

基于荧光纳米颗粒的免疫层析技术同步快速检测药食同源药材中的3种真菌毒素

霍炳帆¹, 马焱¹, 厉佳丽², 梅青¹, 周宇欣¹, 张明洲^{1*}

(1. 中国计量大学生命科学学院, 浙江杭州 310018) (2. 杭州快格科技有限公司, 浙江杭州 310002)

摘要: 该研究建立了一种基于铕纳米粒子 (Europium Nanoparticles, EuNPs) 的超灵敏侧向流动免疫层析 (Lateral Flow Immunochromatography, LFIC) 方法, 用于药食同源药材中黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 和赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 的同步快速检测。通过优化人工抗原包被质量浓度、人工抗原划膜位置、羊抗鼠 IgG 包被质量浓度、缓冲液 pH 值和免疫反应时间等关键因素, 在简单的样品前处理步骤后, 能够实现单个待测样品中 3 种目标真菌毒素的超灵敏联合检测。结果显示, 该方法特异性良好, 灵敏度高, AFB₁、ZEN 和 OTA 标准品的肉眼检测限分别为 0.5、4.0、2.0 ng/mL, 线性范围 (IC₁₀~IC₉₀) 分别为 0.03~4.61、0.12~8.47、0.09~8.26 ng/mL。该方法用于人参、黄芪和当归中真菌毒素的测定, 样品平均添加回收率为 90.02%~109.39%, 相对标准偏差 (RSD) 小于 8.50%, 实际样品检测结果与高效液相色谱法符合率达 100%。因此, 该研究构建的 EuNPs-LFIC 方法适用于药食同源药材中的 AFB₁、ZEN 与 OTA 等真菌毒素的现场快速监测。

关键词: 铕纳米粒子; 侧向流动免疫层析; 真菌毒素; 同时检测

文章编号: 1673-9078(2024)07-227-235

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.7.0933

Simultaneous and Rapid Detection of Three Mycotoxins in Food and Medicine Homologous Materials by Fluorescent Nanoparticle-Based Immunochromatography

HUO Bingfan¹, MA Biao¹, LI Jiali², MEI Qing¹, ZHOU Yuxin¹, ZHANG Mingzhou^{1*}

(1. College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

(2. Hangzhou Kuige Technology Co. Ltd., Hangzhou 310002, China)

Abstract: An ultra-sensitive lateral flow immunochromatography (LFIC) method based on europium nanoparticles (EuNPs) was established for the simultaneous and rapid detection of aflatoxin B₁ (AFB₁), zearalenone (ZEN), and ochratoxin A (OTA) in medicine and food homologous materials. By optimizing the key parameters such as the mass concentration of the antigen, the position of the antigen coating, the mass concentration of the anti-mouse IgG coating, the buffer pH value, and the immunoreaction time, the simultaneous and sensitive detection of three target mycotoxins in a single sample after simple sample pretreatment was achieved. The results showed that the method had good specificity, high sensitivity, and the visual detection limits of AFB₁, ZEN, and OTA standard substances were 0.5, 4.0, and 2.0 ng/mL, respectively. The linear ranges (IC₁₀~IC₉₀) were 0.03~4.61, 0.12~8.47, and 0.09~8.26 ng/mL, respectively. The method was used for the determination of mycotoxins in ginseng, astragalus, and angelica. The average recovery rates of the samples were 90.02%~109.39%, the relative standard deviation (RSD) was less than 8.50%, and the detection results of the actual samples were 100% consistent with those of HPLC. Therefore, the EuNPs-LFIC method constructed in this study is suitable for the on-site rapid monitoring of AFB₁, ZEN, and OTA in food and medicine homologous materials.

引文格式:

霍炳帆, 马焱, 厉佳丽, 等. 基于荧光纳米颗粒的免疫层析技术同步快速检测药食同源药材中的3种真菌毒素[J]. 现代食品科技, 2024, 40(7): 227-235.

HUO Bingfan, MA Biao, LI Jiali, et al. Simultaneous and rapid detection of three mycotoxins in food and medicine homologous materials by fluorescent nanoparticle-based immunochromatography [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(7): 227-235.

收稿日期: 2023-08-03

基金项目: 浙江省重点研发计划项目 (2021C02060; 2020C02024); 浙江省基础公益研究计划农业农村项目 (LGN22C200015)

作者简介: 霍炳帆 (1997-), 男, 硕士, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: 923070845@qq.com

通讯作者: 张明洲 (1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全快速检测技术, E-mail: zmzcjlu@cjlu.edu.cn

coated artificial antigen, immobilized line position of the coated artificial antigen, mass concentration of the coated goat anti-mouse IgG, buffer pH, and immunoreaction time, the developed method could achieve the ultrasensitive and simultaneous identification of three target mycotoxins in one sample after a simple sample pretreatment. This method demonstrated a high specificity and sensitivity. The visual limits of detection of the AFB₁, ZEN, and OTA standards were 0.5, 4.0, and 2.0 ng/mL, respectively. Their linear ranges (IC₁₀~IC₉₀) were 0.03~4.61, 0.12~8.47, and 0.09~8.26 ng/mL, respectively. In the detection of mycotoxins in ginseng, astragalus, and angelica samples, the mean spiked recovery rates of the three types of analytes ranged from 90.02% to 109.39%, with a relative standard deviation of less than 8.50%. The coincidence rate between the actual sample and HPLC method was 100%. Therefore, the developed EuNP-LFIC method is suitable for the on-site rapid monitoring of mycotoxins such as AFB₁, ZEN, and OTA in medicine and food homologous materials.

Key words: europium nanoparticles; lateral flow immunochromatography; mycotoxin; simultaneous detection

真菌毒素是真菌产生的次生代谢产物^[1], 真菌毒素污染导致的药食同源药材霉变是影响药材质量和安全的主要问题之一。药材在种植、采收、运输和贮藏过程中, 容易因方法不当而引起大量真菌毒素积累, 可直接影响人参、黄芪和当归等药材的质量和疗效^[2]。研究表明, 大多数真菌毒素能抑制人类体内蛋白质的合成并损坏细胞结构, 进而影响肝脏、肾脏、神经及造血等器官和组织的正常运作, 对生命健康带来极大的风险^[3,4]。其中, 黄曲霉毒素 B₁ (Aflatoxin B₁, AFB₁)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN) 和赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA) 等是常见的真菌毒素, 也是药材中主要的真菌毒素, 对药材造成严重污染^[5]。霉变的药食同源药材中通常具有多种产毒真菌, 释放多种真菌毒素造成交叉污染^[6], 例如 OTA 与伏马菌素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 共存会加剧污染^[7]。《中国药典》规定柏子仁等药材及饮片中 AFB₁ 不得高于 5 μg/kg^[8], 而对 ZEN 和 OTA 并没有明确限量标准。中医讲究药食同源, 药物和食物之间没有绝对的界限^[9]。我国规定 ZEN 在饲料的玉米中 ≤ 500 μg/kg, 在食品谷物玉米中 ≤ 60 μg/kg, OTA 在饲料谷物中 ≤ 100 μg/kg, 在食品谷物中 ≤ 5 μg/kg^[10], 也可视作药食同源药材中真菌毒素的限量参考值。

目前, 传统的真菌毒素分析技术包括高效液相色谱 (HPLC)^[11,12]、液相色谱串联质谱 (LC-MS/MS)^[13]、气相色谱-质谱 (GC-MS)^[14] 和毛细管电泳 (CE)^[15] 等, 此类方法虽发展成熟, 但步骤繁琐、成本高昂、不适合现场快速检测和应用^[16]。免疫分析方法具有独特的优势, 因其灵敏度高, 特异性强, 操作简便等特点, 逐渐成为一类应用广泛的快速筛查方法^[17,18]。

侧向流动免疫层析 (LFIC) 方法具有简单、快速、灵敏等特点, 可以现场判读检测结果, 广泛应用于食品安全和环境监测中^[19,20]。作为 LFIC 的常用显色标记材料, 胶体金纳米颗粒 (CGNPs) 存在线性范围窄、标记物不稳定等缺点^[21]。为克服上述问题, 镧系元素^[22]、上转换^[23] 和量子点纳米材料^[24] 因其特殊的光学性质而被视为理想的荧光标记材料。其中, 镧系元素是一种独特有效的荧光信号报告分子, 激发和发射峰在 360 nm 和 610 nm 处, 它具有更大的斯托克斯位移、更窄的发射带、更高的荧光强度、长荧光寿命和荧光背景干扰低等优势, 已广泛应用于生物分析和医学研究^[25,26]。

本研究通过碳二亚胺法制备荧光探针, 建立了一种基于镧系纳米颗粒的三重荧光侧向流动免疫层析方法, 将 EuNPs 分别与 3 种特异性抗体结合, 制备 EuNPs-mAb 荧光探针, 可以实现单个药食同源药材待测样品中 AFB₁、ZEN 和 OTA 超灵敏同时定量检测, 为药食同源药材质量安全监测提供新手段。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

AFB₁ 标准品、ZEN 标准品、OTA 标准品、伏马菌素 B₁ (Fumonisin B₁, FB₁) 标准品、T-2 毒素标准品、桔青霉素 (Citrinin, CIT) 标准品和呕吐毒素 (Vomitoxin, DON) 标准品, 购于中国计量科学研究院。镧系纳米粒子 (Europium Nanoparticles, EuNPs, 200 nm)、AFB₁、ZEN 和 OTA 的单克隆抗体及人工抗原, 购自浙江迪恩生物科技股份有限公司。牛血清白蛋白 (10% 质量分数的 BSA)、羊抗

鼠 IgG (GAM-IgG)、硝酸纤维素膜 (Nitrocellulose Membrane, NC 膜)、样品垫、吸收垫、结合垫、PVC 底板, 均购自杭州快格科技有限公司。人参、黄芪和当归, 购自贵阳济仁堂药业有限公司。试剂均为分析级, 使用时不进行任何纯化。

制备磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01 mol/L, pH 值 7.4)、硼酸盐缓冲液 (BBS, 0.05 mol/L, pH 值 8.2)、2- (N- 吗啉) 乙磺酸 (MES, 0.05 mol/L, pH 值 6.5) 溶液和碳酸盐缓冲液 (CBS, 0.05 mol/L, pH 值 9.0), 常温储存。

XYZ-3000 喷金点膜仪, BioDot, CA, USA ; CM-2000 切割机, BioDot, CA, USA ; FIC-S2011-B14 荧光读数仪, 苏州赫尔曼精密仪器公司; 干燥箱, 博远上海实业; Milli-Q 超纯水系统, Millipore, CA, USA ; 低温高速离心机, Thermo, CA, USA ; 高效液相色谱系统, Agilent, CA, USA ; 电动夹套, 上海灯晟仪器制造有限公司; 超声波清洗机, 上海灯晟仪器制造有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 荧光探针的制备

本研究采用改进的碳二亚胺法^[27]。将 1 mg 的 EuNPs 溶解于 400 μ L MES (0.05 mol/L, pH 值 6.5) 溶液中, 加入 30 μ L EDC (10 mg/mL) 活化。室温下摇床振荡孵育 30 min 后, 13 000 r/min 离心 30 min, 弃上清。加入 500 μ L BBS (0.05 mol/L, pH 值 8.2) 溶解沉淀, 超声 (100 W) 1 min。加入 anti-OTA-mAb, 配制成 20 μ L/mL 的溶液, 室温下搅拌反应 2 h。随后加入 55 μ L 的 10% 质量分数的 BSA 封闭 2 h。将 EuNPs-mAb 结合物在 13 000 r/min 下离心 10 min 后, 用 500 μ L 硼酸盐缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 8.2) 重悬, 4 $^{\circ}$ C 保存。EuNPs-ZEN-mAb 和 EuNPs-AFB₁-mAb 探针同样使用上述方法制备。

1.2.2 试纸条的制备

试纸条主要由 NC 膜、样品垫、吸收垫、结合垫组成 (图 1a)。样品垫用 PBS 缓冲液浸泡 30 min, 置于 37 $^{\circ}$ C 干燥器中 2 h 后, 室温保存于密封袋中。将 OTA-BSA、AFB₁-BSA、ZEN-BSA 和羊抗鼠 IgG 分别固定于 NC 膜上的 T1、T2、T3 和 C 位置处, 相邻的检测线间隔约为 0.4 cm。将标记好的单克隆抗体用 BBS 缓冲液 (0.05 mol/L, pH 值 8.2) 稀释至 4 ng/mL 质量浓度后, 按 2.0 μ L/cm 的喷量铺在结合垫上。处理好的 NC 膜和结合垫 37 $^{\circ}$ C 烘干

12 h。最后按照吸收垫、NC 膜、结合垫、样品垫的顺序由顶部依次叠放在 PVC 底板上, 裁剪成 2.5 mm 的条状, 室温下保存。使用荧光读数仪检测试纸条的荧光强度如图 1c 所示, 本研究基于竞争反应原理, 当检测样品为阴性时, 荧光强度很高, 当检测样品为阳性时, 荧光强度降低。

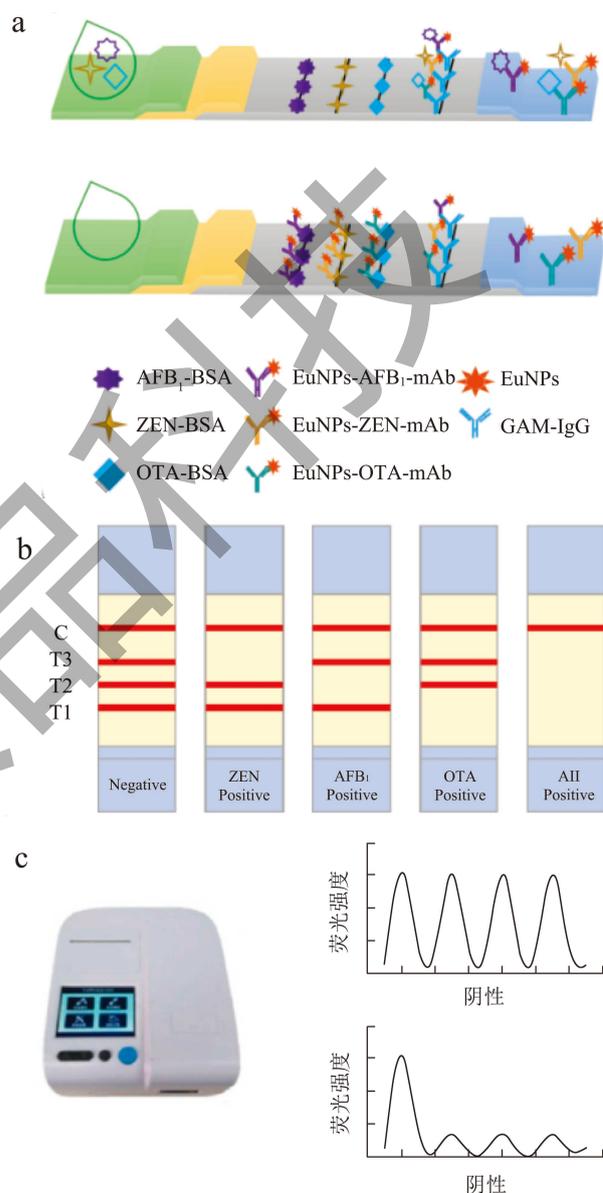


图 1 (a) EuNPs-LFIC 检测示意图; (b) EuNPs-LFIC 结果示意图; (c) EuNPs-LFIC 读卡器测试结果
Fig.1 (a) The EuNPs-LFIC detection schematic;
(b) Schematic diagram of the EuNPs-LFIC results;
(c) Test results of the EuNPs-LFIC reader

1.2.3 单重免疫层析试纸条的优化

采用正交实验模式对人工抗原的质量浓度和羊抗鼠 IgG 的质量浓度进行优化。AFB₁-BSA 包被质量浓度分别为 0、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL,

ZEN-BSA 包被质量浓度分别为 0、0.4、0.8、1.0、1.2、1.4 mg/mL, OTA-BSA 包被质量浓度分别 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL, 羊抗鼠 IgG 的包被质量浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mg/mL。记录不同质量浓度下的荧光强度并进行数据分析。

1.2.4 三重免疫层析试纸条的优化

在单重免疫层析试纸条优化的基础上, 设计三重荧光免疫层析试纸条的人工抗原划膜位置的组合方案, 筛选出最佳排列方式, 并对免疫反应时间和 pH 值等条件进行优化。

1.2.4.1 人工抗原划膜位置的优化

选用单重免疫层析试纸条优化得到的最佳人工抗原质量浓度, 将 OTA-BSA、AFB₁-BSA 和 ZEN-BSA 分别排列在 T1、T2 和 T3 的位置处, 通过分析 T/C 的相对荧光强度比值, 选择最佳组合方式。

1.2.4.2 免疫反应时间的优化

将 40 μL PBS 缓冲液滴加在试纸条上, 借助荧光读数仪记录反应 5、10、15、20、25、30、35、40 min 后的试纸条荧光强度, 重复测试 3 次后分析数据, 选择最佳免疫反应时间。

1.2.4.3 缓冲液 pH 值的优化

将 40 μL PBS 缓冲液滴加在试纸条上, 选取 pH 值分别为 4、5、6、7、8、9 时的缓冲液, 滴加到试纸条上, 静置反应后借助荧光读数仪进行 3 次重复测试后, 记录并分析数据, 确定缓冲液最佳 pH 值。

1.2.5 灵敏度和特异性评估

1.2.5.1 灵敏度实验

取 976 μL PBS 缓冲溶液 (0.01 mol/L, pH 值 7.4) 于 EP 管中, 加入 8 μL 1 μg/mL 的 AFB₁ 标准品、8 μL 1 μg/mL ZEN 标准品、8 μL 1 μg/mL OTA 标准品, 充分混合后配制成混合标准品溶液, 梯度稀释后终质量浓度分别约为 8、4、2、1、0.5、0.25、0.13 和 0.06 ng/mL。将标准品混合溶液分别滴加到试纸条上, 阴性对照为 PBS 缓冲液, 采用荧光读数仪分别读取 T₁、T₂、T₃ 和 C 线的荧光强度, 计算抑制率。将标准品混合溶液质量浓度的对数值作为横坐标, 抑制率作为纵坐标, 建立标准曲线。

$$H = \left(1 - \frac{B}{B_0}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

H —抑制率, %;

B —阳性样本的 T/C 值;

B_0 —阴性样本 (PBS 缓冲液) 的 T/C 值。

$$X = \log c \quad (2)$$

式中:

X —横坐标值;

c —标准品混合溶液质量浓度, ng/mL。

1.2.5.2 特异性评估

使用 AFB₁、ZEN、OTA、DON、FB₁、CIT 和 T-2 毒素等 7 种真菌毒素评价 EuNPs-LFIC 方法的特异性。7 种真菌毒素标准品均稀释至 500 ng/mL, 然后滴加到试纸条的样品垫上进行检测分析。

1.2.6 加标回收实验

选用经 HPLC 确证未被 AFB₁、ZEN 和 OTA 污染的人参、黄芪和当归等 28 份药食同源药材样品, 分别以单独、两两混合和三者混合的方式添加 AFB₁、ZEN 和 OTA 等 3 种真菌毒素标准品, 每种标准品的添加质量浓度分别为 0、2.0、4.0 和 8.0 μg/kg, 使用制备的 EuNPs-LFIC 进行检测, 计算回收率和相对标准偏差。

$$R = \frac{D}{A} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

R —回收率, %;

D —检出量, ng/mL;

A —添加量, ng/mL。

$$E = \frac{F}{M} \times 100\% \quad (4)$$

式中:

E —相对标准偏差 (RSD), %;

F —标准偏差 (SD);

M —平均值。

1.2.7 与其他检测方法的对比分析

30 份药食同源药材 (人参、黄芪和当归) 实际样品分析前需进行预处理, 每个样品称取 1.0 g, 充分研磨后用 20 mL 甲醇:水 (80:20, V/V) 充分混匀, 用高速均质器匀浆 5 min, 震荡 5 min 后使用滤纸过滤。采用 HPLC 和 EuNPs-LFIC 方法同时对滤液进行分析, 并验证检测结果的可靠性。HPLC 的色谱条件: 色谱柱: Hypersil C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 3 μm); 柱温: 30 °C; 流动相: 乙腈:水:乙酸 (99:99:2, V/V/V); 流速: 0.4 mL/min; 进样量 20 μL; 激发波长: 330 nm; 发射波长: 450 nm。

1.2.8 数据分析

采用 Microsoft Excel 软件 (Microsoft Corporation, USA) 进行数据分析, 绘制标准曲线等图表。

2 结果与讨论

2.1 单重免疫层析试纸条的优化

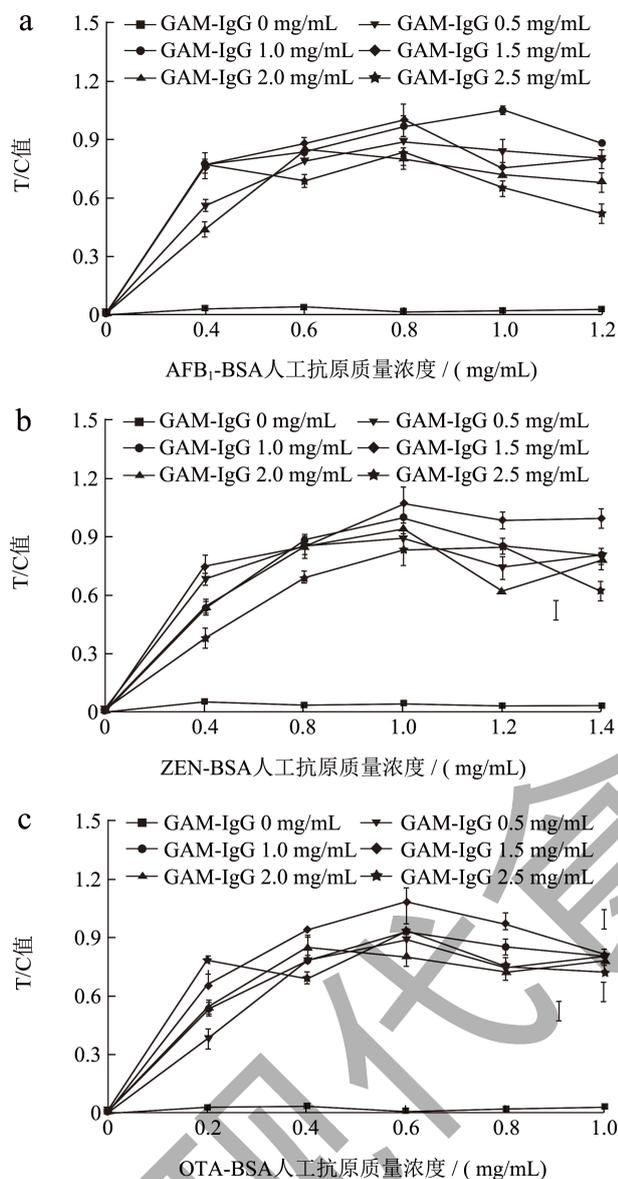


图 2 (a) AFB₁-BSA 和 GAM-IgG 包被质量浓度的优化;
(b) ZEN-BSA 和 GAM-IgG 包被质量浓度的优化;
(c) OTA-BSA 和 GAM-IgG 包被质量浓度的优化

Fig.2 (a) Optimization of AFB₁-BSA and GAM-IgG coating mass concentrations; (b) Optimization of ZEN-BSA and GAM-IgG coating mass concentrations; (c) Optimization of OTA-BSA and GAM-IgG coating mass concentrations

为了获得良好的荧光信号, 对人工抗原的质量浓度和羊抗鼠 IgG 的质量浓度进行了优化。AFB₁ 的免疫层析试纸条的结果显示 (图 2a), 使用 1.0 mg/mL 的 AFB₁-BSA 和 1.0 mg/mL 的 GAM-IgG 时, 相对荧光强度比值最大。ZEN 的免疫

层析试纸条的结果显示 (图 2b), 使用 1.0 mg/mL 的 ZEN-BSA 和 1.5 mg/mL 的 GAM-IgG 时, 相对荧光强度比值最大。OTA 的免疫层析试纸条的结果显示 (图 2c), 使用 0.6 mg/mL 的 OTA-BSA 和 1.5 mg/mL 的 GAM-IgG 时, 相对荧光强度比值最大。

2.2 三重免疫层析试纸条的优化

2.2.1 人工抗原划膜位置的优化

人工抗原的划膜位置会影响荧光探针到达 T 线时的结合效率, 因此, 在三重免疫层析试纸条中, 将不同的人工抗原定位在不同的位置是理想的解决方案。借助荧光读数仪进行 6 次重复测试。结果显示 (表 1), 检测线的荧光强度会随着人工抗原位置的变化而发生变化, OTA-BSA、AFB₁-BSA 和 ZEN-BSA 分别在 T1、T2 和 T3 位置处时, T/C 值分别为 0.57、0.59 和 0.65, T/C 值最高, 荧光信号最大, 因此, 将 OTA-BSA、AFB₁-BSA 和 ZEN-BSA 分别固定在 T1、T2 和 T3 位置处。

表 1 人工抗原划膜位置优化

Table 1 Optimization of artificial antigen line position

编号	抗原	T 线位置	抗原包被质量浓度 / (mg/mL)	荧光强度 / CPS	T/C 值
1	OTA-BSA	T1	0.6	10 303 ± 0.22	0.43
	ZEN-BSA	T2	1.0	11 043 ± 0.31	0.53
	AFB ₁ -BSA	T3	1.0	11 563 ± 0.20	0.57
2	OTA-BSA	T1	0.6	11 735 ± 0.39	0.57
	AFB ₁ -BSA	T2	1.0	11 621 ± 0.29	0.59
	ZEN-BSA	T3	1.0	11 875 ± 0.27	0.65
3	ZEN-BSA	T1	1.0	10 154 ± 0.18	0.42
	OTA-BSA	T2	0.6	10 247 ± 0.11	0.51
	AFB ₁ -BSA	T3	1.0	11 024 ± 0.27	0.55
4	ZEN-BSA	T1	1.0	9 324 ± 0.24	0.39
	AFB ₁ -BSA	T2	1.0	10 782 ± 0.20	0.50
	OTA-BSA	T3	0.6	11 140 ± 0.19	0.58
5	AFB ₁ -BSA	T1	1.0	10 342 ± 0.28	0.41
	OTA-BSA	T2	0.6	10 210 ± 0.25	0.48
	ZEN-BSA	T3	1.0	11 749 ± 0.30	0.56
6	AFB ₁ -BSA	T1	1.0	10 438 ± 0.27	0.50
	ZEN-BSA	T2	1.0	10 409 ± 0.28	0.49
	OTA-BSA	T3	0.6	11 642 ± 0.22	0.57

2.2.2 免疫反应时间的优化

免疫反应时间会影响试纸条的分析结果,随着反应时间的延长,荧光探针会与抗原实现更好地结合。如图 3a 所示,在反应开始 20 min 以内,T/C 值随着时间的延长,越来越大。反应 20 min 时,T/C 值达到 1.0,20 min 之后 T/C 值并无明显变化。检测时间过短会造成显色结果不准确,过长则显示不出现场快速检测的优点。因此免疫反应时间选择 20 min。

2.2.3 缓冲液 pH 值的优化

缓冲液 pH 值会导致抗原抗体结合位点的活性变化,进而影响抗原抗体之间的相互作用。如图 3b 所示,随着 pH 值的增加,T/C 值呈现先增加后降低的趋势。当缓冲液 pH 值为 8 时,T/C 值最大为 0.8。因此,抗原抗体反应必须在合适的酸碱度下进行,pH 值过低或过高都将影响抗原抗体的理化性质,缓冲溶液的最佳 pH 值应为 8。

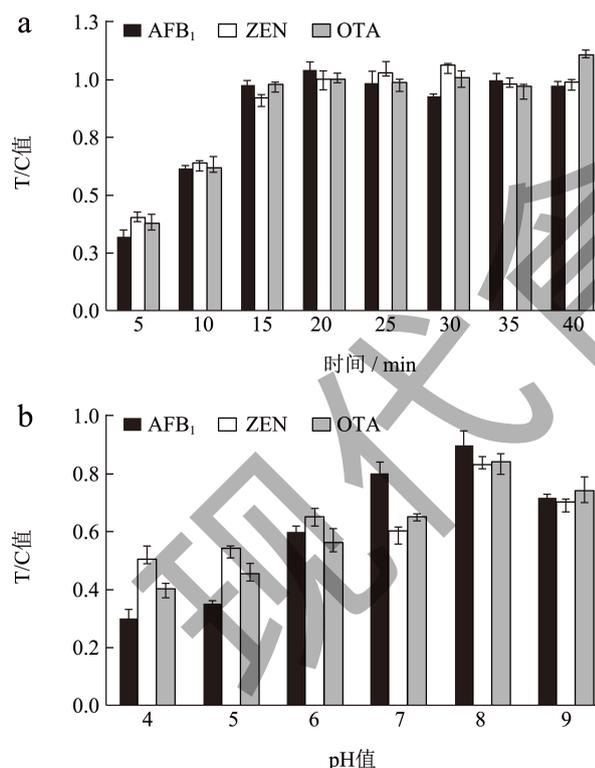


图 3 (a) 免疫反应时间的优化; (b) 缓冲液 pH 值的优化

Fig.3 (a) Optimization of immune response time;
(b) Optimization of buffer pH

2.3 灵敏度和特异性评估

2.3.1 灵敏度实验

随着混合标准品溶液质量浓度的增加,检测线

的荧光强度逐渐降低。将荧光消失时标准品的质量浓度定义为肉眼检测限。由图 4a 可知, AFB₁、ZEN 和 OTA 的肉眼检测限分别为 0.5、4.0 和 2.0 ng/mL。借助荧光读数仪量化检测结果,计算抑制率,拟合标准曲线,明确毒素质量浓度和荧光强度之间的关系。结果显示(图 4b),抑制率与标准品混合溶液质量浓度的对数值之间存在良好的线性关系($R^2 > 0.98$),且 AFB₁、ZEN 和 OTA 线性范围(IC₁₀~IC₉₀)分别为 0.03~4.61、0.12~8.47 和 0.09~8.26 ng/mL。

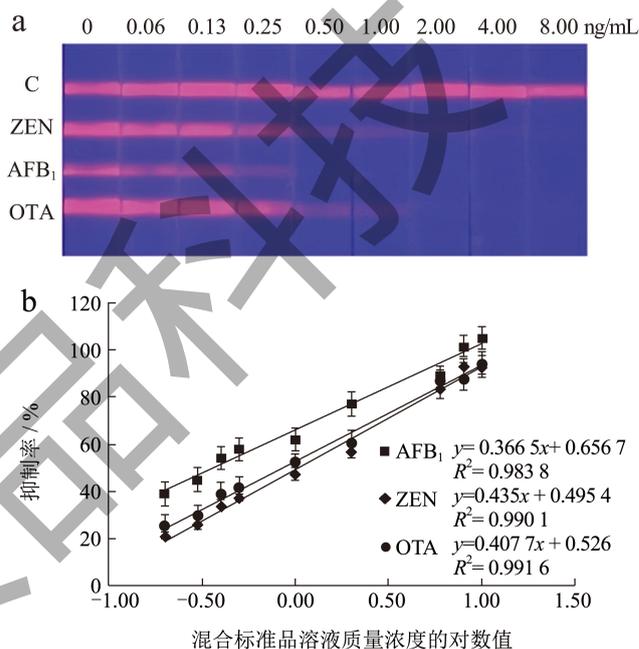


图 4 (a) 三重荧光免疫层析试纸条灵敏度分析;

(b) AFB₁、ZEN 及 OTA 的标准曲线

Fig.4 (a) Sensitivity analysis of triple fluorescence immunochromatographic strip; (b) Standard curves for AFB₁, ZEN and OTA

对比先前研究, Sun 等^[28]建立一种基于铈纳米颗粒同时检测 AFB₁ 和 ZEN 的荧光免疫层析试纸条, AFB₁ 和 ZEN 的线性范围分别为 60.3~92.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 0.40~1.28 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。Zhang 等^[29]建立了一种基于胶体金同时检测 AFB₁、ZEN 和 T-2 毒素的免疫层析试纸条, AFB₁、ZEN 和 T-2 毒素的肉眼检测限分别为 0.5、5.0 和 5.0 ng/mL。本研究增加了目标分析物的数量,提升了药食同源中真菌毒素的检测效率,将标记材料由胶体金改为铈纳米颗粒,线性范围灵敏度更高,更能满足实际检测的需求。

2.3.2 特异性评估

本研究特异性评估指真菌毒素单抗可与对应的

抗原实现高度结合, 可用 T/C 值表示。本文分析了 AFB₁、ZEN、OTA、DON、FB₁、CIT 和 T-2 毒素等 7 种真菌毒素 (图 5a), 通过计算 T/C 值数据分析来评价 EuNPs-LFIC 的特异性。结果显示 (图 5b), AFB₁ 对 T2 处的 T/C 值、ZEN 对 T3 处的 T/C 值和 OTA 对 T1 处的 T/C 值均小于 0.20, DON、CIT、FB₁ 和 T-2 毒素对 T1、T2 和 T3 处的 T/C 值均大于 0.80, 以上结果表明, 本研究的 EuNPs-LFIC 方法对 AFB₁、ZEN 和 OTA 的检测有良好的特异性。

2.4 加标回收实验

向经过 HPLC 验证过的阴性样品中添加不同质量浓度的真菌毒素标准品, 每个质量浓度重复测试 6 次。EuNPs-LFIC 方法的准确性与重复性, 可以用相对标准偏差 (RSD) 表示。结果显示 (表 2), 真菌毒素的平均回收率为 90.02%~109.39%, RSD 均小于 8.50%。结果表明, 本研究建立的真菌毒素检测方法, 结果准确, 重复性好。

表 2 加标样品中 AFB₁、ZEN 和 OTA 的回收率测定
Table 2 Determination of recoveries of AFB₁, ZEN and OTA in labeled samples

编号	添加质量浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)			平均检测值 \pm 标准偏差/($\mu\text{g}/\text{kg}$)			平均回收率 \pm RSD/%		
	AFB ₁	ZEN	OTA	AFB ₁	ZEN	OTA	AFB ₁	ZEN	OTA
1	0.00	/	/	ND	/	/	ND	/	/
2	2.00	/	/	1.96 \pm 0.08	/	/	98.00 \pm 3.87	/	/
3	4.00	/	/	3.90 \pm 0.17	/	/	97.50 \pm 4.24	/	/
4	8.00	/	/	8.24 \pm 0.35	/	/	103.00 \pm 4.33	/	/
5	/	0.00	/	/	ND	/	/	ND	/
6	/	2.00	/	/	1.99 \pm 0.11	/	/	99.50 \pm 5.76	/
7	/	4.00	/	/	3.87 \pm 0.12	/	/	96.75 \pm 3.21	/
8	/	8.00	/	/	8.46 \pm 0.31	/	/	105.75 \pm 3.64	/
9	/	/	0.00	/	/	ND	/	/	ND
10	/	/	2.00	/	/	2.05 \pm 0.10	/	/	102.50 \pm 4.86
11	/	/	4.00	/	/	4.14 \pm 0.22	/	/	103.50 \pm 5.37
12	/	/	8.00	/	/	8.33 \pm 0.28	/	/	104.13 \pm 3.35
13	0.00	0.00	/	ND	ND	/	ND	ND	/
14	2.00	2.00	/	2.03 \pm 0.13	2.05 \pm 0.10	/	101.50 \pm 6.25	102.50 \pm 4.75	/
15	4.00	4.00	/	4.20 \pm 0.10	4.18 \pm 0.15	/	105.00 \pm 2.34	104.50 \pm 3.55	/
16	8.00	8.00	/	7.74 \pm 0.28	7.81 \pm 0.23	/	96.75 \pm 3.59	97.63 \pm 2.98	/
17	0.00	/	0.00	ND	/	ND	ND	/	ND
18	2.00	/	2.00	1.87 \pm 0.02	/	1.91 \pm 0.06	93.50 \pm 1.32	/	95.50 \pm 3.24
19	4.00	/	4.00	3.89 \pm 0.16	/	3.77 \pm 0.10	94.25 \pm 4.23	/	94.25 \pm 2.65
20	8.00	/	8.00	7.69 \pm 0.36	/	7.73 \pm 0.34	96.13 \pm 4.62	/	96.63 \pm 4.37
21	/	0.00	0.00	/	ND	ND	/	ND	ND
22	/	2.00	2.00	/	1.93 \pm 0.10	1.95 \pm 0.06	/	96.50 \pm 5.23	97.50 \pm 3.12
23	/	4.00	4.00	/	4.27 \pm 0.10	4.22 \pm 0.15	/	106.75 \pm 2.34	105.50 \pm 3.58
24	/	8.00	8.00	/	8.45 \pm 0.28	8.27 \pm 0.51	/	105.63 \pm 3.31	103.38 \pm 6.18
25	0.00	0.00	0.00	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26	2.00	2.00	2.00	1.89 \pm 0.05	1.97 \pm 0.13	1.92 \pm 0.06	94.50 \pm 2.89	98.50 \pm 6.43	96.00 \pm 3.34
27	4.00	4.00	4.00	3.85 \pm 0.21	4.03 \pm 0.17	4.16 \pm 0.22	96.25 \pm 5.34	100.75 \pm 4.12	104.00 \pm 5.22
28	8.00	8.00	8.00	8.34 \pm 0.31	8.28 \pm 0.28	8.37 \pm 0.36	104.25 \pm 3.67	103.50 \pm 3.34	104.63 \pm 4.25

注: ND 为没有检出。

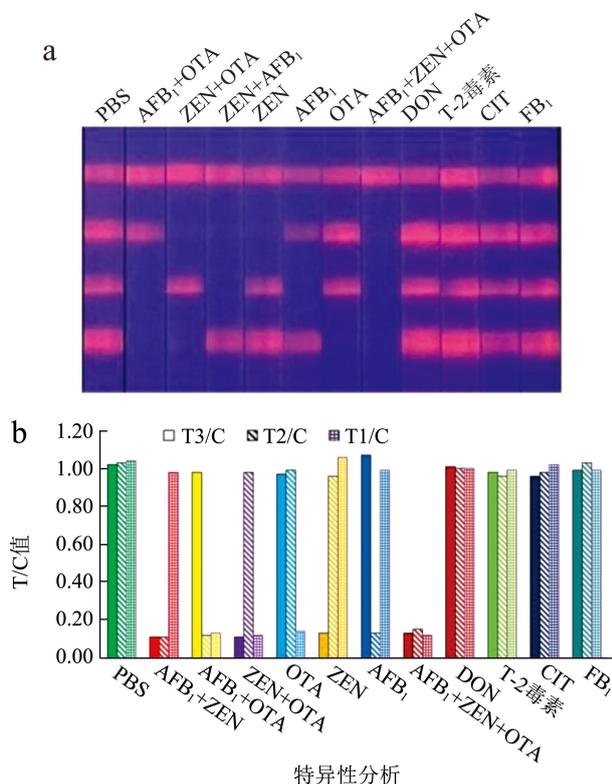


图5 (a) 试纸条特异性检测; (b) 试纸条特异性分析结果

Fig.5 (a) strip specificity detection; (b) strip specificity analysis results

2.5 与其他检测方法的对比分析

为进一步验证 EuNPs-LFIC 方法的有效性, 选用 30 个药食同源药材样品进行分析, 并与高效液相色谱法 (HPLC) 进行比较。同一样品重复测试 3 次以保证结果的准确性。实验结果表明 (表 3), 两种方法检出的阴、阳性结果相当, 符合率达 100%。说明本文的 EuNPs-LFIC 方法有效可靠。

表 3 三重荧光免疫层析和 HPLC 对实际样品检测对比

Table 3 Comparison of actual samples detected by triple fluorescence immunochromatography and HPLC

阳性样品 编号	HPLC/($\mu\text{g}/\text{kg}$)			EuNPs-LFIC/($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	AFB ₁	ZEN	OTA	AFB ₁	ZEN	OTA
7	4.82	5.57	ND	4.39	5.92	/
21	6.45	7.29	7.36	6.78	7.84	7.61

注: ND 为没有检出。

3 结论

本研究基于铕纳米荧光材料开发了一种用于真菌毒素灵敏定量检测的三重荧光免疫层析试纸条。实验结果表明, 试纸条可在 20 min 内完成测定, 对 AFB₁、ZEN 和 OTA 的肉眼检出限分别为 0.5、4.0、

2.0 ng/mL, 检测范围分别为 0.03~4.61、0.12~8.47、0.09~8.26 ng/mL。本方法添加回收实验准确性较好, 样品平均加标回收率为 90.02%~109.39%。在人参、黄芪和当归等实际样品真菌毒素检测中, 荧光免疫层析试纸条与高效液相色谱法具有良好的一致性。因此, 本方法作为一种快速、高通量的现场筛查工具, 在检测真菌毒素污染方面具有很大的应用前景。

参考文献

- [1] POCSI I, KIRALY G, BANFALVI G. Antineoplastic potential of mycotoxins [J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2018, 65(3):267-307.
- [2] 周恒,王少敏,季申. 中药中真菌毒素污染的现状与防控对策[J]. 中国食品药品监管, 2022, 3:110-118.
- [3] WU K, REN C, GONG Y, et al. The insensitive mechanism of poultry to zearalenone: a review [J]. Anim Nutr, 2021, 7(3): 587-594.
- [4] SVAJLENKA J, KOZLOVSKA M, POSIVAKOVA T. Biomonitoring the indoor environment of agricultural buildings [J]. Ann Agric Environ Med, 2018, 25(2):292-295.
- [5] XU H, WANG L, SUN J, et al. Microbial detoxification of mycotoxins in food and feed [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2022, 62(18):4951-4969.
- [6] SRZYDLEWSKI P, TWARUZEK M, GRAJEWSKI J. Cytotoxicity of mycotoxins and their combinations on different cell lines: a review [J]. Toxins (Basel), 2022, 14(4): 244.
- [7] XIA D, MO Q, YANG L, et al. Crosstalk between mycotoxins and intestinal microbiota and the alleviation approach via microorganisms [J]. Toxins (Basel), 2022, 14(12): 859-865.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [9] IMADE F, ANKWASA E, GENGH, et al. Updates on food and feed mycotoxin contamination and safety in Africa with special reference to Nigeria [J]. Mycology, 2021, 12(4): 245-260.
- [10] GB 2761-2017 食品安全国家标准食品中真菌毒素限量[S].
- [11] 王勇,张宪臣,华洪波等. 超高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱联用快速测定水产品及干制水产品制品中的116种农药和24种生物毒素残留[J]. 现代食品科技, 2022, 38(1):371-389.
- [12] SALEM M, ZAYED A. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based profiling of plant hormones [J]. Methods Mol Biol, 2022, 2462: 125-133.
- [13] 徐明芳,黎明,沈林燕,等. 香菇中麦角固醇与VD₂的LC-MS/MS同步检测分析[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 2019, 47(3):109-118.
- [14] FAYED B, KOHDER G, SOLIMAN S. Gas chromatography-

- mass spectrometry analysis of candida auris metabolites [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2517: 165-172.
- [15] STOLZ A, JOOB K, HOCKER O, et al. Recent advances in capillary electrophoresis-mass spectrometry: instrumentation, methodology and applications [J]. *Electrophoresis*, 2019, 40(1): 79-112.
- [16] WANG M, GONG Q, LIU W, et al. Applications of capillary electrophoresis in the fields of environmental, pharmaceutical, clinical, and food analysis [J]. *J Sep Sci*, 2022, 45(11): 1918-1941.
- [17] 王序, 卢迪莎, 曾道平, 等. 时间分辨荧光免疫层析法定量检测谷物中黄曲霉毒素B₁和玉米赤霉烯酮残留[J]. 现代食品科技, 2021, 37(4): 252-261.
- [18] LI Y, WANG J, TIAN Y, et al. The development of a wash-free homogeneous immunoassay method for the detection of tetracycline in environmental samples [J]. *Analyst*, 2021, 146(15): 4918-4926.
- [19] LI Y, XIE H, WANG J, et al. Lateral flow immunochromatography assay for detection of furosemide in slimming health foods [J]. *Foods*, 2021, 10(9): 2041.
- [20] XING G X, SUN X F, LI N, et al. New advances in lateral flow immunoassay technology for food safety detection [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6596.
- [21] LI Y, LI S, NAGARAJAN A, et al. Hydrogen evolution electrocatalyst design: turning inert gold into active catalyst by atomically precise nanochemistry [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(29): 11102-11108.
- [22] CHO U, CHEN J. Lanthanide-based optical probes of biological systems [J]. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(8): 921-936.
- [23] 桂丽娟, 梁紫璐, 罗永文, 等. 上转换发光纳米技术检测食品中磺胺类药物含量[J]. 现代食品科技, 2021, 37(1): 243-250.
- [24] BAGHERI E, ANSARI L, ABNOUS K, et al. Silica-quantum dot nanomaterials as a versatile sensing platform [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2021, 51(7): 687-708.
- [25] YUE H, PARK J, CHANG Y M, et al. Ultrasmall europium, gadolinium, and dysprosium oxide nanoparticles: polyol synthesis, properties, and biomedical imaging applications [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20(17): 1767-1780.
- [26] WANG P, YUE N, LIU C, et al. Colorimetric assay for tetracyclines based on europium ion-induced aggregation of gold nanoparticles [J]. *Anal Sci*, 2022 38(8): 1073-1081.
- [27] CHEN E J, XU Y, MA B, et al. Carboxyl-functionalized, europium nanoparticle-based fluorescent immunochromatographic assay for sensitive detection of citrinin in monascus fermented food [J]. *Toxins*, 2019, 11: 605-618.
- [28] SUN S J, ZHENG P M, ZHAO S J, et al. Time-resolved fluorescent immunochromatographic assay-based on three antibody labels for the simultaneous detection of aflatoxin B₁ and zearalenone in Chinese herbal medicines [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2018, 35(12): 2434-2442.
- [29] ZHANG J Y, LI X J, XIE J H, et al. Rapid and simultaneous detection of aflatoxin B₁, zearalenone, and T-2 toxin in medicinal and edible food using gold immunochromatographic test strip [J]. *Foods*, 2023, 12(3): 633.