

超导量点—免疫荧光法快速测定粮食中黄曲霉毒素 B₁ 的方法验证

Validation of the method for determination of aflatoxin B₁ by QD-Infinity immunofluorescence method in grain

胡元斌¹ 许艳霞¹ 王达能¹ 马志²

HU Yuan-bin¹ XU Yan-xia¹ WANG Da-neng¹ MA-Zhi²

倪小英¹ 唐颜苹² 余杨¹

NI Xiao-ying¹ TANG Yan-ping² YU Yang¹

(1. 湖南省粮油产品质量监测中心, 湖南 长沙 410201; 2. 深圳赛泰诺科技股份有限公司, 广东 深圳 518000)

(1. Hunan Provincial Center for Monitoring of Grain Oil Products Quality, Changsha, Hunan 410201, China;

2. Shenzhen Sitechno Biotechnology Co., Ltd., Shenzhen, Guangdong 518000, China)

摘要:以超导量点为荧光探针,建立了一种超导量点—免疫荧光快速测定粮食中黄曲霉毒素 B₁ 的方法。采用多种方式评价了该方法与高效液相色谱法及酶联免疫吸附法检测稻谷及玉米样品的结果一致性,以验证该方法的准确性,同时对该方法的重复性和台间差异进行了考察。结果表明,超导量点—免疫荧光法对稻谷和玉米等粮食样品的检测结果与高效液相色谱法和酶联免疫法一致,表明该方法准确可靠,同时该方法两台仪器间的检测结果无显著性差异,且重复性好。

关键词:粮食;超导量点;免疫荧光;黄曲霉毒素 B₁

Abstract: A method for rapid determination of aflatoxin B₁ in grain based on QD-Infinity immunofluorescence was established with QD-Infinity as fluorescent probe. In order to confirm the accuracy of this method, multiple methods were used to evaluate the uniformity of the test results of AFB₁ in grain which was determined by the QD-Infinity immunofluorescence method, high performance liquid chromatography and enzyme association immunoadsorption, respectively. Moreover the repeatability of the method and the difference between stations were investigated. The detection results of the superconducting point-immunofluorescence method for grain samples such as rice and corn were consistent with those of high performance liquid chromatography and

enzyme association immunoadsorption, indicated that the method was accurate and reliable. There was no significant difference in the detection results when using two different instruments, which inclined a good repeatability of the method was good too.

Keywords: grain; QD-Infinity; immunofluorescence; aflatoxin B₁ (AFB₁)

黄曲霉毒素 B₁ 是已知的化学物质中致癌性最强的一种,主要诱发肝癌,对人和动物均具有极强的危害性。食物黄曲霉毒素 B₁ 污染比较常见,花生、玉米、稻谷、小麦、花生油等粮油食品都极易受到污染,且以南方高温、高湿地区受污染最为严重^[1]。

黄曲霉毒素 B₁ 的检测方法主要有仪器检测法^[2-5]和免疫学检测法^[6-8]。仪器检测法有高效液相色谱法、同位素稀释液相色谱—串联质谱法、薄层色谱法、毛细管电泳法,其中高效液相色谱法是目前实验室应用最广泛的方法^[9-10]。仪器检测法特异性强、准确度高,但对操作人员技术要求高,前处理繁琐,难以实现大批量样品检测,且无法满足及时高效的市场监管需求。免疫学检测法主要是利用抗原抗体的特异性免疫反应对样品中的抗原或抗体进行定量、定性或定位检测,属于快速检测方法,与仪器检测法相比,该方法具有设备小巧、检测速度快、成本低等优点,在市场监管中具有广泛的应用,且适合大批量样品的检测。

根据标记物的不同,黄曲霉毒素 B₁ 免疫学检测法有酶联免疫法^[11]、胶体金法^[12]、时间分辨荧光法、荧光微球法、量子点法^[13]等。量子点是一种准零维的纳米材料,具

基金项目:粮食公益性行业科研专项经费项目(编号:201513006-4)

作者简介:胡元斌(1963—),男,湖南省粮油产品质量监测中心高级工程师。E-mail: 289637417@qq.com

收稿日期:2019-10-13

有激发光谱宽,发射光谱窄,荧光寿命长,斯托克位移大,荧光强度大,且可通过粒径控制荧光波长及强度等特点,是一种理想的荧光标记物,在生物成像、免疫检测等领域广泛应用^[14]。

研究拟以超导量子点为荧光标记物,利用超导量点优越的荧光性能,结合免疫荧光技术,建立一种灵敏、准确的粮食黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测方法,并对该方法的准确性、重复性和台间差等参数进行验证,旨在考察该方法在粮食黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

黄曲霉毒素 B₁ 快速定量检测卡:深圳市赛泰诺生物技术有限公司;

ST 稀释液:深圳市赛泰诺生物技术有限公司;

黄曲霉毒素 B₁ 酶联免疫检测试剂盒:北京华安麦科生物技术有限公司;

黄曲霉毒素 B₁ 免疫亲和柱:北京中检维康生物技术有限公司;

甲醇:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;

色谱柱:RBAX SB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 美国 Agilent 公司;

糙米、玉米样品:湖南家润多超市。

1.1.2 仪器

免疫荧光快速定量检测系统:QD-Infinity 型,深圳市赛泰诺生物技术有限公司;

酶标仪:rayto RT-6000 型,深圳雷杜生命科学股份有限公司;

液相色谱仪:Agilent 1100 型,安捷伦科技有限公司。

1.2 样品检测

1.2.1 样品预处理 稻谷样品脱壳后粉碎至全部过20目筛,小麦和玉米直接粉碎至全部过 20 目筛,称取过筛样品 5 g 置容器中(如 50 mL 离心管),加入 60% 甲醇溶液 25 mL,混匀,置摇床震荡 10 min,选择 4 000×g 离心 5 min,取上清液备用。

1.2.2 超导量点—免疫荧光法快速法 取经预处理的样品上清液 100 μL 与 ST 缓冲液 500 μL 震荡混匀,得待检测液 1,取 75 μL 待检测液 1 垂直缓慢滴入检测卡的加样孔,孵育 15 min 后,选择“快速检测”模式,当出现请插入检测

卡提示时,立即将检测卡插入 QD-Infinity 快速免疫荧光分析仪,仪器自动根据检测卡上的二维码读取产品信息并进行检测,13 s 仪器显示检测结果,检测完毕。

1.2.3 酶联免疫法 取经预处理的样品上清液,按照 AFB₁ 酶联免疫检测试剂盒的检测方法进行测试。

1.2.4 高效液相色谱法

(1) 上样液制备:取经预处理的样品上层清液 10 mL,加入 20 mL 蒸馏水稀释于 50 mL 离心管中,涡旋混匀,再用微纤维滤纸过滤,并收集滤液作为上样液。

(2) 净化:免疫亲和柱平衡后,将柱上面连接 25 mL 一次性注射器,准确移取 15 mL 上样液,调节开关,使液体以 1~2 d/s 的速度流出;待液体排干后,用去离子水洗 2 次,每次 10 mL;待液体排干后,上样 1 mL 甲醇,流速 1 d/s,收集洗脱液,用水稀释定量至 2 mL,最后用 0.22 μm 微孔滤器过滤后转移至样品瓶采用柱后光化学衍生高效液相色谱法测量。

(3) 色谱条件:选择 ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相 A 为水, B 为甲醇, C 为乙腈;等度洗脱(58% A+20% B+22% C);流速 1.2 mL/min;柱温 30 ℃;进样体积 100 μL;激发波长 360 nm;发射波长 440 nm;柱后光化学衍生器。

1.3 数据处理

所有数据均采用 Excel 2010 和 SPSS 22.0 处理。

2 结果与讨论

2.1 准确性

2.1.1 与酶联免疫法比较 酶联免疫法是当前应用较多的黄曲霉毒素 B₁ 的快速检测方法,也是国标(GB 5009.22—2016 第四法)规定方法。随机选取 43 份不同黄曲霉毒素 B₁ 的样品,分别采用超导量点—免疫荧光法快速法和酶联免疫法测定,将两种测定方法的结果进行配对 *t* 检验、相关分析和方差分析,见表 1。

由表 1 可知,43 份样品的超导量点—免疫荧光法快速法和酶联免疫法检测结果平均值分别为 10.84, 11.47 μg/kg,两种方法配对检验 *t* 值为 1.002,而在 95% 的置信度下,*t* 分布的双边临界 *t* 值为 2.326,因此,两种方法的检测结果之间无显著性差异。

分别采用偏相关和距离分析分析了超导量点—免疫荧光法快速法和酶联免疫法相关性(见表 2),偏相关结果表明,两种方法检测结果间的 Pearson 相关系数为 0.965,

表 1 超导量点—免疫荧光法快速法与酶联免疫法 *t* 检验表

Table 1 The *t*-test results of QD-Infinity and ELISA

方法	样品数量	平均值/(μg·kg ⁻¹)	标准误差	<i>t</i> 值	Sig(双侧)	<i>t</i> _{0.95,42} (双侧)
QD-Infinity 免疫荧光法	43	10.84	2.91	1.002	0.322	2.326
酶联免疫法	43	11.47	2.72			

表 2 超导量点—免疫荧光法快速法与酶联免疫法偏相关分析[†]
Table 2 The partial correlation analysis of QD-Infinity and ELISA ($n=43$)

方法	QD-Infinity 免疫荧光法	酶联免疫法
QD-Infinity 免疫荧光法	1.000	
酶联免疫法	0.965 **	1.000

[†] ** . 在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

表明两种方法在 0.01 水平(双侧)上显著相关。距离分析结果也表明两种方法的 Pearson 相关系数为 0.965, 表明两种方法的结果为相似矩阵。

对超导量点—免疫荧光法快速法和酶联免疫法的检测结果之间进行了线性相关拟合, 结果表明, 两种方法检测结果线性相关系数 $R^2 = 0.9306$, 线性方程斜率为 0.906, 与 1 接近。说明超导量点—免疫荧光法快速法和酶联免疫法的检测结果非常接近, 无显著性差异。

假定方差齐性, 采用 S-N-K(s) 比较方法, 比较了两种检测方法结果之间的差异, 结果见表 3。结果表明, 两组结果的 F 值为 0.003, 显著性为 0.957, 远大于 0.05, 表明两组结果无显著性差异。

2.1.2 与高效液相色谱法比较 高效液相色谱法是黄曲霉毒素 B₁ 检测的经典方法。随机选取 25 份不同黄曲霉

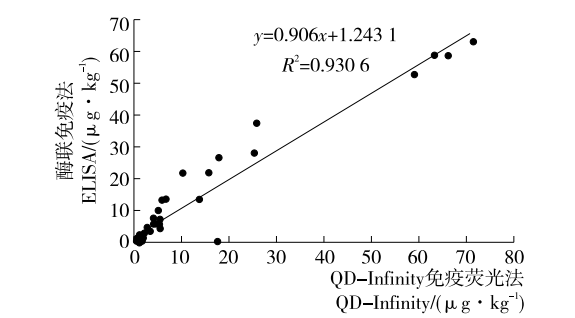


图 1 超导量点—免疫荧光法快速法与酶联免疫法相关性
Figure 1 The correlation of QD-Infinity and ELISA

表 3 超导量点—免疫荧光法快速法与酶联免疫法方差分析
Table 3 The variance analysis of QD-Infinity and ELISA

来源	平方和	df	均方	F 值	显著性
组间	0.946	1	0.946	0.003	0.957
组内	27 560.046	84	328.096		
总数	27 560.992	85			

毒素 B₁ 的样品, 分别采用超导量点—免疫荧光法快速法和高效液相色谱法测定, 将两种测定方法的结果进行配对 t 检验、相关分析和方差分析, 见表 4。

表 4 超导量点—免疫荧光法快速法与高效液相色谱法 t 检验表
Table 4 The t -test results of QD-Infinity and HPLC

方法	样品数量	平均值/(μg · kg⁻¹)	标准误差	t 值	Sig(双侧)	$t_{0.95,24}$ (双侧)
QD-Infinity 免疫荧光法	25	272.91	72.71	0.849	0.404	2.391
高效液相色谱法	25	283.90	79.89			

由表 4 可知, 25 份样品的超导量点—免疫荧光法快速法和高效液相色谱法检测结果平均值分别为 272.91, 283.90 μg/kg, 两种方法配对检验 t 值为 0.849, 而在 95% 的置信度下, t 分布的双边临界 t 值为 2.391, 因此, 两种方法的检测结果之间无显著性差异。

分别采用偏相关和距离分析分析了超导量点—免疫荧光法快速法和高效液相色谱法相关性(见表 5), 偏相关结果表明, 两种方法检测结果间的 Pearson 相关系数为 0.990, 表明两种方法在 0.01 水平(双侧)上显著相关。距离分析结果也表明两种方法的 Pearson 相关系数为 0.990, 表明两种方法的结果为相似矩阵。

对超导量点—免疫荧光法快速法和酶联免疫法的检测结果之间进行了线性相关拟合, 结果表明, 两种方法检测结果线性相关系数 $R^2 = 0.9808$, 线性方程斜率为 1.0899, 与 1 接近, 说明两种方法的检测结果非常接近, 无显著性差异。

假定方差齐性, 采用 S-N-K(s) 比较方法, 比较了超导

表 5 超导量点—免疫荧光法快速法与高效液相色谱法偏相关分析[†]
Table 5 The partial correlation analysis of QD-Infinity and HPLC ($n=25$)

方法	QD-Infinity 免疫荧光法	酶联免疫法
QD-Infinity 免疫荧光法	1.000	
酶联免疫法	0.990 **	1.000

[†] ** . 在 0.01 水平(双侧)上显著相关。

量点免疫荧光法和高效液相色谱法两种检测方法结果之间的差异, 结果见表 6。结果表明, 两组结果的 F 值为 0.010, 显著性为 0.920, 远大于 0.05, 表明两组结果无显著性差异。

2.2 重复性

随机选取 1 个样品, 采用超导量点—免疫荧光法重复测定 6 次, 结果分别为 7.10, 7.33, 7.44, 6.59, 6.69, 6.36 μg/kg, 平均值为 6.92 μg/kg, 相对标准偏差为 6.29% (低于 10%), 表明该方法具有较好的重复性。

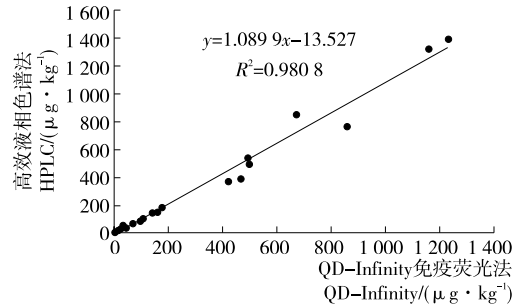


图2 超导量点—免疫荧光法快速法与高效液相色谱法相关性

Figure 2 The correlation of QD-Infinity and HPLC

表6 超导量点—免疫荧光法快速法与高效液相色谱法方差分析

Table 6 The variance analysis of QD-Infinity and HPLC

来源	平方和	df	均方	F 值	显著性
组间	1 511.540	1	0.946	0.010	0.920
组内	7 117 034.887	48	148 271.560		
总数	7 118 456.727	49			

根据 GB 5009.22—2016 规定,高效液相色谱法的重复性在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。试验中样品 6 次测定的平均值为 6.92 μg/kg,计算出两次测定绝对差(即重复性限 r)≤1.384,6 次测定的重复性临界极差为 1.98,重复性标准差为 0.494,显著性水平 $\alpha=0.05$ 情况下,查表得 $\chi^2_{0.95}(5)$ 为 11.070 5, $\chi^2<\chi^2_{0.95}(5)$,极差 1.08<临界极差(1.98),说明该方法测定的重复性标准差和极差均没有超过高效液相色谱法国标(GB 5009.22—2016)中规定的重复性要求。

2.3 稳定性

随机选取 3 个不同浓度梯度(编号为 a、b、c,对应浓度分别为 3.72,23.31,9.95 μg/kg)的样品,采用超导量点—免疫荧光法快速法,每份样品分别孵育 15,16,18,20 min 后,进行测定,考察孵育时间对检测结果的影响,结果见图 3。由图 3 可看出,随着孵育时间的增长,测定结果逐渐升高。与 15 min 相比,a、b、c 3 个样品孵育 20 min 后,检测结果分别升高 15.9%,17.8%,18.9%。

2.4 台间差

在随机两台 QD-Infinity 免疫荧光快速定量检测系统上对 3 个不同浓度梯度的样品(样品编号分别为 1、2、3,浓度分别为 5.1,20.4,37.1 μg/kg)进行检测,每个样本平行检测 6 次,测定结果采用配对 t 检验来比较 2 台仪器间是否存在显著性差异,经计算 $t=0.393, t_{0.025,17}=2.458, t<t_{0.025,17}$,说明随机两台 QD-Infinity 免疫荧光快速定量检测系统的检测结果无差异,结果见表 7。

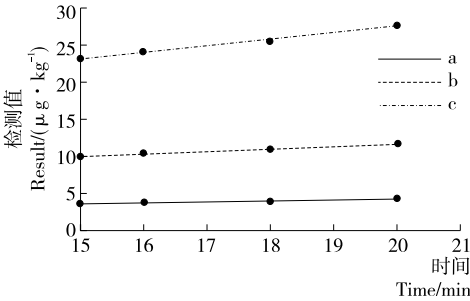


图3 超导量点—免疫荧光法孵育时间的影响
Figure 3 The influence of time for the results of QD-Infinity

表7 超导量点—免疫荧光法台间差结果
Table 7 The differents equipments QD-Infinity

样品编号	平行	检测结果/(μg · kg ⁻¹)		t 值
		1 号仪器	2 号仪器	
1	1	5.30	5.25	
	2	5.21	5.12	
	3	5.01	5.16	
	4	5.44	5.58	
	5	4.88	4.93	
	6	4.91	4.80	
2	1	18.93	19.11	0.393
	2	20.66	21.03	
	3	19.48	19.78	
	4	19.20	18.72	
	5	22.83	22.43	
	6	21.17	21.59	
3	1	36.12	35.67	
	2	35.24	34.74	
	3	38.73	39.16	
	4	36.89	37.84	
	5	37.22	36.37	
	6	38.31	39.02	

3 结论

超导量点—免疫荧光法是一种以超导量子点为荧光探针的免疫分析方法,具有灵敏、准确、快速等优点。通过与高效液相色谱法及酶联免疫吸附法比较,该方法测定粮食中的黄曲霉毒素 B₁ 具有较高的准确性和符合国标(GB 5009.22—2016)要求的精密度,任意两台仪器间的检测解结果也无显著性差异。该方法检测结果与孵育时间密切相关,随着孵育时间的延长,检测结果逐渐上升,因此,在使用过程中应严格控制孵育时间。超导量点—免疫荧光法测定粮食中黄曲霉毒素 B₁ 准确、高效,具有较高的应用前景。

(下转第 109 页)

4 结论

(1) 设计建立了由卵形体、输送辊、导向杆组成的数字化虚拟样机(仿真模型),并创建了卵形体翻滚距离和导向杆作用距离仿真值的测量方法。

(2) 不同蛋形角(3° , 5° , 7°)、长轴(53.2, 57.2, 61.2 mm)、短轴(40.6, 43.6, 46.6 mm)、中心距(50, 55, 60 mm)、导向杆弯曲角度(15° , 30° , 45°)、输送辊移动速度(30, 50, 70 mm/s)的仿真值与实际试验值的变化规律基本吻合,相对误差均在 10%以内,表明所建的仿真模型是可信的和有效的,利用仿真模型研究翻转运动规律是可行的。

(3) 对于不同的卵形体农产品大小头自动定向翻转运动的仿真模型有待于进一步的优化,并研究各因素对不同的卵形体农产品翻转运动的影响规律,以及卵形体农产品翻转运动的动力学特性。

参考文献

- [1] 张艳龙, 李祥辉, 聂馨晨, 等. 农产品上料定向排序技术研究现状[J]. 新疆农机化, 2019(1): 12-16.
- [2] KIM S H, YOUN D K, NOH K, et al. Effects of chitosan coating and storage position on quality and shelf life of eggs[J]. Int J Food Sci Tech, 2009, 44(7): 1 351-1 359.
- [3] 王国江. 禽蛋自动定向中轴向运动和翻转运动规律的研究及试验台的研制[D]. 镇江: 江苏大学, 2013: 28-44.
- [4] 孙柯. 禽蛋大小头自动定向机理及应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2014.
- [5] 朱杰. 卵形体水果大小头自动定向运动规律的研究[D]. 镇

江: 江苏大学, 2016.

- [6] 王婧. 卵形体农产品大小头自动定向中水平偏转角自适应机理及应用[D]. 镇江: 江苏大学, 2018.
- [7] 孙柯, 姜松, 朱红力, 等. 卵形体质量和材质对大小头自动定向运动的影响[J]. 食品与机械, 2014, 30(5): 72-75, 93.
- [8] 姜松, 孙柯, 杨德勇, 等. 禽蛋大小头自动定向排列中翻转运动机理研究[J]. 农业机械学报, 2014, 45(3): 215-222.
- [9] JIANG Song, SUN Ke, WANG Guo-jiang, et al. Study on the mechanical automatic orientation regulations about the axial and the turnover motions of eggs[J]. Journal of Food Engineering, 2014, 133(2): 46-52.
- [10] 朱体操. 卵形体农产品大小头自动定向中轴向运动的仿真及应用研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
- [11] 贾丹凤. 工作参数对卵形体农产品大小头自动定向运动影响的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2017.
- [12] UPADHYAYA S K, COOKE J R, GATES R S, et al. A finite element analysis of the mechanical and thermal strength of avian eggs[J]. Journal of Agricultural Engineering Research, 1981, 33(1): 57-78.
- [13] 田湛, 李应强. 基于 ADAMS 的锯片磨齿机拨齿机构接触仿真[J]. 冶金设备, 2006(1): 27-29, 45.
- [14] 谢最伟, 吴新跃. 基于碰撞仿真分析[C]//第三届中国 CAE 工程分析技术年会论文集. 大连: 中国机械工程学会机械工业自动化分会, 2007: 345-348.
- [15] 马焱, 余经虎. 一种苹果定向机构设计及定向单元动力学仿真[J]. 食品与机械, 2016, 32(11): 55-58.
- [16] 刘平, 张麟. 基于 ADAMS 的油菜籽仁皮振动分层仿真研究[J]. 武汉工业学院学报, 2011, 30(4): 24-27.

(上接第 87 页)

参考文献

- [1] 袁航. 粮食中主要真菌毒素危害及联合毒性研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 223-227.
- [2] 陈宁周, 颜玉婷, 王海波, 等. 高效液相色谱—串联质谱法测定腐乳中 16 种真菌毒素[J]. 食品安全质量检测学报, 2019(15): 5 169-5 179.
- [3] 李梁, 唐书泽, 杨盼盼, 等. 流动注射化学发光法在线监测饮用水中赭曲霉毒素 A 突发污染[J]. 食品与机械, 2019, 35(1): 86-91, 104.
- [4] 王光辉, 殷勇. 基于高光谱融合神经网络的玉米黄曲霉毒素 B₁ 和赤霉烯酮含量预测[J]. 食品与机械, 2018, 34(11): 64-69.
- [5] 肖利龙, 花锦. 高效液相色谱法测定花生酱中黄曲霉毒素 B₁ 结果不确定度的评定[J]. 食品与机械, 2018, 34(3): 79-81, 150.
- [6] 刘静, 王树颖, 刘道峰, 等. 高灵敏黄曲霉毒素 B₁ 免疫层析定量检测法的建立[J]. 食品与机械, 2017, 33(2): 51-55.
- [7] 张元杰. ELISA 法检测煎烤类食品中黄曲霉毒素含量[J]. 中国农村卫生, 2018(10): 12-13.

- [8] 潘明飞, 李诗洁, 郭丹丹, 等. 间接竞争酶联免疫分析方法检测花生中黄曲霉毒素 B₁ [J]. 中国食品学报, 2019(9): 255-261.
- [9] 黄轩. 食品中黄曲霉毒素 B₁ 柱后光化学衍生—高效液相色谱检测法研究[J]. 食品安全导刊, 2018(33): 103.
- [10] 苏小洁, 潘显茂. 用免疫亲和柱净化—柱后衍生高效液相色谱荧光法检测山楂干中多种黄曲霉毒素含量的效果观察[J]. 当代医药论丛, 2018(16): 189-190.
- [11] 卢安根, 莫建光, 杜寒春, 等. 酶联免疫法快速检测牛奶及其制品中的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 广西科学院学报, 2010(3): 306-308.
- [12] 杜兵耀, 马晨, 余雄. 胶体金免疫层析法检测谷物中的黄曲霉毒素 B₁ [J]. 饲料工业, 2016(9): 58-60.
- [13] 李园园, 李培武, 张奇, 等. 量子点标记荧光免疫法检测花生中黄曲霉毒素 B₁ [J]. 中国油料作物学报, 2012(4): 438-442.
- [14] 徐焕焕, 余锦露, 孙雅静, 等. 基于 CdTe:Zn/ZnS 量子点快速检测变形杆菌荧光免疫分析法的建立[J]. 分析实验室, 2019(9): 1 065-1 069.