DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20231225009

聚集诱导发光微球免疫层析试纸条定量 检测水产品中孔雀石绿

罗凯^{1,2,3},张威¹,刘文娟³,郭平^{1*},熊勇华²

(1. 江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院,南昌 330052; 2. 南昌大学中德联合研究院, 南昌 330047; 3. 江西省维邦生物科技有限公司,南昌 330096)

摘 要:目的 建立一种用于定量检测水产品中孔雀石绿的高灵敏免疫层析检测新方法。**方法** 以聚集诱导 发光荧光微球为标记探针,制备荧光免疫层析试纸条,通过 *T/C* 比值法构建定量检测孔雀石绿的定量标准曲 线,并实现水产品中孔雀石绿的高灵敏、定量检测。**结果** 本方法定量检测水产品中孔雀石绿具有较高的检 测灵敏度,其 50%抑制率达到 0.17 µg/kg,最低检出限为 0.05 µg/kg。样本加标 0.25、0.50、1.00 µg/kg 的平均 回收率介于 116.01%~122.76%,变异系数介于 8.66%~11.71% (*n*=10),表明所建立的荧光免疫层析方法定量检 测水产品中孔雀石绿具有较好的准确性、精密度。通过检测 30 份孔雀石绿阴性以及 12 份阳性的水产样本,结 果表明所建立的荧光免疫层析方法无假阳性,且检测孔雀石绿含量与液相色谱-串联质谱法具有良好的一致 性(线性相关系数为 0.9695)。**结论** 本研究以聚集诱导发光荧光微球为新型标记探针,建立了一种高灵敏检测 水产品中孔雀石绿的定量方法,为水产品中孔雀石绿的筛查检测提供了技术支撑。

关键词:聚集诱导发光荧光微球;孔雀石绿;免疫层析方法

Aggregation-induced luminescent microsphere based immunochromatographic assay for the quantitative detection of malachite green in aquatic products

LUO Kai^{1,2,3}, ZHANG Wei¹, LIU Wen-Juan³, GUO Ping^{1*}, XIONG Yong-Hua²

(1. Food Inspection and Testing Research Institute of Jiangxi General Institute of Testing and Certification, Nanchang 330052, China; 2. Jiangxi-OAI Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; 3. Jiangxi Weibang Biotechnology Co., Ltd., Nanchang 330096, China)

ABSTRACT: Objective To establish a new highly sensitive immunochromatographic assay for quantitative detection of malachite green in aquatic products. **Methods** Fluorescent immunochromatographic test strips were prepared by using aggregation-induced luminescence fluorescent microspheres as labeled probes, and the quantitative standard curve for quantitative detection of malachite green was constructed by T/C ratio method, and the highly sensitive and quantitative detection of malachite green in aquatic products was realized. **Results** The quantitative detection of malachite green in aquatic products by this method had high detection sensitivity, its 50% inhibition rate reaches 0.17 µg/kg, and the minimum limit of detection was 0.05 µg/kg. The average recoveries of 0.25, 0.50 and

基金项目:国家自然科学基金项目(32160599)、江西省重点研发计划项目(20232BBG70030)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (32160599), and the Jiangxi Provincial Key Research and Development Program (20232BBG70030)

^{*}通信作者: 郭平, 博士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品检验检测。E-mail: jxftgp@163.com

^{*}Corresponding author: GUO Ping, Ph.D, Professor, Food Inspection and Testing Research Institute of Jiangxi General Institute of Testing and Certification, No.1899, Jinsha No.2 Road, Nanchang 330052, China. E-mail: jxftgp@163.com

 $1.00 \ \mu g/kg$ ranged from 116.01% to 122.76%, and the coefficient of variation ranged from 8.66% to 11.71% (*n*=10), indicating that the established fluorescence immunochromatographic assay for quantitative detection of malachite green in aquatic products had good accuracy and precision. By detecting 30 samples of aquatic products with malachite green negative and 12 samples with malachite green positive, the results showed that the established fluorescence immunochromatographic assay had no false positive, and the detection of malachite green content had good consistency with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (linear correlation coefficient was 0.9695). **Conclusion** In this study, a highly sensitive quantitative method for the detection of malachite green in aquatic products is established by using aggregation-induced luminescence fluorescent microspheres as new labeling probes, which provide technical support for the screening and detection of malachite green in aquatic products.

KEY WORDS: aggregation-induced luminescence fluorescent microspheres; malachite green; immunochromatographic assay

0 引 言

孔雀石绿(malachite green, MG)是一种三苯甲烷类化合物^[1],为暗绿色结晶,易溶于水、乙腈和甲醇,其水溶液为蓝绿色^[2]。孔雀石绿被广泛用于皮革、丝绸、棉花和造纸工业的着色^[3],在水产养殖中也可作为有效的杀菌剂和杀寄生剂^[4],其在鱼体内被还原酶快速还原为溶脂性的隐色孔雀石绿^[5-6]。然而,由于孔雀石绿及隐色孔雀石绿对人体有高致畸性、致突变、致癌等特点^[7-8],已被许多国家列为水产养殖禁用药,我国同样已明令禁止水产养殖中使用孔雀石绿^[9]。

目前国家标准中孔雀石绿常用的检测方法有液相 色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[10]和高效液相色谱荧光检测 法(high performance liquid chromatography with fluorescence detection, HPLC-FLD)^[11]。这些方法虽然有较好的检测精密 度,但存在检测成本高、检测时间长且对检测人员的技术 要求高等缺点,不适用于大规模检测。因此,许多更简 便、成本更低的检测方法被应用于孔雀石绿的检测。例 如: 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[12-13]、化学发光免疫检测法(chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA)^[14-15]等, 这些方法与传统的仪器方 法相比在一定程度上降低了检测成本, 缩短了检测时长, 但仍存在对检测人员的技术要求高、检测时间长、只能满 足实验室检测需求等缺点,限制了这些方法在现场即时检 测领域的应用。

免疫层析方法(immunochromatographic assay, ICA)最 早可溯源至 MARTIN 和 SYNGE 基于纸质层析方法的发明, 并因此于 1952 年获得诺贝尔化学奖^[16]。免疫层析方法 由于其快速、便捷、成本低等特点被广泛应用于食品安 全^[17-19]、医学诊断^[20-21]、环境监控^[22]等领域。其中以胶体 金为探针的胶体金免疫层析法^[23]是目前应用最为广泛的 免疫层析方法。针对水产品中孔雀石绿的检测, 原国家食 品药品监督局于 2017 年颁布并实施了快速检测标准 KJ 201701《水产品中孔雀石绿的快速检测 胶体金免疫层析 法》,其检测水产品检出限为 2 μg/kg。但胶体金免疫层析 法一般通过肉眼判别结果,检测结果极易受光线等环境因 素以及检测者主观因素影响^[24],而且该方法一般只能进行 定性判读,无法得到量值结果,已较难满足现场定量检测 的需求。因此,现阶段许多荧光探针正在被研究并应用于 孔雀石绿的定量检测,如碳量子点^[25-26]、量子点微球^[27]、 时间分辨荧光微球^[28]等。但该类荧光材料由于分子间 π-π 堆积作用在高浓度或聚集状态下会产生荧光衰减或淬灭现 象,称为聚集诱导淬灭效应(aggregation-caused quenching, ACQ)^[29-30],大大限制了该类荧光材料的应用。

聚集诱导发光(aggregation-induced emission, AIE)是 唐本忠院士在 2001 年提出的一类新的荧光发光概念[31]。 具有 AIE 效应的荧光染料被分子隔离和分散时, 分子内运 动会主导激发能量的耗散,从而增强快速非辐射衰变,因 此 AIE 染料在分散状态下不发光或弱发光。但是该类染料 在聚集状态下因限制了发光分子的旋转或振动, 激发态能 量的辐射耗散被激活,从而能发出强烈的荧光。由于 AIE 染料从根本上克服了传统荧光染料的ACQ固有缺陷,且 具有斯托克斯位移大以及抗光漂白能力强等优势^[32],因 此 AIE 染料被认为是设计和制造高亮度发光微球最有 潜力的发光染料。本研究选用聚集诱导发光荧光微球 (aggregation-induced emission fluorescent microspheres, AIEFMs) 材料为信标载体,建立一种高灵敏定量检测水产品中孔雀 石绿的免疫层析检测方法,同时借助荧光免疫分析仪可实 现水产品中孔雀石绿的定量检测,为提高孔雀石绿检测的 准确度、保证监管部门监管的有效性提供了有力支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

孔雀石绿单克隆抗体(广州润坤生物科技有限公司); 孔雀石绿全抗原、AIEFMs(江西维邦生物科技有限公司); 隐 色孔雀石绿标准品[100 mg/L, GBW(E)100474]、孔雀石绿标准品[100 mg/L, GBW(E) 1004743](中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(纯度 \geq 98%)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)(纯度 98%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺[1-ethyl-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC](纯度 \geq 97.0%)(美国 Sigma 公司);其他试剂(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

HGS510 划膜喷金机、FIC-Q1 荧光免疫分析仪、 HGS510 点金喷膜仪、HGS210 切条机(杭州峰航科学仪器 有限公司); JEOLJEM 2100 透射电镜(日本 JEOL 公司); Hitachi S-4800 扫描电镜(日本 Hitachi 公司); F380 荧光分光 光度计(天津港东科技发展股份有限公司); Zetasizer Nano ZS 粒度仪(英国马尔文仪器有限公司); TGL-16 型高速冷冻离心 机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); JE-C6002 电子天平 (精度 0.01 g, 杭州恒仪仪表科技有限公司); JZX-6090B 真空 干燥箱(上海福玛实验设备有限公司); ZD-85 气浴恒温振荡 器(常州金坛良友有限公司); DMT-2500 多管涡旋混合仪(杭 州米欧仪器有限公司); 硝酸纤维素膜(德国赛多利斯公司); 底板、吸水纸、玻璃纤维素膜(上海金标生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 AIEFMs 偶联抗体探针的制备

取 15 µL AIEFMs (10 mg/mL)加入 1.5 mL 0.01 mol/L 磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB) (pH 6.0),加入 24 µL EDC (0.5 mg/mL)及 24 µL NHS (0.25 mg/mL)活化; 37℃ 120 r/min 反应 15 min 后加入孔雀石绿单克隆抗体(30 µg/mg); 37℃ 120 r/min 继续 1 h 后逐滴加入 0.15 mL 10% BSA 溶液 进行封闭反应 1 h,然后 14000 r/min 离心 15 min,加复溶 液[0.01 mol/L PB 缓冲液(pH 6.0)含 10%蔗糖及 1% BSA]复 溶至1mL, 超声15min 后完成探针的制备。制备好的探针 3µL/孔点样于酶标板微孔中, 37℃真空干燥2h获得 AIEFMs 偶联抗体探针(monoclonal antibody coupled aggregation-induced emission fluorescent microspheres, AIEFM@mAbs)。

1.3.2 AIEFMs 及其 AIEFM@mAbs 的表征

透射电镜(transmission electron microscope, TEM)及扫 描电镜(scanning electron microscope, SEM)表征 AIEFMs 的 形态及大小,荧光分光光度计以及粒度仪表征 AIEFMs 及其 AIEFM@mAbs 偶联抗体后荧光强度以及水化粒径变化。

1.3.3 免疫层析试纸条的制备

使用 HGS510 型点金喷膜仪在 NC 膜(CN95)上喷涂合 适浓度的孔雀石绿抗原和抗鼠二抗,分别作为检测线(T 线) 和质控线(C 线)。将结合垫、NC 膜、吸水纸按顺序粘贴于 PVC 底板上,其中结合垫、吸水纸均与 NC 膜部分层叠约 1~2 mm 左右,粘贴好后切成 3.0 mm 宽的试纸条。将制备 好的试纸条置于密封袋中,干燥阴凉条件下保存。

1.3.4 免疫层析试纸条的检测方法

将 AIEFM@mAbs 微孔与 90 μL 待测样本孵育反应 5 min, 然后将该混合物全部加入试纸条的加样孔中, 37℃ 恒温孵育 10 min 后放入荧光免疫分析仪进行检测。检测原 理如图 1 所示,当样本中没有 MG 时 AIEFM@mAbs 在层 析作用下向吸水纸方向层析,在经过 T 线和 C 线时分别被 T 线上的孔雀石绿全抗原和 C 线上羊抗鼠二抗捕获,此时 检测线 的荧光信号值最高;当样本中含有 MG 时 AIEFM@mAbs 会先和待测液中的 MG 发生免疫学反应, 形成 AIEFM@mAbs@MG 免疫复合物,随着待测液中 的 MG 含量增加,能与 T 线上孔雀石绿全抗原结合的 AIEFM@mAbs逐渐减少,检测线荧光信号值呈下降趋势。 基于试纸条的 T/C 值和待测液中的 MG 呈反比关系,可通 过 T/C 值定量检测待测液中的 MG 含量。本研究所使用的荧 光免疫分析仪的激发波长为 365 nm,发射波长为 610 nm。



Fig.1 Schematic diagram of AIEFMs based immunochromatographic assays for MG quantitative detection

1.3.5 免疫层析试纸条工艺参数优化

(1)抗体偶联 pH 的优化

微球和抗体的偶联效率往往受偶联溶液 pH 影响较 大。因此,本研究分别选用 pH 为 4.0、5.0、6.0、7.0 以及 8.0 的 0.01 mol/L PB 缓冲液评价不同标记 pH 对试纸条检 测性能的影响。实验时选取 0.01 mol/L 磷酸盐吐温缓冲液 (phosphate buffered saline and tween-20, PBST)(称取 8.00 g 氯化钠、2.00 g 磷酸二氢钾、2.00 g 氯化钾、29.00 g 十二 水合磷酸氢二钾及 4.00 g 吐温-20 于 800 mL 水中溶解后定 容至 1 L)缓冲液作为阴性, 0.01 mol/L PBST 缓冲液中加标 0.2 ng/mL 孔雀石绿作为阳性进行分析。

(2)抗体用量的优化

微球偶联过程中的抗体使用量会影响试纸条检测的 荧光强度和灵敏度,因此需对偶联抗体用量进行优化。本 研究分别使用抗体用量 5、10、20、40、80、160 μg/mg 微 球进行评价。实验时选取 0.01 mol/L PBST 缓冲液作为阴 性,0.01 mol/L PBST 缓冲液中加标 0.2 ng/mL 孔雀石绿作 为阳性进行分析。

(3)免疫动力学分析

AIEFM@mAbs 与 T 线孔雀石绿抗原及 C 线抗鼠二抗 的结合是一个动态的反应过程,该反应会随着时间的延长 而发生变化,在一定的时间后该反应才会趋于稳定,因此需 对该动态反应进行监测并确定其稳定时间。本研究对该免疫 反应进行 30 min 的动力学分析,每 1 min 记录一次 T 值、C 值及 T/C 值,以免疫动力学反应时间为 X 轴,T、C 线荧光强 度和 T/C 值分别为 Y 轴绘制免疫动力学曲线以确定各方法 的最佳免疫动力学反应时间。实验时选取 0.01 mol/L PBST 缓冲液作为阴性,0.01 mol/L PBST 缓冲液中加标 0.2 ng/mL 孔雀石绿作为阳性进行免疫动力学分析。

1.3.6 免疫层析试纸条性能评价

(1)缓冲液定量标准曲线的绘制

使用 0.01 mol/L PBST 缓冲液分别配制 0、0.05、0.10、 0.20、0.40、0.80、1.60 ng/mL 的孔雀石绿标准工作溶液,每 个浓度梯度做 3 组平行实验,以孔雀石绿浓度为 X 轴, *T/C* 值为 Y 轴绘制定量标准曲线。以标准曲线的 10%抑制率 (inhibition rate 10%, IC₁₀)为检测卡最低检出限(limit of detection, LOD)^[33]。

(2)特异性分析

使用 0.01 mol/L PBST 缓冲液配制 0.2 ng/mL 的孔雀 石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结晶紫标准工作溶液 进行检测,使用缓冲液标准曲线计算测值,进行特异性分 析,计算各自交叉反应率,计算公式见式(1)。

交叉反应率=实际测值/加标浓度×100% (1) (3)稳定性评价

参考医药行业标准 YYT 1579—2018《体外诊断医疗 器械 体外诊断试剂稳定性评价》,加速稳定性评价应可以 被接受作为确立产品说明的最初失效期的基础,本研究将 所制得的免疫层析试纸条于 55℃的高温老化环境中分别 放置 1、2、3、4、5 周评价产品的加速稳定性。实验时选 取 0.01 mol/L PBST 缓冲液作为阴性,0.01 mol/L PBST 缓冲 液中加标 0.2 ng/mL 孔雀石绿作为阳性,考察试纸条在高温 老化环境中的 T 线荧光强度、C 线荧光强度及 *T/C* 值变化。 1.3.7 免疫层析试纸条定量检测水产品中的孔雀石绿

(1)样本前处理步骤

准确称取 4 g±0.2 g样本于 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 提取剂(称取 5.16 g 对甲苯磺酸、 0.2 g 乙酸铵及 0.1 g 盐酸羟 胺于 400 mL 水中溶解后调节 pH 至 4.5, 而后定容至 500 mL) 及 5 mL 乙腈, 漩涡振荡混匀 2 min, 而后称取 2 g 中性氧化 铝及 1 g 氯化钠倒入以上离心管中, 漩涡振荡混匀 1 min, 4000 r/min 离心 2 min。吸取 1 mL 上清液于另一支 10 mL 离心管中, 加入 50 μ L 四氯对苯醌溶液(0.1%), 漩涡振荡混 匀 10 s, 静置 2 min 后放置于 65°C浓缩仪中将溶液吹干。 而后向吹干的离心管中加入 0.5 mL 0.01 mol/L PBST, 漩 涡振荡混匀 5 s 溶解离心管底部及内壁的固体残留物, 静置 2 min 后加入 1 mL 正己烷,轻轻颠倒 40 次,静置 2 min 后,下层溶液即为备用待测液。

(2)基质定量标准曲线

取孔雀石绿阴性样本提取液加标孔雀石绿至终浓度 为 0、0.05、0.09、0.19、0.38、0.75、1.50 μg/kg, 每个浓 度梯度做 3 组平行实验, 以孔雀石绿的浓度为 X 轴, *T/C* 值 为 Y 轴绘制基质定量标准曲线。

(3)样本加标回收评价

采用阴性水产样本加标实验评价检测方法精密度, 其中孔雀石绿的加标浓度分别为: 0.25、0.50、1.00 μg/kg, 每个浓度梯度加标 10 组阴性样本,评价样本加标回收率 及样本提取间变异系数(coefficient of variation, CV)。

1.3.8 实际样本检测结果与 LC-MS/MS 测定方法检测结 果比对

(1)阳性样本一致性分析

对 12 种未知浓度的阳性水产样品同时使用 LC-MS/MS 方法及聚集诱导发光荧光试纸条进行检测,以 验证聚集诱导发光荧光试纸条与 LC-MS/MS 检测结果的 一致性。

(2)假阳性率评价

对 30 份 LC-MS/MS 确证为阴性的水产样本使用聚集 诱导发光荧光试纸条进行检测,以验证聚集诱导发光荧光 试纸条的假阳性率。

1.4 数据处理

本研究的所有数据统计均采用 Origin 2016 进行分析, 本研究的所有图像分析均采用 Adobe Photoshop 2015 CC 进行处理。

2 结果与分析

2.1 AIEFMs 及 AIEFM@mAbs 的表征

2.1.1 电镜表征

通过 TEM 和 SEM 表征 AIEFMs 形态和大小(图 2A、 B),由 TEM 和 SEM 显示,聚集诱导发光荧光微球的大小 为 245 nm±5 nm,且大小均一。

2.1.2 荧光光谱以及粒度仪表征

通过荧光光谱表征 AIEFMs 的吸收光谱、荧光发射光 谱以及 AIEFMs 偶联抗体前后荧光信号变化。由图 2C 可 知, AIEFMs 的激发波长为 362 nm,发射波长为 596.8 nm, 斯托克斯位移为 234.8 nm。由于其激发光谱和发射光谱几 无重叠,因而大大避免了激发光源对其荧光信号的干扰, 提高了信噪比。此外,由图 2C 可知 AIEFMs 的发射波长半 峰宽为 81.2 nm,约为同样具有大斯托克斯位移的时间分 辨荧光微球(发射波长半峰宽一般为 10 nm 左右)半峰宽的 8 倍。由于 AIEFMs 拥有较宽的发射半峰宽,在采集 AIEFMs 发射信号时仅需拓宽信号采集范围便能大幅提升 采集的荧光信号强度,从而提升其检测灵敏度。同时,图 2C 结果表明 AIEFMs 偶联抗体前后荧光强度无显著差异,说明 AIEFMs 偶联抗体后荧光信号几无损耗。进一步通过粒度仪 分析 AIEFMs 偶联 mAbs 前后的水化粒径变化,具体结果见 图 2D。AIEFMs 的水化粒径为 254 nm±3.5 nm,而在标记 mAb 后其偶联复合物的水化粒径增大至 272 nm±4.1 nm。表 明 mAbs 成功偶联至 AIEFMs 表面。

2.2 工艺参数优化

2.2.1 抗体偶联 pH 优化结果

由图 3A 可知, 在不同 pH 条件下抗体与微球的偶联效 率有较大差异。在 pH 4~8 偶联条件下, 随着 pH 增加, 抗体 偶联效率呈先上升后下降的趋势(T 线及 C 线荧光强度随着 pH 增加先上升后下降), 在 pH 6 条件下抗体偶联效率最高 (T、C 线荧光强度最高)。同时由图 3A 中不同 pH 条件下抑 制率曲线可知, 随着 pH 增加, 抑制率同样呈现出先上升后下 降的趋势, 在 pH 6 条件下抑制率最高。综合考虑 T 线、C 线 的荧光强度及抑制率, 选择 pH 6 条件为最优偶联 pH 条件。



注: A: AIEFMs 的透射电镜图; B: AIEFMs 的扫描电镜图; C: AIEFMs 和 AIEFM@mAbs 激发以及荧光光谱; D: AIEFMs 和 AIEFM@mAbs 水化粒径变化。
图 2 AIEFMs 及 AIEFM@mAbs 的表征

Fig.2 Characterization of AIEFMs and AIEFM@mAbs

2.2.2 抗体用量优化结果

由图 3B 可知,随着抗体用量的增加,抗体偶联效率 呈持续上升趋势,且在 80 μg/mg条件下基本达到峰值(T线 及 C线荧光强度随着抗体用量增加持续上升,在 80 μg/mg 条件下趋于稳定)。同时由图 3B 中不同抗体用量条件下抑 制率曲线可知,在抗体用量 5~20 μg/mg条件下抑制率均维 持在 60%左右无显著性差异,但超过 20 μg/mg 后抑制率呈 持续下降趋势。综合考虑 T、C 线的荧光强度及抑制率,选 择 20 μg/mg条件为最佳抗体用量。

2.2.3 免疫动力学分析结果

由图 3C 可知,随着免疫动力学反应时间的延长,阴 性及阳性的 *T/C* 值均呈现持续下降的趋势,且在 10 min 左 右趋于平衡,因此选择 10 min 为试纸条的定量读取的最佳 免疫动力学反应时间。

2.3 性能评价

2.3.1 缓冲液标准曲线的绘制

以 0.01 mol/L PBST 缓冲液为标准曲线缓冲液,分别 配制质量浓度为 0、0.05、0.10、0.20、0.40、0.80、1.60 ng/mL 的孔雀石绿标准品溶液。以孔雀石绿的浓度为 X 轴, *T/C* 值为 Y 轴绘制定量标准曲线,使用四参数拟合,确定拟 合方程。如图 4A 所示,定量标准曲线的曲线方程为 *Y*=0.257+3.29/(1+*X*/0.189)^{2.3}, 线性相关系数(*r*²)为 0.9987, 50%抑制率(inhibition rate 50%, IC₅₀)和 LOD 值分别为 0.19 ng/mL 和 0.05 ng/mL。

2.3.2 特异性分析

分别选取孔雀石绿、隐色孔雀石绿、结晶紫、隐色结 晶紫4种标准工作溶液进行试纸条特异性评价,如图4B所 示,试纸条与孔雀石绿和结晶紫的交叉反应率分别为 100.00%和 96.89%,与隐色孔雀石绿和隐色结晶紫几无交 叉。基于此,本方法检测实际样本中孔雀石绿及其代谢物 隐色孔雀石绿、结晶紫及其代谢物隐色结晶紫残留前处理 步骤需进行氧化步骤,以便在前处理过程中将实际样本中 的隐色孔雀石绿及隐色结晶紫分别氧化为孔雀石绿及结晶 紫后进行检测。通过 1.3.7 (1)中前处理方法可同时检测实 际样本中的孔雀石绿及其代谢物隐色孔雀石绿、结晶紫及 其代谢物隐色结晶紫。

2.3.3 加速稳定性评价

将所制得的免疫层析试纸条于 55℃的高温老化环境 中分别放置 1、2、3、4、5 周评价产品的加速稳定性。结 果如图 4C 所示,试纸条 55℃放置 5 周后 T 线荧光强度、C 线荧光强度及 *T/C* 值均无显著性变化,表明本研究所制得 的免疫层析试纸条加速稳定性较好,证明了本研究所使用 的 AIEFMs 优异的光学稳定性。



Fig.3 Optimization results of process parameters





使用孔雀石绿阴性样本提取液加标方式配制基质标 准曲线溶液,以孔雀石绿浓度为X轴,T/C值为Y轴,使用 四参数拟合,确定拟合方程。如图 5 所示,基质定量标准 曲线的曲线方程为Y=0.165+3.931/(1+X/0.165)^{1.9}, r²=0.9986, 经计算 IC₅₀和 LOD 分别为 0.17 µg/kg 和 0.05 µg/kg。以上 结果表明,通过构建基质标准曲线仍能实现孔雀石绿的高 灵敏检测,相较于现行的快速检测标准 KJ 201701(检出限 2.00 µg/kg),本方法应用于实际水产样本中孔雀石绿检测 具有更高的检测灵敏度。

2.5 方法的准确性以及精密度分析

采用阴性水产样本加标实验分析方法检测实际样本的 加标回收率及 CV, 以评价方法的准确性以及精密度, 结果如 表 1 所示。10 组不同的水产样本(鲫鱼、草鱼、花鲢、鲈鱼、 黄鱼、鳊鱼、乌鱼、基围虾、牛蛙、泥鳅)分别加标 0.25、0.50、 1.00 µg/kg 孔雀石绿, 使用 1.3.7 (1)中前处理方法进行实际样 本检测, 试纸条检测的加标回收率分别为 122.76%、120.72%



和 116.01%,各浓度点样本提取 CV 分别为 11.71%、9.58%和 8.66%,表明该方法应用于实际水产样本中孔雀石绿高灵敏 定量检测具有可接受的准确性及精密度。

表1 水产样本中孔雀石绿加标回收实验(n=10) Table 1 Recoveries of MG in aquatic samples (n=10)

加标浓度/(µg/kg)	检测浓度/(µg/kg)	回收率/%	CV/%
0.25	0.31	122.76	11.71
0.50	0.60	120.72	9.58
1.00	1.16	116.01	8.66

注: 回收率=(检测浓度/加标浓度)×100%。

2.6 与 LC-MS/MS 方法一致性分析

2.6.1 阳性样本一致性分析

对 12 种未知浓度的阳性样品进行检测,结果如表 2 所示,MG 样品检测浓度范围为 3.84~7.04 μg/kg,通过 LC-MS/MS 验证,结果显示检测样品浓度范围为 3.89~ 7.38 μg/kg,相关性分析如图 6 所示,MG 的线性回归方程

表 2 聚集诱导发光免疫层析法和 LC-MS/MS 对实际样品的检测

Table 2	Detection of real samples by aggregation-induced
luminesce	nce immunochromatographic assay and LC-MS/MS

		,
样品	聚集诱导发光免疫层析法	LC-MS/MS 检测结果
	检测结果/(µg/kg)	$/(\mu g/kg)$
鲫鱼1	5.28	5.96
鲫鱼2	5.17	5.69
鲫鱼3	4.95	5.01
鳊鱼1	7.04	7.38
鳊鱼2	5.58	5.72
鳊鱼3	4.23	4.41
黄鱼1	5.22	5.40
黄鱼 2	5.38	5.67
黄鱼 3	6.84	7.03
草鱼1	4.01	3.89
草鱼 2	4.05	4.04
草鱼3	3.84	3.92

注: 检测前将每个样本提取物稀释 5 倍后检测, 每个样本做 3 组 平行, 取平均值。



为 *Y*=1.0942*X*-0.2728, *r*²=0.9695。进一步验证了本研究开发的聚集诱导发光免疫层析法结果的可靠性和准确性,与仪器分析结果高度一致,可用于水产样本中孔雀石绿的现场快速检测。

2.6.2 假阳性率评价

对 30 份 LC-MS/MS 确证为阴性的样品进行检测,考 察本方法的假阳性率,结果如表 3 所示,本方法检测 MG 样品结果均小于检出限(0.05 µg/kg),表明本方法检测水产 样本的假阳性率为 0%。

表	3 聚集诱导发光免疫层析法和 LC-MS/MS	
	对实际样品的检测(<i>n=</i> 3)	
Table 3	Detection of real samples by aggregation-induced	
luminescence immunochromatographic assay and		
$I C_MS/MS (n=3)$		

	LC-MS/MS(n-5)	
样品	聚集诱导发光免疫层析法	LC-MS/MS 检测结果
	检测结果/(µg/kg)	$/(\mu g/kg)$
1	< 0.05	ND.
2	< 0.05	ND.
3	< 0.05	ND.
4	< 0.05	ND.
5	< 0.05	ND.
6	< 0.05	ND.
7	< 0.05	ND.
8	< 0.05	ND.
9	< 0.05	ND.
10	< 0.05	ND.
11	< 0.05	ND.
12	< 0.05	ND.
13	< 0.05	ND.
14	< 0.05	ND.
15	<0.05	ND.
16	<0.05	ND.
17	< 0.05	ND.
18	< 0.05	ND.
19	< 0.05	ND.
20	< 0.05	ND.
21	< 0.05	ND.
22	< 0.05	ND.
23	< 0.05	ND.
24	< 0.05	ND.
25	< 0.05	ND.
26	< 0.05	ND.
27	<0.05	ND.
28	<0.05	ND.
29	< 0.05	ND.
30	< 0.05	ND.

注: ND.表示未检出。

3 讨论与结论

我国农业农村部公告第 250 号明确将孔雀石绿等药 物纳入食品动物中禁止使用的药品及其他化合物清单。因 此,建立水产品中孔雀石绿高灵敏定量检测方法对于保障 我国渔业的高质量健康发展具有重要的意义。本研究以 AIEFMs 为信标探针,建立了一种定量检测水产品中孔 雀石绿的聚集诱导发光免疫层析方法。由于所使用的 AIEFMs 拥有较优的光学特性,基于此材料所建立的免 疫层析方法在检测水产样本时拥有较高的检测灵敏度 (LOD=0.05 µg/kg), 而现行的快速检测标准 KJ 201701 定性 检出限为 2.00 μg/kg, 现行 GB/T 19857—2005《水产品中 孔雀石绿和结晶紫残留量的测定》LC-MS/MS 定量检出限 为 0.50 µg/kg, 本研究所建立的聚集诱导发光免疫层析方 法灵敏度比胶体金法高约 40 倍, 比 LC-MS/MS 方法高 约10倍。此外,将该方法应用于实际水产样本中孔雀石 绿检测,其结果与 LC-MS/MS 方法检测结果高度一致 (r²=0.9695), 且无假阳性结果。总之, 该方法避免了传统胶 体金免疫层析方法肉眼判定主观性强、灵敏度差、无法定 量的缺点。相较于传统胶体金试纸条,荧光试纸条需借助 读取仪才能实现目标物的定量检测,因此在一定程度上增 加了基层使用的成本,但传统依赖于裸眼判读的定性检测 已越来越满足不了食品安全快速检测的发展需求,借助仪 器判读不仅仅能提高检测的准确度,还能借助仪器本身的 特性(可对接监管平台, 检测结果可溯源, 检测结果实时上 传无法人为修改等)保证监管的有效性。总之,本研究建立 了一种高灵敏检测水产品中孔雀石绿的聚集诱导发光免疫 层析方法,为食品安全领域其他污染物的检测提供了一个 新的方向。

参考文献

- 王文珺,韩承义,聂丽,等. 胶体金免疫层析法检测水产品中孔雀石绿 总量残留[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(11):3405–3409.
 WANG WJ, HAN CY, NIE L, *et al.* Determination of total malachite green residues in aquatic products by colloidal gold immunochromatography [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(11): 3405–3409.
- [2] 李凯华,张玲,闫清华,等.优化高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中孔雀石绿及隐色孔雀石绿的残留量[J].食品安全质量检测学报, 2018,9(6):1350–1357.

LI KH, ZHANG L, YAN QH, *et al.* Optimize the detection of malachite green and dark malachite green residues in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(6): 1350–1357.

- [3] KHAN MA, OTERO M, KAZI M, et al. Unary and binary adsorption studies of lead and malachite green onto a nanomagnetic copper ferrite/drumstick pod biomass composite [J]. J Hazard Mater, 2019, 365: 759–770.
- [4] SAMIEY B, TOOSI AR. Adsorption of malachite green on silica gel:

Effects of NaCl, pH and 2-propanol [J]. J Hazard Mater, 2010, 184(1-3): 739–745.

[5] 左舜宇,张天闻.水产品中孔雀石绿检测方法的优化[J].中国渔业质量与标准,2017,7(1):35-40.
 ZUO SY, ZHANG TW. Optimization of malachite green detection method

in aquatic products [J]. China Fish Qual Stand, 2017, 7(1): 35–40.

- [6] 宫向红,徐英江,任传博,等. HPLC 测定水产品中孔雀石绿、亚甲基蓝、结晶紫及其代谢物的残留量[J]. 食品科学, 2012, 33(4): 144–147. GONG XH, XU YJ, REN CB, *et al.* Determination of malachite green, methylene blue, crystal violet and their metabolite residues in aquatic products by HPLC [J]. Food Sci, 2012, 33(4): 144–147.
- [7] CULP SJ, BLANKENSHIP LR, KUSEWITT DF, et al. Toxicity and metabolism of malachite green and leucomalachite green during short-term feeding to fischer 344 rats and B6C3F1 mice [J]. Chem-Biol Interact, 1999, 122(3): 153–170.
- [8] SUNDARRAJAN M, FERNANDIS AZ, SUBRAHMANYAM G, et al. Overexpression of G1/S cyclins and PCNA and their relationship to tyrosine phosphorylation and dephosphorylation during tumor promotion by metanil yellow and malachite green [J]. Toxicol Lett, 2000, 116(1–2): 119–130.
- [9] ZHAO M, HOU Z, LIAN Z, et al. Direct extraction and detection of malachite green from marine sediments by magnetic nano-sized imprinted polymer coupled with spectrophotometric analysis [J]. Mar Pollut Bull, 2020, 158: 111363.
- [10] 黄昌兴. 高效液相色谱法测定水产品中孔雀石绿及其代谢物的含量[J]. 食品安全导刊, 2023, (27): 64-66.
 HUANG CX. Determination of malachite green and its metabolites in aquatic products by high performance liquid chromatography [J]. Chin Food Saf Magaz, 2023, (27): 64-66.
- [11] 高月明,朱洁文,陈玉如. 高效液相色谱-荧光检测法测定水产品中孔 雀石绿残留量[J]. 现代农业科技, 2014, (15): 306, 315.
 GAO YM, ZHU JW, CHEN YR. Determination of malachite green residue in aquatic products by high performance liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Mod Agric Sci Technol, 2014, (15): 306, 315.
- [12] LI L, PENG AH, LIN ZZ, et al. Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film [J]. Food Chem, 2017, 229: 403–408.
- [13] 梁娟, 张倩玉,魏海英,等. ELISA 法测定水产苗种中孔雀石绿及其代谢物的残留量[J]. 渔业研究, 2022, 44(2): 146–153.
 LIANG J, ZHANG QY, WEI HY, *et al.* Determination of the residual amount of malachite green and its metabolites in aquatic seedlings by ELISA method [J]. J Fishs Res, 2022, 44(2): 146–153.
- [14] ZHANG Y, YANG JY, LEI HT, et al. Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of malachite green in seafood [J]. Food Agric Immunol, 2015, 26(2): 127780.
- [15] DONG J, LI Z, WANG Y, et al. Generation of functional single-chain fragment variable from hybridoma and development of chemiluminescence enzyme immunoassay for determination of total malachite green in tilapia fish [J]. Food Chem, 2021, 337: 127780.
- [16] PAROLO C, MERKOCI A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics [J]. Chem Soc Rev, 2013, 42(2): 450–457.

- [17] LIU J, GUO LL, WU AH, et al. Immunochromatographic assay for the analysis of methomyl in cabbage and tomato [J]. Food Chem, 2022, 409: 135273.
- [18] 李磊涛. 免疫层析试纸条在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全导刊,
 2023, (25): 168–170.
 LI LT. Application of immunochromatographic test strips in food safety

testing [J]. Chin Food Saf Magaz, 2023, (25): 168-170.

- [19] XIE H, LI Y, WANG J, et al. Broad-specific immunochromatography for simultaneous detection of various sulfonylureas in adulterated multi-herbal tea [J]. Food Chem, 2022, 370: 131055.
- [20] 叶雅冰. 基于聚左旋多巴的 PCT和 CRP 侧流免疫层析定量检测试纸的 研制[D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
 YE YB. Development of poly(levodopa)-based immunochromatographic quantitative test strips for PCT and CRP lateral flow detection [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2023.
- [21] DUAN XJ, SHI YJ, ZHANG XD, *et al.* Dual-detection fluorescent immunochromatographic assay for quantitative detection of SARS-CoV-2 spike RBD-ACE2 blocking neutralizing antibody [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 199: 113883.
- [22] 李杨阳, 曲文莉, 杨庆,等. 铅胶体金兔疫层析试纸条研制及其在小龙虾中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(8): 2413–2418.
 LI YY, QU WL, YANG Q, *et al.* Development of lead colloidal gold immunochromatographic test strips and their application in crayfish [J]. J Food Saf Qual, 2022, 13(8): 2413–2418.
- [23] LU YK, XU D, LIU WY, et al. A rapid tricolour immunochromatographic assay for simultaneous detection of tricaine and malachite green [J]. Biosensors, 2022, 12(7): 456.
- [24] 彭涛. 胶体金免疫层析法快速定量检测猪尿中β₂-受体激动剂残留的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2015.
 PENG T. Study on rapid quantitative detection of β₂-agonist residues in pig urine by colloidal gold immunochromatography [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015.
- [25] 崔义坤.水产品中孔雀石绿的"碳点"基荧光检测体系构建[D]. 扬州: 扬州大学, 2023.
 CUI YK. Determination of malachite green in aquatic products by "carbon maint" hand flamman data time mattern [D]. Varachem Varachem

point" based fluorescence detection system [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2023.

[26] HU Y, GAO Z, LUO J. Fluorescence detection of malachite green in fish tissue using red emissive Se, N, Cl-doped carbon dots [J]. Food Chem, 2021, 335: 127677.

- [27] YANG J, LIN ZZ, HUANG ZY. Rapid detection of trace malachite green using a fluorescence probe based on signal amplification through electrostatic self-assembly of CdTe QDs and polystyrene microsphere [J]. Mar Pollut Bull, 2020, 151: 110812.
- [28] WANG X, YANG T, CHEN X, et al. Quantitative detection of malachite green in sediment by a time-resolved immunofluorescence method combined with a portable 3D printing equipment platform [J]. Sci Total Environ, 2023, 855: 158897.
- [29] HUANG X, GUO Q, ZHANG R, et al. AIEgens: An emerging fluorescent sensing tool to aid food safety and quality control [J]. Compr Rev Food Sci Food Saf, 2020, 19(4): 2297–2329.
- [30] WANG H, LI Q, ALAM P, et al. Aggregation-induced emission (AIE), life and health [J]. ACS Nano, 2023, 17(15): 14347–14405.
- [31] LUO J, XIE Z, LAM JW, et al. Aggregation-induced emission of 1-methyl-1,2,3,4,5-pentaphenylsilole [J]. Chem Comm, 2001, (18): 1740–1741.
- [32] WEI X, CHEN X, LIU Z, et al. Advantages of aggregation-induced luminescence microspheres compared with fluorescent microspheres in immunochromatography assay with sandwich format [J]. Anal Chim Acta, 2023, 1247: 340869.
- [33] WANG Y, NING B, PENG Y, et al. Application of suspension array for simultaneous detection of four different mycotoxins in corn and peanut [J]. Biosens Bioelectron, 2013, 41: 391–396.

(责任编辑:张晓寒 于梦娇)

作者简介



罗 凯,硕士,工程师,主要研究方向 为食品安全快速检测。 E-mail: luokai19900217@outlook.com



郭 平,博士,正高级工程师,主要研
 究方向为食品检验检测。
 E-mail:jxftgp@163.com