

化学发光免疫分析方法检测粮食谷物中赭曲霉毒素 A 残留

叶云锋^{1*}, 李研东², 吴雨洋³, 熊雅婷³, 刘 薇³

(1. 广西兽药监察所, 南宁 530001; 2. 河北省兽药监察所, 石家庄 050051;
3. 北京维德维康生物技术有限公司, 北京 100095)

摘要: **目的** 建立粮食谷物中赭曲霉毒素 A(ochratoxin A, OTA)残留检测的化学发光免疫分析方法。**方法** 人工改造 OTA 半抗原、制备包被原和多克隆抗体工作液, 优化检测步骤, 验证各项评价指标, 比较化学发光免疫分析方法和高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)的实际样本检测结果的一致性, 以此来实现化学发光免疫分析方法的建立。**结果** 50%抑制浓度(IC₅₀)为 0.278 μg/L; OTA 的最低检出限为 5.0 μg/kg, 样本添加回收率在 65.4% 到 115.8%之间, 批内、批间相对标准偏差 < 15%。同时, 通过对实际样本检测, 证明化学发光免疫分析方法具有显著的准确度和可靠性。**结论** 基于化学发光免疫分析方法能够实现粮食作物中的 OTA 残留的快速检测, 灵敏度高、成本低、时间短, 为食品中霉菌毒素残留的快速检测提供了新的技术参考。

关键词: 化学发光酶联免疫技术; 赭曲霉毒素 A; 粮食谷物

Determination of ochratoxin A residues in grains and cereals by chemiluminescence immunoassay

YE Yun-Feng^{1*}, LI Yan-Dong², WU Yu-Yang³, XIONG Ya-Ting³, LIU Wei³

(1. Guangxi Institute of Veterinary Drug Control, Nanning 530001, China; 2. Hebei Provincial Veterinary Drug Administration, Shijiazhuang 050051, China; 3. Beijing WDWK Biotechnology Co., Ltd, Beijing 100095, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of ochratoxin A residues in grains and cereals by chemiluminescence immunoassay. **Methods** The ochratoxin A hapten was engineered to prepare the coating solution of the original and polyclonal antibody. The detection procedure was optimized and the evaluation indexes were validated. The consistency of the actual sample test results was compared between chemiluminescence immunoassay method and high performance liquid chromatography (HPLC) in order to achieve the establishment of chemiluminescence immunoassay. **Results** The 50% binding inhibition (IC₅₀) values of the method were 0.278 μg/L for ochratoxin A under optimum conditions. The recoveries ranged from 65.4% to 115.8%, the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were less than 15%. The limits of detection (LODs) for the assay were 5.0 μg/kg. Finally, grains and cereals samples were analyzed by chemiluminescence immunoassay, and the results correlated well with those obtained using traditional ELISA and HPLC. **Conclusion** Chemiluminescence immunoassay has been proved to be an effective analytical technique for using in ochratoxin A monitoring owing to its high sensitivity,

*通讯作者: 叶云锋, 高级工程师, 主要研究畜禽产品安全、快速检测技术与方法研究。E-mail: 649372879@qq.com

*Corresponding author: YE Yun-Feng, Senior Engineer, Guangxi Institute of Veterinary Drug Control, No.51, Youyi North Road, Nanning, 530001, China. E-mail: 649372879@qq.com

low cost and ease of handling, which provides a new technical reference for the rapid detection of mycotoxins residues in food.

KEY WORDS: chemiluminescence immunoassay; ochratoxin A; grains and cereals

1 引言

赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)广泛存在于谷物、饲料、果汁、葡萄酒、啤酒、干果中^[1], 污染范围广, 被人 and 动物吸收后, 可以长时间在生物体内蓄积^[2], 具有强烈的肾毒性、肝毒性、细胞毒性、免疫毒性, 还具有潜在的致癌性, 被国际癌症研究机构列为 IIB 类致癌物质^[3]。在目前已发现的真菌毒素中, OTA 因其危害性和重要性被认为是仅次于黄曲霉毒素的真菌毒素^[4]。因而建立高灵敏度 OTA 检测方法对食品安全的控制具有重要意义^[5]。

目前对 OTA 的检测方法主要有高效液相色谱-质谱法 (high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)^[6,7]、气相色谱-质谱法 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[8,9]、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[10] 和酶联免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等^[11], 但是仪器方法所需要的设备昂贵, 操作复杂, 通常作为定量和确证方法^[12]。因此, 急需寻找快速、准确、可视化、大批量的检测方法来实现食品中赭曲霉毒素 A 的快速高通量检测。

化学发光免疫分析技术是借助于化学发光反应的高灵敏性和免疫反应的高特异性而建立的一种测定方法^[13], 具有灵敏度高、特异性强、成本低、方法稳定快速、检测范围宽、操作简单自动化程度高等优点, 是目前发展和推广应用最快的免疫分析方法。高灵敏度的化学发光检测技术已被广大研究人员所认可, 广泛应用于免疫分析、环境生物医药科学和临床化学等方面, 成为药物残留检测发展的一种趋势^[14,15]。

本研究基于抗原抗体特异性反应, 建立化学发光免疫分析技术, 制备相应的 OTA 化学发光免疫分析方法^[16-18], 用于实现粮食谷物中 OTA 残留含量的检测。同时, 与 HPLC 进行比较, 验证化学发光免疫法的可行性。通过本研究可以更好地满足我国食品企业、政府职能监管部门等开展检测工作的需要。

2 材料与方法

2.1 材料与仪器

本实验中用于检测的粮食谷物样本(玉米、小麦、大米)均购于北京的大型超市; OTA 标准品(美国 Sigma 公司, 浓度为 1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 去离子水、浓缩洗涤液(磷酸缓冲液)、HRP 发光底物液(鲁米诺)(北京华迈科生物技术有限责任公司)。

BILON-WX08 型高速电动匀浆机(上海比朗仪器制造有限公司); HQ-60 型恒温振荡器(北京方正生物科技发展有限公司); TDL-40C 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂); 微量移液器(美国 Thermo); Anglent1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 全自动化学发光免疫分析仪(北京维德维康生物技术有限公司)。

2.2 化学发光免疫分析方法建立

2.2.1 人工抗原的制备

基于 OTA 的活性基团结构特点, 对 OTA 半抗原进行了人工设计改造, 半抗原结构式如图 1 所示, 并以 OTA 半抗原为原料进行包被原制备。利用 OTA 半抗原与卵清蛋白 (ov-albumin, OVA) 偶联得到包被原。取 5.3 mg 半抗原, 溶于 0.5 mL N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-dimethylformamide, DMF) 溶液, 同时取 18 mg OVA, 溶于 2.0 mL 0.1 mol/L 磷酸缓冲液, 将两溶液混合。逐滴加入 10.0 mg 1-(3-二甲基胺丙基)-3-乙基碳二亚胺 (1-(3-dimethylaminopropyl)3-ethylcarbodiimide, EDC) 的磷酸缓冲液, 室温搅拌 2 h, 透析 3 d, 得到包被原溶液。

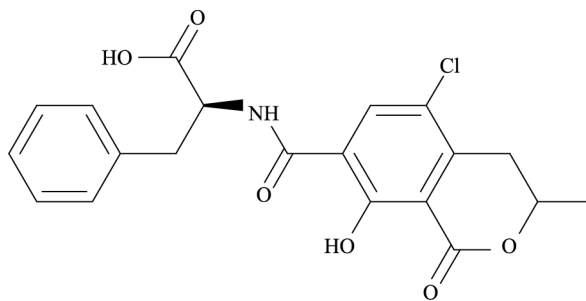


图 1 OTA 结构式
Fig. 1 Structure of OTA

2.2.2 多克隆抗体工作液的制备

取 10 mg 牛血清白蛋白, 用 pH 7.4、0.02 mol/L 的 PBS 缓冲液溶解并定容至 1000 mL, 得到抗体稀释液。将已制备的多克隆抗体用抗体稀释液稀释至 10000 倍体积, 得到多克隆抗体工作液。

2.2.3 样本或标准品检测方法操作步骤

向已包被抗原的化学发光微孔板中加入标准品溶液或待测样本溶液 (50 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 再加入抗体工作液 (50 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 稀释比例为 1:100000, V:V), 室温反应 20 min, 弃上清, 洗涤 4 次, 用吸水纸拍干, 每孔加入 100 μL 新鲜配制发光底物液 (A 液和 B 液等体积混合), 用化学发光仪检测每孔的光子数。

2.3 建立标准曲线

在空白标准溶液中加入 OTA 标准品达到一系列浓度: 0、0.033、0.1、0.3、0.9、2.7 和 8.1 $\mu\text{g/L}$ 利用化学发光免疫分析仪检测, 以标准品溶液浓度($\mu\text{g/L}$)为横坐标, 以百分光子计数强度 $[(B/B_0) \times 100\%]$ 为纵坐标, 绘制标准曲线图。根据标准曲线的回归方程可以求出待测样本溶液中 OTA 的含量。

2.4 检测结果分析

为了评价化学发光免疫分析方法的可靠性, 采用空白样本(不含 OTA)进行回收率实验, 分别对检出限、准确度、精密度和特异性各指标进行验证。

2.4.1 检测限

以最低检测限作为灵敏度指标。分别取 20 份玉米、小麦、大米空白样本进行检测, 检测信号值, 并通过标准曲线得到待测物浓度, 计算各对应浓度值的标准差(standard deviation, *SD*), 检测平均值加 3 倍标准差即为该样本的最低检测限(limit of detection, LOD)。

2.4.2 精密性与准确度

选取玉米、小麦、大米空白样本, 添加各药物检测限附近浓度标准品并检测, 每个浓度重复验证 10 次, 并统计添加回收率和变异系数。

2.4.3 实际样品检测验证

为了评价化学发光免疫分析方法的准确性, 利用高效液相色谱法^[19]和化学发光免疫分析方法对实际样本检测结果进行一致性分析。其中, 高效液相色谱法定量限为 3.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

3 结果与分析

3.1 检测原理

当在化学发光微孔板上预包被半抗原与载体蛋白的偶联物时, 加入待测样本溶液, 随后加入一抗和酶标二抗, 待测样本溶液中残留的 OTA 与化学发光板上包被的包被原竞争一抗, 然后与酶标二抗的进一步结合, 加入化学发光底物液(鲁米诺), 发光强度与待测样本溶液中 OTA 的含量成负相关, 与标准曲线比较即可得出待测样本溶液中 OTA 的残留量^[20]。

3.2 标准曲线的绘制

在空白标准溶液中加入 OTA 标准品达到一系列浓度: 0、0.033、0.1、0.3、0.9、2.7 和 8.1 $\mu\text{g/L}$, 根据样本检测操作步骤进行实验, 用化学发光检测仪检测其光子数量, 并建立标准曲线, 重复 5 次实验, 结果如图 2 可知, 横坐标为标准品溶液浓度($\mu\text{g/L}$)的半对数值, 纵坐标为百分光子计数强度 $(B/B_0) \times 100\%$, 相关系数 $R^2=0.9992$, 通过多次试验可得, 50%抑制浓度(IC_{50})为 0.278 $\mu\text{g/L}$, 线性范围是 0.070~1.79 $\mu\text{g/L}$ 。

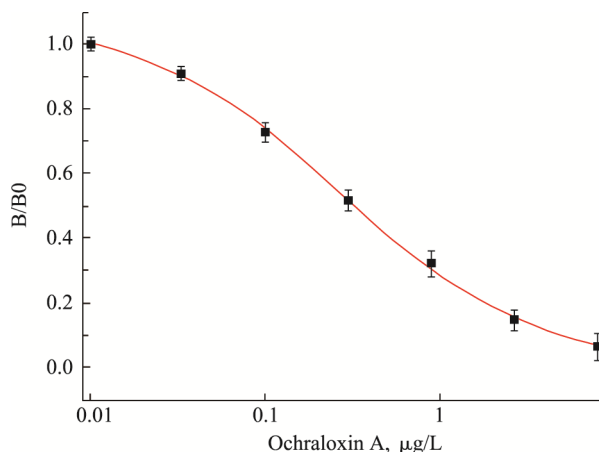


图 2 OTA 标准曲线($n=5$)

Fig. 2 Standard curve of OTA ($n=5$)

3.3 检出限

以最低检测限作为灵敏度指标。为测定化学发光免疫分析法的检出限, 分别取 20 份玉米、小麦、大米样品进行检测, 计算样品光子数的平均值, 并将此平均值带入标准曲线得到对应的样品浓度, 计算各对应浓度值的 *SD*, 由平均值加 3 倍标准差即为该样品的 LOD, 结果见表 2 所示。由实验结果可知: OTA 在玉米、小麦、大米中的最低检出限分别为 3.48、4.29、4.13 $\mu\text{g/kg}$, 为保障检测方法的准确和化学发光免疫产品的稳定性, 避免出现假阴性和假阳性的情况, 设定 OTA 残留化学发光免疫分析法的在玉米、小麦、大米中的检出限为 5.0 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 1 最低检测限验证
Table 1 Verification of LOD

检测指标	样品	样品平均测定值 ($\mu\text{g/L}$, $n=20$)	<i>SD</i> ($n=20$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)
OTA	玉米	3.09	0.13	3.48
	小麦	3.07	0.34	4.29
	大米	3.47	0.22	4.13

3.4 准确度和精密度

为了验证化学发光免疫分析法在检测限附近有良好的准确度和精密度, 向玉米、小麦、大米中分别添加 OTA 标准品至终浓度为 5.0、10.0 $\mu\text{g/L}$ 。每个浓度样品重复实验 10 次, 并且连续 3 d 重复试验, 分别计算检测值、平均回收率和批内、批间相对标准偏差。结果分别见表 2。

结果表明: OTA 在玉米、小麦、大米中的平均添加回收率在 65.4~115.8%; 批内、批间相对标准偏差(relative standard deviation, *RSD*)均 < 15%, 说明化学发光免疫分析法的准确度良好、精密度高。

表 2 准确度和精密度验证($n=10$)
Table 2 Verification of accuracy and precision ($n=10$)

样品	添加浓度($\mu\text{g/L}$)	批内			批间		
		检测值($\mu\text{g/L}$)	回收率(%)	相对标准偏差(%)	检测值 ($\mu\text{g/L}$)	回收率(%)	相对标准偏差(%)
玉米	5.0	4.56±0.4	91.2	8.7	4.84±0.7	96.8	14.4
	10.0	8.97±0.5	89.7	5.6	8.95±0.7	89.5	7.8
小麦	5.0	5.18±0.6	103.6	11.5	5.79±0.8	115.8	13.8
	10.0	9.63±0.7	96.3	7.6	8.78±0.7	87.8	7.9
大米	5.0	3.27±0.4	65.4	12.2	3.45±0.5	69.0	14.4
	10.0	7.91±0.8	79.1	10.1	7.89±1.1	78.9	13.9

表 3 实际样检测结果
Table 3 Results of actual samples test

样品编号	化学发光免疫分析法($\mu\text{g/L}$)	高效液相色谱法($\mu\text{g/L}$)	显著性分析
小麦 7	10.9±1.1	11.6	$P\text{-value}=0.873 > 0.05$
玉米 6	18.3±1.9	16.7	
大米 8	27.9±3.3	28.4	
小麦 1~6、8~10; 玉米 1~5、7~10; 大米 1~7、9、10	< LOD	< LOD	

3.5 实际样本验证

为了验证化学发光免疫分析技术在实际粮食谷物样本中检测的准确性,采用国标高效液相色谱法^[19]和化学发光免疫法分别对 30 份玉米、小麦、大米实际样品进行分析,检测结果见表 3。

从表中结果可以看出,2 种方法对样品的阳性检测结果一致。对 2 组检测结果进行显著性差异分析,结果显示, P 值为 0.873($P > 0.05$),说明 2 种方法的检测结果无显著性差异,进一步证实了化学发光免疫分析技术的准确性。此外,与高效液相色谱法相比,化学发光免疫分析技术操作便捷,反应时间快,检测成本低,准确度高,便于在现场大批量样本检测中推广。

4 结论与讨论

本研究发现,化学发光免疫分析技术在玉米、大米、小麦等粮食谷物中多种 OTA 残留的检测最低检出限为 5.0 $\mu\text{g/L}$;平均添加回收率在 65.4%~115.8%之间,批内、批间 RSD < 15%。同时,对实际样本进行了检测,结果表明,化学发光免疫分析技术在粮食谷物中 OTA 类药物残留检测的结果与高效液相色谱法一致,准确度高,操作便捷,检测成本低,优势明显。

目前,关于化学发光免疫分析法在谷物中赭曲霉毒素 A 的应用和产品研制报道不多,本研究应用 HRP-鲁米诺系统作为发光显色系统,相较于传统的酶联免疫方法,发光稳定性更强,显色平台期更久,适合作为快速检测产品进行开发。

本研究覆盖了大米、玉米、小麦等国内主要粮食作物样本,且 IC_{50} 为 0.278 $\mu\text{g/L}$,线性范围可达 0.070~1.79 $\mu\text{g/L}$,与国内同类研究报道^[21,22]相比,检测样本更丰富,灵敏度较高,线性范围更广泛,为后期技术成果转化成为相应产品奠定了基础。

综上所述,本研究建立的化学发光免疫分析技术能够实现大米、玉米、小麦中 OTA 含量的快速检测,并且灵敏度高、操作简单、反应时间快、成本低,具有良好的准确性和可靠性,为我国谷物中赭曲霉毒素 A 的化学发光免疫分析快速检测产品的研制和推广提供了有力的技术支持和参考。

参考文献

- 王颖,张妮娜,雒丽娜,等. 赭曲霉毒素 A 检测方法的研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(5): 757-760.
Wang Y, Zhang NN, Luo LN, et al. Advances in detection of ochratoxin A [J]. Chin J Health Lab, 2014, 24(5): 757-760.
- 杨琳,马良. 免疫学法检测赭曲霉毒素 A 研究进展[J]. 粮食与油脂,

- 2010, (1): 33–35.
- Yang L, Ma L. Preparation of ochratoxin A by immunological method [J]. *Food Fats*, 2010, (1): 33–35.
- [3] Yang X, Liu S, Huang CC, *et al.* Ochratoxin A induced premature senescence in human renal proximal tubular cells [J]. *Toxicology*, 2017, 382(382): 75–83.
- [4] 张爱华, 冯璐璐, 马彦娜, 等. 赭曲霉毒素A分析方法研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2012, 28(7): 1003–1008.
- Zhang AH, Feng LL, Ma YN, *et al.* Advances in analysis of ochratoxin A [J]. *Chin J Pub Health*, 2012, 28(7): 1003–1008.
- [5] 冯才伟. 饲料和食品中真菌毒素快速检测方法开发及应用[C]. 中国分析测试协会科学技术奖发展回顾, 2015.
- Feng CW. Development and application of rapid detection method of mycotoxin in feed and food [C]. *China Science and Technology Commission of China Analysis and Testing Association*, 2015.
- [6] 毛丹, 郑荣, 王柯, 等. HPLC法测定谷类食品中的赭曲霉毒素A[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, (1): 53–55.
- Mao D, Zheng R, Wang K, *et al.* Determination of ochratoxin A in cereal food by HPLC [J]. *Chin J Health Lab*, 2010, (1): 53–55.
- [7] 杨菲, 王培龙, 石雷, 等. 赭曲霉毒素A速测技术研究[J]. *农产品质量与安全*, 2015, (4): 41–47.
- Yang F, Wang PL, Shi L, *et al.* Study on rapid measurement technology of ochratoxin A [J]. *J Agric Prod Qual Saf*, 2015, (4): 41–47.
- [8] 杨扬. 赭曲霉毒素A的单克隆抗体制备及胶体金检测方法研究[D]. 北京: 北京农学院, 2012.
- Yang Y. Preparation of monoclonal antibody against ochratoxin A and colloidal gold detection method [D]. Beijing: Beijing Agricultural College, 2012.
- [9] Ghali R, Hmaissia-khlifa K, Ghorbel H, *et al.* HPLC determination of ochratoxin A in high consumption Tunisian foods [J]. *Food Control*, 2009, 20(8): 716–720.
- [10] Ratola N, Martins L, Alves A. Ochratoxin A in wines-assessing global uncertainty associated with the results [J]. *Anal Chim Acta*, 2004, 513(1): 319–324.
- [11] Tessini C, Mardones C, Baer VD, *et al.* Alternatives for sample pre-treatment and HPLC determination of ochratoxin A in red wine using fluorescence detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 660(1/2): 119–126.
- [12] 孙亚宁, 胡晓飞, 邓瑞广, 等. 赭曲霉毒素A人工抗原的合成与鉴定[J]. *食品工业科技*, 2011, (5): 172–175.
- Sun YN, Hu XF, Deng RG, *et al.* Synthesis and identification of ochratoxin A artificial antigens [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2011, (5): 172–175.
- [13] 李鑫, 李培武, 张奇, 等. 农产品中赭曲霉毒素A免疫层析试纸条快速检测技术研究[J]. *中国油料作物学报*, 2014, 36(5): 648–652.
- Li X, Li PW, Zhang Q, *et al.* Study on rapid detection of ochratoxin A immunochromatographic test strips in agricultural products [J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2014, 36(5): 648–652.
- [14] 李沐洁, 奚茜, 张明洲, 等. 赭曲霉毒素A直接竞争ELISA试剂盒的研制[J]. *中国粮油学报*, 2012, 27(9): 116–123.
- Li MJ, Xi Q, Zhang MZ, *et al.* Development of an anti-competitive ELISA kit for ochratoxin A [J]. *Chin J Grain Oil*, 2012, 27(9): 116–123.
- [15] 邱云青, 王伟, 李凤琴. 化学发光酶免疫分析法检测食品中赭曲霉毒素[J]. *食品科学*, 2010, 32(24): 432–435.
- Qiu YQ, Wang W, Li FQ. Detection of ochratoxin in food by chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. *Food Sci*, 2010, 32(24): 432–435.
- [16] 陈效兰. 鲁米诺化学发光体系的增强研究及其相关应用[D]. 长沙: 中南大学, 2013.
- Chen XL. Study on enhancement of luminol chemiluminescence system and its related applications [D]. Changsha: Central South University, 2013.
- [17] 农天雷. 常用化学发光免疫分析技术及其特点[J]. *现代医药卫生*, 2011, 27(14): 2156–2158.
- Nong TL. Commonly used chemiluminescence immunoassay technology and its characteristics [J]. *Mod Med Hyg*, 2011, 27(14): 2156–2158.
- [18] Tao XQ, Jiang HY, Yu XZ, *et al.* Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and florfenicol amine in ham sausage with a hybrid chemiluminescent immunoassay [J]. *Food Addit Contam A*. 2012, 4(12): 4083–4090.
- [19] GB 5009.96-2016 食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素A的测定[S]. GB 5009.96-2016 National food safety standard Determination of ochratoxin A in food [S].
- [20] 张良, 陈灰, 韩盈盈. 黄曲霉毒素B₁间接竞争化学发光酶免疫分析方法的建立[J]. *中国兽医学报*, 2013, 33(3): 454–457.
- Zhang L, Chen H, Han YY. Development of an indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for aflatoxin B₁ [J]. *Chin J Vet Med*, 2013, 33(3): 454–457.
- [21] 刘星, 许杨, 何庆华. 谷物中赭曲霉毒素A化学发光酶免疫分析法的建立[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(4): 204–208.
- Liu X, Xu Y, He QH. Development of chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of ochratoxin A in cereal [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(4): 204–208.
- [22] 胡娜, 刘仁荣, 常军, 等. 赭曲霉毒素A化学发光免疫分析技术的建立[J]. *食品科技*, 2010, 35(7): 300–302.
- Hu N, Liu RR, Chang J, *et al.* Development of the detection direct chemiluminescence immunoassay for ochratoxin A [J]. *Food Sci Technol*, 2010, 35(7): 300–302.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



叶云锋, 高级工程师, 主要从事畜禽
产品安全、快速检测技术与方法研究。
E-mail: 649372879@qq.com