文章编号:2095-6002(2013)04-0055-04
引用格式:李培真,尚艳娥,郭健,等. 胶体金测试条快速定量测定呕吐毒素技术在粮食中的应用. 食品科学技术学报,2013,31(4):55-58.
LI Pei-zhen, SHANG Yan-e, GUO Jian, et al. Study on Rapid Quantitative Detection for Vomitoxin in Grain with Colloidal Gold Strips Method. Journal of Food Science and Technology, 2013,31(4):55-58.

胶体金测试条快速定量测定呕吐毒素技术在粮食中的应用

李培真, 尚艳娥*, 郭 健, 刘美辰
(国家粮油质量监督检验中心, 北京 100162)

摘 要: 采用胶体金测试条法对粮食中呕吐毒素进行快速定量检测,结果表明,呕吐毒素的检测限为118 μg/kg,定量限为316 μg/kg,500~5 000 μg/kg质量浓度范围内,相关系数r为0.998 7. 采用有证实物参考物质进行比较,正确度为90.3%~116.6%,变异系数为4.7%~19.6%. 采用配对t-检验,与高效液相色谱法的测定结果相比较,二者无显著差异.

关键词: 胶体金; 呕吐毒素; 粮食; 快速定量
中图分类号: TS210.7 **文献标志码**: A

呕吐毒素(vomitoxin)又名脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON),是一种单端孢霉烯族毒素,主要由禾谷镰刀菌和粉红镰刀菌产生. DON在体内可能有一定的蓄积,但无特殊的靶器官,具有很强的细胞毒性,可导致动物肠功能紊乱,口腔黏膜和真皮损伤,免疫力下降[1]. 农作物在生长、收割、储存等环节水分含量偏高,就容易生成真菌毒素[2],根据王晓云等[3]在2005年调研发现,呕吐毒素对农作物的污染呈现出高污染率、低污染程度的趋势. 目前比较常用的检测技术主要是:薄层色谱法(TLC)、酶联免疫法(ELISA)、液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)[4]及色谱-质谱联用法[5]等. 我国粮食收购时间集中、收购量大、工作条件简单,而上述检测方法均为实验室操作,因此,寻求准确、快速、简便的检测方法对毒素进行定性、定量分析,是真菌毒素检测研究的一个重要课题.

免疫胶体金层析快速诊断试纸条是20世纪90年代以来,在单克隆抗体技术、胶体金免疫层析技术和新材料技术基础上发展起来的一项新型体外诊断技术,该技术以其快速、准确且容易被基层掌握并大面积推广的特点[6],在生物医学各研究领域、微生物检测、兽医快速检测以及食品安全检测等方面得到了日益广泛的应用. 呕吐毒素定量快速检测条是以胶体金层析式免疫竞争为原理,以小分子化合物为检测对象[7-8],运用侧流技术,发展起来的一种真菌毒素快速检测方法.

本课题对胶体金测试条法快速定量测定粮食中呕吐毒素进行应用性研究,评估该法的检测限、定量限、线性范围、准确性、重复性等参数,以验证此方法在检测粮食中呕吐毒素的适用性.

1 材料与方法

1.1 样品来源

小麦粉7份,玉米5份,大米1份. 两份小麦阴性样品,剩余11份样品呕吐毒素质量分数为

收稿日期: 2013-01-16
基金项目: 北京市委、市政府重点工作及区县政府应急项目(Z111100056811003).
作者简介: 李培真,男,工程师,硕士,主要从事粮油安全检测方面的研究;
*尚艳娥,女,教授级高级工程师,国家粮油质量监督检验中心总工程师,主要从事粮油安全检测方面的研究. 通讯作者.

520 ~4 850 μg/kg,共计 13 份样品分别由国家粮油质量监督检验中心和美国 Charm 公司提供的有证参考物质.

1.2 材料与设备

呕吐毒素试剂盒,包括呕吐毒素定量检测条,质量分数为 1 000 μg/kg 的呕吐毒素阳性质控,呕吐毒素定量(deoxynivalenol quantitative,DONQ)稀释缓冲液,快速一步分析(Rapid one step assay, ROSA)-M 孵育器,ROSA-M 读数仪,以上均由美国 Charm 公司提供;KD10K 型离心机,盐城凯特实验仪器设备有限公司;去离子水.

1.3 样品处理与检测方法

1.3.1 样品处理方法

取样品研磨成粉末使其通过 20 目筛,混匀样品,取 50 g 样品加入 5 倍的去离子水剧烈震荡 1 ~2 min,静置 1 min 以获得样品提取物,如静置效果不佳,可取 1.0 ~1.5 mL 提取物至离心管中,离心 10 s,获得上清液即为样品提取物. 移取 100 μL 样品提取物至分装的 1.0 mL DONQ 稀释缓冲液中,密闭混合和标记,即为稀释提取物.

1.3.2 样品检测方法

逐一标记检测条后,打开已升温至 45 ℃并恒温的 ROSA-M 孵育器盖子,将检测条平底一侧朝上放入 ROSA-M 孵育器,揭开检测条粘膜至指示线处,使样品槽暴露;移取 300 ±15 μL 的稀释提取物或质控物至样品槽,压下粘膜重新密闭样品槽,所有过程应在 1 min 之内完成;盖上孵育器盖子,孵育 5 min,取出检测条,2 min 之内使用 ROSA-M 读数仪读取结果.

1.3.3 阳性样品定值浓度测定方法

所有样品参考浓度测定方法均按照国家标准规定方法进行[9].

2 结果与讨论

采用玉米、小麦、大米污染和无污染(阴性)样品共 13 份测试,每份样品按照 **1.3.1** 样品处理和 **1.3.2** 检测方法要求测定 6 次,每次测定双平行样,共计测定 156 次,记录测试结果的数据统计情况.

2.1 检测限和定量限测定结果

通过对两份无污染(阴性)样品的测定,共计得出 24 次阴性检测数据,对结果进行计算分析,检测限(LOD)为测定平均值加 3 倍标准偏差,定量限(LOQ)为测定平均值加 10 倍标准偏差. 测试结果表明,呕吐毒素的检测限为 118 μg/kg,定量限为 316 μg/kg,完全满足分析要求.

2.2 线性范围测定结果

采用同一种样品,以高效液相色谱法检测结果为横坐标,胶体金测试条法的检测结果为纵坐标,计算线性范围内的相关性. 小麦的线性范围:500 ~5 000 μg/kg(5 点); 回归方程: $y = 1.04x - 119$;相关系数 r 为 0.999 2,说明在该质量浓度范围内线性相关性良好,线性关系图见图 1.

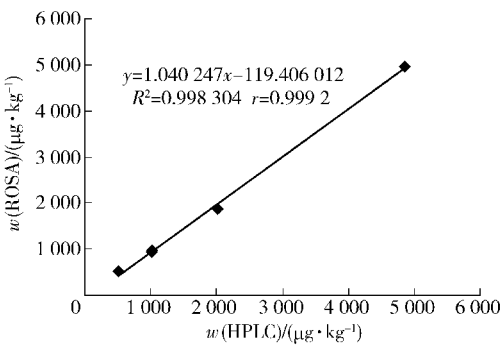

图 1 小麦中呕吐毒素两种方法检测值的线性关系

Fig. 1 Linear relationship between two methods for detecting value of vomintoxin in wheat

玉米的线性范围:800 ~5 000 μg/kg(5 点); 回归方程: $y = 1.16x - 5.49$;相关系数 R 为 0.998 7,说明在该浓度范围内线性相关性良好,线性关系见图 2.

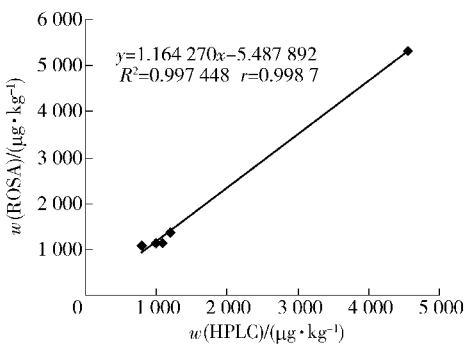

图 2 玉米中呕吐毒素两种方法检测值的线性关系

Fig. 2 Linear relationship between two methods for detecting value of vomintoxin in corn

2.3 准确性测定结果

2.3.1 与标准方法参考值比较

使用胶体金测试条法与高效液相色谱标准方法分别对 13 组样品中的 11 组阳性样品进行检测,采用配对 t 检验法比较两种方法的检测结果是否存在显著性差异,具体见表 1.

表 1　呕吐毒素两种检测方法配对 t-检验结果分析

Tab. 1　Results analysis of paired t-test of two detection methods for vomintoxin

序号	检测值/(μg·kg^{-1})		相差值 D_i	D_i^2	D 均值	S_D	T_D	$T_{0.05,10}$
	HPLC	ROSA						
1	520	504.2	−15.80	249.64				
2	1 020	920.8	−99.17	9 834.03				
3	1 020	954.2	−65.83	4 334.03				
4	2 020	1 866.7	−153.33	23 511.11				
5	4 850	4 966.7	116.67	13 611.11				
6	1 090	1 150.0	60.00	3 600.00	116.82	246.99	1.57	2.23
7	4 560	5 316.7	756.67	572 544.44				
8	800	1 070.8	270.83	73 350.69				
9	1 000	1 140.0	140.00	19 600.00				
10	1 200	1 366.7	166.67	27 777.78				
11	1 000	1 108.3	108.33	11 736.11				

经计算，$t_D = 1.6$，查 t 分布表，$t_{0.05,10} = 2.23$，$t_D = 1.6 < t_{0.05,10} = 2.23$，说明液相参考值与 ROSA 测试条法测定值之间无显著差异，即两种检测方法的测定结果一致.

2.3.2　正确度测定结果

除去阴性样品后的阳性样品，以高效液相色谱法的测定结果作为认定值，将胶体金测试条法的测定结果与之比较，按正确度(%) = 检测值/认定值 × 100 计算. 11 个样品的正确度在 90.3% ~ 133.9%，平均值为 106%，正确度较好，具体见表 2.

表 2　呕吐毒素两种检测方法正确度结果分析

Tab. 2　Results analysis of detecting accuracy of two methods for vomintoxin

序号	样品名称	认定值/(μg·kg^{-1})	检测平均值/(μg·kg^{-1})	正确度/%
1		520	504	97.0
2		1 020	921	90.3
3	小麦	1 020	954	93.5
4		2 020	1 867	92.4
5		4 850	4 967	102.4
6		1 090	1 150	105.5
7		4 560	5 317	116.6
8	玉米	800	1 071	133.9
9		1 000	1 140	114.0
10		1 200	1 367	113.9
11	大米	1 000	1 108	110.8
平均值				106.4

2.4　重复性测定结果

每个样品进行 6 次双平行检测，连续对 13 个样品进行同样的检测，以此进行重复性验证. 对除去阴性样品的 11 个阳性样品进行检测数据统计，根据统计，其变异系数范围在 4.7% ~ 19.6%，平均变异系数为 11.8%，整体变异系数较小，具体数据见表 3.

表 3　呕吐毒素胶体金测试条法重复性测定结果分析

Tab. 3　Results analysis of repeated measurement of colloidal gold strips method for vomintoxin

序号	样品名称	参考质量分数/(μg·kg^{-1})	测定平均值/(μg·kg^{-1})	标准偏差	变异系数/%
1		520	504	99	19.6
2		1 020	921	156	14.0
3	小麦	1 020	954	105	
4		2 020	1 867	345	18.5
5		4 850	4 967	337	6.8
6		1 090	1 150	90	7.9
7		4 560	5 317	248	4.7
8	玉米	800	1 071	114	10.6
9		1 000	1 140	127	11.1
10		1 200	1 367	202	14.7
11	大米	1 000	1 108	114	10.3
平均值					11.8

3　结　论

对胶体金测试条快速定量法检测粮食中呕吐毒

素进行研究,通过简单的样品前处理,测试条点样、孵育器孵育、读数仪读数这几个步骤,15 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. 将测定值与液相色谱测得的定值比较,通过对检测限、定量限、线性范围、准确性、重复性等参数的统计分析,均能满足粮食中呕吐毒素测定的要求,易于推广应用.

参考文献:

[1] 王文龙,刘阳,李少英,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇与人类健康[J]. 食品研究与开发,2008,29(6):153 - 157.

[2] 孙秀兰,邵景东,王俊双. 粮油食品中呕吐毒素危害及风险分析[J]. 粮食与油脂,2006(3):41 - 43.

[3] 王晓云,于雅琴,俞琼. 2005 年中国居民膳食 DON 污染调查及暴露评估[J]. 长治医学院学报,2007,21(2):101 - 103.

[4] 俞琼,计融,王晓云. 玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的气相色谱分析[J]. 吉林大学学报:医学版,2007(9):939 - 941.

[5] 张晓飞,岳延涛,杨美华,等. 色谱-质谱联用技术在真菌毒素检测中的研究进展[J]. 贵州农业科学,2009,37(12):109 - 114.

[6] 尚艳娥. 真菌毒素检测技术研究进展[J]. 北京工商大学学报:自然科学版,2012,30(4):15 - 18.

[7] 许艳丽,鲍蕾. 免疫胶体金技术及其在真菌毒素检测中的应用[J]. 中国酿造, 2010(7):13 - 17.

[8] 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.

[9] 张辉珍,王晓滨,单连菊,等. 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[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

Study on Rapid Quantitative Detection for Vomitoxin in Grain with Colloidal Gold Strips Method

LI Pei-zhen, SHANG Yan-e*, GUO Jian, LIU Mei-chen

(*National Center for Supervision and Inspection of Grain and Oil*, *Beijing* 100162, *China*)

Abstract: The colloidal gold strips method was used for the rapid quantitative detection of vomitoxin in grain. The results showed that the detection limit of vomitoxin was 118 μg/kg. The quantitation limit was 316 μg/kg and the correlation coefficient (r) was 0.998 7 in the range of 500 – 5 000 μg/kg. Compared with the certified reference material, the accuracy was in the range of 90.3% – 116.6% and the coefficient of variation was ranged from 4.7% to 19.6%. There were no significant differences between the colloidal gold strips and the high-performance liquid chromatography using the paired t-test.

Key words: colloidal gold; vomitoxin; grains; rapid quantitative

(责任编辑:叶红波)