

胶体金快速检测条法测定玉米油中 玉米赤霉烯酮含量

李凤旭^{1*}, 吴维吉¹, 李旭¹, 刘佳¹, 王晋威¹, 李荃¹, 李兴元², 张瑞华²

(1. 中国天津粮油批发交易市场, 天津 300171; 2. 天津市粮油质量检测中心, 天津 300171)

摘要: 目的 建立胶体金快速检测条法测定玉米油中玉米赤霉烯酮含量的分析方法, 并与高效液相色谱法作比对。**方法** 分别运用胶体金快速检测条法和免疫亲和层析净化高效液相色谱检测法对 14 个玉米油中玉米赤霉烯酮的含量进行检测。**结果** 对实验结果进行成对样本 *t*-检验, 发现 2 种实验方法所得出的结果在 95% 的置信水平上无显著差异。同时运用胶体金快速检测条法对每个样品进行 6 次重复实验, 分析其变异系数范围在 2.9%~6.3%, 说明此种方法的重复性较好。**结论** 胶体金检测条法可以作为玉米油中玉米赤霉烯酮的快速检测方法。

关键词: 胶体金; 高效液相色谱法; 玉米赤霉烯酮; 成对样本 *t*-检验

Comparison of rapid determination of zearalenone in corn oil by colloidal gold strip method and high performance liquid chromatography

LI Feng-Xu^{1*}, WU Wei-Ji¹, LI Xu¹, LIU Jia¹, WANG Jin-Wei¹, LI Quan¹,
LI Xing-Yuan², ZHANG Rui-Hua²

(1. China Tianjin Grain & Oil Wholesale Trade Market, Tianjin 300171, China; 2. Tianjin Grain & Oil Quality Inspection Center, Tianjin 300171, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of zearalenone in corn oil by colloidal gold strip method, and to compare with high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The zearalenone content in 14 corn oil was detected by the methods of colloidal gold test strip and immunoaffinity chromatography purification HPLC, respectively. **Results** The results of the paired sample *t*-test showed that there was no significant difference between the 2 methods in the 95% confidence level. At the same time, the colloidal gold test strip was used to conduct 6 repeated experiments for each sample, the coefficient of variation were 2.9%-6.3%, indicating that the method has good repeatability. **Conclusion** The colloidal gold test strip can be used as a rapid method for the detection of zearalenone in corn oil.

KEY WORDS: colloidal gold; high performance liquid chromatography; zearalenone; paired sample *t*-test

1 引言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN), 又称 F-2 毒素, 是

由禾谷镰刀菌、三线镰刀菌及串珠镰刀菌等产生的一种雌激素类真菌毒素^[1], 广泛存在于玉米、小麦、高粱等谷物及其制品中, 具有很强的生殖发育毒性和致畸作用, 可导

*通讯作者: 李凤旭, 工程师, 主要研究方向为粮油食品中真菌毒素的检测。E-mail: learn1224@126.com

*Corresponding author: LI Feng-Xu, Engineer, China Tianjin Grain & Oil Wholesale Trade Market, Tianjin 300171, China. E-mail: learn1224@126.com

致家禽和牲畜的生长缓慢和免疫抑制等,并能够通过食物链进入人体,产生血液和免疫毒性,并且具有致癌活性可导致肿瘤,对人类健康带来巨大危害^[2-4]。

目前检测玉米赤霉烯酮的方法主要有薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)^[5]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[6,7]、液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)^[8,9]、生物检测法和免疫学检测法等。薄层色谱法是最早建立的一种检测方法,特点是简便、成本低、对检测人员和仪器设备要求低,但是其灵敏度也较低,适合定性或半定量检测 ZEN。高效液相色谱法是国际上检测 ZEN 最常用的定量检测方法,该方法的特点是灵敏度高、定量准确、结果稳定,但是所需仪器设备昂贵,不适合大批样品的筛选,为降低检出限和减少感染,通常需结合免疫亲和柱。液相色谱-质谱法的检测灵敏度高、重现性好、准确可靠、定性定量兼顾和多组分同时检测等优点,但是所需仪器设备十分昂贵,不具有普及性且对实验人员要求较高。胶体金免疫层析法是将免疫胶体金技术与层析技术结合起来建立的一种快速免疫学检测技术,胶体金免疫层析试纸主要由底板、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫和吸水垫组成。利用膜的毛细效应,将特异性抗原(或抗体)固定于膜上作为检测带,胶体金标记物在玻璃纤维的结合释放垫上,其一端连接膜,一端连接样品垫,当加入样品后,样品通过扩散作用向前移动通过含标记物的玻璃纤维,与胶体金标记物反应,之后继续向前移动至检测线,这样标记物与待测物的反应产物就会被检测线捕获,呈现明显的可观测结果^[10,11]。

我国粮油收购过程中要求短小时内检测大量样本的真菌毒素含量。因此,研究建立灵敏、准确、快速且容易操作的玉米赤霉烯酮检测技术具有重要意义^[12]。胶体金快速检测条法具有操作简单、快速、无需复杂仪器、稳定性较好、检测成本低和适合现场检测等特点,非常适合大量样本的快速检测^[13]。而玉米油是以玉米为原料制取的油,测定玉米油中是否含有玉米赤霉烯酮十分重要。本文采用胶体金快速检测方法检测玉米油中玉米赤霉烯酮含量,并与高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)作比对,考查该方法测定玉米油中玉米赤霉烯酮含量的灵敏度与准确性,为建立灵敏、准确、快速且容易操作的玉米赤霉烯酮检测技术提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品来源

玉米原油 2 份,精炼玉米油 12 份;均来源于抽样,3 号精炼玉米油和 14 号玉米原油为阴性样品,其余样品人工添加了玉米赤霉烯酮,充分混匀。

2.1.2 胶体金快速检测条法

RMQ45L2123ROSA M QUAD 孵化器(45 °C 5 min)、RRM-NB1597ROSA-M Reader、LF-ZEARQ-FAST5-100K ROSA ZEARQ-FAST5 Test 快速定量检测条(美国 CHARM SCIENCES INC 公司)。

2.1.3 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

玉米赤霉烯酮免疫亲和柱(规格 1 mL,北京华安麦科生物技术有限公司);LC 2030 高效液相色谱、RF-20Axs 荧光检测器(日本岛津公司);Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm, 美国 Waters 公司)。

1 mg 装 ZEN 标准品(纯度 ≥ 99%,以色列 FERMENTEK 公司);甲醇、乙腈(色谱纯,天津市化学试剂供销公司);去离子水(18.2 MΩ 自制)。

2.2 实验方法

2.2.1 定量检测条法

称取 5.00 g 油样于 50 mL 离心管中,用移液管加入 10 mL 70%甲醇溶液,涡旋振荡 10 min 充分混合提取。经离心机 4000 r/min 离心 10 min,吸取 100 μL 上清液和 1.0 mL ZEARQ-FAST5 稀释缓冲液混合,静置 5 min,待测。

2.2.2 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

参照国标 GB 5009.209-2016 第一法,称取 10.00 g 油样于 50 mL 离心管中,加入 1.0 g 氯化钠和 20 mL 90%乙腈溶液,涡旋振荡 10 min 充分混合提取。经离心机 4000 r/min 离心 10 min,吸取 10 mL 上清液,加入 40 mL 水混匀后玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清。取滤液 10 mL 经过玉米赤霉烯酮免疫亲和柱吸附,再用 10 mL PBS 清洗缓冲液和 10 mL 水先后淋洗、吹干,再用 2~3 mL 色谱纯甲醇洗脱、收集,氮气吹干,用 1 mL 流动相溶解,待测。

2.3 样品检测

2.3.1 定量检测条法

提前 10 min 打开 ROSA M QUAD 孵育器等待温度升至 45 °C,将检测条编号,放入孵育器中,揭开检测条上的贴膜至黑色标线处。吸取混合待测液 300 μL 加入样品槽中,盖上贴膜。盖上孵育器盖子并锁定,孵育 5 min。取出检测条插入 ROSA-M Reader 读数仪,读取结果。读数仪定量范围为 0~350 μg/kg,定量下限为 15 μg/kg。超出定量上限范围的样品需要进行二次稀释,即吸取首次待测液 300 μL 加入 1.0 mL ZEARQ-FAST5 稀释缓冲液充分混合,作为二次稀释液再次测量。

2.3.2 免疫亲和层析净化高效液相色谱法

液相色谱条件为:色谱柱:Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:乙腈:水:甲醇(46:46:8, V:V:V);流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;柱温:35°C;检测波长:激发波长 274 nm,发射波长 440 nm。

将 ZEN 标准品配置成 10、50、100、200、500、1000 ng/mL 的标准工作液(表 1),用来绘制标准曲线,所

得标准曲线方程为 $Y=788.0X-1130$, 相关系数 $r=0.9999$, 符合实验要求, 可以使用。

表 1 ZEN 标准曲线
Table 1 ZEN standard curve

序号	浓度/(ng/mL)	峰面积
1	0.00	0
2	10.00	6523
3	50.00	38397
4	100.00	76442
5	200.00	154854
6	500.00	395670
7	1000.00	785978

3 结果与分析

利用高效液相色谱法参考国标 GB 5009.209-2016 第一法对 14 个油样品分别进行 6 次重复检测, 6 次结果的平均值作为每个油样品的参考值(表 2), 该法检出限为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 低于 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品视为未检出, 通过实验结果可以看出高效液相色谱法的检测结果变异系数较小, 说明此种方法平行性很好。

利用胶体金检测条法对阴性样品 3 号油和 14 号油分别重复检测 18 次, 通过实验结果可以看出胶体金检测条的检出限为平均值加 3 倍标准差得数为 $6 \mu\text{g}/\text{kg}$, 定量限 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$, 对于阴性样品胶体金检测条法会有数值较低的假阳性出现, 尤其色素含量较高的原油假阳性出现的概率会比较大, 假阳性结果的数值都低于定量限(表 3)。

表 2 高效液相色谱法测定 14 种油样品的实验结果
Table 2 Results of 14 oil samples by HPLC

样品名称	高效液相色谱检测浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$						平均值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	变异系数/%
	1	2	3	4	5	6		
玉米油 1	41.66	42.46	42.51	44.03	42.67	42.80	42.7	1.6
玉米油 2	117.68	121.06	120.77	120.55	119.19	117.01	119.4	1.3
玉米油 3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
玉米油 4	72.33	69.70	71.89	70.63	69.56	72.06	71.0	1.6
玉米油 5	110.36	111.21	108.03	109.91	110.35	109.40	109.9	0.9
玉米油 6	81.36	84.05	82.55	81.16	80.21	83.87	82.2	1.7
玉米油 7	244.11	247.30	242.09	240.88	248.73	241.37	244.1	1.2
玉米油 8	165.42	171.01	173.44	167.35	164.98	170.57	168.8	1.8
玉米油 9	111.16	113.09	116.66	115.75	112.00	112.86	113.6	1.7
玉米油 10	72.62	73.48	70.77	71.48	75.03	71.26	72.4	2.0
玉米油 11	309.56	313.30	315.01	306.72	310.68	313.50	311.5	0.9
玉米油 12	1117.60	1134.98	1097.13	1126.85	1133.46	1118.27	1121.4	1.1
玉米油 13*	146.35	143.16	148.62	147.93	146.06	148.09	146.7	1.3
玉米油 14*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

注: *为玉米原油。

表 3 胶体金法测定阴性样品
Table 3 Results of negative samples by colloidal gold test strip method

样品名称	胶体金检测条检测浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$										平均值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	标准偏差/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检出限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	定量限/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
	0	1	0	3	0	2	1	3	0					
玉米油 3	0	1	0	3	0	2	1	3	0	1.39	1.30	5.28	14.36	
	0	2	0	2	0	2	2	4	3					
玉米油 14	4	1	4	3	2	2	3	3	1	2.72	1.15	6.16	14.18	
	3	4	2	3	4	5	2	1	2					

表4 2种实验结果对比
Table 4 Compare the 2 experimental results

样品名称	胶体金检测条检测浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)						平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	变异系数	HPLC/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	1	2	3	4	5	6			
玉米油 1	47	49	45	51	46	43	46.8	5.6%	42.7
玉米油 2	137	125	126	116	126	128	126.3	4.9%	119.4
玉米油 3	0	1	0	3	0	2	ND		ND
玉米油 4	75	72	68	73	70	81	73.2	5.7%	71.0
玉米油 5	112	110	109	128	106	113	113.0	6.3%	109.9
玉米油 6	88	80	86	96	91	83	87.3	6.0%	82.2
玉米油 7	267	241	271	260	265	249	258.8	4.1%	244.1
玉米油 8	184	171	186	162	180	179	177.0	4.6%	168.8
玉米油 9	111	115	122	126	120	128	120.3	4.9%	113.6
玉米油 10	72	65	75	72	68	77	71.5	5.6%	72.4
玉米油 11	322	335	327	314	318	306	320.3	2.9%	311.5
玉米油 12*	1077	1136	1012	1167	1026	1064	1080.3	5.1%	1121.4
玉米油 13	161	146	152	141	155	157	152.0	4.4%	146.7
玉米油 14	4	1	4	3	2	2	ND		ND

注: *高于 350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的结果为二次稀释测定的结果。

由表 4 中 2 种方法的结果对比可以看出 3 号油和 14 号油胶体金检测条的检测结果低于该种方法的检出限, 视为未检出, 与液相色谱检测结果一致。胶体金检测条法初次测定的浓度范围为 15~350 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 二次稀释测定的浓度范围为 300~1400 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 用此种方法分别对 12 个阳性油样进行 6 次重复检测, 所得结果变异系数范围为 2.9%~6.3%, 重复性较好。

表5 成对样本 t 检验
Table 5 Paired sample t -test

	t	df	Sig.(双侧)
胶体金检测条-高效液相色谱	0.473	11	0.645

采用 IBM SPSS Statistics19 软件对 2 种实验方法的阳性结果进行了成对样本 t 检验, 所得的结果如表 5 所示^[14,15]。由 t 检验结果可以看出在 95%的置信区间上 $P=0.645>0.05$, 说明 2 种实验方法所得阳性结果无显著差异。

4 结论与讨论

本研究表明, 无论是对玉米原油还是对精炼后的一级油, 无论是初次测定还是二次稀释后测定的结果, 胶体金快速检测条法都具有比较好的重复性, 同时与液相色谱法无较大差异。原油中的色素对实验结果影响不大, 对于

阴性结果的判定胶体金检测条法比较准确, 同时对超出初次测定浓度范围的样品也能够得到较好的结果。胶体金检测条法又具有携带方便, 节省时间, 操作简便, 能够同时处理大量样品的优点。当然这种方法也存在一些问题, 比如结果比较粗略、波动比较大, 会有一定的假阳性结果等; 但是面对时间紧、批量大的任务时, 胶体金检测条法完全可以作为初步筛查的手段, 筛查出可疑的样品进一步进行精确检测, 这样既能节省时间又能节省成本。作为传统方法的辅助检测手段, 胶体金检测条法值得推广。

参考文献

- [1] 杨小丽, 杨美华, 欧阳臻. 玉米赤霉烯酮及其衍生物分析方法的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(7): 234-238.
Yang XL, Yang MH, Ouyang Z. Advances in the analytical methods of zearalenone and its derivatives [J]. Guizhou Agric Sci, 2011, 39(7): 234-238.
- [2] 姜淑贞, 杨维仁, 杨在宾. 玉米赤霉烯酮的代谢、毒性及其预防措施[J]. 动物营养学报, 2011, 23(2): 196-202.
Jiang SZ, Yang WR, Yang ZB. Metabolism, toxicity and preventive measures of zearalenone [J]. Chin J Anim Nutr, 2011, 23(2): 196-202.
- [3] 何庆华, 许杨. 玉米赤霉烯酮毒性研究及检测方法进展[J]. 卫生研究, 2005, 34(4): 502-504.
He QH, Xu Y. Advance in study on zearalenone's toxicity and determination [J]. J Hyg Res, 2005, 34(4): 502-504.
- [4] 单妹, 许梓荣, 冯建蕾. 玉米赤霉烯酮对家畜繁殖性能和人体健康的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(1): 3-5.

- Shan M, Xu ZR, Feng JL. Influence of zearalenone on livestock reproductive performance and human health [J]. *Chin Anim Husband Veter Med*, 2006, 33(1): 3-5.
- [5] 吴文达, 王宝杰, 蔡兰芬, 等. 薄层色谱和高效液相色谱联合检测玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(7): 17-20.
- Wu WD, Wang BJ, Cai LF, *et al.* Detection of zearalenone by thin layer chromatography combined with high performance liquid chromatography [J]. *Anim Husband Veter Med*, 2010, 42(7): 17-20.
- [6] 康维钧, 王玉平, 杨福江, 等. 反相高效液相色谱法测定玉米中玉米赤霉烯酮[J]. *分析实验室*, 2007, 26(10): 66-68.
- Kang WJ, Wang YP, Yang FJ, *et al.* Detection of zearalenone in corn by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *Chin J Anal Lab*, 2007, 26(10): 66-68.
- [7] 谢刚, 王松雪, 崔华, 等. 超高效液相色谱法快速检测粮食中玉米赤霉烯酮的含量[J]. *粮油食品科技*, 2014, 22(2): 71-75.
- Xie G, Wang SX, Cui H, *et al.* Rapid detection of zearalenone in grain by UPLC [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2014, 22(2): 71-75.
- [8] 徐飞, 刘峰, 张亚军, 等. 液相色谱-串联质谱法测定粮食中的玉米赤霉烯酮[J]. *中国食品卫生杂志*, 2015, 27(2): 124-126.
- Xu F, Liu F, Zhang YJ, *et al.* Determination of zearalenone in grain and its products by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Food Hyg*, 2015, 27(2): 124-126.
- [9] 应永飞, 朱聪英, 韦敏珏, 等. 液相色谱-串联质谱法测定饲料中 14 种霉菌毒素及其类似物[J]. *分析化学*, 2010, 38(12): 1759-1764.
- Ying YF, Zhu CY, Wei MY, *et al.* Simultaneous determination of 14 mycotoxins and analogues in feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(12): 1759-1764.
- [10] 宫小明, 郝莹, 董静, 等. 真菌毒素检测技术的研究进展[J]. *检验检疫学刊*, 2010, 20(2): 67-69.
- Gong XM, Hao Y, Dong J, *et al.* Review of research progress for the detection of mycotoxins [J]. *Inspect Quarant Sci*, 2010, 20(2): 67-69.
- [11] 包懿, 李智瑾. 谷物中玉米赤霉烯酮检测方法的研究进展[J]. *分析化学*, 2016, 44(1): 7-13.
- Bao Y, Li ZJ. Research progress on the determination methods of zearalenone in grain [J]. *Adv Anal Chem*, 2016, 6(1): 7-13.
- [12] 王桂芳, 李培真, 曹阳, 等. 胶体金测试条法对粮食中玉米赤霉烯酮快速定量测定的应用研究[J]. *粮食科技与经济*, 2014, 39(1): 32-34.
- Wang GF, Li PZ, Cao Y, *et al.* Application of colloidal gold test strip method for rapid quantitative determination of zearalenone in corn [J]. *Food Sci Technol Econ*, 2014, 39(1): 32-34.
- [13] 牟钧, 潘蓓, 杨军, 等. 胶体金免疫层析法快速测定玉米和小麦中玉米赤霉烯酮[J]. *粮油食品科技*, 2011, 19(5): 43-45.
- Mou J, Pan B, Yang J, *et al.* Rapid determination of zearalenone in corn and wheat by colloidal gold immunochromatography [J]. *Sci Technol Cere Oils Foods*, 2011, 19(5): 43-45.
- [14] 王丽丽. 假设检验中关于检验问题探讨[J]. *科技视界*, 2018, (22): 82-84.
- Wang LL. Discussion on T test problems in hypothesis test [J]. *Sci Technol Vision*, 2018, (22): 82-84.
- [15] 兰冲锋. 统计学教学中关于假设检验问题探讨[J]. *湖南城市学院学报(自然科学版)*, 2016, 25(2): 303-304.
- Lan CF. Discussion on hypothesis test problems in statistics teaching [J]. *J Hunan City Univ (Nat Sci Ed)*, 2016, 25(2): 303-304.

(责任编辑: 武英华)

作者简介



李凤旭, 工程师, 主要研究方向为粮油食品中真菌毒素的检测。
E-mail: learn1224@126.com