

木薯叶粉中赭曲霉毒素 A 快速检测方法的建立

余厚美, 王琴飞, 林立铭, 徐 缓, 张振文*

(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 国家薯类加工技术研发分中心,
农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 儋州 571737)

摘 要: 目的 开发快速检测方法检测木薯叶粉中的赭曲霉毒素 A(*Ochratoxins A*, OTA)。**方法** 利用单克隆抗体和酶标抗原, 建立了竞争酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)快速检测方法。用不同浓度的氯化钠甲醇水溶液、乙腈和磷酸盐缓冲液等作为样本提取液提取木薯叶粉中 OTA, 用活性炭和稀释法减少样本基质干扰。**结果** ELISA 灵敏度为 0.2 ng/mL, IC_{50} 为 0.878 ng/mL。木薯叶粉用含氯化钠的 70% 甲醇水溶液提取, 离心后取上清 5 倍稀释, 样本回收率 80%~121%, 检测限为 5 μ g/kg, 满足国标规定食品中 OTA 不超过 5 μ g/kg 的要求, 检测时间为 30 min, 一次可批量检测 90 个样本。**结论** 用本研究建立的 ELISA 方法检测木薯叶粉及其食品中的 OTA 含量结果准确、操作简单、成本低、时间短、重复性好, 适合基层批量筛查。

关键词: 木薯叶粉; 木薯; 赭曲霉毒素 A; 快速检测

Establishment of a rapid detection method for *Ochratoxins A* in cassava leaf meal

YU Hou-Mei, WANG Qin-Fei, LIN Li-Ming, XU Huan, ZHANG Zhen-Wen*

(Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava, National R&D Centre for Potato Processing, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid test method for *Ochratoxin A* in cassava leaf powder. **Methods** Rapid detection of competitive enzyme-linked immunosorbent assay by using monoclonal antibody and enzyme-labeled antigen. OTA in tapioca leaf powder was extracted with different concentrations of sodium chloride methanol solution, acetonitrile and phosphate buffer, etc. Activated carbon and dilution method were used to reduce sample matrix interference. **Results** ELISA sensitivity was 0.2 ng/mL and IC_{50} was 0.878 ng/mL. Cassava leaf powder was extracted with 70% methanol solution containing sodium chloride. After centrifugation, the supernatant was diluted 5 times. The sample recovery was 80%–121%. The detection limit was 5 μ g/kg, which meet the requirements of the national standard that OTA in food should not exceed 5 μ g/kg. The detection time was 30 min, and 90 samples can be detected in batches at a time. **Conclusion** The ELISA method established in this study can

基金项目: 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630032019017)、现代农业产业技术体系(CARS-12)专项资金和中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所科技成果转化专项资金(PZS2019009)

Fund: Supported by Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund for Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (1630032019017), the Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-12) and Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Tropical Crops Genetic Resources Institute Transfer of Scientific and Technological Achievements into Special (PZS2019009)

***通讯作者:** 张振文, 副研究员, 主要研究方向为采后处理与加工利用。E-mail: scuta96@163.com

***Corresponding author:** ZHANG Zhen-Wen, Associate Professor, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Tropical Crops Genetic Resources Institute, No.4, Xueyuan Road, LongHua District, HaiKou City, Hainan Province, 571101, China. E-mail: scuta96@163.com

be used to detect OTA content in tapioca leaf powder and its food with accurate results, simple operation, low cost, short time, good repeatability, and suitable for mass screening at the grass-roots level.

KEY WORDS: *Cassava leaf powder*; *Cassava*; *Ochratoxins A*; rapid detection

1 引言

木薯(*Manihot esculenta* Crantz)又名树薯、木番薯, 属大戟科(Euphorbiaceae)木薯属(*Manihot* P.Miller)植物, 是世界上3大薯类作物之一^[1], 是世界上近10亿人口赖以生存的粮食^[2,3]。木薯叶是木薯重要的生产副产物, 约是鲜薯产量的3%左右。木薯叶片不仅含有丰富的蛋白质、维生素、矿物质和微量元素等营养物质, 还含有大量黄酮类物质^[4,5], 去除氰化物的木薯叶常被作为畜禽优质饲料^[6,7], 被当作蔬菜也具有极高的营养价值。非洲以南 60%的非洲国家都把木薯叶当蔬菜食用, 扎伊尔每天的人均消费量达 500 g。在印度尼西亚、老挝、菲律宾等东南亚国家, 木薯叶也是重要的蔬菜来源^[8,9]。新鲜木薯叶和其他绿叶蔬菜一样不利于保存, 而且它的氰化物含量较高限制了木薯叶作为食物的推广应用。近年来, 随着研究的深入和人们认识的提高, 木薯叶食用化越来越被人们接受。国家薯类加工分中心和木薯产业体系加工岗在木薯叶的食用研究方面取得了长足的进展。将木薯叶脱氢处理后制成木薯叶粉, 此木薯叶粉中还含有大量蛋白质、类胡萝卜素和黄酮类物质等活性成分^[10], 再用木薯叶粉研制成各种饼干、面包等食品。

赭曲霉毒素主要为赭曲霉(*Aspergillus Ochraceus*)、疣孢青霉(*Penicillium Verrucosum*)和碳黑曲霉(*Aspergillus Carbonarius*)等3种霉菌的二级代谢产物, 包括赭曲霉毒素A、B、C等共7种形式, 其化学结构极其相似, 其中毒性最大、与人类健康关系最密切、对农作物的污染最重、分布最广的是赭曲霉毒素A(*Ochratoxins A*, OTA)。OTA具有很强的肝脏毒性和肾脏毒性, 并有致畸、致突变和致癌作用, 且对于不同动物种属的毒副作用具有差异。国际癌症研究机构将OTA定为2B类致癌物^[11-13]。赭曲霉毒素A广泛存在于谷物及谷物产品、草料及饲料产品、粮油、动物性食品等食品中, 一旦人或动物食用后, 容易在肌肉、组织中蓄积, 而且代谢缓慢, 进而严重危害人体健康^[14,15]。欧盟等对食品中OTA的残留做了严格地限量规定, 且残留限量要求高于我国^[16]。目前国标GB 2761-2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中对OTA的残留量做了规定, 谷物及其制品、豆类及其制品、坚果及籽类、饮料类(研磨咖啡)中限量为5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[17]。目前国标仅在部分农产品中做了限量要求, 在木薯中的限量值和检测方法尚未做任何规定。因此有必要建立快速、灵敏、简便, 适合我国具体国情的OTA检测方法, 并尽快开展研究, 制定木薯食品中OTA的限量标准。

降低食品安全隐患, 保障人和动物安全, 检测是避免OTA污染食物和饲料并进入食物链的有效方法。检测OTA的方法主要有仪器分析法和免疫分析法^[18-21]。仪器分析法灵敏度高、准确性高, 但是成本高、对人员要求高、检测时间长等缺点; 免疫分析法是基于抗原抗体的特异性结合的原理, 灵敏度高、特异性好、检测成本低。可批量检测, 适合基层筛查^[18,22]。本研究通过包被抗体, 辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)标记抗原制成酶标抗原, 建立一步竞争竞争酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immuno sorbent assay, ELISA)检测方法, 以期用于木薯叶粉的质量控制, 以及含木薯叶粉食品的食品安全检测, 为木薯叶粉中OTA快速筛查提供技术支撑。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo 公司); IKA MS3 漩涡混合器(德国 IKA 公司); DT5-2B 离心机(北京时代北利公司); AWL-0501-B 纯化仪(美国爱科浦公司); SRY-150 生化培养箱(宁波赛福公司)。

OTA(标准品, 天津阿尔塔公司); 辣根过氧化物酶(分析纯, Sigma 公司); OTA 单克隆抗体, OTA 酶标抗原、TMB 底物液、封闭液、抗体稀释液(化学纯, 海南亿康生物科技有限公司); 小牛血清(化学纯, 兰州民海生物公司); 甲醇、Tween-20、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、氯化钠、碳酸氢钠、碳酸钠、氯化钾、甘油(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 木薯叶粉由国家薯类加工技术研发分中心实验室和农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室提供。

2.2 实验方法

2.2.1 快速检测方法建立

采用竞争 ELISA 棋盘方阵测定效价, 确定包被单克隆抗体、HRP-OTA 酶标抗原的最佳稀释倍数和标准品的线性范围。选取 OD_{450} 最接近 2.0 的酶标抗原和抗体效价为最佳效价, 将标准品浓度从 0.2~16.2 ng/mL 倍比稀释进行间接竞争 ELISA, 以标准品浓度为横坐标, 以竞争抑制率为纵坐标, 建立 ELISA 标准曲线, 并求得相关系数。

2.2.2 样本中标准品的添加回收实验

在木薯叶粉中分别加入提取液, 再加入一定量的 OTA 标准品溶液, 封瓶口后强力振荡 5 min, 3000 r/min 离心 10 min 取上清进行分析。实测浓度/添加浓度 100%为添加回收率。阴性 OD 值越接近空白 OD 值越准确, 回收率越接近 100%表示检测结果越准确。

2.2.3 木薯叶粉中 OTA 的提取

将木薯叶粉准确称取 1 g, 加入提取液 5 mL, 封瓶口后强力振荡 10 min, 3000 r/min 离心 10 min 取上清进行分析。

3 结果与分析

3.1 竞争 ELISA 标准曲线的建立

采用竞争 ELISA 棋盘方阵测定, 确定包被液为 0.2 mol/L pH 7.2 的磷酸盐缓冲液, 包被条件是 4 °C 过夜, 抗体最佳包被浓度是 4.55 μg /mL, 用含 5%酪蛋白的 0.02 mol/L PBS 37 °C 封闭 2 h, 酶标抗原的最佳稀释倍数是 1:30000, 反应条件为 25 °C 30 min, 以 OTA 作为标准品浓度作为横坐标, 竞争抑制率为纵坐标绘制的曲线如图 1 所示, 当标准品 OTA 浓度在 0.2~16.2 ng/mL 时有较好的线性关系, 灵敏度为 0.2 ng/mL, 半数抑制率(IC₅₀)为 0.878 ng/mL。

3.2 不同溶剂提取木薯叶粉中 OTA 回收率效果比较

在 1 g SC6068 木薯叶粉中分别加 5 mL 甲醇、50%甲醇水溶液、PBS、乙腈提取, 并分别对比提取液用 10% NaCl 1:1 稀释前后回收率, 如图 2, 表 1。甲醇、乙腈提取的颜色呈深墨绿色, 50%甲醇水溶液、PBS 提取液为透明橙黄色。从回收率得出甲醇提取回收率比 PBS、乙腈都高, PBS 提取的样本回收率最低。所有提取方法回收率都在用 10% NaCl 1:1 稀释后有明显提高, 说明加 NaCl 稀释后有助于提高样本回收率。从回收率上看, 甲醇提取效果优于乙腈和 PBS。

3.3 不同浓度甲醇提取效果比较

分别在 1 g SC6068 木薯叶粉中加入浓度为 50%、70%甲醇水溶液和无水甲醇, 每个浓度分别加入终浓度为 0 μg/kg 和 10 μg/kg 的标准品进行提取, 提取液随着甲醇浓度的升高

颜色越来越深(如图 3), 50%甲醇水提取液为透明橙黄色, 70%甲醇水溶液提取液颜色加深且比较混浊, 无水甲醇提取液为不透明的墨绿色。所有样本 OD 值都很低, OD 值随着甲醇浓度的增大而降低, 将提取液带入曲线检测含量, 空白样本含量均在 27 μg/kg 以上。随着甲醇浓度升高, 空白值的含量也越高, 假阳性率有上升趋势, 75%甲醇提取液的回收率最接近 100%。见表 2。

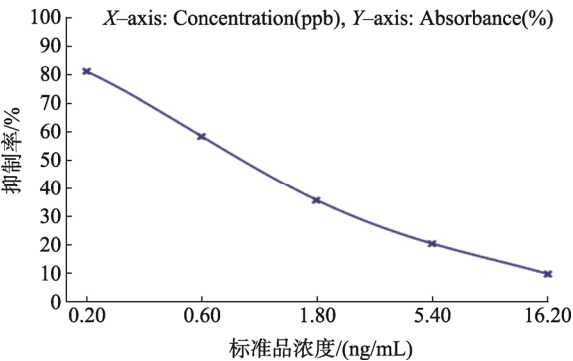
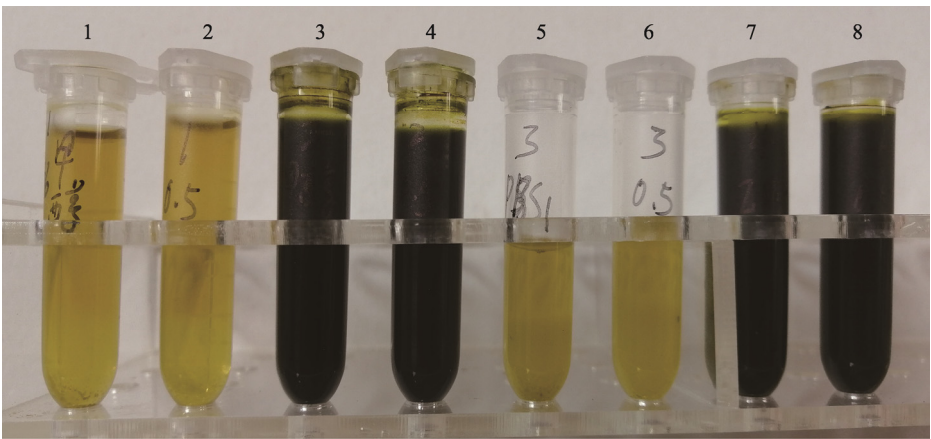


图 1 OTA 检测标准曲线(n=6)
Fig.1 OTA testing standard curve (n=6)

3.4 不同浓度活性炭提取液提取效果

在 1 g SC6068 木薯叶粉中分别加入 5 mL 50%的甲醇水溶液, 分别加入 0、0.03、0.1、0.3 g 活性炭, 每个浓度分别加入终浓度为 0 μg/kg 和 10 μg/kg 的标准品后进行提取, 如图 4、表 3。提取液随着活性炭含量增大颜色从清亮的橙黄色逐渐变灰, 检测 OD 值显色随着添加活性炭的量增高而升高, 回收率随着活性炭含量增加而下降, 说明活性炭对提取液降低基质干扰有一定的影响, 但会降低回收率。



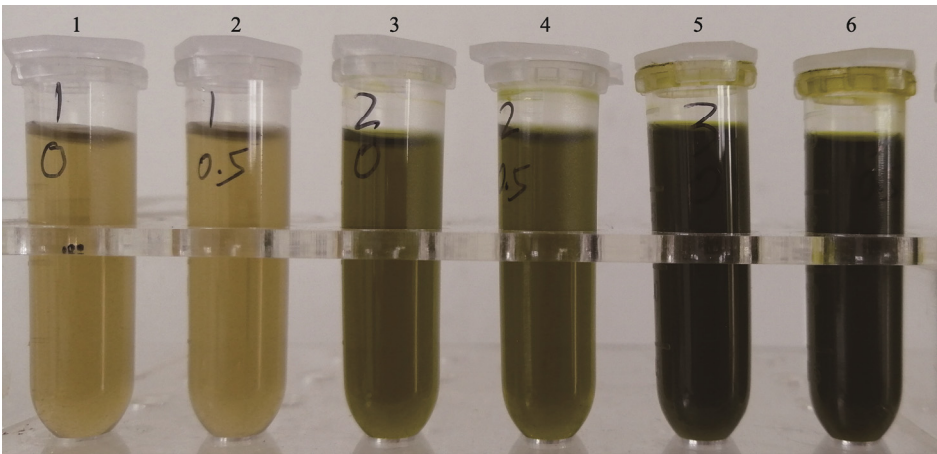
注: 1、2: 50%甲醇水溶液 50% methanol-water buffer; 3、4: 甲醇; 5、6: PBS; 7、8: 乙腈。

图 2 不同提取液颜色对比

Fig.2 Color comparison of different extracts

表 1 不同溶剂提取液回收率比较(n=4)
Table 1 Comparative recoveries for different solvent extract (n=4)

提取液		添加值/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	平均回收率/%
50%甲醇水溶液	不稀释	0	11.95±0.61	88.0
		10	20.75±0.56	
	10% NaCl 稀释	0	37.4±0.6	197.5
		10	57.15±1.92	
	不稀释	0	122.6±3.06	164.0
		10	139±4.45	
甲醇	10% NaCl 稀释	0	28.95±0.72	338.5
		10	62.8±0.27	
	不稀释	0	33.7±0.89	53.0
		10	39±0.98	
	10% NaCl 稀释	0	17.45±0.1	698.0
		10	87.25±0.67	
PBS	不稀释	0	36.85±0.46	37.0
		10	40.55±0.52	
	10% NaCl 稀释	0	95.35±3.3	324.0
		10	127.75±3.74	



注: 1、2 50%甲醇水溶液 50% methanol-water buffer; 3、4 70%甲醇水溶液 70% methanol-water buffer; 5、6 甲醇 methanol。

图 3 不同浓度甲醇提取液颜色对比
Fig.3 Different concentrations of methanol extract color contrast

表 2 不同浓度甲醇提取液的回收率比较(*n*=4)
Table 2 Comparative recoveries of different concentrations of methanol extract (*n*=4)

提取液	添加值/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	平均回收率/%
50%甲醇水溶液	0	27.24±0.095	28
	10	30.04±0.18	
70%甲醇水溶液	0	28.04±0.53	107.60
	10	38.8±0.34	
无水甲醇	0	41.96±0.76	83.20
	10	50.28±0.46	

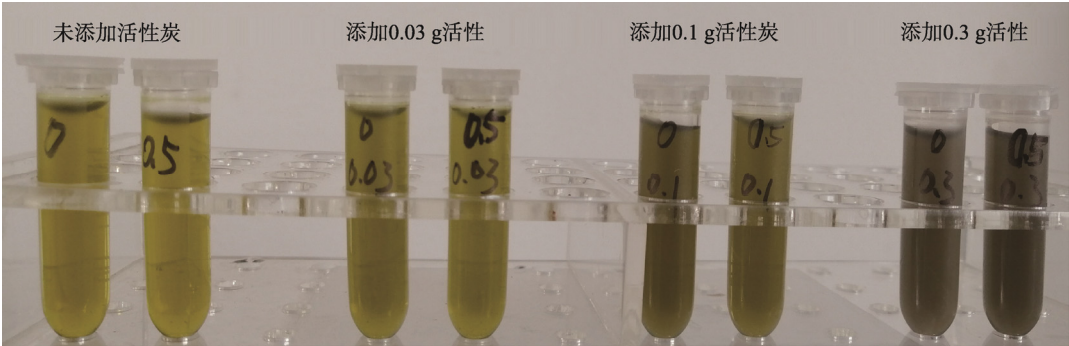


图 4 不同含量活性炭提取液颜色对比
Fig.4 Different content of activated carbon extract color contrast

表 3 不同含量活性炭提取液的添加回收率(*n*=4)
Table 3 Different activated carbon extract content of recovery (*n*=4)

活性炭质量/g	添加值/(μg/kg)	检测值/(μg/kg)	平均回收率/%
0	0	30.04±1.11	98
	10	39.84±0.53	
0.03	0	22.8±0.85	38.80
	10	26.68±0.66	
0.1	0	22.00±0.37	20
	10	24.00±1.06	
0.3	0	7.68±0.11	12
	10	8.88±0.12	

3.5 不同稀释倍数对回收率的影响

称取 1 g SC6068 木薯叶粉，一组加 0.1 g NaCl，一组不加 NaCl，分别用 5 mL 50%甲醇水和 70%甲醇水提取，离心后分别对比稀释 1 倍、2 倍、5 倍、10 倍的回收率。随着稀释倍数的加大，OD 值明显上升，提取液对 OD 值得影响逐渐减小。总体来看，用 70%甲醇水提取液比 50%甲醇水提取液回收率更接近 100%，加 NaCl 比不加 NaCl 的值更高一些，加 NaCl 的阴性样本检测 OD 值更接近空白样品值，稀释倍数越大，阴性样本检测 OD 值越接近空白值。本实验 70%甲醇水加 NaCl 作为提

取液，离心后取上清 5 倍稀释和 10 倍稀释检测，阴性对照检测 OD 值和空白值相差不大，所以选离心后 5 倍稀释。

3.6 样本前处理方法回收率验证

不同品种的 12 个木薯叶粉样本，分别称取 1 g 木薯叶粉样本，0.1 g NaCl，分别添加 0、10、25 μg/kg，用 5 mL 70%甲醇水提取，离心后用 70%甲醇水溶液稀释 5 倍，如图 5 所示，检测所有样本回收率都在 80%~121%之间，说明该样本处理方法稳定性和重现性都好。提取后再 5 倍稀释，该方法检测下限为 5 μg/kg。

表 4 不同稀释倍数对回收率的影响($n=4$)
Table 4 The influence of different dilution on recovery ($n=4$)

提取液	稀释倍数	添加值/($\mu\text{g/kg}$)	检测值/($\mu\text{g/kg}$)	平均回收率/%
50%甲醇水溶液	1	0	11.33 $\pm$ 0.65	638.5
		10	75.18 $\pm$ 9.48	
	2	0	11.9 $\pm$ 0.99	376.6
		10	49.56 $\pm$ 10.10	
	5	0	12.94 $\pm$ 2.74	252.9
		10	38.23 $\pm$ 3.10	
	10	0	10.59 $\pm$ 1.06	208.6
		10	31.45 $\pm$ 0.94	
	1	0	7.18 $\pm$ 0.43	499.7
		10	57.15 $\pm$ 15.60	
	2	0	5.91 $\pm$ 1.19	188.8
		10	24.79 $\pm$ 4.90	
	5	0	8.31 $\pm$ 4.17	285.1
		10	36.82 $\pm$ 1.36	
	10	0	0.00 $\pm$ 0.00	186.0
		10	29.28 $\pm$ 5.93	
70%甲醇水溶液	1	0	5.12 $\pm$ 0.48	62.3
		10	11.35 $\pm$ 0.35	
	2	0	2.74 $\pm$ 0.18	116.4
		10	14.38 $\pm$ 3.7	
	5	0	0.00 $\pm$ 0.00	181.3
		10	18.13 $\pm$ 5.20	
	10	0	0.00 $\pm$ 0.00	146.2
		10	14.62 $\pm$ 3.97	
	1	0	9.97 $\pm$ 1.15	36.6
		10	13.63 $\pm$ 0.58	
	2	0	0.00 $\pm$ 0.00	108.7
		10	10.87 $\pm$ 0.4	
	5	0	0.00 $\pm$ 0.00	112.2
		10	11.22 $\pm$ 0.36	
	10	0	0.00 $\pm$ 0.00	96.8
		10	9.68 $\pm$ 0.81	

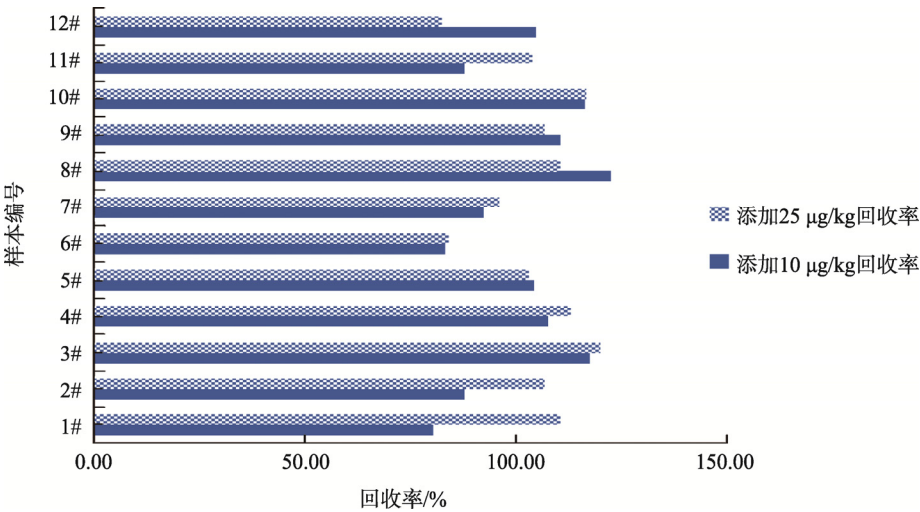


图 5 添加不同浓度标准品的回收率
Fig.5 Recovery of OTA sample by add different standard concentration

3.7 样本检测

将上述样本处理方法用在不同时间制备的 18 个木薯叶粉样本检测中, 每个样本做 4 个平行对比, 变异系数全部在 10%以内, 说明该方法重复性好, 可应用于实际样本的检测, 见表 5。

表 5 木薯叶粉样本检测(µg/kg) Table 5 Detection of cassava leaf powder samples (µg/kg)					
样本编号	1	2	3	4	CV/%
13#	0	0	0	0	0
14#	50.17	45.1	47.38	50.55	5.3
15#	31.22	33.06	29.06	32.54	5.7
16#	49.79	53.36	46.58	49.23	5.6
17#	0	0	0	0	0
18#	0	0	0	0	0
19#	20.01	22.17	18.89	18.63	8.1
20#	17.73	18.78	15.35	16.1	9.1
21#	20.85	19.61	19.71	18.25	5.4
22#	0	0	0	0	0
23#	16.97	17.37	15.21	14.6	8.4
24#	12.9	15.58	15.61	14.57	8.7
25#	0	0	0	0	0
26#	0	0	0	0	0
27#	0	0	0	0	0
28#	0	0	0	0	0
29#	0	0	0	0	0
30#	0	0	0	0	0

4 讨论与结论

本研究通过对比甲醇、乙腈和 PBS 提取缓冲液提取对 OTA 的回收率影响, 发现有机试剂回收率大于无机试剂, 且有机试剂浓度越高, 提取液颜色越深, 空白样本假阳性率越高, 对检测造成的干扰也越大。OTA 用无机盐提取回收率低, 用有机试剂提取回收率高, 是因为 OTA 微溶于水, 易溶于极性有机溶剂的理化性质决定^[23], 所以用甲醇和乙腈提取的回收率会高于 PBS 提取的回收率。郑润生在用 LC-MS/MS 检测中药材中 OTA 时用乙腈提取, 甲醇复溶后上样检测, 提取回收率 84.2%~100%^[12]。

基质效应(matrix effect, ME)是影响定量检测的主要因素^[12,24,25], 目前文献报道的很多方法都是柱纯化净化样品^[11,26-28], 以达到减少或消除基质效应的目的, 但是这种前处理的方法成本高, 无法满足快速检测和大批量样品筛查的需求。稀释法是克服基质效应的另一种有效的前处理技术, 虽然它会降低检测方法的灵敏度, 但是具有快速和经济的优点, 适用于批量和基层检测^[29]。本研究对比了不同梯度稀释的提取液, 随着稀释倍数的增大, 回收率趋于稳定, 检测 OD 值越接近空白值, 稀释 5 倍之后阴性值就和空白值比较接近了, 说明干扰明显降低。10 倍稀释后回收率下降, 可能是因为稀释倍数大更容易导致误差变大, 回收率都能达标的情况下, 选择稀释倍数较小的 5 倍稀释, 有利于检测过程中控制检测误差。且我国国标规定谷物等粮食及制品中 OTA 的限量值为 5 µg/kg^[17], 结合本检测方法灵敏度 0.2 µg/kg, 1g 样本溶于 5 mL 提取液提取后 5 倍稀释的检测限正好是 5 µg/kg。稀释法既稀释了干扰成分的影响, 又避免了采用昂贵的纯化柱, 具有快速、经济的优点。

用该方法验证了添加 12 个样本不同添加浓度的的提取液回收率, 回收率都在 80%~121%之间。检测 18 个木薯

叶粉盲样, 通过 4 组平行检测, 4 组平行检测的 CV 值都在 10% 以内, 且检测阳性的样本肉眼可见都是有存放时间较长的结块现象, 说明该方法可用于大批量样本的检测而不影响检测结果的准确性, 检测结果可靠。

本研究通过建立竞争 ELISA 方法, 用含氯化钠的 70% 甲醇水溶液提取木薯叶粉中 OTA, 离心后上清用稀释法减少基质效应, 建立了一种相对准确、高效、经济的木薯叶粉中 OTA 的检测方法。作为木薯叶粉中 OTA 的快速检测方法, 该方法回收率高、检出限低, 重复性好, 样本处理时间短、方法简单, 成本低, 适用于木薯叶粉中 OTA 快速批量快检测, 也为木薯叶粉中其他真菌毒素的检测提供了一种可靠的技术参考。

参考文献

- [1] 姚庆荣, 郭运玲, 郭安平, 等. 木薯基因工程育种研究现状与展望[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(6): 1636–1637, 1648.
- [2] 韩和悦. 11 个食用木薯品种的品质研究与评价[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2017.
- [3] 肖鑫辉, 李开绵, 许瑞丽, 等. 国内外栽培木薯(*Manihot esculenta* Crantz)种质资源表型多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 94–100.
- [4] Xiao XH, Li KM, Xu RL, et al. Phenotypic diversity analysis of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm from china and abroad [J]. J Plant Genet Resour, 2017, 18(1): 94–100.
- [5] Latif S, Müller J. Potential of cassava leaves in human nutrition: A review [J]. Trends Food Sci Technol, 2015, 44(2): 147–158.
- [6] Siqueira EMA, Arruda SF, De VRM, et al. Beta-carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats [J]. Comp Biochem Physiol. Part C: Toxicol Pharmacol, 2007, 146(1–2).
- [7] R. Castellanos, SB. Altamirano RH, Moretti. Nutritional characteristics of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf protein concentrates obtained by ultrafiltration and acidic thermocoagulation [J]. Plant Food Hum Nutr, 1994, 45(4): 357–363.
- [8] Velmurugu R. Cassava leaves as animal feed: Potential and limitations [J]. J Sci Food Agric, 1993, 61: 141–150.
- [9] Aduni UA, Olufunmike AA, Mpoko B, et al. The use of Cassava leaves as food in Africa [J]. Ecol Food Nutr, 2005, 44(6): 423–435.
- [10] Ngudi, DD, Kuo YH, Marc VM, et al. Research on Motor Neuron Diseases Konzo and Neurolathyrism: Trends from 1990 to 2010 [J]. PLoS Neglect Trop D, 2012, 6(7): 1759.
- [11] 吴秋妃. 木薯叶提取液制备及其抗氧化作用研究[D]. 海口: 海南大学, 2019.
- [12] Wu QF. Study on the preparation and its antioxidant function of cassava leaf [D]. Haikou: Hainan University, 2019.
- [13] 薛良辰, 刘陆, 郑璇, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法检测中草药中赭曲霉毒素 A[J]. 现代食品科技, 2016, 32(10): 297–303, 316.
- [14] Xue LC, Liu L, Zheng X, et al. Determination of Ochratoxin A in Chinese medicinal plants by UHPLC-MS/MS [J]. Mod Food Sci Technol, 2016, 32(10): 297–303, 316.
- [15] 郑润生, 肖启衍, 邱薇, 等. 10 种中药材和 3 种食品污染赭曲霉毒素 A 的 LC-MS/MS 检测研究[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 289–294.
- [16] Zheng RS, Xiao QY, Qiu W, et al. Determination of contaminant ochratoxin A in 10 traditional Chinese medicines and 3 food samples by LC-MS/MS [J]. Chin J Pharm Anal, 2015, 35(2): 289–294.
- [17] 史娜, 路勇, 吴颖, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测食品中的赭曲霉毒素 A[J]. 食品科学, 2011, 32(18): 260–263.
- [18] Shi N, Lu Y, Wu Y, et al. Analysis of Ochratoxin A in Foods by HPLC-MS/MS [J]. Food Sci, 2011, 32(18): 260–263.
- [19] 王健, 成桂红, 阮若云, 等. 动物源性食品中赭曲霉毒素 A 污染概况及检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(16): 4212–4217.
- [20] Wang J, Cheng GH, Ruan RY, et al. Review of Ochratoxin A pollution in animal-derived foods and its detection methods [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(16): 4212–4217.
- [21] 夏骏, 李勇, 徐国茂, 等. 动物源性食品中赭曲霉毒素 A 毒性和检测方法研究进展[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2015, (2): 4–7.
- [22] Xia J, Li Y, Xu GM, et al. Food of animal origin of Ochratoxin A toxicity and detection method is reviewed [J]. Jiangxi J Animal Husbandry Vet Med, 2015, (2): 4–7.
- [23] 宋卫得, 高尧华, 厉雪芹, 等. 高效液相色谱法测定饲料中赭曲霉毒素 A 的不确定度评估[J]. 粮食与饲料工业, 2016, (3): 64–67.
- [24] Song WD, Gao YH, Li XQ, et al. Uncertainty evaluation of determination of ochratoxin A in feeds by HPLC [J]. Cere Feed Ind, 2016, (3): 64–67.
- [25] GB 2761–2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
- [26] GB 2761–2017 National food safety standards-Fungal toxins in food [S].
- [27] 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.
- [28] Li X, Li PW, Zhang Q, et al. Development of an immunochromatographic assay for ochratoxin A in agro-products [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2014, 36(5): 648–652.
- [29] 胡淑荣, 应光耀, 胡玉莉, 等. 赭曲霉毒素 A 快速检测方法研究进展及其在中药中的应用前景[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(11): 2032–2037.
- [30] Hu SR, Ying GY, Hu YL, et al. Research progress of rapid detection of ochratoxin A and its application prospect in traditional Chinese medicine [J]. Chin J Chin Materia Med, 2017, 42(11): 2032–2037.
- [31] 涂春蓉, 王文浩, 董晓娟, 等. 赭曲霉毒素 A 快速检测技术研究进展[J]. 粮油加工(电子版), 2014, (5): 75–79.
- [32] Tu CR, Wang WH, Dong XJ, et al. Research progress on rapid detection of Ochratoxin A [J]. Mach Cereals Oil Food Process Main Contents, 2014, (5): 75–79.
- [33] 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.
- [34] Wang Y, Zhang NN, Luo LN, et al. Research progress on rapid detection of Ochratoxin A [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(5): 757–760.
- [35] 余厚美, 张振文. β -葡萄糖苷酶抗体的制备及比较分析[J]. 热带生物学报, 2019, 10(1): 89–93.
- [36] Yu HM, Zhang ZW. Comparative analysis of construction antibody for β -glucosidase [J]. J Trop Biol, 2019, 10(1): 89–93.

- [23] 赵阳阳. 适配体生物传感技术用于检测赭曲霉毒素 A 的研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2018.
- Zhao YY. Aptamer biosensing technology for detection of ochratoxin A [D]. Changchun: Jilin University of Agriculture, 2018.
- [24] Zhang R, Jian LH, Mao D, *et al.* Determination of *Ochratoxin A* in traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2011, 33(10): 1757.
- [25] Lian HF, Zhao XT, Wang RZ, *et al.* Imultaneous determination of 9 kinds of mycotoxins in maize, peanut and wheat by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2010, 31(20): 360.
- [26] 谢丽伟, 赵祥升, 孔维军, 等. 分子印迹聚合物固相萃取柱净化-HPLC-FLD 测定人体尿液中的赭曲霉毒素 A[J]. *药学报*, 2014, 49(4): 517-523.
- Xie LW, Zhao XS, Kong WJ, *et al.* Determination of *Ochratoxin A* in human urine by HPLC-FLD after cleaned-up by molecularly imprinted polymer solid phase extraction column [J]. *Acta Pharm Sin*, 2014, 49(4): 517-523.
- [27] 石文婷, 陆丽婷, 严艺琳, 等. 食品中赭曲霉毒素 A 三种检测方法的比较研究[J]. *粮食与食品工业*, 2019, 26(3): 56-60.
- Shi WT, Lu LT, Yan YL, *et al.* Comparative study on three methods for determination of *Ochratoxin A* in food [J]. *Cereal Food Ind*, 2019, 26(3): 56-60.
- [28] 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].

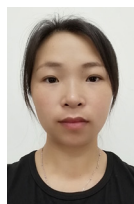
GB 5009. 96-2016 National food safety standards-The determination of *Ochratoxin A* in food [S].

- [29] 杨屹, 王作欢, 蒋小武, 等. 基于量子点标记的赭曲霉毒素 A 快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用[J]. *菌物学报*, 2019, 38(6): 1003-1013.

Yang D, Wang ZH, Jiang XW, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Ochratoxin A* by using a quantum dots-based immunochromatographic assay [J]. *Mycosystema*, 2019, 38(6): 1003-1013.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



余厚美, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品安全快速检测。

E-mail: yuhoumei@sina.com



张振文, 博士, 副研究员, 主要研究方向为采后处理与加工利用。

E-mail: scuta96@163.com