

金标免疫层析试条检测样品中黄曲霉毒素 B₁ 的误差分析

孙秀兰^{1a,1b}, 张银志^{1a}, 汤 坚^{1a}, 朱 瑜²

(1 江南大学 a 食品科学与技术国家重点实验室, b 食品学院, 江苏 无锡 214122;
2 陕西省汉中市产品质量监督检验所, 陕西 汉中 723000)

[摘 要] 为了扩大金标免疫层析试条(GICA)检测食品和饲料中黄曲霉毒素 B₁ 的应用范围,研究了样品基质对试剂条信号强度的影响,探讨了 GICA 测定饲料和各种发酵类食品样品时,提取液中 NaCl、金属离子(Fe³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, As³⁺)和脂肪含量对检测结果的影响,并研究了消除影响的方法。结果表明,3 种阴性样品(大米、玉米和小麦粉)均存在不同程度的非特异性干扰,大米的影响最小,其次为玉米和小麦粉,大米的最佳稀释倍数为 10 倍,玉米和小麦粉为 30 倍;随 NaCl 质量浓度增加,检测结果有偏向假阳性的趋势;4 种金属离子对检测结果的影响程度依次为 Fe³⁺ > Cu²⁺ > Pb²⁺ > As³⁺;随着样品中油脂含量的增高,用 GICA 检测结果偏阳性的程度加剧。对粗提取液用氯仿法萃取后挥干再溶解,可将盐离子和重金属离子对测定的影响控制在允许范围之内;用石油醚脱脂,可使油脂对测定结果的影响降到最低。

[关键词] 金标免疫层析试条;黄曲霉毒素 B₁;误差分析

[中图分类号] R155.5

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)07-0188-05

Study on error analysis during detecting aflatoxin B₁ in food by using Gold Labeled Immucochromatographic Strip

SUN Xiu-lan^{1a,1b}, ZHANG Yin-zhi^{1a}, TANG Jian^{1a}, ZHU Yu²

(1 a State Key Lab of Food Science and Technology, b School of Food Science, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;
2 Quality Supervision & Inspection Bureau of Hanzhong, Hanzhong, Shaanxi 723000, China)

Abstract: The key factors, including NaCl, metal ions (Fe³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, As³⁺), oil content and so on, were studied by detecting all kinds of ferment foods and feed, to amplify the application region of the Gold Labeled Immucochromatographic Strip (GICA) in detecting aflatoxin B₁ in foods. The results showed that all the factors had to some degree serious influence on the detecting results. The three negative samples (rice, corn and wheat flour) had no specific disturbance influence on detection. The sequence was corn, flour > rice. The best dilution multiples of rice were 10, while corn and wheat flour were 30; With the increasing of concentration of NaCl, the muscaline ratio of decting results are increasing; according to the influence on the result, the sequence among those factors is Fe³⁺ > Cu²⁺ > Pb²⁺ > As³⁺. The experiment showed that with the increasing of lipin in the samples, the muscaline ratio increased, too. Fe³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and As³⁺ extracted by chloroform, volatilized and then dissolved could ensure the influence under the limited line. Removed the oil by petroleum, the influence caused by oil could be decreased in the lowest line.

Key words: Gold Labeled Immucochromatographic Strip; aflatoxin B₁; error analysis

* [收稿日期] 2006-08-21

[基金项目] 江苏省自然科学基金项目(B K2002406);江南大学预研基金项目(005041)

[作者简介] 孙秀兰(1976-),女,山东聊城人,副教授,博士,主要从事食品安全研究。E-mail: sxlzz@yahoo.com.cn

金标免疫层析检测技术(Gold Labeled Immunochromatographic Assay,简称 GICA),是20世纪末发展起来的一种快速免疫诊断技术^[1],利用纳米金作为标记物,短时间(15 min之内)便可得到直观的结果。该技术不需进行结合标记物与自由标记物的分离,省去了繁琐的加样、洗涤步骤,不仅提高了检测速度,而且检测过程中无需处理试剂,真正实现了一步法^[2-3](One-step)检测,特别是在大批量检测样本时用金标法初筛,可节约大量时间,满足现场检测的要求。黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)是农产品中广泛存在的一种重要的真菌毒素,致癌性极强,是世界各国重点监测的指标。因此,应用金标免疫层析法检测样品中 AFB₁ 具有非常重要的意义。

金标免疫层析法自建立以来,主要应用于医疗中一些病毒抗体的检测。近年来,该技术逐步被应用于食品中真菌毒素的检测,但相关文献较少,尤其针对食品中 AFB₁ 的金标免疫层析检测技术的研究与应用尚不成熟。

作者曾成功构建了 AFB₁ 的金标免疫层析检测体系^[4-5],但在实际应用时发现,样品的前处理过程对检测结果有显著影响,尤其是对某些成分较为复杂的样品进行检测时,会出现假阳性和假阴性结果。不同的样品组成,前处理方法也不一致,如一些发酵食品如酱油、醋和调味料等,其均含有不同量的盐、重金属离子和脂肪等成分,会严重干扰黄曲霉毒素的提取和测定^[6-8]。

因此,本研究针对金标免疫层析检测法在检测样品中 AFB₁ 时,遇到的实际问题展开研究,对盐、重金属离子和脂肪等影响因素进行了分析,以期获得消除这些影响的改进方法,使检测结果更加准确,为该方法的推广和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

包被 A 试剂为黄曲霉毒素 B₁ 抗原,包被 B 试剂为黄曲霉毒素 B₁ 二抗,以纳米金标记抗体的复合物作为检测探针;纤维膜、金标垫、样品吸收垫、吸水纸购自 Dassel 公司;AFB₁ 标准溶液(溶于甲醇)购自 Sigma 公司;大米、玉米、小麦粉和花生样品,系 2002-12 和 2003-02 分别由江苏省微生物研究所和中国疾控中心根据国家取样暂行标准,从陕西、广西、湖北、湖南和江西等省有关粮库和食品加工厂采集。实验用水均为去离子水。

1.2 试验仪器

XYZ 3000 型金标点样仪、CA92614 型金标切条机和 SR3000 型金标试条扫描仪均购自美国 Biotdot 公司,TK 型微量移液器为芬兰雷勃公司产品,小型粉碎机 and MS2 型微量振荡器为德国 IKA 公司产品,HH-S 型恒温水浴锅由金坛国盛实验仪器厂生产,隔水式电热恒温培养箱由上海跃进医疗器械厂生产,pH 计由上海梅特勒-克利多公司生产,SK250L H 型超声波清洗器由上海科导仪器公司生产。

1.3 试验方法

1.3.1 GICA 法的检测过程及其判断依据 将金标试纸条插入待测样品液中,10~15 min 后,利用金标扫描仪定量测定试剂条信号带 540 nm 处的吸光值,通过样品提取液与标准液的信号强度之比来计算样品中 AFB₁ 的含量。

1.3.2 样品提取 (1)方法 1。参照 GB5009.22-2003 中 ELISA 法检测样品的前处理方法。大米样品粉碎后,过孔径 1.0 mm 筛,充分混合,按四分法取 20 g 于 250 mL 的磨口三角瓶中,准确加入 100 mL 甲醇-水(体积比为 55:45)溶液,振荡 15 min,过滤,弃去初滤液。准确吸取 20 mL 滤液(相当于 4 g 样品)于 250 mL 分液漏斗中,加入 80 mL 氯仿,加塞振荡 5 min,静置分层(约 30 min)放出下层氯仿层,经盛有约 20 g 预先用氯仿湿润的无水 Na₂SO₄ 定量慢速滤纸漏斗,过滤于 100 mL 蒸发皿中,再加入 10 mL 氯仿于分液漏斗中,重复振摇提取,氯仿一并滤于蒸发皿中,最后用少量氯仿洗涤过滤漏斗,洗液并入蒸发皿中。将蒸发皿放入通风橱,于 65 ℃ 水浴上通风挥干后,冷却。准确加入 20 mL 甲醇-PBS(体积比为 1:1)溶液,充分溶解凝结物,即为待测样品提取液。

(2)方法 2。为改进方法。准确称取 20.0 g 固体样品(已粉碎,并过孔径 1.0 mm 筛)于 250 mL 具塞锥形瓶中,准确加入 100 mL 甲醇-水(体积比为 55:45)溶液提取,瓶塞上涂一层水后,将瓶塞盖紧(防止液漏),超声波萃取 10 min,过滤,弃去 1/4 初滤液,收集试样滤液,摇匀,即为待测样品提取液。

(3)方法 3。主要用于饲料样品和各种发酵类食品中 AFB₁ 的检测。即在方法 2 的基础上,取 20 mL 提取滤液加入分液漏斗中,同时加入等体积氯仿萃取 5~10 min。待分层后,收集下层含 AFB₁ 的氯仿于 65 ℃ 挥干,用甲醇-PBS(体积比为 1:9)溶解,即为待测液。

(4)方法 4。主要用于油脂样品中 AFB₁ 的检测。首先按照方法 2 得到样品初提液,用等体积石油醚将试样转移至 250 mL 分液漏斗中,加塞振摇 5 min,静置分层(约 30 min)后放出下层甲醇-水提取液,即为待测样品提取液。

1.3.3 样品基质对 GICA 检测结果的影响试验
选用大米、玉米和小麦粉 3 种阴性样品各 2 g 作为研究对象,参照 GB5009.22 - 2003 对样品进行处理,针对每类样品的粗提液,研究不同稀释倍数下样品基质对检测结果的影响,以此来确定适于检测的最佳稀释倍数。稀释倍数依次为 2,5,10,15,20,30 和 50 倍,相当于每毫升提取液中样品量为 0.5,0.2,0.1,0.0667,0.05,0.0333 和 0.02 g。以不添加样品溶液的稀释液为空白对照。将颜色信号通过试剂条光度计可转变为光密度值,以此进行定量检测。抑制率 = A_i/A_0 (A_i 为样品信号强度的 OD 值, A_0 为空白对照的信号强度 OD 值)。抑制率越高,表明对测定结果的影响愈小,反之影响愈大。

1.3.4 GICA 检测样品时的误差分析 为了研究食品样品提取液中盐、重金属离子和脂肪等成分对 GICA 测定结果的影响,以阴性大米样品为基础,采用 1.3.2 中的方法 2 提取样品,对样品提取液分别作以下处理,然后进行 GICA 测定,测出每种提取液在 540 nm 处的吸光值 A_i ,以不添加任何成分的空白提取液 A_0 为对照,计算每个处理的抑制率。

处理 1:取 5 支小试管,向每支试管中加入样品提取液 1 mL,然后再添加 NaCl,使其质量浓度分别为 5,10,20,30 和 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

处理 2:取 5 支小试管,向每支试管中加入样品提取液 1 mL,然后添加 CuSO_4 ,使其质量浓度分别为 0.1,0.5,1.0,2.0 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

处理 3:取 5 支小试管,向每支试管中加入样品提取液 1 mL,然后添加 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$,使其质量浓度分别为 0.1,0.5,1.0,2.0 和 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

处理 4:取 5 支小试管,向每支试管中加入样品提取液 1 mL,然后添加 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$,使其质量浓度分别为 0.1,0.3,0.5,0.7 和 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

处理 5:取 5 支小试管,向每支试管中加入样品提取液 1 mL,然后添加 $\text{As}(\text{NO}_3)_3$,使其质量浓度分别为 0.1,0.3,0.5,0.7 和 0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

处理 6:取 5 支小试管,向每支试管中加入样品提取液 1 mL,然后再添加花生油,使其体积分数分别为 10%,30%,50%,70%和 90%。

2 结果与分析

2.1 样品基质对 GICA 检测结果的影响

样品中干扰物质的存在,是影响 GICA 检测特异性和灵敏度的重要因素,考察样品基质的干扰也是评价 GICA 非特异性的重要指标^[9-10]。图 1 显示了不同阴性样品(大米、玉米和小麦粉)不同稀释对比对 GICA 分析结果的影响。由图 1 可以看出,3 种样品均存在不同程度的非特异性干扰,但随着稀释倍数的增加,其对非特异性反应的影响降低。3 种样品基质中,大米的影响最小,其次为玉米和小麦粉。由图 1 可知大米的最佳稀释倍数为 10 倍,玉米和小麦粉为 30 倍。

2.2 GICA 测定发酵食品及饲料中 AFB₁ 的误差分析

2.2.1 NaCl 质量浓度对 GICA 测定结果的影响

图 2 表明,随着 NaCl 质量浓度的增大,测定结果有偏向假阳性的趋势,所以对酱油、豆瓣酱等含盐高的样品需进行脱盐处理,即用氯仿提取后再进行检测。

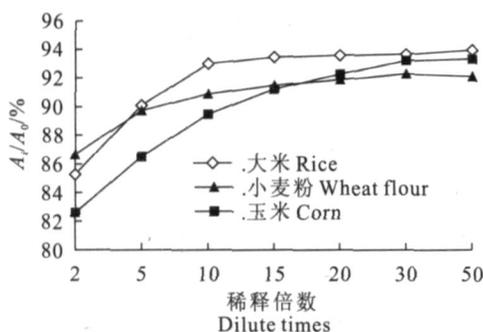


图 1 样品基质对 GICA 分析结果的影响

Fig. 1 Effect of the sample's matrix on GICA analysis result

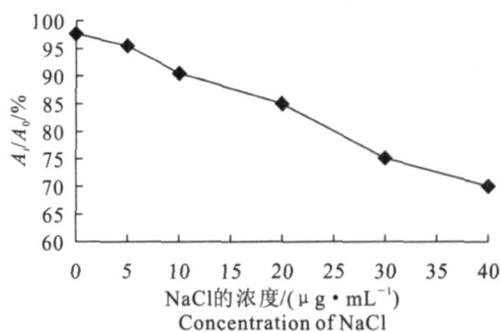


图 2 NaCl 质量浓度对 GICA 测定结果的影响

Fig. 2 Effect of the concentration of NaCl on GICA results

2.2.2 Fe^{3+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , As^{3+} 质量浓度对 GICA

测定结果的影响 从图 3a 可以看出,当 Fe^{3+} 质量

浓度在 0 ~ 2.0 μg/mL 时,其对测定结果的影响随质量浓度增大而增强,当 Fe³⁺ 的质量浓度在 2.0 μg/mL 以上时,抑制率下降到 40% 左右。因此,在测定样品时,尽可能使最终待测样品提取液中 Fe³⁺ 含量保持在较低的质量浓度;Cu²⁺ 对 GICA 测定也有一定的影响,但从图 3a 中可以看出,其对测定结

果的影响明显小于 Fe³⁺ 的影响。图 3b 显示,随 Pb²⁺ 和 As³⁺ 质量浓度增加,其对 GICA 抑制率曲线变化比较平缓,说明 Pb²⁺ 和 As³⁺ 的存在对检测结果没有明显影响。总的来看,各离子对 GICA 测定结果影响的显著程度依次为:Fe³⁺ > Cu²⁺ > Pb²⁺ > As³⁺。

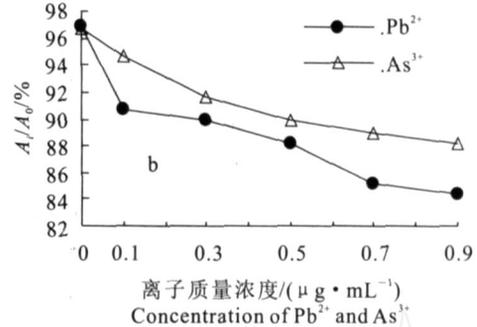
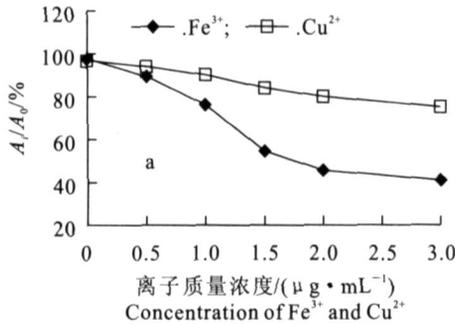


图 3 Fe³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ 和 As³⁺ 质量浓度对 GICA 测定结果的影响

Fig. 3 Effect of the concentration of Fe³⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and As³⁺ on GICA results

2.2.3 油脂对 GICA 测定结果的影响 由图 4 可以看出,油脂含量对 GICA 的检测结果影响很大。随着样品中油脂含量的增高,结果偏阳性的程度加剧。原因可能是样品提取液中油脂多粘附在 NC 膜(硝酸纤维膜)微孔上,对抗原抗体反应产生了一定的屏蔽效应,阻碍了金标抗体和固相抗原的结合,使得结果偏阳性。因此,在对油脂含量较高的样品进行检测时,一定要先进行除油脂处理。

到最低。

2.3 不同样品提取方法对 GICA 测定结果的影响

由图 5 可以看出,采用方法 3,即对粗提液用氯仿法萃取后,挥干再溶解,可基本使盐离子和重金属离子对测定的影响控制在允许范围之内。采用方法 4,即用石油醚脱脂,可使油脂对测定结果的影响降

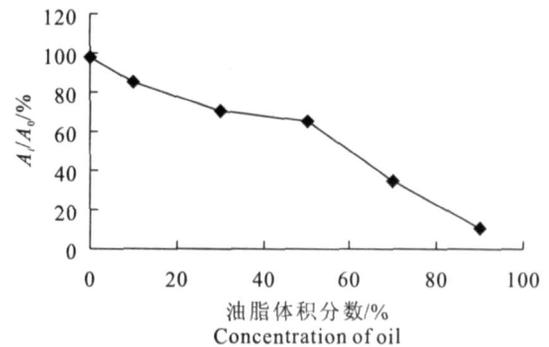


图 4 油脂体积分数对 GICA 测定结果的影响

Fig. 4 Effect of oil concentration on GICA results

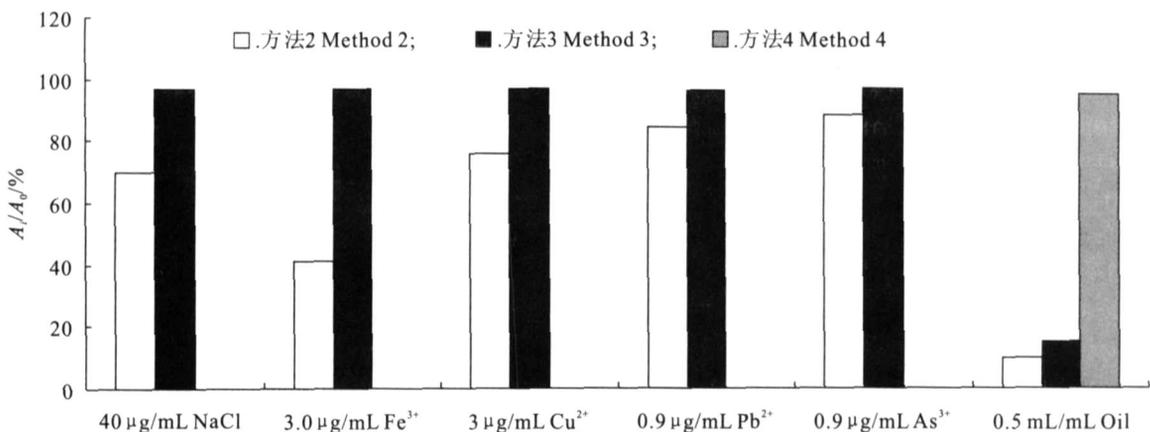


图 5 GICA 不同样品提取方法的比较

Fig. 5 Different extraction methods of GICA

3 结 论

GICA 检测法由于不用接触到黄曲霉毒素标准品,所以检验人员的安全性有了很大提高,其快速、简便的优势已使其成为检测发展的趋势。本研究结果初步证实了盐、重金属离子和脂肪等成分对检测结果具有影响,其中重金属离子的影响程度为: $Fe^{3+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > As^{3+}$ 。进一步研究表明,由于 GICA 方法中的金纳米颗粒的活性较高,对某些基质特殊的样品检测时会出现假阳性(阴性)结果,对这些样品进行特殊处理后(如氯仿萃取),可消除其对纳米金颗粒稳定性的影响,防止出现假阳性或假阴性,提高了测定的准确性^[11-12]。由于所检测的样品种类繁多,体系各不相同,预处理的提取步骤很多,这既影响测定速度,也影响回收率,怎样使预处理既快又准,还需后续研究才能确定。

[参考文献]

- [1] Paek S H, Lee C W, Yook S, et al. Performance control strategies of one-step immunochromatographic assay system for *Salmonella typhimurium*[J]. *Anal Lett*, 1999, 32:335-360.
- [2] Richard J L, Payne G A. Mycotoxins: risks in plant, animal and humans[M]. Iowa: Council of Agricultural Science and Technology (CAST), 2003:139-199.
- [3] Horton J K, Swinburne S, Sullivan M J. A novel, rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin[J]. *J Immuno Method*, 1991, 140:131-134.
- [4] Sun X L, Zhao X L, Tang J, et al. Preparation of gold-labeled antibody probe and its use in immunochromatography assay for detection of aflatoxin B₁[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 99(3):185-194.
- [5] Sun X L, Zhao X L, Tang J, et al. Development of an immunochromatographic assay for detection of aflatoxin B₁ in foods[J]. *Food Control*, 2006, 17(1):256-262.
- [6] Horwitz W. Official Methods of Analysis of AOAC[M]. Gaithersburg: AOAC International, 2000:56-70.
- [7] 赵晓联, 龚 燕, 孙秀兰, 等. 金标免疫层析法检测黄曲霉毒素 B₁ 的方法[J]. *食品粮油科技*, 2005, 13(6):49-51.
- [8] 赵晓联, 赵春城, 纽伟民, 等. 酶联免疫吸附法测定黄曲霉毒素 B₁ 误差分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2001, 11(4):473-474.
- [9] 孙秀兰, 赵小联, 汤 坚. 大米中黄曲霉毒素 B₁ 提取方法优化[J]. *食品科学*, 2004, 25(7):128-131.
- [10] 孙秀兰, 张银志, 汤 坚, 等. 黄曲霉毒素 B₁ 金标检测体系建立过程中的影响因素[J]. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(6):37-41.
- [11] 龚 燕, 赵春城, 张东升, 等. ELISA 法检测五类食品中黄曲霉毒素 B₁ 前处理方法的改进研究[J]. *食品工业科技*, 2003, 24(4):82-84.
- [12] 陆茂林, 蔡建荣, 赵晓联, 等. 标记免疫分析技术在食品分析中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2002, 2(11):60-62.
- [13] Riffaldi R, Levi-Minzi R P, de Bertoldi M. Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analyses [J]. *Waste Management & Research*, 1986, 4:87-96.
- [14] 李承强, 魏源送, 樊耀波, 等. 不同填充料污泥好氧堆肥的性质变化及腐熟度[J]. *环境科学*, 2001, 22(3):60-65.
- [15] Tchobanoglous G, Theisen H, Vigil S. Integrated solid waste management-engineering principles and management issues [M]. 北京:清华大学出版社, 2000:305.
- [16] Epstein E, Willson G B, Parr J F. The Beltsville aerated pile method for composting sewage sludge[C]. *New Process of Waste Water Treatment and Recovery*. London: Soc of Chem Ind, 1977:201-213.
- [17] 蔡建成, 李国珍, 范 毅, 等编译. 堆肥工程与堆肥工厂[M]. 北京:机械工业出版社, 1990:132-141.
- [18] Emeterio I J, Garcia V P. Composting of domestic refuse and sewage sludge. I: Evolution of temperature, pH, C/N ratio and cation-exchange capacity[J]. *Resource, Conservation and Recycling*, 1991, 6:45-60.
- [19] Tiquai S M, Richard T L, Honeyman M S. Carbon, nutrient, and mass loss during composting [J]. *Nutrient cycling in Agroecosystems*, 2002, 62:15-24.
- [20] Riffaldi R, Levi-Minzi R P, Bertoldi M. Evaluation of compost maturity by means of chemical and microbial analyses [J]. *Waste Management & Research*, 1986, 4:87-96.
- [21] 张 桥, 吴启堂, 黄焕忠, 等. 城市污泥与稻草堆肥的腐熟度指标研究[J]. *农业环境科学学报*, 2004, 23(4):782-786.

(上接第 187 页)