

玉米中黄曲霉毒素B1检测方法最新研究

李航棋, 闫蓉芳, 胡秋阳, 张富源, 王向红, 锁然, 淑英, 王文秀, 汤轶伟*

河北农业大学食品科技学院, 河北 保定

收稿日期: 2022年3月27日; 录用日期: 2022年4月29日; 发布日期: 2022年5月10日

摘要

玉米及其制品是我国食品行业不可或缺的原料, 也是食用动物饲养的主要饲料来源。黄曲霉毒素B1是一种霉变玉米中常见的真菌毒素, 具有剧烈的急性毒性, 长期食用污染黄曲霉毒素B1的食品可诱发癌变, 严重损害了民众的身体健康。本文主要从样品前处理技术和玉米中黄曲霉毒素残留最新检测方法两方面进行阐述, 分析了国家标准与近年最新样品前处理技术的优劣, 重点探讨了表面增强拉曼散射光谱法、侧流层析快速检测方法、荧光检测方法、表面等离子共振检测方法、高光谱成像方法、免疫分析法和电化学传感器分析法的研究成果与发展趋势, 以期为我国玉米中黄曲霉毒素残留监测提供新的技术支持。

关键词

玉米, 真菌毒素, 黄曲霉毒素B1, 样品前处理, 检测方法

Recent Research Progress in Detection Methods of Aflatoxin B1 in Corn

Hangqi Li, Rongfang Yan, Qiuyang Hu, Fuyuan Zhang, Xianghong Wang, Ran Suo, Ying Shu, Wenxiu Wang, Yiwei Tang*

College of Food Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding Hebei

Received: Mar. 27th, 2022; accepted: Apr. 29th, 2022; published: May 10th, 2022

Abstract

Corn and its products are indispensable raw materials for China's food industry and the main feed source for edible animals. Aflatoxin B1 is a common mycotoxin in moldy corn. It has severe acute toxicity, and long-term consumption of food contaminated with aflatoxin B1 can induce carcinogenesis, which seriously damages people's health. This paper mainly expounds the sample pre-

*通讯作者。

文章引用: 李航棋, 闫蓉芳, 胡秋阳, 张富源, 王向红, 锁然, 淑英, 王文秀, 汤轶伟. 玉米中黄曲霉毒素 B1 检测方法最新研究[J]. 食品与营养科学, 2022, 11(2): 119-130.

DOI: 10.12677/hjfn.2022.112015

treatment technology and the latest detection method of aflatoxin B1 residue in corn, analyzes the advantages and disadvantages of the new sample pretreatment technology and the related pretreatment methods in the national standard, and discusses the research results and development trend of the surface enhanced Raman scattering spectroscopy, lateral flow immunochromatographic assay, fluorescence detection method, surface plasmon resonance assay, hyperspectral imaging assay, immunoassay and electrochemical sensor analysis, which provide new technical support for the monitoring of aflatoxin B1 residue in corn samples.

Keywords

Corn, Mycotoxin, Aflatoxin B1, Sample Pretreatment, Detection Method

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

玉米(*Zea mays* L.)属禾本科一年生植物,为我国极为重要的粮食作物,是食品、医疗卫生、轻工业、化工等不可或缺的原料之一,也是畜牧、水产等养殖业的重要饲料来源[1]。然而,玉米籽粒及其产品若贮藏和运输条件不当极易诱发霉变,导致其品质劣变,不但可造成巨大的经济损失,还会引发严重的食品安全问题[2]。

黄曲霉毒素(Aflatoxin, AFT)是霉变玉米中常见的一种真菌毒素,由黄曲霉或寄生曲霉的某些菌株产生,为毒性极强的双呋喃环类毒素。AFT 衍生物多达 20 种,其中以 AFT-B1 的毒性最大,半数致死量(LD50)为 0.249 mg/kg,若长期摄入含有该毒素残留的食品可引发肝脏癌变[3]。为保障我国民众身体健康,国家标准 GB2761-2017 《食品中真菌毒素限量》规定了谷物及其制品中 AFT-B1 的最大残留限量为 5.0~20 µg/kg,也将其列为食品安全必检项目[4]。

准确、便捷、稳定的检测方法是保证食品质量安全的技术保障,综述和分析近年来国内外玉米中 AFT-B1 毒素残留最新检测方法研究进展对保障我国稻谷类食品安全具有重要意义。本文将从样品前处理和 AFT-B1 检测方法两方面进行阐述,以期对玉米等粮食及食品中真菌毒素监测与风险评估提供技术参考。

2. 样品前处理方法

样品前处理是检测分析过程中的重要环节,决定着检测结果的准确度。该过程包括样品制备、目标物提取、净化与富集。

2.1. 样品制备

玉米籽粒较大,如取样不当会严重影响供检样品中 AFT-B1 污染的判断结果。因此,样品取样应严格遵循样品取样方法,采样量需大于 1.0 kg,经高速粉碎机粉碎后过筛(孔径 < 2.0 mm),混合均匀后缩分至 100 g 密封保存以供检测[5]。

2.2. 提取、净化与富集

AFT-B1 (结构式如图 1)纯品为无色结晶,难溶于水、易溶于油及甲醇、乙醇、氯仿等多种极性有机

溶剂。因此,玉米中 AFT-B1 提取溶剂主要以甲醇、乙腈等极性有机溶剂为主。表 1 为近年来文献中玉米样品中 AFT-B1 提取的溶剂。

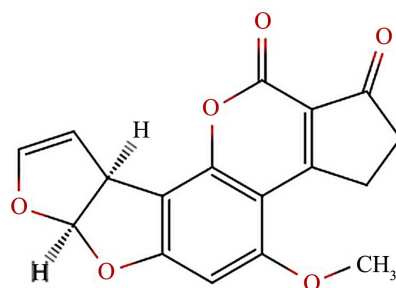


Figure 1. Chemical structure of AFT-B1
图 1. 黄曲霉毒素 B1 化学结构式

Table 1. Extraction solvent, recovery and detection method of Aft-B1 in corn samples

表 1. 玉米样品中 AFT-B1 提取溶剂、回收率与检测方法

提取溶剂	样品量(g)	回收率(%)	检测方法	文献
乙腈/水(84:16; v/v)	5.0	75.5~98.6	LC-MS	[6]
甲醇/水(7:3; v/v)	5.0	81.6~90.1	LC-MS	[7]
甲醇/水(4:1; v/v)	2.0	84.1~107	荧光光谱法	[3]
1%乙酸酸化的乙腈/水(84:16; v/v)	5.0	83.2~101.3	LC-MS	[8]

基于免疫亲和柱的样品净化与富集方法具有有机溶剂消耗少、抗基质干扰能力强、特异性强、灵敏度高、样品基质适应性广等优点[9]。食品安全国家标准(GB 5009.22-2016)采用免疫亲和柱对玉米样品的乙腈/水或甲醇/水提取液中 AFT-B1 进行净化与富集。免疫亲和柱是利用抗原-抗体特异性可逆结合特性从复杂待测样品中提取目标物,环境敏感性与低有机溶剂耐受能力在一定程度上限制了其应用[10]。

新型吸附材料的制备为玉米中 AFT-B1 残留的净化与富集提供了新的途径,对提高检测方法的灵敏度、便捷性、稳定性具有积极作用。分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIP)是一种对目标物具有选择性捕获能力的高分子聚合物。郝铖[11]基于沉淀聚合技术,以 5,7-二甲氧基香豆素为虚拟模板制备了对 AFT-B1 等毒素具有广谱选择性吸附性能的印迹聚合物,最大吸附容量可达 14,840 $\mu\text{g}/\text{kg}$,并建立了玉米等样品中 AFT-B1 等毒素的分子印迹固相萃取样品前处理方法。金属有机骨架(metal organic frameworks, MOF)材料是一种新型的微孔材料,与印迹聚合物结合后其应用性能显著提升。Liang 等[12]以槲皮素为模板分子,丙烯酰胺为共聚单体,氨基功能化的镓基金属有机骨架(UIO-66-NH₂)为接枝材料,制备了用于特异性吸附 AFT-B1 的新型 UIO-66-NH₂-MIP 吸附材料,适合分离与富集样品中的痕量 AFT 毒素,且在时间、成本、提取效率方面优于免疫亲和柱、硅胶固相萃取、C18 固相萃取和佛罗里硅土固相萃取柱等前处理方法。二氧化硅也是一种重要的多孔材料,吸附表面积大。Rui 等[13]以 3-(甲基丙烯酰氧)丙基三甲氧基硅烷(MPS)功能化的二氧化硅为载体制备了可特异性吸附 AFT-B1 的表面分子印迹聚合物材料,实际样品中的添加回收率为 82.6%~116.7%。

磁性分散萃取技术具有操作方便、易分离、有机溶剂用量少等优点,已成为样品前处理领域的研究热点。袁艳丽等[7]采用水热反应法成功制备了磁性氧化石墨烯用于样品中 AFT-B1 选择性吸附,玉米等样品的添加回收率为 81.6%~90.1%。

3. 检测方法

色谱-串联质谱法、高效液相色谱-柱前/柱后衍生法、酶联免疫吸附筛查法等检测方法是目前国际上普遍采用的 AFT 精确定量或快速筛查的方法[5] [14]。近年来,新型检测技术与新型功能材料在玉米 AFT-B1 残留检测中的应用提高了分析方法的灵敏度、便捷性或检测速度。

3.1. 表面增强拉曼散射光谱法

表面增强拉曼散射(surface enhancement of Raman scattering, SERS)光谱法一种灵敏度高、抗光漂白能力强的新型光谱分析技术,在玉米等食品潜在危害物超痕量快速检测中具有广阔的应用前景[15]。

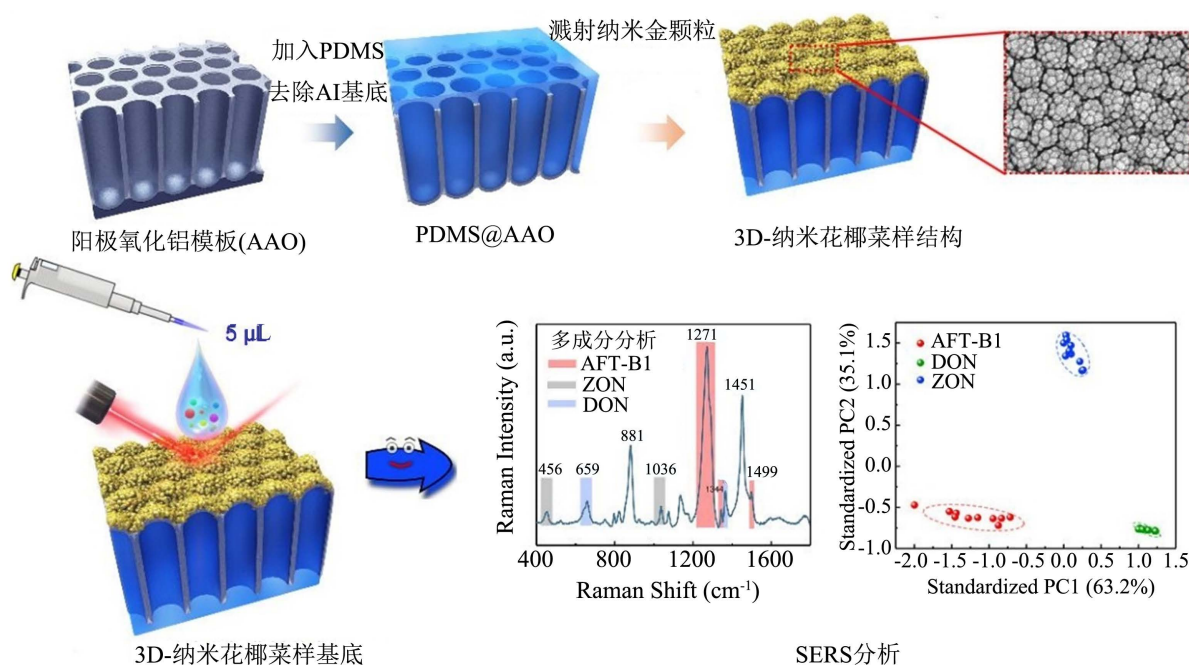


Figure 2. Schematic diagram of fabrication of the 3D-nanocauliflower substrate and SERS measurement [16]

图 2. 3D-纳米花椰菜样 SERS 基底制备及其检测过程示意图[16]

良好的信号增强基底是 SERS 方法痕量检测应用的前提。李晋杰[16]在表面改性的阳极氧化铝模板(AAO)表面覆盖了一层聚二甲基硅氧烷(PDMS)形成 PDMS@AAO 复合衬底,去除铝基底后将纳米金颗粒溅射在 PDMS@AAO 表面构建了 3D-纳米花椰菜样 SERS 基底(图 2),该基底有巨大比表面积和大量信号增强“热点”,最佳条件下,基于该基底建立的 SERS 检测方法对 AFT-B1 检测的线性范围为 5.0~1000 ng/mL,最低检出限为 1.8 ng/mL。

为提高 SERS 方法对目标物检测的灵敏度和特异性,李晋杰[16]基于 DNA 纳米技术,以核酸适配体为识别元件,小粒径银纳米颗粒为 SERS 增强基底,4-硝基苯硫酚为信号探针,设计了一种 DNA 纳米镊子驱动的 AFT-B1 高灵敏生物传感器。该传感器特异性高,基于检测探针分子 SERS 信号强度变化,实现了 AFT-B1 定量检测,最优条件下检测范围为 1 ng/mL~0.01 pg/mL,最低检测限低至 5.07 fg/mL。

光子晶体是一种具有光子带隙特性的周期性调制介电材料,比表面积大,在 SERS 检测中具有较大应用潜力[17]。朱雪蕊[18]基于 SiO₂ 光子晶体偶联抗原和金纳米微球偶联抗体材料,通过免疫竞争反应建立了玉米等样品中 AFT-B1 残留 SERS 检测方法,最优条件下该方法的线性范围为 0.01~0.1 ng/mL,最低检出限为 34.755 pg/mL。

3.2. 侧流层析快速检测方法

侧流层析免疫检测技术(lateral flow immunochromatographic assay, LFIA)是一种集免疫反应的特异性与层析技术的快速性于一体的检测技术,具有较高的便携性、稳定性和简便性[19]。

Wang 等[20]荧光聚苯乙烯微球偶联生物抗体为信号探针,以 AFT-B1-BSA 包被原为 T 线,羊抗鼠二抗为 C 线构建了检测玉米中 AFT-B1 含量的免疫层析检测方法,最优条件该方法的最低定量限为 1.43 ng/g,回收率为 96.0%~107.6%。时间分辨荧光纳米微球(掺杂的聚苯乙烯荧光微球)、量子点纳米微球与量子点(CdSe/ZnS)三种荧光标记物比较,时间分辨荧光纳米微球标记生物抗体构建荧光免疫层析试纸条对 AFT-B1 的灵敏度最低(0.04 ng/g),免疫试剂用量最少,检测时间最快[21]。王序等[22]以时间分辨荧光微球标记的生物抗体为信号探针构建了玉米等谷物产品种 AFT-B1 免疫层析检测方法,并优化了 pH 值、标记抗体浓度、荧光探针使用量、检测 T 线包被原浓度、样品前处理方法等影响检测方法灵敏度的因素,最优条件下方法的检出限为 0.8 ng/mL,加标回收率为 97.1%~108.7%,检测过程约 25 min,适用于玉米等谷物中 AFT-B1 的现场快速筛查。

金纳米棒是一种各向异性的纳米颗粒,有不同的表面等离子峰,有望替代金纳米球用于免疫层析快速检测方法[23]。Chen 等[24]研究了非十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)制备的金纳米棒在免疫层析检测方法中的性能,结果显示非 CTAB 合成的金纳米棒比基于 CTAB 合成的金纳米棒更稳定,更易于进一步功能化,开发的金纳米棒免疫层析检测方法对 AFT-B1 的视觉检测限为 0.5 ng/mL,定量检测为 0.05 ng/mL,检测过程可在 20 min 内完成。

基于胶体金的侧向层析检测方法灵敏度主要依赖于色度信号的强弱,因此增强胶体金的信号强度有利于提高传统胶体金试纸条的检测灵敏度[25]。Zhang 等[26]合成了一种新型超支化金等离子体黑体(AuPB),并将其作免疫层析试纸条(ICTS)传感器中的信号放大标签用于检测玉米中的 AFT-B1。AuPB 的超支化结构和表面密集的聚多巴胺层使其具有较高的色度信号强度、优异的胶体稳定性和良好的生物相容性,这有助于提高竞争性 ICTS 传感器的灵敏度。在优化条件下,基于 AuPB 增强的免疫层析检测方法的最低检测限为 0.016 ng/mL,比以 35 nm 金纳米微球为信号标记物的传统 ICTS 低了 3.9 倍和 5.4 倍,且检测方法的稳定性好。因此,开发的 AuPB 免疫层析检测试纸条可以作为一种替代快速诊断方法用于玉米中 AFT-B1 的灵敏、可靠筛选。此外,Zhao 等[27]以 α -Fe₂O₃ 纳米立方体标记的生物抗体为信号探针构建了检测 AFT-B1 的免疫层析试纸条,并建立了快速检测方法,最优条件下该方法对目标物的检出限为 0.18 ng/mL,玉米等样品的添加回收率为 93.3%~128.3%。

普鲁士蓝纳米立方体(prussian blue nanocubes, PBNCs)具有优异的电化学和光学性质,并且合成简单、比表面积大、孔径可调、易修饰,在检测、吸附和分离领域表有突出的应用潜力[28]。Bu 等[29]创新性的以 PBNCs 标记生物抗体做信号探针构建了 AFT-B1 免疫层析试纸条,建立了玉米中 AFT-B1 快速检测方法,该方法中巧妙的利用了 PBNCs 在碱性条件下会降解和褪色的现象提高了试纸条的灵敏度。在优化条件下,增强的试纸条对 AFT-B1 最低检测限为 23 pg/mL,分别比 PBNCs 免疫层析检测方法(90 pg/mL)和常规金纳米颗粒免疫层析方法(175 pg/mL)低约 4 倍和 8 倍,显著提高了免疫层析检测方法的灵敏度(与 NaOH 反应后 PBNCs 降解(A)和基于 PBNCs 的免疫层析检测 AFT-B1 过程示意图如图 3 所示)。

3.3. 荧光检测方法

荧光分析法是根据目标物浓度与检测体系荧光信号强度的对应关系建立检测方法,具有灵敏度高,操作简便、选择性好等特点。杨卓燃等[3]以 LED 等为激光光源建立了基于 Hg²⁺对 AFT-B1 荧光增强效应的荧光定量检测方法,该方法的检出限为 0.913 ng/mL,线性范围为 3~90 ng/mL,对玉米粉中 AFT-B1 的加标回收率为 84.1%~107%。Lv 等[30]基于 CdSe/ZnS 标记的抗体为信号探针建立了荧光免疫吸附检测方

法, 该方法简单、灵敏度高、检测结果准确, 最有条件下方法的线性范围为 1~40 ng/mL, 最低检出限为 56 pg/mL。核酸适配体是一段具有特异识别性能的一段寡核苷酸链, 较生物抗体更稳定, 且容易合成。Jia 等[31]基于季铵化四苯乙烯盐、氧化石墨烯、核酸适配体建立了 AFT-B1 非标记荧光检测方法, 首先修饰季铵化四苯乙烯盐的核酸适配体吸附于氧化石墨烯表面, 由于共振能量转移氧化石墨烯猝灭了适配体上的季铵化四苯乙烯盐的聚集荧光, AFT-B1 存在时, 适配体与目标物结合后从氧化石墨烯表面脱落, 检测体系荧光增强, 最优条件下该检测方法的检出限为 0.25 ng/mL (季铵化四苯乙烯盐/核酸适配体/氧化石墨烯非标记核酸适配体传感器检测玉米样品中 AFT-B1 示意图见图 4)。相似的, Setlem 等[32]以 Alexa Fluor 488 荧光染料、核酸适配体和氧化石墨烯建立了检测 AFT-B1 的方法, 最优条件下方法检测目标物的线性范围为 0.2~200 ng/mL, 较季铵化四苯乙烯盐的聚集荧光灵敏度高, DNA 四面体纳米结构的高度刚性和多功能性为其用于生物传感检测系统提供了条件。Ren 等[33]构建了一种基于自组装 DNA 四面体的信号开关荧光传感器用于快速 AFT-B1, DNA 探针上荧光团和猝灭剂之间的距离可根据四面体上发夹结构的变化进行调节, 当目标物 AFT-B1 存在下, Cy5 的荧光强度显著降低, 通过荧光强度变化间接进行 AFT-B1 定量分析, 最有条件下 AFT-B1 的最低检测限为 0.01 ng/mL, 在实际玉米样品检测中性能稳定。

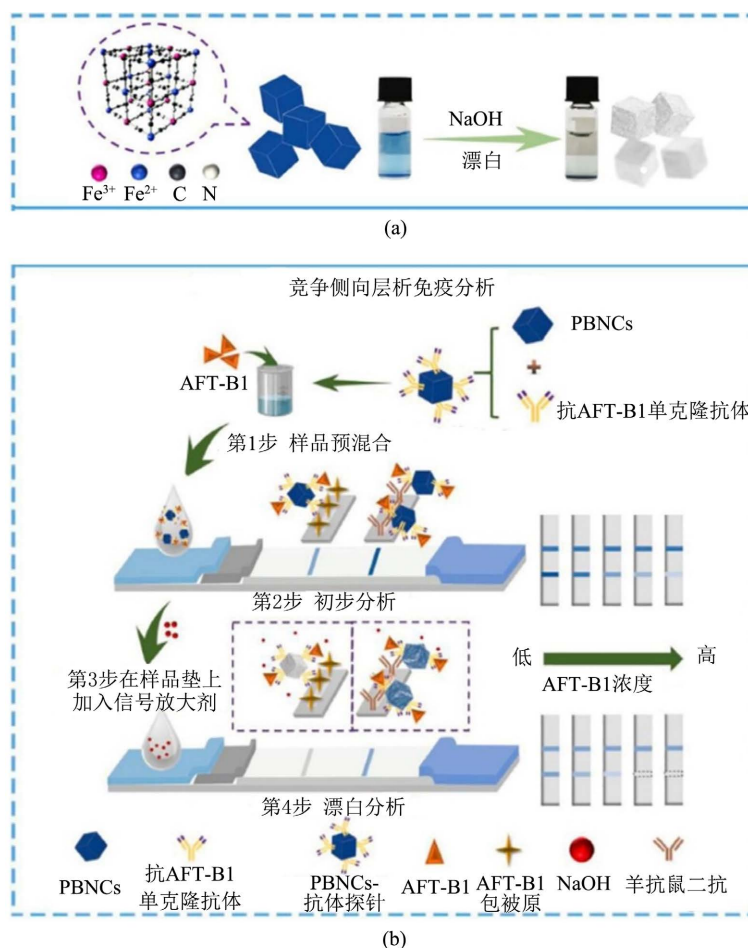


Figure 3. Schematic representations of (A) the PBNCs degradation after reaction with NaOH solution, (B) the process of LFI based on PBNCs for AFT-B1 detection [29]

图 3. 与 NaOH 反应后 PBNCs 降解 (A) 和基于 PBNCs 的免疫层析检测 AFT-B1 过程示意图[29]

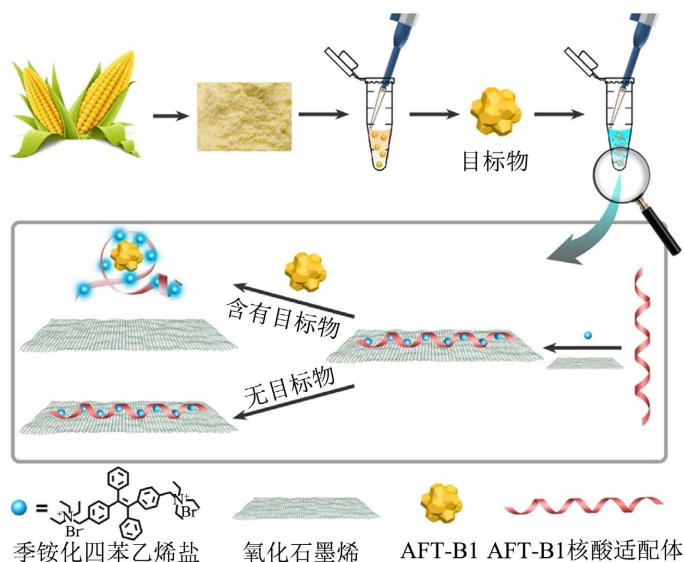


Figure 4. The schematic diagram of the label-free aptasensor TPE-Z/AFT-B1 aptamer/GO for AFT-B1 detection in corn samples [31]

图 4. 季铵化四苯乙烯盐/核酸适配体/氧化石墨烯非标记核酸适配体传感器检测玉米样品中 AFT-B1 示意图[31]

3.4. 表面等离子共振检测方法

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)是一种通过分子吸附在重金属膜上引起介电常数的变化来进行灵敏检测的表面分析技术,具有样品用量少、选择性高、灵敏度高等特点[34]。Wei 等[35]基于结合 AFT-B1 的 SPR 传感芯片建立了玉米等样品中真菌毒素的检测方法,该方法基于样品提取液中目标物与芯片上固定的 AFT-B1 竞争结合检测体系中的生物抗体,提取液中目标物越少,结合到芯片上的生物抗体越多,根据检测芯片 SPR 信号的变化建立检测方法,最佳条件下该方法对 AFT-B1 的检出限为 0.59 ng/mL。Akgönüllü 等[36]首先将 AFT-B1 和 N-甲基丙烯酰-L-苯丙氨酸作为模板分子和功能单体进行预复合,紫外引发条件下在纳米金表面合成具有特异识别性能 MIP (Au@MIP),然后将 Au@MIP 涂覆在 SPR 金芯片表面,建立 SPR 检测方法,最优条件下该方法具有较宽的线性范围(0.0001~10.0 ng/mL),最低检出限为 1.04 pg/mL。与生物抗体比较,MIP 具有稳定的理化性质、耐有机溶剂、可重复使用等特点,是理想的分子识别元件。

3.5. 高光谱成像方法

快速无损检测是食品安全检测领域的发展方向。超光谱成像是一种将传统机器视觉方法与光谱学技术相结合的技术,具备快速无损检测能力,已广泛应用于农业领域[37]。对于玉米中 AFT-B1 检测已有研究报告,Zhu 等[38]研究了荧光结合反射可见-近红外(VNIR)高光谱图像检测玉米粒上 AFT,对于 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 阈值,最小二乘支持向量机(LSSVM)模型的总体预测精度达到了 95.33%。Zhang 等[39]通过高光谱成像技术检测玉米籽粒上不同浓度(100、50、30、20 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的 AFT-B1 污染,优化了玉米籽粒的近红外高光谱数据预处理方法,对比了建模方案及 3 种化学计量学方法(k-最近邻(KNN)、线性判别分析(LDA)和支持向量机(SVM)),结果显示“5~3 平滑”预处理,SPA (standard normal variate)方法和 SVM 模型的训练集和测试集的准确率最高,分别为 84.1%、77.8%和 87.3%、83.0%。通过“SPA 法”获得的这 10 个波长(460.41、491.50、594.72、617.60、679.77、726.69、739.00、772.43、926.10 和 929.03 nm)为将来实时在线监测玉米籽粒上的 AFB1 污染提供了可能。

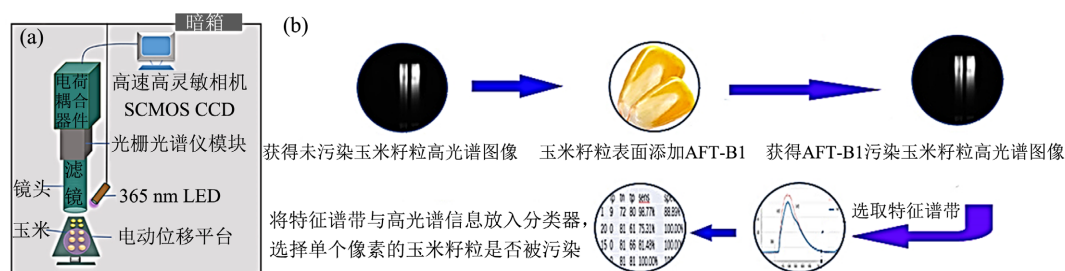


Figure 5. The schematic diagram of hyperspectral image system (A) and flow chart of hyperspectral image method (B) [40]
图 5. 高光谱系统示意图(a), 高光谱成像方法流程图(b) [40]

Gao 等[40]利用像素级高光谱数据建立了黄曲霉毒素分类模型, 每个像素有 600 个高光谱带, 标记为“干净”或“污染”, 对比了 3 种提取特征波段方法, 结果显示特征选择波段准确率最高的是 Relief, RF 分类器和 KNN 分类器的准确率分别达到 99.38%和 98.77%, 未进行特征提取的 600 个波段的准确率 100% (高光谱系统示意图与高光谱成像方法流程图见图 5)。所以, 如果不考虑计算时间, 可以使用全波段进行分类以提高 AFT 污染分析的精准度。

高光谱法预测 AFT 含量方法达到了无损快速检测霉变玉米中 AFT 的目的, 为实现玉米霉变的在线、快速、精确检测提供了借鉴。

3.6. 免疫分析方法

酶联免疫吸附试验(ELISA)是食品种潜在危害物残留常用的靶点筛选方法, 具有操作简便、高通量等优点, 已广泛应用于食品中 AFT-B1 污染的监测中[41]。然而, 传统的酶催化比色 ELISA 灵敏度相对较低, 很大程度上限制了其对低浓度目标污染物的检测[42]。

与吸光度相比, 基于散射的动态光散射(DLS)信号具有更高的灵敏度。Zhan 等[43]首次开发了 DLS 增强直接竞争酶联免疫吸附(DLS-dcELISA)方法用于玉米中 AFT-B1 的超灵敏检测。该方法通过使用羟基自由基诱导的金纳米粒子(AuNP)聚集放大 AuNP 散射信号, 显著提高了 DLS-dcELISA 对 AFB1 检测的灵敏度, 最佳条件下方法的检测限为 0.12 pg/mL, 比使用等离子共振 ELISA 和比色 dcELISA 获得的结果分别低 153 倍和 385 倍。DLS-dcELISA 具有良好的选择性、准确度和实用性, 可用于玉米中超限量 AFT-B1 污染检测。

Zhang 等[44]研发了一种抗体微阵列免疫分析模型, 用于同时定量检测玉米样品中 AFT-B1 等 4 种典型真菌毒素, 该方法分析过程中, 对真菌毒素-蛋白质结合物进行生物素化, 结合生物素-链霉亲和素系统和增强化学发光(ECL)增强检测信号, 提高了分析方法的灵敏度。最优条件下方法对 AFT-B1 的检测限为 0.21 ng/mL, 检测线性范围为 0.47~55.69 ng/mL。

电化学发光是一种新兴的发光技术, 具有背景信号弱、灵敏度高、设计简单等特点, 在检测分析领域受到广泛关注[45]。Xia 等[46]以氨基功能化的 3D 石墨烯(graphene)水凝胶作为电化学荧光免疫分析平台, 将偶联有 AFT-B1-BSA 的金纳米颗粒固定于石墨烯水凝胶表面, 以 3-氨基-苯二甲酰肼-钼-氧化石墨烯(lum-Pd-GO)与生物抗体偶联物为信号探针, 样品中的 AFT-B1 与金纳米颗粒表面的 AFT-B1-BAS 竞争结合信号探针, 目标物浓度越低, 结合到石墨烯水凝胶表面的探针越多, 最优条件下该方法的最低检出限可达 0.005 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 这是由于 3-氨基-苯-二甲酰肼与 GO 的 $\pi\text{-}\pi$ 结合缩短了二者之间的电子转移距离, 产生了放大的电化学荧光信号(约为 3-氨基-苯-二甲酰肼电化学荧光信号的 8.5 倍)。

3.7. 电化学传感器检测方法

电化学传感器具有响应速度快、操作简单等优点, 可实现目标物的实时监测[47]。Zhu 等[48]以组装

二茂铁标记 AFB1 核酸适配体, 蒽醌-2-羧酸(AQ)标记的互补 DNA (cDNA)提供单独和特异的结合位点, 根据目标物浓度与感应电流强度之间的关系建立了 AFT-B1 检测方法, 线性范围为 10~3000 pg/mL, HPLC-MS/MS 验证了检测结果的准确性。对比发夹 DNA (hDNA)和线性单链 DNA (ssDNA)作为互补链发现, 具有刚性二维结构的发夹式 DNA 可以极大地提高传感界面的组装和识别效率, 改善了传感器的灵敏度、可靠性和抗干扰能力。

Chen 等[49]通过引入 BiOBr/氮掺杂石墨烯纳米带(N-GNR)作为光活性界面成功构建了可用于玉米样品中 AFT-B1 检测的光电化学(PEC)适配体传感器。与 BiOBr 相比, 制备的 BiOBr/N-GNR 具有更高的光活性, 紫外-可见漫反射光谱表明, BiOBr/NGNR 具有较窄的带隙能量, 更易被可见光激发。当 AFT-B1 与适配体结合后可增加电极电阻, 抑制电子转移, 从而减弱了 PEC 信号。最优条件下构建的传感器对 AFT-B1 的最低检出限为 1.7 pg/mL, 线性范围为 5 pg/mL~15 ng/mL。此外, 该传感器通过更换核酸适配体可用于玉米种其它真菌毒素的痕量检测。

Zhong 等[50]以沸石咪唑骨架-8 (ZIF-8)修饰玻碳电极(GCE), 在其表面电沉积金纳米粒子(AuNPs)后偶联特异性核酸适配体用于检测 AFT-B1。AuNPs/ZIF-8 纳米复合材料的高比表面积增加了核酸适配体在电极表面的负载量, 优化条件下, 开发的核酸适配体化学传感器具有更宽的线性范围, 为 10.0 - 1.0 × 10⁵ pg/mL, 检测下限为 1.82 pg/mL。

4. 结语

黄曲霉毒素 B1 是已发现的毒性最强的真菌毒素, 玉米中 AFT-B1 污染对人体健康带来的巨大隐患。基于免疫亲和柱的样品前处理技术极大保证了玉米中真菌毒素检测方法的准确性, 但 AFT-B1 属小分子化合物, 生物抗体制备具有一定的难度, 且制备过程耗时。基于核酸适配或分子印迹仿生抗体的亲和柱开发及应用研究, 可丰富玉米样品中 AFT-B1 样品前处理方法, 降低样品前处理成本。

玉米中 AFT-B1 污染新型检测方法的建立大大提高了样品中痕量真菌毒素检测能力, 为玉米类样品安全提供了强有力的技术支撑。根据目前食品行业或市场监管检测需求, 玉米类样品中 AFT-B1 检测方法研究依然可在以下几个方面深入研究: 1) 研究基于新型吸附材料的自动化样品前处理方法, 降低人为操作对检测结果的影响, 提高样品前处理方法稳定性; 2) 研究高光谱分析技术在玉米粉中 AFT-B1 污染的原位监测技术, 提高特征波长的提取准确度, 减少信息的冗余现象; 3) 研发适用于现场检测的便携式、智能化小型设备, 提高玉米中 AFT-B1 的现场检测能力; 4) 研究基于分子印迹仿生抗体的免疫分析、荧光分析、表面等离子共振等技术用于玉米样品中 AFT-B1 污染检测。

基金项目

本论文受到河北农业大学引进人才科研专项(No. YJ01911)和河北农业大学大学生创新创业训练计划项目(No. 2022167, No. 2022166)项目资助。

参考文献

- [1] 杨晓倩, 郅慧, 张辉, 等. 玉米不同部位化学成分、药理作用、利用现状研究进展[J]. 吉林中医药, 2019, 39(6): 837-840.
- [2] 冯莉. 薄层色谱法检测玉米中黄曲霉毒素 B1[J]. 现代畜牧科技, 2018, 37(8): 20.
- [3] 杨卓燃, 李龙, 李超逸, 等. LED 激发荧光光谱法快速测定玉米粉中的黄曲霉毒素 B1[J]. 分析测试学报, 2021, 40(12): 1779-1783.
- [4] 卢迪莎, 王序, 杨金易, 等. 同时检测玉米中黄曲霉毒素 B1 和赭曲霉毒素 A 的时间分辨荧光免疫层析试纸条的研制[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 346-354.

- [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. 食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定: GB 5009.22-2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [6] 郝铖. 基于分子印迹聚合物的四种黄曲霉毒素快速检测方法研究[D]: [硕士学位论文]. 邯郸: 河北工程大学, 2021.
- [7] 袁艳丽, 李新丽, 朱莉, 等. 磁性固相萃取-液质联用法检测花生和玉米中的黄曲霉毒素 B1[J]. 山东化工, 2021, 50(23): 95-96+99.
- [8] 刘笑笑, 丁辉, 吴福祥, 等. 杂质吸附固相萃取-液相色谱串联质谱法同时检测粮食中 15 种真菌毒素[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(1): 155-167.
- [9] Iha, M.H., Mini, C.A., Okada, I.A., *et al.* (2017) The Use of Regenerated Immunoaffinity Columns for Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in Peanut Confection. *Journal of Chromatography A*, **1483**, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.12.040>
- [10] Senyuva, H.Z. and Gilbert, J. (2010) Immunoaffinity Column Clean-Up Techniques in Food Analysis: A Review. *Journal of Chromatography B*, **878**, 115-132. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.042>
- [11] 易珊珊, 杜鑫. PRIME-HLB 固相萃取/超高效液相色谱-串联质谱法同时快速检测粮食中 4 种真菌毒素的含量[J]. 云南师范大学学报, 2020, 40(5): 47-52.
- [12] Liang, Y., He, J., Huang, Z., *et al.* (2020) An Amino-Functionalized Zirconium-Based Metal-Organic Framework of Type UiO-66-NH₂ Covered with a Molecularly Imprinted Polymer as a Sorbent for the Extraction of Aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 and AFG2 from Grain. *Microchimica Acta*, **187**, 32. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3959-7>
- [13] Rui, C., He, J., Li, Y., *et al.* (2019) Selective Extraction and Enrichment of Aflatoxins from Food Samples by Mesoporous Silica FDU-12 Supported Aflatoxins Imprinted Polymers Based on Surface Molecularly Imprinting Technique. *Talanta*, **201**, 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.019>
- [14] 李丽, 吴宇, 王海波, 等. 全自动免疫亲和固相萃取超高效液相色谱测定粮油中黄曲霉毒素[J]. 中国粮油学报, 2020, 35(7): 157-164.
- [15] Mandal, P. and Tewari, B.S. (2022) Progress in Surface Enhanced Raman Scattering Molecular Sensing: A Review. *Surfaces and Interfaces*, **28**, Article ID: 101655. <https://doi.org/10.1016/j.surfin.2021.101655>
- [16] 李晋杰. 新型 SERS 传感器制备及其在真菌毒素检测中的应用研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学, 2020.
- [17] Sansone, L., Campopiano, S., Pannico, M., *et al.* (2021) Photonic Bandgap Influence on the SERS Effect in Metal-Dielectric Colloidal Crystals Optical Fiber Probe. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **345**, Article ID: 130149. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130149>
- [18] 朱雪蕊. 基于表面增强拉曼光谱光子晶体微球生物芯片真菌毒素多元检测[J]. 南京: 南京师范大学, 2019.
- [19] Yin, M., Hu, X., Sun, Y., *et al.* (2020) Broad-Spectrum Detection of Zeranone and Its Analogues by a Colloidal Gold-Based Lateral Flow Immunochromatographic Assay in Milk. *Food Chemistry*, **321**, Article ID: 126697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126697>
- [20] Wang, J., Li, X., Shen, X., *et al.* (2021) Polystyrene Microsphere-Based Immunochromatographic Assay for Detection of Aflatoxin B1 in Maize. *Biosensors*, **11**, 200. <https://doi.org/10.3390/bios11060200>
- [21] Wang, X., Wu, X., Lu, Z., *et al.* (2020) Comparative Study of Time-Resolved Fluorescent Nanobeads, Quantum Dot Nanobeads and Quantum Dots as Labels in Fluorescence Immunochromatography for Detection of Aflatoxin B1 in Grains. *Biomolecules*, **10**, 575. <https://doi.org/10.3390/biom10040575>
- [22] 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(4): 252-261+291.
- [23] Omair, Z. and Talukder, M.A. (2019) Sensitivity Analysis of Gold Nanorod Biosensors for Single Molecule Detection. *Plasmonics*, **14**, 1611-1619. <https://doi.org/10.1007/s11468-019-00946-5>
- [24] Chen, C., Yu, X., Han, D., *et al.* (2020) Non-CTAB Synthesized Gold Nanorods-Based Immunochromatographic Assay for Dual Color and On-Site Detection of Aflatoxins and Zearalenones in Maize. *Food Control*, **118**, Article ID: 107418. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107418>
- [25] Hu, L.M., Luo, K., Xia, J., *et al.* (2017) Advantages of Time-Resolved Fluorescent Nanobeads Compared with Fluorescent Submicrospheres, Quantum Dots, and Colloidal Gold as Label in Lateral Flow Assays for Detection of Ractopamine. *Biosensors and Bioelectronics*, **91**, 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.12.030>
- [26] Zhang, Z., Wu, Y., Chen, Q., *et al.* (2021) Hyperbranched Gold Plasmonic Blackbodies Enhanced Immunochromatographic Test Strip for the Sensitive Detection of Aflatoxin B1 in Maize Sample. *Food Analytical Methods*, **14**, 2017-2025. <https://doi.org/10.1007/s12161-021-02014-3>

- [27] Zhao, S., Bu, T., He, K., *et al.* (2021) A novel α -Fe₂O₃ Nanocubes-Based Multiplex Immunochromatographic Assay for Simultaneous Detection of Deoxynivalenol and Aflatoxin B1 in Food Samples. *Food Control*, **123**, Article ID: 107811. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107811>
- [28] Ojha, R.P., Pal, S., Prakash, R. (2021) Cu-Fe Prussian Blue Analog Nanocube with Intrinsic Oxidase Mimetic Behaviour for the Non-Invasive Colorimetric Detection of Isoniazid in Human Urine. *Microchemical Journal*, **171**, Article ID: 106854. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106854>
- [29] Bu, T., Bai, F., Sun, X., *et al.* (2021) An Innovative Prussian Blue Nanocubes Decomposition-Assisted Signal Amplification Strategy Suitable for Competitive Lateral Flow Immunoassay to Sensitively Detect Aflatoxin B1. *Food Chemistry*, **344**, Article ID: 128711. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128711>
- [30] Lv, Y., Yang, Y., Wu, R., *et al.* (2022) A CdSe/ZnS Core/Shell Competitive Quantum Dot-Based Fluorescence-Linked Immunosorbent Assay for the Sensitive and Accurate Detection of Aflatoxin B1 in Corn Sample. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **16**, 857-866. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01223-y>
- [31] Jia, Y., Wu, F., Liu, P., *et al.* (2019) A Label-Free Fluorescent Aptasensor for the Detection of Aflatoxin B1 in Food Samples Using AIEgens and Graphene Oxide. *Talanta*, **198**, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.078>
- [32] Setlem, S.K., Mondal, B., Ramlal, S. (2022) A Fluorescent Aptasensor for the Detection of Aflatoxin B1 by Graphene Oxide Mediated Quenching and Release of Fluorescence. *Journal of Microbiological Methods*, **193**, Article ID: 106414. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2022.106414>
- [33] Ren, W., Pang, J., Ma, R., *et al.* (2022) A Signal On-Off Fluorescence Sensor Based on the Self-Assembly DNA Tetrahedron for Simultaneous Detection of Ochratoxin A and Aflatoxin B1. *Analytica Chimica Acta*, **1198**, Article ID: 339566. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339566>
- [34] Philip, A. and Kumar, A.R. (2022) The Performance Enhancement of Surface Plasmon Resonance Optical Sensors Using Nanomaterials: A Review. *Coordination Chemistry Reviews*, **458**, Article ID: 214424. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214424>
- [35] Wei, T., Ren, P., Huang, L., *et al.* (2019) Simultaneous Detection of Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Zearalenone and Deoxynivalenol in Corn and Wheat Using Surface Plasmon Resonance. *Food Chemistry*, **300**, Article ID: 125176. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125176>
- [36] Akgönüllü, S., Yavuz, H., Denizli, A. (2020) SPR Nanosensor Based on Molecularly Imprinted Polymer Film with Gold Nanoparticles for Sensitive Detection of Aflatoxin B1. *Talanta*, **219**, Article ID: 121219. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121219>
- [37] Zhang, J., Dai, L., Cheng, F. (2021) Corn Seed Variety Classification Based on Hyperspectral Reflectance Imaging and Deep Convolutional Neural Network. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **15**, 484-494. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00646-3>
- [38] Zhu, F., Yao, H., Hruska, Z., *et al.* (2016) Integration of fluorescence and reflectance visible near-infrared (VNIR) hyperspectral images for detection of aflatoxins in corn kernels. *Transactions of The Asabe*, **59**(3), 785-794. <https://doi.org/10.13031/trans.59.11365>
- [39] Zhang, J., Xu, B., Wang, Z., *et al.* (2022) Application of Hyperspectral Imaging in the Detection of Aflatoxin B1 on Corn Seed. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **16**, 448-460. <https://doi.org/10.1007/s11694-021-01171-7>
- [40] Gao, J., Ni, J., Wang, D., *et al.* (2020) Pixel-Level Aflatoxin Detecting in Maize Based on Feature Selection and Hyperspectral Imaging. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **234**, Article ID: 118269. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2020.118269>
- [41] Sun, Z., Lv, J., Liu, X., *et al.* (2018) Development of a Nanobody-AviTag Fusion Protein and Its Application in a Streptavidin-Biotin-Amplified Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Ochratoxin A in Cereal. *Analytical Chemistry*, **90**, 10628-10634. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b03085>
- [42] Huang, X., Liu, Y., Yung, B., *et al.* (2017) Nanotechnology-Enhanced No-Wash Biosensors for *in Vitro* Diagnostics of Cancer. *ACS Nano*, **11**, 5238-5292. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b02618>
- [43] Zhan, S., Hu, J., Li, Y., *et al.* (2021) Direct Competitive ELISA Enhanced by Dynamic Light Scattering for the Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 in Corn Samples. *Food Chemistry*, **342**, Article ID: 128327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128327>
- [44] Zhang, X., Wang, Z., Fang, Y., *et al.* (2018) Antibody Microarray Immunoassay for Simultaneous Quantification of Multiple Mycotoxins in Corn Samples. *Toxins*, **10**, 415. <https://doi.org/10.3390/toxins10100415>
- [45] Lu, Y., Zhao, X., Tian, Y., *et al.* (2020) An Electrochemiluminescence Aptasensor for the Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 Based on Gold Nanorods/Graphene Quantum Dots-Modified Poly(indole-6-carboxylic acid)/Flower-Gold Nanocomposite. *Microchemical Journal*, **157**, Article ID: 104959. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104959>

-
- [46] Xia, M., Yang, X., Jiao, T., *et al.* (2022) Self-Enhanced Electrochemiluminescence of Luminol Induced by Palladium-Graphene Oxide for Ultrasensitive Detection of Aflatoxin B1 in Food Samples. *Food Chemistry*, **381**, Article ID: 132276. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132276>
- [47] Liu, R., Li, B., Li, F., *et al.* (2022) A Novel Electrochemical Sensor Based on β -Cyclodextrin Functionalized Carbon Nanosheets@carbon Nanotubes for Sensitive Detection of Bactericide Carbendazim in Apple Juice. *Food Chemistry*, **384**, Article ID: 132573. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132573>
- [48] Zhu, C., Liu, D., Li, Y., *et al.* (2021) Hairpin DNA Assisted Dual-Ratiometric Electrochemical Aptasensor with High Reliability and Anti-Interference Ability for Simultaneous Detection of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, **174**, Article ID: 112654. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112654>
- [49] Chen, W., Zhu, M., Liu, Q., *et al.* (2019) Fabricating Photoelectrochemical Aptasensor for Sensitive Detection of Aflatoxin B1 with Visible-Light-Driven BiOBr/Nitrogen-Doped Graphene Nanoribbons. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **840**, 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2019.03.033>
- [50] Zhong, T., Li, S., Li, X., *et al.* (2022) A Label-Free Electrochemical Aptasensor Based on AuNPs-Loaded Zeolitic Imidazolate Framework-8 for Sensitive Determination of Aflatoxin B1. *Food Chemistry*, **384**, Article ID: 132495. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132495>