

doi: 10.12452/j.fxcxb.25102906

氧化石墨烯增强的荧光猝灭免疫层析法检测水胺硫磷

方志鹏¹, 陈宗友¹, 张干¹, 陈佳威¹, 赖怡辉¹, 山珊^{3,4}, 刘道峰^{2*},
赖卫华^{1*}

(1. 南昌大学 食品科学与资源挖掘全国重点实验室, 江西 南昌 330047; 2. 江西省疾病预防控制中心, 江西 南昌 330029; 3. 江西师范大学 生命科学学院, 江西 南昌 330022; 4. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 北京 100700)

摘要: 该研究通过氧化石墨烯(GO)负载枝状金纳米粒子(BA)制备了高效猝灭剂, 基于猝灭红色聚集诱导发光荧光微球(RAIEFM)的荧光信号, 建立了一种侧流免疫层析(LFIA)半定量检测水胺硫磷的方法。GO@BA在640 nm处表现出较高的摩尔消光系数($2.376 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), GO@BA在水溶液中对RAIEFM的荧光猝灭常数 K_n 为 $4.076 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。通过测量荧光寿命的变化, 证实GO@BA的猝灭机制为内滤效应。基于GO@BA构建的荧光猝灭型LFIA, 实现了对ICP的高灵敏检测, 其检出限低至0.0063 ng/mL, 较传统AuNPs-LFIA的灵敏度提升了7.5倍, 线性范围为0.20~6.25 ng/mL。方法应用于黄瓜、青菜和枸杞中的水胺硫磷检测的加标回收率为82.2~104%, 相对标准偏差不超过20%, 与液相色谱串联质谱法的检测结果相比具有良好的一致性。所建立的方法特异性好、灵敏度高, 为水胺硫磷的现场快速检测提供了新思路。

关键词: 氧化石墨烯; 金纳米粒子; 荧光猝灭; 侧流免疫层析; 水胺硫磷

中图分类号: O657.3; O656.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-10

Graphene Oxide-enhanced Fluorescent Quenching Lateral Flow Immunoassay for Detection of Isocarbophos

FANG Zhi-peng¹, CHEN Zong-you¹, ZHANG Gan¹, CHEN Jia-wei¹, LAI Yi-hui¹, SHAN Shan^{3,4}, LIU Dao-feng², LAI Wei-hua¹

(1. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 2. Jiangxi Province Center for Disease Control and Prevention, Nanchang 330029, China; 3. College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China; 4. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, Beijing 100700, China)

Abstract: In this study, an efficient quencher was prepared by loading branched-Au nanoparticles (BA) onto graphene oxide (GO). Based on the quenching of the fluorescent signal from red aggregation-induced emission fluorescent microspheres (RAIEFM), a lateral flow immunoassay (LFIA) method for the semi-quantitative detection of isocarbophos was established. GO@BA exhibited a high molar extinction coefficient of $2.376 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 640 nm, and its fluorescence quenching constant (K_n) against RAIEFM in aqueous solution reached $4.076 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. By measuring the changes in fluorescence lifetime, the quenching mechanism of GO@BA was confirmed to be the inner filter effect. The fluorescence quenching LFIA based on GO@BA enabled highly sensitive detection of ICP, with a limit of detection as low as 0.0063 ng/mL, which represented a 7.5-fold improvement in sensitivity compared with traditional AuNPs-LFIA, and the linear range was 0.20 - 6.25 ng/mL. When this method is applied to the detection of isocarbophos in cucumbers, green vegetables, and wolfberries, the spiked recovery rate ranges from 82.2% to 104%,

收稿日期: 2025-10-29; 修回日期: 2025-11-28

基金项目: 国家重点研发计划(2024YFF1105703); 国家自然科学基金面上项目(82374031); 江西省中医药管理局科技计划项目(2024A0052); 江西省重点研发计划(20243BBH81007); 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302)

* 通讯作者: 赖卫华, 博士, 二级教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: talktolaiwh@163.com;

刘道峰, 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全风险监测, E-mail: defoelau@163.com

网络首发日期: XXXX-XX-XX

the relative standard deviation does not exceed 20%, and it shows good consistency with the detection results of the liquid chromatography–tandem mass spectrometry method. The established method has good specificity and high sensitivity, providing a new idea for the on-site rapid detection of isocarbophos.

Key words: graphene oxide; Au nanoparticles; fluorescence quenching; lateral flow immunoassay; isocarbophos

水胺硫磷 (ICP) 是一种高毒性有机磷农药, 其通过抑制乙酰胆碱酯酶活性来干扰神经冲动的传导, 进而导致害虫死亡^[1], 而 ICP 的过量施用会导致其在果蔬可食部位的积累, 进而危害人类健康。为对 ICP 的使用进行指导和监管, 中国已制定相应的最大残留限量, GB 2763–2021 规定果蔬中 ICP 的最大残留限量为 0.05 mg/kg^[2]。然而, 近年来 ICP 残留量超标事件依旧频频发生^[3]。目前, ICP 的检测方法主要依赖于液相色谱^[4]、气相色谱^[5]、气相色谱–质谱联用^[6]和液相色谱–质谱联用^[7]技术。这些仪器方法通常操作繁琐、耗时较长, 且需要专业人员操作, 难以满足现场快速筛查的实际需求^[8]。因此, 建立快速、高效的 ICP 检测方法至关重要。侧流免疫层析 (LFIA) 具有快速、经济、便携等特点^[9], 在食品安全领域发挥着重要作用^[10]。然而, 传统的 LFIA 在灵敏度方面存在局限, 往往难以实现痕量目标的准确检测^[11]。

免疫层析法检测小分子目标物时, 常用的是竞争抑制策略 (即信号关闭模式), 越来越多的研究表明, 利用猝灭剂和荧光材料构建的荧光猝灭型 LFIA 将传统的信号关闭模式转变为信号打开模式, 有利于提高灵敏度, 实现目标物的痕量检测^[12–13]。这种模式下, 猝灭剂的设计与荧光材料的选择至关重要。聚集诱导发光荧光微球 (AIEFM) 因其在聚集状态下荧光增强的独特性质, 相比于传统荧光材料, 在荧光猝灭型 LFIA 中表现出显著优势^[14]。其荧光猝灭机制主要基于内滤效应^[15], 即猝灭剂通过吸收 AIEFM 的激发光或发射光能量实现荧光猝灭。因此, 通过增强猝灭剂在相关波段的吸收能力, 有望进一步提升猝灭能力和检测灵敏度。

氧化石墨烯 (GO), 具有超大的比表面积^[16]、丰富的表面基团^[17]以及卓越的机械性能^[18], 已成为一种通用的纳米载体平台, 在催化^[19]和检测^[20]等领域广泛应用。

本研究提出了一种通过 GO 平台来构建高效猝灭剂的策略, 通过聚乙烯亚胺 (PEI) 对 GO 进行表面功能化修饰, 使其表面富含胺基, 随后在超声作用下, 将枝状金 (BA) 纳米粒子原位负载于 PEI 功能化的 GO 片层上, 从而合成 GO@BA。由于 GO 的介入, GO@BA 表现出优异的猝灭性能。本研究将 GO@BA 首次应用于荧光猝灭型 LFIA, 为 ICP 的高灵敏度半定量检测提供了新思路。

1 实验部分

1.1 仪器设备

GENESYS 紫外–可见分光光度计 (上海精科实业有限公司); DNM-9026 多功能酶标仪、K-Alpha X 射线光电子能谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司, 美国); TGL-16 高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); FS-1200 超声波处理器 (上海生析超声仪器有限公司); Zetasizer Nano 粒度电位仪 (Malvern 公司, 英国); JEM-2100 透射电子显微镜 (JEOL 公司, 日本); XYZ-3050 喷膜仪 (BIODOT 公司, 美国); HGS210 可编程切割机 (杭州峰航科技有限公司); FICS20111-S2 荧光读取仪 (苏州赫尔曼有限公司); Regulus 8100 场发射扫描电子显微镜 (日立公司, 日本); FLS1000 荧光光谱仪 (爱丁堡仪器有限公司, 英国)。

1.2 试剂与耗材

牛血清白蛋白、酪蛋白、L-抗坏血酸、硝酸银、碘化钾、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 PEI 购自美国 Sigma 公司; 聚乙烯吡咯烷酮购自上海阿拉丁生化技术有限公司; 氧化石墨烯 (片径 < 500 nm) 购自江苏先丰纳米材料科技有限公司; 甲醇、无水乙醇购自上海国药化学试剂有限公司; ICP 的单克隆抗体 (ICP-mAb)、完全抗原 (ICP-BSA)、金纳米粒子 (AuNPs)、红色 AIEFM (Ex/Em: 380/640 nm) (RAIEFM) 由江西维邦生物科技有限公司提供; ICP、杀螟硫磷、甲基对硫磷、对硫磷、三唑磷、二嗪农、毒死蜱和倍硫磷标准品均购自中国坛墨质检有限公司; 羊抗小鼠

二抗IgG购自无锡中德伯尔有限公司；聚氯乙烯（PVC）底板、样品垫和吸收垫购自上海金标生物技术有限公司；硝酸纤维素膜（CN 95）购自德国 Sartorius 公司；黄瓜、青菜和枸杞样品购自中国南昌天虹超市。所有溶剂和其他化学品均为分析试剂级。

1.3 实验方法

1.3.1 荧光猝灭材料的合成 BA 纳米粒子的合成：BA 纳米粒子参照文献方法制备^[21]。具体步骤如下：向 10 mL 超纯水中依次加入 0.2 mL 聚乙烯吡咯烷酮（50 mg/mL）、0.5 mL 碘化钾（10 mmol/L）和 0.5 mL 氯金酸溶液（20 mmol/L），充分搅拌混匀后，迅速加入 0.5 mL 金种子溶液、0.5 mL 硝酸银（5 mmol/L）和 0.5 mL L-抗坏血酸溶液（200 mmol/L）。反应 1 h 后，将所得产物用超纯水在 9000 r/min 条件下离心 20 min，重复洗涤 3 次，最后将沉淀重新分散于硼酸缓冲液中，于 4 °C 条件下保存备用。

GO@BA 的合成：首先，对 GO 进行 PEI 修饰^[22]，将 10 mL PEI 溶液（8 mg/mL）与 10 mL GO 溶液（0.4 mg/mL）加入到 50 mL 圆底烧瓶中，于 90 °C 下搅拌反应 4 h，得到稳定的黑色产物。反应结束后，将产物在 6000 r/min 离心 10 min，重复洗涤 3 次。随后，进行 BA 的负载：将 80 μ L 上述 PEI 修饰的 GO 产物加入至 1 mL BA 纳米粒子溶液中，在 200 W 功率下超声 8 min。最后，将得到的混合溶液在 4000 r/min 条件下离心 10 min，重复洗涤 3 次，所得沉淀用超纯水重新分散，即得 GO@BA 溶液，于 4 °C 条件下保存备用。

1.3.2 GO@BA 的光学性能评价 消光系数的计算：根据朗伯-比尔定律 $A = \epsilon CL$ （C 是摩尔浓度，L 是光路长度，A 是吸收强度）计算 GO@BA 在 640 nm（ ϵ_{640} ）处吸收的消光系数（ ϵ ）。

荧光猝灭常数的计算：用 Stern-Volmer 方程 $F_0/F = 1 + K_n C$ （ F_0 是初始荧光强度，F 是含猝灭剂的荧光强度，C 是猝灭剂的摩尔浓度）计算荧光猝灭常数（ K_n ）。

1.3.3 免疫探针的制备 GO@BA-mAb 免疫探针：将单克隆抗体（mAb）直接加入到 1 mL GO@BA 溶液中，搅拌反应 1 h。随后加入 100 μ L 酪蛋白溶液（10 mg/mL）封闭非特异性位点，继续反应 30 min。反应结束后，于 4 °C、4000 r/min 离心 10 min，收集沉淀并重悬于 100 μ L 储存缓冲液中，即得 GO@BA-mAb 探针。AuNPs-mAb 的制备方法同上。

1.3.4 3 种 LFIA 试纸条的制备 分别制备了 GO@BA 荧光猝灭试纸条、RAIEFM 试纸条和 AuNPs 试纸条。LFIA 试纸条参照文献方法制备^[23]。

GO@BA-LFIA 试纸条由吸收垫、NC 膜、样本垫和 PVC 底板组成，制备过程如下：将 ICP-BSA 和 RAIEFM 喷涂在 NC 膜上作为 T 线，将 sAb 喷涂在 NC 膜上作为 C 线，喷涂好后在 37 °C 下干燥 6 h。最后，将样本垫、NC 膜和吸收垫依次粘贴到 PVC 底板上，组装成 LFIA 试纸条。然后将 LFIA 条切成 3.8 mm 宽，装入装有干燥剂的铝箔袋中，室温下储存备用。AuNPs-LFIA 与 RAIEFM-LFIA 的制备与上述过程基本一致，但无需在 T 线喷涂 RAIEFM。

1.3.5 LFIA 的参数优化 为实现 LFIA 的最佳检测性能，对抗体偶联体系的 pH 值、抗体用量、T 线喷涂的全抗原浓度、T 线喷涂的 RAIEFM 浓度（AuNPs-LFIA 无需此项）和探针用量进行了优化。

1.3.6 ICP 的检测 将适量的探针加入到反应孔中，然后加入 100 μ L 待检溶液，孵育 3 min 后，将混合液体滴加到 LFIA 试纸条上，层析 15 min。GO@BA-LFIA 通过免疫层析读取仪测定 T、C 线信号值。AuNPs-LFIA 则通过智能手机拍摄 LFIA 试纸条，用 ImageJ 软件读取照片中 T、C 线的灰度强度进行数据分析。

1.3.7 LFIA 性能评价 灵敏度评价：配制一系列浓度的 ICP 溶液，用 LFIA 试纸条检测，以所得到的 T 线信号强度为 y 轴，ICP 浓度为 x 轴，建立标准曲线。检出限定义为阴性样品平均 T 线信号值加上 3 倍标准偏差的信号值所对应的 ICP 浓度^[24]。

特异性评价：通过测试 ICP 的结构类似物以评价 GO@BA-LFIA 的特异性，ICP 的质量浓度为 50 ng/mL，其他结构类似物的质量浓度为 500 ng/mL。

稳定性评价：将组装好的试纸条置于 55 °C 烘箱中储存，分别在第 1、3、5、7、9、11、13、15 天取出进行检测，并与未处理的试纸条进行对比，根据 T 线信号强度评估其储存稳定性。此外，用不同批次合成的探针进行阴性和阳性样本的检测，以此评估免疫探针稳定性。

1.3.8 实际样本检测 样品前处理：参照文献^[25]，将样品用破壁机均质化后，准确称量 5 g 样品于

50 mL 离心管中, 加入 10 mL 30% 甲醇溶液, 充分涡旋 5 min 后以 4000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 将上清液稀释后进行检测。

1.3.8.1 加标回收实验 针对不同的样本建立不同的标准曲线。向 5 g 经液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 确证的阴性样本添加 500、250、125 ng 的 ICP, 使其加标水平为 0.1、0.05、0.025 mg/kg, 用 GO@BA-LFIA 进行检测, 根据所建立的标准曲线, 计算回收率。同时按照 LC-MS/MS 方法对试纸条的结果进行验证, 每个添加浓度的样本平行测定 3 次。

1.3.8.2 比对实验 选取 10 个未知样本, 经前处理后得到样本液, 分别用于 GO@BA-LFIA 和 LC-MS/MS 法检测, 根据检测结果评估 GO@BA-LFIA 的准确性和可靠性。

LC-MS/MS 条件: ACE EXCEL 2 C18-PFP 色谱柱 (2.1 mm×150 mm)。进样体积: 3 μ L。流速: 0.2 mL/min。流动相 A: 0.1% 甲酸+1 mmol 乙酸铵水; 流动相 B: 乙腈。梯度洗脱, 洗脱程序为: 0~1 min: 30%~10%A; 1~3 min: 10%A; 3~3.1 min: 10%~30%A; 3.1~8 min: 30%A。

质谱参数: 多反应监测 (MRM); 电喷雾离子源; 喷雾器 15 psi; 离子源温度 300 $^{\circ}$ C; 喷雾电压 4 000 V; MRM 参数见表 1。

表 1 ICP 分析的 MRM 参数
Table 1 MRM parameters of ICP analysis

Compound	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Retention time/min	Collision energy /eV	Declustering potential/V
ICP	273	231	2.67	8	80
		121	2.67	20	80

2 结果与讨论

2.1 GO@BA 的合成与表征

GO@BA 复合材料的制备流程如图 1A 所示。首先通过油浴加热使 PEI 成功修饰于 GO 表面, PEI 分子中富含的可质子化的胺基为 GO 引入了大量正电荷, 随后在超声作用下通过静电吸附作用将带负电的 BA 纳米粒子负载于 PEI 化的 GO 上。如图 1B、C 所示, GO 表面成功负载了大量的纳米颗粒 BA。图 1D 所示, N 元素和 Au 元素均匀分布在 GO 的表面, 表明 PEI 成功修饰且 BA 纳米粒子均匀负载。图 1E 为 GO@BA 的 X 射线光电子能谱, 82.8 eV 处的 Au4f 特征峰也证实了金纳米粒子的负载。如图 1F 所示, BA、GO 和 GO@BA 的平均尺寸分别为 (77.4 \pm 1.1) nm、(405.6 \pm 21.4) nm 和 (633.6 \pm 29.6) nm, 尺寸的显著增加也间接证明了 GO@BA 复合材料的成功合成。

2.2 GO@BA 的光学性能评估

为评估 GO@BA 的荧光猝灭能力, 系统研究了其光学性质。如图 2A 所示, 未修饰的 GO 在 300~900 nm 波长范围内无明显吸收峰, PEI 修饰后 GO 的整体吸光度明显提升, 负载 BA 后, GO@BA 出现 640 nm 处的特征吸收峰。在 640 nm 波长下, 绘制了 GO@BA 的吸光度-浓度标准曲线 (图 2B), 计算得出 GO@BA 在此波长下的摩尔消光系数为 $2.376 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。在 RAIEFM 溶液中掺入不同浓度的 GO@BA, 测量荧光强度变化, 对其进行 Stern-Volmer 校准曲线拟合并计算 K_n 值 (图 2C)。结果表明, GO@BA 具有较高的荧光猝灭常数, K_n 为 $4.076 \times 10^9 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。GO@BA 具有良好的猝灭性能, 这是 PEI 修饰与高密度负载双重作用的结果。首先, PEI 修饰 GO 的过程中同时起到了还原作用 (酰胺化反应), 去除了部分氧官能团, GO 的 sp^2 区域恢复, $\pi-\pi^*$ 电子跃迁增强导致吸光度整体提升, 形成的 GO-NH₂ 也使得其在长波段 (超过 300 nm) 的吸收普遍增强^[26]。其次, BA 纳米粒子的高密度负载, 导致其间距显著减小、等离子耦合增强, 导致整体吸收强度提升^[27]。图 2A 显示 GO@BA 在 RAIEFM 的发射波长处有强吸收, 满足内滤效应的前提条件。其次, 图 2C 的 Stern-Volmer 曲线表现出严格线性。如图 2D 所示, 加入猝灭剂后荧光寿命无明显变化, 这表明 GO@BA 对 AIEFM 的猝灭机制主要为内滤效应。

2.3 GO@BA-LFIA 的构建

基于 GO@BA 优异的猝灭性能, 构建了用于 ICP 检测的荧光猝灭型 LFIA。如图 3A 所示, GO@BA 通过静电吸附与 ICP-mAb 偶联得到免疫探针 (GO@BA-mAb), 以实现 ICP 的特异性识别。将探针与待测液孵育 3 min 后, 加入 LFIA 加样孔中, 层析 15 min 后使用荧光读取仪记录结果。如图 3B 所示, 在

阴性样本中，GO@BA-mAb与T线上的ICP-BSA结合，从而猝灭T线处RAIEFM的红色荧光。而在阳性样本中，样本中的ICP与会与ICP-BSA竞争免疫探针上的mAb，使结合至T线的探针数量减少，因此T线的红色荧光得以保留，且其强度与ICP浓度呈正相关。

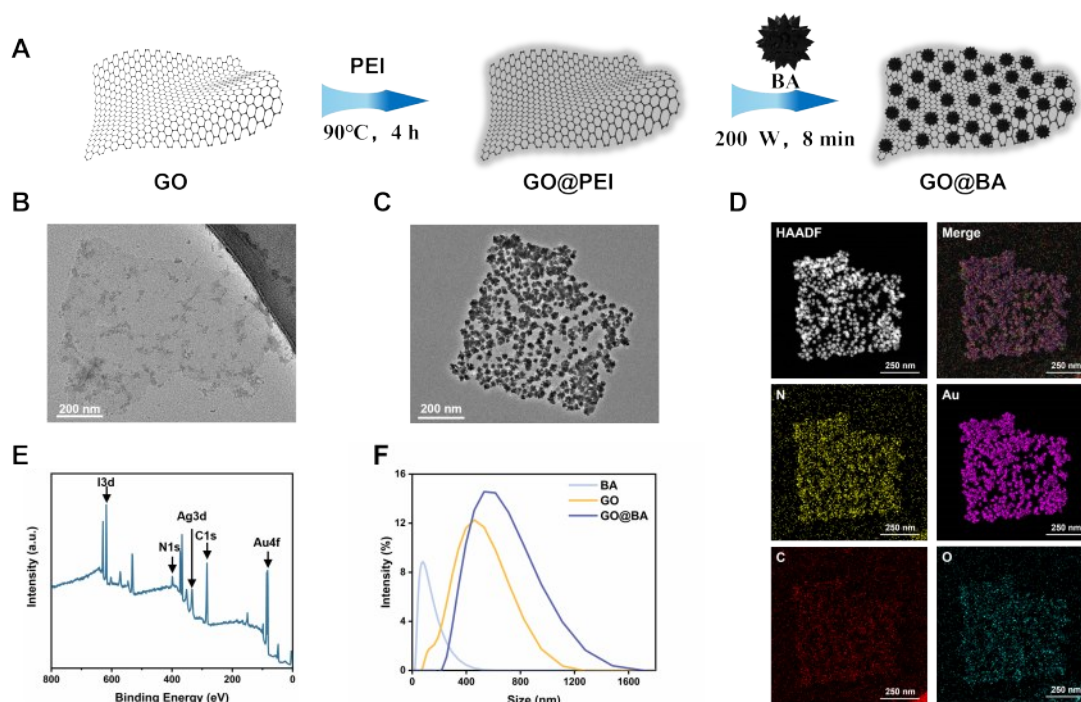


图1 GO@BA的合成与表征

Fig. 1 Synthesis and characterization of GO@BA

A. scheme of process for synthesizing GO@BA, B. TEM images of GO, C. TEM images of GO@BA; D. TEM-EDS elemental mappings of N, Au, C, and O elements from GO@BA, E. XPS spectrum of GO@BA, F. Size distributions of BA, GO, and GO@BA

2.4 GO@BA-LFIA的参数优化

基于阴性样本与阳性样本的T线荧光信号值进行参数优化。在阴性样本荧光被猝灭的前提下，以二者荧光信号差值(ΔF)最大为最优条件。优化了LFIA检测过程中抗体偶联体系的pH值(图4A)、单克隆抗体的用量(图4B)、T线喷涂ICP-BSA的质量浓度(图4C)、T线喷涂RAIEFM的质量浓度(图4D)和探针的用量(图4E)等关键参数。结果表明，GO@BA-LFIA的最优检测条件为抗体偶联体系pH 7.0、抗体用量为8 μg 、T线ICP-BSA喷涂质量浓度为0.5 mg/mL、T线RAIEFM喷涂质量浓度为0.16 mg/mL、探针用量为4 μL 。

2.5 LFIA检测ICP

在最优条件下，对3种LFIA方法(GO@BA-LFIA、RAIEFM-LFIA和AuNPs-LFIA)进行了性能比较。图5A为半定量检测ICP的试纸条实物图。如图5B~D所示，通过各自标准曲线计算得到3种方法的检出限与线性范围分别为：0.0063 ng/mL与0.20~6.25 ng/mL(GO@BA-LFIA)、0.0269 ng/mL与0.40~6.25 ng/mL(RAIEFM-LFIA)以及0.0472 ng/mL与1.25~25.00 ng/mL(AuNPs-LFIA)。结果表明，GO@BA-LFIA的灵敏度高，其检出限相较于传统的AuNPs-LFIA降低了7.5倍。

2.6 GO@BA-LFIA的性能评价

进一步评估了GO@BA-LFIA的特异性和稳定性。如图6A所示，该方法对ICP的其他结构类似物均无明显交叉反应，显示出良好的特异性。稳定性测试结果(图6B)表明，试纸条在55 $^{\circ}\text{C}$ 加速储存15天后，其检测性能未发生显著下降，表明具有良好的储存稳定性。如图6C所示，使用不同批次合成的探针进行阴性与阳性样本的检测，不同批次探针的信号值无明显差异，表明探针合成的批间稳定性良好。这主要归功于材料的稳定性和抗体偶联过程的稳定性。首先，PEI修饰消减了GO上大量的氧官能团，金纳米粒子的负载进一步遮蔽了其表面活性位点，使GO@BA能稳定存在。其次，GO@BA的Zeta

电位为 -23.7 mV ，能够很好地通过静电吸附偶联抗体。

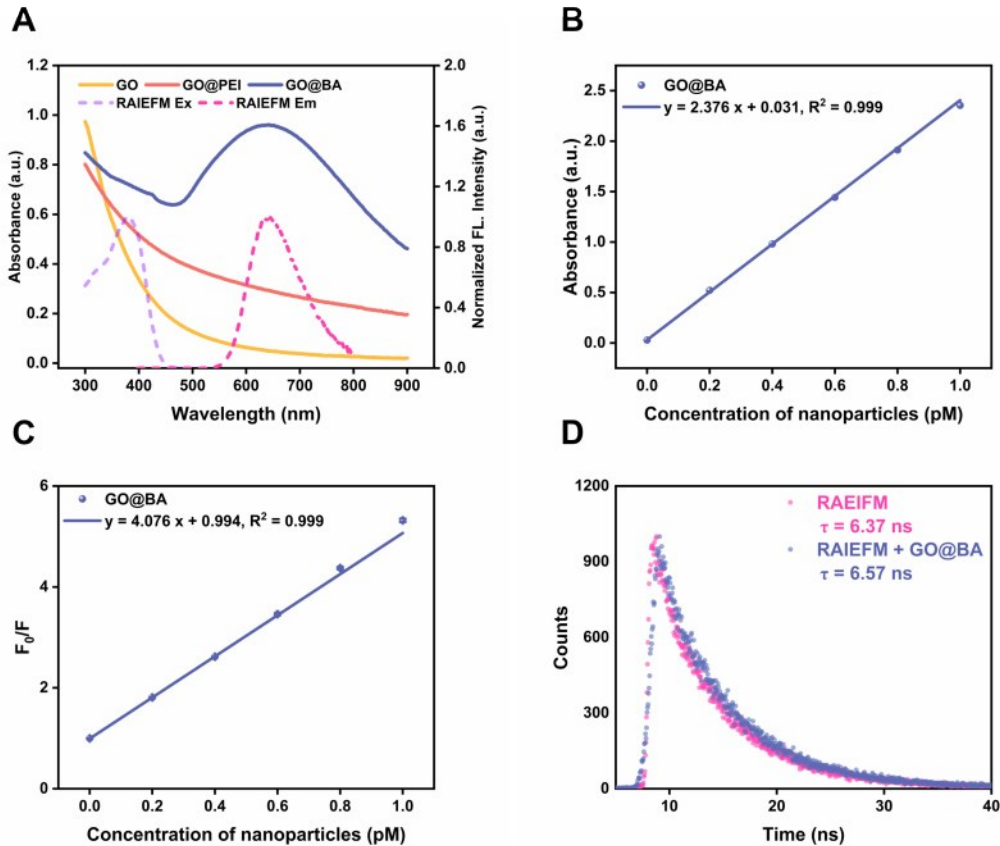


图2 GO@BA的光学性能评估

Fig. 2 Evaluation of optical performance of GO@BA

A. UV - Vis absorption spectra of GO, GO@PEI, and GO@BA, fluorescence excitation and emission spectra of RAEIFM; B. the linear relationship between the absorbance at 640 nm and particle concentration of GO@BA; C. Stern-Volmer calibration curves of GO@BA; D. fluorescence lifetimes of RAEIFM and RAEIFM + GO@BA

2.7 实际样品检测

为验证所建方法的实际应用能力，测定了黄瓜、青菜和枸杞中的ICP的残留量，并与LC-MS/MS的检测结果进行比对。加标回收实验结果如表2所示，GO@BA-LFIA在不同基质中的加标回收率为82.2~104%，相对标准偏差（RSD）不超过20%。本方法对青菜样品检测结果的稳定性有待进一步提高，其3个加标水平的相对标准偏差均偏高，可能是青菜样品色素含量过高带来的影响，可以考虑在前处理阶段加入乙二胺-N-丙基硅烷化硅胶（PSA）等吸附剂处理。比对实验结果如表3所示，GO@BA-LFIA与LC-MS/MS法检测结果的一致性良好。上述实验结果证明该方法能够有效克服复杂食品基质的干扰，具备在实际样品检测中应用的潜力。

3 结论

本研究成功基于GO平台制备了一种高效荧光猝灭剂GO@BA。在最佳工作条件下，方法对水胺硫磷的检出限为 0.0063 ng/mL 、线性范围为 $0.20\sim 6.25\text{ ng/mL}$ 。方法应用于实际样品检测的加标回收率为82.2~104%，相对标准偏差不超过20%，与液相色谱串联质谱法的检测结果相比具有良好的一致性。本研究不仅为ICP的现场快速检测提供了一种可靠的新方法，也为设计高性能荧光猝灭剂用于生物传感提供了新的思路与技术途径。

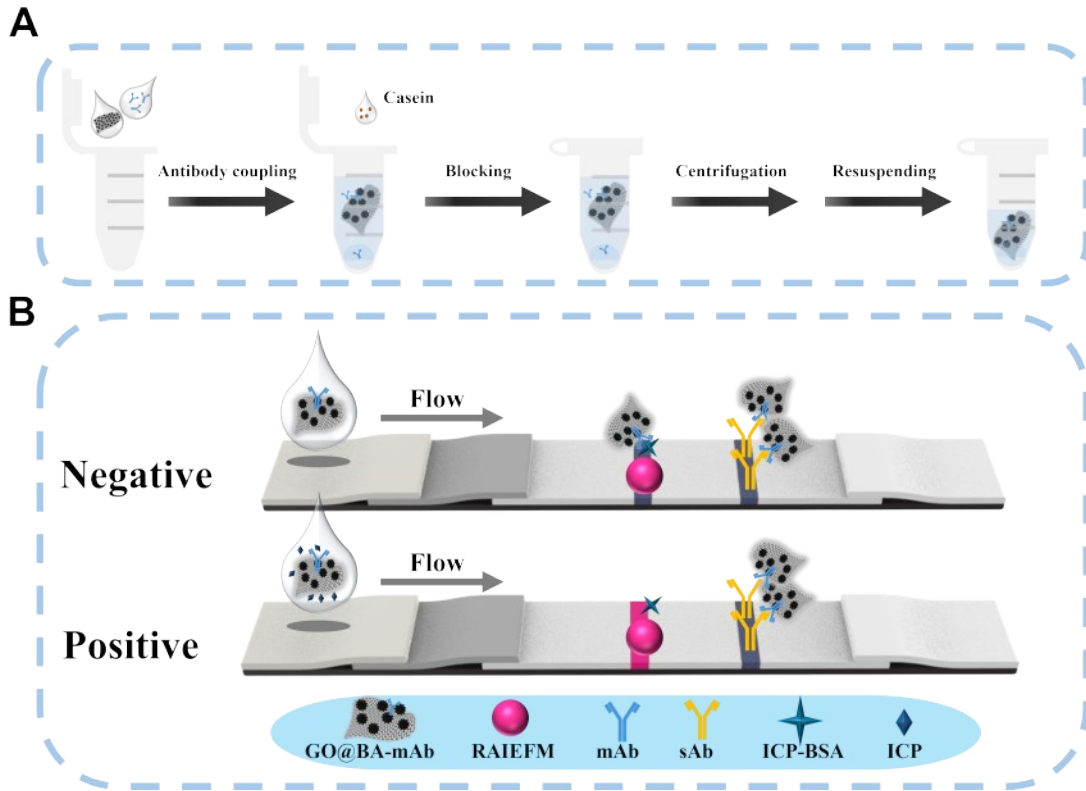


图3 GO@BA-LFIA 的构建

Fig. 3 Construction of GO@BA-LFIA

A. schematic of process for preparing GO@BA immunoprobes; B. schematic of detection principle for GO@BA-LFIA

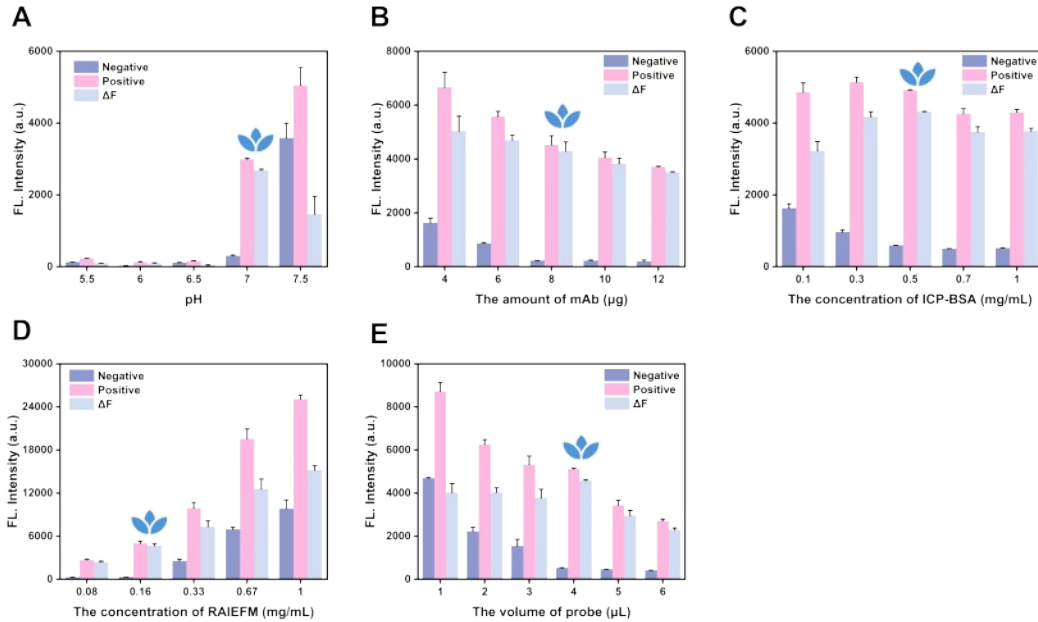


图4 GO@BA-LFIA 的参数优化

Fig. 4 Parameter optimization of GO@BA-LFIA

A. pH, B. the amount of mAb, C. the concentration of ICP-BSA sprayed on the T line, D. the concentration of RAIEFM sprayed on the T line, E. the volume of probe; values were expressed as mean±SD, n=3

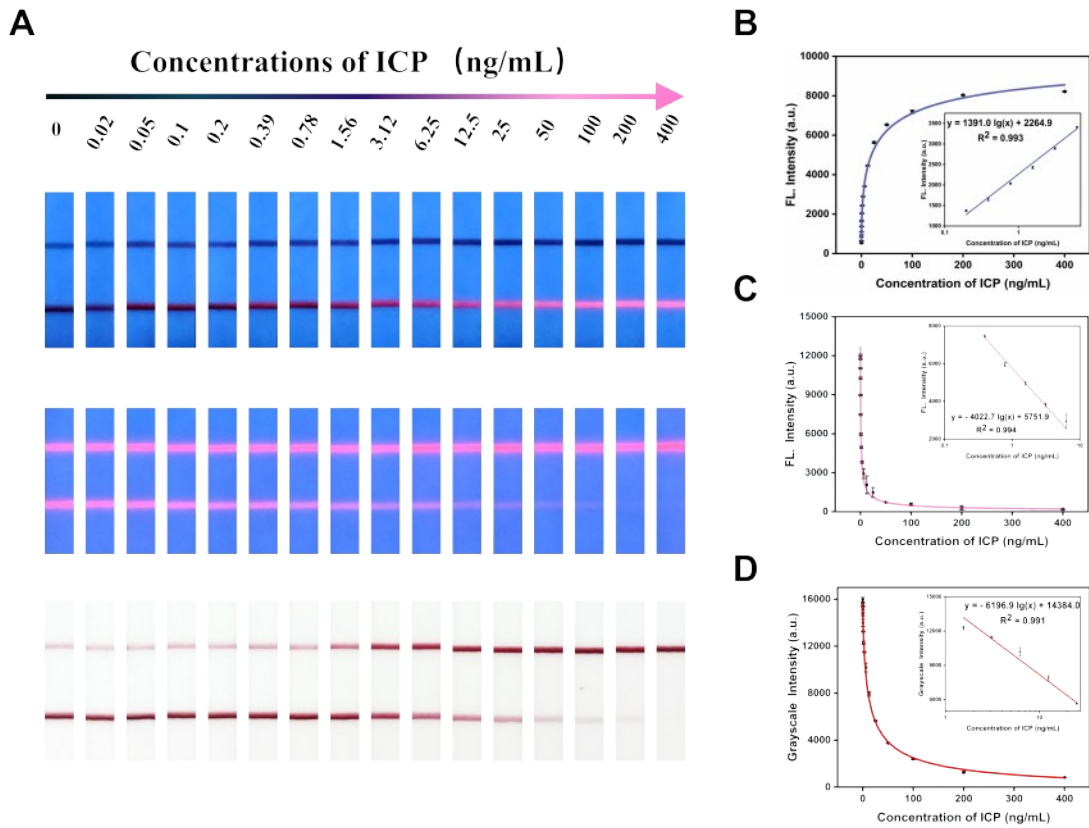


图5 LFIA对ICP的检测

Fig. 5 Detection of ICP through LFIA

A. photographs of reacted GO@BA-LFIA, RAIEFM-LFIA, and AuNPs-LFIA, regression analysis curves and linear relationship curves (insert) of (B) GO@BA-LFIA and (C) RAIEFM-LFIA, D. AuNPs-LFIA; values were expressed as mean \pm SD, n=3

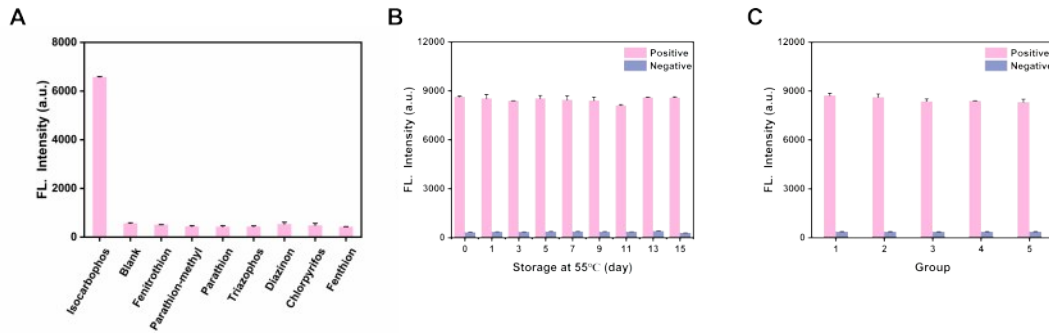


图6 GO@BA-LFIA的性能评价

Fig. 6 Performance evaluation of GO@BA-LFIA

A. specific experiment, B. storage stability experiment, C. synthetic stability experiment of probe of GO@BA-mAb; values were expressed as mean \pm SD, n=3

表2 样品加标回收实验结果 (n=3)

Table 2 Results of sample spiked recovery experiments (n=3)

Sample	Spiked/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	GO@BA-LFIA			LC-MS/MS		
		Measured value (Mean \pm SD) / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/%	Measured value (Mean \pm SD) / ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Recovery/%	RSD/%
Cucumber	25	23.18 \pm 1.87	92.7	7.5	23.33 \pm 1.01	93.3	4.0
	50	46.36 \pm 1.32	92.7	2.7	47.28 \pm 1.48	94.6	3.0
	100	101.50 \pm 5.39	102	5.4	96.94 \pm 4.15	96.9	4.2
Chinese cabbage	25	20.93 \pm 1.96	83.7	7.9	23.06 \pm 2.55	92.2	10
	50	47.34 \pm 9.17	94.7	18	49.48 \pm 4.33	99.0	8.7
	100	103.96 \pm 14.53	104	15	100.85 \pm 4.36	101	4.4
Wolfberry	25	20.56 \pm 2.48	82.2	9.9	23.26 \pm 1.16	93.0	4.7
	50	41.78 \pm 2.49	83.6	5.0	42.69 \pm 3.66	85.4	7.3
	100	91.75 \pm 12.01	91.8	12	85.47 \pm 3.96	85.5	4.0

表3 GO@BA-LFIA 和 LC-MS/MS 对 10 个样本的检测结果

Table 3 Detection results of 10 samples by GO@BA-LFIA and LC-MS/MS

Samples number	Detected by GO@BA-LFIA/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)	Detected by LC-MS/MS/ ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)
1	40.56	44.72
2	ND	ND
3	ND	ND
4	ND	ND
5	26.89	30.45
6	ND	ND
7	ND	ND
8	ND	ND
9	ND	ND
10	ND	ND

ND: not detected

参考文献:

- [1] Chen Z J, Xu Y P, Li N, Qian Y Z, Wang Z J, Liu Y. *Food Control*, **2019**, 104: 34-41.
- [2] GB 2763-2021. *National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits for Pesticides in Food. National Standards of the People's Republic of China* (食品安全国家标准-食品中农药最大残留量. 中华人民共和国国家标准).
- [3] Liu H. *Vegetables* (刘航. 蔬菜), **2017**, 10: 64-68.
- [4] Teng R J, Wang H, Wang X M, Su J Q, Feng L J, Lu X Q. *Chin. J. Anal. Chem.* (滕瑞菊, 王欢, 王雪梅, 苏加强, 冯丽娟, 卢小泉. 分析化学), **2017**, 45 (2): 275-281.
- [5] Zhao L L, Zhang X N, Li X J, Pan S Y. *J. Huazhong Agric. Univ.* (赵丽丽, 张雪娜, 李秀娟, 潘思轶. 华中农业大学学报), **2018**, 37 (6): 98-104.
- [6] Lu Z H, Yu L F, Cai D P, Li C. *Food Mach.* (陆振华, 于丽芳, 蔡丹萍, 李成. 食品与机械), **2022**, 38 (10): 55-60.
- [7] Zhao P F, Lei S, Xing M M, Xiong S H, Guo X J. *J. Sep. Sci.*, **2018**, 41 (6): 1287-1297.
- [8] Lee B, Park B, Kim D, Jung C, Park J H, Park J-H, Lee Y E, Shin M G, Kim M G, Yu N E, Kim J H, Kim K. *Nat. Commun.*, **2025**, 16 (1): 3377.
- [9] Li Y L, Liu Z W, Luo H W, Tang Y, Pan L W, Zhang S W, Huang X A, Wen J X, Chen J H, Lei H T. *J. Hazard. Mater.*, **2025**, 489: 137700.
- [10] Younes N, Yassine H M, Kourentzi K, Tang P, Litvinov D, Willson R C, Abu-Raddad L J, Nasrallah G K. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2023**, 64 (27): 9910-9932.
- [11] Liu S J, Liao Y J, Zhang Y N, Shu R, Zhang M R, Luo X, Sun C Y, Dou L N, Luo L P, Sun J, Zhang D H, Zeng L T, Wang J L. *Small*, **2023**, 19 (43): 2301598.
- [12] Bian L, Fu Q Q, Gan Z H, Wu Z, Song Y C, Xiong Y F, Hu F, Zheng L. *Adv. Sci.*, **2023**, 11 (4): 2305774.
- [13] Wang J P, Wang X Y, Yang Y, Zhou X Y, Dai Z H, Hao P Y, Han G M, Yao J Y, Yu X P, Ye Z H. *Biosens. Bioelectron.*, **2025**, 279: 117379.
- [14] Zhang G G, Xu S L, Xiong Y H, Duan H, Chen W Y, Li X M, Yuan M F, Lai W H. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 135: 173-180.
- [15] Yazhini C, Rafi J, Chakraborty P, Kapse S, Thapa R, Neppolian B. *J. Clean. Prod.*, **2022**, 373: 133929.
- [16] Nishina Y. *ACS Nano*, **2024**, 18 (49): 33264-33275.
- [17] Tang P P, Deng Z M, Zhang Y, Liu L X, Wang Z G, Yu Z Z, Zhang H B. *Adv. Funct. Mater.*, **2022**, 32

- (28): 2112156.
- [18] Tran B N, Fadil Y, Yao Y, Agarwal V, Zetterlund P B. *RSC Appl. Interfaces*, **2025**, 2 (5): 1248–1258.
- [19] Wang C W, Shen W Z, Li Z K, Xia X, Li J X, Xu C Y, Zheng S, Gu B. *ACS Nano*, **2024**, 18 (37): 25865–25879.
- [20] Wang C W, Yu Q, Zheng S, Shen W Z, Li J X, Xu C Y, Gu B. *ACS Nano*, **2024**, 18 (26): 16752–16765.
- [21] Chen Z Y, Yu S, Huang S J, Zhang W, Guo P, Peng J, Xiong Y H, Ma B F, Lai W H. *Chem. Eng. J.*, **2025**, 503: 158571.
- [22] Shao L S, Li J J, Guang Y, Zhang Y L, Zhang H, Che X Y, Wang Y H. *Mater. Des.*, **2016**, 99: 235–242.
- [23] Zhang G, Huang Z, Hu L W, Wang Y M, Deng S L, Liu D F, Peng J, Lai W H. *ACS Nano*, **2023**, 17 (23): 23723–23731.
- [24] Fang B L, Hu S, Wang C, Yuan M F, Huang Z, Xing K Y, Liu D F, Peng J, Lai W H. *Food Control*, **2019**, 98: 268–273.
- [25] Ding Y, Qin S, Liu W M, Wang M H, Hua X D. *J. Instrum. Anal.* (丁园, 秦爽, 刘伟美, 王鸣华, 华修德. 分析测试学报), **2021**, 40 (5): 662–671.
- [26] Krasteva N, Shkodrova M, Keremidarska–Markova M, Doncheva–Stoimenova D, Hristova–Panusheva K, Mishonova M, Chichova M. *Int. J. Bioautom.*, **2024**, 28 (1): 45–58.
- [27] Chen J, Gong M, Fan Y, Feng J, Han L, Xin H L, Cao M, Zhang Q, Zhang D, Lei D, Yin Y. *ACS Nano*, **2022**, 16 (1): 910–920.

(责任编辑: 盛文彦)