

QD-Infinity 免疫荧光定量法快速测定玉米中 呕吐毒素的适用性研究

马 志¹, 刘松雁², 董明杰¹, 田 梅², 赵义良^{2*}

(1. 深圳市赛泰诺生物技术有限公司, 深圳 518108; 2. 石家庄畜产品质量监测中心, 石家庄 050041)

摘 要: 目的 建立 QD-Infinity 免疫荧光法快速测定玉米中呕吐毒素含量的方法, 为玉米中呕吐毒素现场筛查提供快速、有效的检测/监测手段。**方法** 通过测定玉米质控样、阴性玉米的添加回收率, 与高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法测定天然玉米进行比较, 对 QD-Infinity 免疫荧光测定法的准确度、精密度及其检出限与定量限进行全面评估。**结果** 玉米质控样中呕吐毒素含量测定值均在其理论值范围内; 回收率结果为 109.77%、107.83% 和 111.01%, 变异系数分别为 9.77%、7.83%、11.01%; 与 HPLC 法相比, 测定 26 份玉米结果的相对偏差在 1.20%~5.78% 之间; 该方法的检出限与定量限分别为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、32 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

结论 QD-Infinity 免疫荧光法是一种有效、实用的分析方法, 能用于玉米中呕吐毒素的定量检测。

关键词: QD-Infinity 免疫荧光测定法; 食品饲料玉米; 呕吐毒素; 定量检测

Applicability of QD-Infinity immunofluorescence quantitative assay for rapid detection of vomitoxin in corn

MA Zhi¹, LIU Song-Yan², DONG Ming-Jie¹, TIAN Mei², ZHAO Yi-Liang^{2*}

(1. Shenzhen Sitechno Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen 518000, China;

2. Shijiazhuang Livestock Products Quality Inspection & Supervision Center, Shijiazhuang 050041, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of vomitoxin in corn by QD-Infinity immunofluorescence, and provide a rapid and effective means of detecting and monitoring vomitoxin in corn.

Method The accuracy, precision, limit of detection and limit of quantitation of QD-infinity immunofluorescence assay were evaluated comprehensively by determining the vomitoxin in corn quality control material, detecting addition recovery of negative maize, and comparing the results of detection of natural corn samples by high performance liquid chromatography. **Results** The content of vomitoxin in corn quality control material (different levels) were in their own scope of accreditation. The recovery rate in negative corn samples were 109.77%, 107.83% and 111.01%, and the variable coefficient were 9.77%, 7.83% and 11.01%, respectively. Compared with HPLC, the relative deviations of results of testing natural corn samples were between 1.20%–5.78%. The limit of detection

ju(LOD) was 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the limit of quantitation (LOQ) was 32 $\mu\text{g}/\text{kg}$. **Conclusion** QD-Infinity immunofluorescence assay is an effective and practical method for analysis, which can be used in quantitative detection of vomitoxin in corn.

基金项目: 石家庄市科学技术研究与发展计划(181500083A)

Fund: Supported by the Technology Research and Development Program of Shijiazhuang (181500083A)

*通讯作者: 赵义良, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yiliang_zhao@yeah.net

*Corresponding author: ZHAO Yi-Liang, Professor, Shijiazhuang Animal Product Quality Monitoring Center, No.3, Yixi Street, Chang'an District, Shijiazhuang 050041, China. E-mail: yiliang_zhao@yeah.net

KEY WORDS: QD-Infinity immunofluorescence assay; food corn or feed corn; vomitoxin; quantitative detection

1 引言

真菌毒素(mycotoxin), 为一类小分子次级代谢产物, 由真菌(fungi)在适宜温度、湿度条件下产生, 在食品(粮食和饲料)卫生安全领域又俗称为霉菌毒素^[1,2], 这些毒性物质可经过被污染的农产品、谷物及动物源性食品进入我们的食物链, 通过抑制蛋白质和相关酶的合成, 对细胞结构、动物肝脏、肾脏、神经、造血等组织器官造成不同程度的损伤甚至破坏, 严重可导致致癌、致畸、致突变, 对人和动物的生存与健康造成重大威胁^[3-5]。

呕吐毒素(vomitoxin), 又称脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON), 主要来自镰刀菌属(*Fusarium*), 尤其是禾谷镰刀菌和黄色镰刀菌, 是主要真菌性毒素污染物之一, 根据其毒性欧盟分类标准将其划分为三级致癌物^[6,7]。呕吐毒素在自然界中污染非常广泛, 主要存在于小麦、大麦和玉米等粮食类食品中^[8,9], 其中, 玉米是世界上最重要的食粮之一, 同时也是动物饲料必不可少的主要原料类别。建立呕吐毒素的快速、稳定、科学的定量分析方法, 对于粮食类食品中 DON 的暴露和风险评估具有重要意义^[10-15]。

随着人们对食品安全问题关注度的提高, 霉菌毒素污染问题也受到国家及世界各国政府的日益关注和重视, 食品(粮食和饲料)安全被提到了相当高的重视水平, 对各种微量毒素的定量检测提出了更高、更快的要求。QD-Infinity 免疫荧光测定法可实现玉米中呕吐毒素的准确、快速、定量检测/监测, 为真菌毒素开展有效的检测, 并加强相关环节的监管提供了强有力的理论依据与技术支撑。

2 材料与方法

2.1 试剂和材料

呕吐毒素快速定量检测产品, 深圳市赛泰诺生物技术有限公司, 常温避光储存(2~30 °C); 天然玉米样品(食品级、饲料级, 市场购买或食品饲料生产企业获取)。

甲醇(分析纯, 国药集团试剂有限公司); 脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶液标准物质(100.7±3.2 μg/mL, 国家粮食局科学研究院); 低浓度呕吐毒素玉米质控品(理论值 500±100 μg/kg)、中浓度呕吐毒素玉米质控品(理论值 1077±73 μg/kg)、高浓度呕吐毒素玉米质控品(理论值 2700±200 μg/kg)、StarLine™呕吐毒素免疫亲和柱(美国 ROMER 公司); 实验用水均为超纯水。

2.2 仪器和设备

QD-Infinity 系列霉菌毒素快速定量免疫荧光分析仪

(深圳市赛泰诺生物技术有限公司); 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 样品中呕吐毒素的提取

(1) QD-Infinity 免疫荧光法样品提取

取玉米待测样大于 500 g, 经粉碎(研磨)机进行充分粉碎, 过 20 目筛混匀样品, 称取样品 5 g 于容器中(如 50 mL 离心管), 加入 55% 甲醇溶液 25 mL, 混匀, 置摇床振荡 10 min, 选择 4000 r/min 离心 5 min, 收集上层甲醇提取液, 待下一步使用。

(2) 免疫亲和柱法样品提取

按照国标 GB 5009.111-2016《食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定》第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法^[16]进行试样提取、净化、洗脱。

2.3.2 检测

(1) QD-Infinity 免疫荧光法

取上述 2.3.1(1)甲醇提取液 100 μL 与 ST 缓冲液 400 μL 振荡混匀, 得待检液, 取 75 μL 待检液垂直滴入呕吐毒素检测卡的加样孔中, 静置反应 15 min 后检测卡经 QD-Infinity 快速免疫荧光分析仪检测分析。

(2) 高效液相色谱法

取上述 2.3.1(2)的洗脱液, 按照国标 GB 5009.111-2016 第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法进行测试分析。

2.3.3 QD-Infinity 免疫荧光法检出限与定量限的确定

连续独立测定 20 份空白样(天然阴性玉米样本), 分别按照公式 $\frac{3s}{b}$ 、 $\frac{10s}{b}$ 计算检出限与定量限, 式中: s —20 份空白样品检测值的平均值; b —标准曲线的斜率。

3 结果与分析

3.1 准确性测定

用 QD-Infinity 免疫荧光分析法快速定量检测系统在相同实验条件下, 使用不同检测卡检测同一样品, 分别重复测定不同浓度的 3 个玉米质控样, 每个样品平行检测 3 次, 检测结果均与质控样的理论值相符, 且重复测定的变异系数范围在 0.32%~4.07%之间, 平均变异系数为 2.60%, 检测的准确度符合。结果见表 1。

3.2 回收率与精密度测定

取 5 g 阴性玉米粉, 分别添加脱氧雪腐镰刀菌烯醇溶液标准物质, 浓度分别为 800、2000、3000 μg/kg, 充分混

合, 进行回收率和精密度测定, 每个浓度平行测定 6 次, 取平均值计算相对偏差和回收率。计算加标回收率分别为 109.77%、107.83%、111.01%, 相对偏差分别为 9.77%、7.83%、11.01%, 符合国标定量检测标准要求, 结果见表 2。

3.3 与高效液相色谱法比较测定

用 QD-Infinity 免疫荧光快速定量检测系统分别测定 26 份盲样(天然玉米, 食品级玉米样品, 饲料级玉米样品), 以 GB 5009.111-2016 第二法 免疫亲和层析净化高效液相色谱法规定的相对偏差进行定量准确性比较, 26 组测定结果

的相对偏差为 1.20%~5.78%, 符合率达 100%, 结果见表 3。

3.4 检出限与定量限

系列脱氧雪腐镰刀菌烯醇标准工作液(不同浓度): 0、312、780、1560、3120、6240($\mu\text{g/kg}$)对应的 T/C 值分别为: 6.987、3.433、2.104、1.345、0.722、0.397, 经 Elisa Calc 软件拟合线性回归方程式: $Y=5.33651-2.14025X$, $r^2=0.99869$, 即得斜率(b)=2.14025; 测定 20 份空白样品中呕吐毒素的平均含量(s)为 7.357 $\mu\text{g/kg}$ 。QD-Infinity 免疫荧光快速定量检测系统的检出限为 10 $\mu\text{g/kg}$, 定量限为 32 $\mu\text{g/kg}$ 。

表 1 QD-Infinity 免疫荧光法检测玉米质控样的呕吐毒素含量($\mu\text{g/kg}$)
Table 1 The content of DON in corn quality control material determined by QD-Infinity immunofluorescence assay ($\mu\text{g/kg}$)

样品名称	理论值/($\mu\text{g/kg}$)	检测结果/($\mu\text{g/kg}$)			平均值($\mu\text{g/kg}$)	变异系数/%	平均变异系数/%
		平行 1	平行 2	平行 3			
玉米质控样 1	500±100	496.23	516.33	531.40	514.65	3.43	
玉米质控样 2	1077±73	1120.10	1155.58	1065.63	1113.77	4.07	2.6
玉米质控样 3	2700±200	2627.11	2629.63	2642.72	2633.15	0.32	

表 2 QD-Infinity 免疫荧光法检测玉米样中呕吐毒素的添加回收率(%)
Table 2 The recovery rate test results of DON in corn determined by QD-Infinity immunofluorescence assay (%)

样品名称	检测结果/($\mu\text{g/kg}$)						平均值/($\mu\text{g/kg}$)	相对偏差/%	回收率/%
	结果 1	结果 2	结果 3	结果 4	结果 5	结果 6			
阴性玉米	< 25	< 25	< 25	< 25	< 25	< 25	< 25	—	—
加标 800 $\mu\text{g/kg}$	878.07	897.82	895.87	904.77	821.78	870.59	878.15	9.77	109.77
加标 2000 $\mu\text{g/kg}$	2187.96	2271.98	2100.28	1984.42	2204.10	2190.24	2156.50	7.83	107.83
加标 3000 $\mu\text{g/kg}$	3551.92	3425.20	3317.78	3146.44	3256.36	3283.22	3330.15	11.01	111.01

表 3 2 种定量方法检测玉米样中呕吐毒素含量的比较分析($\mu\text{g/kg}$)
Table 3 The comparative analysis of DON content in corn determined by two quantitative methods ($\mu\text{g/kg}$)

样品名称	检测结果/($\mu\text{g/kg}$)		相对偏差/%	GB 5009.111-2016
	高效液相色谱法	QD-Infinity 法		
玉米样 1	776.21	795.80	2.52	符合
玉米样 2	27.54	26.15	5.05	符合
玉米样 3	119.81	121.25	1.20	符合
玉米样 4	169.30	175.89	3.89	符合
玉米样 5	503.46	514.65	2.22	符合
玉米样 6	645.07	682.36	5.78	符合
玉米样 7	1082.28	1113.77	2.91	符合
玉米样 8	890.03	917.53	3.09	符合
玉米样 9	543.76	532.12	2.14	符合
玉米样 10	368.41	384.19	4.28	符合
玉米样 11	1376.85	1429.61	3.83	符合
玉米样 12	777.01	767.10	1.28	符合

续表 3

样品名称	检测结果/(μg/kg)		相对偏差/%	GB 5009.111-2016
	高效液相色谱法	QD-Infinity 法		
玉米样 13	29.68	30.63	3.20	符合
玉米样 14	246.57	257.36	4.83	符合
玉米样 15	1321.11	1346.65	1.93	符合
玉米样 16	13.26	< 25	—	符合
玉米样 17	1189.00	1213.25	2.04	符合
玉米样 18	457.34	472.96	3.42	符合
玉米样 19	572.35	596.20	4.17	符合
玉米样 20	212.42	214.96	1.20	符合
玉米样 21	157.38	165.52	5.17	符合
玉米样 22	187.75	193.64	3.14	符合
玉米样 23	260.49	264.37	1.49	符合
玉米样 24	228.21	235.98	3.40	符合
玉米样 25	493.82	512.36	3.75	符合
玉米样 26	287.22	298.21	3.83	符合

4 结论与讨论

随着现代科学技术的飞速发展,检测类仪器和产品不断更新,尤其在食品安全、饲料安全和中药材质量安全领域,快速筛查是当前的一种趋势,对质量控制和在线监测具有重要的现实意义。通过平行测定不同浓度的玉米质控样、阴性玉米中呕吐毒素的加标回收率,结果精准、科学;此外,与高效液相色谱法比较测定天然玉米样品中呕吐毒素的含量,26 组测定结果的符合率达 100%,与国标定量检测方法有较高的一致性,结果可靠。QD-Infinity 免疫荧光测定法适用于食品饲料用玉米中呕吐毒素含量的快速测定。

本研究表明 QD-Infinity 免疫荧光测定法准确、可靠,具有快速、灵敏、方便、科学、检测成本低的特点,完全满足农产品中真菌毒素快速检测需求。此外,本方法的内置标准曲线、试剂耗材常温储存的技术优势规避了在不同的环境、检测环节以及检测人员差异带来的检测误差,是一种有效、实用的定量分析方法,为农产品、食品和饲料中真菌毒素污染检测/监测体系的建立提供了强有力的理论依据,为长期从事食品加工(食品加工、饲料加工)、粮食收购和仓储的质量监管工作人员提供了快速、可靠的筛选方法,防止有毒有害物质通过原粮污染食品、饲料,从而保证食品及饲料的质量安全。

参考文献

[1] Sorrenti V, Giacomo CD, Acquaviva R, *et al.* Toxicity of ochratoxin A

and its modulation by antioxidants: A review [J]. *Toxins*, 2013, 5(10): 1742–1766.

[2] Tanaka H, Takino M, Sugita-Konishi Y, *et al.* Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(9): 1422–1428.

[3] 尚艳娥, 杨卫民. CAC、欧盟、美国与中国粮食中真菌毒素限量标准的差异分析[J]. *食品科学技术学报*, 2019, 379(1): 10–15.

Shang YE, Yang WM. Variation analysis of cereals mycotoxin limit standards of CAC, EU, USA and China [J]. *J Food Sci Technol*, 2019, 379(1): 10–15.

[4] Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview [J]. *Int J Food Microbiol*, 2007, 119(1-2): 3–10.

[5] Speijers GJA, Speijers MHM. Combined toxic effects of mycotoxins [J]. *Toxicol Letters*, 2004, 153(1): 91–98.

[6] Krska R, Baumgartner S, Josephs R. The state-of-the-art in the analysis of type-A and -B trichothecene mycotoxins in cereals [J]. *Fresenius J Anal Chem*, 2001, 371(3): 285–299.

[7] Girish CK, Smith TK. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with fusarium mycotoxins on small intestinal morphology of turkeys [J]. *Poul Sci*, 2008, 87(6): 1075–1082.

[8] 王小丹, 杨欣, 徐海斌, 等. 中国不同地区居民谷类食物脱氧雪腐镰刀菌烯醇暴露量及健康风险评估[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 53(4): 394–397.

Wang XD, Yang X, Xu HB, *et al.* Exposure status and health risk assessment of deoxynivalenol from cereals in Chinese population in different regions [J]. *Chin J Prev Med*, 2019, 53(4): 394–397.

[9] World Health Organization. Evaluation of certain contaminants in food:

- seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [M]. Geneva: WHO, 2011.
- [10] Veha A, Teren J, Gyori Z, *et al.* A comparative study of fusarium-damaged kernel and deoxynivalenol contamination in naturally infected wheat samples [J]. *Cere Res Commun*, 2008, 36: 399–399.
- [11] 王丽君, 禹洁, 苏阿龙, 等. 高效液相色谱法测定粮谷类中脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. *中国酿造*, 2017, 36(6): 179–182.
- Wang LJ, Yu J, Su AL, *et al.* Determination of deoxynivalenol in cereals by HPLC [J]. *China Brew*, 2017, 36(6): 179–182.
- [12] 张剑峰, 孙艳芳, 赵岚, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法正、负离子模式测定脱氧雪腐镰刀菌烯醇的比较研究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(10): 3969–3973.
- Zhang JF, Sun YF, Zhao L, *et al.* Comparative study of cation and anion ionization modes for detection of deoxynivalenol by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(10): 3969–3973.
- [13] 鲍蕾, 吴振兴, 石媛媛, 等. 多功能柱净化-高效液相色谱法检测粮谷及其制品中的呕吐毒素[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(3): 776–782.
- Bao L, Wu ZX, Shi YY, *et al.* Determination of deoxynivalenol in grain and grain products by multifunctional column clean-up and high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(3): 776–782.
- [14] 郭建, 王郑平, 曹阳, 等. 高效液相色谱法测定粮食中的脱氧雪腐镰刀菌烯醇[J]. *粮食与食品工业*, 2014, 21(6): 87–89.
- Guo J, Wang ZP, Cao Y, *et al.* Study on rapid determination of deoxynivalenol in grain by UPLC [J]. *Cere Food Ind*, 2014, 21(6): 87–89.
- [15] 国家食品安全评估中心. 2016 年国家食品污染和有害因素风险工作手册[M]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- China National Center for Food Safety Risk Assessment. Working manual of national food pollution and hazardous factors risk in 2016 [M]. Beijing: China Standards Press, 2016.
- [16] GB 5009. 111-2016 食品安全国家标准 食品中脱氧雪腐镰刀菌烯醇及其乙酰化衍生物的测定[S].
- GB5009.111-2016 National food safety standard-Determination of deoxidation and acetylated derivatives in food [S].

(责任编辑: 武英华)

作者简介



马志, 硕士, 主要研究方向为分子生物学。

E-mail: jeff.ma@sitechno.com.cn



赵义良, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: yiliang_zhao@yeah.net