

徐正华, 杨晗婕, 吴思超, 等. 多真菌毒素同步快检试纸阵列装置的研制与应用[J]. 华中农业大学学报, 2022, 41(5): 283-290.
DOI: 10.13300/j.cnki.hnlkxb.2022.05.034

多真菌毒素同步快检试纸阵列装置的研制与应用

徐正华¹, 杨晗婕², 吴思超¹, 张毅²

1. 中华人民共和国黄埔海关技术中心, 广州 510770;

2. 江南大学食品科学与技术国家重点实验室/江南大学食品学院, 无锡 214122

摘要 为进一步压缩检测时长、实现进出口食品快速通关, 研制阵列装置用于多毒素同步快速检测。设计并以3D打印技术构建了卧式和立式2种适配于胶体金侧流免疫分析(LFIA)试纸的阵列装置, 并对装置的性能进行评价。以阵列装置同时集成黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)以及脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)等4种真菌毒素的LFIA试纸并应用于玉米、玉米面和麦仁等食品的检测。试验结果显示: 4种毒素的检测限分别达0.031、0.190、0.780、0.220 ng/mL, 回收率为74.42%~112.40%, 结果无交叉反应, 包括前处理时间在内单一样品的四指标同步检测可在40 min内完成。

关键词 真菌毒素; 侧流免疫分析; 3D打印; 快检装置; 粮食安全

中图分类号 TS207.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2022)05-0283-08

黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)、赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)以及脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是丝状真菌产生的有毒次级代谢产物, 可在生物体内积累。这些真菌毒素的主要毒性包括致癌性、雌激素和生殖毒性、致突变性和肝肾毒性物质、致畸性和免疫抑制, 对人类和动物健康构成严重危害^[1]。真菌毒素分布广泛, 主要污染小麦、玉米、饲料等农产品^[2-3]。根据粮农组织的统计, 每年全球25%的农产品受到真菌毒素的污染, 其中多达91.4%的样本受到了联合污染^[4], 造成数千亿美元的经济损失。我国食品安全国家标准GB2761—2017《食品中真菌毒素限量》中规定了黄曲霉毒素B1、玉米赤霉烯酮、赭曲霉毒素A及脱氧雪腐镰刀菌烯醇的限量指标分别为0.5~20、60、2~10、1 000 g/kg。各种真菌在生长或产生毒素时具有相同的生态条件^[5], 大多数真菌可产生多种真菌毒素, 一种真菌可污染多种农产品和食品, 再加上饮食多样化, 食品通常会受到真菌毒素共存的污染^[6]。真菌毒素的共同污染可能导致拮抗、累积或协同效应, 对人类构成更大的威胁^[7]。因此, 迫

切需要开发真菌毒素的多重检测方法。

目前, 霉菌毒素复合检测方法主要有仪器分析法和免疫分析法。仪器检测方法, 如高效液相色谱法(HPLC)^[8]、液相色谱荧光法(LC-FL)^[9]和液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[10], 准确可靠, 但依赖昂贵的设备、复杂的样品预处理步骤和专业培训人员, 这大大限制了真菌毒素现场检测的应用。免疫分析法因其灵敏度高、成本低而被广泛应用于真菌毒素的检测^[11]。高通量免疫分析在检测多种真菌毒素方面具有显著优势, 例如酶联免疫吸附试验^[12]、多重流动细胞免疫分析^[13]和抗体微阵列免疫分析^[14]。然而, 由于对特殊仪器和熟练技术人员的需求, 这些方法无法得到广泛应用。

侧流免疫层析分析法(LFIA)作为一种新兴的检测技术, 具有速度快、检测限低(LOD)、特异性好、成本低和耗样少等优点^[15-16]。尽管标准LFIA具有优良的特性, 但1次只能检测1个目标分析物, 食品安全、环境控制、临床诊断和法医监测等领域, 均需要具有多路复用能力的试纸, 以提高测试效率, 同时降低成本^[17]。已有研究者开发了单条试纸上固定多条

收稿日期: 2022-05-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(21876066); 中华人民共和国海关总署科技计划项目(2020HK199); 江南大学基础科研计划项目(JUSRP21921); 江苏省食品安全与质量控制协同创新中心项目

徐正华, E-mail: xuzhchq@163.com

通信作者: 张毅, E-mail: zhangyijnu@jiangnan.edu.cn

检测线的检测方法(迄今为止最多5种分析物)^[18-19],此方法中前端分析物的含量会对后端显色产生显著影响因而难以定量,多色编码能在一定程度上克服信号元的非特异性吸附带来的干扰,但受试纸长度所限、多条检测条带彼此间距离很近,不利于肉眼准确区分和辨别。多个分析物实际以先后顺序得以检测,没有做到真正的“同步”检测。仅有的1条质控线也无法保障多条通路的有效性,可能会导致假阳性或结果偏差。Lu等^[20]开发了基于适配体的LFIA,用于食品样品中快速定性筛选多种病原体,3条独立的通道可同时初步检测鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7和金黄色葡萄球菌。但此工作在定量检测方向还有待进一步探索。综上,对于多类复杂基质中多目标物的同步快速检测,开发实用、便携、价廉的,又能真正实现时间同步、且又互不影响的阵列试纸装置具有重要的创新意义和成果延伸意义。

3D打印技术简化了产品的制造程序,减少了产品的制造时间和耗材用量,可制造复杂结构零件并且无需组装,可实现精确实体复制以及个性化定制^[21],从而提高了生产效率,成本低廉。它对于小批量单件、特殊复杂零件能直接快速生产。已经有研究人员借助3D打印技术辅助侧流免疫层析试纸条的检测^[22],不仅能简便、低成本地制造模具,而且可以实现新产品开发过程中的设计和功能的验证,简化了复杂系统在有限空间里的可制造性和可装配性检验。

本研究以北京华安麦科生物技术有限公司的4种毒素快检试纸的尺寸为参考,设计基于快检试纸条的阵列装置。利用3D打印技术构建适配于试纸条的阵列装置,可实现多真菌毒素平行同步快速检测,为口岸粮食筛查和快速通关提供切实可行的技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 NaOH 、乙腈、无水乙醇等均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;去离子水,杭州娃哈哈集团有限公司;聚乳酸(直径1.75 mm),珠海京天乐购科技有限公司;黄曲霉毒素B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A以及玉米赤霉烯酮快速检测试纸条均为北京华安麦科生物技术有限公司。真菌毒素标准品包括黄曲霉毒素B1、脱氧雪腐镰刀菌烯醇、赭曲霉毒素A和玉米赤霉烯酮,青岛普瑞邦生物工程有限公司。玉米、玉米面、麦

仁、花生、燕麦、薏仁、小麦、大米粮食样品采购于当地农贸市场。

1.2 仪器与设备

Vortex 2 涡旋混匀仪,德国IKA公司;5804R离心机,德国艾本德股份公司;ST3100实验室pH计,美国奥豪斯仪器有限公司;Z603S工业高精度3D打印机,深圳市极光尔沃科技股份有限公司;荣耀30智能手机,中国华为技术有限公司;MZ-4000样本前处理一体机,山东美正生物科技有限公司;KJ-120快速检测工具箱,山东美正生物科技有限公司。

1.3 试纸阵列装置的设计与打印

3D建模由AutoCAD 2018软件完成;3D打印由极光尔沃Z603S工业高精度3D打印机结合控制软件Cura-15.02.1完成,其主要参数设置为:填充密度为20%、打印速度为30 mm/s、喷头温度为200℃、热床温度为50℃,其他参数保持初始设定。

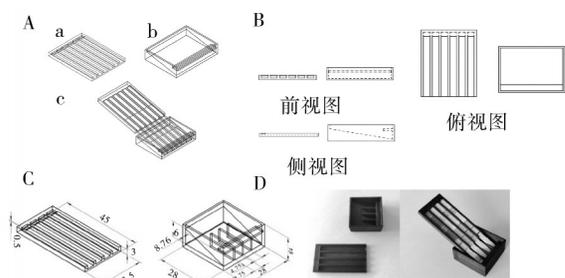
1.4 卧式阵列装置的设计与条件优化

设计了一种卧式同步快检测层析试纸阵列装置,阵列装置由两部分组成,试纸阵列板a与宽度、承重均合适的样液盒b相匹配(图1A)。如图1B装置的三视图所示,试纸阵列板a设有至少1条稳固槽道,槽道宽度略宽于试纸条,稳固槽道前端封闭,末端开口,用于插入试纸条,试纸条的吸水垫插入并固定在稳固槽道前端,试纸条的样品垫悬挂在稳固槽道外;样液盒b四周封闭且上部开口,内部沿长度方向具有由高至低的坡道,坡道的底部用于存放样品液,坡道底部上方设有长方体挡块,用于稳固插入试纸条的样品垫端。

当卧式试纸阵列装置处于测试工作状态时(图1A-C),多条试纸条的吸水垫固定在阵列板稳固槽道前端,移动试纸阵列板,多条试纸条的样品垫沿所述坡道下滑,对应插入所述样液盒底部的样品液中,实现试纸阵列中所有试纸条完全同步上样。

在使用装置时发现,4种样液混合后,金标探针的稀释倍数增大,不符合单条试纸线性规律的应用要求,如增加金标探针的用量,经济成本过大;同时AFB1、ZEN、OTA、DON等4种毒素试纸所需最适缓冲体系的pH值区间分别为8.7~8.8、8~9.6~7,当4种缓冲液混合,缓冲体系的差异将干扰试纸的层析效果。为解决以上应用中存在的问题,对卧式同步快检测层析试纸阵列装置的结构进行优化。根据目前使用需求,槽道设置为4条,在样液盒b内添加隔板,形成4个均匀的隔档,使4种缓冲体系保持独

立状态,隔档与槽道一一对应,供试纸插入。具体尺寸如图1C所示。打印成品图以及应用情况如图1D所示,成本核算如表1所示。



A:组成结构以及处于测试工作状态示意图 Schematic diagram of composition structure and working state under test; B:装置三视图 Three-view of device; C:优化后结构及尺寸(mm) Optimized structure and size (unit: mm); D:打印成品图以及应用情况 Printing of finished drawings and the application situation.

图1 卧式同步快检测流层析试纸阵列装置

Fig.1 Schematic diagram of horizontal synchronous rapid inspection lateral flow chromatography array device

表1 试纸阵列装置3D打印的成本核算
Table 1 Cost accounting of 3D printing of strip array device

类型 Type	部件 Part	打印 时间/min Print time	打印 耗材/m Print consume	打印 成本/元 Print cost
卧式 Horizontal	试纸阵列板 Array board	25	0.78	0.09
	样液盒 Sample liquid box	71	1.77	0.20
立式 Vertical	阵列检测盒 Array detection box	34	1.02	0.12
	推手 Push handle	19	0.55	0.06

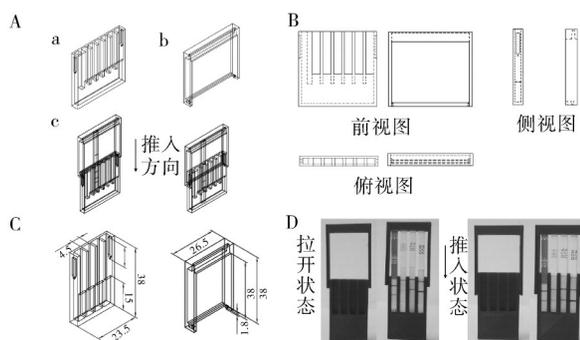
1.5 立式阵列装置的设计与条件优化

设计了一种立式同步快检测流层析试纸阵列盒(图2A),包括阵列检测盒和推手。如图2B所示,阵列检测盒的下部为封闭的样液储蓄盒,用于存放样品液;阵列检测盒的上部具有与样液储蓄盒连通的进样口及至少1条稳固槽道;阵列检测盒的上部两外侧具有滑道;推手包括主横杆和两侧的竖杆,主横杆内侧具有夹道,用于固定试纸条吸水垫端;竖杆的内侧具有与滑道匹配的楔形滑柱,滑柱可沿滑道滑动。当滑柱沿滑道滑动至底部时,滑柱与锥形结构以楔形吻合的方式固定。

为解决本文“1.4”中提出的问题,对立式同步快检测流层析试纸阵列盒的结构进行优化。根据目前使用需求,槽道设置为4条,除去样液储蓄盒左侧的

加样通道,将槽道对应的样液储蓄盒分成4个储蓄分盒,达到4种缓冲体系加入后互不干扰的状态。具体尺寸如图2C所示。打印成品图以及应用情况如图2D所示,成本核算如表1所示。

当立式试纸阵列装置处于测试工作状态时(图2A-C),多条试纸条的吸水垫端固定在推手的夹道内。加样时所有试纸均不接触样液,加样完成后,借助推手将所有试纸的样品垫端一起推入样液储蓄盒,实现试纸阵列中所有试纸条完全同步上样。



A:组成结构以及处于测试工作状态示意图 Schematic diagram of composition structure and working state under test; B:装置三视图 Three-view of device; C:优化后结构及尺寸(mm) Optimized structure and size (unit: mm); D:打印成品图以及应用情况 Printing of finished drawings and the application situation.

图2 立式同步快检测流层析试纸阵列盒

Fig.2 Schematic diagram of vertical synchronous fast inspection lateral flow chromatography array box

1.6 4种毒素试纸的性能验证

预先用乙腈配制0.1 mg/mL AFB1、ZEN、OTA、DON 标品溶液,用PBS(10 mmol/L, pH 7.4)进行稀释。AFB1的质量浓度依次为0、0.1、0.5、1、2、3 ng/mL;ZEN的质量浓度依次为0、1、10、25、50、60、70、80、100 ng/mL;OTA的质量浓度依次为0、1、10、20、40、60、80、100、120、200、300 ng/mL;DON的质量浓度依次为0、10、50、100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、15 000、18 000 ng/mL。

最佳试验条件下,将金标抗体、200 μL不同质量浓度的毒素标品溶液与相应试纸缓冲液的混合液($V_{\text{标品液}}:V_{\text{稀释液}}=1:5$),在室温下孵育5 min,然后将试纸条插入进行层析,静等25 min目测读取试验结果,并利用智能手机采集结果图像,采用Image J软件(<http://cnij.imjoy.io/>)对图像结果进行灰度分析。以公式 $LOD=\bar{x}+3s$ (\bar{x} 为对11个空白样品的测试均值, s 为测试的标准偏差)计算得到方法的检测限。以T区消线的毒素浓度作为试纸最高检出限的判定标准。

1.7 4种毒素试纸的特异性验证

评定4种试纸条在4种毒素间的特异性。分别配制质量浓度为5、120、400、6 400 ng/mL的AFB1溶液、ZEN溶液、OTA溶液和DON溶液待用。用AFB1试纸缓冲液、ZEN试纸缓冲液、OTA试纸缓冲液、DON试纸缓冲液对4种毒素溶液分别进行稀释混合5 min ($V_{\text{毒素溶液}}:V_{\text{稀释液}}=1:5$)。取混合液200 μL ,用试纸条进行特异性试验,25 min后目测读取试验结果,并利用智能手机采集结果图像,采用Image J软件对图像结果进行灰度分析。

1.8 实际样品的检测

1)选取玉米、玉米面、麦仁、花生、燕麦、薏仁、小麦、大米8种粮食样品,利用试纸及阵列装置进行4种毒素的检测分析。粮食样品前处理:称取5.0 g粮食样品均质,过孔径0.85 nm筛网,加入12 mL 50%乙醇-水溶液,充分振荡混合(150 r/min, 3 min),离心(4 000 r/min, 5 min),除去沉淀,吸取上清液待用。用AFB1试纸缓冲液、ZEN试纸缓冲液、OTA试纸缓冲液、DON试纸缓冲液对上清液进行稀释混合5 min ($V_{\text{上清液}}:V_{\text{稀释液}}=1:5$)。取混合液200 μL ,用试纸条进行实际样品检测试验,25 min后目测读取试验结果,并利用智能手机采集结果图像,采用Image J软件对图像结果进行灰度分析。

2)玉米、玉米面、麦仁样品的加标检测。AFB1的加标质量浓度分别为0、0.1、1 ng/mL;ZEN的加标质量浓度分别为0、1、10 ng/mL;OTA的加标质量浓度分别为0、10、100 ng/mL;DON的加标质量浓度分别为0、10、100 ng/mL。分别用AFB1试纸缓冲液、ZEN试纸缓冲液、OTA试纸缓冲液、DON试纸缓冲液对加标粮食上清液进行稀释混合5 min ($V_{\text{上清液}}/V_{\text{稀释液}}=1:5$)。取混合液200 μL ,用试纸条进行实际样品加标检测实验,25 min后目测读取试验结果,并利用智能手机采集结果图像,采用Image J软件对图像结果进行灰度分析。

2 结果与分析

2.1 阵列装置的使用效果

首先由7名独立评价员在相同试验环境以及规定时间内,分别使用卧式、立式2种阵列装置,对同一批次的试验样品(均为阴性样品),进行完整的检测操作,并对装置的使用效果进行描述性检验评价。由2种装置的特征可知,卧式阵列装置具有易操作、灵活性强、重复利用性高、暴露性高、易受污染等特

点,因其良好的操作性以及重复利用性,更适用于实验室环境的检测;立式阵列装置具有操作性欠佳、体积小、轻便、密闭性好、重复利用性低等特点,因其轻便以及密闭性佳更适用于现场检测。其次从简单描述检验结果中选取易操作性、灵活性、重复利用性、便携性以及现场适用性等5种特征进行定量评价,与普通胶体金试纸检测方法的特征进行比较,讨论制定统一标尺,特征强度指标为1~9分(由弱至强),由7名评价员独立进行评定,试验结果如图3所示。评定结果与简单描述检验相符,可知,卧式阵列装置具有突出的可重复利用性能,立式阵列装置便携性强,更适用于现场检测。由于检测方法的性能以及特异性验证在实验室环境中进行,同时考虑到重复利用性能以及灵活性,故选择卧式阵列装置进行后续试验。

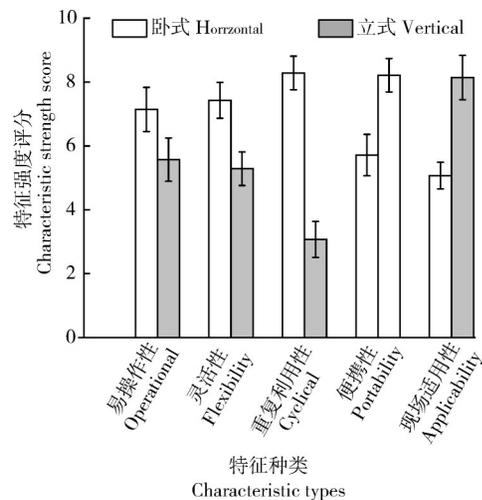


图3 试纸阵列装置描述性评定结果

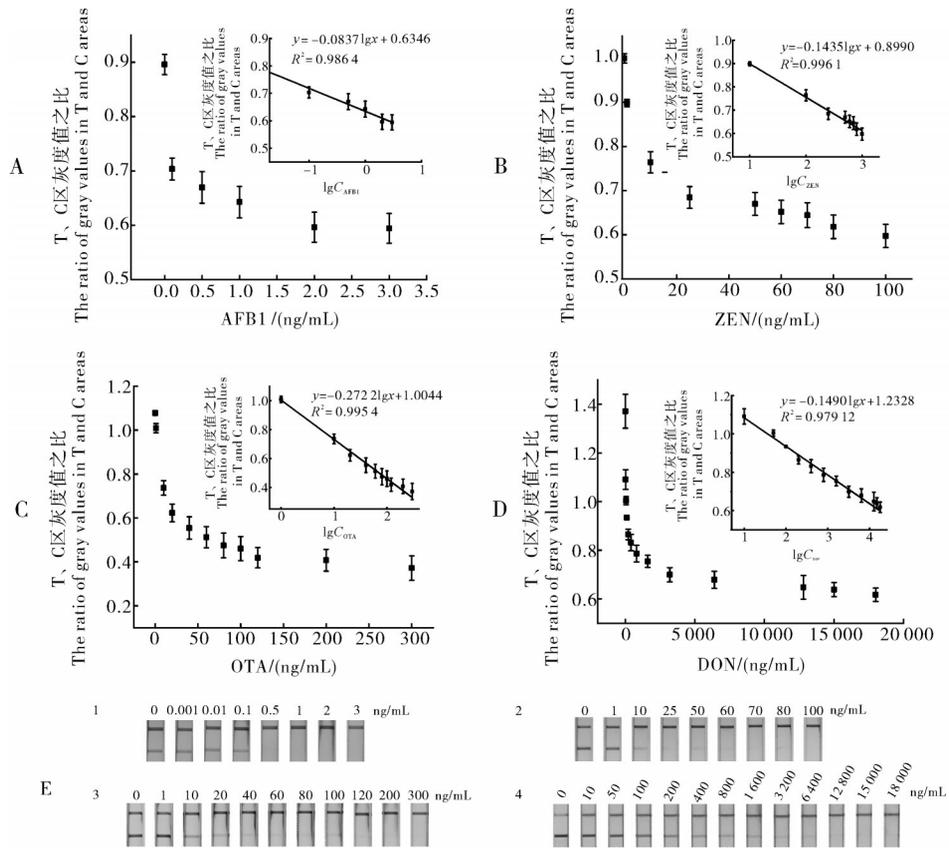
Fig.3 Descriptive evaluation results of dipstick array device

2.2 4种毒素免疫层析试纸的分析性能

为便于操作,将4种毒素试纸采用统一的测试条件,测定了一系列不同质量浓度毒素标准溶液,确定4种试纸的最高检出限值、检测限、线性范围。AFB1、ZEN、OTA、DON试纸结果如图4所示,随着毒素浓度不断增大,T区显色逐渐变浅甚至消失,当AFB1、ZEN、OTA、DON质量浓度分别高达3、100、300、18 000 ng/mL时,T区颜色消失。因此,此时质量浓度为各毒素试纸的最高检出限值。AFB1、ZEN、OTA、DON试纸的检测限分别为0.031、0.19、0.78、0.22 ng/mL,线性范围分别为0.1~3、1~100、1~300、10~18 000 ng/mL。

2.3 4种毒素免疫层析试纸特异性

分别以5、120、400、6 400 ng/mL的AFB1溶液、ZEN溶液、OTA溶液和DON溶液进行特异性试验,



图E中1,2,3,4分别对应图4的A,B,C,D。1,2,3和4在Fig.4 E correspond to A,B,C and D in Fig.4 respectively.

图4 4种试纸对AFB1(A),ZEN(B),OTA(C)和DON(D)的分析性能试验结果

Fig.4 Experimental results and images of analytical performance of AFB1 (A), ZEN (B), OTA (C) and DON (D) test strips

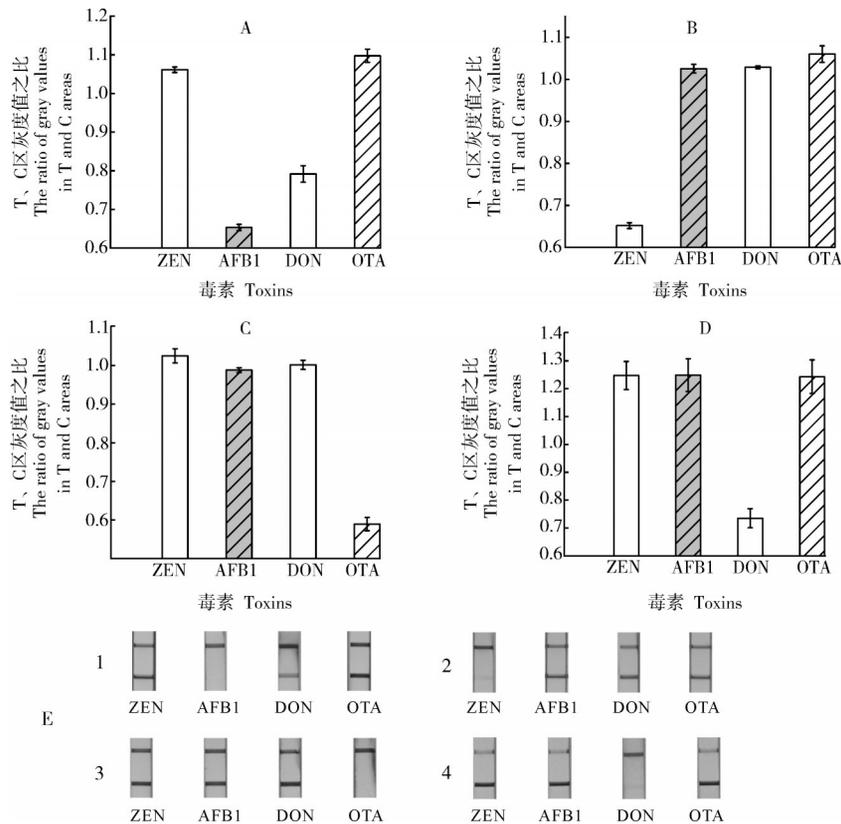
以验证本方法对毒素的选择性。非特定毒素不能被抗体特异性识别并结合,因而不能与固定在T区的毒素包被原竞争结合金纳米标记抗体,抗体被毒素包被原捕获,T区显色;反之,目标物与抗体结合的亲和力越高,结合在T区的抗体越少,显色越浅。试验结果如图5所示,非特定毒素试纸的T区均显色较深,特异性识别结果好。综上所述,4种毒素试纸具有良好的选择性,可以实现对样品中毒素的特异性准确检测。

2.4 实际样品检测

1)粮食样品检测。在当地农贸市场购买粮食样品后,在现场利用MZ-4000样本前处理一体机以及KJ-120快速检测工具箱进行样品前处理,然后采用所构建的卧式同步快检测层析试纸阵列装置以及4种毒素试纸检测了玉米、玉米面、麦仁、花生、燕麦、薏仁、小麦、大米等8类粮食样品的毒素污染情况,检测结果如表2所示。结果显示,8种粮食样品均受到了轻微的AFB1毒素污染,其中玉米面的污染量最大,为0.045 ng/mL;除去麦仁和大米,其他粮食样品

均受到了不同程度ZEN毒素的污染,玉米和小麦污染情况相对严重,但污染量级均小于国家标准;花生、燕麦、薏仁、小麦、大米受到了OTA毒素(<1 ng/mL)的污染;玉米和小米受到轻微污染外,小麦样品受到了DON毒素的严重污染,量级超过国家限量,分析原因为存储不当,在潮热的环境中敞口放置过久导致霉菌繁殖产生大量毒素。

2)加标粮食样品的检测。对最易同时受到4种毒素污染的玉米、玉米面、麦仁样品进行加标回收试验,以验证本方法的准确性和实际样品检测能力。样品中分别加入不同质量浓度(0、0.1、1 ng/mL)的AFB1、(0、1、10、100 ng/mL)的ZEN、(0、1、10、100 ng/mL)的OTA、(0、10、100、1 000 ng/mL)的DON。测定4种毒素含量,试验结果如表3所示。玉米、玉米面和麦仁样品的回收率分别为77.3%~107.3%、76.1%~112.4%和74.4%~96.3%。结果表明,阵列装置以及试纸可以应用于玉米、玉米面、麦仁样品中4种毒素的检测。



图E中1,2,3,4分别对应图5的A,B,C,D。1,2,3 and 4 in Fig.5E correspond to A,B,C and D in Fig. 5, respectively.

图5 4种试纸的特异性试验结果

Fig.5 Test results and images of AFB1(A),ZEN(B),OTA(C),DON(D) test strips

表2 谷物中4种毒素的检测结果

样品 Sample	AFB1	ZEN	OTA	DON
玉米 Corn	<LOD	35.72±0.02	ND	0.81±0.02
玉米面 Corn flour	0.05±0.01	2.53±0.01	ND	ND
麦仁 Wheat berry	<LOD	ND	ND	ND
花生 Peanut	<LOD	0.65±0.01	0.98±0.02	ND
燕麦 Oats	<LOD	2.83±0.02	0.99±0.01	ND
薏仁 Coix seed	0.02±0.00	22.47±0.03	0.84±0.01	<LOD
小麦 Wheat	<LOD	32.05±0.03	0.91±0.01	2 833.75±0.01
大米 Rice	<LOD	ND	0.92±0.01	1.36±0.03

注 Note;LOD:检测限 Limit of detection;ND:未检出 Not detected.

3 讨论

传统的真菌毒素胶体金试纸可通过肉眼观察检测区的信号对目标物进行定性分析,在定量检测方面仍待完善。为提高其检测通量,研究人员开发了具有多条检测线的快检试纸,多条通路间的干扰难以避免,时间上同步的检测效果仍未实现。利用3D

打印技术设计并构建小型阵列装置,将多条不同目标物的试纸集成于一体,对样品同时层析进行检测,可避免上述问题,达到高通量同步快速检测的目的,有助于同时监测多种真菌毒素的污染状况,保障粮食品质,提高口岸粮食筛查的效率。

本研究开发新型阵列装置用于准确、快速、现场检测粮食谷物中的AFB1、ZEN、OTA、DON,实现一步同时侧流层析检测。设计目标有以下几点:(1)设计并构建装置,达到多条侧流层析试纸同时进行层析的效果,装置便携且易于推广;(2)装置由尺寸匹配的两部分组成,两部分可以组合或连接的方式搭配进行使用;(3)装置的一部分以多条槽道及夹层的形式用于固定试纸的吸水垫端;(4)装置的第二部分用于收集并储存样液;(5)装置操作简便,可工厂化批量生产。利用装置对8类粮食样品进行定量检测与毒素污染情况分析,加标实际样品的回收率结果良好,应用场景范围覆盖常见且易受真菌毒素污染的谷物食品。真正实现了时间同步、平行又互不影响的阵列试纸,保障检测质量的同时提高了效率。研究过程中发现由于不同毒素试纸所需缓冲体系的pH值存在较大差异,目前尚未找到一种同时适合4

表3 4种毒素试纸对3种加标粮食样品的检测结果

Table 3 Results of detection for three kinds of spiked grain samples by four kinds of toxin test strip

加标质量浓度/(ng/mL) Spiked concentration	玉米 Corn		玉米面 Corn flour		麦仁 Wheat berry		
	检出质量浓度/ (ng/mL) Detection of concentration	回收率/% Recovery	检出质量浓度/ (ng/mL) Detection of concentration	回收率/% Recovery	检出质量浓度/ (ng/mL) Detection of concen- tration	回收率/% Recovery	
0	<LOD	NC	0.05±0.00	NC	<LOD	NC	
AFB1	0.1	0.08±0.03	78.4	0.16±0.05	112.4	0.08±0.04	74.4
	1	0.98±0.01	97.1	0.99±0.01	94.9	0.97±0.01	96.3
ZEN	0	35.72±0.02	NC	2.53±0.01	NC	ND	NC
	1	28.37±0.00	77.3	2.79±0.01	79.0	0.88±0.00	87.8
	10	39.81±0.01	87.1	10.72±0.01	85.6	8.82±0.01	88.2
	100	127.84±0.01	94.2	103.03±0.01	100.5	88.63±0.01	88.6
OTA	0	ND	NC	ND	NC	ND	NC
	1	0.91±0.04	91.2	0.81±0.01	81.3	0.79±0.02	79.0
	10	9.25±0.01	92.5	9.75±0.01	97.5	8.95±0.00	89.5
	100	90.56±0.03	90.6	85.13±0.02	85.1	87.53±0.02	87.5
DON	0	0.81±0.02	NC	ND	NC	ND	NC
	10	11.60±0.01	107.3	7.61±0.00	76.1	9.02±0.02	90.2
	100	87.56±0.00	86.9	78.81±0.01	78.8	93.52±0.00	93.5
	1 000	784.44±0.00	78.4	883.32±0.01	88.3	961.43±0.01	96.1

注 Note: LOD:检测限 Limit of detection; NC:未计算 Not calculated; ND:未检出 Not detected.

种毒素检测环境的缓冲体系以进一步简化操作流程,有待进一步探究。本研究中设计的阵列装置通过真空塑封,与不同试纸组合,可发展为一次性产业化商品,为广阔的市场提供方案支持。同时,此方法可拓展应用于其他种类分析物的同步快检。

参考文献

- [1] CHEN Y Q, CHEN Q, HAN M M, et al. Development and optimization of a multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous determination of three mycotoxins in corn, rice and peanut [J]. Food chemistry, 2016, 213: 478-484.
- [2] HOU S L, MA J J, CHENG Y Q, et al. One-step rapid detection of fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone in grains [J/OL]. Food control, 2020, 117: 107107 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107107>.
- [3] PEREIRA C S, CUNHA S C, FERNANDES J O. Prevalent mycotoxins in animal feed: occurrence and analytical methods [J/OL]. Toxins, 2019, 11(5): 290 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.3390/toxins11050290>.
- [4] JIN Y P, CHEN Q, LUO S L, et al. Dual near-infrared fluorescence-based lateral flow immunosensor for the detection of zearalenone and deoxynivalenol in maize [J/OL]. Food chemistry, 2021, 336: 127718 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127718>.
- [5] ZHENG S, WU T, LI J X, et al. Difunctional immunochromatographic assay based on magnetic quantum dot for ultrasensitive and simultaneous detection of multiple mycotoxins in foods [J/OL]. Sensors and actuators B: chemical, 2022, 359: 131528 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131528>.
- [6] LIU Z W, HUA Q C, WANG J, et al. A smartphone-based dual detection mode device integrated with two lateral flow immunoassays for multiplex mycotoxins in cereals [J/OL]. Biosensors and bioelectronics, 2020, 158: 112178 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112178>.
- [7] SMITH M A, FRONK G E, ZHANG H L, et al. Acute bouts of wheel running decrease cocaine self-administration: influence of exercise output [J]. Pharmacology biochemistry and behavior, 2016, 150/151: 94-99.
- [8] ZHANG Y Y, PEI F, FANG Y, et al. Comparison of concentration and health risks of 9 *Fusarium* mycotoxins in commercial whole wheat flour and refined wheat flour by multi-IAC-HPLC [J]. Food chemistry, 2019, 275: 763-769.
- [9] MARLEY E, BROWN P, LEEMAN D, et al. Analysis of citrinin in cereals, red yeast rice dietary supplement, and animal feed by immunoaffinity column cleanup and LC with fluorescence detection [J]. Journal of aoac international, 2019, 99(4): 1025-1031.
- [10] SUN S J, XIE J, PENG T, et al. Broad-spectrum immunoaffinity cleanup for the determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1, M2 in *Ophiocordyceps sinensis* and its pharmaceutical preparations by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Journal of chromatography B, 2017, 1068/1069: 112-118.
- [11] XU Y, MA B, CHEN E J, et al. Dual fluorescent immunochromatographic assay for simultaneous quantitative detection of citrinin and zearalenone in corn samples [J/OL]. Food chemistry, 2021, 336: 127713 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127713>.
- [12] SHIMUYE K Y, LING S M, YANG Y L, et al. The preparation

- and identification of a monoclonal antibody against citrinin and the development of detection via indirect competitive ELISA [J/OL]. *Toxins*, 2017, 9 (3) : 110 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.3390/toxins9030110>.
- [13] BIENENMANN-PLOUM M E, VINCENT U, CAMPBELL K, et al. Single-laboratory validation of a multiplex flow cytometric immunoassay for the simultaneous detection of coccidiostats in eggs and feed [J]. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2013, 405(29) : 9571-9577.
- [14] ZHANG X, WANG Z H, FANG Y, et al. Antibody microarray immunoassay for simultaneous quantification of multiple mycotoxins in corn samples [J/OL]. *Toxins*, 2018, 10(10) : 415 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.3390/toxins/10100415>.
- [15] YAHAYA M L, ZAKARIA N D, NOORDIN R, et al. Development of rapid gold nanoparticles based lateral flow assays for simultaneous detection of *Shigella* and *Salmonella genera* [J]. *Biotechnology and applied biochemistry*, 2021, 68(5) : 1095-1106.
- [16] YANG X D, WANG Y B, YANG J F, et al. An immunochromatographic lateral flow strip test for the rapid detection of danofloxacin in milk [J]. *Food analytical methods*, 2019, 12(11) : 2430-2437.
- [17] DI NARDO F, ALLADIO E, BAGGIANI C, et al. Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single test line [J]. *Talanta*, 2019, 192 : 288-294.
- [18] CHARLERMROJ R, PHUENGWAS S, MAKORNWATTANA M, et al. Development of a microarray lateral flow strip test using a luminescent organic compound for multiplex detection of five mycotoxins [J/OL]. *Talanta*, 2021, 233 : 122540 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122540>.
- [19] ZHANG W J, TANG S S, JIN Y P, et al. Multiplex SERS-based lateral flow immunosensor for the detection of major mycotoxins in maize utilizing dual Raman labels and triple test lines [J/OL]. *Journal of hazardous materials*, 2020, 393 : 122348 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122348>.
- [20] LU C X, GAO X X, CHEN Y, et al. Aptamer-based lateral flow test strip for the simultaneous detection of *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* [J]. *Analytical letters*, 2020, 53(4) : 646-659.
- [21] RONG Z, WANG Q, SUN N X, et al. Smartphone-based fluorescent lateral flow immunoassay platform for highly sensitive point-of-care detection of Zika virus nonstructural protein 1 [J]. *Analytica chimica acta*, 2019, 1055 : 140-147.
- [22] JUNG Y, HEO Y, LEE J J, et al. Smartphone-based lateral flow imaging system for detection of food-borne bacteria *E. coli* O157:H7 [J/OL]. *Journal of microbiological methods*, 2020, 168 : 105800 [2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105800>.

Development and application of synchronous and rapid test strip array device for detecting multiple mycotoxins

XU Zhenghua¹, YANG Hanjie², WU Sichao¹, ZHANG Yi²

1. *Huangpu Customs Technology Center of the People's Republic of China, Guangzhou 510770, China;*
 2. *State Key Laboratory of Food Science and Technology/
 College of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China*

Abstract An array device for synchronously and rapidly detecting multiple mycotoxins was developed to further reduce the time of detection and achieve rapid customs clearance of import and export food. Due to the interaction between probe and analyte, it is difficult to quantify the existing scheme of fixing multiple detection lines on a single test paper, and single quality control line cannot guarantee the effectiveness of multiple channels, and the real “synchronous” detection is not achieved. In this article, two kinds of horizontal and vertical arrays adapted to colloidal gold lateral flow immunoassay (LFIA) strips were designed and constructed by 3D printing technology, with four channels synchronous detection capability. The LFIA strip of aflatoxin B1 (AFB1), zearalenone (ZEN), ochratoxin A (OTA) and deoxynienol (DON) was integrated into the array and used to detect corn, corn meal and wheat kernel. Results showed that the detection limit (LOD) of the four toxins was 0.031 ng/mL, 0.19 ng/mL, 0.78 ng/mL, 0.22 ng/mL, respectively, with recoveries ranging from 74.42% to 112.40%. There was no cross-reaction. The synchronous detection of the four indicators of a single sample, including the pretreatment time, was completed within 40 minutes. The array device constructed will provide a potential equipment support for synchronous and rapid detection of multiple mycotoxins.

Keywords mycotoxin; lateral flow immunoassay (LFIA); 3D printing; rapid detection device; food security

(责任编辑:陆文昌)