

食醋中黄曲霉毒素检测的胶体金免疫
层析试纸条定量技术研究贺亚萍^{1,6}, 马良^{1,6}, 李培武^{1,2,3,4,5*}

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉, 430062; 2. 农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 湖北 武汉, 430062; 3. 农业部生物毒素检测重点实验室, 湖北 武汉, 430062; 4. 农业部油料产品质量安全风险评估实验室(武汉), 湖北 武汉, 430062; 5. 农业部油料及制品质量监督检验测试中心, 湖北 武汉, 430062; 6. 西南大学食品科学学院, 重庆, 400716)

摘要:建立了食醋中黄曲霉毒素检测的前处理方法,并实现了食醋中黄曲霉毒素 B₁ 免疫层析试纸条定量检测。分析了提取溶剂、水添加比例对黄曲霉毒素 B₁ 提取率和试纸条显色条带的影响,最终选择两者比例为 1:2。在此条件下,建立了定量检测标准曲线,该检测方法同批次和不同批次的相对标准偏差分别为:6.82%~8.1%、6.65%~9.76%,日间、日内的相对标准偏差分别为:5.88%~6.73%、5.04%~8.02%。实际阳性样品的检测结果与高效液相结果一致,此方法精密度和稳定性良好。

关键词:黄曲霉毒素 B₁; 胶体金免疫层析试纸条; 食用醋

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFTs)是由黄曲霉菌、寄生曲霉菌及集蜂曲霉等真菌产生的一类次生代谢产物,常存在于发霉的花生、玉米和小麦等粮油制品中^[1],是一类致癌力和毒性极强的真菌毒素,对人类生命健康构成很大的威胁^[2~4]。常见的黄曲霉毒素主要有:黄曲霉毒素 B₁、B₂、G₁、G₂,其中,黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)致癌性和毒性最强,被国际癌症研究机构(IARC)划为 I 类致癌物^[5~7],可同时诱发多种癌症,且具致畸、致突变性,对消费者的饮食安全和生命健康危害极大。AFB₁ 污染受到世界范围内的高度重视,各国政府都制定了十分严格的限量标准,我国规定食醋中 AFB₁ 的限量为 $\leq 5.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。2002 年我国质监总局规定,针对大米、食用植物油、酱油、醋五类食品实行“市场准入”制度,AFB₁ 更是必检项目之一^[9,10],鉴于此,国内许多检测机构都纷纷开展农产品、食品以及饲料中 AFB₁ 的检测方法的研究。

胶体金免疫层析技术是从 20 世纪 80 年代发展起来的一项新技术,具有操作快速、灵敏、抗基质干扰强等优点^[11],相比于高效液相色谱法^[12]、酶联免疫吸附法^[13]及薄层色谱法^[14],该方法前处理简单、抗基质干扰强、操作快速灵敏、无需借助大型分析仪

器,适合现场快速检测和筛查^[15~17]。但此方法判定结果一般是通过肉眼观察显色条带颜色的深浅,故局限于定性和半定量分析^[18]。中国农业科学院油料作物研究所自主研发的基于免疫层析试纸条的黄曲霉毒素单光谱成像快速定量技术可以实现对黄曲霉毒素的快速定量检测。其原理是采用胶体金免疫层析试纸条作为一级传感器,利用其上抗体与抗原结合反应测试区(T 线)显色变化的原理,采用单光谱成像将图像信息转换为灰度信息,利用计算机视觉以及现代信息处理技术对图像进行处理分析,来获取 T 线和 C 线的灰度信息,通过建立黄曲霉毒素标准浓度和灰度信息之间的关系,从而实现对黄曲霉毒素的定量分析。本研究探索了适用于胶体金免疫层析技术的食醋中 AFB₁ 的前处理方法、通过优化 AFB₁ 提取参数,建立了食醋中 AFB₁ 的快速定量检测方法,该方法具有灵敏度高、快速、经济适用等优点,适于现场快速检测。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

食醋样品购于武汉超市;胶体金免疫层析试纸条,实验室自制。

基金项目:国家科技支撑计划(2012BAB19B09);公益性农业行业专项(201203094);国家自然科学基金(31171702)

作者简介:贺亚萍(1987-),女,陕西榆林人,硕士研究生,主要从事食品工程研究,E-mail:luresy@sina.cn

* 通讯作者:李培武(1961-),男,山东成武人,二级研究员,博士,博士生导师,研究方向为农产品质量标准与检测技术,E-mail:peiwuli@oil-crops.cn

黄曲霉毒素标准品(美国 Sigma 公司),分析级二氯甲烷(德国 CNW 科技公司),分析级甲醇(德国 CNW 科技公司),分析级乙腈(德国 CNW 科技公司),分析级三氯甲烷(德国 CNW 科技公司),超纯水。

DT211 型黄曲霉毒素单光谱成像速测仪(中国农业科学院油料作物研究所)。

1.2 提取溶剂的选择

黄曲霉毒素易溶于二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇及乙腈等溶液,选择空白食醋样品和加标浓度为5.0 ng/mL 的食醋样品,分别用四种试剂(二氯甲烷、三氯甲烷、甲醇及乙腈)进行提取,具体提取方法:1mL 样品中分别加入4mL 试剂,振荡,静置,点样,10min 后,观察试纸条 T、C 线,并用单光谱成像速测仪进行检测,选择能使试纸条显色清晰、无背景色的试剂作为最佳提取溶剂。

1.3 试纸条的精密度评价

取空白的食用醋样品,添加系列浓度 AFB₁ 标准品使终浓度为 1.25、2.5、5.0ng/mL 的。每个浓度在同一天重复测定三次,并在连续六天时间内进行测定(1、3、7d),对日间和日内重复性进行评价。

1.4 试纸条的稳定性评价

取上述空白的的食用醋样品,添加 AFB₁ 标准品使浓度分别为 5.0ng/mL 和 2.5ng/mL,处理方法同上,每个浓度重复三次,用同一批次和不同批次试纸条分别检测。

1.5 定量标准曲线的建立

配制一系列浓度的 AFB₁ 标准品,分别向食醋样品中添加使终浓度分别为 0、0.3125、0.625、1.25、2.5、5.0ng/mL,前处理方法上,从样品提取液

中各取 100 μ L 不同浓度的标准品溶液至点样孔处,10min 后,用单光谱成像速测仪检测,图像经软件处理后会显示 T 线和 C 线的灰度值。每个浓度 3 次重复,以 AFB₁ 标准品的浓度为横坐标,以 T 线灰度值为纵坐标,建立标准曲线。

1.6 实际阳性样品检测与 ELISA 结果比对

检测食用醋实际样品,处理方法同上,提取液一部分用于试纸条定量检测,另一部分用于间接酶联免疫吸附法检测,将两者结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 样品前处理优化

2.1.1 提取溶剂的选择 在使用二氯甲烷进行提取时,提取后静置分层,黄曲霉毒素转入二氯甲烷层,避免了样品颜色和酸碱度对检测结果准确性的影响,且二氯甲烷对操作人员的伤害比较轻,而使用甲醇和乙腈溶液不分层,会对试纸条显色有颜色影响,三氯甲烷对人体伤害太大,因此选取二氯甲烷作为提取溶剂。

2.1.2 提取溶剂的添加量 各添加量如表 1, HPLC 结果显示不同二氯甲烷添加量的回收率在 81%~110% 之间,各个添加量提取效果良好。1 号至 5 号空白样品分别添加 AFB₁ 标准溶液使终浓度为 2.5ng/mL,进行免疫层析试纸条定量。从表 2 知,随着提取溶剂添加量的增加,T 线灰度值逐渐下降;而从图 1 知,提取溶剂添加量 \leq 2mL 时,AFB₁ 浓度为 5ng/mL 的试纸条检测线完全消线,1 号与 2 号相比,AFB₁ 浓度为 2ng/mL 的试纸条检测线颜色较浅,即灵敏度较高。因此选择 1 号,即二氯甲烷的添加量为 1mL。

表 1 提取溶剂的添加量

编号	样品量/mL	水/mL	二氯甲烷/mL	添加浓度/(ng/mL)	液相结果/(ng/mL)	回收率/%
1	1	1	1	23.6	19.18	81.29
2	1	1	2	23.6	25.89	109.7
3	1	1	3	23.6	23.96	101.52
4	1	1	4	23.6	24.82	105.16
5	1	1	5	23.6	25.74	109.08

表 2 提取溶剂的添加量对 T 值的影响

编号	2ng/mL(灰度值)				5ng/mL(灰度值)			
	T 线	T 线	T 线	平均值 T 线	T 线	T 线	T 线	平均值 T 线
1	81.85	86.53	84.22	84.20	96.44	98.23	95.38	96.68
2	79.72	76.35	80.22	78.76	94.23	90.88	94.28	93.13
3	62.46	73.92	70.21	68.86	86.11	80.26	88.38	84.91
4	58.22	65.72	55.80	59.91	72.17	76.78	69.66	72.87
5	58.64	50.39	47.94	52.32	55.69	60.49	58.39	58.19



图1 提取溶剂的添加量

2.1.3 水的添加量选择 水的添加量如下表3, HPLC 结果的回收率在 93% ~ 108% 之间,说明水的添加量不影响样品的加标回收率。试纸条层析结果

表3 水的添加量

编号	样品量/mL	水/mL	二氯甲烷/mL	添加浓度/(ng/mL)	液相结果/(ng/mL)	回收率/%
1	1	0	1	11.8	12.59	106.67
2	1	1	1	11.8	12.65	107.18
3	1	2	1	11.8	12.34	104.57
4	1	3	1	11.8	10.99	93.20

表4 水的添加量对 T 值的影响

编号	空白 (灰度值)				5ng/mL (灰度值)			
	T 线	T 线	T 线	平均值 T 线	T 线	T 线	T 线	平均值 T 线
1	64.24	75.53	69.47	69.75	83.35	73.98	88.42	81.92
2	61.85	70.70	63.57	65.38	89.06	100.39	94.23	94.57
3	56.16	54.66	50.32	53.71	101.31	95.84	98.34	98.50
4	53.87	50.38	59.24	54.50	96.29	97.68	92.48	95.49

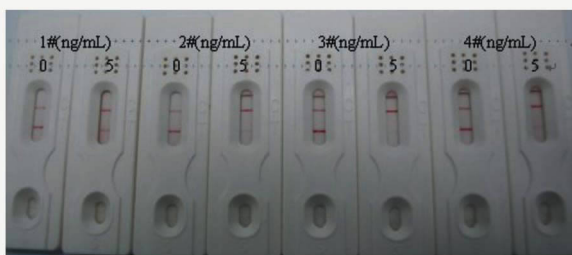
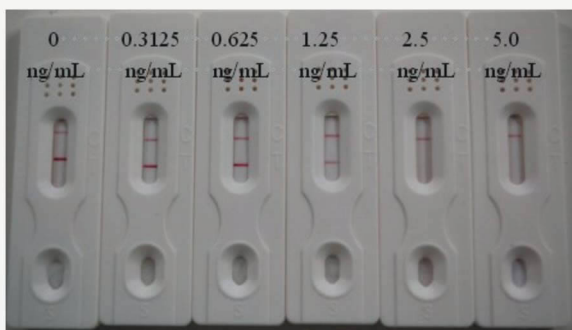


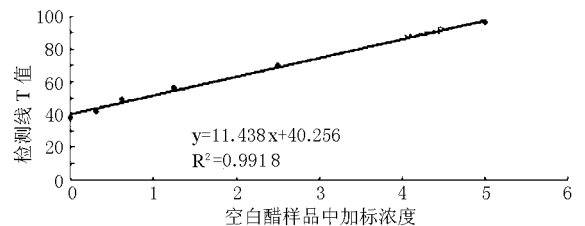
图2 水的添加量

2.2 标准曲线的建立

将各个浓度的醋样品提取液滴加到检测卡上。结果如图3所示,样品中添加 AFB₁ 浓度为 2.5ng/mL 时,试纸条检测线完全消线。再用单光谱成像速测仪检测 T 线灰度值,绘制标准曲线如图4,回归方程为 $y = 11.438x + 40.256$, 相关系数 $R^2 = 0.9918$, 线性关系良好。

图3 AFB₁ 试纸条的检测限

如图2所示,加标浓度为 5ng/mL 时,3、4号与1、2号相比检测线完全消失且无背景色;加标浓度为 0ng/mL 时,3号与4号相比检测线颜色更亮,基质效应不明显;如表4所示,随着水的添加量的增加,空白样品和阳性样品的检测线灰度值也逐渐降低,但在水的添加量为 2mL 时,空白和阳性样品检测线灰度值分别为最低和最高,检测限范围宽,与图2所示一致。因此,选择水的添加量为 2mL。

图4 醋黄曲霉毒素 B₁ 免疫层析快速定量标准曲线

2.3 检测方法的精密度

试验结果如表5,该检测方法日间、日内的相对标准偏差分别为:5.88% ~ 6.73%、5.04% ~ 8.02%,回收率分别为:95.36% ~ 110.33%、97.89% ~ 106.61%,说明此方法精密度良好。

2.4 稳定性

试验结果如表6和表7,该检测方法同批次和不同批次的相对标准偏差分别为:6.82% ~ 8.1%、6.65% ~ 9.76%,回收率分别为:92.72% ~ 113.4%、94.93% ~ 100%,同一批次和不同批次试纸条检测结果一致,此检测方法结果可靠。

2.5 实际阳性样品检测与 ELISA 结果比对

测食醋实际样品,处理方法同上,提取液一部分用于试纸条定量检测,另一部分用于 ELISA 法检测,将两者结果进行比较。从表8可知,单光谱成像速测仪检测结果与 ELISA 法结果一致,说明此方法结果可靠。

表5 醋样品中 AFB₁ 回收率实验

理论值/(ng/mL)	日内(n=3)			日间(n=3)		
	测定值/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%	测定值/(ng/mL)	回收率/%	RSD/%
1.25	1.23	98.37	6.14	1.38	110.33	6.73
2.5	2.67	106.61	8.02	2.64	105.79	5.88
5.0	4.89	97.89	5.04	4.77	95.36	5.98

表6 醋样品中同一黄曲霉毒素浓度下同一批次试纸条检测结果重复性

毒素浓度/(ng/mL)	速测仪结果/(ng/mL)			平均值/(ng/mL)	SD	RSD/%	回收率/%
2.5	2.6	2.86	3.05	2.84	0.23	8.1	113.4
5.0	4.27	4.82	4.82	4.64	0.32	6.82	92.72

表7 醋样品中同一黄曲霉毒素浓度下不同批次试纸条检测结果重复性

毒素浓度/(ng/mL)	速测仪结果/(ng/mL)			平均值/(ng/mL)	SD	RSD/%	回收率/%
2.5	2.23	2.58	2.7	2.51	0.24	9.76	100
5.0	4.4	5.02	4.82	4.75	0.32	6.65	94.93

表8 AFB₁ 试纸条快速定量检测技术与 ELISA 对比

样品	ELISA	单光谱成像速测仪	
	实测值	实测值	RSD/%
食醋1	1.12	1.44	13.23
食醋2	0.85	0.69	8.75
食醋3	0.32	0.11	14.23
食醋4	0.67	0.86	12.29
食醋5	1.02	1.37	10.46
食醋6	1.47	1.94	8.37
食醋7	0.24	0	12.62
食醋8	0.43	0.08	14.72
食醋9	1.83	2.25	6.93
食醋10	3.49	4.07	5.84

3 结论

本研究采用中国农业科学院油料作物研究所自主研发的黄曲霉毒素单光谱成像速测仪进行黄曲霉毒素 B₁ 的快速定量检测,通过对食醋样品黄曲霉毒素提取条件的摸索,建立了适合于速测技术的前处理方法,通过黄曲霉毒素单光谱成像速测仪检测试纸条,直接读取检测结果。同一批次和不同批次各重复测定 3 次,RSD 在 6.65%~9.76% 之间;日间和日内各重复测定 3 次,RSD 在 5.04%~8.02% 之间。实际阳性样品检测结果与 ELISA 法结果一致。整个方法可在 10min 内完成,满足现场快速检测的需求,对加强食品安全监管、保障食品质量安全具有重要意义。

参考文献:

[1] 劳文艳,林素珍. 黄曲霉毒素对食品的污染及危害[J]. 北京联合大学学报:自然科学版,2011,25(1): 64-69.

[2] Banu N, Muthumary J. Taxol as chemical detoxificant of

aflatoxin produced by *Aspergillus flavus* isolated from sunflower seed[J]. Health,2010,2(7):789-795.

- [3] 张艺兵,鲍蕾,褚庆华. 农产品中真菌毒素的检测分析[M]. 北京:化学工业出版社,2006.5-7.
- [4] 李培武,马良,杨金娥. 粮油产品黄曲霉毒素 B₁ 检测技术研究进展[J]. 中国油料作物学报,2005(6):77-81.
- [5] Han Z, Zheng Y, Luan L, et al. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ and M₂ in traditional Chinese medicines[J]. Analytica Chimica Acta,2010,664(23):165-171.
- [6] Mendez-Albores A, Arambula-Villa G, Loarca-Pina M G, et al. Safety and efficacy evaluation of aqueous citric acid to degrade B-aflatoxins in maize[J]. Food and Chemical Toxicology,2005,43(2):233-238.
- [7] Liu R, Chang M, Jin Q, et al. Degradation of aflatoxin B₁ in aqueous medium through UV irradiation[J]. European Food Research and Technology, 2011, 233(6): 1007-1012.
- [8] GB 2761-2011 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S].
- [9] 鲁长豪. 食品中黄曲霉毒素的测定[A]. 食品检验[M]. 成都:四川科学技术出版社,1978.108-114.
- [10] 李秀芳. 黄曲霉毒素 B₁ 抗体的制备研究[J]. 卫生研究,1989,18(4):1-4.
- [11] Beggs M, M Novotny, Sampedro S. A self performing chromatographic immunoassay for the qualitative determination of human chorionic-gonadotrophin (HCG) in urine and serum[J]. Clinical Chemistry, 1990, 36: 1084-1085.
- [12] 倪梅林,谢东华,曹苏仙. 高效液相色谱法与快速酶免疫法检测食品中黄曲霉毒素的比较[J]. 江苏农业

- 科学,2006,(5):167-169.
- [13] 谢广有. 黄曲霉毒素检测方法进展[J]. 职业与健康, 2011,27(6):694-695.
- [14] 杨超. 四种真菌毒素检测方法的建立以及赭曲霉毒素A脱除方法的初步研究[D]. 青岛:中国海洋大学,2009.2-5.
- [15] Li X, Zhang G, Deng R, et al. Development of rapid immunoassays for the detection of ractopamine in swine urine[J]. Food Additives and Contaminants, 2010, 27(8):1096-1103.
- [16] Zhang M Z, Wang M Z, Chen Z L, et al. Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009, 395(8):2591-2599.
- [17] 张道宏,李培武,张奇,等. 污染粮油食品的主要真菌毒素及胶体金免疫层析技术在快速检测中的应用[J]. 中国油料作物学报,2010,32(4):577-582.
- [18] 何小维,赵喜红,刘晓云,等. 胶体金快速检测技术的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2007,23(1):86-88.