

doi: 10.12452/j.fxcxb.26082405

胶体金免疫层析法快速检测食品中对羟基苯甲酸甲酯

龙泽雄¹, 张咏仪^{1,4*}, 王宇², 杨金易¹, 田元新³, 王弘¹, 徐振林¹,
沈玉栋^{1*}

(1. 华南农业大学 食品学院 广东省食品质量安全重点实验室, 广东 广州 510642; 2. 广州市食品检验所, 广东 广州 511410; 3. 南方医科大学 药学院 广东省新药筛选重点实验室, 广东 广州 510515; 4. 广东标允生物科技有限公司, 广东 云浮 527499)

摘要: 该研究建立了一种对羟基苯甲酸甲酯的胶体金免疫层析快速检测方法。结果表明, 在抗体标记量 2 μg , 金标探针用量 5 μL , T线及C线包被浓度均为 1.0 mg/mL , 样品垫处理液为含 0.4% Tween-20 的 0.02 mol/L Tris 缓冲液, 层析时间 6 min 的最佳工作条件下, 该方法在酱油、可乐和米醋样品中的定量下限分别为 0.270、0.360、0.444 $\mu\text{g/mL}$, 线性检测范围分别为 0.126~6.276 $\mu\text{g/mL}$ 、0.282~3.186 $\mu\text{g/mL}$ 、0.192~6.228 $\mu\text{g/mL}$, cut-off 值均为 18 $\mu\text{g/mL}$ 。3 种样品的平均加标回收率为 82.4%~110.5%, 相对标准偏差均不大于 15%, 测定值与 LC-MS/MS 值呈良好线性相关 (相关系数 $r^2=0.94$)。该方法与其他结构类似物的交叉反应率小于 0.5%, 特异性良好, 适用于食品中对羟基苯甲酸甲酯的现场快速筛查。

关键词: 对羟基苯甲酸甲酯; 胶体金免疫层析法; 单克隆抗体; 快速检测; 食品防腐剂

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(XXXX)XX-0001-11

Colloidal Gold Immunochromatography for Rapid Detection of Methylparaben in Food

LONG Ze-xiong¹, ZHANG Yong-yi^{1,4*}, WANG Yu², YANG Jin-yi¹, TIAN Yuan-xin³, WANG Hong¹, XU Zhen-lin¹, SHEN Yu-dong^{1*}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, Guangzhou 510642, China; 2. Guangzhou Food Inspection Institute, Guangzhou 511410, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Guangdong Biaoyun Biotechnology Co., Ltd., Yunfu 527499, China)

Abstract: Methylparaben is a common food preservative widely used in carbonated beverages, seasonings, and other food products. However, this compound has been reported to possess endocrine-disrupting activity, posing potential risks to human health; therefore, development of rapid and sensitive on-site detection methods is of great importance. In this study, a colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) was established for the rapid detection of methylparaben. Under optimal conditions (antibody labeling amount 2 μg , gold-labeled probe volume 5 μL , coating concentrations of 1.0 mg/mL for both T and C lines, sample pad treatment buffer of 0.02 mol/L Tris containing 0.4% Tween-20, and chromatographic time 6 min), the limits of quantification (LOQ) in soy sauce, cola, and rice vinegar samples were 0.270, 0.360, and 0.444 $\mu\text{g/mL}$, respectively, with linear detection ranges of 0.126 - 6.276, 0.282 - 3.186, and 0.192 - 6.228 $\mu\text{g/mL}$, and a cut-off value of 18 $\mu\text{g/mL}$ for all three matrices. The average recoveries from spiked samples ranged from 82.4% to 110.5%, with relative standard deviations (RSD) not more than 15% for all tested concentrations. The measured values showed good linear correlation with those obtained by LC-MS/MS ($r^2 = 0.94$). The assay exhibited excellent specificity, with cross-reactivity

收稿日期: 2026-08-24; 修回日期: 2026-09-11

基金项目: 国家自然科学基金 (32272400); 国家重点研发计划 (2023YFF1105002); 广州市科技计划项目 (2025D04J0037)

* 通讯作者: 沈玉栋, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: shenyudong@scau.edu.cn

网络首发日期: XXXX-XX-XX

ty rates of less than 0.5% against six structurally related analogues. The method is suitable for on-site rapid screening of methylparaben in foods.

Key words: methylparaben; colloidal gold immunochromatographic assay; monoclonal antibody; rapid detection; food preservative

对羟基苯甲酸酯 (PBs) 是一类广谱高效的食品防腐剂, 主要包括对羟基苯甲酸甲酯 (MeP)、乙酯 (EtP)、丙酯 (PrP) 和丁酯 (BuP)。其分子结构中酚羟基的脂溶性特性, 使之能够穿透微生物细胞膜, 干扰胞内呼吸酶系和电子传递链的正常运转^[1-3], 实现抑制细菌生长, 广泛用于调味品、饮料等领域^[4]。与其他防腐剂相比, 对羟基苯甲酸酯的活性 pH 值范围更宽, 在酸性、中性及碱性溶液中均能发挥作用, 适用范围更广^[5]。随着烷基碳链的增长, 该类化合物在水溶液中的溶解度降低, 毒性增强^[6]。因此, 食品中 MeP 是最常检出的对羟基苯甲酸酯, 检出浓度水平一般为 ng/g^[7]。MeP 含有酚羟基结构, 使其呈现一定的内分泌干扰活性, 对人体健康构成潜在风险^[8]。与此同时, MeP 通过生产与消费环节持续进入环境, 在地表水 (检出浓度 80 000 ng/L)^[9]、空气 (检出浓度 21 ng/m³)^[10] 及土壤 (检出浓度 8.04 ng/g dw, dw 为干重)^[11] 中广泛检出, 对生态安全构成潜在威胁。因此, 开发一种快速灵敏的 MeP 检测技术至关重要。

而目前 MeP 的检测主要依赖高效液相色谱、气相色谱-质谱联用等仪器分析法。燕群等^[12] 采用气相色谱法对食醋、酱油和茶饮料中的对羟基苯甲酸甲酯含量进行检测, 检出限为 0.489 mg/kg, 加标回收率为 93.2%~97.4%, RSD<1%; 陈桂娟等^[13] 采用高效液相色谱-串联质谱法测定化妆品中对羟基苯甲酸甲酯的含量, 检出限达到 0.043 mg/kg, 回收率为 88.6%~98.5%; 周美丽等^[14] 建立了基于高效液相色谱法测定食醋中对羟基苯甲酸甲酯含量的方法, 检出限可达 1 mg/kg。虽然上述仪器分析方法灵敏度高、准确性好, 但其设备投入大、样品前处理流程复杂、单批次检测耗时较长, 且高度依赖熟练操作人员, 难以满足基层监管、现场执法及企业自检等场景对快速筛查的现实需求^[15]。

免疫层析法 (ICA) 以抗原-抗体的特异性亲和反应为核心识别基础, 具备分析速度快、灵敏度较高、成本可控及适合现场操作等突出特点, 已在食品安全快检领域成为常规仪器检测方法的有力补充^[16-18]。ICA 对设备要求较低、操作易于掌握, 检测结果可直接通过肉眼或简单仪器判读。目前, 在各类 ICA 形式中, 以胶体金为标记物的免疫层析法 (GICA) 的应用覆盖面最广^[19]。其原理是金纳米颗粒与抗体通过静电作用结合, 并借助抗原抗体特异性反应, 使金纳米颗粒聚集形成肉眼可见的条带。该方法价格低廉、操作简单、在 5~10 min 内即可完成检测, 结果可用肉眼观察或使用免疫层析读数仪进行定量。在食品防腐剂检测方面亦有相关 GICA 的研究报道, 如苯甲酸和山梨酸等^[20]。然而, 针对 MeP 的免疫检测研究鲜有报道。故本研究在实验室前期制备的对羟基苯甲酸甲酯单克隆抗体的基础上, 以采用胶体金标记技术制备的金标抗体作为信号探针, 通过优化工作条件, 建立了一种适用于食品中 MeP 的胶体金免疫层析快速检测方法, 以期食品安全日常监管提供一种简便、快速、可视化的现场筛查技术手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

本实验所用主要设备包括: 划膜仪 (XYZ3060 型, 美国 BioDot 公司)、数控裁条机 (ZQ2000 型, 上海金标生物科技有限公司)、便携式免疫层析读数仪 (南京微测生物科技有限公司)、冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)、场发射透射电镜 (Talos F200S 型, 捷克 FEI 公司) 以及纳米粒度及 ZETA 电位分析仪 (英国 Malvern 公司)。

硝酸纤维素膜 (UniSart CN 95) 购自赛多利斯莱珀思 (上海) 贸易有限公司; 样本垫 (HG-2)、吸水纸 (CH37K) 及 PVC 底板 (SMA331-40) 由上海良信生物技术有限公司提供; 对羟基苯甲酸甲酯 (纯度≥98%) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 羊抗鼠 IgG、牛血清蛋白均购自美国 Sigma 公司; 氯金酸、柠檬酸三钠等分析纯试剂均购自国药集团化学试剂有限公司; 金标探针复溶液由温氏食品集团提供; 标准品稀释液 (0.1 g NaOH、1 g KH₂PO₄、1 g NaCl、100 μL Tween-20, 加入一级水定容至 100 mL)、抗体 MeP-mAb (B3) 及包被原 H5-OVA 均为本实验室自制。

1.2 实验方法

1.2.1 胶体金及探针的制备与鉴定 胶体金颗粒采用柠檬酸三钠还原法制备。具体操作为：将 500 mL 超纯水与 5 mL 1% (w/v) 氯金酸溶液依次加入洁净的圆底烧瓶中，加热至沸腾后快速注入 10 mL 1% (w/v) 柠檬酸三钠溶液，继续煮沸 10 min。反应过程中，溶液颜色由浅黄色逐渐转变为透亮的酒红色，表明胶体金颗粒已成功生成^[21]。

取 1 mL 胶体金溶液，以 0.04 mol/L K_2CO_3 溶液调节 pH 值后涡旋混匀 5 min。将 B3 单克隆抗体用 0.05 mol/L PB (pH 7.5) 稀释至 1 mg/mL，取 2 μ g 加入上述金胶溶液中，继续涡旋振荡反应 15 min。随后加入 100 μ L 10% BSA (牛血清蛋白) 封闭液，振荡反应 10 min 以封闭金颗粒表面未结合的活性位点。将上述混合液于 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 条件下离心 15 min，弃去上清液后，沉淀用 200 μ L 金标复溶液重新分散，于 4 $^{\circ}C$ 保存备用。采用透射电子显微镜 (TEM)、纳米粒度及 ZETA 电位仪对偶联前后的胶体金颗粒进行表征，通过对比其形貌、粒径及表面电位的变化确认探针是否制备成功^[21]。

1.2.2 试纸条的组装、检测及结果判读 试纸条由样品垫、硝酸纤维素膜 (NC 膜)、吸水垫和 PVC 底板 4 部分组成。包被原 H5-OVA (1.0 mg/mL) 和羊抗鼠 IgG (0.5 mg/mL) 分别用作检测线 (T 线) 和质控线 (C 线) 的喷涂液，经划膜仪喷涂于 NC 膜上后，于 37 $^{\circ}C$ 烘箱中干燥 12 h。将处理好的样品垫、NC 膜和吸水垫按顺序依次粘贴于 PVC 底板上，组装成完整的试纸条。用切条机切成 3.80 mm 宽的试纸条，干燥保存备用。

本研究采用微孔预反应模式进行胶体金免疫层析检测，具体检测流程及原理如图 1 所示。检测时取适量胶体金探针加入微孔中，随后加入 100 μ L 用标准品稀释液配制好的待检物溶液，用移液枪反复吹打混匀，使探针与待检溶液充分接触。微孔静置反应 3 min 后，垂直插入预装的试纸条，继续反应 5 min。反应结束后，取出试纸条，弃去样品垫。若样品中不含待测物，金标抗体随层析液上行至检测线时被包被抗原捕获，形成肉眼可见的红色条带；若样品中存在待测物，抗体结合位点被优先占据，检测线上红色信号随目标物浓度升高而减弱乃至消失，两者呈负相关^[15]。通过肉眼半定量检测 (T 线消失的值为 cut-off 值) 或通过免疫层析读数仪测定阴性和待测样品试纸条 T 线和 C 线的显色数值，计算 T/C 值和抑制率。同时以待测物浓度为横坐标， B/B_0 为纵坐标绘制标准曲线 (其中 B_0 为无药物时的 T/C 值， B 为添加待测药物浓度 x 时的 T/C 值)。每个药物浓度重复检测 3 次，使用 Origin 绘图软件拟合建立待测药物标准曲线。

1.2.3 胶体金免疫层析法工作条件的优化 胶体金溶液的稳定性依赖于颗粒表面的双电层结构，而体系 pH 值的调控直接影响抗体能否高效标记到金颗粒表面。同时抗体用量也直接影响标记效率和检测灵敏度，用量过少，金颗粒表面裸露，非特异性吸附增加；用量过多，抗体多层堆积产生位阻，反而削弱竞争反应。在检测过程中金标探针的用量同样需要精准把控，探针用量太少，会导致检测线显色不足，影响判读的准确性；用量过多，T 线则被过量探针占据，竞争反应受到抑制，灵敏度下降，甚至可能出现假阴性。基于以上考虑，本研究对标记阶段的胶体金粒径、pH 值、抗体用量，以及检测阶段的探针用量、样品垫处理液组成等进行了系统优化。优化实验中，分别以空白对照和含一定浓度 MeP 的阳性样品进行测试，通过免疫层析读数仪记录 T 线和 C 线信号强度 (A_T 和 A_C)，以抑制率为指标评价各条件下的检测性能^[21]。抑制率按照下式计算：

$$\text{抑制率}(\%) = \left[1 - \frac{A_T/A_C(\text{阳性})}{A_T/A_C(\text{阴性})} \right] \times 100$$

式中： A_T 为 T 线吸光度； A_C 为 C 线吸光度。

1.2.4 试纸条的性能评价 在最优检测条件下，将 MeP 标准品用空白样品提取液梯度稀释后采用 GICA 检测，通过读取各试纸条 T、C 线的信号强度，计算 T/C 比值。以 MeP 浓度为横坐标， B/B_0 为纵坐标，拟合得到定量标准曲线。以 20 个空白样品测定值的平均值加 10 倍标准偏差计算定量下限 (LOQ)；将 $B/B_0=50\%$ 所对应的浓度定义为半抑制浓度 (IC_{50})，将 B/B_0 在 20%~80% 之间所对应的浓度区间 (IC_{20} ~ IC_{80}) 作为方法的线性范围，用于准确定量。每个浓度重复检测 3 次，取平均值进行曲线拟合^[21]。

准确度评价：向经 HPLC-MS/MS 确证的空白阴性酱油、可乐和米醋样品中，依据 LOQ、 IC_{50} 和 IC_{80}

值分别添加低、中和高3个不同质量浓度的对羟基苯甲酸甲酯溶液,加标样品经乙酸乙酯提取后离心,取上清液用氮气吹干,用样品稀释液复溶后进行GICA检测,并通过加标回收率及相对标准偏差(RSD)对准确度进行评价。

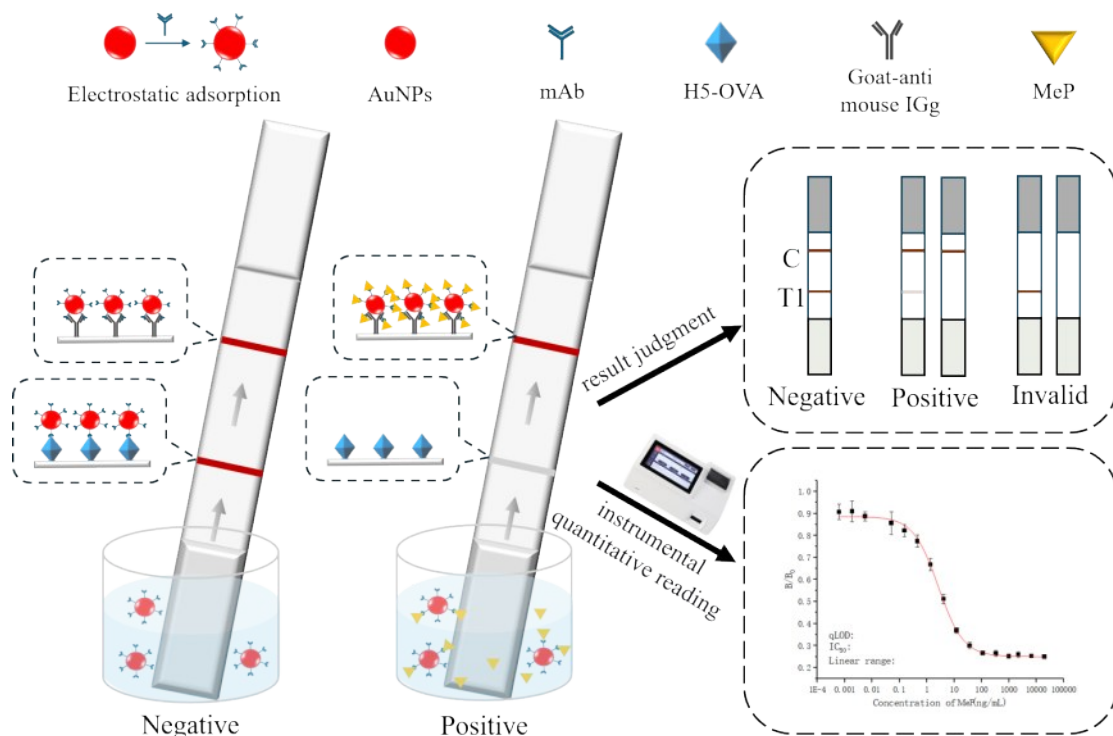


图1 胶体金试纸条检测原理及结果判定

Fig. 1 Detection principle and result interpretation of the colloidal gold immunochromatographic test strip

一致性评价: 将GICA的实际样品检测结果与HPLC-MS/MS(参照GB 5009.31-2025^[22])进行比对, 评估两方法之间的相关性。

特异性评价: 以交叉反应率(CR)为评价指标。采用GICA测定6种与MeP结构及功能类似物, 获得各类似物的 IC_{50} , 并按下式计算CR值:

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}(\text{MeP})}{IC_{50}(\text{类似物})} \times 100$$

稳定性评价: 将金标探针和已组装的试纸条分别用铝箔袋密封, 置于45℃恒温烘箱中加速老化, 分别于储存0、1、3、5、7d后取样检测, 考察其显色强度及抑制率变化。根据阿伦尼乌斯公式计算得到试纸条的预估保质期, 以评价试纸条的储存稳定性。

2 结果与讨论

2.1 胶体金及其探针的质量鉴定

采用TEM、粒径分析及Zeta电位测定仪对胶体金偶联抗体前后的形貌、粒径和表面电位进行表征。TEM结果显示(图2A、B), 所制备的胶体金颗粒呈圆形或椭圆形, 大小基本均一, 表明胶体金质量符合免疫标记实验要求。粒径分析结果显示(图2C), 空白胶体金的平均粒径为22.8 nm, 分布较为均一; 当抗体成功偶联至金颗粒表面后, 由于抗体蛋白分子附着形成蛋白层, 胶体金探针的平均粒径增至37.17 nm, 粒径的显著增加进一步证实了抗体已成功标记至胶体金表面。Zeta电位是衡量胶体体系稳定性的关键指标, 其绝对值越高表明颗粒间静电排斥作用越强, 体系越稳定^[23]。测定结果显示(图2D), 空白胶体金的Zeta电位为-11.3 mV; 抗体偶联后, 胶体金探针的Zeta电位降至-15.2 mV, 绝对值增大。这一变化主要归因于在偶联过程中, 部分物理吸附于金颗粒表面的柠檬酸根被抗体通过Au—S键或静电吸附取代, 而抗体分子引入了更多的负电基团, 增加了金颗粒表面的负电荷密度, 从而增强了颗粒间的静电排斥作用, 同时也证明了抗体成功结合至金颗粒表面并改变了其原有的界面特

性^[19, 24]。综上, 胶体金与抗体成功偶联, 所制备的免疫探针具有良好的分散性和稳定性, 为后续试纸条的组装及实际样品检测奠定了可靠基础。

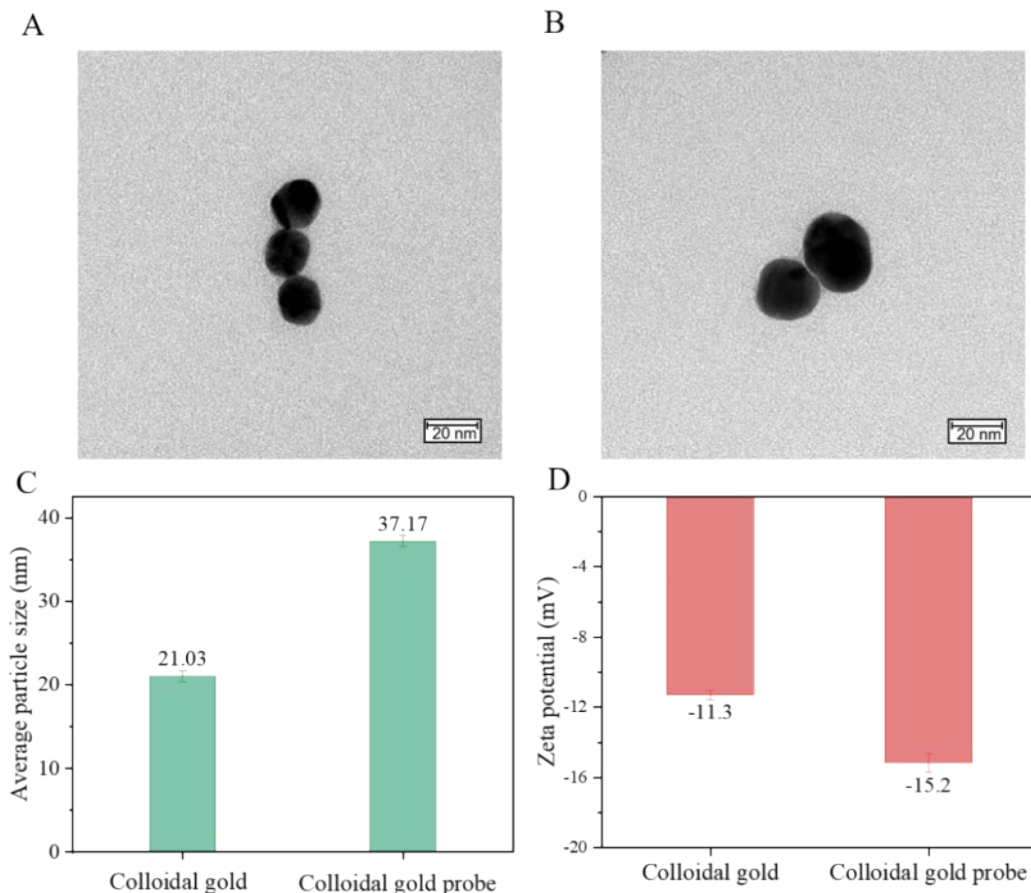


图2 胶体金(A)及胶体金探针(B)的透射电镜图; 胶体金及胶体金探针的平均粒径(C)和zeta电位(D)

Fig. 2 TEM images of colloidal gold (A) and colloidal gold probe (B); average particle size (C) and zeta potential (D) of colloidal gold and colloidal gold probe

2.2 胶体金免疫层析法工作条件的优化

2.2.1 胶体金探针的制备及用量优化 适当粒径的胶体金是保障检测灵敏度的关键, 其粒径主要通过光学信号、标记效率和层析行为3个方面影响试纸条性能。粒径越大, 单个颗粒的散射信号越强, 有利于提升肉眼观察灵敏度; 但过大的颗粒易加深背景颜色, 降低信噪比^[25]。同时, 大粒径金颗粒虽单个颗粒的表面积更大、可偶联更多抗体, 却可能因空间位阻遮蔽抗体活性位点, 降低标记效率^[26]。此外, 粒径过大会减缓层析速度, 甚至被NC膜截留, 导致背景不均或假阳性。本研究采用经典的柠檬酸三钠还原法(Turkevich法)制备胶体金。胶体金的粒径主要与其与氯金酸的相对用量决定^[27], 其调控机制为: 柠檬酸三钠用量越多, 反应体系中初始成核位点数量越多, 金原子在大量晶核表面同步生长, 最终形成的颗粒粒径越小; 反之, 当柠檬酸三钠用量较少时, 成核位点数量有限, 金原子在较少的晶核上持续沉积, 生长周期延长, 最终形成较大粒径的颗粒^[27-29]。实验中固定1%氯金酸用量(5 mL), 改变1%柠檬酸三钠的加入量, 考察了氯金酸与柠檬酸三钠溶液体积比分别为1:2(粒径32.7 nm)、1:4(粒径23.7 nm)、1:6(粒径22.8 nm)、1:8(粒径22.3 nm)时的胶体金粒径变化(两种溶液浓度均为1% (w/v), 故体积比等同于质量比)。结果如图3A所示, 随着柠檬酸三钠相对用量增加, 显色强度与抑制率呈上升趋势, 其中氯金酸与柠檬酸三钠溶液体积比为1:6时效果最佳, 而两者体积比为1:8时显色和灵敏度均下降。因此, 选择氯金酸与柠檬酸三钠溶液体积比为1:6时得到的粒径约22.8 nm的胶体金用于后续实验。

碳酸钾用于调节胶体金溶液pH值, 以增强其与抗体的静电吸附。金颗粒表面带负电荷, 需将pH值调至略高于抗体等电点的微碱性环境, 以促进两者结合, 同时防止pH值过低导致抗体聚集或过高引

发金颗粒团聚^[30]。由图 3B 可知,随着 K_2CO_3 用量增加, T、C 线显色逐渐减弱,抑制率逐步上升,碳酸钾用量为 10 μL 时抑制率最高,但此时显色过浅、检测稳定性不足。碳酸钾用量 8 μL 时,显色强度适宜且抑制率达 62%,故选择 8 μL 为最佳碳酸钾添加量。

抗体用量是偶联工艺的关键参数。抗体用量不足时,金颗粒表面活性位点不能被充分覆盖,易引起非特异性吸附;用量过高则导致抗体多层堆积,产生空间位阻,阻碍抗原结合^[31]。如图 3C 所示,随着抗体用量增加, T 线显色先增强后趋于饱和, C 线亮度和抑制率逐渐下降。综合考虑显色效果与灵敏度, 2 μg 抗体标记的探针表面抗体密度适中、空间暴露充分,信号强度和灵敏度均表现最佳,因此确定 2 μg 为最优抗体用量。

探针用量优化结果如图 3D 所示,当探针用量为 2.5 μL 时, T 线显色较浅,抑制率偏低,难以满足肉眼判读的清晰度要求。用量增至 5 μL 时,显色条带清晰度明显改善,抑制率在各用量组中最高,竞争效率最优。继续增加至 10~25 μL 时,虽 T 线信号强度进一步增强,但抑制率呈下降趋势,且阴性 T/C 值波动增大,可能与过量探针在膜上滞留引起的非特异性吸附有关。综合比较, 5 μL 探针在保证足够显色强度的同时实现了最优竞争效率,信噪比理想,故选为最佳探针用量。

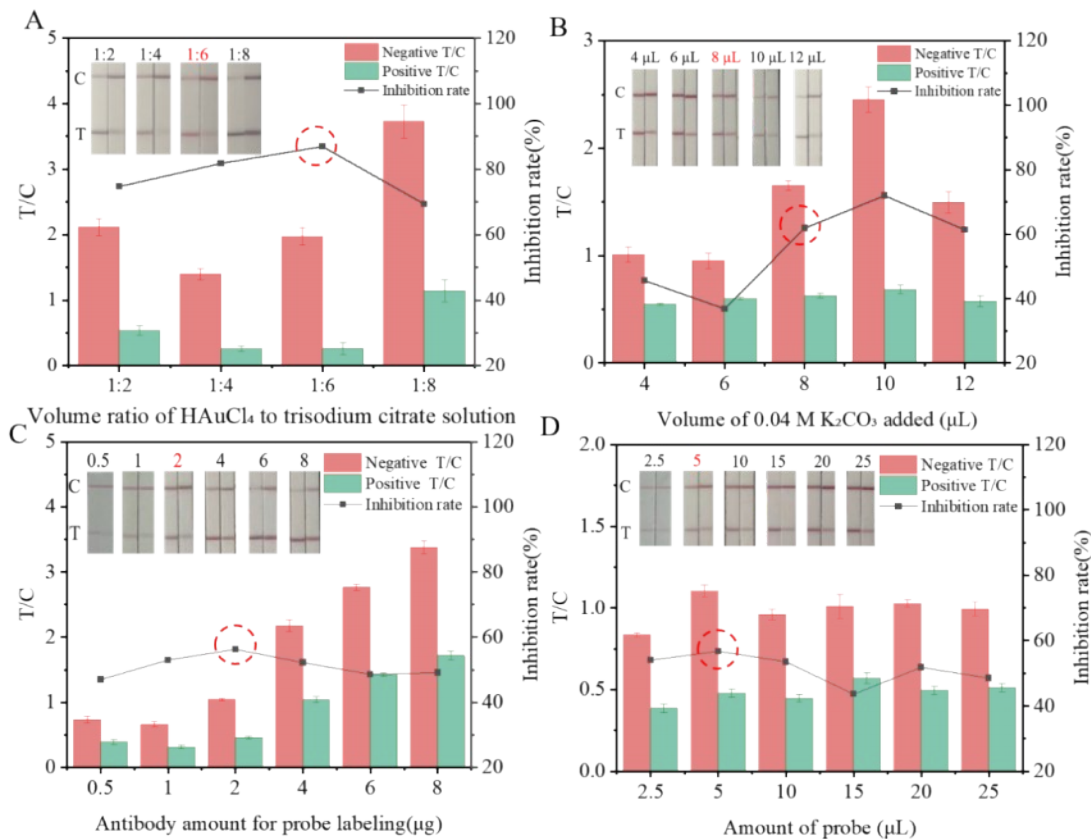


图3 氯金酸与柠檬酸三钠溶液体积比 (A), 胶体金溶液 pH 值 (B), 抗体用量 (C), 探针用量 (D) 对 GICA 性能的影响

Fig. 3 Volume ratio of HAuCl₄ to trisodium citrate solution (A), pH of colloidal gold solution (B), antibody amount (C), probe amount (D) on the performance of GICA

2.2.2 试纸条处理方法的优化 在优化过程中, C 线与 T 线的信号强度均主要受探针用量调控, 且两者显色较为接近。若同时调整二者浓度, 将引入多重变量, 干扰对探针用量与检测性能之间关系的准确判断。因此, 本研究在固定 C 线浓度 (羊抗鼠 IgG 1.0 mg/mL) 的前提下, 仅对 T 线浓度进行梯度优化。结果如图 4A 所示, 随着 T 线浓度降低, 显色强度减弱而灵敏度提高。这是因为有限包被位点加剧了药物与包被原之间的竞争, 使体系对目标物浓度变化更为敏感; 但 T 线浓度过低也会削弱对探针的捕获能力, 影响检测稳定性。当 T 线浓度为 1.0 mg/mL 时显色最佳, 灵敏度满足检测需求, 故选择该浓度进行后续实验。

样品垫处理缓冲液直接影响金标探针的释放效率、免疫反应微环境及非特异性吸附水平^[32]。本研

究比较了 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PB)、0.02 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS)、0.02 mol/L 三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (Tris) 及超纯水 4 种体系对检测性能的影响, 结果如图 4B 所示。Tris 缓冲液组的抑制率最高 (62%), 显色效果亦优于其他处理组, 这可能与适宜的离子强度和 pH 值环境有关。综合考虑, 选择 0.02 mol/L Tris 作为样品垫处理缓冲液。

吐温-20 作为非离子表面活性剂, 可改善层析流速, 促进金标探针均匀释放与迁移, 减少非特异性吸附^[33]。结果如图 4C 所示, 显色强度随吐温含量增加先增强后趋于平缓, 灵敏度则先升后降, 在 0.4% 处达到峰值。适量吐温可有效降低疏水性、抑制背景干扰, 但含量过高可能干扰抗原-抗体识别, 甚至导致抗体脱落或构象改变, 降低特异性结合效率^[34]。综合显色与灵敏度表现, 确定 0.4% 为最佳吐温含量。

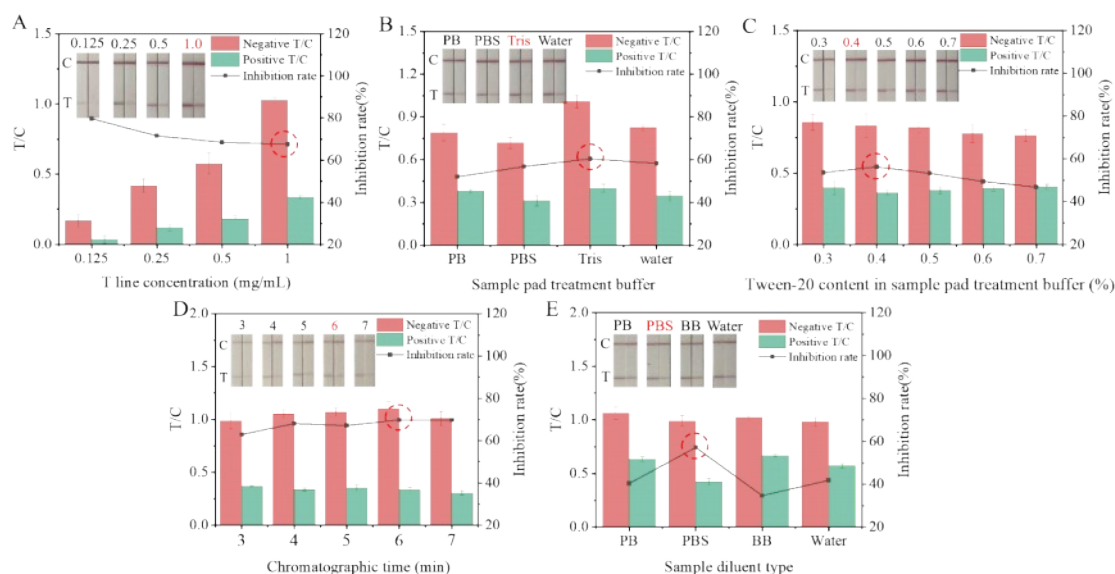


图4 T线浓度 (A), 样品垫处理缓冲液 (B), 样品垫处理液吐温含量 (C), 层析时间 (D), 样品稀释液 (E) 对 GICA 性能的影响

Fig. 4 Effects of T line concentration (A), sample pad treatment buffer (B), Tween-20 content in sample pad treatment buffer (C), chromatographic time (D), sample diluent (E) on the performance of GICA

2.2.3 层析时间和样品稀释液种类的优化 层析时间是影响免疫层析检测性能的关键动力学参数, 决定了抗原与抗体反应的充分程度、显色强度以及非特异性吸附的干扰水平^[35]。本研究比较了加样后 3、4、5、6、7 min 5 个时间点的检测信号变化, 结果如图 4D 所示。在加样初期 (即 3、4 min 实验组), 金标探针随样本向前迁移, 与 T、C 线的结合尚未充分完成, 显色信号较弱; 至 5~6 min 时, 抗原抗体反应逐渐达到平衡, T、C 线信号趋于稳定, 灵敏度有所提升; 7 min 后, 试纸条的显色强度和灵敏度已无明显提升。综合考虑检测方法的速度与灵敏度, 由于 6 min 时 C、T 线显色信号稳定且抑制率接近峰值, 能够满足灵敏度和稳定性的要求。因此, 本研究选择 6 min 作为最佳层析时间用于后续实验。

标准品稀释液作为免疫层析检测体系中的重要基质组分, 其组成成分直接影响抗原抗体反应的微环境、探针在膜上的层析行为以及非特异性吸附水平^[36]。为筛选最优稀释液, 本研究系统比较了磷酸盐缓冲生理盐水 (PBS, 0.02 mol/L)、磷酸盐缓冲液 (PB, 0.02 mol/L)、硼酸盐缓冲液 (BB, 0.02 mol/L) 及超纯水 4 种常用稀释液对检测性能的影响, 结果如图 4E 所示。从抑制率指标来看, 不同稀释液体系下检测的竞争效率存在显著差异。其中 PBS 作为稀释液时抑制率最高, 达到 57%, 表明在该缓冲体系下, 探针与目标抗原的特异性结合竞争最为充分, 同时阴性和阳性样本显色情况稳定。相比之下, 其余的样品稀释液抑制率均较低。因此, 本研究选择 0.02 mol/L PBS 作为标准品稀释液用于后续实验。

2.3 方法性能评价

2.3.1 灵敏度 为考察不同样品基质对检测结果的影响, 分别将酱油、可乐和米醋的样品提取液进行不同倍数稀释后测定, 以不含基质的样品稀释液为对照, 通过比较 IC_{50} 的偏移程度筛选最佳稀释倍

数。结果如图 5A~C 所示, 3 种样品提取液稀释 6 倍后, 均达到基质消除效果。3 种样品的标准曲线如图 5D 所示, 其在稀释后检测液中的 cut-off 值均为 $3 \mu\text{g/mL}$; IC_{50} 分别为 0.151 、 0.157 、 $0.182 \mu\text{g/mL}$; 线性检测范围分别为 $0.021\sim1.046 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.047\sim0.531 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.032\sim1.038 \mu\text{g/mL}$ 。同时计算得到其 LOQ 分别为 0.045 、 0.060 、 $0.074 \mu\text{g/mL}$ 。经基质消除稀释倍数 (6 倍) 换算后, 本方法在实际酱油、可乐和米醋样品中的 cut-off 值均为 $18 \mu\text{g/mL}$ (即稀释前实际样品浓度=稀释后检测液浓度 $\times 6$, 下同); IC_{50} 分别为 0.906 、 0.942 、 $1.092 \mu\text{g/mL}$; 线性检测范围 ($\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$) 分别为 $0.126\sim6.276 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.282\sim3.186 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.192\sim6.228 \mu\text{g/mL}$; LOQ 分别为 0.270 、 0.360 、 $0.444 \mu\text{g/mL}$ 。该方法的灵敏度满足我国《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》(GB 2760-2024)^[37] 中对羟基苯甲酸甲酯的检测要求。

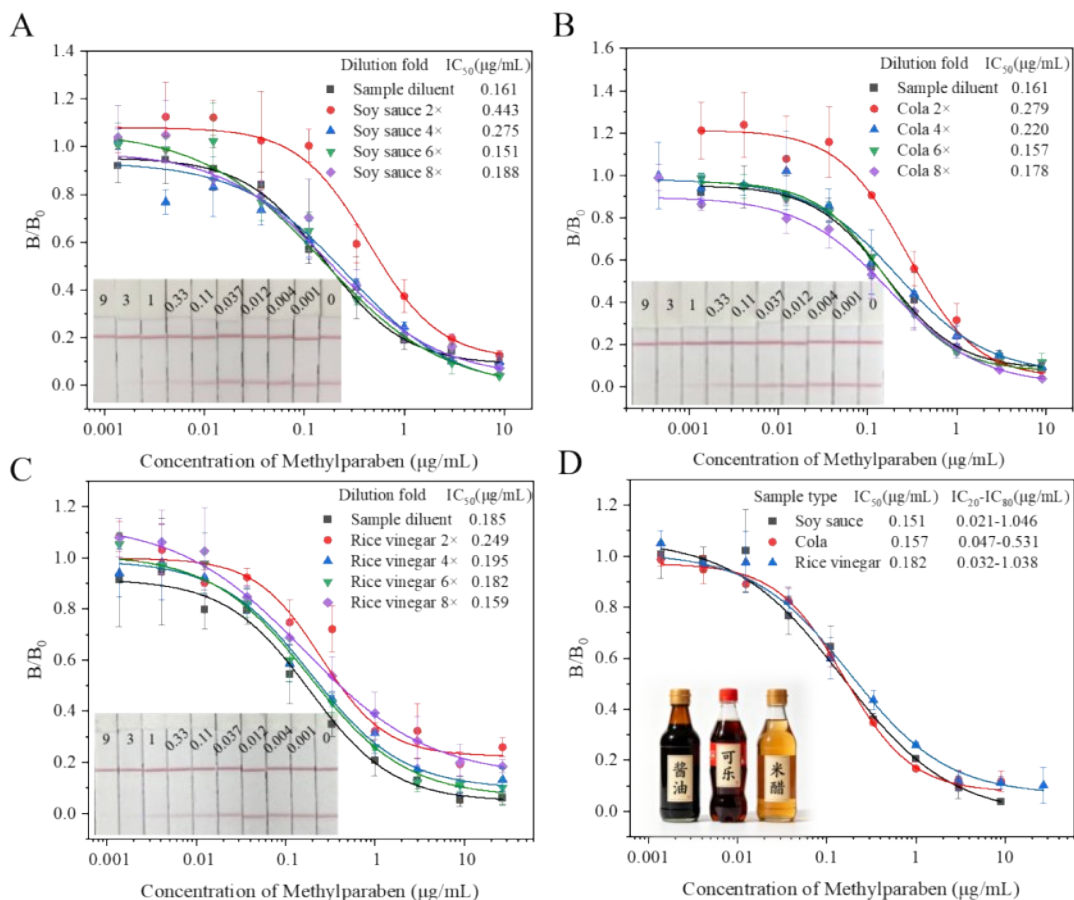


图 5 酱油 (A)、可乐 (B)、米醋 (C) 样品基质消除及其标准曲线 (D)

Fig. 5 Matrix effect elimination for soy sauce (A), cola (B), rice vinegar (C) samples and their calibration curves (D)

2.3.2 准确度 酱油、可乐和米醋样品预先通过 HPLC-MS 检测为阴性样品, 根据样品 LOQ、 IC_{50} 和 IC_{80} 值, 分别向 5 g 阴性样品中添加低、中、高 3 个不同浓度水平的对羟基苯甲酸甲酯标准品, 经样品前处理后进行试纸条检测, 结果如表 1 所示, 三者的回收率分别为 82.4%~104.2%、82.7%~110.5% 和 85.6%~94.2%, RSD 分别为 3.8%~14.4%、10.2%~13.6% 及 2.6%~10.8%。酱油低浓度组 RSD 较大, 可能原因在于该浓度接近方法定量下限, 竞争反应对层析条件的变化较为敏感; 此外, 酱油基质中少量残留的色素、氨基酸等极性组分也可能对免疫反应产生一定干扰。相比之下, 中、高浓度组 RSD 均在 9% 以下, 精密度明显改善。可乐 3 个浓度组的 RSD 均超过 10%, 同时回收率随加标浓度升高呈递减趋势, 推测与基质中焦糖色素等非挥发性成分的残留有关, 这些物质经提取富集后仍存在于复溶液中, 在免疫层析过程中, 焦糖色素可能与金标抗体发生非特异性吸附或在 NC 膜上造成背景滞留, 干扰探针在 T 线和 C 线的特异性结合, 导致回收率偏低且波动较大^[38]。米醋仅在低浓度组 RSD 略高于 10%, 中、高浓度组 RSD 分别为 8.1% 和 2.6%, 符合低浓度下仪器读数信噪比低、相对误差易被放大的普遍规律。总体而言, 3 种基质中回收率整体处于 80%~120% 的可接受范围内, 表明该方法在酱油、可乐和米醋中

的准确度能够满足实际样品检测的要求。

表1 样品添加回收实验结果
Table 1 Spiked recoveries of samples

Sample	Spiked/ (μg·mL ⁻¹)	Found/ (μg·mL ⁻¹)	Recovery/%	RSD/%
Soy sauce	0.3	0.250±0.036	83.3	14.4
	0.9	0.938±0.036	104.2	3.8
	6	4.946±0.406	82.4	8.2
Cola	0.4	0.442±0.060	110.5	13.6
	1	0.924±0.102	92.4	11.0
	3	2.482±0.254	82.7	10.2
Rice vinegar	0.45	0.424±0.046	94.2	10.8
	1.1	0.942±0.076	85.6	8.1
	6	5.358±0.140	89.3	2.6

2.3.3 一致性仪器确证 将所构建的胶体金免疫层析法应用于酱油和米醋中对羟基苯甲酸甲酯的检测，并以LC-MS/MS作为参比方法。结果如表2及图6A所示，GICA的测定值与LC-MS/MS值呈良好线性相关，相关系数 $r^2=0.94$ ，表明两种方法的检测结果具有良好的一致性，且未出现假阴性和假阳性，证实所建立的胶体金免疫层析方法具有较高的可靠性。

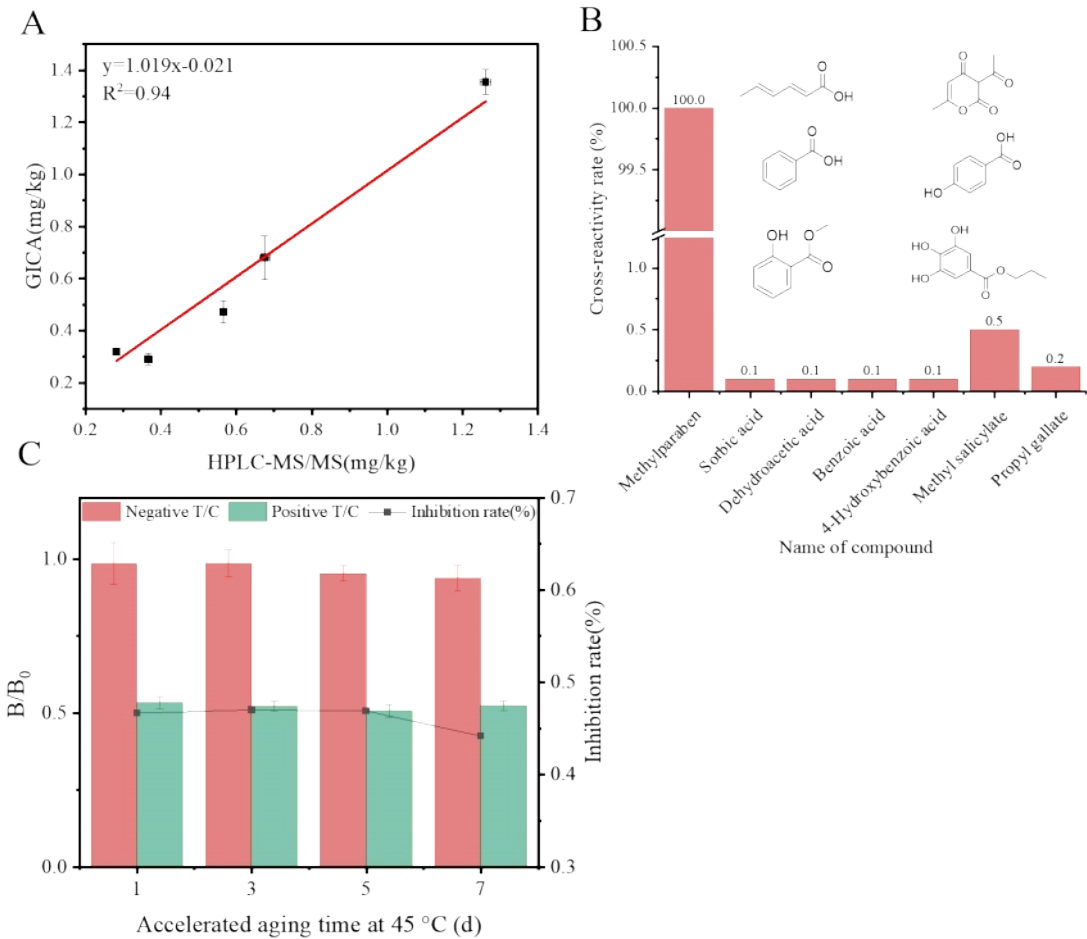


图6 GICA的一致性仪器确证 (A)，交叉反应 (B) 及稳定性实验 (C)

Fig. 6 Consistency verification by instrumental analysis (A), cross-reactivity of GICA (B), stability test (C) of GICA

2.3.4 特异性与稳定性 以6种MeP结构类似物(山梨酸、脱氢乙酸、苯甲酸、对羟基苯甲酸、水杨酸甲酯、没食子酸丙酯)进行交叉反应测试，结果如图6B所示，该方法对各类似物的交叉反应率均低于0.5%，表明建立的GICA特异性良好。本研究通过7 d的45 °C加速老化试验评价了试纸条的储存稳定性(图6C)。在此期间抑制率未见明显下降，表明试纸条中的金标抗体和包被抗原在加速老化条件下保持了较好的生物活性。根据阿伦尼乌斯公式推算，本方法可在25 °C常温条件下保存45~50 d，处

于可接受的时间范围。试纸条的长期稳定性还受包装密封性、储存湿度等因素影响, 实际应用中应确保铝箔袋封装完整及干燥剂足量, 以保证检测性能的稳定性^[39]。

表2 盲样仪器对比实验结果

Table 2 Results of blind sample analysis by instrumental method

Sample No.	GICA / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LC-MS/MS / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Sample No.	GICA / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LC-MS/MS / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
Soy sauce 1	0.318±0.014	0.282±0.002	Rice vinegar 1	0.290±0.022	0.366±0.010
Soy sauce 2	ND	ND	Rice vinegar 2	ND	ND
Soy sauce 3	1.354±0.050	1.262±0.014	Rice vinegar 3	0.680±0.084	0.674±0.014
Soy sauce 4	0.472±0.042	0.566±0.008	Rice vinegar 4	59.314±2.792	58.232±0.222

ND: not detected

3 结 论

本研究基于 MeP 单克隆抗体建立了食品中 MeP 的胶体金免疫层析检测方法, 并系统考察了标记条件与层析参数对检测性能的影响, 确定的最佳实验方案为: 胶体金粒径 21 nm, 抗体标记量 2 μg , 金标探针用量 5 μL , T 线及 C 线包被浓度均为 1.0 mg/mL, 样品垫处理液为含 0.4% Tween-20 的 0.02 mol/L Tris 缓冲液, 层析时间 6 min。在上述最优条件下, 该方法对酱油、可乐和米醋中 MeP 的 cut-off 值均为 18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 线性范围分别为 0.126~6.276 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.282~3.186 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.192~6.228 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 3 种基质的加标回收率为 82.4%~111%, RSD 均不大于 15%。综上所述, 本研究建立的胶体金免疫层析检测方法兼具操作便捷与快速检测的优势, 适用于食品中 MeP 的现场筛查, 可为食品安全日常监测提供有效的技术支撑。

参考文献:

- [1] Liu Y, Sun Y B, Zhang L Y. China Feed (刘颖, 孙永波, 张丽英. 中国饲料), **2021**, (7): 13-16.
- [2] Neri I, Laneri S, Di Lorenzo R, Dini I, Russo G, Grumetto L. *Molecules*, **2022**, 27 (13): 4263.
- [3] Soni M G, Carabin I G, Burdock G A. *Food Chem. Toxicol.*, **2005**, 43 (7): 985-1015.
- [4] Golden R, Gandy J, Vollmer G. *Crit. Rev. Toxicol.*, **2005**, 35 (5): 435-458.
- [5] Chen J W, Li H M, Zhou R R. China Brew. 陈建文, 厉华明, 周荣荣. 中国酿造), **2008**, (8): 4-5.
- [6] Wang X. *Effects of Combined Exposure to Methylparaben and Propylparaben on Ovarian Damage and Oxidative Stress in Drosophila*. Xi'an: Shaanxi Normal University (王霄. 对羟基苯甲酸甲酯和丙酯混合暴露对果蝇卵巢损伤及氧化应激的影响. 西安: 陕西师范大学), **2022**.
- [7] Haman C, Dauchy X, Rosin C, Munoz J F. *Water Res.*, **2015**, 68: 1-11.
- [8] Boberg J, Axelstad M, Svingen T, Mandrup K, Christiansen S, Vinggaard A M, Hass U. *Toxicol. Sci.*, **2016**, 152 (1): 244-256.
- [9] Zhang L, Li X M, Wei Y, Feng C L, Su H L, Liu Y X, Zhao Y N, Li F L, Guo F, Zhang Y, Xue J C. *Environ. Eng.* (张雷, 李雪梅, 魏源, 冯承莲, 苏海磊, 刘玉贤, 赵亚男, 李飞龙, 郭芬, 张远, 薛靖川. 环境工程), **2024**, 42 (4): 91-99.
- [10] Rudel R A, Camann D E, Spengler J D, Korn L R, Brody J G. *Environ. Sci. Technol.*, **2003**, 37 (20): 4543-4553.
- [11] Pérez R A, Alberio B, Miguel E, Sánchez-Brunete C. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 402 (7): 2347-2357.
- [12] Yan Q, Dang C H, Zhang Y. *Mod. Food* (燕群, 党翠红, 张育. 现代食品), **2022**, 28 (9): 133-136.
- [13] Chen G J, Xing H Y, Liu Y, Su J, Yao X Y. *Phys. Test. Chem. Anal.: Chem. Anal.* (陈桂娟, 邢海艳, 刘洋, 苏晶, 姚欣悦. 理化检验-化学分册), **2023**, 59 (2): 184-189.
- [14] Zhou M L, Lu W, Qiao J L, Zhang R, Luo R. *J. Food Ind.* (周美丽, 卢薇, 乔佳璐, 张瑞, 罗瑞. 食品工业), **2024**, 45 (6): 321-323.
- [15] Mei J, Wang S H, Ding G X, Gao Y C, Wang Y B. *Mod. Dis. Control Prev.* (梅洁, 王姝晗, 丁艮晓, 高一纯, 王寅彪. 现代疾病预防控制), **2026**, 37 (3): 238-242.
- [16] Hu J Q, Lei J T, Zhan L J, Zong W, Bai Y H, Jing J Z, Sun X C, Dong C W. *J. Zhengzhou Univ. Light Ind.: Nat. Sci. Ed.* (胡金强, 雷俊婷, 詹丽娟, 纵伟, 白艳红, 景建洲, 孙新城, 董彩文. 郑州轻工业学院学报: 自然科学版), **2014**, 29 (3): 7-11.
- [17] Wu M J, Li N, Hu M, Xu Y, Wang J, Xiang F. *Food Mach.* (吴梦娇, 李宁, 胡梅, 徐燕, 王杰, 向锋. 食品与机械), **2025**, 41 (5): 216-224.
- [18] Cai L Y, Ren Q, Li Y T, Liu Z Y, Qiao J, Yuan N. *Cereals & Oils* (蔡琳雅, 任秦, 李宇, 刘重阳, 乔敬, 苑宁. 粮食与油脂), **2026**, 39 (3): 15-21.
- [19] Zhang W, Zhou C H, Guo Z X, Zheng J, Ye X M, Peng L P. *China Food Saf. Mag.* 张问, 周晨卉, 郭智欣, 郑剑,

- 叶晓媚, 彭丽萍. 食品安全导刊), **2025**, (10): 4-7.
- [20] Yang Z F, Chen L, Lin Q W, Zhang L N Y, Lin S P, Zhu F J. *J. Food Ind.* (杨忠芳, 陈玲, 林青雯, 张刘宁颖, 林舒平, 朱凤鹃. 食品工业), **2024**, 45 (3): 190-194.
- [21] Zhang Y Y, Liang Y L, Luo D F, Zhao J L, Zhu L Y, Chen H Y, Shen Y D. *J. Instrum. Anal.* (张咏仪, 梁颖琳, 罗鼎峰, 赵金利, 朱亮宇, 陈浩宇, 沈玉栋. 分析测试学报), **2025**, 44 (9): 1985-1993.
- [22] GB 5009.31-2025. National Food Safety Standard—Determination of p-Hydroxybenzoic Acid Esters in Foods. National Standards of the People's Republic of China (食品安全国家标准 食品中对羟基苯甲酸酯类化合物的测定. 中华人民共和国国家标准).
- [23] Fagúndez P, Botasini S, Tosar J P, Méndez E. *Heliyon*, **2021**, 7 (6): e07392.
- [24] Peng Y P. *Preparation, Characterization of Nano-Immunospheres and Their Application in Immunochromatographic Assay*. Guangzhou: South China University of Technology (彭运平. 纳米免疫微球的制备、表征及在免疫层析检测中的应用研究. 广州: 华南理工大学), **2013**.
- [25] Yang J Y. *Regulation of Optical Properties of Gold Nanostructures and Its Application in Elemental Speciation Analysis and Microbial Identification*. Shenyang: Northeastern University (杨健宇. 金纳米结构光学性质调控及其在元素形态分析和微生物鉴定中的应用. 沈阳: 东北大学), **2021**.
- [26] Safenkova I V, Zherdev A V, Dzantiev B B. *J. Immunol. Meth.*, **2010**, 357 (1/2): 17-25.
- [27] Xie G F, Lai F, Wang Y R, Zhou X L, Wang X L, Cai T. *China Food Saf. Mag.* (谢桂芳, 赖飞, 王艺蓉, 周雪丽, 王晓鹭, 蔡滔. 食品安全导刊), **2023**, (32): 181-185.
- [28] Zhou W L. *China Food Saf. Mag.* (周文兰. 食品安全导刊), **2024**, (27): 133-136.
- [29] Xu Y. *Mod. Food* (徐颖. 现代食品), **2022**, 28 (2): 69-71.
- [30] Chen H Z. *China Food Saf. Mag.* (陈慧贞. 食品安全导刊), **2021** (36): 172-174.
- [31] Cavallera S, Stanzani S, Serra T, Testa V, Di Nardo F, Baggiani C, Anfossi L. *Toxins*, **2025**, 17 (11): 557.
- [32] Hsieh H, Dantzler J, Weigl B. *Diagnostics*, **2017**, 7 (2): 29.
- [33] Amini M, Pourmand M R, Faridi-Majidi R, Heiat M, Mohammad Nezhady M A, Safari M, Noorbakhsh F, Baharifar H. *J. Exp. Nanosci.*, **2020**, 15 (1): 266-279.
- [34] de Castro R B, de Souza A C A, da Rocha Torres Pavione N, Badaró de Moraes J V, Ribeiro I C, de Melo Agripino J, Bressan G C, de Souza Vasconcellos R, Silva-Júnior A, Fietto J L R. *Anal. Biochem.*, **2022**, 646: 114648.
- [35] Song J, He T T, Qi D Q. *Mod. Food* (宋皎, 何婷婷, 齐冬琴. 现代食品), **2022**, 28 (21): 75-77.
- [36] Wang Y P. *Food Ind.* (王艳平. 食品界), **2025**, (4): 29-31.
- [37] GB 2760-2024. National Food Safety Standard for Uses of Food Additives. National Standards of the People's Republic of China (食品安全国家标准 食品添加剂使用标准. 中华人民共和国国家标准).
- [38] Chen W X, Wang Z E. *Chin. Foreign Food Ind.* 陈晚霞, 王志娥. 中外食品工业), **2026**, (1): 136-139.
- [39] Xiang H J, Tian X M. *J. Food Saf. Qual.* (相海峽, 田秀梅. 食品安全质量检测学报), **2026**, 17 (10): 140-147.

(责任编辑: 盛文彦)