

玉米赤霉烯酮胶体金试纸条质量验证试验

陈佩虹, 苏妙贞, 刘海虹, 周露*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: **目的** 验证玉米赤霉烯酮胶体金试纸条对玉米基质、小麦基质样品中玉米赤霉烯酮检测的准确性。**方法** 根据试纸条说明书方法, 将不同浓度系列的玉米基体和小麦基质质控样品进行前处理后, 用试纸条测定其浓度。**结果** 检测样品为玉米基体时试纸条间无显著性差异, 相对准确率为 99.5%, 检测结果准确; 小麦基体时, 试纸条显著性差异为 39.03(自由度 $df=1$), 相对准确率为 80.5%, 检测结果差异较大。**结论** 该方法基本可行, 适合对玉米中玉米赤霉烯酮的含量进行定性检测, 不适合对小麦中玉米赤霉烯酮含量进行定性检测。**关键词:** 玉米赤霉烯酮胶体金试纸条; 玉米基质; 小麦基质

Quality verification test of zearalenone by colloidal gold test strip

CHEN Pei-Hong, SU Miao-Zhen, LIU Hai-Hong, ZHOU Lu*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To verify the accuracy of detection of zearalenone in corn matrix and wheat matrix samples by zearalenone colloidal gold test strip. **Methods** According to the test strip specification method, the corn substrate and the wheat substrate quality control samples of different concentration series were pretreated, and the concentration was determined by test strips. **Results** There was no significant difference between the test strips when the samples were tested on the corn matrix, the relative accuracy was 99.5%, so the test results were accurate. When the samples were tested on the wheat matrix, the significant difference of the test strip was 39.03 (degree of freedom $df=1$), the relative accuracy was 80.5%. The test results were quite different. **Conclusion** The method is suitable for qualitative detection of zearalenone content in corn, but not suitable for qualitative detection of zearalenone content in wheat.

KEY WORDS: zearalenone colloidal gold test strip; corn substrate; wheat substrate

1 引言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是 Stob 从禾谷镰刀菌的培养液里分离出来的一种真菌毒素(化学式见图 1)^[1,2]。玉米赤霉烯酮具有生殖毒性和肝脏毒性, 导致动物生长下降、免疫抑制、不育、畸形等^[3]。王若军等^[4]研究表明, 中国饲料及饲料原料中 ZEN 的污染比黄曲霉毒素的污染更

为严重。目前食品、饲料中玉米赤霉烯酮的检验方法主要有高效液相色谱法、荧光光度法、液相色谱-质谱法^[5]、超高效液相色谱法^[6]、胶体金免疫层析法^[7]、酶联免疫吸附法^[8]等。其中, 免疫胶体金技术(colloidal gold-based immunochromatographic assay, GICA)是近几年发展起来的食品安全快速检测方法之一, 其原理是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术^[9]。玉

基金项目: 广东省食品药品监督管理局科技创新项目(2018ZDZ06)

Fund: Supported by the Science and Technology Innovation Project of Guangdong Food and Drug Administration (2018ZDZ06)

***通讯作者:** 周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoulu1982@sohu.com

***Corresponding author:** ZHOU Lu, Ph.D, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoulu1982@sohu.com

米赤霉烯酮胶体金试纸条具有简便、省时、样本用量少、结果易判读等特点,何方洋等^[10]建立了一种对谷物中玉米赤霉烯酮残留的胶体金免疫层析法,对市售小麦、大米、黄豆、玉米进行加标检测,该方法检测限为 100 $\mu\text{g/kg}$,灵敏度为 99%,特异性为 94%,假阴性率为 1%,假阳性率为 6%,检测时间为 10 min;李凤旭等^[11]曾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,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;Chen 等^[12]研制出了多重侧流免疫分析同时测定玉米、水稻和花生中的 3 种真菌毒素的方法,其中玉米赤霉烯酮的可视检测限为 50 $\mu\text{g/kg}$,定量分析检测限为 0.42~0.46 $\mu\text{g/kg}$,远低于欧盟标准。本研究通过验证玉米赤霉烯酮胶体金试纸条对玉米基质、小麦基质的加标质控样品的检验准确性,得出该试纸条是否能准确应用于玉米基质、小麦基质的样品检验,以期应用于基层检测、基层执法以及作为初筛或者预实验时需大型仪器验证的实验方法互相补充,节约时间和金钱成本。

2 材料与方法

2.1 仪器与材料

ST8 离心机(赛默飞世尔科技(中国)有限公司);QT-1 旋涡混合器(上海琪特分析仪器有线公司);Milli-Q Advantage A10 型超纯水系统(德国 Merck Millipore 公司);甲醇(分析纯,广州化学试剂厂);玉米赤霉烯酮标准品(100.2 $\mu\text{g/mL}$,广州中实生物科技有限公司);玉米赤霉烯酮胶体金试纸条试剂盒(检出限为 60 $\mu\text{g/kg}$,无锡迪腾敏生物科技有限公司)。

玉米赤霉烯酮系列质控样品(由国家粮食局科学研究院提供):玉米基体 YA、YB、YC、YD 和小麦基体 XA、XB、XC、XD,每种基体分 4 个浓度梯度(表 1)。YA、YB、XA、XB 为阴性样,YC、YD、XC、XD 为阳性样。

表 1 玉米赤霉烯酮系列质控样品量值表

Table 1 Methotrexone series quality control sample quantity table			
样品编号	基体	标准值/($\mu\text{g/kg}$)	扩展不确定度(U)/($\mu\text{g/kg}$)
YA	玉米全粉	< 5	/
YB	玉米全粉	31	4
YC	玉米全粉	59	7
YD	玉米全粉	124	12
XA	全麦粉	< 5	/
XB	全麦粉	34	4
XC	全麦粉	62	6
XD	全麦粉	95	12

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

70%甲醇-水溶液:准确量取 30 mL 去离子水与 70 mL 甲醇(分析纯)充分混合。

2.2.2 样品前处理

1) 在已准备好的装有基质标准物质的离心管中加入 12.5 mL 70%甲醇水溶液,旋涡振荡 3 min,4000 r/min 离心 3 min。

2) 根据表 2,取相应上清液,用样本稀释液进行稀释,涡动 10 s,待检。

表 2 样本稀释
Table 2 Sample dilution

样本	上清液体积/ μL	样本稀释液体积/ μL
玉米	80	400
小麦	50	400

2.2.3 样品检测

1) 打开试纸桶,取所需量金标微孔和试纸条,做好标记并置于桌面上(注:取出微孔和试纸条后,立即盖好筒盖,以防受潮)。

2) 吸取待检样品 200 μL 于金标微孔中,小心吹打至孔底的紫红色颗粒完全溶解(注:该步骤非常重要,吹打时动作要轻柔,避免产生气泡,同时注意必须缓慢抽吸直至混合均匀,肉眼观察无固形物),室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)孵育 10 min。

3) 将试纸条插入金标微孔中,使样品垫充分浸入样品中,并反应 5 min。

4) 从金标微孔中取出试纸条,弃去试纸条下端的样品垫,进行结果判定。

5) 该胶体金试纸条判定结果使用消线法,即以 T 线是否显色来判断被检样品的阴阳性。

3 结果与分析

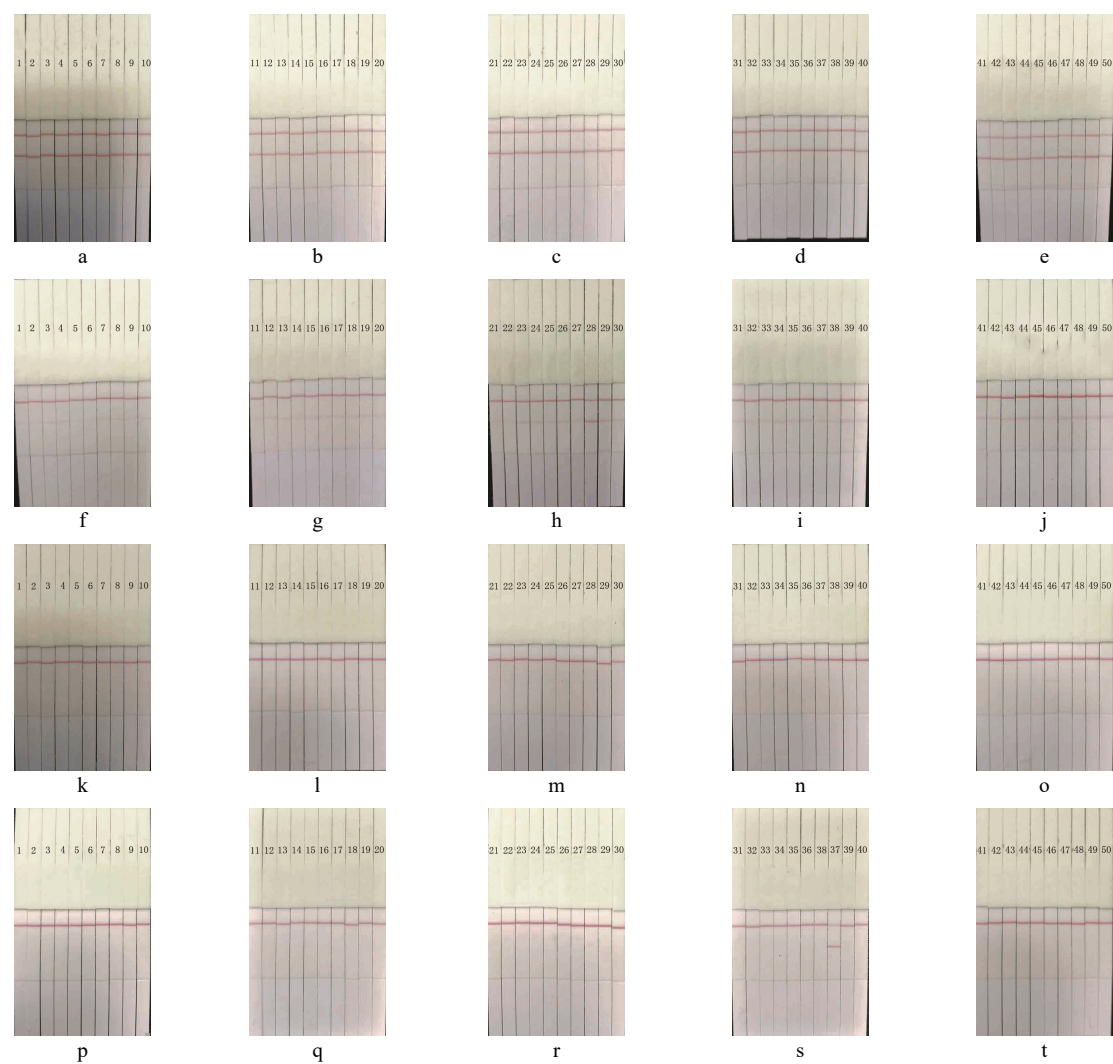
3.1 玉米基体试纸条验证结果与分析

3.1.1 玉米基体试纸条验证结果

玉米基体的试纸条验证结果如图 1 所示。其中,玉米基体 YC 浓度水平中,编号 46 的试纸条检测结果为假阴性,YD 浓度水平中,编号为 37 的样品结果为假阴性。

3.1.2 玉米基体试纸条验证结果分析

玉米基体的试纸条验证结果分析如表 3 所示。通过排除性实验,发现编号玉米基质 YC 浓度水平中编号 46 号和 YD 浓度水平中编号 37 号的试纸条出现假阴性不是试纸条本身质量原因所致。将样品送检后,检测结果为玉米赤霉烯酮加标量不足所致。通过分析可知,试纸条间无显著性差异,灵敏度为 99%,特异性为 100%,假阴性率为 1%,假阳性率为 0%,相对准确率为 99.5%。



注: a~e 为 YA 浓度下 5 次测试; g~j 为 YB 浓度下 5 次测试; k~o 为 YC 浓度下 5 次测试; p~t 为 YD 浓度下 5 次测试

图 1 玉米基胶体金试纸条检测结果

Fig.1 Corn matrix colloidal gold test strip test results

表 3 玉米基胶体金试纸条性能指标计算表
Table 3 Corn matrix colloidal gold test strip performance index calculation table

样品情况	检测结果		总数
	阳性	阴性	
阳性	99	1	100
阴性	0	100	100
总数	99	101	200
显著性差异(χ^2)	$\chi^2=(1-0-1)2/(0+1)=0$, 自由度(df)=1		
灵敏度($p+$, %)	$p+=99/100=99\%$		
特异性($p-$, %)	$p-=100/100=100\%$		
假阴性率($pf-$, %)	$pf-=1/100=1\%$		
假阳性率($pf+$, %)	$pf+=0/100=0\%$		
相对准确度, %	$(99+100)/200=99.5\%$		

3.2 小麦基试纸条验证结果与分析

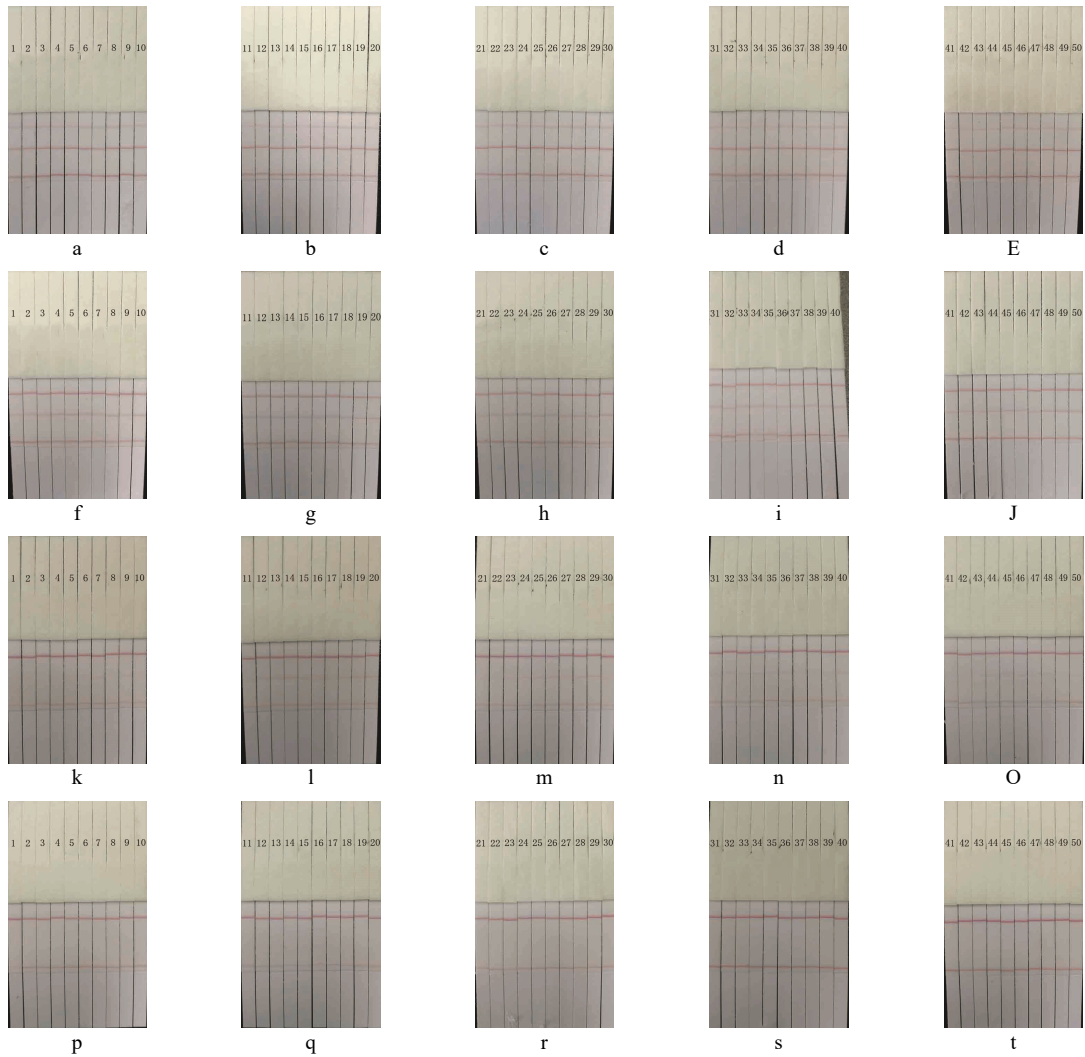
3.2.1 小麦基试纸条验证结果

小麦基体的试纸条验证皆若如图 2。

所示。小麦基体 XC 浓度水平中, 除了编号 1、2、3、4、8、9、21、22、42、49、50 等 11 组的试纸条外, 其余 39 个编号的试纸条均为假阴性。

3.2.2 小麦基试纸条验证结果分析

小麦基体的试纸条验证结果分析如表 4 所示。试纸条显著性差异为 39.03(自由度 $df=1$), 灵敏度为 61%, 特异性为 100%, 假阴性率为 39%, 假阳性率为 0%, 相对准确率为 80.5%。实验过程中试纸条的储藏温度为 15~25 ℃, 空气湿度为 50%~60%; 实验过程中, 实验温度为 23~25 ℃, 空气湿度为 70%。



注: a~e 为 XA 浓度下 5 次测试; g~j 为 XB 浓度下 5 次测试; k~o 为 XC 浓度下 5 次测试; p~t 为 XD 浓度下 5 次测试

图 2 小麦基体胶体金试纸条检测结果

Fig.2 Wheat matrix colloidal gold test strip test results

表 4 小麦基体胶体金试纸条性能指标计算表

Table 4 Wheat matrix colloidal gold test strip performance index calculation table

样品情况	检测结果		总数
	阳性	阴性	
阳性	61	39	100
阴性	0	100	100
总数	61	139	200
显著性差异(χ^2)	$\chi^2 = [(39-0)-1]^2 / (0+39) = 39.03$, 自由度(df)=1		
灵敏度($p+$, %)	$p+ = 61/100 = 61\%$		
特异性($p-$, %)	$p- = 100/100 = 100\%$		
假阴性率($pf-$, %)	$pf- = 39/100 = 39\%$		
假阳性率($pf+$, %)	$pf+ = 0/100 = 0\%$		
相对准确度, %c	$(61+100)/200 = 80.5\%$		

4 结论与讨论

该检测方法基本可行,当检测样品为玉米基体时试纸条间无显著性差异,相对准确率为 99.5%,检测结果准确;当检测样品为小麦基体时,试纸条显著性差异为 39.03(自由度 $df=1$),相对准确率为 80.5%,检测结果差异较大,不够准确。

针对小麦基体试纸条验证试验中, XC 浓度出现的假阴性情况,进行检出限测定实验。以玉米赤霉烯酮标准溶液为样液,稀释至的试纸条检出限浓度范围,试纸条检验结果均为阳性结果。排除试纸条因素,可知,该方法适合对玉米中玉米赤霉烯酮的含量进行定性检测,不适合对小麦中玉米赤霉烯酮含量进行定性检测。

在同等实验条件下,玉米基质在检出限范围内无出

现假阴性, 小麦基质出现假阴性, 实验过程中发现加入样品提取液后, 玉米基体样品完全溶解, 小麦基体样品有结块现象, 可能因为小麦的提取率较低, 导致加标质控样品回收率不足, 造成检测结果出现假阴性。优化样品的前处理方法, 提高基质中玉米赤霉烯酮回收率。

文献指出, 实验操作环境湿度对试纸条检测有较大影响, 应保持环境湿度在 45%~65% 之间^[13,14], 本次进行小麦基体试纸条验证的实验过程中, 实验温度为 23~25 °C, 空气湿度为 70%, 空气湿度高于试纸条的最佳试验温度, 可能对试纸条的检出限有所影响。建议进行玉米赤霉烯酮胶体金试纸条检测时, 环境空气湿度应控制在最佳实验湿度范围内。此外, 胶体金测试条的组合条件(NC 膜、包被抗原的划线位置、喷金量、金垫等)也对试纸条的测试结果有影响, 可通过优化试纸条的组合条件进而提高试纸条质量。

参考文献

- [1] Stob M, Baldwin RS, Tuite J, *et al.* Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberellae* [J]. *Nature*, 1962, 196(4861): 1318.
- [2] 孙亚宁. 玉米赤霉烯酮免疫学快速检测技术研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
Sun YN. Study on immunological rapid determination of zearalenone [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017.
- [3] 任丹丹, 谢云峰, 李少晖, 等. 饲料及食品中玉米赤霉烯酮检测方法研究进展[J]. *分析测试技术与仪器*, 2015, 21(4): 199–204.
Ren DD, Xie YF, Li SH, *et al.* Advances in detection methods of zearalenone in feed and food [J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2015, 21(4): 199–204.
- [4] 王若军, 苗朝华, 张振雄, 等. 中国饲料及饲料原料受霉菌毒素污染的调查报告[J]. *饲料工业*, 2003, (7): 53–54.
Wang RJ, Miao CH, Zhang ZX. Investigation report on contamination of mycotoxin by feed and feed ingredients in China [J]. *Feed Ind*, 2003, (7): 53–54.
- [5] GB 5009.209-2016 食品安全国家标准食品中玉米赤霉烯酮的测定[S].
GB 5009.209-2016 National food safety standard-Determination of zearalenone in food [S].
- [6] 龚珊, 党献民, 任正东, 等. C₁₈ 固相萃取柱净化-超高效液相色谱法检测谷物中玉米赤霉烯酮[J]. *粮食与饲料工业*, 2015, (6): 60–62.
Gong S, Dang XM, Ren ZD, *et al.* Determination of zearalenone in corn by UPLC with C₁₈ solid extract column cleaning [J]. *Cereal Feed Ind*, 2015, (6): 60–62.
- [7] 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 in rapid quantitative determination of zearalenone in grain [J]. *Grain Sci Technol Econ*, 2014, 39(1): 32–34.
- [8] Ngom B, Guo Y, Wang X, *et al.* Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: A review [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(3): 1113–1135.
- [9] 刘涛, 王向红, 常戡, 等. 直接竞争酶联免疫法检测大麦中玉米赤霉烯酮[J]. *食品与机械*, 2008, (2): 97–99, 117.
Liu T, Wang XH, Chang Y, *et al.* Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of zearalenone in barley [J]. *Food Mach*, 2008, (2): 97–99, 117.
- [10] 何方洋, 万宇平, 崔廷婷, 等. 谷物中玉米赤霉烯酮残留的胶体金免疫层析法测定[J]. *食品工业*, 2019, 40(5): 308–311.
He FY, Wan YP, Cui YT, *et al.* Determination of zearalenone residues in grain by gold immunochromatography assay [J]. *Food Ind*, 2019, 40(5): 308–311.
- [11] 李凤旭, 吴维吉, 李旭, 等. 胶体金快速检测条法测定玉米油中玉米赤霉烯酮含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(4): 876–880.
Li FX, Wu WJ, Li X, *et al.* Comparison of rapid determination of zearalenone in corn oil by colloidal gold strip method and high performance liquid chromatography [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(4): 876–880.
- [12] Chen YQ, Chen Q, Han MM, *et al.* Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut [J]. *Food Chem*, 2016, 213: 478–484.
- [13] 张付贤, 王兴龙. 免疫胶体金技术影响因素分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(5): 199–202.
Zhang FX, Wang XL. Analysis of factors affecting immunocolloidal gold technology [J]. *Chin Anim Husbandr Veter Med*, 2009, 36(5): 199–202.
- [14] 韦素梅, 李炜, 刘运龙. 影响赭曲霉毒素 A 胶体金试纸条最低检出限的因素[J]. *粮食与食品工业*, 2013, 20(2): 55–57, 61.
Wei SM, Li W, Liu YL. Affections of the minimum detection limit of OTA colloidal gold strip [J]. *Cere Food Ind*, 2013, 20(2): 55–57, 61.

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介



陈佩虹, 助理工程师, 主要研究方向为食品微生物检验。
E-mail: 905752637@qq.com



周露, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。
E-mail: zhoulu1982@sohu.com