

“粮油真菌毒素”专题文章之二

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.02.008

顾建华, 严艺琳, 杨婷婷, 等. 玉米赤霉烯酮时间分辨荧光试纸条的制备及特性研究[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(2): 59-65.

GU J H, YAN Y L, YANG T T, et al. Preparation and properties of time-resolved fluorescent strip for zearalenone detection[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(2): 59-65.

玉米赤霉烯酮时间分辨荧光试纸条的制备及特性研究

顾建华¹, 严艺琳², 杨婷婷²✉, 祁苏娴², 张海涛², 王宝春³

1. 苏州市吴中区粮食质量监督管理站, 江苏 苏州 215128;
2. 江苏省苏微微生物研究有限公司, 江苏 无锡 214063;
3. 淮安市城南粮库, 江苏 淮安 223200)

摘要: 研究制备一种基于时间分辨荧光免疫层析法的玉米赤霉烯酮(ZEN)快速定量检测试纸条。采用镧纳米微球作为荧光探针, 标记抗 ZEN 的单克隆抗体, 应用竞争抑制原理建立免疫层析定量方法并对其进行方法学考核。结果表明: ZEN 荧光试纸条的灵敏度为 0.1 ng/mL, 线性范围为 0.1~5.0 ng/mL, 玉米、小麦阴性样品的加标回收率在 93.45%~112.20%之间, 对于同一个样品 5 次重复测定的变异系数小于 15%。ZEN 快速定量检测试纸条具有灵敏度高、反应时间短、准确定量、稳定性好等技术特点, 适用于谷物及制品中玉米赤霉烯酮的快速定量检测。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 时间分辨荧光免疫层析法; 试纸条; 快速定量检测

中图分类号: TS210.7 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)02-0059-07

网络首发时间: 2021-01-29 15:42:06

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3863.TS.20210129.1307.012.html>

Preparation and Properties of Time-Resolved Fluorescent Strip for Zearalenone Detection

GU Jian-hua¹, YAN Yi-lin², YANG Ting-ting²✉, QI Su-xian², ZHANG Hai-tao², WANG Bao-chun³

1. Food Quality Supervision and Management Station of Wuzhong District, Suzhou, Jiangsu 215128, China;
2. Jiangsu Su Wei Institute of Microbiology Co., Ltd., Wuxi, Jiangsu 214063, China;
3. Huai'an Chengnan Grain Depot, Huai'an, Jiangsu 223200, China)

Abstract: The purpose of this study was to prepare a kind of Zearalenone fast quantitative test strip based on time-resolved fluorescence immunochromatographic assay. Europium nanoparticles were used as fluorescent probes to label anti-zearalenone monoclonal antibodies, and a quantitative immunochromatography method was established based on competitive inhibition principle. The results showed that the sensitivity of Zearalenone fluorescent detection strip was 0.1 ng/mL, the linear range was 0.1~5.0 ng/mL, the standard

收稿日期: 2020-10-31

基金项目: 2017 年度江苏省农业科技自主创新资金项目 (CX(17)1003)

Supported by: Jiangsu Agricultural Science and Technology Innovation Fund (No. CX(17)1003)

作者简介: 顾建华, 男, 1970 年出生, 工程师, 研究方向为化学轻工。E-mail: 2417551616@qq.com.

通讯作者: 杨婷婷, 女, 1982 年出生, 硕士, 副研究员, 研究方向为食品安全快速检测。E-mail: 646228723@qq.com.

recovery rate of negative samples of corn and wheat was between 93.45% and 112.2%, and the coefficient of variation of 5 repeats for the same sample was less than 15%. The results show that the Zearalenone fluorescent test strip has the technical characteristics of high sensitivity, short reaction time and accurate quantification, which is suitable for the rapid quantitative detection of Zearalenone in grain and its products.

Key words: Zearalenone; time-resolved fluorescence immunochromatography assay; test strips; rapid quantitative analysis

玉米赤霉烯酮, 又名 F-2 毒素 (Zearalenone, 简称 ZEN), 是一种由镰刀菌属真菌分泌的类雌激素霉菌毒素, 最初从发霉玉米中分离得到, 普遍存在于玉米、小麦、大米、大麦、燕麦等农作物中, 对动物的肝脏等器官造成较大损伤, 在动物体内蓄积, 引起动物机能异常甚至死亡, 给农场造成巨大的影响和经济损失^[1-3]。目前, 世界各地都对食品、谷物和饲料中的玉米赤霉烯酮的含量做了严格的规范, 并制定了相应的玉米赤霉烯酮限量标准。例如欧盟除单独规定玉米外, 对小麦、稻谷等供人直接食用的谷物统一规定玉米赤霉烯酮含量不能超过 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4], 我国《GB 2761—2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中明确规定谷物及其制品中玉米赤霉烯酮的残留限量标准为 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]。因此, 在现如今食品加工和畜牧业生产中, 对这种有害人身体健康的真菌毒素的防控就显得尤为重要。

目前, 常用的检测粮食中玉米赤霉烯酮的方法有: 高效液相色谱法、薄层色谱法、免疫分析方法、液相色谱-质谱法^[6-8]等。HPLC 检测法作为国标中的第一法, 应用最为广泛, 虽然该方法灵敏度较高, 检测极限低, 但此方法检测过程较为复杂, 仪器价格昂贵, 对操作人员要求较高, 操作时间长, 不利于检测技术的现场推广应用。ELISA 法虽然操作简单、灵敏度高, 但不适合现场检测。时间分辨荧光免疫分析测定是一种新一代标记免疫测定技术, 根据镧系元素螯合物的长寿命的发光特点, 用时间分辨技术测量荧光, 通过同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨, 可有效地排除非特异荧光的干扰, 具有灵敏度高、快速、灵活, 试剂无放射性污染等特点^[9-10], 在医疗、环境、食品等领域广泛应用^[11-14]。

“舌尖上的安全”需要以方便、快速、准确、易普及的检测技术作为支撑, 为更好的发挥快检

方法对食品安全监控的基础支撑作用, 在传统的胶体金免疫层析半定量技术基础上, 对抗体标记物及标记技术进行革新, 建立了玉米赤霉烯酮时间分辨免疫层析定量检测法。该方法采用高灵敏度有机荧光纳米微球作为示踪物来标记抗体, 提高了标记物的稳定性。微球包裹的镧元素在 340 nm 紫外光源的照射下发出高强度的荧光, 且该荧光寿命长, 利用延缓测量时间, 待样品基质中自然发生的短寿命荧光 (1~10 ns) 全部衰变后, 再测量稀土元素的特异性荧光, 这样可以更多的排除特异本底荧光的干扰, 解决了食品检测过程中基质干扰问题, 提升了检测的准确度, 适合大批样品的测定, 在市场上更容易受到青睐^[15]。

1 材料与amp;方法

1.1 试剂与仪器

玉米赤霉烯酮标准品 (纯度 $\geq 98\%$)、碳二亚胺 (EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、牛血清白蛋白 (BSA): Sigma-Aldrich 公司; ZEN-BSA 偶联物、抗玉米赤霉烯酮单抗 (纯度 $\geq 95\%$, 蛋白浓度 18.49 mg/mL, 亚型 IgG2a, 亲和常数 9.8×10^7 L/mol, 与 ZEN、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇以及玉米赤霉酮的交叉反应率分别为 100%、95%、38%、133%、69%和 118%): 江苏省苏微微生物研究有限公司制备; 羊抗鼠 IgG (10 mg/mL): 上海杰一生物有限公司; 镧 Eu^{3+} 纳米微球 (平均粒径 200 nm, 表面活性基团-COOH, 激发 365 nm、发射 615 nm): 长沙美牛生物科技有限公司; 硝酸纤维素膜 CN95、CN140: 德国赛多利斯; 硝酸纤维素膜 Pall90: 美国 Pall 公司; 样品垫 (SB08)、吸水纸 (SX27)、PVC 底板 (SM31-25): 上海金标生物科技有限公司; 玉米、小麦等粮食及其制品: 市场购买。

SW-2 时间分辨荧光检测仪、ZEN 亲和柱：江苏省苏微微生物研究有限公司；GL-21M 高速冷冻离心机：湖南湘仪离心机仪器有限公司；HS-3 垂直混匀仪：宁波新芝生物科技股份有限公司；JP-100T 超声机：深圳市洁盟清洗设备有限公司；BPG-9240A 精密鼓风干燥箱：上海精科实业有限公司；HM3035 三维划膜喷金仪、CTS300 数控裁条机、ZQ2000 自动斩切机：上海金标生物科技有限公司；LC-20AT 液相色谱仪：日本岛津公司；色谱柱（HP-C₁₈, 4.6*150 mm, 5 μm）：美国赛芬科技公司。

1.2 实验方法

1.2.1 抗 ZEN 单抗的荧光纳米微球标记

将 200 nm 时间分辨荧光微球超声分散 10 min，取 100 μL 超声后的微球于 2 mL 圆底离心管中，加入 900 μL 超纯水混匀，并超声分散 5 min。分别配制 50 mg/mL N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）与碳二亚胺（EDC）的乙醇溶液，各取 50 μL 加入微球悬液，混匀后于垂直混匀仪上活化 40 min，15 000 r/min 离心 30 min，去上清，加入 1 mL 超纯水，超声 5 min 使微球分散。于活化后的微球悬液中加入抗 ZEN 抗体，置于垂直混匀仪上反应 2 h，加入 BSA 使之最终浓度为 0.5%，封闭 1 h，15 000 r/min 离心 30 min，去上清，加入 1 mL 微球保存液超声分散后冷藏备用。

1.2.2 层析膜的制备

将裁成 25×300 mm 的硝酸纤维素膜，置于三维划膜喷金仪平台上；用含 1.5%蔗糖和 1.5%海藻糖的 PBS（0.01 mol/L/pH7.2）分别溶解 ZEN-BSA 包被抗原和羊抗鼠 IgG 至一定浓度，分别放于存储池 A 和 B；以 1 μL/cm 的划膜量分别将上述溶液划线于 NC 膜中央，形成检测线和质控线印迹，两者相距 4 mm，其中质控线距离试纸条顶端 25 mm；于 45 °C 鼓风干燥箱中干燥 24 h 以上，将层析膜置于铝箔袋中，干燥保存备用。

1.2.3 荧光免疫试纸条的组装

以 PVC 胶粘板作衬板，将层析膜粘贴在衬板的中央。将样品垫、吸水纸分别粘贴在层析膜的两端，并且两垫之间有 1~2 mm 的交联。将组装好的试纸条大板用自动斩切机切割成宽 4 mm、长 60 mm 的板条，装于塑料卡壳中，用压壳机压紧。

放入带干燥剂的铝箔袋中，连续封口机封口后，常温保存。

1.2.4 反应条件的优化

1.2.4.1 荧光微球标记的抗体和包被抗原浓度的优化 将 C 线上二抗的浓度固定为 0.5 mg/mL，通过改变 T 线上 ZEN-BSA 包被抗原和荧光微球标记单抗的浓度，以 ZEN 标准溶液来考察所制成的试纸条，选择荧光背景弱、荧光峰值高，且 T 线与 C 线的荧光强度之比在 1.0~2.0 之间的作为包被抗原与标记抗体的最佳浓度。

1.2.4.2 原材料的选择 选择 Pall 90、Starorius CN140 和 Starorius CN95 三种不同规格的硝酸纤维素膜，按照上述确定的优化条件，用 ZEN 系列标准品溶液（0、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2.5、5、10 ng/mL）点样，观察荧光微球在 NC 膜上的移动速度、背景是否干净等；反应结束后，采用时间分辨荧光免疫分析仪读数，考察线性范围和相关系数（ R^2 ）等，优选出合适的硝酸纤维素膜。

1.2.5 标准曲线的建立

在 1.2.4 确定的最佳优化条件下，准确配制 0.01 mol/L 的 pH 为 7.2 的磷酸盐缓冲液，加入 0.4%的吐温-20，将荧光微球标记的抗 ZEN 抗体以此分析缓冲液稀释至合适倍数作为样品稀释液。将 ZEN 的标准品，用 50%乙腈-水（体积比）定容配制成 410.4 ng/mL 的标准储备溶液；再用 5%甲醇-样品稀释液（体积比）稀释成 0.00、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 ng/mL 浓度标准工作溶液。分别取 100 μL 加至试纸条的样品孔中，25 °C 下反应 10 min，由低浓度到高浓度进行检测，时间分辨荧光仪检测 T 线荧光强度与 C 线荧光强度，计算 T/C 值。以标准工作溶液浓度的自然对数值（lnC）为横坐标，各浓度标准液的 T/C 值与 0 ng/mL 标准液的 T/C 值的比值所得百分比为纵坐标，建立标准曲线。

1.2.6 样品处理与测定

准确称取 5 g 粉碎均匀样本，量取 25 mL 80% 甲醇-水至 50 mL 离心管中，混匀，密封；至漩涡混匀器上涡旋提取 2 min，于离心机中 4 000 r/min 离心 5 min，得上清液。测试前将未开封的检测卡及待检样本平衡至 25 °C；将检测卡平放，用移液器定量吸取 50 μL 清液加入 750 μL

样本稀释液中, 至漩涡混匀器上混匀, 后再吸出 100 μL 此混合液垂直滴加于加样孔中, 开始计时; 反应 10 min 后, 将检测卡放入时间分辨荧光免疫层析检测仪中, 仪器读数完成后会自动计算出被检样本中的 ZEN 含量, 可选择储存及打印结果。

1.2.7 方法学评价

1.2.7.1 检出限与定量限 取 20 组无污染的样品, 用玉米赤霉烯酮定量试纸条对其进行检测, 以空白样品 20 次测定结果的均值加 3 倍的标准差, 即为检出限; 以测定结果的均值加 10 倍的标准差, 即为定量限^[16-17]。

1.2.7.2 稳定性 本实验测试试纸条在 1 年的保存时间是否有效, 根据阿伦尼乌斯公式, 将试纸条是置于 50 °C 老化 23 d 未变质, 相当于室温 1 年有效^[18-19]。本实验将试纸条置于 50 °C 42 d 加速反应后与未加速的试纸条作对比, 考察其稳定性。

1.2.7.3 准确性与重复性 采用空白样品加标回收实验, 在小麦、玉米阴性样本中分别加入低、中、高浓度的 ZEN 标准品, 根据 SW-2 时间分辨荧光检测仪 T/C 值和标准曲线得出检测浓度。加标回收率=(实测浓度-空白浓度)/加标浓度×100%。

1.2.7.4 与 HPLC 法对比验证 选取小麦、玉米等样本共 20 份, 按 1.2.6 方法处理, 同一份样品分别采用 ZEN 荧光试纸条和 IAC-HPLC 法进行测定。结果对比分析, 进一步验证该方法与国家标准方法的一致性。

1.2.7.5 特异性 配制 1.0 ng/mL 的玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 B₁、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A 这 4 种毒素的标准溶液, 用本实验建立的检测方法进行检测。

2 结果与讨论

2.1 反应条件的优化

2.1.1 荧光微球标记单抗浓度及包被抗原划膜质量浓度的确定

不同包被抗原与标记单抗浓度的匹配结果见

表 1, 标记单抗的量越多, 对于不同浓度的 ZEN 抑制率越差, 但单抗用量不可过少, 选择合适的荧光强度之比, 确定划膜浓度为 0.1 mg/mL, 荧光微球标记的单抗终浓度为 0.02 mg/mL。

表 1 包被抗原与标记单抗浓度的确定
Table 1 Determination of the concentration of antigens and labeled antibodies

标记单抗 /mg	ZEN 标准溶液 /(ng/mL)	T 线划膜浓度/(mg/mL)		
		0.05	0.1	0.2
0.01	0	0.395	0.614	0.878
	0.1	0.303	0.442	0.682
	1.0	0.189	0.348	0.393
	5.0	0.072	0.115	0.156
0.02	0	0.921	1.766	2.564
	0.1	0.763	1.469	2.051
	1.0	0.459	0.817	1.184
	5.0	0.194	0.327	0.479
0.05	0	2.192	2.836	3.615
	0.1	1.753	2.408	3.273
	1.0	1.386	1.851	2.398
	5.0	0.704	1.039	1.412

2.1.2 原材料确定

三种硝酸纤维素膜对显色和线性的检测结果见表 2。结果显示, 赛多利斯 CN95 膜的显色速度较快, 背景清晰干净, 且线性良好。从表 3 三种硝酸纤维素膜对荧光强度和 T/C 的影响结果来看, 在同样的 T 线包被浓度下, 赛多利斯 CN95 膜所测出的荧光强度较其他两种膜要高。因此, 从节约原材料成本等方面综合考虑, 最终选择赛多利斯 CN95 膜作为本研究最佳的 NC 膜材料。

表 2 三种规格硝酸纤维素膜对显色和线性的影响
Table 2 Effect of three types of nitrocellulose films on color development and linearity

膜规格	显色速度/s	层析卡背景	线性范围 /(μg/L)	线性相关系数(R ²)
Pall 90	48	干净, 无荧光残留	0.1~10	0.976 4
Starorius CN140	53	干净, 无荧光残留	0.1~10	0.952 9
Starorius CN95	45	干净, 无荧光残留	0.1~10	0.993 3

表 3 三种规格硝酸纤维素膜对荧光强度和 T/C 值的影响

Table 3 Effects of three types of nitrocellulose films on fluorescence intensity and T/C value

膜规格	Pall 90		Starorius CN140		Starorius CN95				
T 值	17 349	18 600	17 987	27 181	21 962	24 811	46 825	55 976	40 042
C 值	56 914	48 951	57 300	42 332	31 478	38 037	28 829	32 620	24 236
T/C	0.305	0.380	0.314	0.642	0.698	0.653	1.624	1.716	1.652

2.2 标准曲线的建立

由图 1 可以发现横坐标采用的是浓度的自然对数，但是通过绘制得到的是平滑的 S 曲线，这与免疫竞争得到的曲线是一致的^[20]；同时在 0.1~5 ng/mL 浓度范围内，有效剂量值即抑制率（以下采用 B/B₀ 表示）在 92%~19%，线性回归相关系数 R² 达 0.993 3，直线方程 $y = -0.183 6x + 0.475 7$ 。由此，确定标准曲线的线性范围，并以此作为以下实验的线性浓度。

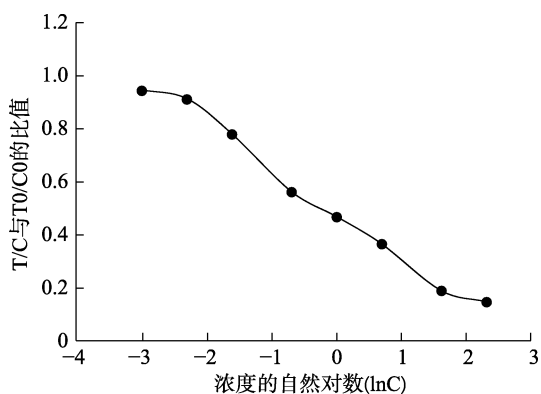


图 1 不同浓度 (0.05~10 ng/mL) 平滑曲线

Fig.1 Smooth curve of different concentrations (0.05~10 ng/mL)

2.3 检测限和定量限的确定

测定结果和计算结果见表 4。方法的检出限为 10.05 μg/kg、定量限为 20.13 μg/kg。

表 4 方法的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) (n=20)

Table 4 The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of wheat flour

测定次数	平均值 \bar{x} / (μg/kg)	标准偏差 S	检出限 LOD / (μg/kg)	定量限 LOQ / (μg/kg)
20	5.73	1.44	10.05	20.13

2.4 稳定性分析

检测结果如图 2 所示，试纸条在 50 °C 存放

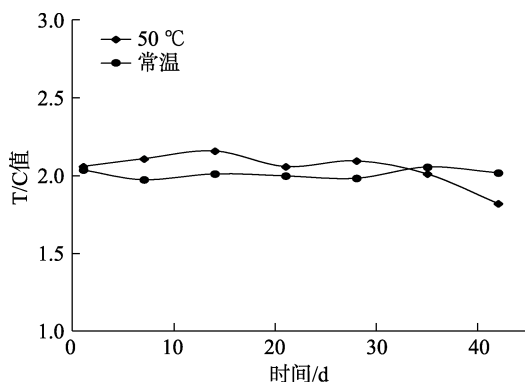


图 2 试纸条稳定性分析

Fig.2 Stability analysis of test strips

28 d 时，T/C 值无明显下降，在 35 d 之后，T/C 值略有下降，说明试纸条在常温下 1 年的稳定性良好。

2.5 准确性和重复性分析

根据国家限量标准，设定 3 个浓度，涵盖低、中、高浓度的加标回收测定。分别对阴性小麦及玉米进行不同水平的 ZEN 加标，加标浓度分别为 20、60 及 120 μg/kg，用 ZEN 荧光试纸条重复测定 5 次，计算平均回收率在 93.45%~112.2% 之间，5 次重复的变异系数在 6.81%~12.31% 之间（见表 5）。

表 5 小麦、玉米不同浓度加标回收率 (n=5)

Table 5 The recovery rate of different concentrations of wheat and corn (n=5)

样本	平行实验	ZEN 添加量/(μg/kg)		
		20	60	120
小麦	1	17.49	59.81	126.03
	2	18.33	54.97	132.24
	3	16.38	66.06	110.93
	4	21.73	61.31	104.73
	5	19.52	68.98	141.56
	检测平均值/(μg/kg)		18.69	62.23
	平均回收率/%	93.45	103.70	102.60
	变异系数 CV/%	10.98	8.79	12.31
玉米	1	23.39	70.78	121.67
	2	22.43	57.23	133.95
	3	20.76	58.26	109.99
	4	24.45	65.04	106.35
	5	21.18	65.73	139.23
	检测平均值/(μg/kg)		22.44	63.41
	平均回收率/%	112.20	105.70	101.90
	变异系数 CV/%	6.81	8.89	11.77

2.6 与 HPLC 法对比验证结果

将两种方法对 20 份典型样品的检测结果进行线性回归分析，结果如图 3，两种方法的线性

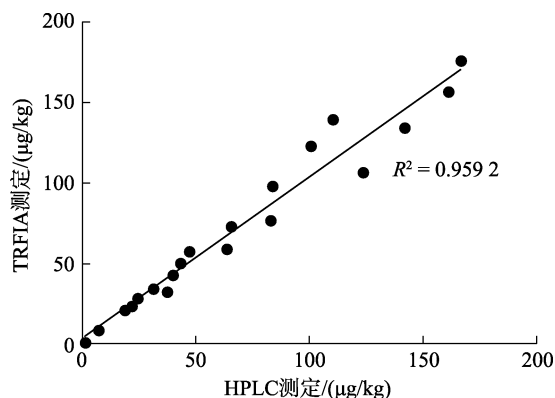


图 3 HPLC 与试纸条测定样品中 ZEN 的相关性

Fig.3 Correlation between HPLC and test strips in the determination of ZEN in samples

回归系数 $R^2=0.9592$, 结果高度相关, 具有良好的一致性。

2.7 试纸条的特异性

用 ZEN 荧光试纸条分别测定 1.0 ng/mL 的玉米赤霉烯酮、黄曲霉毒素 B₁、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A 这 4 种毒素的标准品, 最后计算得出与玉米赤霉烯酮与黄曲霉毒素 B₁、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素 A 基本无交叉反应, 说明该产品特异性良好。

3 结论

本研究基于抗原抗体的特异性免疫反应原理, 采用高灵敏度有机荧光微球作为示踪物这一新方法标记抗体, 从市场需求出发, 创新性地研制出玉米赤霉烯酮时间分辨荧光免疫层析卡为核心产品的霉菌毒素快速检测系统, 具有小型、便携、智能化等优点, 形成了易于推广和应用的霉菌毒素快速检测系统用户终端。

本实验研制的玉米赤霉烯酮快速定量免疫试纸条, 采用钨纳米微球作为荧光探针, 标记抗 ZEN 的单抗, 通过竞争抑制建立免疫层析定量方法。试纸条的灵敏度为 0.1 ng/mL, 检出限为 10.05 μg/kg, 定量限为 20.13 μg/kg, 显著高于胶体金方法和酶联免疫法的灵敏度, 与一般的 ELISA 方法相比, 试纸条的操作更加简便, 所需时间更短, 可为实验人员减轻负担。其次, 其他方法学参数评价结果表明, 样品的加标回收率在 93.45%~112.2% 之间, 对于同一个样品的 5 次重复的变异系数均小于 15%, 采用 IAC-HPLC 法和试纸条同时检测小麦、玉米等 20 份样品, 结果表明这两种方法具有良好的相关性。其准确性和可靠性基本满足了绝大多数粮食及其制品中玉米赤霉烯酮的检测。

时间分辨荧光试纸条操作简单, 简单样本只需甲醇提取处理即可测定, 从提样至得出结果只需 25 min; 配套小型经济、便于携带的荧光分析仪, 不仅降低了企业的检测成本, 还有效提升了企业产品质量的检测能力, 同时也为政府职能部门提供了快速、有效、易于普及的检测技术和手段, 尤其适合基层单位, 便于大量样本的筛选。因此, 具有非常好的推广应用价值, 有利于保障食品的质量和消费者的健康。

参考文献:

- [1] 王怡净, 张立实. 玉米赤霉烯酮毒性研究进展(综述)[J]. 中国食品卫生杂志, 2002, 14(5): 40-43.
WANG Y J, ZHANG L S. Research progress on the toxicity of zearalenone (review)[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2002, 14(5): 40-43.
- [2] 周建川, 史东辉, 计成. 玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇对动物毒性的研究进展[J]. 动物营养学报, 2020, 32(6): 2460-2466.
ZHOU J C, SHI D H, JI C. Research progress on the toxicity of zearalenone and deoxynivalenol to animals[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2020, 32(6): 2460-2466.
- [3] WU L, WANG B J. A review on the clean-up, determination, toxicity and biotransformation of deoxynivalenol and zearalenone from cereals[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(5): 1323-1330.
- [4] 尚艳娥, 杨为民. CAC、欧盟、美国与中国粮食中真菌毒素限量标准的差异分析[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(1): 10-15.
SHANG Y E, YANG W M. Variation analysis of cereals mycotoxin limit standards of CAC, EU, USA and China[J]. Journal of Food Science and Technology, 2019, 37(1): 10-15.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 2761—2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. GB 2761—2017 National Food Safety Standard Limits of Mycotoxins in Food[S]. Bei Jing: China Standard Press, 2017.
- [6] 张婷, 向仲朝. 玉米等谷物中玉米赤霉烯酮的高效液相色谱测定法[J]. 中国卫生检验杂志, 2016, 16: 2327-2328.
ZHANG T, XIANG Z C. Determination of zearalenone in corn and other grain by high performance liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 16: 2327-2328.
- [7] 徐飞, 刘峰, 张亚军, 等. 液相色谱-串联质谱法测定粮食中的玉米赤霉烯酮[J]. 中国食品卫生杂志, 2015, 2: 124-126.
XU F, LIU F, ZHANG Y J, et al. Determination of zearalenone in grain and its products by liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 2: 124-126.
- [8] ZHANG K, XU D. Application of stable isotope dilution and liquid chromatography tandem mass spectrometry for multi-mycotoxin analysis in edible oils[J]. Journal of Aoac International, 2019, 102(6): 1651-1656.
- [9] 辛甜甜, 郭松林, 王艺磊, 等. 时间分辨荧光免疫分析的新进展[J]. 理化检验(化学分册), 2017, 53(1): 112-118.
XIN T T, GUO S L, WANG Y J, et al. New progress of time-resolved fluoroimmunoassay[J]. Physical Testing and Chemical Analysis Part B: Chemical Analysis, 2017, 53(1): 112-118.

- [10] HEMMILAI, HOLTINEN S, PETERSSON K, et al. Double-label time-resolved immunofluorometry of lutropin and follitropin in serum[J]. *Clinical Chemistry*, 1987, 33(12): 2281-2283.
- [11] WANG H, ZHAI X M, LIU T C, et al. Development of a novel immunoassay for the simple and fast quantitation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin using europium(III) chelate microparticles and magnetic beads[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2019, 470: 15-19.
- [12] FANG S, ZHANG Y Z, LIU X, et al. Development of a highly sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for the determination of trace salbutamol in environmental samples[J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 679: 359-364.
- [13] SUN S J, ZHENG P M, ZHAO S J. 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 Additives and Contaminants: Part A*, 2018, 35(12): 2434-2442.
- [14] WANG D, ZHANG Z W, LI P W. Europium nanospheres-based time-resolved fluorescence for rapid and ultrasensitive determination of total Aflatoxin in feed[J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2015, 63: 10313-10318.
- [15] 吴伟峰, 张燕, 彭宏威. 玉米赤霉烯酮样品前处理与快速检测技术研究进展[J]. *食品质量安全检测学报*, 2015, 6(9): 3536-3642.
- WU W F, ZHANG Y, PENG H W. Research progress on sample pretreatment and rapid detection methods of zearalenone[J]. *Journal of Food Safety and Quality*, 2015, 6(9): 3536-3642.
- [16] 孙明山. 检出限的分类与计算方法[J]. *现代化农业*, 2012, 3: 33-34.
- SUN M S. Classification and calculation method of detection limit[J]. *Modernizing Agriculture*, 2012, 3: 33-34.
- [17] 王兴国. 理化检验与数理统计[M]. 河南: 河南科学技术出版社, 1994: 15-18.
- WANG X G. Physical and chemical testing and mathematical statistics[M]. Henan: Henan Science and Technology Press, 1994: 15-18.
- [18] 李静宇, 何小维, 刘晓云, 等. 克伦特罗荧光免疫层析试纸条的制备及特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 10: 2606-2611.
- LI J Y, HE X W, LIU X Y, et al. Preparation and properties analysis of clenbuterol fluorescent immunochromatographic strip[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 10: 2606-2611.
- [19] 杨梅, 刘君君, 牟晓然, 等. 阿伦尼乌斯方程在体外诊断试剂有效期预测中的应用[J]. *国际检验医学杂志*, 2013, 34(12): 1586-1588.
- YANG M, LIU J J, MOU X R, et al. The application of arrhenius equation in predicting the expiry date of diagnostic reagents in vitro[J]. *International Journal of Laboratory Medicine*, 2013, 34(12): 1586-1588.
- [20] 徐立根. 放射免疫分析试剂盒质量控制[J]. *放射免疫学杂志*, 2003, 16(3): 184.
- XU L G. Quality control of radioimmunoassay kit[J]. *Journal of Radioimmunology*, 2003, 16(3): 184. 完