



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105067804 B

(45)授权公告日 2017.05.31

(21)申请号 201510432649.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2015.07.21

G01N 33/53(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 苗君叶

申请公布号 CN 105067804 A

(43)申请公布日 2015.11.18

(73)专利权人 内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司

地址 011500 内蒙古自治区呼和浩特市和林格尔盛乐经济园区

(72)发明人 解鑫 宋晓东 喻东威 李海礁  
赵媛 齐文静

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

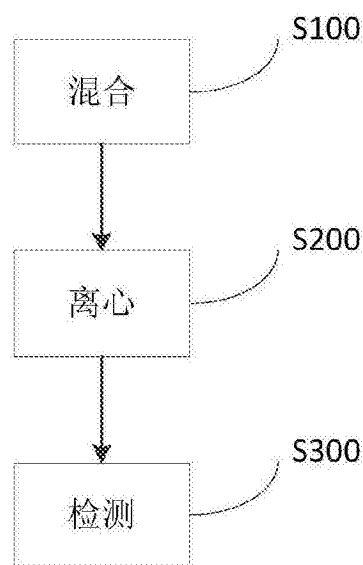
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

## (54)发明名称

检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法

## (57)摘要

本发明提出了检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法,该方法包括:(1)将待检测的谷物食品与乙腈水溶液进行混合,其中,所述乙腈水溶液的浓度为80体积%,基于1克所述待检测的谷物食品,所述乙腈水溶液的用量为5毫升;(2)将步骤(1)中所得到的混合物进行离心处理,并收集上清液;以及(3)通过酶联免疫法检验,确定步骤(2)中所得到的上清液中黄曲霉毒素B1的含量。本发明检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有下列优点的至少之一:操作简便、快速、灵敏度高以及准确性强。



1. 一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法,其特征在于,包括:

第一步,将5mL 80体积%的乙腈溶液加入到1.00g核桃粉中,3000rpm振荡5min,以进行混合;

第二步,将第一步得到的混合物于4℃,3000g条件下离心10min,收集上清液,相当于稀释倍数为5,进一步用洗涤缓冲液稀释10倍,制成待检测稀释液,样品的最终稀释倍数为50;

第三步,酶联免疫法检测:

(1) 使用前将所有溶液恢复至室温;

(2) 取出实验所需数量的稀释孔置于微孔架上,向每个稀释孔加入200μL待检测稀释液,使用前震荡混匀;

(3) 取出等量包被抗体的微孔置于另一个微孔架上;

(4) 分别向含有待检测稀释液的稀释孔中加入100μL标准品或样品,其中,6个标准品的浓度分别为:0ng/mL、0.02ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.4ng/mL,吸打混匀,至少吸打5次;

(5) 从每个稀释孔中移取100μL混合液至相应的抗体包被微孔中,20-25℃孵育30分钟;

(6) 将微孔中液体倒入废液缸,采用稀释后的洗涤缓冲液洗涤微孔,共洗涤3-5次,然后拍板,去除残留的洗涤液;

(7) 向每个包被抗体的微孔中加入100μL黄曲霉毒素B1酶标物,20-25℃下避光孵育30分钟,重复步骤(6);

(8) 移取底物试剂100μL至每个微孔中,20-25℃下避光孵育10分钟;

(9) 添加终止液100μL至每个微孔中,使用酶标仪在450nm的波长下读取每个微孔的OD值,务必在加入终止液后5分钟内读取吸光度值;

(10) 以标准品对应孔的吸光度值为纵坐标、标准品浓度为横坐标构建标准曲线,拟合方式为spline逻辑拟合,将待检测液稀释液对应孔的吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应的浓度,为待检测液稀释液的黄曲霉毒素B1含量,乘以稀释倍数即为谷物食品中黄曲霉毒素B1含量。

## 检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品检测领域。具体地,本发明涉及检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法。

### 背景技术

[0002] 黄曲霉毒素B1 (Aflatoxin B1) 被国际癌症研究机构定为I类致癌物(人类致癌物)。我国2011年实施的《食品安全国家标准食品中真菌毒素限量标准》对食品中黄曲霉毒素B1的含量进行了明确规定。

[0003] 然而,目前检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法仍有待改进。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明的一个目的在于提供一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法,该方法操作简便、快速、灵敏度高或者准确性强。

[0005] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0006] 国家标准GB/T 17480-2008提出了一种测定饲料中黄曲霉毒素的方法,简言之,包括取一定量的充分研磨粉碎的样本,利用一定比例的甲醇溶液提取样本中的黄曲霉毒素B1,之后再用酶联免疫试剂进行检测获得结果。但发明人在研究过程中发现,针对某些谷物类样本(如:核桃、花生等),经充分研磨粉碎后其样本形态接近膏状,在用有机溶剂甲醇进行提取时,离心获得的上清液较为浑浊且成分复杂、含较多油脂,对酶联免疫法的检测结果有较大影响,经常会出现本底检测值偏高(假阳性),而添加回收率又偏低(假阴性)的现象。

[0007] 本发明的发明人经过大量实验发现,将谷物食品和乙腈水溶液混合,将得到的混合物进行离心,对收集的上清液进行稀释后通过酶联免疫法检测,确定上清液中黄曲霉毒素B1的含量。由此检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有下列优点的至少之一:操作简便、快速、灵敏度高以及准确性强。

[0008] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法。根据本发明的实施例,该检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法包括:(1)将待检测的谷物食品与乙腈水溶液进行混合,其中,所述乙腈水溶液的浓度为80体积%,基于1克所述待检测的谷物食品,所述乙腈水溶液的用量为5毫升;(2)将步骤(1)中所得到的混合物进行离心处理,并收集上清液;以及(3)通过酶联免疫法检验,确定步骤(2)中所得到的上清液中黄曲霉毒素B1的含量。由此,最终的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有下列优点的至少之一:操作简便、快速、灵敏度高以及准确性强。

[0009] 根据本发明的实施例,上述一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法还可以具有下列附加技术特征至少之一:

[0010] 根据本发明的实施例,所述谷物为核桃、花生、大豆、燕麦、干果、坚果和大米的至少一种。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有

较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0011] 根据本发明的实施例,所述谷物食品包括含有选自核桃、花生、大豆、燕麦、干果、坚果和大米的至少一种的乳制品。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0012] 根据本发明的实施例,在步骤(1)中,将所述待检测的谷物食品与所述乙腈水溶液进行混合是通过将所述乙腈水溶液加入到所述待检测的谷物食品中进行的。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0013] 根据本发明的实施例,在步骤(2)中,所述离心是在4摄氏度下进行的。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0014] 根据本发明的实施例,在步骤(2)中,在3000g下进行所述离心10分钟。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0015] 根据本发明的实施例,在进行所述酶联免疫法检验之前,预先将所述上清液稀释10倍。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0016] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法。根据本发明的实施例,该检测黄曲霉毒素B1的方法包括:第一步,将5mL 80体积%的乙腈溶液加入到1.00g核桃粉中,3000rpm振荡5min,以进行混合。第二步,将第一步得到的混合物于4℃,3000g条件下离心10min,收集上清液(相当于稀释倍数为5),进一步用洗涤缓冲液稀释10倍,制成待检测稀释液(最终样品的最终稀释倍数为50)。第三步,酶联免疫法检测:(1)使用前将所有溶液恢复至室温;(2)取出实验所需数量的稀释孔置于微孔架上,向每个稀释孔加入200μL待检测稀释液(使用前震荡混匀);(3)取出等量包被抗体的微孔置于另一个微孔架上;(4)分别向含有待检测稀释液的稀释孔中加入100μL标准品(6个标准品,浓度分别为:0ng/mL、0.02ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.4ng/mL)或样品,吸打混匀,至少吸打5次;(5)从每个稀释孔中移取100μL混合液至相应的抗体包被微孔中,室温20-25℃孵育30分钟;(6)将微孔中液体倒入废液缸,采用稀释后的洗涤缓冲液洗涤微孔,共洗涤3-5次。然后拍板,去除残留的洗涤液;(7)向每个包被抗体的微孔中加入100μL黄曲霉毒素B1酶标物,室温20-25℃下避光孵育30分钟,重复步骤(6);(8)移取底物试剂100μL至每个微孔中,室温20-25℃下避光孵育10分钟;(9)添加终止液100μL至每个微孔中,使用酶标仪在450nm的波长下读取每个微孔的OD值,务必在加入终止液后5分钟内读取吸光度值;(10)以标准品对应孔的吸光度值为纵坐标、标准品浓度为横坐标构建标准曲线,拟合方式为spline逻辑拟合。将待检测液稀释液对应孔的吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应的浓度,为待检测液稀释液的黄曲霉毒素B1含量,乘以稀释倍数即为谷物食品中黄曲霉毒素B1含量。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0017] 此外,根据本发明的实施例,本发明检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有以下优点的至少之一:

[0018] 1、根据本发明的实施例,本发明利用乙腈水溶液提取谷物食品中的黄曲霉毒素B1,克服了利用甲醇提取导致的离心上清液较为浑浊且成分复杂、含油脂较多的缺点,利用乙腈提取及离心得到的上清液澄清,检测结果准确性和精密度方面较甲醇提取有所提高,其中准确性方面有明显的优势。

[0019] 2、根据本发明的实施例,在进行酶联免疫法检验之前,预先将待测上清液稀释10倍。由此,不仅有效地淡化了待测上清液的背景颜色,方便洗板时微孔的彻底洗净,而且降低了用于提取的乙腈的浓度,更加有利于酶联免疫反应的进行,检测结果准确性和精密度都得到了显著地提高。

[0020] 3、根据本发明的实施例,将待检测的谷物食品与乙腈水溶液振荡混合后直接离心,省去了振荡混合后超声等中间步骤,操作简便、快速,准确性较高。

[0021] 4、根据本发明的实施例,通过酶联免疫法进行检测,操作简便、准确性高。

[0022] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

## 附图说明

[0023] 本发明的上述和/或附加的方面和优点从结合下面附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0024] 图1显示了根据本发明一个实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法的流程示意图;以及

[0025] 图2显示了根据本发明另一个实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法的流程示意图。

## 具体实施方式

[0026] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0027] 需要说明的是,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。进一步地,在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。

[0028] 需要说明的是,本发明是基于发明人的下列发现而完成的:

[0029] CN201110102780.7中公开了一种食品中黄曲霉毒素快速仪器分析方法,采用乙腈-水溶液以及超声提取黄曲霉毒素,并利用超高效液相色谱-质谱联用仪对黄曲霉毒素的含量进行测定。然而,该检测方法提取黄曲霉毒素的操作复杂、耗时长。目前,检测谷物中黄曲霉毒素B1含量的酶联免疫方法主要是基于国家推荐标准GB/T 17480-2008《饲料中黄曲霉毒素B1的测定酶联免疫吸附法》中提到的黄曲霉毒素B1含量测定方法的原理开发而来,包括取一定量的充分研磨粉碎的样本,利用一定比例的甲醇溶液提取样本中的黄曲霉毒素B1,之后再用酶联免疫试剂进行检测获得结果。但针对某些谷物类样本(如:核桃、花生等),经充分研磨粉碎后其样本形态接近膏状,用有机溶剂提取,离心获得的上清液较为浑浊且成分复杂、含较多油脂,对酶联免疫法的检测结果有较大影响,经常会出现本底检测值偏高

(假阳性),而添加回收率又偏低(假阴性)的现象。

[0030] 本发明的发明人经过大量实验发现,将谷物食品和乙腈水溶液混合,将得到的混合物进行离心,对收集的上清液进行稀释后通过酶联免疫法检测,确定上清液中黄曲霉毒素B1的含量。由此检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有下列优点的至少之一:操作简便、快速、灵敏度高以及准确性强。

[0031] 由此,本发明提出了一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法,下面将进行详细描述。

[0032] 在本发明的第一方面,本发明提出了一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法。参考图1,根据本发明的实施例,该检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以包括下列步骤,由此,最终的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有下列优点的至少之一:操作简便、快速、灵敏度高以及准确性强。

[0033] S100:混合

[0034] 将待检测的谷物食品与乙腈水溶液进行混合,其中,该乙腈水溶液的浓度为80体积%,基于1克该待检测的谷物食品,乙腈水溶液的用量为5毫升。发明人在大量有机溶剂中筛选,发现利用乙腈提取黄曲霉毒素B1能够有效地克服其他有机溶剂与待测谷物食品混合后离心的上清液较为浑浊且成分复杂、含油脂较多以及混合液背景颜色较深的缺点,而对背景颜色较深或者成分复杂的样品检测时会干扰到抗原抗体反应的进行,不能很好的反映样本中黄曲霉毒素B1的实际含量,且稳定性难以保证。此外,较深的颜色背景会为洗板时微孔的彻底洗净带来困难,从而影响到后续步骤的有效完成。利用乙腈提取及离心得到的上清液澄清,即使是油脂含量较高或者颜色较深的谷物食品,提取效果仍较好,处理后的溶液澄清,检测结果准确性高,稳定性好。

[0035] 发明人发现乙腈的用量对于根据本发明实施例的检测黄曲霉毒素B1的方法的效率存在至关重要的影响。发明人经过大量实验优化得出:该乙腈水溶液的浓度为80体积%,基于1克该待检测的谷物食品,乙腈水溶液的用量为5毫升时,提取黄曲霉毒素B1的效果最优,进一步地,检测结果准确性和精密度较高。乙腈的用量过多或者过少都会显著地影响黄曲霉毒素B1的检测效率。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0036] 本发明所使用的术语“混合”具有广义的理解,指用机械的或流体动力的方法,使两种或多种物料相互分散而达到一定均匀程度的单元操作。根据本发明的实施例,混合方式不作严格限定。根据本发明的具体示例,采用振荡方式进行混合,其中,振荡是利用德国IKA MS3涡旋混合仪在3000rpm下振荡5min进行。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0037] 根据本发明的一个实施例,该谷物为核桃、花生、大豆、燕麦、干果、坚果和大米的至少一种。根据本发明的另一个实施例,该谷物食品包括含有选自核桃、花生、大豆、燕麦、干果、坚果和大米的至少一种的乳制品。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0038] 本发明中使用的术语“乳制品”应具有广义理解,指的是使用牛乳或羊乳及其加工制品为主要原料,加入或不加入适量的维生素、矿物质和其他辅料,使用法律法规及标准规

定所要求的条件,加工制作的产品。

[0039] 参考图2,根据本发明的一个实施例,在步骤S100中,将待检测的谷物食品与乙腈水溶液进行混合是通过将乙腈水溶液加入到待检测的谷物食品中进行的(S110)。发明人经过大量实验发现,由于有些谷物(如核桃等)粉碎后为膏状物,多次转移会造成损失,影响检测结果,因此选择将乙腈水溶液加入待检测的谷物食品中,避免损失。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0040] S200:离心

[0041] 将步骤S100中所得到的混合物进行离心处理,并收集上清液。发明人惊奇的发现,离心得到的上清液较为澄清,克服了以甲醇为提取液得到的上清液较为浑浊且成分复杂、含较多油脂的缺陷。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0042] 根据本发明的一个实施例,在步骤S200中,离心是在4摄氏度下进行的。根据本发明的另一个实施例,在步骤S200中,在3000g下进行所述离心10分钟。发明人经过大量实验发现,在4摄氏度下离心效果最好,可能的原因是:离心温度过高,容易使黄曲霉毒素B1重新融入非乙腈相中,导致提取不充分,进一步造成检测结果不准确。发明人经过大量实验发现,转速为3000g、离心10分钟时,提取效果最好,检测效果准确性最高。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0043] S300:检测

[0044] 通过酶联免疫法检验,确定步骤S200中所得到的上清液中黄曲霉毒素B1的含量。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0045] 根据本发明的一个实施例,在进行酶联免疫法检验之前,预先将上清液稀释10倍。发明人发现,将上清液进行稀释可以有效地淡化其背景颜色,降低了背景颜色对后续酶联免疫反应的干扰。此外,淡化的背景颜色会方便洗板时微孔的彻底洗净。同时,上清液经稀释后,降低了乙腈的浓度,防止过多的乙腈抑制酶联免疫反应的发生,影响检测结果的准确性。另外,发明人发现,如果稀释倍数过高或者过低,都会导致检测结果不精确。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0046] 在本发明的第二方面,本发明提出了一种检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法。该方法包括:第一步,将5mL 80体积%的乙腈溶液加入到1.00g核桃粉中,3000rpm振荡5min,以进行混合。第二步,将第一步得到的混合物于4℃,3000g条件下离心10min,收集上清液(相当于稀释倍数为5),进一步用洗涤缓冲液稀释10倍,制成待检测稀释液(最终样品的最终稀释倍数为50)。第三步,酶联免疫法检测:(1)使用前将所有溶液恢复至室温;(2)取出实验所需数量的稀释孔置于微孔架上,向每个稀释孔加入200μL待检测稀释液(使用前震荡混匀);(3)取出等量包被抗体的微孔置于另一个微孔架上;(4)分别向含有待检测稀释液的稀释孔中加入100μL标准品(6个标准品,浓度分别为:0ng/mL、0.02ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.4ng/mL)或样品,吸打混匀,至少吸打5次;(5)从每个稀释孔中移取

100 $\mu$ L混合液至相应的抗体包被微孔中,室温20-25 $^{\circ}$ C孵育30分钟;(6)将微孔中液体倒入废液缸,采用稀释后的洗涤缓冲液洗涤微孔,共洗涤3-5次。然后拍板,去除残留的洗涤液;(7)向每个包被抗体的微孔中加入100 $\mu$ L黄曲霉毒素B1酶标物,室温20-25 $^{\circ}$ C下避光孵育30分钟,重复步骤(6);(8)移取底物试剂100 $\mu$ L至每个微孔中,室温20-25 $^{\circ}$ C下避光孵育10分钟;(9)添加终止液100 $\mu$ L至每个微孔中,使用酶标仪在450nm的波长下读取每个微孔的OD值,务必在加入终止液后5分钟内读取吸光度值;(10)以标准品对应孔的吸光度值为纵坐标、标准品浓度为横坐标构建标准曲线,拟合方式为spline逻辑拟合。将待检测液稀释液对应孔的吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应的浓度,为待检测液稀释液的黄曲霉毒素B1含量,乘以稀释倍数即为谷物食品中黄曲霉毒素B1含量。由此,根据本发明实施例的检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法可以进一步具有较简便、快速的操作、较高的灵敏度或者较强的准确性。

[0047] 由此,可以进一步提高检测黄曲霉毒素B1的效率。

[0048] 综上,根据本发明的实施例,本发明检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有以下优点的至少之一:

[0049] 1、根据本发明的实施例,本发明利用乙腈水溶液提取谷物食品中的黄曲霉毒素B1,克服了利用甲醇提取导致的离心上清液较为浑浊且成分复杂、含油脂较多的缺点,利用乙腈提取及离心得到的上清液澄清,检测结果准确性和精密度方面较甲醇提取有所提高,其中准确性方面有明显的优势。

[0050] 2、根据本发明的实施例,在进行酶联免疫法检验之前,预先将待测上清液稀释10倍。由此,不仅有效地淡化了待测上清液的背景颜色,方便洗板时微孔的彻底洗净,而且降低了用于提取的乙腈的浓度,更加有利于酶联免疫反应的进行,检测结果准确性和精密度都得到了显著地提高。

[0051] 3、根据本发明的实施例,将待检测的谷物食品与乙腈水溶液振荡混合后直接离心,省去了振荡混合后超声等中间步骤,操作简便、快速,准确性较高。

[0052] 4、根据本发明的实施例,通过酶联免疫法进行检测,操作简便、准确性高。

[0053] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

[0054] 下面将结合实施例对本发明的方案进行解释。本领域技术人员将会理解,下面的实施例仅用于说明本发明,而不应视为限定本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献所描述的技术或条件或者按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0055] 在下面的实施例中,如果没有明确说明,则采用的试验仪器和试剂为:

[0056] 80体积%的乙腈溶液:准确吸取80mL乙腈(分析纯,纯度 $\geq$ 99%),加入盛有20mL蒸馏水的烧杯中,混匀,待用。

[0057] 黄曲霉毒素B1酶联免疫试剂盒。

[0058] BioTek公司的E1x808酶标仪,检测波长为:450nm。

[0059] 实施例1

[0060] 在该实施例中,通过下列步骤对核桃粉中的黄曲霉毒素B1进行检测:

[0061] 第一步,将5mL 80体积%的乙腈溶液加入到1.00g核桃粉中,3000rpm振荡5min,以

进行混合。

[0062] 第二步,将第一步得到的混合物于4℃,3000g条件下离心10min,收集上清液(相当于稀释倍数为5),进一步用试剂盒配备的稀释后的洗涤缓冲液稀释10倍,制成待检测稀释液(最终样品,稀释倍数为50)。

[0063] 第三步,酶联免疫法检测:

[0064] (1) 使用前将所有溶液恢复至室温;

[0065] (2) 取出22个稀释孔置于微孔架上,向每个稀释孔加入200μL待检测稀释液(使用前震荡混匀);

[0066] (3) 取出等量包被抗体的微孔置于另一个微孔架上;

[0067] (4) 分别向含有待检测稀释液的稀释孔中加入100μL标准品(6个标准品,浓度分别为:0ng/mL、0.02ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.4ng/mL)或样品,吸打混匀,至少吸打5次;

[0068] (5) 从每个稀释孔中移取100μL混合液(要使用多通道移液器转移混合液)至相应的抗体包被微孔中,室温20-25℃孵育30分钟;

[0069] (6) 将微孔中液体倒入废液缸,采用稀释后的洗涤缓冲液洗涤微孔,共洗涤3-5次。然后拍板,去除残留的洗涤液(也可以使用洗板机洗涤,洗涤次数为5次);

[0070] (7) 向每个包被抗体的微孔中加入100μL黄曲霉毒素B1酶标物,室温20-25℃下避光孵育30分钟,重复步骤(6);

[0071] (8) 移取底物试剂100μL至每个微孔中,室温20-25℃下避光孵育10分钟;

[0072] (9) 添加终止液100μL至每个微孔中,使用酶标仪在450nm的波长下读取每个微孔的OD值,务必在加入终止液后5分钟内读取吸光度值;

[0073] (10) 以标准品对应孔的吸光度值为纵坐标、标准品浓度为横坐标构建标准曲线,拟合方式为spline逻辑拟合。将待检测液稀释液对应孔的吸光度值代入标准曲线中,从标准曲线上读出所对应的浓度,为待检测液稀释液黄曲霉毒素B1含量,即0.0249ng/mL,0.0659ng/mL,0.0919ng/mL,0.122ng/mL,0.233ng/mL,乘以稀释倍数50即为谷物食品中黄曲霉毒素B1含量,即为1.247ng/mL,3.297ng/mL,4.596ng/mL,6.102ng/mL,11.652ng/mL。

[0074] 实施例2

[0075] 在本实施例中,通过检测含有已知含量黄曲霉毒素B1标准品(市售)的核桃粉中的黄曲霉毒素B1的含量,确定检测黄曲霉毒素B1的方法的平均回收率和检测结果的相对标准偏差,具体步骤包括:

[0076] 向核桃粉中添加不同量的黄曲霉毒素B1标准品(市售),以便得到加标核桃粉,其中各加标核桃粉的黄曲霉毒素B1用量如表1所示。

[0077] 按照实施例1中的方法,对所得到的加标核桃粉进行黄曲霉毒素B1的含量进行检测,包括四次平行检测,并根据检测结果计算不同添加水平下的平均回收率和检测结果的相对标准偏差,计算结果如表1所示。其中,回收率(%) = (加标核桃粉的黄曲霉毒素B1的实测含量 - 不加标的黄曲霉毒素B1的实测含量) × 100 / 加标核桃粉的黄曲霉毒素B1的理论添加含量。每批实验每个浓度做4组平行样,分别单独计算回收率,将四个回收率结果相加后取平均值得到平均回收率。

[0078] 表1检测方法的准确性验证

[0079]	样本编号	黄曲霉毒素 B1 添加水平	平均回收率	检测结果的相 对标准偏差
	加标核桃粉 1	2.0ng/mL	102.52%	8.88%
[0080]	加标核桃粉 2	2.5ng/mL	133.94%	6.07%
	加标核桃粉 3	5.0ng/mL	97.10%	2.40%
	加标核桃粉 4	10.0ng/mL	104.05%	5.58%

[0081] 如表所示,测得本检测方法的回收率为97.10%~133.94%,符合酶联免疫试剂盒的检测要求范围;检测结果的相对标准偏差均<10%,精密度较好。

[0082] 对比例1

[0083] 按照实施例1和实施例2的方法检测谷物食品中黄曲霉毒素B1,区别在于,在实施例1的第一步中,将5mL 70体积%的甲醇溶液加入到1.00g核桃粉中,结果如表2所示。

[0084] 表2对比例1检测方法的准确性验证

[0085]	样本编号	黄曲霉毒素 B1 添加水平	平均回收率	检测结果的相 对标准偏差
	加标核桃粉 1-1	2.0ng/mL	58.52%	9.68%
	加标核桃粉 1-2	2.5ng/mL	47.44%	10.07%
	加标核桃粉 1-3	5.0ng/mL	60.05%	12.76%
	加标核桃粉 1-4	10.0ng/mL	41.31%	13.18%

[0086] 结果表明,测得本检测方法的回收率为41.31%~60.05%,不符合酶联免疫试剂盒的检测要求范围;检测结果的相对标准偏差大都>10%,精密度较差。

[0087] 对比例2

[0088] 按照实施例1和实施例2的方法检测谷物食品中黄曲霉毒素B1,区别在于,在实施例1的第一步中,乙腈的浓度分别为60体积%、70体积%、80体积%以及90体积%。不同浓度的乙腈溶液的制备方法与上述80体积%的乙腈溶液的制备方法相同,在此不再赘述。具体结果如表3所示。

[0089] 表3不同乙腈浓度对检测结果的影响

[0090]	样本编号	黄曲霉毒素 B1 添加水平	60 体积%的 乙腈溶液提 取的平均回 收率	70 体积%的 乙腈溶液提 取的平均回 收率	80 体积%的 乙腈溶液提 取的平均回 收率	90 体积%的 乙腈溶液提 取的平均回 收率
	加标核桃粉 1	2.0ng/mL	48.32%	52.59%	102.52%	92.11%

[0091]	加标核桃粉 2	2.5ng/mL	39.69%	72.89%	133.94%	121.44%
	加标核桃粉 3	5.0ng/mL	43.55%	64.88%	97.10%	98.09%
	加标核桃粉 4	10.0ng/mL	50.56%	75.32%	104.05%	100.77%

[0092] 如表所示,测得60体积%和70体积%的乙腈溶液提取的平均回收率整体偏低,全部或者部分的低于试剂盒要求水平;80体积%和90体积%的乙腈溶液提取的平均回收率均满足检测要求,考虑到成本因素,故确定80体积%为乙腈的最优浓度。

[0093] 对比例3

[0094] 按照实施例1和实施例2的方法检测谷物食品中黄曲霉毒素B1,区别在于,在实施例1的第一步中,3000rpm振荡5min后,将得到的混合物超声处理10min,具体结果如表4所示。

[0095] 表4不同处理方式对检测结果的影响

样本编号	黄曲霉毒素 B1 添加水平	实施例 1	对比例 3
[0096] 加标核桃粉 1	2.0ng/mL	102.52%	90.15%
加标核桃粉 2	2.5ng/mL	133.94%	94.09%
加标核桃粉 3	5.0ng/mL	97.10%	122.84%
加标核桃粉 4	10.0ng/mL	104.05%	110.76%

[0097] 如表所示,采用80体积%的乙腈溶液提取后,增加10min的超声处理,回收率介于90.15%~122.84%之间,与提取后直接检测结果(回收率介于97.10%~133.94%之间)相比较并无明显的不同,为了简化处理步骤,提高效率,提取后并不采取超声的处理步骤。

[0098] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0099] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

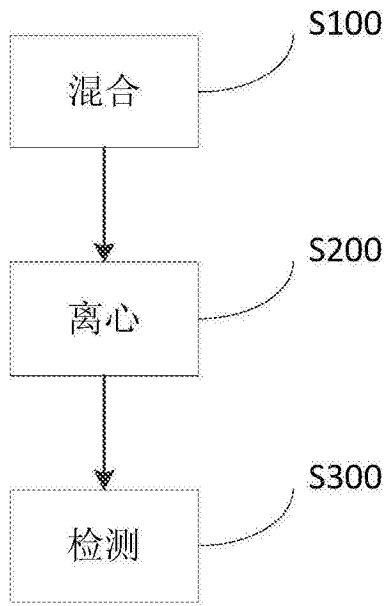


图1

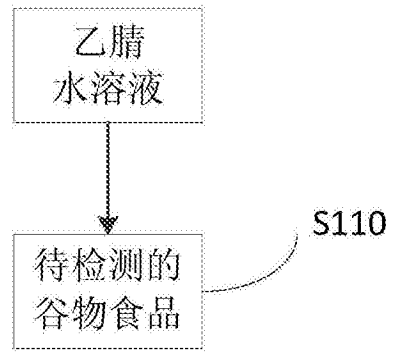


图2

专利名称(译)	检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105067804B</a>	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201510432649.5	申请日	2015-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司		
[标]发明人	解鑫 宋晓东 喻东威 李海礁 赵媛 齐文静		
发明人	解鑫 宋晓东 喻东威 李海礁 赵媛 齐文静		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	李志东		
其他公开文献	CN105067804A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提出了检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法，该方法包括：(1)将待检测的谷物食品与乙腈水溶液进行混合，其中，所述乙腈水溶液的浓度为80体积%，基于1克所述待检测的谷物食品，所述乙腈水溶液的用量为5毫升；(2)将步骤(1)中所得到的混合物进行离心处理，并收集上清液；以及(3)通过酶联免疫法检验，确定步骤(2)中所得到的上清液中黄曲霉毒素B1的含量。本发明检测谷物食品中黄曲霉毒素B1的方法具有下列优点的至少之一：操作简便、快速、灵敏度高以及准确性强。

