组最终浓度分别达到 0.1、1.0、2.0 μg/L^[1]。用 ELISA 法检测, 同时做 5 组平行。按如下公式计算:

$$\text{回收率} = \frac{\text{检测出 AFB}_1 \text{ 的含量}}{\text{添加入的 AFB}_1 \text{ 的含量}} \times 100\%。$$

1.4.2 样品加标回收试验 将甲醇和水按 1: 9、8: 2、7: 3、6: 4、5: 5 的比例配制。准确称取 2.0 g 苦荞麦麸样品, 装入 25 mL 具塞离心管中, 准确加入 10 mL 提取溶液, 超声振幅为 3Φ, 超声萃取 10 min, 离心取上清液, 即为待测样品提取液。测定原样品中黄曲霉毒素 B₁ 的含量, 按 1: 1 比例加入浓度分别为 0.1、1.5、5.0 μg/L 的黄曲霉毒素 B₁ 标准品 50 μL^[2]。用 ELISA 检测。按如下公式计算:

$$\text{回收率} = \frac{\text{总的 AFB}_1 \text{ 含量} - \text{原样品中 AFB}_1 \text{ 含量}}{\text{添加入 AFB}_1 \text{ 的量}} \times 100\%。$$

1.4.3 不同料液比对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响 用 6: 4 的甲醇作溶剂, 准确称取 2.0 g 苦荞麦麸样品, 装入 25 mL 具塞离心管中, 按照料液比 1 g: 4 mL、1 g: 5 mL、1 g: 6 mL、1 g: 7 mL、1 g: 8 mL、1 g: 9 mL 加入溶剂, 超声振幅为 3Φ, 超声波萃取 10 min, 离心取上清液, 即为待测样品提取液^[3], 用 ELISA 检测。

1.4.4 不同超声时间对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响 选用提取溶剂比 6: 4 和料液比 1 g: 5 mL 进行试验, 准确称取 2.0 g 苦荞麦麸样品, 装入 25 mL 具塞离心管中, 准确加入 10 mL 提取溶液, 超声波萃取, 振幅为 3 Φ, 时间分别采用 5、10、15、25、35、50 min, 离心取上清液, 即为待测样品提取液^[4], 用 ELISA 检测。

1.4.5 不同超声振幅对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响 采用最佳提取溶剂 6: 4、料液比 1 g: 5 mL、超声时间 15 min 进行试验, 准确称取 2.0 g 苦荞麦麸样品, 装入 25 mL 具塞离心管中, 准确加入 10 mL 提取溶液, 超声波萃取, 振幅分别为 3、6、10、15、20 Φ, 离心取上清液, 即为待测样品提取液。用 ELISA 检测。

1.4.6 正交试验 根据正交试验原理, 选取料液比(A)、超声时间(B)、超声振幅(C)对黄曲霉毒素 B₁ 提取影响显著的 3 个因素, 每个因素 3 个水平, 选用 L₉(3³) 正交表, 并对数据进行极差分析, 最后在水平范围内取最佳值^[5]。正交试验因素与水平设计见表 1。

1.5 苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 含量的测定

1.5.1 样品处理 取经过上述超声处理后的提取溶剂 5 mL, 加入 10 mL 三氯甲烷, 振荡 5 min, 离心分层, 取出下层

收稿日期: 2014-04-30

基金项目: 四川省教育厅科研重点项目(编号: 13ZA0157)。

作者简介: 林 巧(1978—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事食品微生物技术与微生物研究。E-mail: 13778672269@163.com。

表 1 苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取工艺正交试验因素水平

水平	因素		
	A:料液比 (g : mL)	B:超声时间 (min)	C:超声振幅 (Φ)
1	1 : 4	10	10
2	1 : 5	15	15
3	1 : 6	20	20

三氯甲烷相;向上层水相中再加入 10 mL 三氯甲烷,按上述方法重复提取 1 次,合并三氯甲烷相;于 50 ℃ 下水浴蒸干;加入 2 mL 样品提取液,溶解挥干物;再加入 8 mL 样品稀释液进行稀释;取稀释后液体待测。

1.5.2 加标准品/样本 将样本和标准品对应微孔按序编号,并记录标准孔和样本孔所在的位置,加入标准品或样本 50 μL 到对应的微孔中,加 AFB₁ 酶标物 50 μL/孔,再加入 AFB₁ 抗试剂 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 37 ℃ 避光环境中反应 30 min。

1.5.3 洗板 小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液 300 μL/孔,充分洗涤 5 次,每次间隔 30 s,用吸水纸拍干。

1.5.4 显色 加入底物液 A 液 50 μL/孔,再加底物液 B 液 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置 37 ℃ 避光环境反应 15 min。

1.5.5 测定 加入终止液 50 μL/孔,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于双波长 $D_{450\text{ nm}}/D_{630\text{ nm}}$ 检测,在 5 min 内读完数据,测定每孔 D 值。

1.5.6 ELISA 试验标准曲线 用 ELISA 标准品作标准曲线,标准品浓度分别为 0、100、250、500、1 500、5 000 ng/L 进行 3 次重复试验,取平均值。利用 RIDAWIN 软件分析得到标准曲线,结果如图 1。

2 结果与分析

2.1 空白溶剂加标回收试验

ELISA 检测过程中会受到试剂、温度、仪器灵敏度等因素

表 3 样品加标回收试验结果

提取溶剂 (甲醇:水)	稀释 10 倍后样品中 AFB ₁ 的含量 (ng/L)	添加 100 ng/L		添加 1 500 ng/L		添加 5 000 ng/L	
		检测值 (ng/L)	回收率 (%)	检测值 (ng/L)	回收率 (%)	检测值 (ng/L)	回收率 (%)
9 : 1	101.1	121.1	141.1	703.5	87.06	1 867.2	72.67
8 : 2	139.2	134.2	129.2	687.4	82.37	2 315.8	89.85
7 : 3	117.1	119.9	122.7	637.6	77.21	2 555.4	99.87
6 : 4	102.1	108.1	114.1	735.2	91.22	2 430.9	95.19
5 : 5	135.4	141.0	146.6	572.2	67.27	1 933.7	74.64

由表 3 可知,在甲醇:水比例为 9 : 1、8 : 2、7 : 3、5 : 5 时回收率均达到 120% 以上,不符合回收率的可行标准^[6],在甲醇:水比例为 6 : 4 时,回收率在 91.22% ~ 114.1% 之间,最接近 100%,回收率最好,即是黄曲霉毒素 B₁ 提取时,提取效果最好。因此宜采用甲醇:水比例为 6 : 4 的提取溶剂。

2.3 不同料液比对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响

不同的料液比对黄曲霉毒素提取有不同影响,选择甲醇:水比例 6 : 4 为提取溶剂,按照“1.4.3”节方法进行 5 次重复试验,取其平均值。试验结果见图 2。

由图 2 可知,在料液比为 1 g : 5 mL 时,测得的黄曲霉毒

的影响。为了研究提取溶剂本身对 ELISA 的影响,比较不同溶剂的回收率。按照“1.4.1”节方法进行 5 次重复试验,取平均值。计算加标回收率,试验结果见表 2。

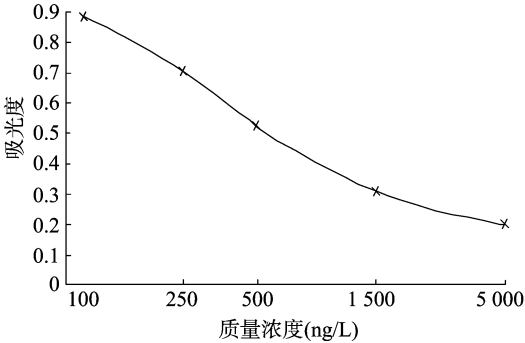


图 1 黄曲霉毒素 B₁ 标准曲线

表 2 空白溶剂加标回收试验结果

提取溶剂 (甲醇:水)	添加 100 ng/kg AFB ₁		1 000 ng/kg AFB ₁		2 000 ng/kg AFB ₁	
	检测值 (ng/kg)	回收率 (%)	检测值 (ng/kg)	回收率 (%)	检测值 (ng/kg)	回收率 (%)
9 : 1	81.4	81.4	1 178.1	117.8	1 933.7	96.7
8 : 2	82.5	82.5	1 196.3	119.6	1 893.3	94.7
7 : 3	88.7	88.7	967.1	96.7	1 804.3	90.2
6 : 4	109.2	109.2	877.1	87.7	1 780.2	89.0
5 : 5	114.2	114.2	924.5	92.5	2 372.2	118.6

由表 2 可知,直接用不同溶剂配比进行加标试验,不同提取方法的回收率在 81.4% ~ 119.6% 之间。根据回收率在 70% ~ 120% 之间可行,结果表明,采用上述提取溶剂,并用 ELISA 检测是可行的。

2.2 样品加标回收试验

苦荞麦麸中可能含有某些干扰物质,对提取效果会有一定干扰。为了研究样品中干扰物质对苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响,按照“1.4.2”节方法进行 5 次重复试验,取平均值,计算加标回收率,试验结果见表 3。

素 B₁ 的含量最高,表明在料液比为 1 g : 5 mL 时,提取液的提取效果最好。产生该变化趋势的原因可能是,当料液比大于 1 g : 5 mL 时,样品与溶剂的接触不够,不能充分溶解,导致黄曲霉毒素 B₁ 提取不完全;当料液比达到 1 g : 5 mL 时,正好达到最佳溶解状态;当料液比小于 1 g : 5 mL 时,黄曲霉毒素 B₁ 的溶解量减少,导致检测的含量减少,曲线呈下降趋势^[7]。

2.4 不同超声时间对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响

采用不同的超声时间对黄曲霉毒素 B₁ 进行提取,按照“1.4.4”节方法进行 5 次重复试验,取其平均值。试验结果

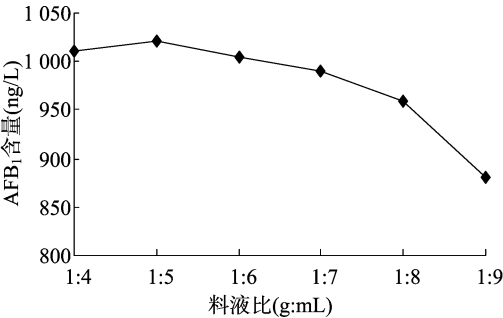


图2 不同料液比对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响

见图 3。

由图 3 可知,在超声时间为 15 min 时,提取的黄曲霉毒素 B₁ 含量最高,即是超声时间为 15 min 时,黄曲霉毒素 B₁ 提取效果最好。当超声时间低于 15 min 或高于 15 min 时,检测含量呈缓慢下降的趋势,即黄曲霉毒素 B₁ 提取含量减少。产生该变化趋势的原因可能是在超声时间低于 15 min 时,超声强度不够,苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 溶解不完全;当超声时间为 15 min 时,苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 提取达到较为完全的状态,含量最高,提取效果最好;当提取时间超过 15 min 时,由于苦荞麦在溶剂中浸泡时间过久,导致苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 有少量降解的现象^[8]。

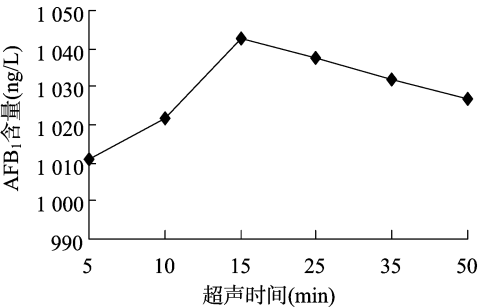


图3 不同超声时间对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响

2.5 不同超声振幅对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响

使用不同的超声振幅进行试验,按照“1.4.5”节方法进行 5 次重复试验,取其平均值,试验结果见图 4。

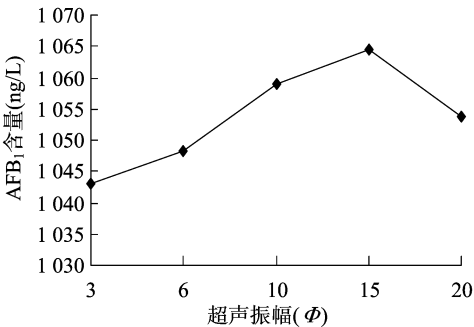


图4 不同超声振幅对黄曲霉毒素 B₁ 提取的影响

由图 4 可知,随着超声振幅的增加黄曲霉毒素 B₁ 的含量维持在 1 064.6 ~ 1 053.7 ng/L 之间,苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 含量相对稳定。超声振幅在 15 Φ 时,苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 含量最高,提取效果最好。产生该变化趋势的原因可能是当

超声振幅小于 15 Φ 时,苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 溶解不够充分,造成少量差异;当超声振幅大于 15 Φ 时,振幅过高造成黄曲霉毒素 B₁ 少量降解^[9]。

2.6 苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取正交试验

按照“1.4.6”节方法进行正交试验,试验结果如表 4。

表 4 苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 提取正交试验结果

序号	A:料液比	B:超声时间	C:超声振幅	AFB ₁ 含量 (ng/L)
1	A ₁	B ₁	C ₁	1 012.5
2	A ₁	B ₂	C ₂	1 037.2
3	A ₁	B ₃	C ₃	1 026.9
4	A ₂	B ₁	C ₂	1 041.2
5	A ₂	B ₂	C ₃	1 060.8
6	A ₂	B ₃	C ₁	1 038.1
7	A ₃	B ₁	C ₃	1 023.1
8	A ₃	B ₂	C ₁	1 051.3
9	A ₃	B ₃	C ₂	1 032.8
k ₁	1 025.5	1 025.6	1 034.0	
k ₂	1 046.7	1 049.8	1 037.1	
k ₃	1 035.7	1 032.6	1 036.9	
R	21.2	24.2	3.1	

由表 4 分析可知,3 种因素对黄曲霉毒素 B₁ 提取效果影响大小依次为 B > A > C,即超声时间 > 料液比 > 超声振幅。根据正交试验得到黄曲霉毒素 B₁ 含量,可以得出最优的提取条件为 A₂B₂C₂,即料液比为 1 g : 5 mL,超声时间为 15 min,超声振幅 15 Φ。

按照 A₂B₂C₂ 的最佳组合进行验证试验,同时进行 3 次平行试验。用 ELISA 检测后测得其含量为 1 065.1 ng/L。

3 结论

根据国标 GB/T 5009.23—2006《食品中黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂ 的测定》、GB/T 18979—2003《食品中黄曲霉毒素的测定》中选择适当的溶剂配比进行空白加标回收试验,回收率在 81.4% ~ 119.6% 之间,表明采用 ELISA 检测黄曲霉毒素 B₁ 是可行性。

正交试验结果表明,超声波提取苦荞麦麸中黄曲霉毒素 B₁ 的最佳工艺条件为溶剂配比 6 : 4,料液比为 1 g : 5 mL,超声时间为 15 min,超声振幅 15 Φ。在此条件下提取黄曲霉毒素 B₁ 的含量为 1 065.1 ng/L,高于同等条件下常规提取含量 1 055.0 ng/L。

此外,苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 提取方法中因内部提取溶剂及外部环境因素等要求复杂,影响提取因素多,在实际工作中还应做其他条件的优化,如溶剂、温度、湿度、pH 值等,因工作量大而时间有限,本试验仅对苦荞麦中黄曲霉毒素 B₁ 作初步的优化设计。

参考文献:

[1]程 静,高学军,刘晓飞,等. 反相高效液相色谱法检测牛初乳乳铁蛋白的方法研究[J]. 乳业科学与技术,2009,32(1):30 - 32,34.
[2]赵晓联,赵春城,钮伟民,等. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B₁

吴翠蓉,柴振林,杨 柳,等. SPME-GC-MS 测定山茶油掺假[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):305-308.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.110

SPME-GC-MS 测定山茶油掺假

吴翠蓉,柴振林,杨 柳,朱杰丽

(浙江省林产质量检测站,浙江杭州 310023)

摘要:利用固相微萃取(solid-phase microextraction,SPME)-气质联用技术,分离得到 50 种山茶油挥发性成分,筛选出区别于菜籽油、大豆油、玉米油、棉籽油的特征挥发性组分 Z,E-2,13-十八碳二烯-1-醇。将菜籽油、大豆油、玉米油、棉籽油 4 种植物油分别掺入山茶油,建立掺杂油中山茶油含量与特征组分含量变化回归方程,相关系数均在 0.99 以上,方法准确率较高。

关键词:固相微萃取;山茶油;挥发性成分;掺假测定

中图分类号: O652.1;O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0305-04

山茶油,是一种高级食用油,富含甾醇、生育酚、角鲨烯、山茶苷、山茶皂苷等特定生理活性物质,对提高人体抗病能力,防治心血管硬化性疾病,降低患肿瘤机会,增加肠胃吸收功能,促进内分泌腺体激素分泌,防治神经功能下降,延缓衰老等方面有明显功效^[1-3],被益为“东方橄榄油”、“油王”及“油中珍品”等。山茶油中一般不含芥酸、山萘酸等难以消化吸收的组分,也不含黄曲霉毒素,是一种绿色优质食用油^[4-5]。然而目前食用油市场鱼龙混杂现象屡有发生,山茶油中掺入成本低廉的菜籽油、大豆油,甚至是对人体有害的棉籽油、桐油等,严重影响了消费者的健康和利益。为维护消费者利益,保护消费者健康,建立一种可靠的山茶油掺杂测定方法非常必要。

固相微萃取(solid-phase microextraction,SPME)分析技术在油脂分析领域是 1 项快速、稳定、高效的新型检测技术,具有灵敏、快速、高重现性等特点,萃取条件温和、过程环保,减少了传统方法如溶剂萃取等引起的二次污染,在分析微量、痕量组分中有着无可比拟的优势^[6-7]。SPME 技术已广泛应用于环境、生物、工业、食品、临床医学等诸多领域^[8-9]。近几

年来,随着 SPME 技术与多维色谱或电子鼻等仪器联用技术的发展,越来越多国内外研究人员利用 SPME 预处理技术来分析植物油中多种化合物,如采用 SPME 技术分析食用植物油中溶剂残留^[10-11]、风味成分^[12-16]、有机污染物多环芳烃 PAHs^[17] 和塑化剂^[18] 的检测等。

本研究采用固相微萃取-气质联用法测定山茶油、大豆油、菜籽油、玉米油等食用油的挥发性成分,寻找到山茶油的特异性挥发性成分,建立掺杂油中山茶油含量与特异挥发性组分相对含量的变化方程,以测定山茶油的纯度。

1 材料与方

1.1 材料与仪器

山茶油、菜籽油、玉米油、棉籽油、大豆油。

IKA RH basic 1 型磁力加热搅拌器、SPME 手动进样手柄,美国 Supelco 公司;100 μm 聚二甲基硅氧烷(PDMS);20 mL 带有特氟龙瓶垫的透明样品瓶,上海安谱科学仪器有限公司;7890A/5975C 气相色谱质谱联用仪,美国安捷伦公司。

1.2 仪器条件

气相条件:使用 HP-5MS 毛细色谱柱(30 m \times 250 μm \times 0.25 μm),固定相为 5% 联苯-95% 二甲基硅氧烷,为非极性毛细管柱。进样口温度为 260 $^{\circ}\text{C}$,采用不分流进样。初始炉温为 50 $^{\circ}\text{C}$,保持 5 min 后以 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升到 250 $^{\circ}\text{C}$,保持 20 min。

质谱条件:传输线温度为 280 $^{\circ}\text{C}$;采集模式:全扫描;离子源温度:230 $^{\circ}\text{C}$;四极杆:160 $^{\circ}\text{C}$ 。分离化合物的鉴定经计算机

收稿日期:2014-06-05

基金项目:浙江省农产品安全标准与检测技术重点创新团队项目(编号:2010R50028)。

作者简介:吴翠蓉(1985—),女,江西余干人,硕士,工程师,主要从事森林食品安全检测与研究。Tel:(0571)87757245;E-mail:wucrong@126.com。

通信作者:柴振林,硕士,研究员,主要从事森林食品质量安全检测与研究。Tel:(0571)87798115;E-mail:zhichai@163.com。

误差分析[J]. 中国卫生检验杂志,2001,11(4):473-474.

[3] 张海涛,陆廷瑾,蒋 飞,等. ELISA 法检测玉米中 AFB₁ 样品提取方法改进的研究[J]. 河南工业大学学报:自然科学版,2011,32(5):58-60.

[4] 何建中. 459 份花生油中黄曲霉毒素 B₁ 检测结果分析[J]. 应用预防医学,2010,31(8):127.

[5] 王 磊. 黄曲霉毒素 B₁ 免疫学快速检测技术研究[D]. 洛阳:河南科技大学,2001.

[6] 孙秀兰,赵晓联,汤 坚. 大米中黄曲霉毒素 B₁ 的提取方法优化[J]. 食品科学,2004,25(7):128-131.

[7] 刘媛婷. 霉菌毒素吸附剂对黄曲霉毒素 B₁ 吸附特性及效果研究[D]. 雅安:四川农业大学,2011.

[8] 陈志娟,刘 阳,邢福国,等. 氨气熏蒸降解玉米中黄曲霉毒素 B₁ 的条件优化[J]. 食品科学,2010,31(8):33-37.

[9] 陈宪明,张坊秋,陈 惠,等. 变黄米污染黄曲霉毒素 B₁ 规律的研究[J]. 粮食储藏,1985,23(3):32-40.