

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2022.04.022

刘洪美, 郑梦瑶, 袁华山, 等. 基于时间分辨荧光纳米微球的伏马毒素 B1 快速定量检测卡的制备及应用[J]. 粮油食品科技, 2022, 30(4): 164-171.

LIU H M, ZHENG M Y, YUAN H S, et al. Preparation and application of time-resolved fluorescent nanospheres based rapid quantitative detection card of fumonisin B1[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2022, 30(4): 164-171.

基于时间分辨荧光纳米微球的 伏马毒素 B1 快速定量 检测卡的制备及应用

刘洪美¹, 郑梦瑶¹, 袁华山², 王平东², 赵 皖³,
肖理文³, 叶 金¹, 王松雪¹✉

1. 国家粮食和物资储备局科学研究院 粮油质量安全研究所, 北京 102629;
2. 南京中储粮粮油质监中心有限公司, 江苏 南京 211151;
3. 南京微测生物科技有限公司, 江苏 南京 210031)

摘 要: 为了满足粮食谷物中伏马毒素 B1 快速定量检测的需求, 以伏马毒素 B1 为研究对象, 建立了基于时间分辨荧光纳米微球的 FB1 荧光快速定量检测卡, 检测前无需调整样品提取液 pH, 并借助酶联免疫试剂盒及高效液相色谱法分析对比了该荧光定量快速检测卡在粮食谷物(大米、玉米、小麦)中的检测性能。结果表明其检测不同样品的 LOD 在 35.37~37.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间, LOQ 在 117.9~123.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 之间, 灵敏度良好; 线性范围均为 250~6 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 相关系数 R^2 在 0.997 2~0.999 5 之间; 不同样品中 6 个添加水平的加标回收率为 83.38%~114.66%, 变异系数(CV)小于 15%, 准确性和重复性良好; 国标液相色谱法和伏马毒素 B1 荧光定量快速检测卡同时检测 FB1 污染的不同样品, 检测结果的符合度为 92.53%~106.26%, CV 小于 10.37%; 与其他常见的 5 种真菌毒素的交叉反应率均小于 5%, 且添加浓度和检出浓度的差异极显著, 表明特异性良好。因此, 所制备的 FB1 荧光定量快速检测卡能够满足粮食谷物中伏马毒素 B1 现场化快速定量检测的需求。

关键词: 伏马毒素 B1; 快速定量检测; 时间分辨荧光; 纳米微球; 荧光定量免疫层析

中图分类号: TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2022)04-0164-08

网络首发时间: 2022-07-01 13:52:27

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.ts.20220630.1041.003.html>

收稿日期: 2022-02-19

基金项目: 中国科协青年人才托举工程项目(2021QNRC001); 国家自然科学基金(81803712); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZX1922, ZX2001); 广西重点研发计划(桂科 AB20238018)

Supported by: Young Elite Scientists Sponsorship Program by CAST (No. 2021QNRC001); National Natural Science Foundation of China (No. 81803712); Fundamental Research Funds of non-profit Central Institutes (No. ZX1922, ZX2001); the Key Research and Development Project of Guangxi Province (No. AB20238018)

作者简介: 刘洪美, 女, 1989 年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为粮油质量安全检测。E-mail: lhm@ags.ac.cn.

通讯作者: 王松雪, 男, 1977 年出生, 博士, 研究员, 研究方向为粮油质量安全检测。E-mail: wsx@ags.ac.cn.

Preparation and Application of Time-resolved Fluorescent Nanospheres Based Rapid Quantitative Detection Card of Fumonisin B1

LIU Hong-mei¹, ZHENG Meng-yao¹, YUAN Hua-shan², WANG Ping-dong²,
 ZHAO Wan³, XIAO Li-wen³, YE Jin¹, WANG Song-xue¹✉

(1. Institute of Grain and Oil Quality and Safety, Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 102629, China; 2. Nanjing Storage Grain Oil Quality Supervision Center Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu 211151, China;
 3. Nanjing Microtest Biotechnology Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu 210031, China)

Abstract: In order to meet the needs of rapid quantitative detection of fumonisin B1 (FB1) in grains, this paper takes fumonisin B1 as the research object, and creates a rapid quantitative detection card of FB1 on the basis of time-resolved fluorescent nanospheres, with no need to adjust the PH of samples before detection. The detection performance of the detection card in grains (rice, corn, wheat) was analyzed and compared with enzyme-linked immunosorbent assay kit and high performance liquid chromatography. The LOD for different samples was in the range of 35.37~37.17 $\mu\text{g}/\text{kg}$, and the LOQ was 117.9~123.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$, which meant good sensitivity; the linear range was 250~6 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, while the correlation coefficient R^2 was in the range of 0.997 2~0.999 5; the spiking recoveries at 6 spiked levels in different samples were in the range of 83.38%~114.66%, with the coefficient of variation (CV) less than 15%, which meant good accuracy and repeatability. When the national standard liquid chromatography and FB1 fluorescence quantitative rapid detection card simultaneously detects different samples contaminated by FB1, the coincidence of the detection results was in the ranger of 92.53%~106.26%, with the CV less than 10.37%. The cross-reaction rate of other five common mycotoxins was less than 5%. Meanwhile, the difference between the spiked concentration and their average detected concentration was extremely significant, indicating good specificity. Hence, the FB1 fluorescence quantitative detection card prepared in this study could meet the needs of on-site rapid quantitative detection of fumonisin B1 in grains.

Key words: Fumonisin B1; rapid quantitative detection; time-resolved fluorescent; nanospheres; fluorescence quantitative immunochromatography

伏马毒素 (Fumonisin, 简称为 FB), 又称烟曲霉毒素, 是由串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme* Sheld)、黑曲霉 (*Aspergillus nigri*)、链格孢霉菌 (*Alternaria alternata*) 产生的水溶性有毒次级代谢产物^[1], 广泛存在于玉米、小麦、大麦、大米、燕麦等粮食作物及其制品中^[1-3]。目前, 已鉴定出的伏马毒素约有 28 种, 根据 R 基基团的不同, 可分为伏马毒素 A (FA1)、伏马毒素 B (FB1 和 FB2)、伏马毒素 C (FC) 和伏马毒素 P (FP) 四大类, 其中 FB1 毒性最强^[4-5], 已被国际癌症研究中心列为 2B 级致癌物^[6], 可引发人的食道癌、马科动物的神经功能紊乱、猪的肺水肿, 以及啮齿类动物的肾毒性和肝毒性等^[4,7-10]。为此, 国际食品法典委员会规定未处理的玉米中伏马毒素 B1 和 B2 含量不得超过 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[11]。我国现行标准

GB 13078—2017《饲料卫生标准》规定猪、兔、马的配合饲料中伏马毒素 (B1+B2) 的限量值不超过 5 mg/kg 。

目前, 我国市场上伏马毒素的检测主要有以下几种方法: (1) 精密仪器检测法包括高效液相色谱法、高效液相色谱串联质谱法等^[12-18], 该方法检测准确度高、精密度高、重现性好, 但对操作人员和实验环境要求较高, 前处理过程复杂, 且仪器使用和维护成本高, 很难应用于现场快速检测^[19-25]。(2) 酶联免疫吸附法为早期的快检方法, 因其检测结果相对准确, 仪器使用成本低, 在早期应用中较为广泛^[22]。但是, 每次检测前, 酶联免疫吸附法都需要根据不同的检测环境现做标准曲线, 对实验人员操作要求高, 检测时间也长, 而且需要额外的试剂来稳定抗体^[23]。近年来,

随着测流层析技术的发展,酶联免疫吸附法正逐步被替代,甚至是淘汰^[24]。(3)胶体金免疫层析法虽然前处理步骤简便,使用快捷,无需使用大型且昂贵的仪器和专业的操作人员,可直接肉眼观察是否超标,但是受温湿度影响较大,存在假阴性和假阳性、灵敏度低的缺点^[24,26]。荧光纳米材料凭借高灵敏度和良好的选择性而具有很好的应用前景。

时间分辨荧光纳米微球(Time Resolved Fluorescent nanospheres)通常将 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 、 Sm^{3+} 和 Dy^{3+} 等长效荧光的镧系稀土离子包裹在聚苯乙烯材料或螯合负载在氧化硅纳米粒子中,以提高镧系配合物的荧光强度,避免荧光猝灭。其中, Eu^{3+} 应用较多,具有斯托克位移大(276 nm),荧光寿命长(ns级)的优点,可有效避免激发光和被检物中非特异荧光干扰。本研究以时间分辨荧光纳米微球(Eu^{3+})为标记物,制备了一种基于时间分辨荧光纳米微球的FB1荧光快速定量检测卡,该检测卡结合了时间分辨荧光微球技术、测流层析技术以及免疫分析技术的优势,适用于FB1现场快速便携式定量检测,具有灵敏度高、线性范围宽、试剂的稳定性良好、操作简单、检测效率高,产品便于储存等优点。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

伏马毒素B1标准品:ROMER国际贸易(北京)有限公司;伏马毒素B1完全抗原(FB1-BSA)、鼠源FB1单克隆抗体、山羊抗小鼠IgG(H+L)、200 nm羧基修饰的时间分辨荧光纳米微球(Eu ,激发波长365 nm、发射波长615 nm):上海飞测生物科技有限公司;硝酸纤维素膜(Sartorius CN140):赛多利斯(上海)贸易有限公司;样品垫(SB08)、聚氯乙烯(Polyvinyl chloride, PVC, SMA31-40)底板、A-9塑料卡和吸收垫(CH37K):上海金标生物科技有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS):美国Sigma-Aldrich公司;所有其它分析纯化学试剂:上海国药集团化学试剂有限公司;实验用水均为娃哈哈纯净水:杭州娃哈哈集团有限公司;实验所需样品(玉米、小麦、大

米):超市购入或从企业取得。

1.2 仪器与设备

荧光定量快速检测仪(型号:FD-600)、检测卡恒温孵育器(型号:FD-2200)、MD-12旋涡混匀器(型号:MD-12):上海飞测生物科技有限公司;XYZ 3050三维喷点平台:美国Biodot公司;HGS20可编程切条机:杭州峰航科学仪器有限公司;高速离心机:上海湘仪离心机仪器有限公司;电子天平(型号:BSA3202S-CW):赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;试管旋转混匀仪:赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 FB₁荧光定量快速检测卡的制备

1.3.1.1 荧光探针的制备 时间分辨荧光纳米微球表面的羧基和鼠源FB1单克隆抗体的氨基通过酰胺键连接制备荧光探针。具体的偶联过程如下:准确移取100 μL 超声混匀后的时间分辨荧光纳米微球和900 μL MES缓冲液(0.05 mol/L, pH 6.0),12 000 r/min离心10 min,去上清,重复两次;加入新鲜配制的40 μL 50 mg/mL碳二亚胺(EDC)溶液和40 μL 50 mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液,置于试管旋转混匀仪上20 r/min旋转混匀活化30 min。活化结束后,12 000 r/min离心10 min,去除过量的活化剂,并加入1 mL Tris-HCl缓冲液(0.02 mol/L, pH 7.0)和鼠源FB1单克隆抗体,置于试管旋转混匀仪上20 r/min反应120 min后,12 000 r/min离心10 min,弃上清。再加入100 μL 50 mg/mL BSA溶液20 r/min封闭60 min。最后,12 000 r/min离心10 min,去上清,加入1 mL保存液(0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液, pH 7.0, 5%蔗糖, 3%海藻糖, 0.1% NaN_3 , 1% BSA和1% Tween-20),得到时间分辨荧光纳米微球标记FB1单克隆抗体复合物,即为荧光探针。

1.3.1.2 NC膜和结合垫的制备 将伏马毒素B1完全抗原(FB1-BSA)用PBS缓冲液(0.01 mol/L, pH 7.4)稀释至0.4 mg/mL,并加入5%的蔗糖溶液封闭,通过XYZ 3050三维喷点平台以0.8 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷涂量将其固定在NC膜上(距离左端10 mm处),作为检测线(T线);将山羊抗小鼠IgG(H+L)稀释至1 mg/mL,并加入5%的蔗

糖溶液封闭,以 $0.8\ \mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷涂量固定在T线右侧 $5\ \text{mm}$ 处,作为C线;将FB1单克隆抗体-时间分辨荧光纳米微球标记复合物喷涂在结合垫上作为荧光标记物结合垫;最后将制备好的NC膜和结合垫 $37\ ^\circ\text{C}$ 干燥 $24\ \text{h}$,保存备用。

1.3.1.3 FB1 荧光定量快速检测卡的组装 在长 $8\ \text{cm}$ 的PVC底板上,依次搭接样品垫、荧光标记物结合垫、划有C/T线的NC膜和吸水纸(相互重叠 $2\ \text{mm}$)组成完整的试纸条,用切条机切成规格为 $60\ \text{mm}\times 4\ \text{mm}$ 的试纸条,放入配套的塑料卡槽,用压壳机压紧,加入1包 $1\ \text{g}$ 的干燥剂, $4\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

1.3.2 样品前处理

取有代表性的待测样品 $500\ \text{g}$ 至 $1\ 000\ \text{g}$,用粉碎机粉碎后过 20 目筛,准确称取 $5\ \text{g}$ 样品粉末于 $50\ \text{mL}$ 离心管中,加入 $25\ \text{mL}$ 样品提取液(80% 甲醇水,含 2% 氯化钠),涡旋混匀提取 $3\ \text{min}$,提取结束后, $4\ 000\ \text{r}/\text{min}$,离心 $2\ \text{min}$,得到样品提取液。取 $100\ \mu\text{L}$ 样品提取液加入 $900\ \mu\text{L}$ 样品稀释液($0.1\ \text{M}$ PBS, 0.2% BSA 和 0.2% Tween 20%),涡旋混匀 $3\sim 5\ \text{s}$ 得到待测样品稀释液,备用。

1.3.3 FB1 荧光定量快速检测卡的检测原理

将待测样品稀释液滴加在加样孔,样品中含有的FB1与结合垫中的时间分辨荧光纳米微球标记的FB1抗体结合,并通过吸水纸提供的动力进行毛细层析作用向前层析,当到达检测T线时,余下未结合的时间分辨荧光纳米微球标记的FB1抗体与T线喷涂的FB1抗原结合,多余的荧光探针与FB1结合形成的荧光复合物在C线处被山羊抗小鼠IgG(H+L)捕获,形成清晰可见的荧光条带。T线上结合的荧光探针量与样品中含有的FB1量成反比,质控线C与FB1含量无关。当 8 分钟反应结束后,通过FD-600型荧光定量快速检测仪读取T值和C值,并计算T/C值,再通过仪器内置伏马毒素B1标准曲线,即可计算出样品中伏马毒素B1的含量。

1.3.4 FB1 荧光定量快速检测卡的使用

取 $100\ \mu\text{L}$ “1.3.2 样品前处理”制备的待测样品稀释液加入到FB1荧光定量快速检测卡的加样孔中,水平放置于FD-2200检测卡恒温孵育器上

$37\ ^\circ\text{C}$ 恒温孵育 $8\ \text{min}$,孵育结束后将检测卡插入FD-600型荧光定量快速检测仪中,读数值即为样品的实际检测浓度值。若检测浓度值大于 $6\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 时,将待测样品稀释液进一步稀释 5 倍后再进行检测,所得读数值乘以对应稀释倍数即为最终检测结果。

1.4 FB1 荧光定量快速检测卡的性能评价

1.4.1 灵敏度和线性范围评价

分别取 10 个无FB1污染的阴性小麦样品、 10 个无FB1污染的阴性玉米样品、 10 个无FB1污染的阴性大米样品,用FB1荧光定量快速检测卡依次检测,每个样品检测 1 次,检出限(Limits of Detection, LOD)为测定平均值加 3 倍标准偏差,定量限(Limits of Quantitation, LOQ)为测定平均值加 10 倍标准偏差,LOD和LOQ越小,灵敏度越高。分别在无FB1污染的阴性小麦样品、无FB1污染的阴性玉米样品、无FB1污染的阴性大米样品中添加FB1标准品,加标水平为 250 、 500 、 $1\ 000$ 、 $2\ 000$ 、 $4\ 000$ 和 $6\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 3 个平行,然后用伏马毒素B1荧光定量快速检测卡进行检测,以添加浓度为横坐标,FB1荧光定量快速检测卡的检测结果为纵坐标进行线性回归,并计算相关系数。

1.4.2 准确度和重复性评价

分别在无FB1污染的小麦、玉米和大米样品中添加FB1标准品溶液,加标水平为 250 、 500 、 $1\ 000$ 、 $2\ 000$ 、 $4\ 000$ 和 $6\ 000\ \mu\text{g}/\text{kg}$, 3 个平行,依次用FB1荧光定量快速检测卡检测,计算加标回收率和变异系数,以加标回收率表征准确度,以变异系数表征重复性。

1.4.3 与色谱法的对比

取 2 个自然FB1污染的小麦样品、 2 个自然FB1污染的玉米样品和 2 个自然FB1污染的大米样品, 3 个平行,分别采用国标液相色谱法^[27]和FB1荧光定量快速检测卡进行检测,并计算两种检测结果的符合度(符合度= $x/y\times 100\%$, x :FB1荧光定量快速检测卡 3 次检测结果的平均值, y :液相色谱法 3 检测结果的平均值)。

1.4.4 特异性评价

考察该FB1荧光定量快速检测卡的特异性,以避免交叉反应的发生,保证检测结果的准确性。

分别将其他常见的五种真菌毒素标准品 (T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素) 添加在阴性玉米样品中, 加标水平为 1 000 μg/kg, 3 个平行, 然后用 FB1 荧光定量快速检测卡进行检测, 计算每种毒素的交叉反应率 (交叉反应率=测定值/添加浓度×100%), 交叉反应率越小, 表明特异性越好。同时, 采用方差分析中的无重复双因素分析法对添加浓度和检出浓度进行差异显著性分析, 计算两组数据的 P-value, 若 P-value 大于 0.01, 小于 0.05, 表明差异显著; P-value 小于 0.01, 表明差异极显著; 若 P-value 大于 0.05, 表明两组数据无差异。

2 结果与分析

2.1 不同 pH 对 FB1 荧光定量快速检测卡和 FB1 酶联免疫试剂盒的影响

选择玉米加工副产物为检测对象, 分别将离心后上清液的 pH 调至 2、4、6、8、10 和 12 共 6 个 pH 梯度, 3 个平行, 分别使用 FB1 荧光定量快速检测卡和 FB1 酶联免疫试剂盒检测, 并计算与色谱法检测结果的符合度。检测数据见图 1, FB1 荧光定量快速检测卡检测不同 pH 上清液的结果符合度为 104.12%~111.28%, 变异系数 CV 为 5.63%~9.91%, FB1 酶联免疫试剂盒检测不同 pH 上清液的结果符合度为 106.99%~119.01%, 变异系数 CV 为 8.20%~14.70%, 表明提取液的 pH 在 2~12 范围内可以直接检测无需调整 pH, 且 FB1 荧光定量快速检测卡的符合度和重复性略好于 FB1 酶联免疫试剂盒。

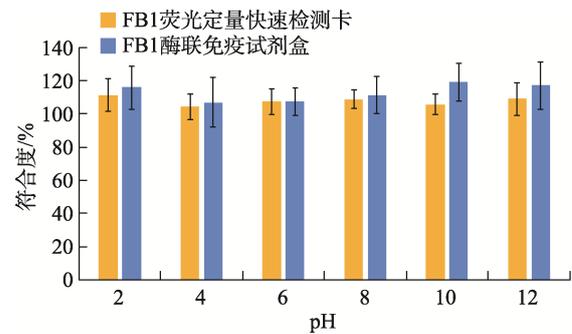


图 1 不同 pH 对 FB1 荧光定量快速检测卡和 FB1 酶联免疫试剂盒的影响

Fig.1 Effects of different pH on FB1 fluorescence quantitative rapid detection card and FB1 enzyme-linked immunosorbent assay kit

2.2 FB1 荧光定量快速检测卡的性能评价

2.2.1 灵敏度和线性范围评价

10 个无 FB1 污染的阴性小麦样品、10 个无 FB1 污染的阴性玉米样品、10 个无 FB1 污染的阴性大米样品的检测结果如表 1 所示, 表明 FB1 荧光定量快速检测卡检测大米的 LOD 为 35.37 μg/kg, LOQ 为 117.90 μg/kg, 检测小麦的 LOD 为 36.00 μg/kg, LOQ 为 120.00 μg/kg, 检测玉米的 LOD 为 37.17 μg/kg, LOQ 为 123.9 μg/kg, 表明 FB1 荧光定量快速检测卡的灵敏度良好。FB1 荧光定量快速检测卡检测小麦、玉米和大米的线性范围均为 250~6 000 μg/kg, 回归方程和相关系数分别为: 大米, $y=1.036 3x-59.117$, 相关系数 $R^2=0.997 2$; 小麦, $y=1.048 4x+4.179 4$, 相关系数 $R^2=0.999 5$; 玉米, $y=1.084 3x-1.607 9$, 相关系数 $R^2=0.999 3$, FB1 荧光定量快速检测卡线性范围较宽且线性关系良好。

表 1 伏马毒素 B1 荧光定量快速检测卡的检出限和定量限

Table 1 Limit of detection and Limit of quantitation of fumonisin B1 fluorescence quantitative rapid detection card

样本	平行实验	检测浓度/(μg/kg)	浓度平均值/(μg/kg)	SD/(μg/kg)	检出限/(μg/kg)	定量限/(μg/kg)
大米	1	13.65	21.38	11.79	35.37	117.90
	2	38.13				
	3	17.96				
	4	41.57				
	5	17.59				
	6	10.71				
	7	31.14				
	8	21.09				
	9	5.89				
	10	16.02				

续表 1

样本	平行实验	检测浓度/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	浓度平均值/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	SD/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	检出限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	定量限/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
小麦	1	41.41	22.57	12.00	36.00	120.00
	2	4.82				
	3	23.09				
	4	35.72				
	5	32.66				
	6	16.91				
	7	9.04				
	8	17.70				
	9	14.67				
	10	29.68				
玉米	1	6.49	20.86	12.39	37.17	123.00
	2	25.07				
	3	17.72				
	4	26.00				
	5	3.78				
	6	17.97				
	7	15.48				
	8	23.39				
	9	48.71				
	10	24.00				

2.2.2 准确度和重复性分析

FB1 荧光定量快速检测卡的检测结果 (表 2) 表明不同粮食谷物中 FB1 的回收率为 83.38%~114.66%，变异系数小于 15%，表明 FB1 荧光定量快速检测卡的准确度和重复性良好。

2.2.3 与色谱法的对比

FB1 荧光定量快速检测卡的检测结果和国标液相色谱法检测结果的符合度, 如表 3 所示, 不同粮食谷物中 FB1 检测结果的符合度为 92.53%~106.26%，变异系数在 10.37%以内, 表明 FB1 荧

表 2 不同样本检测的准确性和重复性

Table 2 Accuracy and repeatability of detection for different samples

样本	平行实验	伏马毒素 B1 标准品添加量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)					
		250	500	1 000	2 000	4 000	6 000
大米	1	225.05	602.50	816.42	1 928.78	4 027.73	6 057.10
	2	213.47	579.59	976.94	1 827.53	4 205.59	5 980.19
	3	274.70	504.77	890.90	1 760.04	4 512.15	6 298.21
	检测平均值	237.74	562.29	894.75	1 838.78	4 248.49	6 111.83
	回收率/%	95.10	112.46	89.48	91.94	106.21	101.86
	变异系数 CV/%	13.68	9.09	8.98	4.62	5.77	2.71
小麦	1	217.71	584.26	1 168.06	2 007.34	4 429.64	6 125.97
	2	227.50	470.28	1 069.40	2 339.63	3 821.55	6 578.15
	3	180.15	517.75	1 202.48	1 945.90	4 189.92	6 245.00
	检测平均值	208.45	524.10	1 146.65	2 097.62	4 147.04	6 316.37
	回收率/%	83.38	104.82	114.66	104.88	103.68	105.27
	变异系数 CV/%	11.99	10.92	6.02	10.10	7.39	3.71
玉米	1	283.42	524.76	1 044.78	2 144.85	4 241.94	6 237.54
	2	217.50	457.08	951.96	2 368.10	4 627.69	6 477.95
	3	280.26	481.44	1 174.66	2 216.22	4 387.48	6 582.25
	检测平均值	260.39	487.76	1 057.13	2 243.06	4 419.04	6 432.58
	回收率/%	104.16	97.55	105.71	112.15	110.48	107.21
	变异系数 CV/%	14.28	7.03	10.58	5.08	4.41	2.75

表 3 伏马毒素 B1 荧光定量快速检测卡与色谱法检测结果的对比

Table 3 Comparison of the results of Fumonisin B1 by fluorescence quantitative rapid detection card and chromatography

样本	大米	大米	小麦	小麦	玉米	玉米
色谱值/(μg/kg)	1 420.85	1 025.47	1 022.97	1 167.39	4 125.74	2 568.99
平行样 1/(μg/kg)	1 521.85	1 125.54	1 029.27	1 020.31	3 813.22	2 462.11
平行样 2/(μg/kg)	1 410.27	1 007.89	1 127.53	1 209.44	4 239.17	2 679.15
平行样 3/(μg/kg)	1 597.46	1 101.20	1 006.79	1 010.83	4 109.68	2 697.68
检测平均值/(μg/kg)	1 509.86	1 078.21	1 054.53	1 080.19	4 054.02	2 612.98
符合度/%	106.26	105.14	103.09	92.53	98.26	101.71

光定量快速检测卡和国标液相色谱法的检测结果符合度良好。

2.2.4 方法特异性分析

五种常见真菌毒素(T-2 毒素、赭曲霉毒素 A、黄曲霉毒素 B₁、玉米赤霉烯酮、呕吐毒素)的交

叉反应率均小于 5% (表 4)。五种常见真菌毒素的添加浓度和检出平均值的 P-value 为 0.005 6<0.01, 表明添加浓度和检出浓度的差异极显著。因此, 交叉反应率和方差分析的结果均表明 FB1 荧光定量快速检测卡的特异性良好。

表 4 伏马毒素 B1 荧光定量快速检测卡的特异性

Table 4 Specificity of the fumonisin B1 fluorescent quantitative rapid detection card

项目	伏马毒素 B1	T-2 毒素	赭曲霉毒素 A	黄曲霉毒素 B1	玉米赤霉烯酮	呕吐毒素
添加浓度/(μg/kg)	1 000.00	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
平行样 1/(μg/kg)	1 121.03	31.31	26.56	41.45	21.61	30.09
平行样 2/(μg/kg)	1 045.97	40.17	35.68	50.45	33.91	26.78
平行样 3/(μg/kg)	1 029.86	31.13	26.23	41.77	33.06	30.75
检测平均值/(μg/kg)	1 065.62	34.20	29.49	44.56	29.53	29.21
交叉反应率/%	100.00	3.21	2.77	4.18	2.77	2.74

3 结论

本研究以时间分辨荧光微球标记的单克隆抗体为荧光探针, 基于测流层析原理和竞争抑制的原理建立了伏马毒素 B1 荧光定量快速检测卡用于不同粮食谷物样本中 FB1 的快速定量测定。样品提取液的 pH 在 2~12 范围内, 该伏马毒素 B1 荧光定量快速检测卡可以直接检测无需调整 pH。FB1 荧光定量快速检测卡性能评估结果表明, 其检出限和定量限远低于伏马菌素的限量标准; 在 250~6 000 μg/kg 范围内具有良好的线性关系 (R^2 大于 0.99); 检测结果与国标液相色谱法的符合度较好; 具有良好的准确性、重复性和特异性。因此, 本研究开发了一种低成本、操作简单、可准确定量的 FB1 荧光定量快速检测卡, 适用于现场大批量样品种 FB1 的场快速、定量检测, 可减少在大量样品检测时对大型昂贵仪器的依赖。

参考文献:

[1] FARHADI A, FAKHRI Y, KACHUEI R, et al. Prevalence

and concentration of fumonisins in cereal-based foods: a global systematic review and meta-analysis study[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(17): 20998-21008.

[2] MATSUO Y, TAKAHARA K, SAGO Y, et al. Detection of N-(1-deoxy-D-fructos-1-yl) fumonisins B₂ and B₃ in corn by high-resolution LC-Orbitrap MS[J]. Toxins, 2015, 7(9): 3700-3714.

[3] CHEN J, WEN J, TANG Y, et al. Research progress on Fumonisin B₁ contamination and toxicity: a review[J]. Molecules, 2021, 26(17): 5238.

[4] LIU X, FAN L, YIN S, et al. Molecular mechanisms of fumonisin B₁-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions[J]. Toxicon, 2019, 167: 1-5.

[5] DUTTON M F. Fumonisins, mycotoxins of increasing importance: their nature and their effects[J]. Pharmacology & therapeutics, 1996, 70(2): 137-161.

[6] JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES. MEETING. Safety evaluation of certain mycotoxins in food[M]. Food & Agriculture Org, 2001.

[7] YU S, JIA B, LIU N, et al. Fumonisin B₁ triggers carcinogenesis via HDAC/PI3K/Akt signalling pathway in human esophageal epithelial cells[J]. Science of The Total Environment, 2021, 787: 147405.

[8] TYSKA D, MALLMANN A O, VIDAL J K, et al.

- Multivariate method for prediction of fumonisins B₁ and B₂ and zearalenone in Brazilian maize using Near Infrared Spectroscopy (NIR)[J]. *PloS one*, 2021, 16(1): e0244957.
- [9] WANG X, WU Q, WAN D, et al. Fumonisin: oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in vivo and in vitro[J]. *Archives of toxicology*, 2016, 90(1): 81-101.
- [10] CHEN J, WEI Z, WANG Y, et al. Fumonisin B₁: Mechanisms of toxicity and biological detoxification progress in animals[J]. *Food and chemical toxicology*, 2021, 149: 111977.
- [11] ESKOLA M, KOS G, ELLIOTT C T, et al. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2020, 60(16): 2773-2789.
- [12] SMITH L L, FRANCIS K A, JOHNSON J T, et al. Quantitation of fumonisin B₁ and B₂ in feed using FMOc pre-column derivatization with HPLC and fluorescence detection[J]. *Food chemistry*, 2017, 234: 174-179.
- [13] DE BAERE S, CROUBELS S, NOVAK B, et al. Development and validation of a UPLC-MS/MS and UPLC-HR-MS method for the determination of fumonisin B₁ and its hydrolysed metabolites and fumonisin B₂ in broiler chicken plasma[J]. *Toxins*, 2018, 10(2): 62.
- [14] ZHANG S, ZHOU S, YU S, et al. LC-MS/MS analysis of fumonisin B₁, B₂, B₃, and their hydrolyzed metabolites in broiler chicken feed and excreta[J]. *Toxins*, 2022, 14(2): 131.
- [15] WANG W, ZHANG Q, MA F, et al. Simultaneous determination of aflatoxins, fumonisin B₁, T-2 and cyclopiazonic acid in agri-products by immunomagnetic solid-phase extraction coupled with UHPLC-MS/MS[J]. *Food Chemistry*, 2022: 132020.
- [16] TONTI S, MANDRIOLI M, NIPOTI P, et al. Detection of fumonisins in fresh and dehydrated commercial garlic[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(32): 7000-7005.
- [17] KECSKEMÉTI Á, NAGY C, BIRÓ P, et al. Analysis of fumonisin mycotoxins with capillary electrophoresis-mass spectrometry[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2020, 37(9): 1553-1563.
- [18] NAKAGAWA H, HASHIMOTO R, MATSUO Y, et al. Detection and determination of Fumonisin B₁, B₂, and B₃ contaminating Japanese domestic wine by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)[J]. *Current Microbiology*, 2020, 77(10): 3057-3064.
- [19] REN W, XU Y, HUANG Z, et al. Single-chain variable fragment antibody-based immunochromatographic strip for rapid detection of fumonisin B₁ in maize samples[J]. *Food Chemistry*, 2020, 319: 126546.
- [20] 于瑶, 李岩松, 卢士英, 等. 玉米中伏马毒素 B₁、B₂ 间接竞争酶联免疫吸附方法的建立[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(23): 193-197.
- YU Y, LI Y S, LU S Y, et al. An indirect competitive ELISA method for detecting fumonisin B₁ and B₂ in maize[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46(23): 193-197.
- [21] 王琦, 杨庆利, 吴薇. 基于氧化石墨烯的荧光适配体传感器检测食品中真菌毒素[J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 318-322.
- WANG Q, YANG Q L, WU W. A graphene oxide-based fluorescent aptasensor for determination of mycotoxins in foods[J]. *Food Science*, 2021, 42(24): 318-322.
- [22] MUNAWAR H, SAFARYAN A H M, DE GIROLAMO A, et al. Determination of Fumonisin B₁ in maize using molecularly imprinted polymer nanoparticles-based assay[J]. *Food chemistry*, 2019, 298: 125044.
- [23] CHOTCHUANG T, CHEEWASEDTHAM W, JAYEOYE T J, et al. Colorimetric determination of fumonisin B₁ based on the aggregation of cysteamine-functionalized gold nanoparticles induced by a product of its hydrolysis[J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(9): 1-10.
- [24] SHENG W, WU H, JI W, et al. Visual non-instrumental on-site detection of fumonisin B₁, B₂, and B₃ in cereal samples using a clean-up combined with gel-based immunoaffinity test column assay[J]. *Toxins*, 2018, 10(4): 165.
- [25] ZHANG L, SUN Y, LIANG X, et al. Cysteamine triggered "turn-on" fluorescence sensor for total detection of fumonisin B₁, B₂ and B₃[J]. *Food Chemistry*, 2020, 327: 127058.
- [26] 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+291.
- WANG X, LU D S, ZENG D P, et al. Development of a time-resolved fluorescence immunochromatographic assay for the quantitative determination of AFB₁ and zen in grain[J]. *Modern Food Science & Technology*, 2021, 37(4): 252-261+291.
- [27] 食品中伏马毒素的测定: GB 5009. 240—2016[S].
National food Safety standard-Determination of fumonotoxin in food: GB 5009. 240—2016[S]. 