

荧光侧流免疫层析法检测谷物制品中 黄曲霉毒素B1

刘 恋, 肖小华*, 李攻科*

(中山大学 化学学院, 广东 广州 510006)

摘要: 基于特异性单克隆抗体, 通过系统优化标记抗体pH值、抗体用量、包被抗原浓度等关键参数, 并将探针预包被于共轭垫, 建立了一种基于时间分辨荧光微球(TRFM)标记的侧流免疫层析方法(TRFM-LFIA), 用于谷物中黄曲霉毒素B1(AFB1)的快速检测, 该法包含样品制备在内的总检测时间为10 min。结果表明: 在最优条件下, 所建立的TRFM-LFIA方法对AFB1的线性范围为0.05~10.00 $\mu\text{g/L}$, 纯缓冲溶液中检出限(LOD)为 $1.30 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$ 。与赭曲霉毒素A、伏马毒素B1等4种常见霉菌毒素无明显交叉反应, 且与同位素稀释液相色谱-串联质谱标准方法结果相吻合($r^2=0.9918$)。该方法具有快速、灵敏、准确等优点, 适用于谷物制品中AFB1的现场高通量筛查, 为食品安全风险监控提供了有力的技术支持。

关键词: 黄曲霉毒素B1; 快速检测; 谷物; 荧光侧流免疫层析; 时间分辨荧光微球

中图分类号: O657.38 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2026)10-2179-08

Fluorescent Lateral Flow Immunoassay Test Strip for Aflatoxin B1 in Cereal Products

LIU Lian, XIAO Xiao-hua*, LI Gong-ke*

(School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: To meet the demand for rapid on-site screening of aflatoxin B1 (AFB1) in cereal products, a time-resolved fluorescent microsphere-based lateral flow immunoassay (TRFM-LFIA) technique was developed using a specific monoclonal antibody. Key experimental parameters, including the pH for antibody labeling, antibody concentration, and coating antigen concentration, were optimized systematically. The fluorescent microsphere-labeled antibody probe was pre-coated onto the conjugate pad, enabling rapid detection of AFB1 in cereals within 10 min, including sample preparation. Under the optimized conditions, the proposed TRFM-LFIA exhibited a linear detection range of 0.05–10.00 $\mu\text{g/L}$ for AFB1, with a limit of detection (LOD) of $1.30 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$ in buffer solution. No significant cross-reactivity was observed with four common mycotoxins, including ochratoxin A and fumonisin B1. The results obtained using the method proposed herein were in good agreement with those obtained using the isotope dilution liquid chromatography–tandem mass spectrometry reference method, with a coefficient of determination of 0.9918. Owing to its rapidity, sensitivity, and accuracy, the developed TRFM-LFIA technique is suitable for application in on-site, high-throughput screening of AFB1 in cereal products and provides robust technical support for food safety risk monitoring.

Key words: aflatoxin B1; rapid detection; grain products; fluorescent lateral flow immunoassay; time-resolved fluorescent microspheres

谷物类制品作为全球范围内最重要的基础粮食, 其质量安全直接关系到国计民生与消费者健康。然而, 谷物在种植、仓储及加工过程中极易受到霉菌及其代谢物污染^[1]。其中, 黄曲霉毒素B1(AFB1)性质稳定, 常规加工难以有效去除, 可通过食物链在人体内富集, 引发急性或慢性中毒, 并对肝、肾、

收稿日期: 2026-03-08; **修回日期:** 2026-04-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22376225, 22576240, 22134007); 广州市科技计划项目(2024B03J1386); 广东省重点领域研发计划项目(2025B0202120004); 中山大学中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(XJYL2602)

* **通讯作者:** 李攻科, 博士, 教授, 研究方向: 复杂样品分离分析, E-mail: cesgkl@mail.sysu.edu.cn

肖小华, 博士, 教授, 研究方向: 复杂样品分离分析, E-mail: xiaoxhua@mail.sysu.edu.cn

网络首发日期: 2026-08-07

免疫及神经系统造成严重损害^[2-3],被世界卫生组织国际癌症研究机构列为I类致癌物^[4]。

为保障粮食安全与消费者健康,世界各国均对谷物及其制品中的霉菌毒素残留量设立了严格的限量标准。我国《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》(GB 2761-2022)^[5]明确规定,在谷物及其制品中 AFB1 的限量应小于 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此,建立快速、灵敏、准确的检测方法,对谷物及其制品进行高效监控,对于从源头控制霉菌毒素风险具有至关重要的意义。

目前, AFB1 的检测方法主要包括液相色谱法^[6]、液相色谱-质谱联用法^[7-8]等仪器分析方法。这些方法虽具有高灵敏度与高准确度的优点,但存在前处理复杂、仪器昂贵、检测周期长等局限性,难以满足现场、大批量样品的快速筛查需求。同时,在全球可持续发展和环境保护目标的推动下,绿色和可持续的检测策略需求量增大^[9]。基于抗原-抗体特异性反应的免疫层析技术,无需标记或使用纳米标记物替代有毒试剂^[10],在实现快速检测的同时减少了有机溶剂的使用,特别是侧流层析免疫分析法(LFIA),以其快速、简便、成本低、便于携带^[11]等优势,成为实现现场快速检测的理想绿色检测技术。

针对 AFB1 的现场快速检测,市场上已有基于胶体金免疫层析、荧光标记物免疫层析及酶联免疫吸附的各类产品。其中,胶体金试纸条操作简便,但灵敏度普遍在 1~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平,难以满足痕量筛查需求;酶联免疫吸附试剂盒灵敏度较高,可达 0.1~1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,但操作步骤繁琐、需多次孵育洗涤,检测时间通常在 1 h 以上。近年来,基于荧光标记物的新型免疫层析产品逐步涌现,配合专用读数仪,灵敏度可较胶体金法提高 1~2 个数量级,同时保留了操作快速简便的优势。其中,时间分辨荧光微球具有较长的荧光寿命以及可通过时间和波长分辨消除背景荧光干扰^[12-13]的优点,是理想的发光标记物,可应用于 LFIA 提高方法灵敏度。聚苯乙烯纳米微球封装铕离子(Eu(III))制得的时间分辨荧光微球,其表面可实现多种官能团修饰以提高抗体标记效率^[14],且 Eu 在紫外光照射下可发射深红色荧光,拥有更窄的发射峰,有利于减少非特异性荧光背景干扰,常被用作抗体标记物。

目前,多数 LFIA 的操作流程为先孵育后检测。孵育步骤有利于抗原与抗体在液相中充分反应,可显著提升检测灵敏度与准确性,尤其在低浓度目标物或复杂样本基质中表现更为稳定。然而,孵育过程通常需 15~30 min,孵育后仍需 15~20 min 达到免疫反应平衡,限制了其在现场筛查中的应用。

本研究使用羧基改性 Eu(III)-螯合物掺杂的聚苯乙烯纳米微球(TRFM)作为标记探针,设计了一种用于谷物中 AFB1 检测的时间分辨荧光微球免疫层析(TRFM-LFIA)试纸条,将孵育步骤改为预喷涂探针至共轭垫并集成至试纸条上,使孵育过程与免疫反应过程在层析过程中同步进行,有效缩短了检测时间(图1)。本研究对 TRFM-LFIA 进行了系统优化,并对其线性范围、检出限(LOD)、特异性、重复性、稳定性和回收率进行了评价。

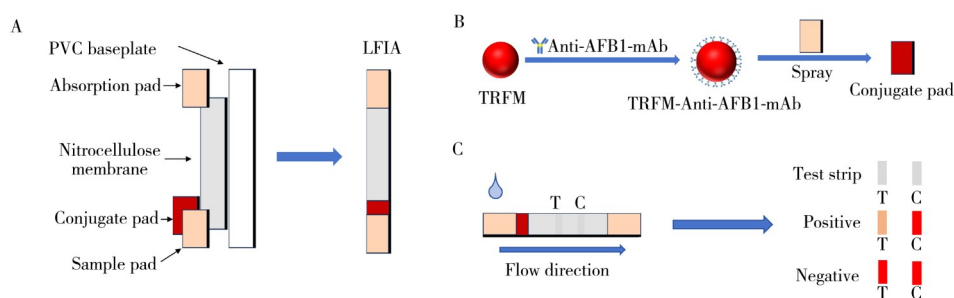


图1 TRFM-LFIA 示意图(A)、预喷涂步骤(B)和检测过程(C)

Fig. 1 Schematic of TRFM-LFIA (A), pre-coating step (B) and its detection process (C)

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

XYZ3050 点线划膜仪、荧光读数仪均购于上海金标公司;低温高速离心机购于德国 Eppendorf 公司;涡旋振荡器购于德国 IKA 公司。

硝酸纤维素(NC)膜、聚氯乙烯(PVC)底板、玻璃纤维、吸水垫购于扬州宇凡生物科技公司;羧基改性 Eu(III)-螯合物掺杂的聚苯乙烯纳米球(固含量 1% w/v, 激发波长 360 nm, 发射波长 615 nm, 粒径

200 nm)购于苏州为度生物科技公司;羊抗鼠二抗(IgG)购于上海Abcam试剂公司;AFB1小鼠抗体购于佛山牧斯研生物科技公司;黄曲霉毒素B1(纯度98%)、proclin 300购于上海Macklin试剂公司;Tween 20、海藻糖二水合物、蔗糖、聚乙二醇20000(PEG-20000)、磷酸盐缓冲液(PBS)购于上海Beyotime试剂公司;2-吗啉乙磺酸(MES)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、硼砂、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)购于上海Aladdin生化科技公司;牛血清白蛋白(BSA)购于上海生工生物工程公司;其余试剂均为分析纯级。大米、食用油、面粉均购于周边市场。

1.2 实验方法

1.2.1 TRFM标记抗体探针(TRFM-mAb)制备 取0.1 mL TRFM加入0.9 mL 0.10 mol/L MES溶液,涡旋1 min分散,在4℃下13 000 r/min离心20 min。沉淀用1.0 mL 0.10 mol/L MES溶液重悬,超声1 min,加入0.2 mL 0.10 mol/L EDC溶液和0.1 mL 0.10 mol/L NHS溶液,室温反应30 min。将反应液在4℃下13 000 r/min离心20 min,沉淀用1.0 mL 0.10 mol/L MES溶液重悬,超声1 min,得到活化的TRFM。取1.0 mL活化的TRFM加入1.0 mL抗体溶液,室温轻搅2 h。加入25.0 μL 10wt% BSA,室温搅拌1 h封闭未反应位点。将反应液在4℃下13 000 r/min离心10 min,沉淀用1.0 mL含0.5wt% BSA、1wt%蔗糖、0.5wt%聚乙二醇、0.05wt%硼砂的0.01 mol/L PBS缓冲液重悬,超声。重复离心洗涤3次。最终用洗涤液重悬至1.0 mL,4℃避光保存备用。

1.2.2 TRFM-LFIA制备 使用XYZ3050点膜平台,在NC膜上同时喷印AFB1-OVA和IgG作为检测线(T)和质控线(C),相邻两直线间距3.5 mm,45℃恒温干燥12 h。将样品垫浸泡于含1%(体积分数)Tween 20、1wt%蔗糖的0.01 mol/L PBS缓冲液中20 min,45℃恒温干燥12 h。将共轭垫浸泡于含3wt%蔗糖、3wt%海藻糖二水合物、1%(体积分数)proclin 300、3wt% NaCl的0.10 mol/L Tris-HCl溶液中20 min,45℃恒温干燥12 h。将NC膜粘贴于PVC底板中部,与NC膜一侧重叠2.0 mm粘贴吸水垫,与NC膜另一侧重叠2.0 mm粘贴共轭垫,再与共轭垫重叠2.0 mm粘贴样品垫。切割成4.0 mm宽试纸条,密封于干燥铝箔袋中,4℃下避光保存。

1.2.3 TRFM-LFIA系统优化 偶联抗体pH值:调节TRFM偶联抗体pH值分别为6.0、7.0、8.0、9.0、10.0,考察最佳偶联抗体pH值。

偶联抗体量:将TRFM分别与质量浓度为0.01、0.02、0.05、0.10、0.20 mg/mL的AFB1抗体进行偶联,考察最佳偶联抗体量。

包被抗原浓度:分别选用质量浓度0.01、0.02、0.05、0.08 mg/mL的AFB1-OVA进行NC膜喷涂,考察最佳包被抗原浓度。

免疫反应时间:以温度为变量,分别在室温(空调控温实验室室温,25℃)、40、45℃下每2 min读取信号,30 min后每30 min读取1次。通过考察T值与抑制率得到最佳免疫反应温度及时间。在室温条件下改变试纸条工艺,以3.00 μL/cm的喷量将TRFM-mAb探针喷涂至共轭垫上,37℃恒温干燥12 h后组装进试纸条中,每1 min读取1次信号,通过考察T值与抑制率得到最佳免疫反应时间。

其中抑制率按下式计算:

$$\eta/\% = \frac{FI_T/FI_C(\text{阴性}) - FI_T/FI_C(\text{阳性})}{FI_T/FI_C(\text{阴性})} \times 100\% \quad (1)$$

式中, η 为抑制率, FI_T 为T线荧光信号, FI_C 为C线荧光信号。

工艺改良前检测步骤为:将待测液使用含5wt% BSA的0.02 mol/L PBS缓冲液以体积比1:3稀释后,取80.0 μL与1.0 μL TRFM-mAb混合孵育15 min后滴涂至样品垫上,反应20 min后进行信号读取;工艺改良后检测步骤为将待测液使用含5wt% BSA的0.02 mol/L PBS缓冲液以1:3体积比稀释后滴涂80.0 μL至样品垫上,反应5 min后读取信号。

1.2.4 TRFM-LFIA性能评价 灵敏度评价:在最优检测条件下,通过0.02 mol/L PBS缓冲液稀释配制0、0.05、0.10、0.50、1.00、3.00、10.00 μg/L的AFB1标准溶液并测定其对应的T、C线信号,以阳性样本与阴性样本T/C值的比值($FI_{(T/C1)}/FI_{(T/C0)}$)为纵坐标,AFB1浓度(c_{AFB1})为横坐标绘制散点图,使用Logistic四参数拟合法得到标准曲线。测定20个空白样本的T、C线信号,结合下式进行LOD的计算:

$$FI_{LOD} = \mu_{\text{空白}} - 3\sigma_{\text{空白}} \quad (2)$$

式中, $\mu_{\text{空白}}$ 为 20 个空白样本 T/C 值的算术平均值, $\sigma_{\text{空白}}$ 为 20 个空白样本 T/C 值的标准偏差。

将计算所得 FI_{LOD} 代入所得标准曲线换算得到方法检出限。

特异性评价: 选取赭曲霉毒素 A(OTA)、伏马毒素 B1(FB1)、玉米赤霉烯酮(ZEN)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)4 种常见的可能与 AFB1 共存的霉菌毒素, 使用 0.02 mol/L PBS 进行稀释后检测, 通过该 4 种毒素在与 AFB1 处于相同浓度水平时的抑制率评价 TRFM-LFIA 特异性。

抗干扰性评价: 选取质量分数 1% 的 NaCl、KCl、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 、蔗糖、BSA、精氨酸、赖氨酸以及质量浓度 2.50 mg/L 的 Cr(VI)、Pb(II) 分别作为无机盐、有机物、蛋白质、氨基酸、重金属干扰物, 使用 0.02 mol/L PBS 稀释配制质量浓度为 1.00 $\mu\text{g/L}$ 的 AFB1 标准溶液进行回收率实验, 对 TRFM-LFIA 的抗干扰性进行评价。

稳定性评价: 平行制备 11 批 TRFM-LFIA, 通过 T 线信号变化评估其批间稳定性; 将制得的 TRFM-LFIA 装入干燥铝箔袋中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存, 分别于第 1、3、7、14、30 d 取出进行检测, 观察其显色情况, 使用 T/C 值评价 TRFM-LFIA 的日内与日间稳定性。

1.2.5 实际样品检测 取谷物类样品(面粉、大米共 18 个, 大米样品需粉碎后过筛)10.0 g, 用 20.0 mL 70%(体积分数)甲醇溶液提取, 涡旋 3 min 后静置 1 min, 取上清液用 0.22 μm 滤膜过滤作为待测液。

分别采用建立的 TRFM-LFIA 方法与 GB 5009.22-2016《食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》^[15] 中的同位素稀释液相色谱-串联质谱法进行检测, 并对两种方法检测结果一致性进行确证分析。

对 18 个谷物类样本进行 1:1 含量水平加标, 经上述前处理步骤提取后使用 TRFM-LFIA 进行检测, 通过平均加标回收率及相对标准偏差(RSD)对准确度进行评价。

2 结果与讨论

2.1 探针表征与鉴定

如图 2A 所示, 在 312 nm 激发波长下于 400~650 nm 波长范围内进行 TRFM 及 TRFM-mAb 的发射光谱测定, 其最大发射波长均为 612 nm, 说明偶联 AFB1 抗体后, TRFM 仍保留了荧光特性, 由于抗体占据 TRFM 表面的羧基位点, 荧光强度有所下降^[16]。 ζ 电位反映了分散相在介质中的稳定程度, 由图 2B 可知, $\zeta_{\text{TRFM}} = -72.49 \text{ mV}$, 说明 TRFM 分散稳定良好, 不易聚凝。而偶联 AFB1 抗体后, $\zeta_{\text{TRFM-mAb}} = -88.28 \text{ mV}$, ζ 电位绝对值进一步变大, 其原因是抗体分子在 pH 7.0 条件下整体带负电, TRFM 上的羧基被 EDC 和 NHS 活化形成琥珀酸, 琥珀酸与抗体上的氨基发生共价反应, 形成稳定的酰胺键^[17], 增加了微球表面的净负电荷密度; 同时抗体作为大分子蛋白, 在微球表面形成较厚的水化层, 导致剪切面外移, 使实测 ζ 电位绝对值升高; 另外探针重悬液中含有 0.05 wt% 硼砂, 硼砂在水溶液中水解产生 $B(OH)_4^-$, 可能进一步吸附于微球表面或与抗体糖链形成硼酸酯结构, 增强表面负电性。由图 2C、D 可知, TRFM 及 TRFM-mAb 粒径约为 200 nm, 且 TRFM-mAb 外层有不规则突起, 证明 AFB1 抗体成功偶联。

2.2 TRFM-LFIA 系统优化

2.2.1 偶联抗体 pH 值 TRFM 在强酸或强碱性条件下易发生聚沉^[16], 随着 pH 值的增大, 所制得 TRFM-LFIA 的 T/C 值逐渐上升, 而抑制率在 pH 7.0 下达到峰值后又逐渐降低, 如图 3A 所示。综合考虑 T/C 值及抑制率, 为保证在较高 T/C 值的同时有较高抑制率, 选取 pH 7.0 作为 TRFM 的最优偶联 pH 值。

2.2.2 偶联抗体量 适当的抗体偶联量可实现良好荧光强度, 但抗体过量时会因空间位阻^[18] 导致偶联效果不佳且与目标物的反应也受影响。由图 3B 可知, 在使用 TRFM 进行抗体偶联时, T/C 值与抑制率随抗体浓度增加逐渐上升; 当超过 0.05 mg/L 时, T/C 值无显著变化, 抑制率出现下降, 说明抗体与 TRFM 的结合已接近饱和。故选取 0.05 mg/L 作为荧光微球的最优抗体标记浓度。

2.2.3 包被抗原浓度 在免疫层析反应中, 包被抗原浓度过低时荧光信号也会过低, 造成较大读数误差, 若包被浓度过高, 则对低含量水平 AFB1 的检测不敏感, 降低方法灵敏度^[19]。由图 3C 可知, 当 AFB1-OVA 质量浓度为 0.05 mg/mL 时, TRFM-LFIA 的 T/C 值较高, 同时抑制率也达到峰值, 故选取

0.05 mg/mL 为最佳包被抗原浓度。

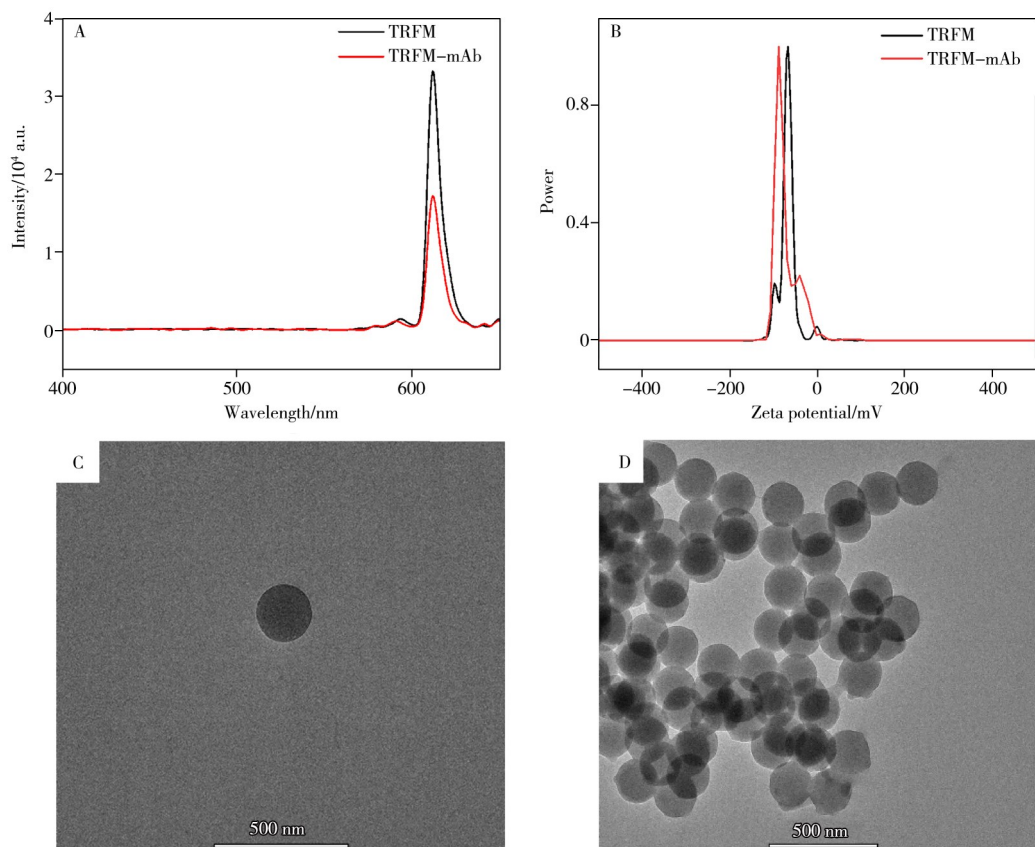


图2 TRFM/TRFM-mAb的荧光发射光谱图(A)和 ζ 电位图(B), TRFM(C)和TRFM-mAb(D)的透射电镜图
Fig. 2 Fluorescence emission spectra(A), zeta potential results(B) of TRFM and TRFM-mAb, transmission electron micrographs of TRFM(C) and TRFM-mAb(D)

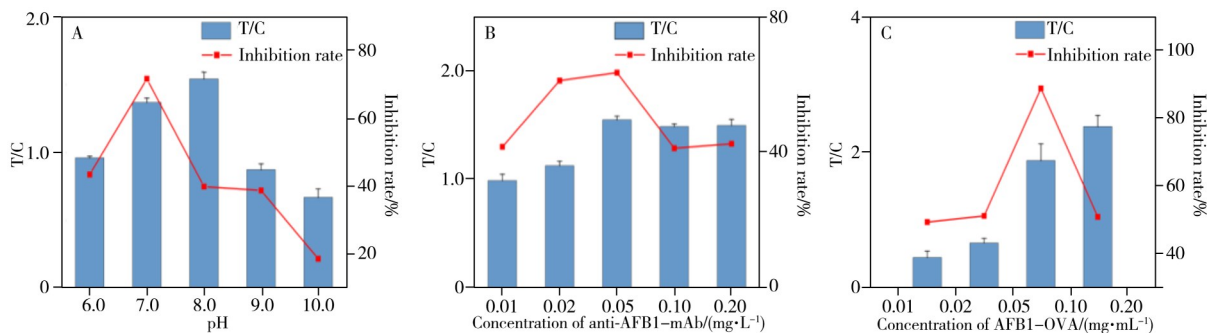


图3 抗体标记pH值(A)、抗体标记浓度(B)、包被抗原浓度(C)对TRFM-LFIA性能的影响
Fig. 3 Effects of antibody labeling pH(A), antibody labelling concentration(B), envelope antigen concentration(C) on TRFM-LFIA performance

2.2.4 免疫反应时间 由图4A可知,在一定温度范围内, T线信号随温度上升而上升,且达到稳定所需时间缩短。这是因为在一定温度范围下,温度升高会加速抗原-抗体的结合反应,有利于反应充分进行。相同时间下随着温度升高,未结合待测液中 AFB1 的 TRFM-mAb 与包被抗原反应更充分,导致 T 线荧光信号增强; TRFM-LFIA 的检测基于毛细层析作用进行,随着温度的上升,液体黏度下降,在毛细介质中的流动速度上升,达到反应平衡的时间缩短。

考虑到温度升高同样会使非特异性结合增强,导致背景荧光增强,且液体蒸发速率加快,可能改变膜上的液体流动和反应浓度,在室温条件下对试纸条工艺进行改良,将 TRFM-mAb 提前喷涂至共轭垫上并组装进入试纸条。由图4B可看出,改良后免疫反应达到稳定所需时间可缩短至 5 min 内。这是因为,在预混合方式中探针分子连同待测液一同滴涂至样品垫上,探针分子扩散路径更长,且与待测

液中的 AFB1 结合后形成更大的复合物, 在通过多孔网状结构时受到的摩擦阻力与空间位阻更大; 而预喷涂方式在待测液流经共轭垫瞬间即复溶并携带干燥的探针分子开始迁移, 路径更短且能更快爬升至 NC 膜区域开始反应。

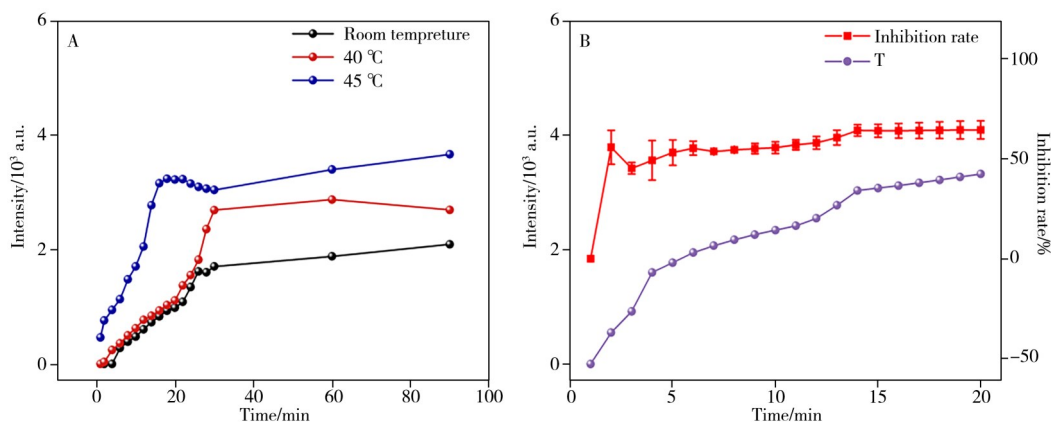


图4 不同温度下(A)及预喷涂共轭垫后室温下(B)的最佳检测时间优化结果

Fig. 4 Results of optimizing detection time at different temperatures (A) and at room temperature after pre-spraying conjugated pads (B)

2.3 TRFM-LFIA 性能评价

2.3.1 灵敏度 在TRFM-LFIA 最优检测条件下, 配制一系列梯度浓度的 AFB1 标准溶液绘制标准曲线, 以确定TRFM-LFIA (预包被) 检测 AFB1 的灵敏度, 如图 5A 所示。标准曲线拟合方程为 $FI_{(T1/C1)}/FI_{(T0/C0)} = -0.04112 + 1.074/[1 + (c_{AFB1}/0.6491)^{0.8893}]$, 线性范围为 0.05~10.00 $\mu\text{g/L}$, $r^2=0.9979$, 在纯缓冲液体系中 IC_{50} 和 LOD 分别为 0.64、 $1.30 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$ 。

在其他条件保持一致的前提下, 对比预孵育工艺与预包被工艺的线性范围、 IC_{50} 与 LOD, 如图 5B 所示, 两种工艺的线性范围一致, 均为 0.05~10.00 $\mu\text{g/L}$, 这是因为在反应完全的前提下, 线性范围的上下限与抗体总量、标记效率及 T 线包被抗原密度等条件有关。两种工艺使用相同探针, 在相同优化条件下, 线性范围不变。预孵育的 IC_{50} 和 LOD 与预包被工艺相当, 分别为 0.41 $\mu\text{g/L}$ 、 $3.50 \times 10^{-2} \mu\text{g/L}$, 这是因为预孵育过程中探针与样品是在液相中进行孵育, 抗原-抗体反应更充分, 更多抗体被 AFB1 占据, 导致 T 线信号更低, 标准曲线稍左移。然而预孵育工艺增加了人工移液和混合孵育步骤, 易引入更多人为误差; 预包被工艺将探针预喷涂集成于试纸条内, 空白检测时无需人工混合操作, 信号更稳定。预包被工艺以更短的检测时间和更简便的操作, 在现场快检环境下较预孵育工艺更具综合优势。

由表 1 可知, 所制备的 TRFM-LFIA 无需加温孵育, 可在室温下直接检测, 具有更低的 LOD 与更短的检测时间, 与荧光读数仪配合可进行定量分析。

2.3.2 TRFM-LFIA 的特异性与抗干扰性 分别选取 OTA、FB1、ZEN、DON 4 种常见的可能与 AFB1 共存的霉菌毒素作为干扰物, 进行 TRFM-LFIA 检测。如图 5C 所示, 在相同浓度下, 当 AFB1 对 TRFM-LFIA 产生约 80% 的抑制率时, 其余 4 种霉菌毒素所产生的抑制率均低于 20%, 表明本研究所建立的 TRFM-LFIA 特异性良好, 可精准识别 AFB1。

同时, 为验证检测方法在实际复杂样本基质中的抗干扰性, 保证检测结果的准确性和可靠性, 选取常见无机盐、有机物、蛋白质、氨基酸和重金属干扰物共 10 种物质进行抗干扰性实验, 结果如图 5D 所示, 其回收率介于 80.8%~109% 之间, RSD 为 0.40%~9.2%, 表明建立的 TRFM-LFIA 方法具有良好的抗干扰能力和基质适应性, 能够满足实际复杂谷物样品中 AFB1 快速检测的需求。

2.3.3 TRFM-LFIA 的稳定性 为评价所制备的 TRFM-LFIA 的稳定性与重现性, 制备了 11 批 TRFM-LFIA, 批次间 RSD 为 4.5% (图 5E), 因此 TRFM-LFIA 有良好的批间稳定性。如图 5F 所示, 在 4 °C 下避光干燥保存 30 d, T/C 比值仍大于 1.0, RSD < 10%, 说明该条件下 TRFM-LFIA 可稳定储存至少 30 d。

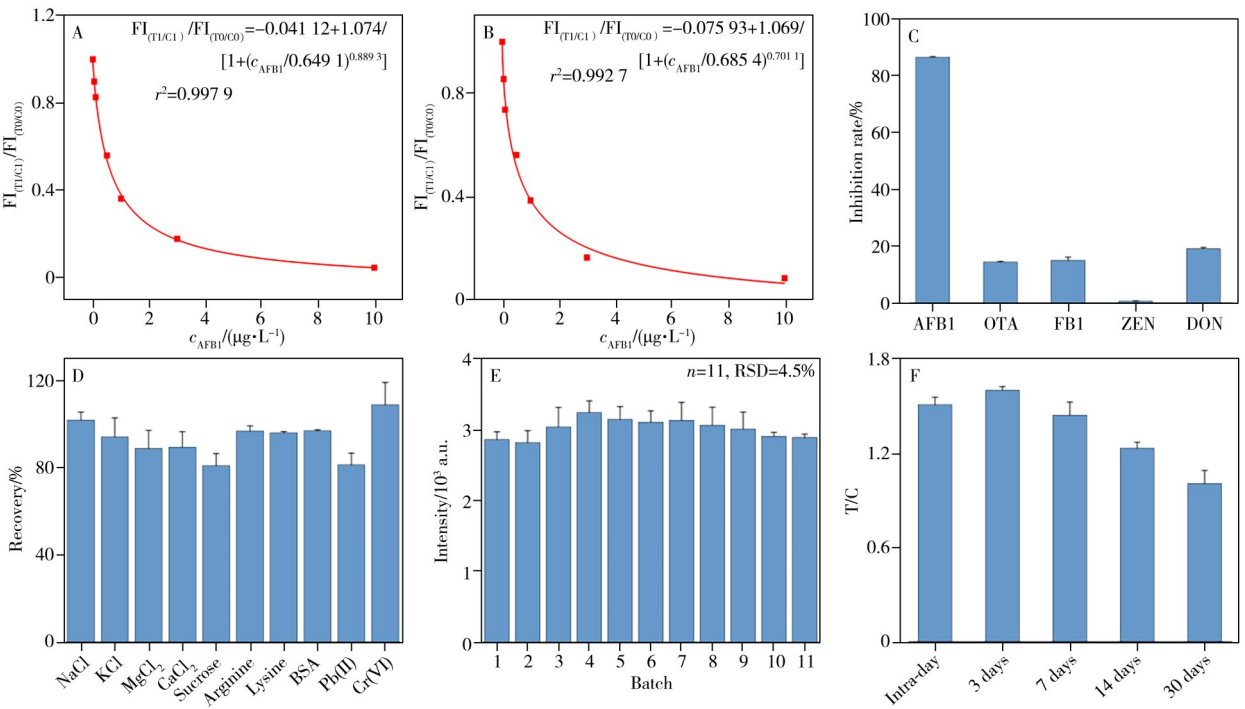


图5 TRFM-LFIA 预包被工艺(A)和预孵育工艺(B)的线性关系, 预包被工艺下TRFM-LFIA的选择性(C), 抗干扰性(D), 批次间稳定性(E)和日间稳定性(F)

Fig. 5 Linear relationship of pre-coating process(A) and pre-incubation process(B), and the specificity(C), anti-interference capability(D), inter-batch stability(E), and inter-day stability(F) of TRFM-LFIA under the pre-coating process conditions

表 1 市售商品黄曲霉毒素 B1 试纸条参数对比
Table 1 Comparison of parameters of commercial aflatoxin B1 test strips

Brand	Analyte	Detection temperature	Quantification range/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOD/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Detection time/min
本方法	时间分辨荧光微球	室温	0.05~10.00	1.30×10^{-2}	5
A	时间分辨荧光微球	40℃	5.00~120.00	2.50	6
B	时间分辨荧光微球	室温	20.00~100.00*	20.00*	25
C	胶体金	室温	—	5.00	5
D	胶体金	室温	—	10.00	5~8
E	胶体金	室温	—	5.00	8~10

: The unit is $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; -: The product is intended for semi-quantitative use only (: 单位为 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$; -: 产品仅用于半定量)

2.4 谷物样品检测

因样本中 AFB1 含量较低, 接近方法线性范围下限, 故选取样本中的 AFB1 含量作为加标水平。如表 2 所示, 在 1 : 1 加标水平下, 18 个实际样品的平均加标回收率为 85. 8%~109%, RSD < 8. 0%。为评估所研制的 TRFM-LFIA 的准确性与可靠性, 本研究选取 10 份大米样品和 8 份面粉样品进行 TRFM-LFIA 检测, 并使用同位素稀释液相色谱-串联质谱法进行方法对比。两种方法拟合所得曲线方程为 $c_{\text{LC-MS}}=0.9913c_{\text{TRFM-LFIA}}-0.01462$, 其中 $r^2=0.9918$, 表明使用 TRFM-LFIA 检测结果与 LC-MS 法判读结果相吻合。

表 2 实际样品的回收实验结果(n=3)
Table 2 Results of recovery in actual samples(n=3)

Sample	$w_{\text{AFB1}}/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Recovery/%	RSD/(%, n=3)	Sample	$w_{\text{AFB1}}/(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	Recovery/%	RSD/(%, n=3)
Rice	0.67	86.4	5.7	Rice	1.01	95.4	3.6
	1.06	97.3	3.9	Flour	0.46	87.5	6.2
	1.11	105	3.1		3.41	99.0	2.8
	0.40	108	7.9		0.45	109	7.2
	0.40	88.9	6.8		0.97	94.2	4.3
	0.66	103	4.6		0.68	89.6	5.4
	0.50	93.1	5.9		1.31	96.0	5.1
	0.48	108	7.4		2.31	104	2.3
	1.19	92.3	4.9		0.42	85.8	6.1

3 结 论

本文通过将TRFM-mAb探针预包被于共轭垫的工艺改进,成功研制了一种基于时间分辨荧光微球标记的侧流免疫层析试纸条,该法包含样品制备在内的总检测时间为10 min,对AFB1的线性范围为0.05~10.00 $\mu\text{g/L}$,具有良好特异性和稳定性,与OTA、FB1等常见共存霉菌毒素的交叉反应低,在实际复杂样品基质中表现出良好的抗干扰能力。在4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光干燥可稳定保存30 d以上。18个实际谷物样品的验证结果显示,TRFM-LFIA的检测方法与标准方法吻合($r^2=0.9918$)。结果表明,TRFM-LFIA方法操作简便、检测快速、准确可靠,为谷物及其制品中AFB1的高通量现场快速筛查与风险评估提供了一种绿色有效的技术手段,具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Kousar M, Yaseen M, Yousouf M, Malik M A, Mushtaq A, Mukhtar T, Javaid R, Aijaz A, Jabeen A. *Toxicon*, **2024**, 251: 108148.
- [2] Danesh N M, Bostan H B, Abnous K, Ramezani M, Youssefi K, Taghdisi S M, Karimi G. *Trends Anal. Chem.*, **2018**, 99: 117-128.
- [3] Wang X J, Cui J L, Sun L, Zhang Z M, Zheng H J. *Food Anal. Methods*, **2024**, 17: 534-550.
- [4] Chu L L, Wang Y Z, Dai Y Q, Wang D D, He H J, Jiang X M, Jiang Q Q. *J. Food Saf. Qual.* (褚兰玲, 王云政, 戴宇琪, 王丹丹, 贺红军, 蒋小满, 姜倩倩. 食品安全质量检测学报), **2025**, 16(11): 1-8.
- [5] GB 2761-2022. National Food Safety Standard-Maximum Levels of Mycotoxins in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量. 中华人民共和国国家标准).
- [6] Fang J Y, Li D T, Li J, Wang Q Q, Wang J T, Gao Y X F, He Y H, Wang C H. *Food Chem.*, **2025**, 481: 143919.
- [7] Jiang X H, Cheng J, Yang Z H, Wang P L. *Food Chem.*, **2025**, 472: 142964.
- [8] Sun L J, Zheng Y X, Tang Y Y, Li H Q, Feng X L, Pang T R. *J. Instrum. Anal.* (孙良娟, 郑羽茜, 唐媛媛, 李红权, 冯祥龙, 庞田润. 分析测试学报), **2025**, 44(11): 2354-2361.
- [9] Wang S C, Du T, Huangmin J Q, Liu S J, Zhu Y, Zhang D H, Sun J, Wang Y R, Zeng L T, Wang J L. *Green Chem.*, **2023**, 25: 7756-7763.
- [10] Zhu J J, Dai W X, Xia Y. *Mod. Food*(朱金军, 代文侠, 夏瑜. 现代食品), **2025**, 15: 29-34.
- [11] Xue X Y, Xia L, Li G K. *J. Instrum. Anal.* (薛小燕, 夏凌, 李攻科. 分析测试学报), **2026**, 45(8):1823-1833.
- [12] Cheng J L, Wu Y F, Wang Y L, Guo X D, Liu Q. *Microchem. J.*, **2025**, 213: 113526.
- [13] Hu L M, Luo K, Xia J, Xu G M, Wu C H, Han J J, Zhang G G, Liu M, Lai W H. *Biosens. Bioelectron.*, **2017**, 91: 95-103.
- [14] Sun J D, Wang L Z, Shao J D, Yang D D, Fu X R, Sun X L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2021**, 413: 6489-6502.
- [15] GB 5009.22-2016. National Food Safety Standard-Determination of B-group and G-group Aflatoxins in Foods. National Standards of the People's Republic of China(食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素B族和G族的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [16] Li M, Wang H M, Sun J D, Ji J, Ye Y L, Lu X, Zhang Y Z, Sun X L. *Food Control*, **2021**, 121: 107616.
- [17] Liang J F, Li X W, Huang B, Pan Y P, Zhuang Z L, Ye Q X, Peng C, Deng H Y, Yi Y T, Zhang B B, Chen P Y, Chen X C. *Biosens. Bioelectron.*, **2024**, 258: 116357.
- [18] Li S X, Liu W H, Liu M X, Chen Y Y, Zhang F Y, Wang X H. *Talanta*, **2023**, 271: 125580.
- [19] Wen Z H, Hu X L, Yan R F, Wang W X, Meng H, Song Y, Wang S, Wang X H, Tang Y W. *Food Chem.*, **2023**, 406: 135081.

(责任编辑: 盛文彦)