

“粮油质量安全检测与评价” 特约专栏文章之一

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.03.006

基于免疫磁珠黄曲霉毒素全自动净化方法适用性评价

李 丽, 叶 金, 轩志宏, 刘洪美, 陈梦泽, 周明慧, 吴 宇, 王松雪

(国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037)

摘 要: 对基于免疫磁珠黄曲霉毒素全自动净化的方法适用性进行研究。结果表明: 免疫磁珠试剂盒平均回收率均在 95% 以上, 相对标准偏差小于 3.3%。质控样品的测定结果均在给参考值范围内。通过 t 检验可知, sig. (双侧) = 0.533, 两台净化仪的检测结果没有显著性差异。通过 62 名检测人员对黄曲霉毒素免疫磁珠自动化处理方法与传统的免疫亲和柱净化法的评测, 通过 t-检验可知, 99% 的置信区间内, P 值 ≥ 0.01 , 说明两种方法的测定值没有显著性差异, 但是免疫磁珠自动化处理法测定结果的离散程度小于免疫亲和柱法, 且全部的检测结果的 $|Z|$ 均 ≤ 2 。

关键词: 免疫磁珠; 黄曲霉毒素; 自动化净化; 粮食; 适用性评价

中图分类号: TS207.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)03-0037-05

网络首发时间: 2020-04-18 13:06:01

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20200417.1653.006.html>

Evaluation of the applicability of an automatic method for aflatoxin purification based on immunomagnetic beads

LI Li, YE Jin, XUAN Zhi-hong, LIU Hong-mei, CHEN Meng-ze, ZHOU Ming-hui, WU Yu, WANG Song-xue
(Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Abstract: The objection was to evaluate the applicability of an automated method for aflatoxins analysis by using Immunoaffinity Magnetic Bead - UPLC. The results showed that the average recovery of the mmunoaffinity Magnetic Bead was above 95%, and the relative standard deviation was less than 3.3%. The results of the quality control samples were within the range of the reference uncertainty. The method was accurate and reliable. T testing (sig. (bilateral) = 0.533) proved that there was no significant difference between two independent purification instruments. 62 researchers evaluated two methods of purifications with immunomagnetic beads and immunoaffinity column. T testing has proved that the results of the two methods were no significant difference. However, the dispersion degree of the immunomagnetic bead automated processing method was smaller than that of the immunoaffinity column method. Moreover, the z-value of all the test were less than 2 ($|Z| \leq 2$). Hence, this method can detect cereals and oils. In addition, the method is environmentally friendly, simply, and lower-cost, which greatly improved detection efficiency and level.

Key words: immunomagnetic beads; aflatoxin; automatic purification; applicability evaluation; grain

收稿日期: 2020-03-09

基金项目: “十三五”国家重点研发计划 (2017YFC1601300); 中国科协青年人才托举工程, 中国科学青年人才托举工程 2018 年-2020 年项目 (2018QNRC001)

作者简介: 李丽, 1982 年出生, 女, 助理研究员, 研究方向为粮油质量安全与检测。

通讯作者: 王松雪, 1977 年出生, 男, 研究员, 研究方向为粮油质量安全检测与防控。

黄曲霉毒素(aflatoxins, AFT)的毒性是氰化钾的10倍,是砒霜的68倍,被世界卫生组织(WHO)的癌症研究机构划定为I类致癌物。黄曲霉毒素对人畜有强烈的致病性、致癌性,是危害最严重的真菌毒素之一,受到世界各国的广泛关注^[1]。其广泛存在于玉米、花生及一些坚果类食品和饲料中,常见的黄曲霉毒素有B₁、B₂、G₁、G₂等四种^[2]。国内外非常重视黄曲霉毒素的防控,我国在2017年最新颁布的国家食品安全标准GB 2761—2017《食品中真菌毒素限量》规定了玉米、玉米面(渣、片)及玉米制品中AFB₁的限量为20 μg/kg,植物油脂(花生油、玉米油除外)中AFB₁的限量为10 μg/kg,花生油、玉米油中AFB₁的限量20 μg/kg,稻谷、糙米、大米中AFB₁的限量为10 μg/kg,小麦、大麦、麦片、小麦粉、其它谷物及去壳谷物AFB₁的限量为5 μg/kg^[3]。

黄曲霉毒素的检测方法研究进展很快,主要分为快速筛查法和准确定量法两种。其中薄层色谱法^[4]虽然成本低,但是操作繁琐,重现性差。酶联免疫吸附法^[5]和胶体金试纸条法^[6]多用于快速筛查,存在假阳性和假阴性。液相色谱串联质谱法^[7-8]可用于多种毒素同时筛查,但使用成本较为昂贵。免疫亲和柱液相色谱法具有特异性强、灵敏度高和适用于多种复杂基质等特点,是目前国际上普遍采用的黄曲霉毒素精确定量和确认的方法^[9-10]。但是,免疫亲和柱-液相色谱法的前处理过程多为手动完成,存在实验过程繁琐,耗时长,对检测人员的实验技能要求高等问题^[11-12]。

近年来,基于免疫磁珠真菌毒素净化方法由于具有前处理简单、自动处理、高效快速、便捷操作和结果可靠等优点^[13-14],越来越受到检测人员的欢迎。其原理是样品经提取液提取后,提取液中黄曲霉毒素特异性吸附在磁珠表面的抗体上,配合真菌毒素全自动净化仪完成杂质洗涤和目标物洗脱等过程。本研究通过系统评估,验证该方法在粮油黄曲霉毒素检测中的适用性。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

Sartorius BS224S 电子天平:德国 Sartorius 公司;MX-F 多功能旋涡混匀器:美国 SCILOGEX 公

司;Waters I Class 超高效液相色谱仪配大体积流通池:美国 Waters 公司;免疫磁珠试剂盒、真菌毒素全自动净化仪:北京东方孚德技术发展中心;免疫亲和柱:北京华安麦科生物技术有限公司;色谱级甲醇、乙腈:美国 Fisher 公司;黄曲霉毒素 B₁ 标准品:国家粮食和物资储备局科学研究院。

自然污染黄曲霉毒素有证标准物质和质控样品:花生油中黄曲霉毒素 B₁ 质控样、大米粉中黄曲霉毒素 B₁ 和玉米赤霉烯酮质控样、糙米粉中黄曲霉毒素 B₁、玉米粉中黄曲霉毒素 B₁ 标准物质(GBW(E)100386)、玉米粉空白、小麦粉空白:由国家粮食和物资储备局科学研究院提供

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理方法

参照 GB5009.22—2016《食品安全国家标准食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》中第三法高效液相色谱-柱后衍生法(无衍生器法,大体积流通池直接检测)进行^[15]。准确称取样品(5±0.005)g(感量 0.001 g)样品,加 20 mL 提取液甲醇-水(v/v:70:30)并用涡旋混合器混匀 1 min,置于涡旋振荡器上提取 20 min,然后以 7 000 r/min,离心 5 min,准确移取上清液 0.5 mL 加入免疫磁珠套合 1 孔位中,放入免疫磁珠净化装置中,按照设定的程序进行净化处理,处理时间 30 min,之后在 5 孔位加入 0.5 mL 水,混匀过膜上机检测。

免疫磁珠试剂盒性能评价方法:按照上述方法处理玉米粉阴性样本,获得玉米粉阴性样本的提取液,在提取液中添加 2.5 ng/mL 的黄曲霉毒素 B₁ 标准溶液,开展实验。

方法准确性考察:本研究选取 GBW(E)100386 玉米全粉中黄曲霉毒素 B₁、大米粉中黄曲霉毒素 B₁ 质控样、糙米粉中黄曲霉毒素 B₁ 等 5 种质控样(自然污染样品)按照 1.2.1 的处理及检测。

台间差考察方法:随机选择两台全自动净化仪进行考察。参照免疫磁珠试剂盒性能评价方法进行。

1.2.2 仪器条件

WATERS I CLASS 配荧光检测器(大体积流通池)。

色谱柱: Waters BEH-C18 柱 (2.1×100 mm, 1.7 μm), 柱温: 40 °C。

流动相: A 相: 乙腈: 甲醇(体积比为 1:1); B 相: 水, A:B=35:65, 等梯度洗脱。

流速为 0.3 mL/min, 进样量为 10 μL。

激发波长: 365 nm; 发射波长 463 nm。

2 结果与分析

2.1 免疫磁珠试剂盒性能评价

由于免疫磁珠是基于“零长度 EDC/NHS 偶联法”将黄曲霉毒素特异性偶联到带有多个位点的纳米级磁球表面, 可能存在黄曲霉毒素吸附或洗脱不全的问题, 因此需对免疫磁珠的试剂盒性能评价。由于全自动净化仪有 10 个磁棒, 一次最多可装 10 条试剂盒, 故需对 10 个试剂盒进行评价, 结果如下:

从表 1 可知, 全自动净化仪-免疫磁珠净化试剂盒性能评测 2 次, 每次评价 10 条试剂盒。试剂盒的平均回收率均在 95%以上, 相对标准偏差小于 3.3%。满足 GB5009.22—2016 附录 A 中对黄曲霉毒素免疫亲和柱回收 ≥80% 的要求。因此, 免疫磁珠净化试剂盒具有与免疫磁珠相当或更优的净化和吸附能力。

2.2 方法准确性考察

采用自然污染的有证标准物质或质控样考察了基于全自动净化仪-免疫磁珠净化试剂盒检测黄曲霉毒素方法的准确性, 结果如下:

表 1 全自动净化仪-免疫磁珠净化试剂盒性能评价结果 %

名称	次数										平均 值	RS D
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
试剂 盒 1	99.2	95.9	100.3	94.7	96.4	95.2	100.5	97.2	94.4	96.5	97.0	2.3
试剂 盒 2	91.2	89.3	95.7	96.2	95.7	93.4	98.7	97.3	93.4	99.2	95.0	3.3

表 2 五种质控样品的测定结果

标物编号	标定值/ (μg/kg)	测定结果	
		平均值/ (μg/kg)	RSD (n=3)/%
GBW(E)100386	27±3	26.4	3.1
大米粉中黄曲霉毒素 B1	9.7±1.5	8.5	7.3
糙米粉中黄曲霉毒素 B1	10.3±1.6	9.3	2.4
花生油中黄曲霉毒素 B1	15.8±2.2	13.9	1.7
糙米粉中黄曲霉毒素 B1	31±4	27.0	3.4

由上表可知, 测定结果均在标定值扩展不确定度范围之内, 检测结果满意。

2.3 台间差的评测

仪器台间差的评价结果见表 3。采用 t 检验法比较两台净化仪的检测结果是否有显著性, sig. (双侧) = 0.533, 表明两样本所属总体平均数相等的概率 $P = 0.533 > 0.05$, 平均数间无显著性差异, 满足 LS/T 6402—2017《粮油检验 设备和方法标准适用性验证及结果评价一般原则》^[16] 的要求。

表 3 台间差仪器的检测结果的 t 检验

名称	均值	标准差	均值的标准误	下限	上限	t	df	Sig.(双侧)
台 1—台 2	-1.270	6.194	1.959	-5.701	3.161	-0.648	9	0.533

2.4 免疫亲和柱净化法(国标法)和免疫磁珠自动化处理方法的评测

本研究分别采用免疫亲和柱净化法(国标法)和全自动净化仪-免疫磁珠净化试剂盒法对玉米粉中黄曲霉毒素 B1 质控样品检测, 通过 t 检验和稳健 Z 值统计评价不同实验人员操作对结果准确性和一致性。

2.4.1 两组净化方法检测结果的 t 检验

采用 t 检验, 评价两种净化方法的测定结果是否一致。

免疫磁珠净化法测定结果的稳健平均值是 11.35 μg/kg, 免疫亲和柱净化法测定结果的稳健平均值是 11.67 μg/kg, 通过 t 检验, 由表 4 可见, 在 99% 的置信区间内, 显著性水平 ≥0.01, 两种方法之间的均值是没有显著性差异的。

2.4.2 检测结果统计汇总

依据 CNAS-GL02:2014《能力验证结果的统计处理和评价指南》^[17], 计算了结果总数、均值、中位值、稳健平均值、稳健标准差、稳健变异系数、极大值、极小值、极差等统计量, 统

表 4 t 检验分析结果

分析结果	方差方程的		均值方程的 t 检验						
	Levene 检验		t	df	Sig. (双侧)	均值 差值	标准误 差值	差分的 99%置信区间	
	F	Sig.						下限	上限
假设方差相等	6.081	0.015	-2.614	116	0.01	-0.322	0.123	-0.645	0.000 6
假设方差不相等			-2.614	109.1	0.01	-0.322	0.123	-0.645	0.000 9

计参数见表 5。

表 5 检测结果统计汇总表

统计值	免疫磁珠净化	免疫亲和柱净化
样本个数/个	62	62
均值/(μg/kg)	11.36	11.69
标准偏差/(μg/kg)	0.58	0.77
中位值/(μg/kg)	11.37	11.71
极小值/(μg/kg)	10.19	10.44
极大值/(μg/kg)	12.68	14.10
极差/(μg/kg)	2.49	3.66
稳健平均值/(μg/kg)	11.35	11.67
稳健标准差/(μg/kg)	0.57	0.81
稳健相对标准偏差/%	5.0	6.9

由表 5 可知, 免疫磁珠净化法测定结果的极

差是 2.49 μg/kg, 而免疫亲和柱测定结果的极差值是 3.659 μg/kg, 说明免疫亲和柱测定结果的离散程度大于免疫磁珠净化法。采用免疫磁珠净化检测结果的的标准偏差和稳健标准偏差低于免疫亲和柱净化检测方法的结果。

2.4.3 检测结果的评价

采用稳健 Z 值统计方法对结果进行统计分析并解释。结果见图 1、2。

$$Z = \frac{x - X}{\sigma}$$

X—指定值, 通过迭代法计算得到稳健平均值;
σ—评定标准差, 通过迭代法计算得到 1.134 倍的稳健标准差。

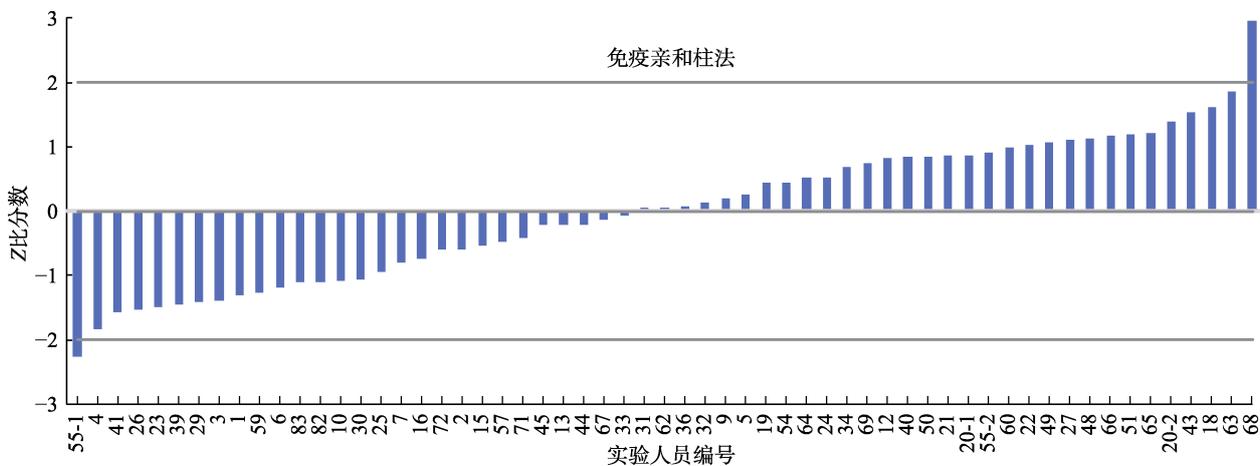


图 1 免疫亲和柱净化法测定结果 Z 值比分数分布图

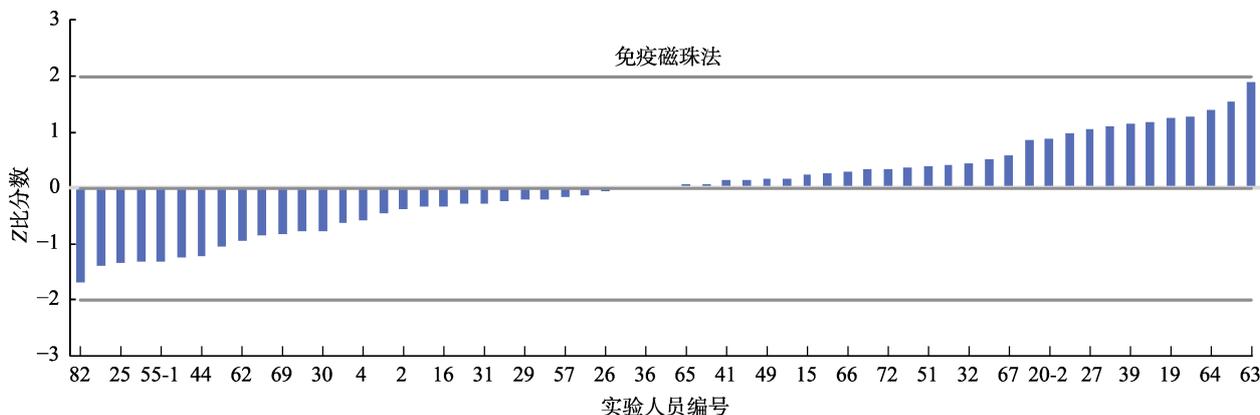


图 2 免疫磁珠净化法测定结果 Z 值比分数分布图

由图可知, IAC 净化检测 62 个结果中, 60 个结果 $|Z| \leq 2$, 结果满意, 满意率是 97%, 有 2 个结果 $2 < |Z| < 3$, 结果为可疑。IME 净化检测 62 个结果全部 $|Z| \leq 2$, 结果 100% 满意。

免疫磁珠净化法实现了部分前处理自动化, 只需完成称样和提取, 操作简单, 大大降低了人员成本和对实验人员实验技能的要求, 提高了检测质量。该方法适合高通量样品检测, 全自动净化仪一次处理 10 个样品时间约 40 min, 一天至少可净化 40 个样品, 优于常规的免疫亲和柱净化, 检测效率高。

3 结论

本研究对黄曲霉毒素 B₁ 免疫磁珠自动化处理方法的适用性进行了评价。免疫磁珠试剂盒平均回收率均在 95% 以上, 相对标准偏差小于 3.3%, 免疫磁珠净化试剂盒具有与免疫磁珠相当或更优的净化和吸附能力。通过有证基体标物或质控样品准确性评价, 测定结果均在给定值的不确定范围内, 检测结果准确。全自动净化仪的台间差没有显著性差异。通过 62 位实验人员对黄曲霉毒素 B₁ 免疫磁珠自动化处理方法与传统的免疫亲和柱净化法的比较, 由 *t*-检验可知两者之间的测定值是没有显著性差异, 但是免疫磁珠自动化处理法测定结果的离散程度小于免疫亲和柱法, 且全部的检测结果的 $|Z|$ 均 ≤ 2 。

黄曲霉毒素 B₁ 免疫磁珠自动化处理方法简化了前处理过程, 操作简单, 检测成本低, 很大程度上提高检测效率和检测水平。此外, 免疫亲和柱制备时需使用剧毒的 CNBr 活化琼脂糖凝胶, 免疫磁珠的制备则相对绿色、安全。通过适用性评价, 该方法适用于粮食样品检测、监测。

参考文献

[1] BENNETT J W, KLICH M. Mycotoxins[J]. Clin. Microbiol. Rev, 2003, 16(3): 497-516.
 [2] SWEENEY M J, DOBSON A D. Mycotoxin production by

Aspergillus, Fusarium and Penicillium species[J]. Int. J. Food Microbiol, 1998, 43(3): 141-158.
 [3] 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量: GB 2761—2017[S].
 [4] ONO E Y, SILVA M, RIBEIRO R M, et al. Comparison of thin-layer chromatography, spectrofluorimetry and bright greenish-yellow fluorescence test for aflatoxin detection in corn. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2010, 53(3): 687-692.
 [5] 李小明, 银尧明, 罗颖王, 等. 粮食中真菌毒素快速定量检测方法应用比较研究[J]. 粮油食品科技, 2019, 25(1): 54-58.
 [6] 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.
 [7] 叶金, 吴宇, 辛媛媛, 等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱快速精准测定粮食中多种真菌毒素[J]. 分析测试学报, 2017, 36(4): 449-456.
 [8] 辛媛媛, 张艳, 王松雪, 等. UPLC-MS/MS 法测定玉米中 13 种真菌毒素[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(12): 126-130.
 [9] 谢刚, 王松雪, 张艳. 超高效液相色谱法快速检测粮食中黄曲霉毒素的含量[J]. 分析化学 13, 41(2): 223-228.
 [10] SENYUVA H Z, GILBERT J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: a review[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(2): 115-132.
 [11] JINAP S, RIJK T, ARZANDEH S. Aflatoxin determination using in-line immunoaffinity chromatography in foods[J]. Food Control, 2012, 26(1): 42-48.
 [12] RIA R, MONIKA P, ELAINE M. Automated aflatoxin analysis using inline reusable immunoaffinity column cleanup and LC-Fluorescence detection[J]. Journal of AOAC International, 2015, 98(6): 1585-1590.
 [13] XUAN Z H, YE J, ZHANG B, et al. An Automated and high-throughput immunoaffinity magnetic bead-based sample clean-up platform for the determination of aflatoxins in grains and oils using UPLC-FLD[J]. Toxins, 2019, 11(10): 583-598.
 [14] YE J, XUAN Z H, ZHANG B, et al. Automated analysis of ochratoxin A in cereals and oil by immunoaffinity magnetic beads coupled to UPLC-FLD[J]. Food Control, 2019, 104: 57-62.
 [15] 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定: GB 5009.22—2016[S].
 [16] 中华人民共和国粮食行业标准 设备和方法标准实用性验证及结果评价一般原则: LS/T 6402—2017[S].
 [17] 中国合格评定国家认可委员会 化学分析中不确定度的评估指南: CNAS—GL06[S].

备注: 本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lspkj.ijournal.cn/ch/index.aspx>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。