

ELISA 法测定发酵茶和植物香料真菌毒素的污染

柳其芳

摘要 目的 探讨以 ELISA 法检测发酵茶、植物香料中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素(AFB1)、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、T-2 毒素的可行性及污染状况。方法 采用竞争酶联免疫吸附法 检测发酵茶、植物香料中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素。结果 玉米赤霉烯酮浓度为 40.0~1 000.0 μ g/kg 之间的变异系数为 1.5%~6.5%, 回收率为 87.5%~111.1% $r=0.998$, 伏马菌素浓度为 0.25~5.0mg/kg 之间的变异系数为 2.0%~6.5%, 回收率为 90.0%~107.2% $r=0.992$, 黄曲霉毒素浓度为 1.0~20.0 μ g/kg 之间的变异系数为 2.2%~7.8%, 回收率为 85.0%~115.0% $r=0.997$; 赭曲霉毒素浓度为 2.0~40.0 μ g/kg 之间的变异系数为 1.8%~7.0%, 回收率为 87.5%~120.0% $r=0.998$, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇浓度为 0.25~5.0 mg/kg 之间的变异系数为 1.5%~8.0% ,回收率为 90.0%~110.0% $r=0.996$, T-2 毒素含量浓度为 75.0~500.0 μ g/kg 之间的变异系数 为 2.8%~7.5% ,回收率为 86.6%~106.6% $r=0.996$ 。结论 ELISA 法检测发酵茶、植物香料中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素简便快速。建议日常工作中先以 ELISA 法筛选 ,阳性样品再以液相色谱—质谱联用仪分析法、薄层法进行确证实验。

关键词 发酵茶 植物香料 玉米赤霉烯酮 伏马菌素 黄曲霉毒素 赭曲霉毒素 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 T-2 毒素 酶联免疫法

中图分类号 R155.32 **文献标识码** A **文章编号** :1009-9727(2011)11-1381-03

Detection of zearalenone, fumonisin, aflatoxin, ochratoxin, deoxynivalenol and T-2 toxin in fermented tea and plant perfume by ELISA. LIU Qi-fang. (Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, Guangdong, P. R. China)

Abstract Objective To probe into the feasibility of detecting zearalenone, fumonisin, aflatoxin, ochratoxin, deoxynivalenol and T-2 toxin in fermented tea and plant perfume by ELISA. **Methods** The competitive ELISA was used to detect contamination of zearalenone, fumonisin, aflatoxin, ochratoxin, deoxynivalenol and T-2 toxin in fermented tea and plant perfume. **Results** The concentrations of zearalenone, fumonisin, aflatoxin, ochratoxin, deoxynivalenol and T-2 toxin in fermented tea and plant perfume were in the range of 40.0~1000.0 μ g/kg, 1.0~20.0 μ g/kg, 1.0~20.0 μ g/kg, 2.0~40.0 μ g/kg, 0.25~5.0 mg/kg and 75.0~500.0 μ g/kg with recovery in the range of 87.5%~111.1%, 90.0%~107.2%, 85.0%~115.0%, 87.5%~120.0%, 90.0%~110.0% and 86.6%~106.6%. **Conclusion** ELISA is suitable for rapid detection of mycotoxin in fermented tea and plant perfume.

Key words: Fermented tea; Plant perfume; Zearalenone; Fumonisin; Aflatoxin; Ochratoxin; Deoxynivalenol; T-2 toxin; Enzyme-linked immunosorbent assay

湿仓发酵茶通常放置于较潮湿的地方,如地下室、地窖,以加快其发酵速度,虽较干仓发酵茶速度快,但容易发生霉变,产生真菌毒素。植物香料在存放过程中也容易发生霉变,产生真菌毒素。真菌毒素(mycotoxin)是一些真菌(主要为曲霉属、青霉属及镰孢属)在生长过程中产生的生物毒素,目前已知的真菌毒素有 200 余种,按主要产毒菌种可将其分为曲霉毒素(如黄曲霉毒素、棕曲霉毒素等),青霉毒素(如展青霉素、桔青霉素等),镰孢毒素(如脱氧雪腐镰刀菌烯醇、玉米赤霉烯酮等)及其它类(如孢子毒)等 4 类。玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇和 T-2 毒素是禾木镰刀霉属、念珠镰刀霉、曲霉属或是谷物代谢分泌产生的毒性物,是国际粮农组织严控毒性物,因此研究快速简便检测方法对于日常监测工作中具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 随机抽取深圳市市售湿仓发酵茶 60 份和植物香料 35 份。

1.1.2 仪器及试剂 玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、T-2 毒素检测试剂盒(美国),酶标仪和液相色谱—质谱联用仪(美国)。

1.2 方法

1.2.1 检测原理 应用固相直接竞争酶联免疫吸附原理,用 70%甲醇萃取研磨样品中毒素,样品液与酶标记的伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、DON、T-2 毒素标准品混合加入到抗体包被的微孔中,样品及标准品中的毒素与酶联偶合剂竞争结合孔中的特异抗体加入酶底物及终止液后,在 450nm(OD450)、

作者单位:深圳市疾病预防控制中心 广东 深圳 518055

作者简介:柳其芳,男,副主任技师,主要从事卫生检验研究。

630nm 的滤镜下使用酶标仪对微孔板进行光学测量。

1.2.2 样品萃取 称取 5g 研磨样品 加入 25ml70/30(v/v)甲醇 / 水萃取溶液(检测脱氧雪腐镰刀菌烯醇加 25ml 蒸馏水萃取)。震荡或在混合器中混合 3min 静置样品 收集待检滤液。

1.2.3 检测步骤 按试剂盒操作说明书进行。

1.2.4 结果计算 样品毒素含量 (mg/kg 或 $\mu\text{g/kg}$)= 仪器读数 \times 稀释倍数。

1.2.5 确证实验 取阳性样品,应用液相色谱—质谱联用仪、薄层法进行确证实验。

2 结果

2.1 再现性和回收率 将玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、DON、T-2 毒素分别为 1000.0、5000.0、20.0、40.0、5000.0 和 500.0 $\mu\text{g/kg}$ 按对倍稀释 5 个浓度,使最低浓度分别为 40.0、250.0、1.0、2.0、250.0 和 75.0 $\mu\text{g/kg}$,测定各系列之间的变异系数和回收率,显示在全部范围内变异系数较低及回收率较高,得到很好的再现性和回收率,见表 1。

表 1 6 种真菌毒素以 ELISA 法检测再现性和回收率

毒素	检测浓度 ($\mu\text{g/kg}$)	变异系数 (%)	回收率 (%)	标准曲线回归 (r)
玉米赤霉烯酮	40.0~1000.0	1.5~6.5	87.5~88.1	0.998
伏马菌素	250.0~5000.0	2.0~6.5	90.0~103.0	0.992
黄曲霉毒素	1.0~20.0	2.2~7.8	85.0~115.0	0.998
赭曲霉毒素	2.0~40.0	1.8~7.0	87.5~120.0	0.998
DON	250.0~5000.0	1.5~8.0	90.0~108.0	0.996
T-2 毒素	75.0~500.0	2.8~7.5	86.0~106.0	0.996

表 2 ELISA 法检测 6 种真菌毒素的干扰情况

真菌毒素	本底值 ($\mu\text{g/kg}$)	黄曲霉毒素		赭曲霉毒素		DON	
		加入量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)	加入量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)	加入量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)
伏马菌素	500.0~5000.0	10.0	90.0~105.7	20.0	89.0~112.8	2000.0	92.0~114.4
黄曲霉毒素	1.0~10.0	—	—	20.0	90.0~118.0	2000.0	92.0~109.3
赭曲霉毒素	2.0~20.0	10.0	85.5~119.2	—	—	2000.0	87.0~118.0
DON	250.0~5000.0	10.0	86.9~107.3	20.0	88.5~107.0	—	—
T-2 毒素	75.0~500.0	10.0	90.0~105.7	20.0	89.0~112.8	2000.0	92.0~114.4
玉米赤霉烯酮	40.0~1000.0	10.0	87.2~106.3	20.0	90.3~112.5	2000.0	87.6~116.2

真菌毒素	本底值 ($\mu\text{g/kg}$)	伏马菌素		T-2 毒素		玉米赤霉烯酮	
		加入量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)	加入量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)	加入量 ($\mu\text{g/kg}$)	回收率 (%)
伏马菌素	500.0~5000.0	—	—	300.0	90.0~113.2	200.0	87.6~110.3
黄曲霉毒素	1.0~10.0	2500.0	90.0~115.0	300.0	85.0~115.0	200.0	85.2~120.3
赭曲霉毒素	2.0~20.0	2500.0	84.0~110.0	300.0	85.0~120.0	200.0	87.3~119.2
DON	250.0~5000.0	2500.0	87.0~118.0	300.0	85.5~119.0	200.0	86.9~114.3
T-2 毒素	75.0~500.0	2500.0	88.2~115.6	—	—	200.0	88.3~120.3
玉米赤霉烯酮	40.0~1000.0	2500.0	84.6~113.5	300.0	86.3~119.5	—	—

素是人类及多数物种的强诱变剂和肝致癌物,玉米等粮谷类产品及其制品中 AFB1 标准规定限值为 20 $\mu\text{g/kg}$;赭曲霉毒素是赭曲霉菌和某些青霉菌的代谢产物,尽管赭曲霉毒素数量相对较低,但它无法从体内很快的消除,并在人或动物的血液及其他消化污染食物的组织器官中堆积,赭曲霉毒素主要是肾毒素,玉米及其相关产品的赭曲霉毒素标准规定限值为 50 $\mu\text{g/kg}$;脱氧雪腐镰刀菌烯醇是一种免疫抑制剂,可以引起肾的疾病,小麦及玉米中 DON 的标准规定限值为 1 000 $\mu\text{g/kg}$;T-2 毒素常见于谷物,T-2 毒素抑制蛋白质合成,影响活细胞分化,谷物中 T-2 毒素的标准规定限值为 100 $\mu\text{g/kg}$ 。目前发酵茶、植物香料中玉

2.2 干扰实验 由于在发酵茶中各种真菌毒素可能共存,为探索该实验方法的特异性反应情况,通过加入不同浓度的各种真菌毒素,进行干扰因素研究。回收率为 84.0%~120.3%。见表 2。

2.3 对照实验 应用 ELISA 法与液相色谱—质谱联用仪分析法及薄层法同时对 6 份黄曲霉毒素阴性样品和 6 份黄曲霉毒素阳性样品进行测定,测定结果相符率达 100.0%。

2.4 发酵茶、植物香料样品的测定 应用 ELISA 法测定样品中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素。发酵茶 AFB1 污染水平超出标准规定限值(20 $\mu\text{g/kg}$)的有 10 份(16.6%),DON 污染水平超出标准规定限值(1 000 $\mu\text{g/kg}$)的有 13 份(23.0%),植物香料 AFB1 污染水平超出标准规定限值 (20 $\mu\text{g/kg}$) 的有 6 份 (17.1%),DON 污染水平超出标准规定限值 (1 000 $\mu\text{g/kg}$) 的有 4 份 (11.4%);玉米赤霉烯酮、伏马菌素、赭曲霉毒素、T-2 毒素污染水平均未超出标准规定限值 (分别为 200 $\mu\text{g/kg}$ 、2 000 $\mu\text{g/kg}$ 、50 $\mu\text{g/kg}$ 和 100 $\mu\text{g/kg}$)。

3 讨论

玉米赤霉烯酮是由禾木镰刀霉菌属产生,主要影响雌性激素及生殖系统,会导致猪的雌性激素综合征,玉米及其相关产品的玉米赤霉烯酮标准规定限值为 200 $\mu\text{g/kg}$,伏马菌素主要是念珠镰刀霉的产物,这是世界上很多地区的玉米中最常见的污染,流行病学研究显示部分地区食道癌的高发率与玉米中含伏马菌素有关,玉米及其相关产品的 FB1 标准规定限值为 2 000 $\mu\text{g/kg}$,黄曲霉毒素是曲霉和寄生曲霉代谢产物,黄曲霉毒

米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素的限量标准尚未制定,因此参照玉米及其相关产品所规定的标准限值进行评价。

对现场采样 60 份发酵茶、35 份植物香料中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素进行分析研究,发现有霉味的发酵茶、植物香料均存在不同程度的 AFB1 及 DON 污染情况,而玉米赤霉烯酮、伏马菌素、赭曲霉毒素、T-2 毒素虽未超出标准规定的限值,但在样品中均可检出,应引起广泛重视,建议加强发酵茶、植物香料中真菌毒素的日常检测工作。

(下转第 1409 页)

拄拐,3 例随访 2 年以上,未见肿瘤复发,脊柱稳定性良好,未出现畸形。

3 讨论

多节段椎管内肿瘤相对少见,文献相关的专题报告很少^[1-4]。从本组结果来看,多节段椎管内肿瘤以胸、腰段多见。肿瘤在该节段的发展空间相对较大。在组织类型上,本病以神经鞘瘤、脊膜瘤、神经纤维瘤等良性肿瘤多见,也有生殖细胞瘤、室管膜瘤的报告^[5-10,14]。

本组结果显示:本病病程相对较长,一方面是因瘤多为良性,生长缓慢;另一方面是因为,非神经外科医师缺乏相应的意识,没有考虑到病变的存在,如 1 例早期病例,腰椎 X-线片已经明显显示椎体受压缺损,但仍未能早期诊断,而仅按腰腿痛治疗。

脊髓受压在初期为缓慢进展表现,多数有肢体麻木无力;随着病情进展,逐渐出现排尿困难、大便秘结约肌受累症状,脊髓长久受压后,出现不可恢复性损害,导致病情迅速恶化。因此,对于出现神经根脊髓刺激或受压表现的病人时,应尽早给予相应的影像学检查,其 MRI 为首选。对于椎管内肿瘤,目前学者多主张早期手术,以创伤最小为前提,最大限度地切除病灶,为脊髓的恢复创造条件。病人一旦出现肿瘤压迫脊髓表现,脊髓组织可能继发出缺血性改变,即使手术,功能难以完全恢复^[11,12]。

近年来,行脊柱和椎管内病变手术时,越来越重视对脊柱稳定性的考虑,有采用自体骨和(或)人工材料进行脊柱的重建或者内固定^[13]。后路减压手术虽然近期对脊柱的稳定性不会有太大影响,但从远期来看,部分病人会出现脊柱前凸改变,特别是从事体力劳动者尤为明显。对于多节段肿瘤病人,从文献报道^[5-10]与本组病例来看,良性肿瘤多见,全切肿瘤后复发的可能性小,针对此类肿瘤尽量争取全切。完全暴露肿瘤需要去除的椎板较多,在尽可能切除病灶的前提下,术中尽量让后椎板成形,切除肿瘤后将后椎板解剖复位固定,很好的解决了病人脊柱稳定性改变的问题,同时减轻了患者的经济负担,目前缺乏长期随访资料与大宗病例证实,但觉得此类方法值得推广。

参考资料:

- [1] Kagaya H, Abe E, Sato K et al. Giant cauda equinaschwannoma. A case report[J]. Spine 2000, 25(2): 268-272.
- [2] Hwang SL, Liu CS, Su YF et al. Giant nondural-based cauda equina meningioma with multiple cysts [J]. J Neurooncol 2005, 74(2): 173-177.
- [3] Haegelen G, Morandlx R, Riefaudl et al. Results of spinalmeningioma surgery in patients with severe pre-operative neurological deficits[J]. Eur Spine J 2005, 14(5): 440-444.
- [4] Carolie Acqui M, Roberto R et al. Spinal enplaquemeningiomas: contemporary experience[J]. Neurosurgery 2004, 55(6): 1275-1279.
- [5] Gotteried O N, Gluf W, Quinones H A et al. Spinalmeningiomas: surgical management and outcome[J]. Neuro-surg Focus 2003, 14(6): E2.
- [6] Turgut M. Spinal angiolipomas: report of a case and re-view of the cases published since the discovery of the tumor in 1890 [J]. Br J Neurosurg 1999, 13(1): 30-40.
- [7] Fournay DR, Sladati A, Bruner JM et al. Giant cell ependymoma of the spinal cord. Case report and review of the literature [J]. J Neurosurg(Spine) 2004, 100(1 Suppl): 75-79.
- [8] Hanbali F, Rourney D R, Marmor E et al. Spinal cord ependymoma: radical surgical resection and outcome [J]. Neurosurgery 2002, 51(5): 1162-1174.
- [9] Huang J H, Tsui I, Judkins A R et al. Intramedullary cervical spine germinoma: case report [J]. Neurosurgery 2004, 55(6): 1432.
- [10] Subramaniam P, Behari S, Singh S et al. Multiple subpial lipomas with dumb-bell extradural extension through the intervertebral foramen without spinal dysraphism [J]. Surg Neurol 2002, 58(5): 338-343.
- [11] Saito T, Arizono T, Maeda T et al. A novel technique for surgical resection of spinal meningioma [J]. Spine 2001, 26(16): 1805-1808.
- [12] Klekamp J, Samii M. Surgical results for spinal meningiomas [J]. Surg Neurol 1999, 52(6): 552-562.
- [13] Bailey C S, Fisher C G, Boyd M C et al. En bloc marginal excision of a multilevel cervical chordoma. Case report [J]. J Neurosurg Spine, 2006, 4(5): 409-414.
- [14] 梁玉敏, 高国一, 包映晖, 等. 多节段椎管内肿瘤的显微手术切除(附 12 例分析)[J]. 中国微侵袭神经外科杂志(CMINSJ) 2007, 12(11): 1011-1013.

收稿日期 2011-06-23 编辑 杜中华

(上接第 1382 页)

本研究应用酶联免疫测试盒测定发酵茶、植物香料中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素, 变异系数在 1.5%~8.0%, 回收率为 85.0%~120.3%, 分析结果满意。ELISA 法、液相色谱-质谱联用仪分析法、薄层法被验证是目前检测发酵茶、植物香料中玉米赤霉烯酮、伏马菌素、黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、T-2 毒素最好的方法^[1-6]。

参考文献:

- [1] 路戈, 刘春霞, 计融. 玉米赤霉烯酮单克隆抗体酶联免疫检测方法的建立及初步应用[J]. 真菌学报, 1996, 15(4): 292-296.

- [2] 郭云昌, 刘秀梅. 伏马菌素 B1 免疫检测方法的研究[J]. 卫生研究, 1999, 04.
- [3] 路戈, 计融. 食品中黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体酶联免疫测定方法的建立及初步应用[J]. 卫生研究, 1996, 5(3): 162-165.
- [4] 刘仁荣, 余宙, 何庆华, 等. 以赭曲霉毒素 A 单克隆抗体建立竞争酶联免疫吸附分析方法的建立[J]. 食品科技, 2005, 26(11): 174-176, 966 镰刀菌烯醇 34
- [5] 邓舜洲, 游淑珠, 许杨. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇酶联免疫检测方法的建立[J]. 食品科技, 2006(8): 223-224.
- [6] 中华人民共和国国家标准, GB/T5009-2003 食品卫生检验方法. 理化部分[S]. 中国标准出版社, 2003.

收稿日期 2011-06-24 编辑 符式刚