

竞争性酶联免疫法快速检测高产奶牛精料补充料中玉米赤霉烯酮

李晓波, 李慧娟*, 宋 鸽, 何 娇, 王克超, 杨小剑, 陈海燕, 刘海旭

(蒙牛乳业(沈阳)有限责任公司, 中粮蒙牛东北区域检测中心, 沈阳 110122)

摘要: **目的** 建立竞争性酶联免疫方法检测饲料中玉米赤霉烯酮的分析方法。**方法** 样品经过 60%的甲醇溶液提取, 提取液经过离心后, 取 25 μL 提取液, 加入 475 μL 稀释缓冲液混合后即为试样液, 取 50 μL 试样液采用酶联免疫吸附方法进行检测。在 450 nm 波长处检测吸光度值。**结果** 本方法在 3 h 内完成了饲料中玉米赤霉烯酮含量的测定。在加标浓度为 100、200 和 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标水平下, 玉米赤霉烯酮酶在饲料中的加标回收率为 99.5%~122.1%, 变异系数为 1.4%~3.0%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适用于饲料中玉米赤霉烯酮的快速筛查检测。

关键词: 酶联免疫吸附法; 回收率; 玉米赤霉烯酮; 饲料

Rapid detection of zearalenone in high-yielding dairy concentrate supplements by competitive enzyme-linked immunosorbent assay

LI Xiao-Bo, LI Hui-Juan*, SONG Ge, HE Jiao, WANG Ke-Chao, YANG Xiao-Jian, CHEN Hai-Yan, LIU Hai-Xu

(Mengniu Dairy (Shenyang) Co., Ltd., Cofco-Mengniu Northeast Region Testing Center, Shenyang 110122, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for rapid detection of zearalenone in high-yielding dairy concentrate supplements by competitive enzyme-linked immunosorbent assay. **Methods** The sample was extracted with 60% methanol solution. After the extract was centrifuged, 25 μL extraction solution was added, and 475 μL dilution buffer was added to mix the sample solution. The 50 μL sample solution was taken for detection by enzyme-linked immunosorbent assay. Absorbance was detected at 450 nm. **Results** This method completed the determination of zearalenone in feed within 3 h. At spiked levels of 100, 200, and 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the spiked recoveries of zearalenone in feed were 99.5% to 122.1%, and the coefficient of variation was 1.4% to 3.0%. **Conclusion** This method is rapid, accurate and sensitive, which is suitable for rapid screening and detection of zearalenone in feed.

KEY WORDS: enzyme-linked immunosorbent method; recovery; zearalenone; feed

1 引言

玉米赤霉烯酮是一种主要的天然霉菌毒素。它们由多种镰刀菌属产生, 可能会出现在小麦、大麦、玉米等谷物

上, 也可能出现在香蕉、菜豆叶片、亚麻和花生上^[1,2]。玉米赤霉烯酮具有雌激素作用, 主要作用于生殖系统, 可使家畜、家禽和实验小鼠产生雌性激素亢进症。妊娠期的动物(包括人)食用含玉米赤霉烯酮的食物可引起流产、死

*通讯作者: 李慧娟, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。E-mail: lihuijuan@mengniu.cn

*Corresponding author: LI Hui-Juan, Engineer, COFCO-Mengniu Northeast Region Detection Center, Mengniu Dairy (Shenyang) Co., Ltd., Shenyang 110122, China. E-mail: lihuijuan@mengniu.cn

胎和畸胎。食用含赤霉病麦面粉制作的各种面食也可引起中枢神经系统的中毒症状, 如恶心、发冷、头痛、神智抑郁和共济失调等^[3-8]。玉米赤霉烯酮是广泛存在于饲料和谷物中的一种毒素。调查研究发现大多数国家的谷物和动物饲料及原料中都不同程度的受到玉米赤霉烯酮的污染。在我国这样的农业大国, 由于特定的地理环境, 呈现出不同程度的玉米赤霉烯酮的污染。由于玉米赤霉烯酮对饲料和养殖业的危害给经济带来极大的影响, 人们对玉米赤霉烯酮的研究越来越重视^[9-11]。目前检测霉菌毒素的方法主要是仪器法, 如薄层色谱法、气相色谱法、高压液相色谱法、气质联用、液相质谱法联用等, 快速检测方法有免疫亲和柱-荧光检测、酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析方法等^[12-20]。仪器方法虽然准确, 但仪器设备价格昂贵, 前处理过程复杂、操作繁琐、效率低, 成本高, 因此不适合大量样品的筛查和日常内控检测。酶联免疫方法快速、方便、准确、灵敏度相对较高、成本低, 适合大批量样品的检测。

本研究建立了一种霉菌毒素的快速检测酶联免疫方法, 以期作为饲料中玉米赤霉烯酮的监管提供参考。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

MX-S 旋涡混合仪(美国赛洛捷克); JT-1000Y 粉碎机(中国杭州聚同电子有限公司); 3K15 冷冻离心机(德国 Sigma 公司); XSE204 电子天平[瑞士梅特勒-托利多(上海)有限公司]; Multiskan FC 酶标仪 450 nm(美国 Thermo Fisher 公司); LT-BIX800L 低温生化培养箱[立德泰勃(上海)公司]。

玉米赤霉烯酮 ELISA 检测试剂盒(德国拜发公司); 甲醇(色谱纯, 北京汇海科仪有限公司); 玉米赤霉烯酮标准品[(100.1±0.6) μg/mL, 美国 ROMER LABS 公司]。

饲料样品均来源于合作牧场。

2.2 实验方法

2.2.1 试剂配制

1) 标准品溶液

稀释获得一系列浓度的玉米赤霉烯酮标准品溶液。

加 2.0 mL 稀释缓冲液至玉米赤霉烯酮标准品小瓶中并混合均匀。玉米赤霉烯酮标准品溶液的浓度为 10 ng/mL。

继续使用稀释缓冲液进行稀释以获得一系列浓度 5、1、0.5、0.25 和 0.125 ng/mL。

2) 60%的甲醇溶液

用 60 mL 甲醇与 40 mL 蒸馏水或纯水混合。

3) 洗涤工作液

用 190 mL 的蒸馏水或纯水稀释 10 mL 20 倍浓缩洗涤缓冲液, 制成洗涤工作液。

4) 稀释缓冲液(4×浓缩)

使用前 4 倍稀释(如: 20 mL 缓冲液+60 mL 蒸馏水)。

5) 酶连接物溶液与抗体溶液

分别使用 4 mL 稀释缓冲液复溶干粉状酶连接物(玉米赤霉烯酮-HRP)和冻干抗体, 混合均匀后暗处保存。

2.2.2 样品前处理

1) 试样的制备

按 GB/T 14699.1^[21] 饲料采样方法取得试样, 四分法浓缩减取约 200 g 样品, 经粉碎, 混匀后装入磨口瓶中备用。

2) 提取

取 1 g 细粉状的样品中加入 5 mL 的 60% 甲醇溶液, 混合 30 min(上下颠倒混合);

离心 10 min, 2000 g; 取 25 μL 上清液, 加入 475 μL 稀释缓冲液, 按 1:19(V:V) 稀释, 摇匀, 为试样液。取 50 μL 进行 ELISA 检测, 需保证最终待测溶液的 pH 值在 6.7~7.0 之间。

2.2.3 操作步骤

1) 试剂盒提前 15~30 min 回温至 20~25 °C, 取出需要数量的微孔。

2) 平行添加 50 μL 稀释缓冲液于零标准孔;

3) 平行添加 50 μL 每个标准品于微孔中;

4) 平行添加 50 μL 样品溶液至剩余微孔中;

5) 添加 25 μL 酶连接物(玉米赤霉烯酮-HRP)至每个微孔中;

6) 添加 25 μL 抗体至每个微孔中;

7) 密封微孔板, 使用微孔板振荡器振荡微孔板 1 min;

8) 37 °C 下暗处孵育 1 h;

9) 去除微孔板中液体, 使用洗涤缓冲液洗板 3 次;

10) 添加 100 μL 底物溶液至每个微孔中;

11) 室温(20~25 °C)下暗处孵育 30 min;

12) 添加 100 μL 终止液至每个微孔中

13) 立即于 450 nm 处读取吸光度值。

3 结果与分析

3.1 样品前处理条件优化

3.1.1 样品提取液条件的优化

本研究采用乙腈与甲醇提取方法分别对加标后的饲料样品进行检测, 样品的稀释倍数为 100 倍, 加标浓度在玉米赤霉烯酮试剂盒标准曲线范围内, 结果(表 1)表明乙腈作为提取液时样品加标回收率较低, 不能满足检测的要求, 甲醇作为提取液时, 回收率为 78.4%~110.3%, 能够满足检测的要求。因此选取甲醇提取法作为提取液。

3.1.2 甲醇水溶液比例的优化

本研究采用 50%、60%、70%、80% 甲醇水溶液分别对添加后的玉米赤霉烯酮饲料样品检测, 样品的稀释倍数为 100 倍, 结果(表 2)表明: 随着甲醇水溶液体积分数的增加, 样品的回收率偏增高。甲醇提取液比例为 60% 时, 样品的加标回收率比较稳定, 能够满足检测要求。

3.2 抗干扰试验

选取饲料为本底, 主要检测混合毒素之间的干扰物, 另在其中添加玉米赤霉烯酮标准品, 终浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对以上各样品进行平行检测, 结果如表 3 所示, 饲料本底检测平均值为 60.9114 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 添加干扰物质本底值 70.1220 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 无明显干扰; 添加 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉烯酮后, 回收率符合要求, 混合毒素抗干扰满足要求。

3.3 方法的检出限

本方法为半定量检测, 灵敏度为 0.125 ng/mL , 试剂盒的曲线范围为 0.125~10 ng/mL , 试剂盒饲料样品方法的检出限为 58.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。检出限的验证见表 4。以饲料为本底, 在加标浓度为 58.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 其回收率范围为 94.7%~115.4%, 该范围的回收率能够满足分析检测

要求。

表 1 样品提取液条件的优化($n=3$)

Table 1 Optimization of extraction conditions for samples ($n=3$)

玉米赤霉烯酮加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	乙腈回收率/%	甲醇回收率/%
100	55.2	88.6
	50.3	109.2
	58.9	110.3
200	60.5	84.2
	59.8	78.4
	61.6	80.2
500	62.7	85.6
	58.4	90.2
	65.1	79.3

表 2 甲醇水溶液比例的优化($n=2$)

Table 2 Optimizing the proportion of methanol aqueous solution ($n=2$)

玉米赤霉烯酮加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	50%甲醇水溶液平均回收率/%	60%甲醇水溶液平均回收率/%	70%甲醇水溶液平均回收率/%	80%甲醇水溶液平均回收率/%
100	50.2	98.9	102.7	117.7
200	46.8	90.3	81.0	109.6
500	56.3	92.6	85.1	121.8

表 3 玉米赤霉烯酮抗干扰实验结果($n=2$)
Table 3 Experimental results of corn gibberellone anti-interference ($n=2$)

样品	检测结果/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%
饲料本底	60.9114	/
混合毒素	70.1220	/
饲料本底 +100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉烯酮	170.1326	109.2
混合毒素本底 +100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉烯酮	181.6265	111.5

表 4 饲料中玉米赤霉烯酮检出限验证结果($n=3$)

Table 4 validation results of detection limit of zearalenone in feed ($n=3$)

加标量/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检测值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%
本底	48.2768	/
	110.5621	106.5
58.5	103.6942	94.7
	115.8103	115.4

3.4 酶联免疫方法与高效液相色谱法检测结果比较
随机抽取不同浓度玉米赤霉烯酮的饲料的样品用试

剂盒方法与液相色谱法进行比较, 检测结果如表 5 所示, 2 个检测方法的结果偏差较小, 符合国标 GB/T19540-2004 饲料中玉米赤霉烯酮的测定方法^[22]中酶联免疫方法中的偏差要求, 说明所建立的酶联免疫方法适合饲料样品中玉米赤霉烯酮的检测。

表 5 不同检测方法的比较($n=2$)

Table 5 Comparison of different detection methods ($n=2$)

样品	酶联免疫方法检测值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	高效液相色谱法检测值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	2种方法的偏差%
饲料本底	63.1	55.6	13
饲料本底 +100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉烯酮	166.7 168.6	150.3 149.8	10 12
饲料本底 +200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉烯酮	298.1 292.9	261.3 262.7	13 11
饲料本底 +200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 玉米赤霉烯酮	656.8 660.2	596.5 598.2	10 10

3.5 回收率及精密度实验

按照上面的优化后的方法, 以饲料样品为本底, 添加 3 个水平的玉米赤霉烯酮标准品, 每个水平进行 6 组重复

实验, 玉米赤霉烯酮的加标回收率和精密度实验结果如表 6 所示。其中回收率的范围符合日常检测要求, 精密度结果符合试剂盒板孔间精密度要求($< 10\%$)。说明建立的快速检测酶联免疫方法适用于饲料中玉米赤霉烯酮的检测。

表 6 回收率及精密度实验结果($n=6$)
Table 6 Experimental results of recovery and precision ($n=6$)

样品	加标量 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检测值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/%	精密度/%
饲料	本底	63.0940	/	/
		166.7207	103.6	3.0
		168.6352	105.5	
	164.2173	101.1		
	100	170.6328	107.5	1.7
		162.5941	99.5	
		176.4401	113.3	
		298.1326	117.5	
		292.8557	114.9	
		301.5079	119.2	
	200	303.2173	120.1	1.4
		305.0121	121.0	
		306.4652	121.7	
		656.8407	118.7	
		660.2159	119.4	
		652.8750	118.0	
		669.8272	121.3	
		673.4936	122.1	
650.3562		117.5		

3.6 实际样品测定

随机抽取 12 份饲料样品, 采用建立的方法进行检测分析, 结果均符合国家规定饲料的限量标准。如表 7 所示。

表 7 实际饲料样品的实验结果
Table 7 Experimental results of actual feed samples

样品名称	检测值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)	样品名称	检测值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$)
自配料1	116.8233	饲料3	104.5640
自配料2	197.3201	饲料4	162.7328
干酒糟 及其可溶物	419.1926	精补料 补充料	50.7466
饲料1	54.9320	奶牛 浓缩饲料	88.3458
饲料2	155.3626	泌乳牛精料 补充料	68.2379
配合饲料	96.8925	高产奶牛 精料补充料	57.4382

4 结 论

本方法是一种简便、快速, 灵敏度高的分析方法, 并且通过准确度、精密度、抗干扰试验均能满足日常检测要求, 可用于饲料样品中玉米赤霉烯酮的定量分析检测。

参考文献

- 计成. 霉菌毒素生物降解技术在动物生产中的应用[J]. 饲料与畜牧, 2012, (10): 1.
Ji C. Application of mycotoxin biodegradation technology in animal production [J]. Feed Anim Husband, 2012, (10): 1.
- 余涛, 李大刚, 邓宁, 等. 玉米赤霉烯酮多克隆抗体的制备及特性分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 78-82.
Yu T, Li DG, Deng N, *et al*. Preparation and characterization of polyclonal antibodies against zearalenone [J]. Food Mach, 2012, 28(1): 78-82.
- 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 rapid immunoassay of zearalenone [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017
- 张天妹. 饲料中玉米赤霉烯酮的污染状况及其毒性研究进展[J]. 畜牧业, 2018, 29(10): 21.
Zhang TS. Pollution and toxicity of zearalenone in feed [J]. Livestock Poult Ind, 2018, 29(10): 21.
- 田淑丽, 李维. 玉米赤霉烯酮毒素研究进展与防控[J]. 粮食与饲料工业, 2017, (12): 36-40.
Tian SL, Li W. Research progress and control of zearalenone toxin [J]. Food Feed Ind, 2017, (12): 36-40.
- 代荣远, 吕刚, 王亮. 动物饲料中玉米赤霉烯酮的检测方法[J]. 养殖与饲料, 2017, (6): 50-51.
Dai RK, Lu G, Wang L. Detection method of zearalenone in animal feed [J]. Cult Feed, 2017, (6): 50-51.
- 马传国, 王英丹. 玉米赤霉烯酮污染状况及毒性的研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2017, 38(1): 122-128.
Ma CG, Wang YD. Research progress on pollution and toxicity of zearalenone [J]. J Henan Univ Technol (Nat Sci Ed), 2017, 38(1): 122-128.
- 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, 10(4): 199-204.
Ren DD, Xie YF, Li SH, *et al*. Research progress in the detection method of zearalenone in feed and food [J]. Anal Test Technol Instrum, 2015, 10(4): 199-204.
- 包懿, 李智瑾. 谷物中玉米赤霉烯酮检测方法的研究进展[J]. 分析化学进展, 2016, 6(1): 7-13.
Bao Y, Li ZJ. Research progress in determination of zearalenone in grains [J]. Progr Anal Chem, 2016, 6(1): 7-13.
- 周妍, 张圆圆, 刁晨曦, 等. 玉米赤霉烯酮检测方法的研究进展[J]. 中国饲料, 2017, 10(16): 35-39.
Zhou Y, Zhang YY, Diao CX, *et al*. Research progress of detection method of zearalenone [J]. China Feed, 2017, 10(16): 35-39.
- GB2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].
GB2761-2017 National food safety standard-Mycotoxin limits in foods [S].
- 甄玉萍, 裴世春, 高建伟, 等. 禾谷镰刀菌发酵液中玉米赤霉烯酮毒素

- 的提取及纯化研究[J]. 食品工业科技, 2016, 37(9): 155-158.
- Zhen YP, Pei SC, Gao JW, *et al.* Extraction and purification of zearalenone toxin from *Fusariumgraminearum* fermentation broth [J]. Food Ind Technol, 2016, 37 (9): 155-158.
- [13] 姚秀娟, 王书舟, 王志强. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定食用油中玉米赤霉烯酮[J]. 河南预防医学杂志, 2016, 27(9): 661-663.
- Yao XJ, Wang SZ, Wang ZQ. Determination of zearalenone in edible oil by immunoaffinity column HPLC [J]. Henan J Prev Med, 2016, 27(9): 661-663.
- [14] 丁雪瑶, 黄钰, 钟晓霞, 等. 动物性食品中玉米赤霉烯酮残留的 LC-MS/MS 法测定[J]. 畜牧与兽医, 2016, 10(1): 86-89.
- Ding XY, Huang Y, Zhong XX, *et al.* Determination of zearalenone residue in animal food by LC-MS/MS [J]. Anim Husbandr Veter, 2016, 10(1): 86-89.
- [15] 徐一达, 袁晓, 王海鸣, 等. 色谱法检测真菌毒素的研究进展[J]. 粮油食品科技, 2018, 26(6): 54-61.
- Xu YD, Yuan X, Wang HM, *et al.* Research progress of mycotoxin detection by chromatography [J]. Cereals Oil Food Technol, 2018, 26(6): 54-61.
- [16] Zhang, X, Wang X, Sun, M, *et al.* A magnetic nanoparticle based enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive quantification of zearalenone in cereal and feed samples [J]. Toxins, 2015, 7(10): 4216-4231.
- [17] Rasmussen R, Stormimld BC, Rasmussenph TR, *et al.* Multi - mycotoxin analysis of maize silage by LC - MS/MS [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(2): 765-776.
- [18] Abergat A, Solyakova CB, Bondesson U. Development and in-house validation of an LC-MS /MS method for the quantification of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxin, ochratoxin A and fumonisin B₁ and B₂ in vegetable animal feed [J]. Food Add Contamin Part A, 2013, 30(3): 541-549.
- [19] Kong WJ, Shen HH, Zhang XF, *et al.* Analysis of zearalenone and α -zearalenol in 100 foods and medicinal plants determined by HPLC-FLD and positive confirmation by LC-MS-MS [J]. J Sci Food Agric, 2013, 93(7): 1584-1590.
- [20] 张继斌, 汪咏曾, 王昕, 等. 免疫亲和柱同时净化-HPLC法测定高粱中黄曲霉毒素和玉米赤霉烯酮[J]. 粮食科技与经济, 2013, 38(6): 231-236.
- Zhang JB, Wang YZ, Wang X, *et al.* Simultaneous purification of aflatoxin and zearalenone in Sorghum by immunoaffinity column-high performance liquid chromatography [J]. Food Sci Technol Econ, 2013, 38(6): 231-236.
- [21] GB/T 14699.1-2005 饲料采样[S].
- GB/T 14699.1-2005 Feed sampling [S].
- [22] GB/T 19540-2004 饲料中玉米赤霉烯酮的测定方法[S].
- GB/T 19540-2004 Determination of zearalenone of zearalenone in feeds [S].

(责任编辑: 陈雨薇)

作者简介

李晓波, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: lixiaobo4@mengniu.cn

李慧娟, 工程师, 主要研究方向为食品安全与检测。

E-mail: lihuijuan@mengniu.cn