

- 离株的血清型、核糖型及毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(2):114-119.
- [2] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2002:871-942.
- [3] 向辉, 朱海, 刘钢, 等. 5种食源性致病微生物毒力基因重组质粒的构建、克隆表达与表达产物的研究[J]. 华南预防医学, 2014, 40(5):409-415.
- [4] 向辉, 朱海, 孙世宏, 等. 荧光纳米颗粒标记技术在快速检测产 enterotoxin B 金黄色葡萄球菌方面的应用研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(9):1359-1362.
- [5] 代敏, 王大鹏, 陈万义, 等. 副溶血弧菌临床分离株的血清分型及毒力基因分析[J]. 中国食品学报, 2013, 13(2):159-164.
- [6] NISHIBUCHI M, KAPER J B. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium [J]. Infect Immun, 1995, 63(6):2093-2099.
- [7] BHOOPONG P, PALITTAPONGARNPIM P, POMWISED R, et al. Variability of properties of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from individual patients [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(5):1544-1550.
- [8] 李毅, 朱心强. 副溶血性弧菌及其溶血毒素研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(12):2835-2839.

## 实验技术与方法

# 胶体金免疫层析技术快速检测谷物中3种真菌毒素的研究

曹德康<sup>1</sup>, 苏建忠<sup>1</sup>, 张瑛<sup>1</sup>, 秦璐<sup>1</sup>, 苗银萍<sup>2</sup>, 吴智坚<sup>2</sup>, 张杰<sup>2</sup>, 赵林萍<sup>2</sup>

(1. 武警后勤部疾病预防控制中心, 北京 102613;

2. 郑州中道生物技术有限公司, 河南 郑州 450000)

**摘要:**目的 应用胶体金免疫层析技术开发一种快速检测谷物中黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)、玉米赤霉烯酮 (ZEN) 和呕吐毒素 (DON) 的三联检测卡。方法 优化胶体金溶液 pH 值、金标抗体量及抗原包被量制备 3 种胶体金试纸条, 将试纸条组装成检测卡, 研究该卡的检测限、准确度、特异性和稳定性。结果 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 3 种试纸条的胶体金溶液最适 pH 值分别为 7.5、7.5 和 7.0, 金标抗体量分别为 4.2、7.2 和 9.6 μg/ml, 抗原包被量分别为 1.0、1.4 和 0.8 mg/ml。检测卡的检测结果与仪器检测结果基本一致, 重复性较好, 与结构类似物及其他霉菌毒素无交叉反应, 在室温条件下可以保存 12 个月。结论 该三联检测卡操作简便、快速、准确、稳定, 且能同时检测 3 种真菌毒素, 在谷物的现场检测中有较好的应用前景。

**关键词:**胶体金免疫层析法; 谷物; 真菌毒素; 检测卡; 快速检测; 食品污染物; 食品安全

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)03-0306-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.03.011

## Research on the rapid detection of three kinds of mycotoxin in grains by colloidal gold immunochromatographic method

CAO De-kang<sup>1</sup>, SU Jian-zhong<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, QIN Lu<sup>1</sup>,  
MIAO Yin-ping<sup>2</sup>, WU Zhi-jian<sup>2</sup>, ZHANG Jie<sup>2</sup>, ZHAO Lin-ping<sup>2</sup>

(1. Center for Diseases Control and Prevention of Chinese People's Armed Police Forces,  
Beijing 102613, China; 2. Zhengzhou Zhongdao Biotechnology Co., Ltd, Henan  
Zhengzhou 450000, China)

**Abstract: Objective** The colloidal gold immunochromatographic strip was developed to detect aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON) in grains. **Methods** The pH of colloidal gold solution and the dosage of the specific antibody and antigen were optimized through three combinations. The limit of quantitation, accuracy, specificity and the stability of the detection strip were investigated. **Results** The optimal pH of colloidal gold solution for AFB<sub>1</sub>, ZEN and DON was 7.5, 7.5 and 7.0, respectively. The optimal concentration of antibody marking was 4.2, 7.2

收稿日期: 2017-02-10

基金项目: 武警后勤部卫生局科研课题 (WJWSB2015-01)

作者简介: 曹德康 男 主任医师 研究方向为军事预防医学及环境监测 E-mail: 13301080538@163.com

通信作者: 苏建忠 男 主治医师 研究方向为卫生监督及环境监测 E-mail: wjszj@139.com

and 9.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectively. The optimal concentration of the specific antigen was 1.0, 1.4 and 0.8  $\text{mg}/\text{ml}$ , respectively. Sixty samples were detected through instrument method and colloidal gold immunochromatographic method simultaneously, and the results were consistent with each other. No cross-reaction was observed with other analogue and mycotoxins, and the triple strip could be stored at room temperature for 12 months. **Conclusion** The triple strip was a simple, accurate and stable method for monitoring AFB<sub>1</sub>, ZEN and DON in grains, and had good application foreground in field analysis.

**Key words:** Colloidal gold immunochromatographic method; grains; mycotoxin; detection card; rapid detection; food contaminant; food safety

黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 是迄今已知最强的化学致癌物之一<sup>[1]</sup>, 可同时诱发多种癌症, 此外还具有强烈的致畸性和致突变性<sup>[2]</sup>。玉米赤霉烯酮 (ZEN) 会引起雌性激素中毒症, 造成生殖系统的严重损伤, 还可诱导 DNA 收缩, 导致染色体失常<sup>[3]</sup>。呕吐毒素 (DON) 严重影响人的消化系统, 具有细胞毒性、免疫毒性和神经毒性<sup>[4]</sup>。这 3 种毒素普遍存在于谷物中, 超过国家限量标准后, 对人类的健康和安全造成严重威胁, 在 GB 2761—2011《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》<sup>[5]</sup> 中规定, AFB<sub>1</sub> 在麦仁和小米中的限量值为 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、玉米糝中限量值为 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、大米中限量值为 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; ZEN 在谷物及其制品中的限量值均为 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; DON 在谷物及其制品中的限量值均为 1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 玉米、玉米糝 (渣、片)、大麦、小麦、麦片、小麦粉的限量值均为 1 000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; 因此, 对谷物中真菌毒素的检测是一项艰巨而重要的任务。

目前, 检测 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 的方法有很多, 主要有薄层色谱 (TLC) 法、气相色谱 (GC) 法、高效液相色谱 (HPLC) 法、酶联免疫吸附 (ELISA) 法和胶体金免疫层析 (GICA) 法<sup>[6-10]</sup>。TLC 是应用最早、最广泛的检测技术, 也是检测真菌毒素最经典的方法。但其灵敏度低、重现性差、操作繁琐、时间长且安全性差。GC 和 HPLC 可以对样品中真菌毒素进行精确定量, 而且结果稳定, 是最权威的方法, 但前处理相对复杂, 检测周期长, 需要昂贵的仪器并耗费大量人力。ELISA 操作相对简单、灵敏度高, 但也需要专门仪器, 耗时较长。此外, 以上检测技术均为单一指标检测, 不能同时检测多种真菌毒素。针对上述检测技术的不足, 本试验应用胶体金免疫层析法研制 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 检测试纸条并组装成三联检测卡, 检测谷物中污染的真菌毒素。该法操作简单、快速, 不需要专业人员和仪器设备, 适合现场检测, 值得推广应用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 样 品 来 源

北京市某超市、某集贸市场购买的小米、玉米

糝、麦仁和大米, 各 15 份。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

HM3030 型 XYZ 三维划膜喷金仪 (上海金标)、紫外可见分光光度计 (上海美谱达仪器有限公司)、真空干燥箱、低温高速离心机、ZQ3500 型数控快速斩切机、恒温培养箱、切条机、磁力搅拌器、pH 计。

AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体、ZEN 单克隆抗体、DON 单克隆抗体、AFB<sub>1</sub>-牛血清白蛋白 (BSA)、ZEN-BSA、DON-BSA、山羊抗小鼠 IgG 均购自洛阳佰奥通生物技术有限公司, AFB<sub>1</sub> [GBW (E) 100302]、ZEN [GBW (E) 100301]、DON [GBW (E) 100383] 标准品均购自国家标准物质中心, 硝酸纤维素膜 (NC 膜, 德国赛多利斯), 聚氯乙烯 (PVC) 底板、样品垫、吸水纸、玻璃纤维均购自上海金标生物公司, 氯金酸 (美国 Sigma), 碳酸钾, 柠檬酸三钠, 阴性样品; 仪器方法确定的不含 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 的小米、玉米糝、麦仁和大米。

## 1.2 方 法

### 1.2.1 胶体金的制备

用超纯水将 1.0% 氯金酸稀释成 0.01%, 置于磁力搅拌器上搅拌煮沸, 迅速加入 1.0 ml 1% 柠檬酸三钠, 继续加热煮沸 15 min, 溶液由灰色变成黑色, 随后稳定成红色。关闭加热电源, 冷却至室温后用超纯水补足体积, 用紫外可见分光光度计扫描来估算金颗粒的大小, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。

### 1.2.2 胶体金溶液最适 pH 值的确定

取 10 支 5 ml 玻璃小试管, 分别加入 1.0 ml 胶体金溶液, 用 0.1 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH 值为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0, 每管加入 10  $\mu\text{g}$  AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体。混匀并静置 10 min 后, 分别加入 100  $\mu\text{l}$  10% NaCl 溶液, 混匀后静置 2 h, 观察溶液颜色的变化。溶液保持红色的最低 pH 值可确定为胶体金溶液的最适 pH 值。胶体金结合 ZEN 和 DON 单克隆抗体的最适 pH 值也按此方法确定。

### 1.2.3 抗体标记量的确定

3 种抗体分别选择 1.2.2 中确定的最适 pH 值的胶体金溶液, 各取 9 管, 每管 1.0 ml。加入不同量

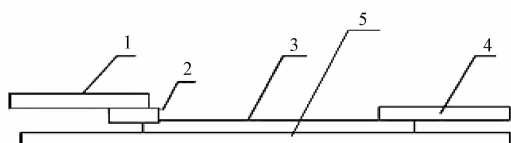
的抗体, AFB<sub>1</sub> 单克隆抗体加入量的范围为 20 ~ 55  $\mu\text{l}$  (抗体浓度 0.1 mg/ml), ZEN 和 DON 单克隆抗体加入量的范围均为 2.0 ~ 16  $\mu\text{l}$  (抗体浓度 1.0 mg/ml), 补足体积至 1.1 ml, 对照管仅加 0.1 ml 稀释液, 混匀。5 min 后, 在各管加入 0.1 ml 10% NaCl 溶液, 混匀后静置 2 h, 观察溶液颜色的变化。溶液保持红色的最低抗体量可确定为稳定胶体金的最低抗体量。在最低抗体量的基础上再增加 10% ~ 20% 即为胶体金标记的最佳抗体量<sup>[11]</sup>。

#### 1.2.4 检测线最佳浓度的确定

将 1.0 mg/ml 的山羊抗小鼠 IgG 包被在 NC 膜的质控线 (C 线) 上, 同时将 AFB<sub>1</sub>-BSA、ZEN-BSA 和 DON-BSA 分别梯度稀释成 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 和 1.6 mg/ml 7 个浓度包被在 NC 膜的检测线 (T 线) 上, 喷量均为 1.0  $\mu\text{l}/\text{cm}$ , 间距为 5 mm, 37  $^{\circ}\text{C}$  干燥 2 h, 作为试纸条的检测区, 与最适条件下制备的结合垫组装成试纸条。AFB<sub>1</sub> 检测浓度为 0、0.5、1.0 和 2.0 ng/ml 的标准品, ZEN 检测浓度为 0、5.0、10 和 20 ng/ml 的标准品, DON 检测浓度为 0、100、200 和 300 ng/ml 的标准品, 比较 AFB<sub>1</sub>-BSA/ZEN-BSA/DON-BSA 浓度的变化对试纸条检测结果的影响。选择检测线最佳浓度的标准如下: 阴性溶液 [0.01 mol pH = 7.4 磷酸盐 (PBS) 缓冲液] 滴定时, C 线和 T 线显色深度适中, 两线显色一致或 T 线显色大于 C 线; 用标准品滴定时, 试纸条灵敏度越高越好。

#### 1.2.5 胶体金免疫层析试纸条和三联检测卡的组装

将胶体金标记的单克隆抗体 (以下简称金标抗体) 喷在玻璃纤维上制成结合垫, 将完全抗原和山羊抗小鼠 IgG 包被于 NC 膜上, 分别作为 T 线和 C 线。经处理的样品垫 (1.5 cm  $\times$  10 cm)、结合垫 (1.5 cm  $\times$  10 cm)、NC 膜 (2.5 cm  $\times$  10 cm) 和吸水垫 (1.5 cm  $\times$  10 cm) 每两部分以 2 mm 重叠, 依次粘在 PVC 底板 (6 cm  $\times$  5 cm) 上, 用切条机切成宽 3 mm 的胶体金免疫层析试纸条, 其侧面结构示意图见图 1。将 3 种试纸条按指定位置放入三联检测卡卡槽内, 盖上卡盖, 组装成三联检测卡 (见图 2)。



注: 1 为样品垫; 2 为结合垫; 3 为 NC 膜;  
4 为吸水垫; 5 为 PVC 底板

图 1 试纸条侧面结构示意图

Figure 1 Sketch map of test strip of side structure

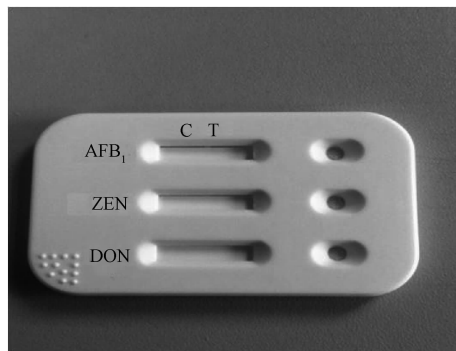
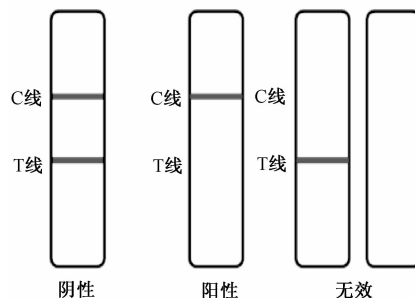


图 2 真菌毒素三联检测卡实物图

Figure 2 Physical map of triple detection card of mycotoxin

#### 1.2.6 谷物中 3 种真菌毒素的检测

将玉米糝粉碎后过 0.850 mm 筛孔的筛子。称取 2.0 g 样品置于 50 ml 的离心管中, 加入 4.0 ml 的甲醇-PBS 缓冲液 (7:3, V/V), 充分振荡 5 min, 5 000 r/min 离心 6 min。取上清液 0.2 ml 加入 0.8 ml PBS 缓冲液稀释 5 倍作为待测液。用滴管吸取待测液滴加于加样孔中, 每孔 2 ~ 3 滴。加样后开始计时, 结果应在 5 ~ 8 min 读取, 其他时间判读无效。读取结果时, 检测卡中每个试纸条结果解释见图 3。



注: 阴性: 在观察孔内, 检测线 (T 线) 及质控线 (C 线) 均显色;  
阳性: 在观察孔内, 只有 C 线显色, T 线不显色; 失效: 在观察孔内, C 线和 T 线都不显色, 或仅 T 线显色

图 3 试纸条检测区结果判定示意图

Figure 3 Sketch map of judgements of the results of test strip

#### 1.2.7 三联检测卡的质量评价

不同种类样品中 3 种毒素检测限的确定: 4 种阴性样品 (小米、玉米糝、麦仁和小米) 分别取 15 份, 每份 2.0 g。分别加入不同浓度的 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 标准品, AFB<sub>1</sub> 加入标准品的浓度分别为 0、2.5、5.0、10 和 20 ng/g, ZEN 加入标准品的浓度 0、15、30、60 和 90 ng/g, DON 加入标准品的浓度为 0、500、750、1 000 和 1 500 ng/g, 每个浓度做 3 次重复。按照 1.2.6 方法检测样品中毒素含量。

与 HPLC 法比较: 按照 1.2.6 方法检测样品中 3 种毒素含量, 大于等于检测限的判为阳性, 反之判

为阴性。同时用 HPLC 法分别检测样品中的 ZEN<sup>[12]</sup>、DON<sup>[13]</sup> 和 AFB<sub>1</sub><sup>[14]</sup>, 根据国家规定的真菌毒素在谷物中的限量标准判定结果<sup>[5]</sup>。

**特异性试验:**通过与结构类似物及其他霉菌毒素的交叉反应试验来研究。用含 15% 甲醇的 PBS 缓冲液分别将 AFB<sub>1</sub>、AFM<sub>1</sub>、AFB<sub>2</sub>、DON、赭曲霉毒素 A、T-2 毒素、ZEN、玉米赤霉醇制备成浓度为 1.0、5.0、100 和 500 ng/ml 的溶液,用三联检测卡进行检测。

**稳定性试验:**将三联检测卡置于铝箔袋中,加干燥剂密闭包装,放于 37 °C 条件下保存 8 周。分别在第 1 天、第 2 天、第 4 天、第 7 天以及之后的每周取出三联检测卡检测含 15% 甲醇的 PBS 缓冲液及浓度为 100 ng/ml 的 3 种标准品溶液。观察 T 线、C 线的显色强度、稳定性情况及金标抗体的释放情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶体金颗粒的特征

胶体金溶液为澄清的酒红色,未发现漂浮物及颗粒沉淀物,用紫外可见分光光度计扫描可知(见图 4),紫外扫描的最大吸收峰波长为 525 nm。根据回归方程  $y = 0.4271x + 514.56$  计算<sup>[15]</sup>,得到胶体金颗粒直径大小为 25 nm。

### 2.2 胶体金溶液最适 pH 值的确定

不同 pH 值的胶体金溶液与抗体结合,若 pH 值未达到同蛋白结合的最适点时,胶体金会聚沉,溶

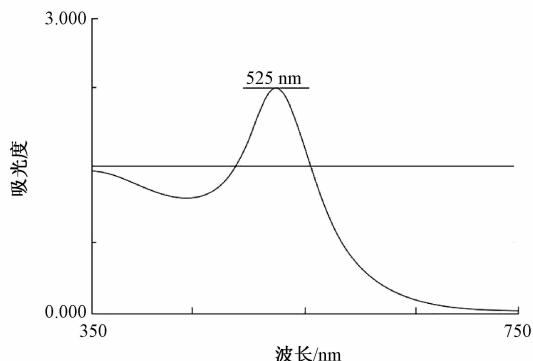


图 4 胶体金颗粒紫外扫描图

Figure 4 Determination of colloidal gold by spectrophotometry

液由红色变为蓝色,保持红色的最低 pH 值作为最适 pH 值。由此可知,AFB<sub>1</sub> 金标抗体、ZEN 金标抗体的最适 pH 值均为 7.5, DON 金标抗体的最适 pH 值为 7.0。

### 2.3 抗体标记量的确定

取一系列 pH 值为 7.5 (AFB<sub>1</sub> 和 ZEN 抗体最适)和 7.0 (DON 抗体最适)的胶体金溶液,确定了 3 种抗体最适标记量,结果见表 1。可以看出,向 1 ml 胶体金溶液中加入 AFB<sub>1</sub> 抗体量  $\geq 3.5 \mu\text{g}$ ,或加入 ZEN 抗体量  $\geq 6 \mu\text{g}$ ,或加入 DON 抗体量  $\geq 8 \mu\text{g}$ ,溶液稳定,颜色由蓝色变为稳定的红色。在此基础上,增加 20% 的蛋白量即为最适抗体用量<sup>[11]</sup>。因此,AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 抗体的最适浓度分别为 4.2、7.2 和 9.6  $\mu\text{g/ml}$ 。

表 1 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 抗体标记量的确定

Table 1 Making certain the quantity of labeling antibody for AFB<sub>1</sub>, ZEN, DON

管号	胶体金 /ml	10% NaCl /ml	AFB <sub>1</sub>		ZEN		DON	
			抗体量/ $\mu\text{g}$	显色结果	抗体量/ $\mu\text{g}$	显色结果	抗体量/ $\mu\text{g}$	显色结果
1	1	0.1	5.5	红色	16	红色	16	红色
2	1	0.1	5.0	红色	14	红色	14	红色
3	1	0.1	4.5	红色	12	红色	12	红色
4	1	0.1	4.0	红色	10	红色	10	红色
5	1	0.1	3.5	红色	8	红色	8	红色
6	1	0.1	3.0	浅红色	6	红色	6	浅红色
7	1	0.1	2.5	浅蓝色	4	浅红色	4	浅蓝色
8	1	0.1	2.0	蓝色	2	蓝色	2	蓝色
9	1	0.1	0.0	深蓝色	0	深蓝色	0	深蓝色

### 2.4 T 线最佳浓度的确定

C 线山羊抗小鼠 IgG 包被浓度为 1.0 mg/ml,当 T 线 AFB<sub>1</sub>-BSA 包被量为 1.0 mg/ml, AFB<sub>1</sub> 试纸条显色较好,加标后有明显的梯度,标准品浓度  $\geq 1.0 \text{ ng/ml}$  时,试纸条检测为阳性;当 T 线 ZEN-BSA 包被量为 1.4 mg/ml,加标后有明显的梯度,标准品浓度  $\geq 5.0 \text{ ng/ml}$  时,试纸条检测为阳性;当 T 线 DON-BSA 包被量为 0.8 mg/ml,加标后有明显的梯度,标准品浓度  $\geq 100 \text{ ng/ml}$  时,试纸条检测为阳性。

由此可见 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 试纸条的灵敏度依次为 1.0、5.0、100 ng/ml。

### 2.5 三联检测卡的质量评价

#### 2.5.1 样品检测限的确定

如表 2 所示,阴性样品小米和麦仁中, AFB<sub>1</sub> 加入浓度为 2.5 ng/g 时,结果显示阴性,而加入 5.0 ng/g 及以上浓度时,结果为阳性,说明样品检测限为 5.0 ng/g。同理,阴性样品玉米糝和大米中 AFB<sub>1</sub> 的检测限均为 10 ng/g,说明不同样品中 AFB<sub>1</sub>



的检测限不完全相同。而在小米、玉米糝、麦仁和大米 4 种样品中,ZEN 的检测限均为 60 ng/g, DON

的检测限均为 1 000 ng/g。所有检测项目重复 3 次试验,结果均一致,试验重复性较好。

表 2 谷物中 3 种真菌毒素检测限的确定

Table 2 Results of detection limit determination of three kinds test strip

谷物名称	AFB <sub>1</sub> 加标结果					ZEN 加标结果					DON 加标结果				
	0 ng/g	2.5 ng/g	5.0 ng/g	10 ng/g	20 ng/g	0 ng/g	15 ng/g	30 ng/g	60 ng/g	90 ng/g	0 ng/g	500 ng/g	750 ng/g	1 000 ng/g	1 500 ng/g
小米	- - -	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
玉米糝	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
麦仁	- - -	- - -	+ + +	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
大米	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +

注: - - - 表示 3 次重复试验样品加标结果均为阴性; + + + 表示 3 次重复试验样品加标结果均为阳性

2.5.2 与 HPLC 法比较

检测样品中 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 时,两种方法结果均一致,阳性率分别为 33.3% (20/60)、38.3% (23/60) 和 33.3% (20/60)。4 种样品中,玉米糝受 3 种毒素污染的情况最为严重,阳性样品数分别为

7 份(AFB<sub>1</sub>)、9 份(ZEN)和 7 份(DON),阳性率依次为 46.7% (7/15)、60.0% (9/15)和 46.7% (7/15),小米受污染情况最轻,阳性样品数分别为 4 份(AFB<sub>1</sub>)、3 份(ZEN)和 2 份(DON),阳性率分别为 26.7% (4/15)、20.0% (3/15)和 13.3% (2/15)。结果见表 3。

表 3 GICA 法和 HPLC 法检测谷物结果比较 (ng/g)

Table 3 Comparison of detecting results between GICA and HPLC

样品编号	GICA/HPLC			样品编号	GICA/HPLC			样品编号	GICA/HPLC		
	AFB <sub>1</sub>	ZEN	DON		AFB <sub>1</sub>	ZEN	DON		AFB <sub>1</sub>	ZEN	DON
1	+ /18	+ /65	- / -	21	- / -	- / -	- / -	41	+ /39	+ /76	- / -
2	- / -	- / -	+ /1 100	22	+ /17	+ /63	+ /1 147	42	- / -	- / -	- / -
3	- / -	+ /93	- / -	23	- / -	- / -	+ /1 078	43	- / -	+ /85	- / -
4	- / -	+ /64	+ /1 020	24	- / -	+ /66	- / -	44	- / -	+ /89	+ /1 158
5	- / -	- / -	- / -	25	+ /22	- / -	+ /1 138	45	+ /43	+ /92	+ /1 423
6	- / -	+ /70	+ /1 087	26	+ /25	+ /73	- / -	46	- / -	- / -	- / -
7	+ /29	- / -	- / -	27	- / -	- / -	+ /1 431	47	+ /9	- / -	- / -
8	- / -	- / -	- / -	28	- / -	- / -	- / -	48	- / -	- / -	- / -
9	+ /16	+ /79	- / -	29	- / -	- / -	- / -	49	- / -	+ /87	- / -
10	- / -	- / -	- / -	30	- / -	+ /71	+ /1 210	50	+ /13	- / -	- / -
11	+ /35	- / -	+ /1 123	31	+ /23	- / -	- / -	51	+ /18	+ /81	+ /1 045
12	- / -	- / -	- / -	32	- / -	+ /65	+ /1 145	52	- / -	- / -	- / -
13	- / -	- / -	- / -	33	+ /35	+ /78	- / -	53	- / -	- / -	- / -
14	- / -	- / -	- / -	34	+ /42	- / -	+ /1 302	54	- / -	- / -	+ /1 560
15	- / -	- / -	- / -	35	- / -	- / -	- / -	55	+ /7	- / -	- / -
16	- / -	- / -	+ /1 056	36	+ /27	+ /93	- / -	56	- / -	+ /69	- / -
17	- / -	- / -	- / -	37	- / -	+ /105	+ /1 400	57	- / -	- / -	- / -
18	+ /29	+ /86	- / -	38	- / -	- / -	- / -	58	- / -	- / -	- / -
19	+ /10	+ /67	- / -	39	+ /50	+ /74	+ /1 036	59	- / -	- / -	- / -
20	- / -	- / -	+ /1 300	40	- / -	- / -	+ /1 321	60	- / -	- / -	- / -

注:样品编号中 1~15 是大米样品,16~30 是麦仁样品,31~45 是玉米糝样品,46~60 是小米样品;- / - 表示 GICA 结果和 HPLC 结果均为阴性;阳性结果举例说明: + /18 表示 GICA 结果阳性,HPLC 检测样品中 AFB<sub>1</sub> 含量为 18 ng/g

2.5.3 特异性试验

3 种试纸条检测各自浓度小于灵敏度的标准品时,结果为阴性,检测浓度大于等于灵敏度的标准品时,结果为阳性;但检测浓度为 1.0、5.0、100 和 500 ng/ml 的结构类似物及其他霉菌毒素时,结果均为阴性,表明试纸条的特异性较好,并且 3 种真菌毒素之间没有交叉反应。结果见表 4。

2.5.4 稳定性试验

检测卡于 37 ℃ 条件下保存 8 周,检测阴性溶液均为两条线(T 线和 C 线),检测 100 ng/ml 的标准

品均为一条线(C 线),且 T 线和 C 线条带清晰。因此根据 37 ℃ 条件下 1 d 相当于室温下 1 周计算<sup>[16]</sup>,本检测卡在室温可以保存 12 个月。

3 讨论

为了能够准确、快速、简便的检测谷物(小米、玉米糝、麦仁和大米)中 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON,本试验应用 GICA 法研制出 3 种试纸条并组装成真菌毒素三联检测卡。该卡在检测样品时,选择能较好溶解 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON 的甲醇-PBS 缓冲液(7:3, V/V)

表 4 3 种真菌毒素胶体金试纸条特异性试验结果

Table 4 Results of specificity of three kinds test strip

标准品名称	与 AFB <sub>1</sub> 试纸条反应				与 ZEN 试纸条反应				与 DON 试纸条反应			
	1	5	100	500	1	5	100	500	1	5	100	500
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
AFB <sub>1</sub>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AFB <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AFM <sub>1</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DON	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
赭曲霉毒素 A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T-2 毒素	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZEN	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
玉米赤霉醇	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：- 表示标准品与待检试纸条无交叉反应；+ 表示标准品与待检试纸条有交叉反应

作为萃取液,能最大限度地回收样品中的真菌毒素。同时,萃取时间短,仅需 5 min。样品检测限试验中,除玉米中 AFB<sub>1</sub> 的检测限(10 ng/g)比国家标准低(20 ng/g)外,其余均与国家标准一致,因此能满足市场需求。60 份样品用 HPLC 法和 GICA 法检测结果基本一致,故用三联检测卡能准确地检测真菌毒素的实际含量。该卡还具有特异性强、稳定性好、不需要特殊仪器和设备的特点,适用于现场大批量样品的快速检测。

影响胶体金试纸条质量的因素很多,如胶体金颗粒的大小与 pH 值、金标抗体量、抗原包被量等。本试验根据经验制备粒径为 25 nm 的胶体金颗粒。胶体金溶液的 pH 值是影响标记的重要因素,本试验选用 Mey 氏稳定化试验,最终确定 AFB<sub>1</sub> 和 ZEN 最适 pH 值为 7.5, DON 最适 pH 值为 7.0<sup>[17]</sup>。金标抗体量和抗原包被量直接影响试纸条的灵敏度,当抗体的量太大,在与样品中高浓度抗原结合后剩余的金标抗体与 NC 膜上的包被抗原结合,表现为竞争抑制不明显,检测灵敏度降低;当金标抗体的量太小,导致 T 线显色不明显,容易出现假阳性,故在有效范围内,金标抗体量越小,试纸条的灵敏度越高。T 线上抗原的包被浓度也至关重要,包被浓度太高容易造成假阴性,反之,会增加假阳性率。本试验通过优化抗体标记量和抗原包被量,保证了试纸条的灵敏度,同时使 T 线和 C 线显色适中、均一。

真菌毒素是真菌产生的有毒次级代谢产物,这些毒素污染食品和饲料,使人和动物中毒。据联合国粮农组织估算,全球每年约有 25% 的农产品受到真菌毒素的污染,我国农产品中真菌毒素污染更为严重,已成为农业可持续发展的重要限制因素之一<sup>[18]</sup>。本试验检测从超市、集贸市场购买的谷物中的 AFB<sub>1</sub>、ZEN 和 DON,结果阳性率分别为 33.3%、38.3% 和 33.3%,4 类样品均有不同程度的霉菌毒素污染,玉米糝受 3 种毒素污染最为严重,进一步验证了食品中真菌毒素的污染较为严重;因此,建立

更快速、更简便、特异性更好、灵敏度更高,适合我国真菌毒素污染控制和检测的技术具有重要意义。

### 参考文献

- [1] 王萍. 黄曲霉毒素免疫胶乳快速检测技术的研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2007.
- [2] 马德宏, 周元军. 饲料中黄曲霉毒素的危害及其控制措施[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(1): 80-81.
- [3] MURATA H, SULTANA, SHIMADA N, et al. Structure-activity relationships among zearalenone and its derivatives based on bovine neutrophil chemiluminescence[J]. Vet Hum Toxicol, 2003, 45(1): 18-20.
- [4] IKUNAGA Y, SATO I, GROND S, et al. *Nocardioides* sp. strain WSN05-2, isolated from a wheat field, degrades deoxynivalenol, producing the novel intermediate 3-epi-deoxynivalenol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(2): 419-427.
- [5] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量:GB 2761—2011[S]. 北京:中国标准出版社, 2011.
- [6] 熊齐荣, 金涌, 邢仕歌, 等. 胶体金试纸条法快速筛查小麦和玉米中脱氧雪腐镰刀菌烯醇的研究[J]. 食品科技, 2014, 39(2): 292-296.
- [7] 李翘, 桑丽雅, 陈笑笑, 等. 玉米赤霉烯酮胶体金快速检测试剂板的研制[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(2): 457-462.
- [8] 吴文晔, 徐炜, 李艳, 等. 同时检测两种真菌毒素的胶体金试纸条的研制[J]. 食品工程, 2011(4): 46-49.
- [9] SUN Q, ZHU Z, DENG Q M, et al. A “green” method to detect aflatoxin B<sub>1</sub> residue in plant oil based on a colloidal gold immunochromatographic assay[J]. Analytical Methods, 2015, 8(3): 564-569.
- [10] BELOGLAZOVA N V, SPERANSKAYA E S, WU A, et al. Novel multiplex fluorescent immunoassays based on quantum dot nanolabels for mycotoxins determination[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 62(6): 59-65.
- [11] ROMANO E L, ROMANO M. Staphylococcal protein a bound to colloidal gold: a useful reagent to label antigen-antibody sites in electron microscopy[J]. Molecular Immunology, 1977, 14(9/10): 711-715.
- [12] 郑荣, 毛丹, 张道广, 等. HPLC 法测定常用食品中玉米赤霉烯酮[J]. 中国卫生检验杂志, 2008, 18(11): 2266-2267.

- [13] 毛丹, 许勇, 张道广, 等. HPLC法测定粮谷中的呕吐毒素[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12):2207-2208.
- [14] 李迎梅, 孙晓红, 刘彤, 等. 高效液相色谱法检测食品中黄曲霉毒素含量[J]. 中国卫生标准管理, 2014, 5(1):93-94.
- [15] 余传霖. 现代医学免疫学[M]. 上海:上海医科大学出版社, 1998: 725-726.
- [16] VERHEIJEN R, OSSWALD I K, DIETRICH R, et al. Development of a one step strip test for the detection of (dihydro) streptomycin residues in raw milk [J]. Food and Agricultural Immunology, 2000, 12(1): 31-40.
- [17] WANG Y, WANG L, ZHANG J, et al. Preparation of colloidal gold immunochromatographic strip for detection of *Paragonimiasis skrjabini* [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92034.
- [18] 徐剑宏, 祭芳, 陆琼娟, 等. 谷物真菌毒素的控制策略[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(6): 642-646.

## 实验技术与方法

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定竹笋中百草枯的残留

纪律, 李启, 雷永良, 徐峻卿

(丽水市疾病预防控制中心, 浙江 丽水 323000)

**摘要:**目的 运用超高效液相色谱-串联质谱联用技术, 建立竹笋中百草枯残留的检测方法。方法 样品用甲醇-0.1 mol/L 盐酸溶液(1:1, V/V)提取后, 经 Oasis WCX 固相萃取柱(60 mg/3 ml)净化, 采用 UPLC BEH HILIC 色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)分离, 正离子多反应监测模式监测, 外标法定量。结果 百草枯在 10 ~ 500 μg/L 范围内具有良好线性关系, 相关系数为 0.998 2, 检出限为 2 μg/kg, 定量限为 5 μg/kg。进行 5、50 和 200 μg/kg 三个浓度的样品加标试验, 回收率为 82.2% ~ 104.8%, 相对标准偏差为 8.3% ~ 10.9%。结论 该方法简便、灵敏、准确, 适合于竹笋中百草枯的检测。

**关键词:**超高效液相色谱-串联质谱; 百草枯; 竹笋; 食品污染物; 农药

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2017)03-0312-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2017.03.012

## Determination of paraquat residues in bamboo shoots by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Ji Lyu, Li Qi, Lei Yong-liang, Xu Jun-qing

(Lishui Center for Disease Prevention and Control, Zhejiang Lishui 323000, China)

**Abstract: Objective** To establish a detection method for paraquat residues in bamboo shoots by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Methods** Samples were extracted with methanol-0.1 mol/L hydrochloric acid solution (1:1, V/V). After cleaned up with Oasis WCX solid phase extraction columns (60 mg/3 ml), samples were separated in UPLC BEH HILIC column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm). The analytes were detected with mass spectrometer in multiple reaction monitoring mode with external standard. **Results** It showed good linearity with the correlation coefficients of 0.998 2 in the range of 10-500 μg/L. The limit of detection was 2 μg/kg and the limit of quantitation was 5 μg/kg. Under 5, 50 and 200 μg/kg spiked levels, the recoveries ranged from 82.2% to 104.8% with the relative standard deviation (RSD) of 8.3% -10.9%. **Conclusion** The results indicated that this method was simple, rapid, sensitive and suitable for the determination of paraquat residues in bamboo shoots.

**Key words:** Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry; paraquat; bamboo shoots; food contaminants; pesticide

收稿日期: 2017-04-02

基金项目: 浙江省医药卫生一般研究计划项目(2016KYB339)

作者简介: 纪律 女 主管技师 研究方向为理化检验 E-mail: jilv1231@126.com

通信作者: 雷永良 男 主任技师 研究方向为卫生检验 E-mail: jilv1231@126.com