



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108490169 B

(45) 授权公告日 2021.09.03

(21) 申请号 201810260450.2

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2018.03.27

G01N 33/535 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108490169 A

审查员 周洋

(43) 申请公布日 2018.09.04

(73) 专利权人 广东一家人食品有限公司  
地址 515000 广东省汕头市金平区荣升科  
技园内C2、G2之三号  
专利权人 广东一家人食品工业技术研究院  
有限公司

(72) 发明人 邱晖

(74) 专利代理机构 汕头兴邦华腾专利代理事务  
所(特殊普通合伙) 44547  
代理人 张树峰 梁凤德

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶  
联免疫检测的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法。本发明首先将用乙醇-水对米粉进行超声萃取后离心,取上清液在上清液中加入超分子溶剂沉淀蛋白等生物大分子后离心取上清,在上清液加入盐溶液涡旋离心后形成双水相,最后取上相进行酶联免疫检测真菌毒素。本发明的检测方法快速,灵敏(检测限与定量限分别为0.07ug/kg和0.12ug/kg),安全有效,操作简单能广泛应用于各种米粉的检测中。

1. 一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,其特征包括以下步骤:

(1) 将烷醇或者烷酸与六氟异丙醇、水混合后涡旋离心,体系分为两相,将上相取出即得超分子溶剂;所述的烷醇为正辛醇或者正己醇;所述的烷酸为正癸酸;

(2) 将米粉在40-60℃条件下干燥4-6小时后,准确的称量0.5g样品粉末与4-8ml的乙醇-水溶液涡旋20-40s后,在400-600W功率,40-60℃水浴中超声20-40min后冷却,将混合液在4000-6000rpm条件下离心5-10min;所述的乙醇-水溶液中乙醇的体积含量为60-70%;

(3) 取步骤(1)中离心后的上清2ml与100ul超分子溶剂混合后,涡旋20-40s后在4000-6000rpm条件下离心3-5min后,将上相取出后与5ml盐溶液混合后涡旋20-40s后在4000-6000rpm条件下离心;所述的盐溶液为硫酸铵、硫酸钠以及磷酸氢二钾中的一种;

(4) 取离心后的上清液利用酶联免疫法测量其中真菌毒素含量;

所述的烷醇/烷酸与六氟异丙醇、水混合体系中烷醇/烷酸所占体积比为30-40%,六氟异丙醇所占体积为10-20%;水所占体积为40-50%。

2. 如权利要求1所述的一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,其特征包括步骤(3)中所述的上相体积为1.85-1.9mL。

3. 如权利要求1所述的一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,其特征包括,所述盐溶液的浓度为0.25-0.5g/mL。

4. 如权利要求1所述的一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,其特征包括步骤(4)中所述的上清液体积为150-200uL。

5. 如权利要求1所述的一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,其特征包括步骤(4)中所述的酶联免疫检测步骤为:将上清液加到包含有针对相关真菌毒素的抗体的微孔板中,加入酶标记物,混合均匀,避光孵育20-30min后,洗板5次,加四甲基联苯胺显色液,避光孵育,加盐酸终止液终止酶联反应后,于酶标仪450nm处测量吸光度值。

6. 如权利要求1所述的一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,其特征包括步骤(4)中所述的酶联免疫检测的总真菌毒素的检测限和定量限分别为0.07ug/kg和0.12ug/kg。

## 一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及食品检测领域,具体为一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法。

### 背景技术

[0002] 真菌毒素是霉菌等真菌在其所污染的食品中产生的有毒的代谢产物。联合国粮农组织的资料显示世界上约有 25%的谷物受到不同程度的污染。真菌毒素具有致癌毒性和细胞毒性,对人体健康构成严重威胁。我国出口的花生、饲料等农产品多次由于检出黄曲霉等真菌毒素而遭遇退货。目前,全世界每年由于霉变污染真菌毒素引起的农产品和工业原料的损失达数百亿美元。米粉中真菌毒素感染已成为不可忽视的问题。目前,米粉中真菌毒素的检测方法主要有酶联免疫法、高效液相色谱法(包括荧光法)、液相色谱-串联质谱法等。但是,高效液相色谱-荧光法需进行衍生,操作繁杂,不适宜多种不同类真菌毒素的同时检测;液相色谱-串联质谱法能够提供结构方面的信息,且检出限低、灵敏度高、线性范围宽,但是质谱价格昂贵。传统的酶联免疫法虽然检测速度快、特异强,但是检测灵敏度不高,基于此开发一种简单,快捷,灵敏的真菌毒素的检测方法具有重要的意义。

### 发明内容

[0003] 为了解决米粉种真菌毒素检测时存在灵敏度不高,前处理复杂等问题,本发明公开一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法。

[0004] 本发明的方法包括以下步骤:

[0005] (1)将烷醇或者烷酸与六氟异丙醇、水混合后涡旋离心,体系分为两相,将上相取出既得超分子溶剂;

[0006] (2)将米粉在40-60℃条件下干燥4-6小时后,准确的称量0.5g样品粉末与4-8ml的乙醇-水溶液涡旋20-40s后,在400-600W功率,40-60℃水浴中超声20-40min后冷却,将混合液在4000-6000rpm条件下离心5-10min;

[0007] (3)取步骤(1)中离心后的上清2ml与100ul超分子溶剂混合后,涡旋20-40s后在4000-6000rpm条件下离心3-5min后,将上相取出后与5ml盐溶液混合后涡旋20-40s后在4000-6000rpm条件下离心;

[0008] (4)取离心后的上清液利用酶联免疫法测量其中真菌毒素含量。

[0009] 进一步的,步骤(1)中所述的烷醇为正辛醇、正己烷以及正癸醇中一种;所述的烷酸为正辛酸、正己酸以及正癸酸中的一种;所述的烷醇/烷酸与六氟异丙醇、水混合体系中烷醇/烷酸所占体积比为30-40%,四氢呋喃所占体积为10-20%;水所占体积为40-50%。

[0010] 进一步的,步骤(2)中所述的乙醇-水溶液中乙醇的体积含量为60-70%。

[0011] 进一步的,步骤(3)中所述的上相体积为1.85-1.9ml。

[0012] 进一步的,步骤(3)中所述的盐溶液为硫酸铵、硫酸钠、柠檬酸钠以及磷酸氢二钾中的一种;所述盐溶液的浓度为0.25-0.5g/mL。

[0013] 进一步的,步骤(4)中所述的上清液体积为150-200ul。

[0014] 进一步的,步骤(4)中所述的酶联免疫检测步骤为:将上清液加到包含有针对相关真菌毒素的抗体的微孔板中,加入酶标记物,混合均匀,避光孵育20-30min后,洗板 5 次,加四甲基联苯胺显色液,避光孵育,加盐酸终止液终止酶连反应后,于酶标仪 450 nm 处测量吸光度值。

[0015] 进一步的,步骤(4)中所述的酶联免疫检测的总真菌毒素的检测限和定量限分别为0.07ug/kg和0.12ug/kg。

[0016] 与现有技术相比,本发明所述的一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法具有以下有益效果,本发明采用乙醇超声辅助萃取,使用的溶剂安全无毒且超声工艺能显著的缩短萃取时间。采用超分子溶剂的空间排阻效应沉淀蛋白质降低干扰,采用双水相萃取,进一步纯化和富集后与酶联免疫法联合能显著降低酶联免疫法的检测限。本发明的检测方法快速,灵敏,安全有效,能广泛应用于各种米粉的真菌毒素的检测中。

### 具体实施方式

#### [0017] 【实施例1】

[0018] 一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,包括如下步骤:将正辛醇、六氟异丙醇、水按35:20:45的体积比混合后涡旋离心,体系分为两相,将下相取出得正辛醇-六氟异丙醇-水超分子溶剂;将米粉在60℃条件下干燥4小时后,准确的称量0.5g的样品粉末与6ml的乙醇-水溶液涡旋30s后,在600W功率,50℃水浴中超声25min后冷却,将混合液在6000rpm条件下离心6min;取离心后的上清2ml与100ul正辛醇-六氟异丙醇-水超分子溶剂混合后,涡旋25s后在6000rpm条件下离心5min后,将上相取出后与5ml 0.35g/ml  $K_2HPO_4$ 溶液混合后涡旋20s后在6000rpm条件下离心;取200ul离心后的上清液加到含有有针对相关真菌毒素的抗体的微孔板中,加入酶标记物,混合均匀,避光孵育25min后,洗板 5 次,加四甲基联苯胺显色液,避光孵育,加盐酸终止液终止酶连反应后,于酶标仪 450 nm 处测量吸光度值,测得总真菌毒素含量为0.6ug/kg。

#### [0019] 【实施例2】

[0020] 一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,包括如下步骤:将正癸酸、六氟异丙醇、水按30:20:50的体积比混合后涡旋离心,体系分为两相,将下相取出得正癸酸-六氟异丙醇-水超分子溶剂;将米粉在60℃条件下干燥4小时后,准确的称量0.5g的样品粉末与6ml的乙醇-水溶液涡旋30s后,在600W功率,50℃水浴中超声25min后冷却,将混合液在6000rpm条件下离心6min;取离心后的上清2ml与100ul癸酸-六氟异丙醇-水超分子溶剂混合后,涡旋25s后在5000rpm条件下离心5min后,将上相取出后与5ml 0.25g/ml  $Na_2SO_4$ 溶液混合后涡旋20s后在5000rpm条件下离心;取200ul离心后的上清液加到包被有针对相关真菌毒素的抗体的微孔板中,加入酶标记物,混合均匀,避光孵育30min后,洗板 5 次,加四甲基联苯胺显色液,避光孵育,加盐酸终止液终止酶连反应后,于酶标仪 450 nm 处测量吸光度值,测得总真菌毒素含量为0.64ug/kg。

#### [0021] 【实施例3】

[0022] 一种米粉中真菌毒素的双水相萃取联合酶联免疫检测的方法,包括如下步骤:将正己醇、六氟异丙醇、水按35:15:50的体积比混合后涡旋离心,体系分为两相,将下相取出

得正己醇-六氟异丙醇-水超分子溶剂;将米粉在60℃条件下干燥4小时后,准确的称量0.5g的样品粉末与6ml的乙醇-水溶液涡旋30s后,在600W功率,50℃水浴中超声25min后冷却,将混合液在6000rpm条件下离心6min;取离心后的上清2ml与100u1癸酸-六氟异丙醇-水超分子溶剂混合后,涡旋20s后在5000rpm条件下离心5min后,将上相取出后与5ml 0.3g0/ml  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液混合后涡旋20s后在5000rpm条件下离心;取200u1离心后的上清液加到包被有针对相关真菌毒素的抗体的微孔板中,加入酶标记物,混合均匀,避光孵育25min后,洗板5次,加四甲基联苯胺显色液,避光孵育,加盐酸终止液终止酶连反应后,于酶标仪 450 nm处测量吸光度值,测得总真菌毒素含量为0.7ug/kg。

[0023] 对于本领域的普通技术人员而言,具体实施例只是对本发明进行了示例性描述,显然本发明具体实现并不受上述方式的限制,只要采用了本发明的方法构思和技术方案进行的各种非实质性的改进,或未经改进将本发明的构思和技术方案直接应用于其它场合的,均在本发明的保护范围之内。