

小麦和玉米中生物毒素免疫层析快速定量方法的验证及与国家标准方法的比较*

李为喜 张妍 孙娟 王步军

(中国农业科学院作物科学研究所, 农业部谷物质量监督检验测试中心, 农业部谷物产品质量安全风险评价实验室(北京), 北京 100081)

摘要: 本文验证了应用免疫层析技术测定小麦、玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)和赭曲霉毒素A(OTA) 3种生物毒素的快速、定量测定方法。空白样品的添加回收试验结果为: 小麦中DON、ZEN和OTA的回收率分别为85.1%~92.2%、82.0%~89.2%和76.8%~87.9%; 玉米中DON、ZEN和OTA的回收率分别为88.0%~92.7%、81.1%~85.6%和80.0%~90.9%。与国家标准检测参考值相比, 免疫层析快速法测定DON的百分比在87.0%~106.9%; ZEN的百分比为76.5%~120.4%; OTA的百分比为79.2%~117.8%。结果表明, 免疫层析快速定量测定法满足了一般化学分析方法的要求, 此外, 该方法具备易于操作、仪器便于携带、操作快速、检测量化、灵敏准确、重现性好等优点, 不仅适用于小麦、玉米农产品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素A等生物毒素的现场检测, 而且非常适用于我国县级、乡镇级农产品质量安全检测站开展小麦和玉米生物毒素的快速定性、定量筛查工作。

关键词: 小麦; 玉米; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇; 玉米赤霉烯酮; 赭曲霉毒素A; 免疫层析快速定量法

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)和赭曲霉毒素A(Ochratoxin A, OTA), 是由镰刀菌、赭曲霉菌等真菌分泌产生的代谢产物, 主要污染小麦、玉米等谷物产品。研究表明, 食用DON污染的食物可导致人畜呕吐、腹泻等疾病^[1~2], ZEN具有一定类雌激素作用, 可能与性早熟和宫颈病变有关^[3], OTA可导致人和动物肾癌, 已被国际癌症研究所列为人类二级致癌物^[4]。

近年来, 小麦、玉米中DON、ZEN、OTA的污染问题受到广泛关注, 对其监管受到广泛重视。世界上许多国家、国际和地区性组织如食品法典委员会、欧盟先后制定了此3种毒素限量标准^[5~7]。我国于2011年4月修订并颁布了食品安全国家标准, 规定了DON、ZEN和OTA在小麦和玉米中的最高限量分别为1000 μg/kg、60 μg/kg和5 μg/kg^[8]。

目前检测小麦、玉米等食用农产品中的DON、

ZEN和OTA的理化方法有薄层色谱法(TLC)、液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)和酶联免疫吸附测定(ELISA)等。我国制定的DON、ZEN和OTA检测国家标准^[9~11]规定采用免疫亲和柱净化, 用高效液相色谱仪(HPLC)或荧光分光光度计进行定量检测。生物毒素国家标准测定方法的共同点是: 样品前处理过程中亲和柱净化时间长, 成本高; 最后定量过程需要HPLC精密仪器, 仪器昂贵, 操作过程复杂、时间长。这些方法无法满足现场检测的需要, 同时不易被县、乡等基层小型实验室的检测人员所掌握和应用。近年来, 国内外对生物毒素快速测定方法的研究方兴未艾, 国内已有报道应用免疫层析法快速检测植物油中的黄曲霉毒素^[12]及玉米赤霉烯酮^[13]等方面的研究。本研究旨在验证免疫层析法快速、定量检测小麦及玉米中DON、ZEN和OTA的可行性和适用性, 并将该方法与现行的国家标准方法进行了比

* 基金项目: 2012年全国谷物产品质量安全普查和风险监测项目资助。

作者简介: 李为喜(1975—), 副研究员, 从事谷物产品质量安全检测和风险评估工作。E-mail: liweixi@caas.cn。
王步军(1960—), 研究员, 从事农产品质量与食品安全工作。E-mail: wangbujun@caas.cn (通讯作者)。

对, 力图为开展小麦、玉米农产品现场检测, 同时也为县、乡镇级农产品质量安全检测站等基层实验室开展生物毒素检测找到一种科学、简便、适用的检测方法。

一、试验材料和方法

(一) 试剂和材料 iCheck 脱氧雪腐镰刀菌烯醇定量快检卡: 由胶体金标记脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗体的微孔、喷涂有脱氧雪腐镰刀菌烯醇抗原测定线和鼠二抗参考线的测试卡和稀释缓冲液组成(北京中检维康技术有限公司)。iCheck 玉米赤霉烯酮定量快检卡: 由胶体金标记玉米赤霉烯酮抗体的微孔、喷涂有玉米赤霉烯酮抗原测定线和鼠二抗参考线的测试卡和稀释缓冲液组成(北京中检维康技术有限公司)。iCheck 赭曲霉毒素 A 定量快检卡: 由胶体金标记赭曲霉毒素 A 抗体的微孔、喷涂有赭曲霉毒素 A 抗原测定线和鼠二抗参考线的测试卡和稀释缓冲液组成(北京中检维康技术有限公司)。

甲醇: 色谱纯, 美国 FISHER 公司; 1.5 μm 玻璃纤维滤纸: 美国 VICAM 公司。脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素 A 免疫亲和柱: 美国 VICAM 公司。

小麦和玉米为市场购得的粮食。

(二) 仪器与设备 iCheck 食品安全定量快检仪: I 型, 北京中检维康技术有限公司; 高效液相色谱仪配紫外和荧光检测器: LC-20AB, 岛津公司。

(三) 试验方法

1. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定及验证。(1) 样品提取: 称取 5.0g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 25.0 mL 纯水, 用多功能旋转混合器混合 10 min (或者用手剧烈振荡 3min), 用中速定性滤纸过滤, 收集全部滤液。(2) 免疫层析法快速定量检测: 取滤液 30 μL 于抗体微孔中, 加入 120 μL 稀释缓冲液, 用移液器吸打 5 次混匀, 取 100 μL 加入到快检卡样品孔中。室温放置 10 min 后, 将快检卡插入定量快检仪中读数, 即为样品实际浓度。该方法的定量限为 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围为 500~5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 当测定值为 5 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 需要将提取滤液用纯水进行一定比例的稀释再重新测定。(3) 采用国家标准方法检测: 取样品提取中所得滤液 10 mL, 用 40mL 纯水稀释, 按照 GB/T 23503-2009 规定进行检测和数据处理。

2. 玉米赤霉烯酮测定及验证。(1) 样品提取: 称取 5.0 g 样品于 50 mL 离心管中, 加入 25.0 mL

提取液甲醇+水 (70+30, V/V), 用多功能旋转混合器混合 10 min (或者用手剧烈振荡 3 min), 用中速定性滤纸过滤, 收集全部滤液。(2) 免疫层析法快速定量检测: 前期操作方法同 DON 的试验方法。该方法的定量限为 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围为 30~500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 当测定值为 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 需要将提取滤液用甲醇+水 (70+30, V/V) 进行一定比例的稀释再重新测定。(3) 采用国家标准方法检测: 取样品提取所得滤液 10 mL, 用 40 mL 甲醇+水 (70+30, V/V) 稀释, 按照 GB/T 5009.209-2008 规定进行检测和数据处理。

3. 赭曲霉毒素 A 测定及验证。(1) 样品的提取: 方法同玉米赤霉烯酮测定及验证中的样品提取方法。(2) 免疫层析法快速定量检测: 前期操作方法同 DON 的试验方法。该方法的定量限为 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围为 2.5~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 当测定值为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 需要将提取滤液用甲醇+水 (70+30, V/V) 进行一定比例的稀释再重新测定。(3) 采用国家标准方法检测: 取样品提取中所得滤液 10mL, 用 40mL 甲醇+水 (70+30, V/V) 稀释, 按照 GB/T 23502-2009 规定进行检测和数据处理。

二、结果和讨论

(一) DON、ZEN 和 OTA 测定方法的准确性和重复性试验 在空白小麦、玉米样品中分别添加不同浓度水平的 DON、ZEN 和 OTA, 按照免疫层析快速定量检测法分别进行检测, 以验证方法的准确性和重复性, 在添加水平选择的过程中充分考虑到我国现有标准中 DON、ZEN 和 OTA 的限量值, 以及快速检测方法的定量限。回收试验结果见表 1。

从表 1 可以看出, 小麦中 DON 在 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率分别为 87.2%、92.2%和 85.1%, 变异系数小于 14.7%; ZEN 在 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率分别为 84.2%、82.0%和 89.2%, 变异系数小于 9.8%; OTA 在 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率分别为 76.8%、82.0%和 87.9%, 变异系数小于 12.8%。

玉米中 DON 在 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率分别为 90.9%、88.0%和 92.7%, 变异系数小于 9.7%; ZEN 在 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率分别为 81.1%、84.5%和 85.6%, 变异系数小于 14.0%; OTA 在 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和

表 1 不同添加水平的 DON、ZEN 和 OTA 回收率试验结果

DON 添加水平	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$		1 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$		3 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	小麦	玉米	小麦	玉米	小麦	玉米
DON ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	410.7	488.9	1 097.3	885.4	2 234.2	2 689.7
	462.2	415.2	935.8	1 024.9	3 130.2	2 943.5
	436.5	426.4	806.5	846.5	2 247.8	2 446.6
	421.3	468.7	893.4	825.1	2 445.4	3 044.3
	449.8	472.5	879.2	816.2	2 705.7	2 784.7
DON 平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	436.1	454.3	922.4	879.6	2 552.7	2 781.8
DON 平均回收率%	87.2	90.9	92.2	88.0	85.1	92.7
DON 变异系数%	4.8	7.0	11.7	9.7	14.7	8.4
ZEN 添加水平	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$		60 $\mu\text{g}/\text{kg}$		300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	小麦	玉米	小麦	玉米	小麦	玉米
ZEN ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	24.8	29.6	49.6	55.1	273.8	257.9
	28.5	22.9	45.3	45.8	266.5	263.5
	25.1	20.6	55.1	48.6	292.1	232.7
	26.2	25.4	52.4	55.2	247.3	277.8
	21.7	23.2	43.7	48.9	258.6	252.4
ZEN 平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	25.3	24.3	49.2	50.7	267.7	256.9
ZEN 平均回收率%	84.2	81.1	82.0	84.5	89.2	85.6
ZEN 变异系数%	9.8	14.0	9.7	8.3	6.3	6.4
OTA 添加水平	2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		5 $\mu\text{g}/\text{kg}$		15 $\mu\text{g}/\text{kg}$	
	小麦	玉米	小麦	玉米	小麦	玉米
OTA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.8	1.9	4.5	3.8	12.3	16.6
	1.7	2	3.9	4.2	11.8	12.4
	2.2	2.3	5.1	4.1	13.5	13.5
	1.9	2.1	3.8	5.2	12.6	11.3
	2.0	1.7	4.2	4.6	15.7	14.4
OTA 平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.9	2.0	4.1	4.4	13.2	13.6
OTA 平均回收率%	76.8	80.0	82.0	87.6	87.9	90.9
OTA 变异系数%	10.0	11.2	12.8	12.3	11.7	14.8

15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个添加水平的平均回收率分别为 80.0%、87.6%和 90.9%，变异系数小于 14.8%。

由此可见，小麦及玉米中 DON、ZEN 和 OTA 快速测定的准确性和重复性试验结果良好，满足一般分析方法学的规定。

(二) 快速测定法与国家标准方法的对比试验 本文选取含有 DON 和 ZEN 的小麦和玉米实际样品，分别采用免疫层析快速测定法和国家标准方法^[9~11]对样品进行测定，将国家标准方法的测定值作为参考值，由此进一步验证方法的科学性和适用性。选取小麦、玉米市售样品各 3 个，按照国家标准方法和快速测定方法对小麦及玉米实际样品进行检测。由于未采集到含有 OTA 的小麦及玉米实际样品，因此采用添加样品进行方法对比试

验，两种方法的比对结果见表 2。

以国家标准方法测定平均值作为参考值，运用免疫层析快速法获得的测定平均值与参考值进行比较，发现两种不同方法测定 3 种生物毒素的平均值的相对相差在 3.1%~26.6%之间（见表 2），说明两种方法的测定均值离散程度在合理范围内。如果以国家标准方法测定平均值作为参考值，以免疫层析快速法获得的测定平均值与参考值相除，计算得“百分比”，该结果可以更直观地说明免疫层析快速测定结果的偏离程度。由表 2 可以看出，与参考值相比，免疫层析快速法测定 DON 的百分比在 87.0%~106.9%；ZEN 的百分比在 76.5%~120.4%；OTA 的百分比在 79.2%~117.8%。对比结果表明，免疫层析快速法与国家标准方法偏离程度小。

表 2 免疫层析快速测定法与国家标准方法测定结果比较

样品	毒素	国家标准方法测定 (μg/kg)			免疫层析快速法测定 (μg/kg)			平均值的 相对相差%	平均值 百分比%
		测定值 1	测定值 2	平均值	测定值 1	测定值 2	平均值		
小麦 1 号样	DON	3 072.4	3 148.5	3 110.4	3 352.1	3 208.3	3 280.2	5.3	105.5
	ZEN	42.6	45.7	44.1	55.4	50.8	53.1	18.5	120.4
小麦 2 号样	DON	2 473.3	2 209.7	2 341.5	2 262.9	2 599.1	2 431.0	3.8	103.8
	ZEN	120.5	108.3	114.4	97.3	94.37	95.8	17.7	83.8
小麦 3 号样	DON	1 007.8	1 171.0	1 089.4	899.4	996.2	947.8	13.9	87.0
	ZEN	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出	—	—
玉米 1 号样	DON	2 533.6	2 602.8	2 568.2	2 244.6	2 676.5	2 460.6	4.3	95.8
	ZEN	32.6	36.6	34.6	28.5	24.8	26.7	26.0	77.0
玉米 2 号样	DON	2 601.5	2 453.1	2 527.3	2 482.7	2 417.1	2 449.9	3.1	96.9
	ZEN	64.8	72.0	68.4	55.4	49.3	52.4	26.6	76.5
玉米 3 号样	DON	3 117.5	2 946.9	3 032.2	2 967.4	3 128.2	3 241.8	6.7	106.9
	ZEN	223.7	237.3	230.5	201.5	222.9	212.2	8.3	92.1
小麦 4 号样									
	添加 2.5 μg/kg	2.2	2.6	2.4	2.0	1.7	1.9	23.3	79.2
	添加 5 μg/kg	5.4	4.3	4.8	5.1	5.8	5.4	11.8	112.5
	添加 10 μg/kg	9.2	11.4	10.3	9.4	8.7	9.1	12.4	88.3
玉米 4 号样									
	添加 2.5 μg/kg	2.4	2.8	2.6	1.8	2.3	2.1	21.3	80.8
	添加 5 μg/kg	4.8	4.1	4.5	5.5	5.1	5.3	16.3	117.8
	添加 10 μg/kg	9.0	9.1	9.1	10.5	9.1	9.8	7.4	107.7

从表 2 可以看出,应用免疫层析快速法测定小麦、玉米实际样品中 DON、ZEN 和 OTA 的结果有高于采用国家标准测定结果的现象,其原因可能是一方面由分析方法自身普遍存在的偶然误差造成;另一方面,实际样品中往往含有各化合物的衍生物或类似物,对检测造成了一定的干扰,如 DON 常见的衍生物包括 3-乙酰基-DON 和 15-乙酰基-DON, ZEN 结构类似物有 α-玉米赤霉烯醇、β-玉米赤霉烯醇和玉米赤霉醇等。鲍蕾^[13]等学者在研究免疫层析法检测植物油实际样品中玉米赤霉烯酮的过程中,发现免疫层析法测定结果普遍高于国家标准规定的方法。衍生物或类似物对免疫层析检测法的影响有待进一步研究并确认。

三、结论

免疫层析快速测定生物毒素法是免疫学方法和胶体金技术、薄层色谱技术、显色成像技术有机的结合。其基本原理是:将生物毒素的特异性的抗原

或抗体以条带状固定在膜上,再把胶体金标记试剂(抗体或单克隆抗体)吸附在结合垫上,当待检样本加到试纸条一端的样本垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,未结合的胶体金标记物又与固定在膜上的抗原发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过显像仪观察到显色结果,通过对比显色结果进行定性、定量检测。本文研究发现免疫层析快速法测定小麦、玉米中生物毒素的方法具备易于操作、仪器便于携带、操作快速、检测量化、灵敏准确、重现性好等优点,不仅适用于小麦、玉米农产品中生物毒素的现场检测,而且非常适用于我国县级、乡镇级农产品质量安全检测站开展小麦和玉米生物毒素的快速定性、定量筛查工作。

参考文献

- [1] Pestka J J, Zhou H R, Moon Y, et al. Cellular and molecular mechanisms for immunomodulation by deoxyni-

- valenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.* 2004, 153: 61-73.
- [2] Pestka J J, Smolinski A T. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *Journal Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews*, 2005, 8 (1): 39-69.
- [3] Bhatnager D, Yu J, Ehrlich K C. Fungal allergy and pathogenicity // Breitenbach M, Cramer R, Lehrer SB (Eds.) .*Chemical Immunology*. Basel: Karger, 2002, 81: 167-206.
- [4] World health organization international agency for research on cancer. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon: IARC, 1993, 56: 489-521.
- [5] Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Worldwide Regulations for Mycotoxins in food and feed in 2003* [EB/OL] .<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e00.htm>, 2003.
- [6] 李为喜, 孙娟, 董晓丽等. 新修订真菌毒素国家标准与CAC最新限量标准的对比与分析, *现代农业科技*, 2011, 23: 41-43.
- [7] European Commission, EC1881-2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, *Official Journal of the European Union*, 20.12.2006, L364/5-L364/24.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB 2761-2011 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [9] 国家标准化管理委员会. GB/T 23503-2009 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [10] 中华人民共和国卫生部. GB/T 5009.209-2008 谷物中玉米赤霉烯酮的测定. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [11] 国家标准化管理委员会. GB/T 23502-2009 食品中赭曲霉毒素A的测定 免疫亲和层析净化高效液相色谱法. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [12] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素B1的研究. *食品科学*, 2007, 28 (2): 232-235.
- [13] 鲍蕾, 吕宁, 吴振兴等. 免疫层析法快速定量检测植物油中玉米赤霉烯酮. *粮食科技与经济*, 2012, 37 (5): 16-18.

《农产品质量与安全》编辑部 2012年度新闻记者证核验公示

根据新闻出版总署办公厅《关于开展新闻记者证2012年度核验工作的通知》(新出厅字[2012]515号)要求精神和《新闻记者证管理办法》的相关规定,我单位已对核验记者证人员的资格进行了严格审核,现将我单位通过2012年度核验的记者名单公示如下,欢迎社会各界监督。新闻出版总署举报电话:010-83138953。

《农产品质量与安全》编辑部通过2012年度核验的记者名单如下:

序号	姓名	记者证号	所在部门
1	李祥洲	K11486301000001	农产品质量与安全编辑部

农产品质量与安全编辑部
二〇一三年一月二十五日