

时间分辨荧光免疫层析法检测酥油中 黄曲霉毒素 M_1 的研究

魏 娜, 张飞龙

(西藏农牧科学院农业质量标准与检测研究所, 西藏 拉萨 850032)

摘 要:为寻求酥油中黄曲霉毒素 M_1 快速准确检测方法,本研究利用时间分辨荧光免疫层析法测定酥油中黄曲霉毒素 M_1 含量,结果表明:该检测方法样品加标回收率为 77.6 % ~ 89.6 %, $RSD < 15\%$,与免疫亲和柱净化-HPLC 法相比,相对误差 $< 12\%$,该方法具有简便快速、灵敏度高、重现性好等特点,可用于酥油中黄曲霉毒素 M_1 的快速检测。

关键词:时间分辨荧光免疫层析法;黄曲霉毒素 M_1 ;酥油;快速检测

中图分类号:S182

文献标识码:A

Study on Time-Resolved Fluorescence Immunochromatography for Aflatoxin M_1 Determination in Tibetan Buttle

WEI Na, ZHANG Fei-long

(Institutions of Agricultural Product Quality Standrad and Testing Research, Tibet Academy and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850032, China)

Abstract:To find a rapid and accurate detection method of aflatoxin M_1 in butter, a rapid and quantitative detection method based on time-resolved fluorecence immunochromatography method was developed to analyze AFM₁ in Tibetan buttle. The results showed that the recovery rate was 77.6 % - 89.6 % ($RSD < 15\%$). Compared with immuno-affinity column purification-liquid chromatography, the relative stand-ard deviation (RSD) was less than 12 %. Time-resolved fluorecence immunochromatography method as a rapid detection of AFM₁ in Tibetan buttle had high accuracy and stability.

Key words:Time-resolved fluorecence immunochromatography; Aflatoxin M_1 ; Tibetan buttle; Rapid assay

黄曲霉毒素主要是黄曲霉菌和寄生曲霉菌的代谢产物,毒性是氰化钾的 10 倍,是人类癌症的一个重要的致癌源,被世界卫生组织的癌症研究机构定为 I 类致癌物^[1]。黄曲霉毒素广泛存在于粮油农产品及其制品中,至今已分离出的黄曲霉毒素及其衍生物有 20 多种,而黄曲霉毒素 M_1 作为其中的一种,主要存在于牛乳中^[2-3]。西藏酥油是从高原地区牦牛牛奶中提炼出来的油脂产品,是西藏高原地区牧民摄入脂肪的主要膳食途径之一^[4-5]。酥油主要含有脂肪、水分及少量蛋白质,其中水分含量高达 15 % 左右,丰富的营养物质和较高的水分含量为微

生物的滋生与繁殖创造了非 常适宜的环境条件,若储藏条件不佳,便会导致酥油中霉菌的大量繁殖,产生真菌毒素,严重影响酥油品质及其安全性^[6]。刘晓棠、达娃卓玛、王秋玲等对西藏酥油中微生物的污染进行了评价,发现西藏地区酥油样品霉菌检出率为 90 % 以上^[7-9]。由于仪器设备及检测技术的限制,目前鲜有对西藏酥油中真菌毒素含量研究报道。黄曲霉毒素最常用的检测方法是高效液相色谱分析法,虽然精确度高,但设备昂贵、操作繁琐、耗时长、检测成本高。时间分辨免疫荧光免疫层析(time-resolved fluorecence immunochromatography, TRFIA),是近些年来得到发展应用的一种免疫分析技术,具有灵敏度高、检测速度快、结果稳定等优点,该技术目前已在食品安全检测领域得到应用^[10-14]。因此本研究采用时间分辨荧光免疫分析仪测定酥油中黄曲霉毒素 M_1 含量,以期对西藏酥油产品的质量安

收稿日期:2019 - 10 - 12

基金项目:国家自然科学基金“西藏高原农作物真菌毒素污染及产毒真菌多样性研究”(31860473);西藏自治区科技项目“西藏主要粮食作物储藏过程中真菌毒素污染分析与评价研究(13)

作者简介:魏 娜(1983 -),副研究员,从事农产品质量安全研究,E-main: weina0894@163.com。

表 1 酥油样品中精密度与加标回收率

加标浓度(μg/kg) Concentration of added standard	平均值(μg/kg) Mean	标准差 SD	变异系数(%) RSD	回收率(%) Recovery
0.05	0.039	0.0055	14.06	77.6
0.1	0.084	0.0067	8.03	83.6
0.2	0.175	0.0131	7.48	87.6
0.5	0.442	0.0334	7.54	88.5
1	0.896	0.0548	6.12	89.6

全、科学监管与防控提供重要检测手段。

1 材料与方法

1.1 检测原理

采用竞争免疫层析原理定量检测乳制品中黄曲霉毒素 M₁ 含量:在检测试纸条上固化了黄曲霉毒素 M₁ 抗原和质控抗体;在冻干品中包含有时间分辨荧光素标记的黄曲霉毒素 M₁ 抗体和质控抗原,当在冻干品中加入含有黄曲霉毒素 M₁ 的样品后,时间分辨荧光素标记的黄曲霉毒素 M₁ 抗体发生化学反应生成复合物,插入试纸条后,该复合物会随样品层析到 T 检测区域而不与 T 线的抗原结合,样品黄曲霉毒素 M₁ 含量越高,T 区域结合越弱。冻干品中的质控抗原与 C 线位置的质控抗体直接结合。

1.2 仪器

时间分辨荧光免疫分析仪、K30 加热器、高效液相色谱仪。

1.3 检测方法

前处理。称取 1~2 g 样品(精确到 0.001 g,被称试样中含黄曲霉毒素 AFM₁ <8 ng)于 50 mL 离心管,加入 8 mL 石油醚,待酥油溶解后加入 9 mL 水和 11 mL 甲醇,振荡 30 min,将全部液体移至分液漏斗中。加入 0.3 g 氯化钠摇动溶解,静置分层后,将下层转移到圆底烧瓶中,旋转蒸发至 10 mL 以下,用 PBS 稀释至 30 mL。

时间分辨荧光免疫层析法。将待测样品及检测试纸、冻干品回复至室温。打开样品杯,加入 150 μl 待测样品,充分溶解、混匀,置加热器 37 ℃ 温育,取出检测试纸条,插入加热器上的样品杯中,孵育 6 min 后,取出试纸条吸干下端液体,3 min 内放入时间分辨荧光免疫分析仪中读取结果,当 AFM₁ 含量过高,超出检测卡的检测范围(2.0 μg/kg)时,需将样品进行一定比例稀释后进行检测。

免疫亲和柱净化-HPLC 法。按照《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》(GB 5009.24-2016)第二法 高效液相色谱法测定。C₁₈ 色谱柱

(4.6 mm × 150 mm × 5 μm);进样量 50 μl;柱温 40 ℃;流动相为乙腈-甲醇(1:1)和水,梯度洗脱,流速为 1.0 mL/min;荧光检测器激发波长 360 nm,发射波长 440 nm。

2 结果与分析

2.1 方法的准确度和精密度

根据黄曲霉毒素定量检测卡的定量范围 0~2.0 μg/kg,分别添加 AFM₁ 标准溶液于阴性酥油样品中,使其在样品中的最终含量为 0.05、0.1、0.2、0.5、1.0 μg/kg,并进行 5 次重复试验。表 1 可知,该方法测定不同样品中 AFM₁ 的回收率在 77.6%~89.6%之间,样品的重复测定结果 RSD 为 6.12%~14.06%。说明该检测技术具有较好的准确度和精密度。

2.2 黄曲霉毒素时间分辨荧光免疫层析检测实际样品与 HPLC 检测结果比对

选取 5 份酥油样品,分别采用时间分辨荧光免疫分析法和《食品安全国家标准. 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定》(GB 5009.24-2016,第二法 高效液相色谱法)进行比对,进一步考察验证方法的科学性和适用性。由表 2 可知,时间分辨荧光免疫分析法与免疫亲和柱净化-HPLC 法测定结果的相对误差小于 10%,能满足酥油产品中黄曲霉毒素 M₁ 快速筛查的测定准确度的要求。与国标方法免疫亲和柱净化-HPLC 法相比,该方法具有操作简便、时间短、灵敏度高、不用接触毒素标准品、有机试剂用量少、对环境及检验人员安全性最高等优点,适用于企业和质检机构对粮油农产品中 AFM₁ 进行现场筛查。

3 结 论

本文利用高效液相色谱法和时间分辨荧光免疫层析法进行酥油中黄曲霉毒 M₁ 检测的对比研究。采用时间分辨荧光免疫层析法检测其回收率为 77.6%~89.6%,变异系数为 6.12%~14.05%,与 HPLC 法相比,检测结果无显著性差异,相对误差小

表 2 时间分辨荧光免疫层析法与高效液相色谱法检测结果比较

样品号 Sample	时间分辨荧光免疫法 TRFIA			高效液相色谱法 HPLC			相对误差(%) RE	显著性 P
	平均值(μg/kg) Mean	标准差 SD	RSD (%)	平均值(μg/kg) Mean	标准差 SD	RSD (%)		
1	ND	0	0	ND	0	0	/	/
2	ND	0	0	ND	0	0	/	/
3	0.292	0.0322	11.05	0.314	0.0132	4.22	-7.13	0.365
4	0.442	0.0437	9.88	0.454	0.0209	4.60	-2.56	0.727
5	ND	0	0	ND	0	0	/	/
6	ND	0	0	ND	0	0	/	/
7	ND	0	0	ND	0	0	/	/
8	ND	0	0	ND	0	0	/	/
9	ND	0	0	ND	0	0	/	/
10	ND	0	0	ND	0	0	/	/
11	ND	0	0	ND	0	0	/	/

于 12 %。时间分辨荧光免疫层析法检测过程中避免使用黄曲霉毒素标准品,可以直接读取检测结果,且所需时间短,检测全过程控制 10 min 内,仪器便于携带,可实现在农贸市场和超市等现场实地的快速检测,为酥油样品中黄曲霉毒素的快速检测提供了一种新的模式。

参考文献:

[1] 黄禄华,胡昌金,唐臣学,等. 黄曲霉毒素对奶牛的危害及控制措施[J]. 畜禽业,2013(10):26-28.

[2] 李培武,丁小霞,白艺珍,等. 印南日. 农产品黄曲霉毒素风险评估研究进展[J]. 中国农业科学,2013,46(12):2534-2542.

[3] 高亚男,王加启,郑楠. 牛奶中霉菌毒素来源、转化及危害[J]. 动物营养学报,2017,29(1):34-41.

[4] 喻峰,熊华,吕培蕾,等. 西藏牦牛酥油脂肪酸成分分析及功能特性评价[J]. 中国油脂,2006,31(11):35-38.

[5] 李海梅,何胜华,刘天一,等. 牦牛乳物理化学特性的研究进展[J]. 中国乳品工业,2009,37(8):35-40.

[6] 李婕妤,马传国,王英丹,等. 6 种市售西藏酥油理化指标及物理特性分析[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2018,39(3):38-46.

[7] 刘晓堂,边巴卓玛,陈虹. 酥油卫生微生物学评价[J]. 西藏科技,1994(4):73-74.

[8] 达娃卓玛. 浅谈酥油生产过程中微生物污染及防控[J]. 西藏农业科技,2015,37(3):6-8.

[9] 王秋玲,次顿,李颖,等. 不同包装及储藏条件对酥油微生物的影响[J]. 西藏科技,2015(4):8-11.

[10] 李静,李培武,张奇,等. 时间分辨荧光免疫层析试纸条在油料饼粕黄曲霉毒素 B1 检测中的应用[J]. 中国油料作物学报,2014,36(2):256-262.

[11] 谢婷婷. 时间分辨荧光免疫层析法检测小麦中呕吐毒素的研究[J]. 粮食与食品工业,2018,25(3):61-63+66.

[12] 王坤,侯玉泽,胡晓飞,等. 时间分辨荧光免疫分析技术在真菌毒素检测的应用[J]. 中国免疫学杂志,2013,29(2):197-201.

[13] Zhang J, Gao L, Zhou B, et al. Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2011, 91(2):193-197.

[14] 张兆威,李培武,张奇,等. 农产品中黄曲霉毒素的时间分辨荧光免疫层析快速检测技术研究[J]. 中国农业科学,2014,47(18):3668-3674.