

# 玉米油中玉米赤霉烯酮的 ELISA 测定

孟卫芹<sup>1</sup>, 武玉香<sup>1</sup>, 唐世云<sup>2</sup>, 沈志强<sup>1, 2</sup>

(1. 山东绿都生物科技有限公司, 山东滨州 256600) (2. 山东滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州 256600)

**摘要:** 用间接竞争酶联免疫分析法 (ELISA 法) 对 3 种玉米油中的玉米赤霉烯酮残留进行了测定, 以评价试剂盒的性能。结果表明, 标准曲线线性方程  $y = -2.2x + 0.66$ , 相关系数  $r$  为 0.9974,  $IC_{50}$  为 0.29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 线性范围为 0.05~4.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 灵敏度为 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 添加回收率均大于 85%。该法测定玉米赤霉烯酮灵敏度高, 重复性好, 特异性高, 适合用于检测各种玉米油中的玉米赤霉烯酮残留。

**关键词:** 玉米油; 玉米赤霉烯酮; 酶联免疫检测法

文章编号: 1673-9078(2013)6-1431-1433

## Enzyme-linked Immunosorbent Assay for the Detection of Zearalenone in Corn Oil

MENG Wei-qin<sup>1</sup>, WU Yu-xiang<sup>1</sup>, TANG Shi-yun<sup>2</sup>, SHEN Zhi-qiang<sup>1,2</sup>

(1. Shandong Lvdu Bio-Sciences & Technology Co., Ltd, Binzhou 256600, China)

(2. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China)

**Abstract:** To know the performance of the kit, indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the residues of zearalenone in the 3 kinds of corn oil. The results showed that the linear equation was:  $y = -2.2x + 0.66$ ,  $r = 0.9974$ ,  $IC_{50} = 0.29 \mu\text{g}/\text{kg}$ . Quantitation of zearalenone was linear from 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to 4.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The sensitivity was 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The recovery rates in the corn oil were more than 85%. The sensitivity, repeatability and specificity of the method were satisfactory and could meet the need of detecting the residues of zearalenone in corn oil.

**Key words:** corn oil; zearalenone; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 又名 F-2 毒素, 主要是由镰刀菌属的粉红镰刀菌及禾谷镰刀菌产生的一种非甾体雌激素样作用的真菌毒素<sup>[1]</sup>。其毒素广泛存在于霉变的玉米、高粱、小麦等谷类作物和奶制品中, 对动物具有很强的生殖毒性和致畸性<sup>[2]</sup>, 还可导致畜禽的料耗增加、生长减缓、免疫抑制等, 给畜牧业带来很大的经济损失, 同时还可通过被污染的谷类作物和肉、奶等动物性食品进入人体, 从而引发肿瘤、诱导 DNA 收缩、导致染色体失常等, 给人类健康造成极大的危害<sup>[3]</sup>, 因此, 正日益受到重视。玉米、小麦和配合饲料污染 ZEN 的报告较多, 玉米深加工产品玉米油即玉米胚芽油具有调节血脂、预防动脉硬化的作用<sup>[4]</sup>, 备受消费者青睐, 其污染 ZEN 的报道较少, 而 ZEN 是影响其质量的重要卫生指标之一。

到 2003 年, 全世界已有 19 个国家制订了食品中 ZEN 的限量标准, 欧盟规定精炼玉米油中 ZEN 不得

超过 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[5]</sup>。中国标准则规定玉米、小麦及其制品中 ZEN 含量不得超过 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[6]</sup>, 但没有规定玉米油中 ZEN 的限量标准。但农作物特别是玉米中的 ZEN 检出率很高<sup>[7]</sup>, 而玉米油是以玉米为基本原料的, 因此非常有必要对玉米油中 ZEN 进行检测与控制。

目前, 检测 ZEN 的方法主要包括: 薄层色谱法 (TLC)<sup>[8-9]</sup>、气相色谱法 (GC)<sup>[10]</sup>、高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[11-12]</sup>、微生物检测法和酶联免疫法 (ELISA)<sup>[13-14]</sup>。它们都各有优缺点, 其中酶联免疫检测方法具有特异性强、灵敏度高、实验操作较简单、成本相对较低等优点, 适用于现场大规模样品的筛查。本实验应用我公司研制的玉米赤霉烯酮酶联免疫检测试剂盒测定了玉米油中的 ZEN 残留量。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试剂与材料

玉米赤霉烯酮标准品 (Sigma 公司, 纯度 99%); 正己烷、甲醇 (分析纯); 玉米赤霉烯酮酶联免疫检测试剂盒, 山东绿都生物科技有限公司 (批号为 LD120809, 包括包被有玉米赤霉烯酮全抗原的酶标

收稿日期: 2013-01-30

作者简介: 孟卫芹 (1985-), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全检测技术

通讯作者: 沈志强 (1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为预防兽医学

板,浓度分别为0、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的玉米赤霉烯酮标准液,玉米赤霉烯酮抗体溶液,酶标记物溶液,显色液 A,显色液 B,终止液,2 $\times$ 样品稀释液、20 $\times$ 浓缩洗涤液等);玉米油样品 1#、2#、3#(滨州超市)。

## 1.2 仪器与设备

MK3 型酶标仪,美国 Thermo 公司;TDL-40B 台式离心机,上海安亭科学仪器厂;QL-866 振荡器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;JE1002 型电子天平,上海浦春计量仪器有限公司;DRP-9272 型电热恒温培养箱,上海森信实验仪器有限公司;Genex Beta 单道和多道微量移液器等。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 实验原理

测定的原理是抗原抗体反应,采用间接竞争 ELISA 法检测样本中 ZEN 含量。微孔内包被有 ZEN 的全抗原,加入样本或标准液、ZEN 抗体后,样本或标准液中的 ZEN 和微孔内包被的偶联抗原竞争结合 ZEN 抗体,加入酶标记物后,用底物显色,样本和标准液中的 ZEN 含量与吸光度值呈反比,与标准曲线比较即可得出 ZEN 含量。

### 1.3.2 标准品检测

首先将试剂盒平衡至室温。加系列浓度的玉米赤霉烯酮标准液 50  $\mu\text{L}$  到对应的微孔中,加入 50  $\mu\text{L}$  ZEN 酶标记物溶液,再加入 50  $\mu\text{L}$  ZEN 抗体溶液,混匀,用盖板膜盖板后置 37  $^{\circ}\text{C}$  暗处温育 20 min。倾弃孔中液体,每孔以 250  $\mu\text{L}$  洗涤缓冲液洗涤,每次静置 20 s,甩去孔内液体,重复洗涤 3 次,拍干。每孔加入 50  $\mu\text{L}$  显色液 A 和 50  $\mu\text{L}$  显色液 B,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后在 37  $^{\circ}\text{C}$  暗处孵育 10 min。加入 50  $\mu\text{L}$  终止液终止反应,立刻于 450 nm 处用酶标仪测量吸光度值(OD 值)。

以试剂盒中系列标准液浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的 log 值为横坐标,以吸光度的 logit 值为纵坐标,绘制双对数标准曲线。

### 1.3.3 样品前处理

称取:2.0 $\pm$ 0.05 g 玉米油至离心管中,加入 4 mL 正己烷和 4 mL 80% 甲醇溶液,震荡 1 min 后 4000 r/min 离心 5 min;移取下层液体 10  $\mu\text{L}$  加到 590  $\mu\text{L}$  1 $\times$  样品稀释液中,混匀,称取 50  $\mu\text{L}$  用于分析。稀释倍数为 200 倍。

### 1.3.4 样品检测

检测方法同标准品检测步骤,将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上计算出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中玉米赤霉

烯酮实际浓度,也可使用相应的计算软件进行计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 标准曲线的绘制

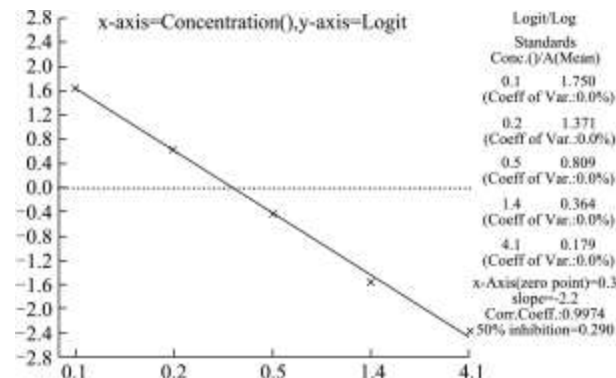


图 1 ZEN 标准曲线

Fig.1 Calibration curve of Zearalenone

以 logit/log 作图,以玉米赤霉烯酮标准品浓度( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )的对数为横坐标,对应的 logit 值为纵坐标,logit=ln(p/q), $p=B/B_0$ , $q=1-p$ ,标准曲线如图 1。

由标准曲线可以看出,在 0.05~4.05  $\mu\text{g}/\text{L}$  浓度范围内,ZEN 标准品有良好的线性关系,其线性方程为  $y=-2.2x+0.66$ ,相关系数  $r$  为 0.9974,IC<sub>50</sub> 为 0.29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。计算得知,当 ZEN 浓度达到 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时,抑制率为 16%,可以确定玉米赤霉烯酮间接竞争 ELISA 法检测的灵敏度为 0.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

### 2.2 玉米油样品中玉米赤霉烯酮含量的测定结果

表 1 玉米油样品中玉米赤霉烯酮含量测定结果

Table 1 The result of Zearalenone concentration in corn oil

玉米油样品	测定结果	ZEN 含量平均值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	变异系数 CV/%
1#	1.459~1.479	23.4	0.9
2#	1.407~1.421	27.7	0.7
3#	1.275~1.297	35.1	1.2

玉米油样品中 ZEN 含量的测定结果如表 1 所示,用上述方法测定的 3 种玉米油样品的结果均为阴性(结果 $<60 \mu\text{g}/\text{kg}$ ),且变异系数(CV)均小于 3%。

### 2.3 添加回收率试验

表 2 回收率试验结果

Table 2 Recovery rate of the method for ZEN detection

样品	加标浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检出浓度均值/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	样品空白/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	回收率/%
1#	50	68.45	22.6	91.7
3#	70	98.53	37.1	87.75

选玉米油 1#和 3#阴性样品,分别加入终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  和 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的 ZEN 标准品。按 1.3.2 样品处理方法并测定,每份做 2 个平行,同时测定样品空白,

计算回收率。结果如表 2 所示, 1#、3#玉米油样品的添加回收率分别为 91.7% 和 87.75%, 说明该方法提取效率较高, 重现性好。

### 3 结论

3.1 酶联免疫分析法是将抗原抗体特异性结合与酶对底物的高效催化结合起来的一种检测技术, ELISA 法检测快速, 灵敏度高, 特异性强, 样本前处理简单, 仪器化程度低, 样品处理量大, 并可以进行定性和定量检测, 非常适合于现场监控及大样本量的初筛, 现已实现了商品化, 在市场上已有很多厂家的试剂盒供应。另外, 建立一种快速、灵敏、易行的检测方法对制定 ZEA 标准以及确保食品和饲料等的安全也具有重要意义。

3.2 用该 ELISA 快速检测盒检测玉米油中玉米赤霉烯酮残留, 样品前处理简单, 适用范围广; 在 0.05~4.05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的浓度范围内线性关系良好,  $r=0.9974$ , 具有较高的灵敏度; 添加回收率均在 85% 以上, 重复性好, 满足食品理化分析的要求。间接竞争 ELISA 检测法耗时短 (约 1 h), 为准确测定粮油、食品、饲料及其原料中 ZEN 的含量提供了简便有效方法。

### 参考文献

- [1] 郭静, 袁莉芸, 贺军宇. 玉米赤霉烯酮毒害作用的研究进展 [J]. 湖南畜牧兽医, 2007, 3: 7-9
- [2] Giuseppina A, Robert H. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model [J]. Toxicity, 2003, 41:

- 1283-1290
- [3] 单妹. 玉米赤霉烯酮对家畜繁殖性能和人体健康的影响 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(1): 3-5
- [4] 周先汉, 马宏峰, 范婷婷. 玉米油降血脂作用的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(4): 1337-1337
- [5] European Commission. EC1881-2006, setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs [J]. Official Journal of the European Union, 2006, 12: 364-388
- [6] GB 2761-2011, 食品安全国家标准 [S]
- [7] 罗小虎, 包清彬, 杨潇, 等. 高效液相色谱法测定玉米中玉米赤霉烯酮 [J]. 粮食与饲料工业, 2009, 3: 48-49
- [8] Shotwell O L. Determination of zearalenone in corn: Collaborative Study [J]. Assoc. off. Anal. Chem., 1976, 59(3): 666
- [9] 罗雪云. 小麦、小麦制品及玉米中玉米赤霉烯酮的薄层色谱测定 [J]. 卫生研究, 1993, 32: 112-115
- [10] Mirocha C J. Detection and quantitation of zearalenone in Maize and Barley [J]. Assoc. off. Anal. Chem., 1974, 57(5): 1104
- [11] 隋凯. 免疫亲和柱-高效液相色谱法检测中的玉米赤霉烯酮 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16(6): 657-690
- [12] 冯永建, 何学超, 郭道林, 等. 玉米赤霉烯酮的液相色谱法检测技术研究 [J]. 粮食储藏, 2008, 37(4): 45-47
- [13] 邓舜洲, 何庆华, 章英, 等. 竞争间接 ELISA 检测饲料中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮 [J]. 江西农业大学学报, 2006, 28(2): 289-292
- [14] 彭运平, 齐维, 唐海波, 等. 应用酶联免疫法检测鱼肉、蜂蜜中氯霉素的残留量 [J]. 现代食品科技, 2010, 26(12): 1415-1417