

粮食中真菌毒素快速定量检测方法应用比较研究

李小明¹, 银尧明¹, 罗颖¹, 王霞² 张华³

(1. 遂宁市粮食质量监督检验站, 四川 遂宁 629000; 2. 重庆市粮油质量监督检验站 重庆 400037; 3. 四川巴中国家粮食质量检测站, 四川 巴中 636000)

摘要:采用便携式真菌毒素快速定量检测仪对玉米中黄曲霉毒素 B₁ 和呕吐毒素进行定量检测, 同时与酶联免疫法对比检测结果。结果显示黄曲霉毒素 B₁ 快速定量检测卡检出限为 1.75 μg/kg; 准确性与所采用酶联免疫法无显著差异; 检测结果变异系数范围在 7% ~ 11.2% 之间, 平均变异系数为 8.7%; 定量检测仪台间无显著差异。呕吐毒素快速定量检测卡检测限为 0.078 mg/kg; 定量检测仪台间无显著差异; 采用便携式定量检测仪具有简单、快速、成本低、能实现现场操作且实时上传数据并记录监测地点位置等优势, 具有较好的推广使用价值, 特别适用于卫生调查、研究、筛查等现场使用。

关键词:胶体金; 黄曲霉毒素 B₁; 呕吐毒素; 玉米; 快速定量

中图分类号:TS 207.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1007-7561(2017)01-0054-04

Comparative study on the rapid quantitative detection of mycotoxins in grain

LI Xiaoming¹, YIN Yao-ming¹, LUO Ying¹, Wang Xia², Zhang Hua³

(1. Suining food quality supervision and inspection station, Suining Sichuan 629000; 2. Chongqing grain and oil quality supervision and inspection station, Chongqing 400037; 3. Bazhong national food quality monitoring station, Bazhong Sichuan 636000)

Abstract: The aflatoxin B₁ and deoxynivalenol in corn was quantitatively detected by portable mycotoxin rapid quantitative detector, the result was compared with that by enzyme linked immunosorbent assay. The results showed that the detection limit of aflatoxin B₁ was 1.75 μg/kg by rapid quantitative detection card. The accuracy had no significant difference between the two methods; weight measurement range of the coefficient of variation between 7% ~ 11.2%, the average coefficient of variation was 8.7%; no significant difference among the quantitative detectors. The detection limit was 0.078 mg/kg by deoxynivalenol rapid quantitative detection card; no significant difference among the quantitative detectors. The portable quantitative detector has the advantages of simple, fast, low cost, can realize site operation and upload real-time data and recording monitoring site location, which is worth promotion, particularly being used in the health survey, research, screening and other field.

Key words: colloidal gold; aflatoxin B₁; vomitoxin; maize; rapid quantitative

真菌毒素是一种由霉菌或真菌产生的次生代谢物,广泛存在于粮油食品和饲料中^[1],主要有黄曲霉毒素 B₁、呕吐毒素、玉米赤霉烯酮、伏马毒素、赭曲霉毒素等。根据联合国粮食农业组织统计,全世界每年约 25% 的谷物被霉菌所污染^[2]。真菌毒素是一类具有致癌、致畸、致突变性的毒性极强的化合物,人们摄入被污染的食品后,会对人体健康产生极

大损害。针对粮食质量安全问题,《粮食管理流通条例》和粮食卫生标准都明确规定粮食收购要对真菌毒素进行检验,但中国粮油种植区分布广泛,粮食收购多集中在县以下单位的收储库点,时间短,收购量大,无法及时利用现行国家标准规定的方法检测粮食中真菌毒素含量^[3]。

现有真菌毒素的定量分析一般采用薄层色谱法(TLC)、酶联免疫法(ELISA)和高效液相色谱法(HPLC)。3种方法均须在实验室条件下严格控制

收稿日期:2016-06-23

作者简介:李小明,1974年出生,男,大学本科,工程师。

条件,进行复杂的样品前处理,才能出具结果,无法适应现场收购快速检验的需要。因此,建立简便、高效、低成本的现场快速筛选检测方法迫在眉睫^[4]。近几年,随着生物技术的不断突破,一种基于酶联免疫反应原理的快速检测方法——胶体金检测技术应运而生,这项技术产品能在一定范围内准确、快速检测真菌毒素的含量,适用于现场操作^[5]。

为了验证黄曲霉毒素 B₁ (AFB₁) 与呕吐毒素 (DON) 胶体金快速定量检测卡在粮食中的适用性,本实验对真菌毒素快速定量检测系统与 ELISA 方法进行对比验证。旨在开发简便、快捷、准确,尤其前处理简单,适用于现场快速的真菌毒素分析方法。

1 材料与方法

1.1 样品来源

参考粮食卫生标准,确定本验证实验粮种为玉米,考虑到加标样品的毒素分布、均匀性等因素,本验证实验全部采用射洪县潼射镇的样品进行验证,验证毒素为 AFB₁ 和 DON,供 AFB₁ 检测用样品为 94 份,供 DON 检测用样品为 91 份。

1.2 材料与设备

AFB₁ 和 DON 胶体金快速定量测试卡:成都盛泰尔生物医药科技有限公司;Elisa 试剂盒:美国 Romer 公司。

1.3 样品处理

验证用样品为阳性玉米样品,经粗碎与连续多次用四分法缩减至 0.5~1kg,然后全部粉碎全部通过 20 目筛,混匀。

称取 2 g 样品于提取瓶中,加入 4 mL 提取剂 A,振摇 5 min,静置 3 min,使用注射器和微孔滤膜过滤,收集 1~1.5 mL 样液于 1.5 mL 塑料管中备用。取 100 μL 样液加入样品缓冲液 400 μL 混匀,待检。

同时按照 Elisa 测试方法进行对比试验。

1.4 样品检测

从检测卡袋中取出检测卡,在卡上做好样品编号标记;用移液器吸取 120 μL 待检样液,滴入加样孔中,加样后开始计时,15 min 放入手持式读卡仪读取结果。

2 结果与分析

2.1 黄曲霉毒素 B₁

使用真菌毒素快速定量检测系统和 Elisa 试剂盒共检测 94 个样品,其中有 55 个样品 AFB₁ 含量

小于 2 μg/kg,39 个样品 AFB₁ 含量超过 2 μg/kg。

2.1.1 方法的检出限 (LOD)

按照《粮油检验 粮食中黄曲霉毒素 B₁ 测定 胶体金快速定量法》(LS/T 6111—2015),用真菌毒素快速定量检测系统测定 7 个低含量样品中的 AFB₁ 检测值,通过公式 $\bar{X} + 3 \times SD$ (\bar{X} 为样品的算术平均值,SD 为样品的标准偏差) 计算出方法检出限为 1.75 μg/kg,见表 1。

表 1 AFB₁ 快速定量检测系统检出限测试结果 μg/kg

序号	AFB ₁ 含量	\bar{X}	SD	检出限
1	1.58			
2	1.59			
3	1.58			
4	1.56	1.60	0.05	1.75
5	1.63			
6	1.55			
7	1.69			

2.1.2 准确性

用真菌毒素快速定量检测系统分别测定 39 个不同 AFB₁ 含量样品,测定结果与国标 GB/T 5009.22—2003 第二法酶联免疫法检测结果进行配对 t 检验比较 2 种方法是否存在显著性差异,经计算 $t = 1.32$, $t_{\text{双尾临界}(0.05,39)} = 2.02$, $t < t_{\text{双尾临界}(0.05,39)}$,说明 AFB₁ 快速定量检测系统检测结果与国标 GB/T 5009.22—2003 酶联免疫结果无显著性差异,见表 2。

表 2 AFB₁ 快速定量检测系统准确性对比结果 μg/kg

序号	样品编号	AFB ₁ 快速定量检测系统检测结果	酶联免疫结果
1	SN36	17	23.2
2	SN28	39	42.9
3	SN31	6	4.4
4	SN32	57	61
5	SN273	71	80
6	SN290	51	53
7	SN338	87	84
8	SN265	6.7	8.1
9	SN309	63	56
10	SN318	2.8	2.3
11	SN254	73	68
12	SN319	82	82
13	SN330	10	9.6
14	SN252	71	70
15	SN30	20	18.2
16	SN35	2.2	2.2

续表 2

序号	样品编号	AFB ₁ 快速定量检测系统检测结果	酶联免疫结果
17	SN340	10	11
18	SN327	44	46.9
19	SN343	52	55
20	SN256	28	28
21	SN275	18	22.7
22	SN331	21	21.2
23	SN250	15	13.7
24	SN336	61	65
25	SN322	35	32.7
26	SN310	10	9.8
27	SN298	2.3	3.9
28	SN305	40	39.8
29	SN329	30	31.1
30	SN267	40	35.9
31	SN213	6.7	6.9
32	SN342	5	5.6
33	SN26	33	27.3
34	SN247	60	68
35	SN164	16	12.9
36	SN173	19	23
37	SN272	58	58
38	SN130	61	67
39	SN323	39	41.6

2.1.3 重复性

用真菌毒素快速定量检测系统在相同实验条件下,使用不同检测卡检测同一样本,重复测定玉米高、中、低三种样品,每个样品重复检测6次,测定结果见表3,重复测定的变异系数范围在7%~11.2%之间,平均变异系数为8.7%。

表3 AFB₁ 快速定量检测系统重复性结果

样品编号	检测序号	AFB ₁ 快速定量检测系统检测结果/(μg/kg)	平均值/(μg/kg)	相对标准偏差/%	平均相对偏差/%
SN31	1	6	6.3	11.2	
	2	6			
	3	6.7			
	4	7.5			
	5	6			
	6	5.5			
SN30	1	20	20.8	7	8.7
	2	21			
	3	20			
	4	19			
	5	22			
	6	23			
SN329	1	30	31.3	8	
	2	30			
	3	28			
	4	32			
	5	33			
	6	35			

2.1.4 台间差

分别用2台真菌毒素快速定量检测系统仪器同时对39个不同AFB₁含量样品进行检测,测定结果采用配对t检验来比较2台仪器间是否存在显著性差异,经计算 $t = 0.26$, $t_{\text{双尾临界}(0.05,39)} = 2.02$, $t < t_{\text{双尾临界}(0.05,39)}$,说明不同AFB₁快速定量检测系统的检测结果无差异,见表4。

表4 AFB₁ 快速定量检测系统台间对比结果 μg/kg

序号	样品编号	1号仪器检测结果	2号仪器检测结果
1	SN36	17	17
2	SN28	39	39
3	SN31	6	6
4	SN32	57	56
5	SN273	71	72
6	SN290	51	51
7	SN338	87	87
8	SN265	6.7	6.6
9	SN309	63	63
10	SN318	2.8	2.8
11	SN254	73	72
12	SN319	82	81
13	SN330	10	10
14	SN252	71	72
15	SN30	20	21
16	SN35	2.2	2.2
17	SN340	10	10
18	SN327	44	44
19	SN343	52	52
20	SN256	28	28
21	SN275	18	18
22	SN331	21	21
23	SN250	15	15
24	SN336	61	60
25	SN322	35	35
26	SN310	10	11
27	SN298	2.3	2.5
28	SN305	40	40
29	SN329	30	30
30	SN267	40	40
31	SN213	6.7	6.7
32	SN342	5	5
33	SN26	33	32
34	SN247	60	61
35	SN164	16	16
36	SN173	19	20
37	SN272	58	56
38	SN130	61	62
39	SN323	39	40

2.2 呕吐毒素

使用真菌毒素快速定量检测系统和 Elisa 试剂盒共检测 91 样品,其中有 87 个样品 DON 含量小于 0.25 mg/kg,4 个样品 DON 含量超过 0.25 mg/kg。

2.2.1 方法的检出限(LOD)

按照《粮油检验 粮食中脱氧雪腐镰刀菌烯醇测定 胶体金快速定量法》(LS/T 6113—2015),用真菌毒素快速定量检测系统测定 7 个低含量样品中的 DON 含量,通过公式 $\bar{X} + 3 \times SD$ (\bar{X} 为样品的算术平均值,SD 为样品的标准偏差)计算出其检出限为 0.078 mg/kg,见表 5。

表 5 DON 快速定量检测系统检出限测试结果 mg/kg

序号	DON 含量	\bar{X}	SD	检出限
1	0.03			
2	0.05			
3	0.02			
4	0.04	0.039	0.013	0.078
5	0.04			
6	0.06			
7	0.03			

2.2.2 准确性

用真菌毒素快速定量检测系统分别测定 4 个不同 DON 含量样品,测定结果与国标 GB/T 5009.22—2003 第二法酶联免疫法检测结果进行配对 t 检验比较 2 种方法是否存在显著性差异,经计算 $t = 0.44$, $t_{\text{双尾临界}(0.05,4)} = 2.78$, $t < t_{\text{双尾临界}(0.05,4)}$,说明 DON 快速定量检测系统检测结果与国标 GB/T 5009.22—2003 酶联免疫结果无显著性差异,见表 6。

表 6 DON 快速定量检测系统准确性对比结果 mg/kg

序号	样品编号	DON 快速定量检测系统检测结果	酶联免疫结果
1	SN258	0.29	0.31
2	SN308	0.46	0.45
3	SN335	0.32	0.3
4	SN32	0.36	0.53

但是由于样品收集太少且没有超标(国标为 1 mg/kg)和高值样品,因此需要更多阳性样品对

准确性进行进一步验证。

2.2.3 台间差

分别用 2 台真菌毒素快速定量检测系统仪器同时对 4 个不同 DON 含量样品进行检测,测定结果采用配对 t 检验来比较 2 台仪器间是否存在显著性差异,经计算 $t = 0.39$, $t_{\text{双尾临界}(0.05,4)} = 2.78$, $t < t_{\text{双尾临界}(0.05,4)}$,说明不同 DON 快速定量检测系统的检测结果无差异,见表 7。

表 7 DON 快速定量检测系统台间对比结果 mg/kg

序号	样品编号	1 号仪器检测结果	2 号仪器检测结果
1	SN258	0.31	0.31
2	SN308	0.45	0.45
3	SN335	0.3	0.3
4	SN32	0.53	0.52

3 结论

胶体金快速定量检测卡法检测玉米中黄曲霉毒素 B₁、呕吐毒素含量前处理简单,仅有加样、层析、读数这 3 个步骤,在 25 min 之内就能完成一个样品的测定,方法要求条件低,操作简单,适用于现场快速定量初筛检测。其中黄曲霉毒素 B₁ 检测的检出限、准确性、重复性、台间差等参数分析均能满足测定要求;呕吐毒素由于未收集到足够的阳性样品,未对重复性进行考察,准确性也需要更多阳性样品进行确认,但是检出限和台间差等参数均满足测定要求。

参考文献:

- [1]施兆鹏,朱旗,毛清黎,等. 粮食真菌毒素污染的预防与脱毒[J]. 食品科学, 2003(8):264-268.
- [2]段文仲,吕红英,庞津霞. 动物源性食品中黄曲霉毒素污染的控制研究[J],动物科学,2009(7):206-208.
- [3]鞠兴荣,万忠民,陈建伟. 粮食安全控制体系的建立[J]. 粮食储藏,2009(3):18-21.
- [4]姜翠翠,邱松山,李波,等. 粮食中真菌毒素的检测及脱毒方法探讨[C]. “食品加工与安全”学术研讨会暨 2010 年广东省食品学会年会会议论文集,2010.
- [5]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(4):577-582.