

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250109002

引用格式: 薛耀辉, 李锦花, 马明, 等. 动物源性食品中类固醇激素的快速检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(9): 159-171.

XUE YH, LI JH, MA M, *et al.* Research progress on rapid detection methods for steroid hormones in animal derived foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(9): 159-171. (in Chinese with English abstract).

动物源性食品中类固醇激素的快速检测方法 研究进展

薛耀辉^{1,2,3#}, 李锦花^{2#}, 马明², 钱四化³, 韩超^{1*}, 王宇辉^{3*}

(1. 华北理工大学化学工程学院, 唐山 063210; 2. 宁波海关技术中心, 宁波 315048;
3. 中国科学院宁波材料技术与工程研究所, 宁波 315201)

摘要: 动物源性食品是人类重要的营养来源之一。在养殖过程中, 类固醇激素的合理使用可达到促生长、增重、消炎等目的, 但过度滥用会严重威胁食品安全和消费者身体健康。目前, 类固醇激素的检测方法主要为液相色谱法、气相色谱法及其与质谱的联用技术, 这严重依赖大型精密仪器、预处理复杂, 并且需要专业实验室和技术人员。近些年来, 随着分析科学技术与仪器的飞速发展, 各种类固醇激素残留的快速检测技术已不断涌现, 为食品安全提供了坚实的技术保障。本文对目前类固醇激素的快速检测方法, 包括电化学法、比色法、荧光/磷光法、拉曼光谱法和侧流免疫层析法进行了详细综述, 分析了这些方法的优点及不足, 探讨了其面临的挑战及未来的发展方向。该综述将为食品中类固醇激素残留的快速检测方法的设计提供参考借鉴, 并对相关研究者提供思路启发。

关键词: 类固醇激素; 快速检测; 电化学法; 比色法; 免疫层析法; 表面增强拉曼光谱法; 荧光检测法

Research progress on rapid detection methods for steroid hormones in animal derived foods

XUE Yao-Hui^{1,2,3#}, LI Jin-Hua^{2#}, MA Ming², QIAN Si-Hua³, HAN Chao^{1*}, WANG Yu-Hui^{3*}

(1. School of Chemical Engineering, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China;
2. Ningbo Customs Technology Center, Ningbo 315048, China; 3. Ningbo Institute of Materials Technology & Engineering, Chinese Academy of Sciences, Ningbo 315201, China)

ABSTRACT: Animal derived foods are one of the important sources of nutrients for humans. During the breeding process, the rational use of steroid hormones can achieve the goals of promoting growth, weight gain and anti-inflammatory effects, but excessive abuse can lead to serious threats to food safety and consumer health. At

收稿日期: 2025-01-09

基金项目: 宁波市公益性研究计划重点项目(2023S006); 宁波市自然科学基金重点项目(2022J293)

#薛耀辉和李锦花为共同第一作者

第一作者: 薛耀辉(1999—), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: xueyaohui@nimte.ac.cn

李锦花(1982—), 女, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为食品分析。E-mail: 82944338@qq.com

*通信作者: 韩超(1984—), 男, 副教授, 主要研究方向为有机探针与分析。E-mail: hanchao@ncst.edu.cn

王宇辉(1985—), 男, 副研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: wangyuhui@nimte.ac.cn

present, the detection methods for steroid hormones mainly rely on liquid chromatography, gas chromatography and their combined techniques with mass spectrometry. They also heavily rely on large precision instruments and complex preprocessing, requiring professional laboratories and technical personnel. In recent years, with the rapid development of analytical science and technology, rapid detection technologies for various steroid hormone residues have emerged, providing solid technical support for food safety. This paper presented a comprehensive review of current rapid detection methods for steroid hormones, including electrochemistry, colorimetric methods, fluorescence/phosphorescence methods, Raman spectroscopy and lateral flow immunoassay. It analyzed the advantages and disadvantages of these methods, discussed the challenges they face, and explored their future development directions. This review served as a reference for the design of rapid detection methods for steroid hormone residues in food and provided insights and inspiration for relevant researchers.

KEY WORDS: steroid hormones; rapid detection; electrochemistry; colorimetric assay; immunochromatography; surface enhanced Raman spectroscopy; fluorescence assay

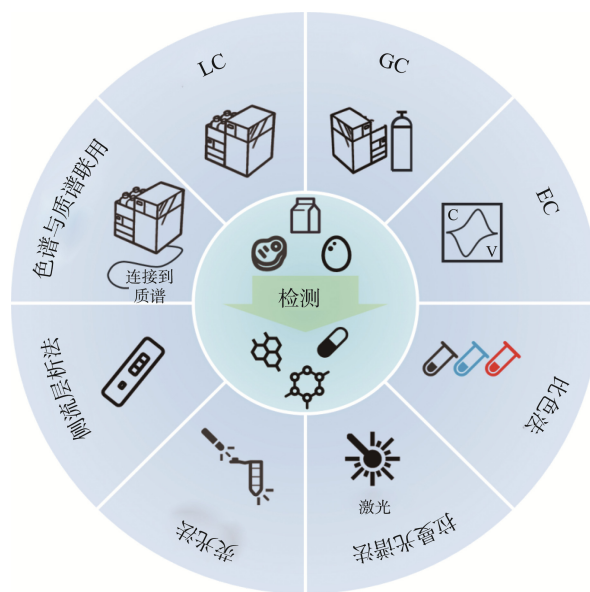
0 引言

在食用动物的养殖中,类固醇激素主要用于人工繁殖、性别转化及抗炎抗病害^[1-3]。在养殖过程中使用的兽药(如激素、抗生素等)被归类为内分泌干扰化学物质(endocrine-disrupting chemicals, EDCs)^[4-6]。20世纪70—80年代以来,与食品中残留的合成类固醇相关的内分泌失调报道大量出现。研究表明,即使残留量极低,这些残留的激素仍将造成长期危害^[7-11],传统的废水处理系统无法将它们从水体中清除,它们留存在环境中,造成长期环境影响^[12-13]。类固醇激素常在动物的可食用部分(如肌肉、内脏)和奶中检出,由于类固醇激素残留的危害,我国自2002年起先后禁止了多种性激素在养殖中用于任何用途,在所有动物的可食用部分不得检出;并且对地塞米松等糖皮质激素在动物源性食品中的残留量做出了限制。

科研人员在过去几十年间开发了多种方法来检测不同基质中残留的类固醇激素,包括气相色谱法(gas chromatography, GC)、液相色谱法(liquid chromatography, LC)、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)、液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)等^[14](图1)。目前应用最广泛的检测技术是高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)技术,它具有很高的灵敏度^[15]。然而,由于类固醇类物质的极性和低挥发性,对类固醇等小分子化合物的分析通常需要柱前衍生^[16-17],这些预处理过程大多复杂费时,且处理过程中需要使用大量有机溶剂。如果衍生处理不彻底,还将导致回收率低和结果不准确等问题^[18-19],这要求分析操作人员拥有较高的专业素质。

类固醇激素按照其功能可分为性激素和皮质激素,它们具有共同的甾体母核结构。目前,对类固醇残留检测的国家标准主要是 GB 31660—2019《食品安全国家标准

水产品中辛基酚、壬基酚、双酚 A、己烯雌酚、雌酮、17 α -乙炔雌二醇、17 β -雌二醇、雌三醇残留量的测定 气相色谱-质谱法》,其中规定了对水产品中雌二醇(estradiol, E2)、雌三醇、醋酸甲地孕酮等性激素的 GC-MS 检测方法;以及对动物性食品中醋酸甲地孕酮和醋酸甲羟孕酮的 LC-MS 检测方法。这些方法虽然检测灵敏度高,但是柱前衍生等前处理烦琐耗时,仪器体积大,对工作环境的要求较高,无法实现现场快速检测。



注: 电化学法(electrochemical, EC)。

图1 食品中类固醇激素的常见检测技术与方法

Fig.1 Common detection techniques and methods for steroid hormones in foods

近年来,随着食品工业的多样化发展,食品检测朝着快速、灵敏、便携、简便且低成本高通量的方向发展。大量快速检测技术被开发出来用于检测类固醇,主要包括 EC^[20]、比色法^[21-22]、荧光/磷光法^[23]、拉曼光谱法^[24-25]和侧流免疫层析法^[26-28]等,相较于传统 LC-MS、GC-MS 方

法, 它们所需的样品预处理程序较少或无需预处理, 仅需小型便携式仪器或无需仪器^[29], 提高了检测效率, 并且大幅降低了仪器和人力成本。本文综述了近些年类固醇激素快速检测方法的发展及应用, 介绍了它们各自的优势和局限性, 以期检测食品安全中的类固醇激素的快速检测研究提供借鉴, 促进未来新型检测方法的开发应用。

1 类固醇激素的快速检测技术

1.1 电化学法

EC 检测类固醇类激素具有成本低、灵敏度高、响应速度快、操作简便且可实时监测等优点^[30]。在各种电化学检测技术中, 最常用的电化学检测方法是伏安法, 在测量过程中, 可快速测量氧化还原电位^[31-32], 是一种准确、快速且高灵敏度的方法。在伏安法中, 用于定性和定量检测的技术包括循环伏安法(cyclic voltammetry, CV)、方波伏安法(square wave voltammetry, SWV)、线性扫描伏安法(linear sweep voltammetry, LSV)和差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)。这些方法均是对工作电极施加特定电压, 并检测施加电压范围内的电流变化为基础^[33-34]。

直接电化学检测法早在 2009 年就被应用于检测类固醇^[35]。然而, 由于类固醇的氧化产物在电极表面结垢等原因, 导致传统电极的性能降低, 使用裸电极难以检测到痕量水平的类固醇激素。为了提高灵敏度, 研究者对工作电极进行了各种修饰以提高其性能^[36-37]。由于良好的导电性、高比表面积和高化学稳定性, 铜、银、钯和金等贵金属纳米粒子被广泛作为电极修饰材料使用^[38]。石墨烯、碳纳米管等作为电化学传感器的修饰材料也受到广泛关注^[39-40]。BACCHU 等^[31]开发了基于氮化石墨碳(g-C₃N₄)和导电聚合物 3-氨基丙基三乙氧基硅烷[(3-aminopropyl)triethoxysilane, APTES]修饰的电化学传感器(图 2a)。g-C₃N₄ 比表面积大、电催化性能高, 能够提高电极的表面电导率和生物传感器的识别能力; APTES 可提高电化学传感器稳定性和灵敏度, 可优化生物传感器的催化性能。应用于检测牛奶、家禽肉类和环境水样中的 E2, 检出限低至 9.9×10^{-19} mol/L。此外, 金属有机框架(metal-organic frameworks, MOFs)材料也在电化学分析领域展现出应用潜力。MOFs 材料是一种由金属节点与有机配体配位而成的新型结晶纳米多孔材料, 它具有可调节的孔结构和较大的比表面积。为了进一步提升 MOFs 的电化学传感性能, 将金属纳米颗粒(metal nanoparticles, MNPs)与 MOFs 偶联已成为有效策略之一。基于此, CHAI 等^[41]通过离子交换在 Zn-MOF 宿主表面覆盖配位金, 随后通过化学还原法转化为尺寸小于 5 nm、分散性好的超小型金纳米粒子(gold nanoparticles, AuNPs)。由于将 AuNPs 的尺寸减小到了 5 nm 以下, 金氧化物暴露的活性位点密度大幅增加。集成的 MNPs 可显著提高 MOFs 的电子传递能力, 还可赋予其更多的活性催化位点。MOFs

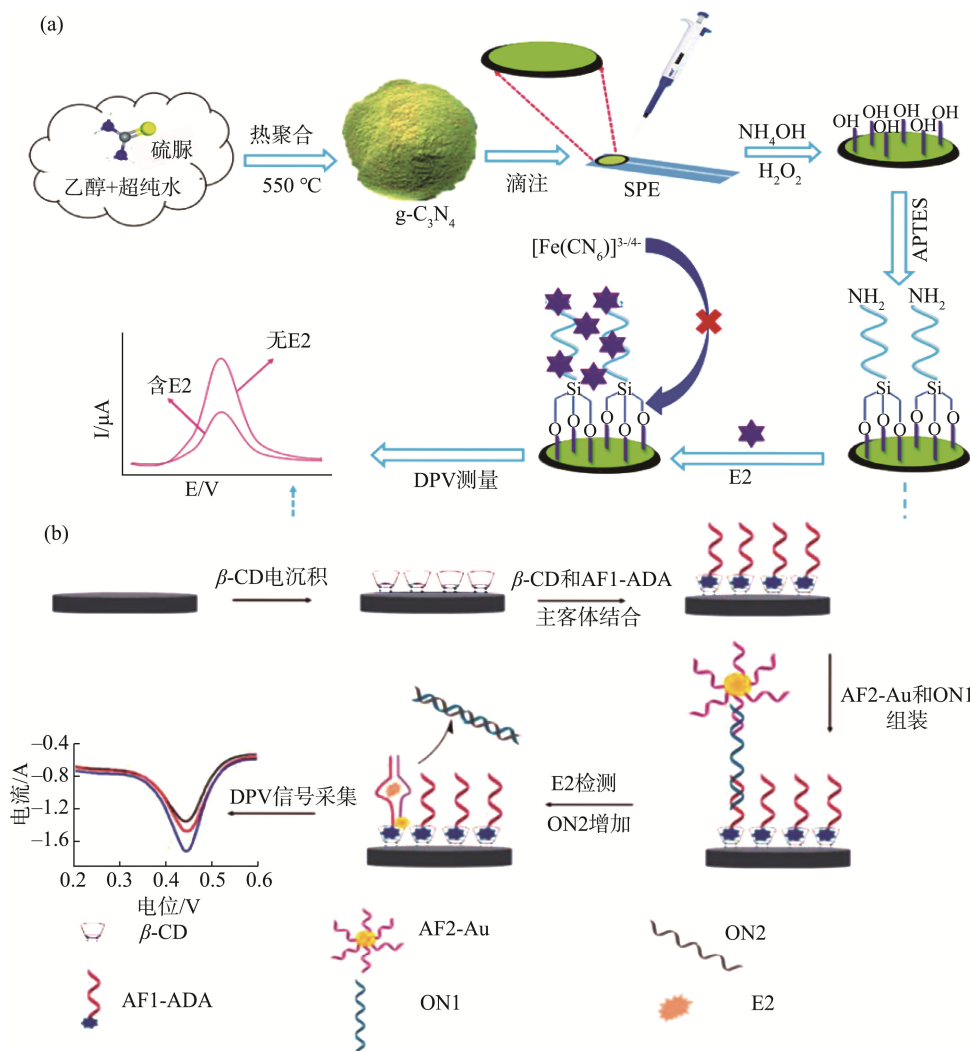
能防止 MNPs 因支撑效应或封闭效应而发生聚集, 因此混合体具有更高的电化学传感性能。传感器对激素的检出限低至 12.3 nmol/L, 在湖水实际样品中的加标回收率在 93.0%~103.5%之间, 表现出优异的分析性能。

将电化学传感器与免疫测定结合构建电化学免疫传感器的方法也备受关注^[42]。作为典型的特异性识别元件分子, 核酸适配体近年来在分析和诊断应用中备受关注。核酸适配体是一种合成的单链核酸序列, 通过折叠成二级结构, 具有与目标分子的高亲和力和高选择性。与传统抗体相比, 核酸适配体具有成本低、化学性质稳定、修饰简单、热稳定性好和易于体外合成等独特优势, 可以更灵活地设计各种类型的传感器。CHANG 等^[32]利用拆分为两个片段并分别标记的适配体开发了一种电化学传感器。第一个适配体片段上修饰的金刚烷与 β -环糊精(β -cyclodextrin, β -CD)结合而被固定激光刻划石墨烯(laser-scribed graphene, LSG)电极表面; 第二个适配体片段被修饰在 AuNPs 上作为电化学指示剂使用。当 E2 存在时, 两个适配体片段在与 E2 结合的过程中重组, 使 AuNPs 更接近电极表面, 从而导致电化学信号的变化(图 2b), 该方法将检出限进一步降低至 0.7 fmol/L。

分子印迹电化学传感器(molecularly imprinted electrochemical sensors, MIECS)近年来也被应用于检测类固醇。分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIP)由聚合物单体和模板分子聚合而成, 洗脱模板分子后, 聚合物表面留有大量可与靶标分子高度特异性结合的空穴^[43]。MIECS 可识别 MIP 与靶标分子结合过程中的电化学信号变化, 具有低成本、高灵敏度和选择性、检测时间短、环境稳定性好及可重复利用等特点, 广泛应用于生物分析等领域^[44]。MANICKAM 等^[45]首次开发了使用 MIP 的用于检测类固醇的电化学传感器。此后, 人们又提出了几种方法用于降低检出限并缩短检测时间。提高电极的有效面积、电导率和电化学稳定性是获得具有良好稳定性和优异传感性能的 MIP 生物传感器的有效手段, 通过对电极进行纳米材料修饰, 使电极表面具有更好的电子流和能量流, 都有助于提高传感器的检测性能。LIU 等^[46]将 Ti₃C₂T_x型二维碳化钛基材料(Ti₃C₂T_x-transition metal carbide/nitride/carbonitride, Ti₃C₂T_x-MXene)和 Gr 组成的具有三维多孔结构的 MXene/石墨烯复合材料(MXene/graphene composite, MXG)复合材料修饰在玻璃碳电极上, 开发了 MIP 生物传感器, 首次应用于皮质醇的电化学传感并将其应用于检测人唾液中的皮质醇。MXG 复合材料具有高导电性能和较大的电活性表面积, 可提高生物传感器的电导率。在此传感器中, MXG 多孔复合材料被用于修饰电极, 使电极的电流响应提高了 15 倍以上, 具有低至 0.4 fmol/L 的检出限和 1 fmol/L~10 μ mol/L 较宽的线性范围。

1.2 比色法

在比色检测中, 溶液中物质的微观化学变化可以通过可视的颜色变化得以反映, 故而可以通过测量吸光度的



注: 固体聚合物电解质(solid polymer electrolyte, SPE); 核酸适配体片段 1/2 (aptamer fragment 1/2, AF1/2); 羧酸官能化金刚烷(carboxylic acid functionalised adamantane, ADA); 寡核苷酸序列(oligonucleotide sequence 1/2, ON1/2)。

图 2 $g-C_3N_4$ 的制备及其作为电极涂层用于 E2 的电化学检测示意图(a)和基于核酸适配体识别的 E2 电化学传感器示意图(b)

Fig.2 Schematic of the preparation of $g-C_3N_4$ and its use as an electrode coating for the electrochemical detection of E2 (a), and schematic of an electrochemical sensor for E2 based on the recognition of nucleic acid aptamers (b)

变化而对分析物进行定量检测^[47]。比色法凭借其操作简单、灵敏度高、准确性高和成本低等优势,近年来在分析化学领域得到了快速发展。肉眼观察到的颜色变化为高通量筛选提供了便利。

各种比色法中,基于 AuNPs 的比色传感器尤其令人关注。AuNPs 具有极高的消光系数和等离子激元吸收光学特性,常被用作灵敏的比色指示剂,它们呈现出清晰且明显的颜色,很容易被肉眼观察^[48-50]。PULE 等^[51]基于融入了电纺聚苯乙烯纳米纤维的 AuNPs 开发了一种可应用于现场检测的比色探针,使用电纺丝技术制造苯乙烯-金聚合物,合成过程简单稳定。随着 E2 浓度的增加,表面等离子共振吸收峰向长波段移动,可视颜色由粉红色逐渐变为蓝色。用于检测乳制品中的 E2 时,目视检出限为 100 ng/mL。LIU 等^[52]基于非靶向生物识别物“雌激素受体 α ” (estrogen

receptor α , ER α)和 AuNPs 的比色传感器,应用于自来水和牛奶样品中的多种非特定的雌激素进行检测。ER α 可在无 EDCs 存在时防止 AuNPs 聚集,并可识别多种非特定的雌激素,可应用于现场高通量筛选,为初步同时筛选多种 EDCs 提供了一种可行思路。该传感器的检出限为 0.01 nmol/L,但并非特异性识别单一物质,仅适用于大批量筛选,存在较大的局限性。

许多研究将核酸适配体与 AuNPs 结合开发比色传感器。目前已开发出多种适用于不同目标分子的核酸适配体,但大多数长序列核酸适配体的灵敏度不佳,这可能是由于二级结构的形成影响了适配体的灵敏度^[22]。为了提高灵敏度,科研人员做了大量工作,包括截短或删除适配体的一部分序列、控制适配体的修饰量^[22,53-55]等。LIU 等^[22]首次将 E2 76 mer 的核酸适配体拆分为两个短的 DNA 序列以提高

灵敏度。ALSAGER 等^[53]通过删除适配体序列中多余的侧边核苷酸获得了 35 mer 和 22 mer 的适配体片段并用于测试。他们的工作使灵敏度分别提高了 10 倍和 25 倍, 结果均表明, 截短的适配体应用于检测可提高传感器的灵敏度。基于他们的研究, 全长适配体对目标结合信号存在抑制作用的可能原因是: 在与目标分子结合后, 结合区域以外的过剩碱基仍吸附在 AuNPs 上阻止其聚集(图 3a^[53])。经过对使用不同长度的适配体体系的对比, 得出了“保留少量的过剩碱基是最佳选择”的结论。SOH 等^[54]利用适配体-靶标识别介导适配体功能化的 AuNPs 的生长开发了一种比色传感器, 根据目标物浓度和 AuNPs 表面修饰的适配体量的不同, AuNPs 将生长为形态各异的结构, 从而产生不同颜色的溶液(图 3b^[54]), 即使吸附的适配体数量仅存在细微差别, 金氧化物的生长也将出现明显的形态变化, 从而产生可见的颜色变化, 该传感器对 E2 的检出限低至 0.2 nmol/L, 为提高传感器的灵敏度提供了另外一种思路。

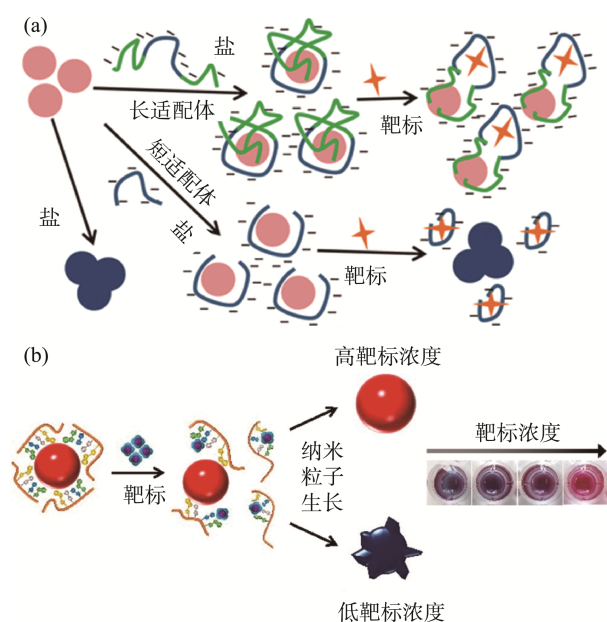


图 3 长链适配体对目标分子结合信号的抑制作用示意图(a)和基于目标分子介导的核酸适配体功能化 AuNPs 对类固醇激素的比色检测(b)

Fig.3 Suppression of target binding signals with the long aptamer (a), and colorimetric detection of steroid hormones based on target molecule-mediated functionalization of nucleic acid aptamers with AuNPs (b)

此外, 还有基于过氧化物纳米酶和其他一些纳米材料的比色传感器。例如, Fe_3O_4 自 2007 年被发现具有过氧化物酶的特性, 有大量工作对利用 Fe_3O_4 代替过氧化物酶进行了研究。相对于辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP), Fe_3O_4 具有在高 pH 条件下稳定性高、易制备和储存以及可回收等特点。WEI 等^[56]制备了具有磁性及过氧化

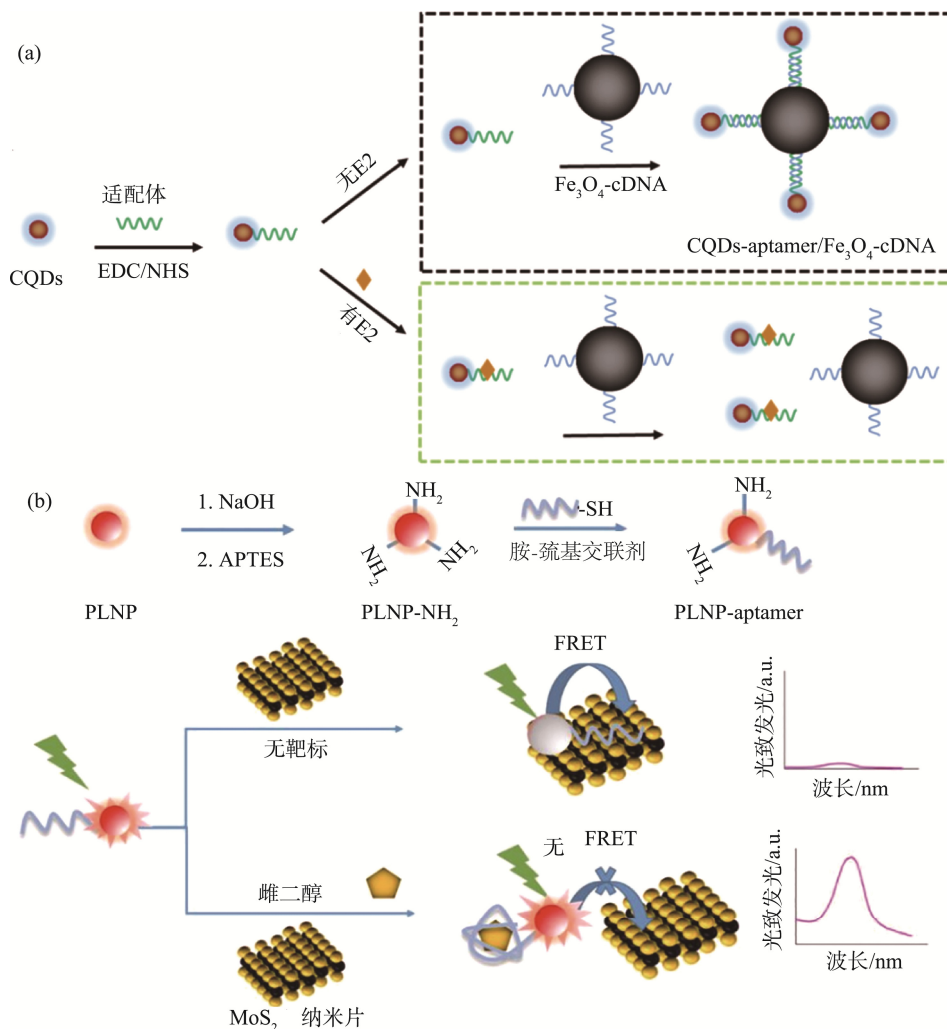
物酶样活性的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{mSiO}_2$ 磁性介孔纳米粒子, 并用作比色传感器检测 E2, 检出限为 0.2 mmol/L。GUO 等^[57]利用硫磺素 T 与 E2 适配体结合后产生强烈荧光信号的特点, 基于硫磺素 T 与 E2 竞争适配体结合位点的特性开发了荧光和比色双模式传感器并应用于肉类食品, 检出限分别为 0.15 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.3 荧光/磷光法

荧光光谱法具有高灵敏、高通量、样品用量少等优势, 是各种光谱法中常用的类固醇检测技术。荧光团的光学性能在荧光检测中至关重要, 直接决定靶标的检测灵敏度。目前, 常见的荧光探针包括有机染料、量子点(quantum dots, QDs)、碳点(carbon dots, CDs)、长余辉纳米材料(persistent luminescence nanoparticles, PLNPs)等, 它们主要是基于荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)原理检测类固醇激素^[58-60]。VARRIALE 等^[61]基于荧光探针 Biotium CF647 和多克隆单特异性抗 E2 抗体合成了 E2-半琥珀酸-谷氨酰胺结合蛋白偶联物, 通过竞争性免疫测定的方法对未经处理的牛奶样品中 E2 进行测定。该方法无需预处理步骤, 检出限低至 10 pmol/L。

近年来, QDs 被广泛研究, 并在生物传感器的设计中得到了广泛应用。QDs 具有独特的光学特性, 其激发光谱窄而对称, 并具有可调的发射光谱。与传统的有机荧光染料相比, 具有高荧光量子产率、优异的光稳定性和良好的水溶性等优势^[62]。WANG 等^[63]开发了基于 FRET 的探针, 首次报道了水溶性低毒 β -CD 功能化 ZnS QDs 的合成。环糊精由于特殊的分子结构, 可作为分子宿主与各种客体分子形成聚合物, 中性红分子能以中性形式进入锚定在硫化锌 QDs 表面的水溶性 β -CD 空腔, 结合 QDs 独特的光学特性, 形成 FRET 探针。用于测定河水中醋酸甲孕酮的浓度, 检出限为 0.0083 nmol/L。WEI 等^[64]将碳点与磁性 Fe_3O_4 结合, 开发了一种新型荧光传感器(图 4a), 在竞争法的基础上做了部分改变: 在富含羧基的 CDs 上标记 E2 适配体, 用同样的方法将互补 DNA 序列修饰在 Fe_3O_4 上, E2 将阻止适配体与其互补 DNA 杂交。当使用磁铁分离时, 若无 E2 存在, 上清液的荧光强度很低, 当 E2 存在时, E2 阻止了复合物的形成, 上清液的荧光强度升高。根据荧光强度的增加程度即可定量 E2 的浓度。该传感器的检出限低至 3.48 pmol/L, 并成功应用于检测牛奶与水样中的 E2。

通过金属增强荧光的传感器以达到时间分辨目的的荧光传感器近年来也被开发。采用时间分辨策略, 可有效避免背景荧光的干扰。SAFARIAN 等^[65]开发了一种基于游离皮质醇对固定在金表面上的免疫复合物中荧光标记的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)-可的松偶联物的位移对可的松检测。BSA-可的松偶联物被固定在 AuNPs 上, 与样品中游离的皮质醇发生竞争性交换反应,



注: 1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳酰二亚胺[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide, EDC]; N-羟基丁二酰亚胺

(N-hydroxysuccinimide, NHS); 互补 DNA (complementary DNA, cDNA); 碳量子点(carbon quantum dots, CQDs); 适配体(aptamer)。

图 4 基于 CDs-磁颗粒的 FRET 适配体传感器检测 E2 的机制图(a)和基于 PLNP 与 MoS_2 纳米片的 FRET 适配体检测 E2 的机制图(b)
Fig.4 Mechanism diagram of E2 detection by FRET aptamer sensor based on CDS-magnetic particles (a) and mechanism diagram of FRET aptamer sensor based on PLNP and MoS_2 nanosheets for E2 detection (b)

一旦荧光标记的 BSA-可的松偶联物被游离的可的松取代, 荧光增强将会消失。通过检测加入样品后的荧光强度可对目标分子进行时间分辨检测, 检出限为 20 ng/mL。此外, 还有其他基于 FRET 原理但使用其他荧光团的荧光传感器: 如有机染料^[66-68]、环糊精^[69-70]和上转换纳米粒子^[71-72]等。这些荧光材料都为开发灵敏的荧光传感器提供了多种可能。

由于存在激发光源的影响, 荧光检测会存在背景荧光和散射光的干扰^[73]。长寿命发光或余辉延迟检测技术可以完全避免上述光学干扰, 显著提高检测信噪比或灵敏度, 近年来获得了更多的关注^[74-76]。PLNPs 可储存激发能量并在数分钟到数小时内缓慢发射光子, 其作为一种新兴的光学探针, 在高灵敏生化传感分析和生物成像中极具竞争力。基于此, ZHANG 等^[67]将核酸适体修饰至 PLNPs 表面,

以 MoS_2 纳米片为淬灭剂, 开发了长余辉 FRET 传感器(图 4b), 成功应用于牛奶复杂样品中 E2 的检测, 在关闭激发光后检测磷光信号, 以避免基质的自发荧光, 检出限低至 0.29 ng/mL, 为快速、高特异性且能避免自发荧光的检测提供了可行的检测方法。

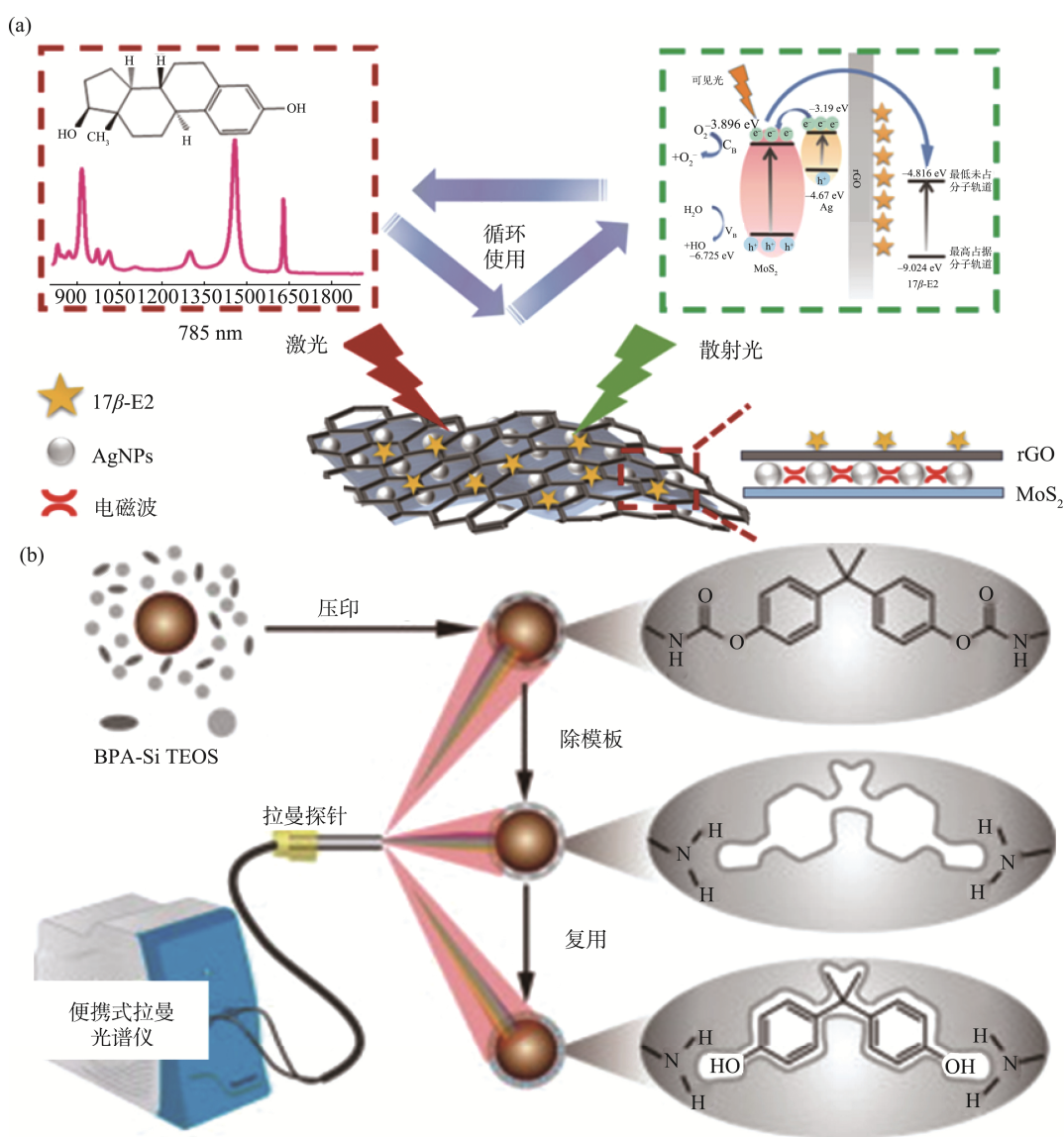
1.4 表面增强拉曼光谱检测技术

拉曼光谱技术是鉴定和表征分子化学结构的重要分析工具, 与红外光谱相似, 都属于分子振动光谱。拉曼光谱具有快速、简单、可应用于现场检测等优势^[24,77], 通过检测散射光并进行分析, 可获得样品分子的振动状态信息。由于类固醇的 C_{18} 骨架结构中 O-H 的伸缩振动、C-H 和 O-H 的弯曲振动及环变形, 类固醇激素在拉曼光谱中将存在特征峰, 可在光谱中识别。然而, 拉曼散射效应的强

度很弱, 且实际样品中的类固醇含量相对较低, 这限制了它在检测中的应用^[78-79]。为了获得较强的拉曼散射信号, 提高信噪比, 研究者开发了表面增强拉曼光谱 (surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)检测技术, 以对目标分子实现高灵敏度检测。

SERS 基底在 SERS 检测中至关重要, 可分为胶体基底和固体基底。最常用的胶体基底是金、银和金银核壳纳米粒子胶体^[80-82], 但胶体悬浮液可能不稳定并会发生团聚。固体基底可克服这种缺陷, 但制造较为困难。拉曼信号的放大通常认为是电磁增强和化学增强的协同效应, 在激光的激发下, 金、银等贵金属纳米粒子的过渡频率高、

介电常数大, 它们之间会产生局部表面等离子共振, 从而实现电磁增强^[83]。在各种贵金属纳米粒子中, 银纳米粒子 (silver nanoparticles, AgNPs) 的 SERS 活性最好, 价格较 AuNPs 低, 是优秀的 SERS 基底之一^[84]。LIU 等^[83]使用 AgNPs 为 SERS 源, 利用 MoS₂ 的光催化特性实现基底的自清洁, 并在 AgNPs 外包裹还原氧化石墨烯(reduced graphene oxide, rGO)起到保护作用并吸附目标物(图 5a), 缩短目标分子与 AgNPs 间的距离, 从而增强 SERS 信号。MoS₂ 具有很大的比表面积, 可为 AgNPs 提供规则排列的平台, 同时可为 AgNPs 提供更高的灵敏度。使用此基底的传感器检出限低至 5 pmol/L, 并可应用于养殖废水样本中 E2 的检测。



注: 四乙氧基硅烷(tetraethoxysilane, TEOS)。

图 5 MoS₂/Ag@rGO 对 17β-E2 的 SERS 检测和光催化降解(a)和 MIP-ir-AuNPs 便携式拉曼特异性检测 BPA 原理示意图(b)
Fig.5 MoS₂/Ag@rGO-based SERS detection and photocatalytic degradation of 17β-E2 (a) and schematic diagram of the principle of MIP-ir-AuNPs portable Raman specific detection of BPA (b)

利用分子印迹聚合物、核酸适配体的优异分子识别特性,可以开发高特异、高灵敏的 SERS 传感器,获得了研究者的广泛关注^[85-87]。XUE 等^[78]较早利用表面印迹核壳 AuNPs 对双酚 A (bisphenol A, BPA) 进行检测(图 5b), 检出限为 0.12 mg/mL。LIU 等^[88]利用金硅核壳纳米颗粒(Au@Ag core-shell nanoparticles, Au@Ag CS NPs)基底结合核酸适配体, 开发了一种新型的 SERS 系统, 利用 4-巯基苯甲酸(4-mercaptobenzoic acid, 4-MBA)作为拉曼报告分子, 用于检测复杂水样中的 E2。由于系统中的适配体与 Au@Ag CS NPs 之间的静电作用, Au@Ag CS NPs 与 4-MBA 被分离, 拉曼强度较弱。当 E2 被添加到系统中时, 它更倾向于与适配体结合并形成复合物, 从而导致纳米颗粒与适配体分离, 报告分子的拉曼散射强度随之恢复, 通过监测添加 E2 前后的拉曼散射强度变化即可对 E2 进行定量。该传感器的灵敏度足够高, 可检测到 HPLC 无法检测到的水样中的痕量 E2, 检出限低至 0.05 pmol/L, 线性范围为 0.1 pmol/L~10 nmol/L, 对 E2 具有良好的选择性。ZHANG 等^[89]将核壳结构的多巴胺分子印迹 AuNPs 嵌入铁 MOFs 材料中, 形成了六边形微纺锤结构。通过有机配体与聚多巴胺(polydopamine, PDA) 芳香基团间的疏水作用、邻苯二酚基团的螯合作用及醋酸的引入, AuNP@MIP-PDA 被封装在 MIL-101 晶体中。结合 AuNPs 的 SERS 活性、MIPs 的特异性识别位点以及 MIL-101 的吸附和富集能力, 纳米杂化具有高选择性。该传感器可直接应用于牛奶中 E2 的检测而无需预处理, 检出限为 0.195 fmol/L。

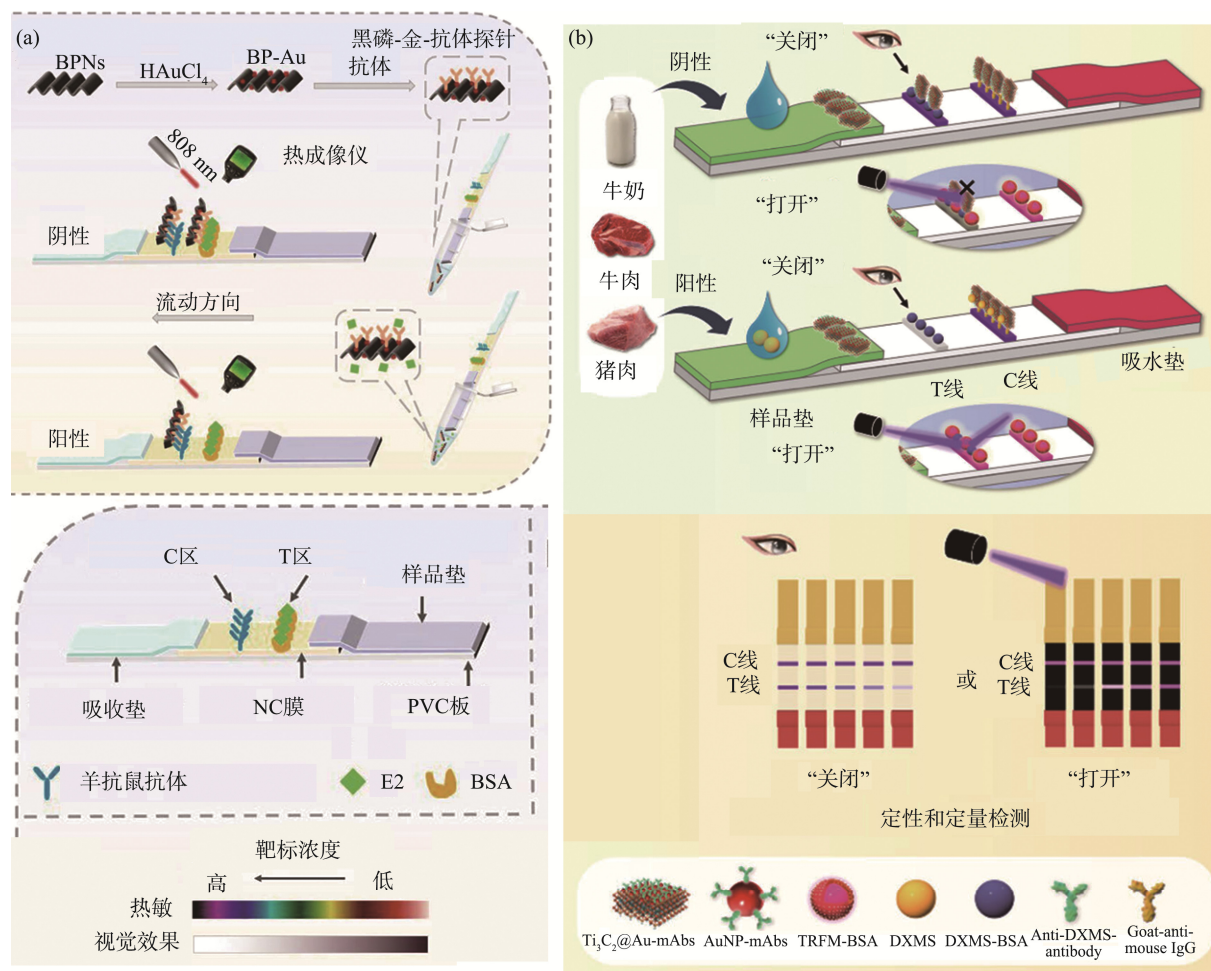
1.5 侧流免疫层析技术

侧流免疫层析技术凭借灵敏、低成本、操作简便、适宜现场快速检测等优点, 目前被广泛应用于临床诊断、环境监测和食品安全等诸多领域^[90-91]。基于抗原抗体的免疫识别反应, 对目标物进行特异性检测^[92]。最常用的侧流免疫层析技术是胶体金法, 在食品安全分析中获得了较为广泛的应用^[93]。近年来, 胶体金层析亦被应用于检测食品中类固醇激素。例如 YANG 等^[94]首次将侧流胶体金免疫分析试纸应用于测定牛奶样品中 E2 的检测, 并验证了该试纸可进一步用于奶粉中 E2 残留量的检测, 试纸条的线性范围为 37.14~1484.65 pg/mL, 可提供定量结果且无需前处理, 应用于现场检测, 方便快捷。WANG 等^[95]开发了针对雌酮、E2 和雌三醇的胶体金免疫层析试纸, 用于检测牛奶样品中的 3 种雌激素残留, 该测试方法的视觉检出限低至 5 ng/mL。YAO 等^[96]在柠檬酸钠的作用下, 通过 g-C₃N₄ 纳米片表面原位还原氯金酸, 开发了石墨类氮化碳 AuNPs (g-C₃N₄@Au) 复合材料。这种材料具有比 AuNPs 更深的颜色, 有效增强了信号强度。辅助放大信号的侧流层析试纸将 E2 的目视检出限提升了 3 倍, 低至 0.5 ng/mL, 并应用

于鱼、虾、猪肉和鸡肉 4 种食品样品中 E2 的快速检测与筛选。

对于小分子分析物的竞争法检测, 测试线的信号强度与游离的分析物浓度成反比, 这需要存在低浓度抗体的同时, 还需要足够的纳米粒子标记物来提高灵敏度, 以保证测试线的颜色强度。传统的胶体金材料通常无法满足这些要求, 为了解决这些问题, 人们开发了许多新型探针用于抗体标记, 如荧光纳米微球、彩色乳胶微球、普鲁士蓝纳米粒子和氧化石墨烯等^[97]。KIM 等^[98]开发了一种基于化学发光的侧流免疫层析平台, 以酶偶联 AuNPs 作为发光标记, 层析膜含有与皮质醇抗体或 HRP 偶联的 AuNPs 探针, 通过为抗皮质醇抗体和 HRP 提供多个区域, 还能有效增加发光信号。通过夹心法测定血清中的皮质醇, 用于检测人血清中的皮质醇, 检出限为 0.343 μg/dL。

近年来, 科研人员也在尝试开发新的信号采集方式和检测策略以提高侧流层析试纸的灵敏度和可靠性。ZHANG 等^[99]开发了一种光热侧流免疫层析条带, 首次将 BP-Au 纳米复合材料用于 E2 的光热侧流层析检测。光热侧流免疫层析技术的信号采集仅需依赖光源和便携式红外热成像仪, 可降低测试成本; 光热转化效率足够高, 背景信号得到有效去除, 易于实现高灵敏度和高信噪比。抗 E2 修饰的黑磷-金纳米复合材料作为光热对比信号探针, 用红外摄像机记录测试线的温度(图 6a^[99])。黑磷纳米片(black phosphorus nanosheets, BPNs)的带隙可利用厚度变化调整, 这一特点使 BPNs 可吸收可见光区至中红外区的光线。此外, BPNs 的消光系数大, 光热转换效率高, 为光热侧流层析提供了有利条件。以阴性对照的温度为基准, 以 T 区和 C 区的温度比值为定量依据, 可有效克服使用环境的温差造成的误差。在最佳检测条件下, 试纸的检出限低至 50 pg/mL, 并可应用于水、牛奶和奶粉样本中 E2 的快速筛选分析。DENG 等^[100]利用 Ti₃C₂@Au 荧光比色探针开发了“关闭”和“开启”双信号侧流层析免疫条带。Ti₃C₂@Au 纳米复合材料具有摩尔消光系数高、淬灭能力强、分散性高、生物相容性好等特点, 可在低抗体水平下进行高灵敏度检测, 合成过程无需任何有机试剂或加热反应。时间分辨荧光微球和目标分子的包被原被固定在 T 线, 在阴性条件下, 探针被 T 线捕获, 微球的荧光被探针淬灭, 探针在 T 线显色; 阳性条件下, 探针无法被 T 线捕获, 微球的荧光恢复, 而探针将不再在 T 线聚集而无颜色显示(图 6b^[100])。通过“关闭”和“开启”模式的结合, 实现了两个信号的相互校准, 有助于提高信号可靠性。用于测定牛奶、牛肉和猪肉中的地塞米松, 检出限分别为 0.0013、0.080 和 0.070 μg/kg。



注: 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAbs); 时间分辨荧光微球(time-resolved fluorescence microspheres, TRFM); 地塞米松(dexamethasone, DXMS); 抗地塞米松抗体(anti-DXMS antibody); 山羊抗小鼠免疫球蛋白 G (goat anti mouse IgG)。

图 6 基于 BP-Au 探针的光热-比色双通道侧流免疫层析技术及其 E2 检测试纸(a)和基于 $Ti_3C_2@Au$ 比色-荧光双模式探针的侧流免疫层析技术及其检测地塞米松的原理(b)

Fig.6 BP-Au-based colorimetric and photothermal dual channel lateral flow immunoassay test strips for E2 detection (a) and $Ti_3C_2@Au$ -based colorimetric-fluorescence probe for the lateral flow immunoassay of dexamethasone (b)

2 常用快速检测方法的性能比较

不同快速检测方法检测类固醇激素的优势和局限性见表 1, 每种方法都有它们独特的优点和不足, 如何结合这些优缺点以达到扬长避短的效果仍是科研工作者今后

的努力方向。上述快速检测方法的典型应用在表 2 中列出, 可以看出, 在 EC、比色法在灵敏度方面的表现较为突出, 但是, 侧流层析和拉曼光谱法的简单性和便携性更胜, 进一步缩短前者的检测时间以及提高后两者的灵敏度或将成为新的研究热点。

表 1 不同快速检测方法检测类固醇激素的优势和局限性

Table 1 Advantages and limitations of different rapid tests for the detection of steroid hormones

方法	优势	局限性
EC	响应快、成本低、灵敏度高, 适用于快速筛选和现场检测	稳定性和重现性相对较差
比色法	低成本、简单、可用于现场分析	肉眼难以识别颜色的微弱变化, 灵敏度偏低
荧光/磷光法	高灵敏度和高选择性	易受干扰, 荧光团可能发生光漂白
拉曼光谱	快速、灵敏、无损、可原位分析	拉曼散射强度较弱, 稳定性和可重复性较差
侧流层析	灵敏度高、成本低、操作简便、可用于现场快速检测	灵敏度和定量能力有限, 有一定概率出现假阳/阴性, 在复杂基质中易受干扰

表 2 代表性快检技术在食品类固醇激素检测中的应用
Table 2 Representative applications of the quick detection methods for steroid hormone in food

方法	样品	目标分子	检出限	线性范围	回收率/%	分析时间	参考文献
EC	牛奶	BPA	5 nmol/L	0.01~10 pmol/L	105	30 min	[101]
	牛奶、肉类	E2	9.9×10^{-19} mol/L	$10^{-18} \sim 10^{-6}$ mol/L	95.1~104.8	20 min	[31]
比色法	牛奶	E2	13.1 pmol/L	0.05~0.8 nmol/L	100.1~113.0	1.5 h	[55]
		BPA	7.60 pmol/L	10~100 pmol/L	96.10~106.5	55 min	[102]
	肉类	E2	0.15 μ mol/L	0~10 μ mol/L	95.70~113.8	40 min	[57]
荧光/磷光法	牛奶	孕酮	0.065 ng/mL	0.25~25 ng/mL	90~105	15 min	[103]
		E2	3.48×10^{-12} mol/L	$10^{-11} \sim 10^{-6}$ mol/L	82~107	1.5 h	[104]
			0.29 ng/mL	0.5~1.2 μ g/mL	93.6~102.4	40 min	[67]
拉曼光谱	鸡肉、牛奶	E2	9.58×10^{-14} mol/L	$10^{-12} \sim 10^{-4}$ mol/L	95.00~98.72	1 h	[87]
	牛奶		1.95×10^{-16} mol/L	$10^{-14} \sim 10^{-6}$ mol/L	90.56~109.40	35 min	[89]
	水产、牛奶	E2	65 ng/g	75 ng/g	-	7~10 min	[93]
侧流层析	鸡/猪肉	丙酸睾酮	0.32 μ g/kg	0.05~0.94 ng/mL	90~110	40 min	[105]
	牛奶		0.0013 μ g/kg	0.05~0.08 μ g/kg	81.1~113.7		
	牛肉	地塞米松	0.08 μ g/kg	0.35~1.50 μ g/kg	89.2~115.4	20 min	[100]
	猪肉		0.07 μ g/kg	0.25~1.00 μ g/kg			

注: -表示无数据。

3 结束语

本综述系统总结了包括 EC、比色法、荧光/磷光法、拉曼光谱法和侧流层析法等近些年常见的类固醇激素快速检测方法与技术, 综述了这些方法在动物源性食品, 包括乳制品和肉类等食品基质中类固醇激素检测的最新应用研究进展。如今, 内分泌干扰化学物质, 尤其是激素已成为我们难以回避的问题, 类似问题在全球范围内广泛存在, 对人类健康构成严重威胁。特别是近年来, 世界各国食品安全事件频发; 由于市场和贸易的周转需求, 新型检测方法的开发尤为迫切, 且将更加注重视快速和灵敏, 以期对痕量物质进行即时高灵敏检测。这将主要涉及高灵敏信号探针的选择与设计, 以及识别元件的选择和优化, 包括高特异性抗体的制备、功能配体的筛选等。由于 E2 是作用最强的类固醇激素, 目前关于类固醇激素的检测主要集中于对 E2 的检测, 然而其他类固醇激素如甲基睾酮、丙酸睾酮等雄性激素, 地塞米松、倍他米松等糖皮质激素的检测方法研究偏少。类固醇激素的多重识别与同时检测将是今后的重要研究方向, 这需要结合高通量的检测技术(如: 微流控分析、阵列传感等)。此外, 类固醇等内分泌干扰化学物质的原位检测目前仍缺乏有效手段, 如何在食品中建立原位实时的监测技术, 将有利于控制此类物质进入食物链, 这也将成为未来需要关注的研究方向之一。

参考文献

[1] HOGA CA, ALMEIDA FL, REYES FGR. A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their

residues [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2018, 16(1): 679-691.

- [2] MLALILA N, MAHIKA C, KALOMBO L, *et al.* Human food safety and environmental hazards associated with the use of methyltestosterone and other steroids in production of all-male tilapia [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(7): 4922-4931.
- [3] JIANG XL, HUA XM, ZHU LL. Production, safety and quality of aquatic products and strategies in China [J]. *Rural Eco-Environment*, 2004, 20(2): 77-80.
- [4] ISMAIL NAH, ARIS AZ, WEE SY, *et al.* Occurrence and distribution of endocrine-disrupting chemicals in mariculture fish and the human health implications [J]. *Food Chemistry*, 2021, 345: 128806.
- [5] 吴燕燕, 李来好, 刁石强, 等. 环境激素对水产品安全性的影响及预防[J]. *海洋科学* 2008, 32(1): 94-96.
- WU YY, LI LH, DIAO SQ, *et al.* Effects of environmental hormone on aquatic products safety and measure of preventing the effects [J]. *Marine Sciences*, 2008, 32(1): 94-96.
- [6] KONG N, SONG S, PENG J, *et al.* Sensitive, fast, and specific immunoassays for methyltestosterone detection [J]. *Sensors*, 2015, 15(5): 10059-10073.
- [7] GAO HJ, CHENG GY, WANG H, *et al.* Development of a broad-spectrum monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening of androgens in animal edible tissues [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 160: 157-162.
- [8] HUML L, TAUCHEN J, RIMPELOVA S, *et al.* Advances in the determination of anabolic-androgenic steroids: From standard practices to tailor-designed multidisciplinary approaches [J]. *Sensors*, 2022, 22(1): 4.
- [9] 马立利, 刘艳, 贾丽, 等. 动物源性食品中糖皮质激素残留检测技术的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013, 4(3): 847-856.
- MA LL, LIU Y, JIA L, *et al.* Progress in determination of glucocorticoid hormones residues in animal derived food [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2013, 4(3): 847-856.
- [10] 周芳, 邢晓玲, 余春苗, 等. 动物源性食品中地塞米松残留检测技术的研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2022(16): 171-176.

- ZHOU F, XING XL, YU CM, *et al.* Research progress on detection technology of dexamethasone residues in animal-derived foods [J]. *China Food Safety Magazine*, 2022(16): 171–176.
- [11] LI CN, HE X, LI H, *et al.* A new COF@AuNC catalytic amplification-aptamer SERS quantitative analysis method for trace estradiol with nanoreaction of H₂AuCl₄-sulfite [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 191: 108920.
- [12] ZHU JL, YANG H, XIAO W, *et al.* Determination of methyltestosterone residue in tilapia muscle by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) [J]. *Food Science*, 2011, 32(22): 243–247.
- [13] MUSEE N, KEBABETSWE LP, TICHAPONDWA S, *et al.* Occurrence, fate, effects, and risks of dexamethasone: ecological implications post-COVID-19 [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2021, 18(21): 11291.
- [14] ZOU DX, GU YJ, LUO D, *et al.* Rapid and ultra-sensitive testosterone detection via aptamer-functional gold nanoparticles [J]. *New Journal of Chemistry*, 2023, 47(3): 1023–1026.
- [15] 张丽娅, 邱小元, 黄鑫, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中8种糖皮质激素残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(22): 211–219.
- ZHANG LJ, QIU XY, HUANG X, *et al.* Determination of 8 kinds of glucocorticoids residues in food of animal origin by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(22): 211–219.
- [16] FAN YB, YIN YM, JIANG WB, *et al.* Simultaneous determination of ten steroid hormones in animal origin food by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Food Chemistry*, 2014, 142: 170–177.
- [17] CONNEELY G, AHERNE M, LU H, *et al.* Electrochemical immunosensors for the detection of 19-nortestosterone and methyltestosterone in bovine urine [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 121(1): 103–112.
- [18] XIA WQ, HU YJ, SUN C, *et al.* Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for methyltestosterone residue in aquatic products [J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(1): 93–98.
- [19] MENG X, XIE SH, XIE ST, *et al.* Simultaneous determination of six hormones in muscle tissues of monopterus albus using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Science*, 2015, 31(2): 208–212.
- [20] CHARITHRA MM, MANJUNATHA JGG, RARIL C. Surfactant modified graphite paste electrode as an electrochemical sensor for the enhanced voltammetric detection of estradiol with dopamine and uric acid [J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2020, 10(2): 247–253.
- [21] DING N, ZHAO H, PENG WB, *et al.* A simple colorimetric sensor based on anti-aggregation of gold nanoparticles for Hg²⁺ detection [J]. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 2012, 395: 161–167.
- [22] LIU JC, BAI WH, NIU SC, *et al.* Highly sensitive colorimetric detection of 17 β -estradiol using split DNA aptamers immobilized on unmodified gold nanoparticles [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7571.
- [23] HOU Y, LU X, YANG J, *et al.* A label-free fluorescent aptamer sensor for testosterone based on SYBR Green I [J]. *Anal Methods*, 2023, 15(12): 1546–1552.
- [24] WANG R, CHON H, LEE S, *et al.* Highly sensitive detection of hormone estradiol E2 using surface-enhanced Raman scattering based immunoassays for the clinical diagnosis of precocious puberty [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(17): 10665–10672.
- [25] CHOI JM, HAHM E, PARK K, *et al.* SERS-based flavonoid detection using ethylenediamine- β -cyclodextrin as a capturing ligand [J]. *Nanomaterials*, 2017, 7(1): 8.
- [26] WANG ZX, SUN L, LIU LQ, *et al.* Ultrasensitive detection of seventeen chemicals simultaneously using paper-based sensors [J]. *Materials Chemistry Frontiers*, 2018, 2(10): 1900–1910.
- [27] WANG LL, WANG WL, YANG C, *et al.* Detection of 17 β -estradiol in water by time-resolved fluorescence lateral flow assay [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2021, 40(10): 1409–1416.
- [28] REN J, YIN XC, HU HL, *et al.* A multi-scenario dip-stick immunoassay of 17 β -estradiol based on multifunctional and non-composite nanoparticles with colorimetric-nanozyme-magnetic properties [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2022, 367: 132150.
- [29] QIN Y, BUBIAJAEER H, YAO J, *et al.* Based on unmodified aptamer-gold nanoparticles colorimetric detection of dexamethasone in Food [J]. *Biosensors*, 2022, 12(4): 242.
- [30] BARRETO FC, LEME-SILVA MK, CESARINO I. An electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and copper nanoparticles for monitoring estradiol levels in water samples after bioremediation [J]. *Chemosensors*, 2022, 10(10): 395.
- [31] BACCHU MS, ALI MR, HASAN MN, *et al.* Graphitic carbon nitride and APTES modified advanced electrochemical biosensor for detection of 17 β -estradiol in spiked food samples [J]. *RSC Advances*, 2022, 12(26): 16581–16588.
- [32] CHANG Z, ZHU BC, LIU JJ, *et al.* Electrochemical aptasensor for 17 β -estradiol using disposable laser scribed graphene electrodes [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2021, 185: 113247.
- [33] MUSA AM, KIELY J, LUXTON R, *et al.* Graphene-based electrodes for monitoring of estradiol [J]. *Chemosensors*, 2023, 11(6): 337.
- [34] ZHAO QA, FARAJ Y, LIU LY, *et al.* Simultaneous determination of dopamine, uric acid and estradiol in maternal urine samples based on the synergistic effect of reduced graphene oxide, silver nanowires and silver nanoparticles in their ternary 3D nanocomposite [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 158: 105185.
- [35] CAO QA, ZHAO H, ZENG LX, *et al.* Electrochemical determination of melamine using oligonucleotides modified gold electrodes [J]. *Talanta*, 2009, 80(2): 484–488.
- [36] SAMIE HA, ARVAND M. Label-free electrochemical aptasensor for progesterone detection in biological fluids [J]. *Bioelectrochemistry*, 2020, 133: 107489.
- [37] HUANG Y, YE DX, YANG J, *et al.* Dual recognition elements for selective determination of progesterone based on molecularly imprinted electrochemical aptasensor [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1264: 341288.
- [38] SINGH AC, ASIF MH, BACHER G, *et al.* Nanoimmunosensor based on ZnO nanorods for ultrasensitive detection of 17 β -estradiol [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2019, 126: 15–22.
- [39] DISHA, KUMARI P, NAYAK MK, *et al.* A bio-sensing platform based on graphene quantum dots for label free electrochemical detection of progesterone [Z]. *International Conference on Advances in Nanomaterials and Devices for Energy and Environment (ICAN)*, 2019, 48: 583–586.
- [40] MASIKINI M, GHICA ME, BAKER PGL, *et al.* Electrochemical sensor based on multi-walled carbon nanotube/gold nanoparticle modified glassy carbon electrode for detection of estradiol in environmental samples [J]. *Electroanalysis*, 2019, 31(10): 1925–1933.
- [41] CHAI CX, GAO J, ZHAO GQ, *et al.* In-situ synthesis of ultrasmall Au nanoparticles on bimetallic metal-organic framework with enhanced electrochemical activity for estrone sensing [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1152: 157–162.

- [42] WU L, YANG W, XIA C, *et al.* An electrochemical immunosensor for detecting progesterone in milk from dairy cows [J]. *Veterinarski Arhiv*, 2018, 88(1): 49–57.
- [43] YEASMIN SJ, WU B, LIU Y, *et al.* Nano gold-doped molecularly imprinted electrochemical sensor for rapid and ultrasensitive cortisol detection [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2022, 206: 114142.
- [44] LEE MH, THOMAS JL, LIU WC, *et al.* A multichannel system integrating molecularly imprinted conductive polymers for ultrasensitive voltammetric determination of four steroid hormones in urine [J]. *Microchimica Acta*, 2019, 186(11): 695.
- [45] MANICKAM P, ARIZALETA F, GURUSAMY M, *et al.* Theoretical studies of cortisol-imprinted prepolymerization mixtures: Structural insights into improving the selectivity of affinity sensors [J]. *Journal of the Electrochemical Society*, 2017, 164(5): B3077–B3080.
- [46] LIU HC, QIN WJ, LI XX, *et al.* Molecularly imprinted electrochemical sensors based on $Ti_3C_2T_x$ -MXene and graphene composite modifications for ultrasensitive cortisol detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(44): 16079–16088.
- [47] LI Y, XU JY, JIA MM, *et al.* Colorimetric determination of 17β -estradiol based on the specific recognition of aptamer and the salt-induced aggregation of gold nanoparticles [J]. *Materials Letters*, 2015, 159: 221–224.
- [48] TU E, PEARLMUTTER P, TIANGCO M, *et al.* Comparison of colorimetric analyses to determine cortisol in human sweat [J]. *ACS Omega*, 2020, 5(14): 8211–8218.
- [49] ZHANG X, SHEN ZJ, SU WH, *et al.* Gold nanoparticle assembly and disassembly in colorimetric immunoassay to detect 17β -estradiol and determine gynecological disorder [J]. *Process Biochemistry*, 2020, 99: 21–26.
- [50] CHANG CC, LI CF, YANG ZH, *et al.* Target-induced recycling assembly of split aptamer fragments by DNA toehold-mediated displacement for the amplified colorimetric detection of estradiol [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2022, 364: 131823.
- [51] PULE BO, DEGNI S, TORTO N. Electrospun fibre colorimetric probe based on gold nanoparticles for on-site detection of 17β -estradiol associated with dairy farming effluents [J]. *Water SA*, 2015, 41(1): 27–32.
- [52] LIU MY, ZHANG SQ, DU SY, *et al.* A high throughput screening method for endocrine disrupting chemicals in tap water and milk samples based on estrogen receptor α and gold nanoparticles [J]. *Analytical Methods*, 2020, 12(2): 200–204.
- [53] ALSAGER OA, KUMAR S, ZHU B, *et al.* Ultrasensitive colorimetric detection of 17β -estradiol: The effect of shortening DNA aptamer sequences [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(8): 4201–4209.
- [54] SOH JH, LIN YY, RANA S, *et al.* Colorimetric detection of small molecules in complex matrixes via target-mediated growth of aptamer-functionalized gold nanoparticles [J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(15): 7644–7652.
- [55] KONGPREECHA P, CHUMPOL J, SIRI S. Highly sensitive colorimetric aptasensor for 17β -estradiol detection in milk based on the repetitive-loop aptamer [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2023, 70(3): 1384–1396.
- [56] WEI SL, LI JW, LIU Y. Colourimetric assay for β -estradiol based on the peroxidase-like activity of $Fe_3O_4@mSiO_2@HP-\beta$ -CD nanoparticles [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(130): 107670–107679.
- [57] GUO ZH, YANG B, ZHU J, *et al.* Light-activated, dual-mode fluorescence and colorimetric detection of estradiol with high fidelity based on aptamer's special recognition [J]. *Food Chemistry*, 2024, 436: 137702.
- [58] TAN CX, SCHENK JA, GAJOVIC-EICHELMANN N, *et al.* A new one-step antigen heterologous homogeneous fluorescence immunoassay for progesterone detection in serum [J]. *Talanta*, 2015, 134: 508–513.
- [59] SARKAR I, MISHRA AK. Fluorophore tagged bio-molecules and their applications: A brief review [J]. *Applied Spectroscopy Reviews*, 2018, 53(7): 552–601.
- [60] LEE WI, SHRIVASTAVA S, LE-THAI D, *et al.* A smartphone imaging-based label-free and dual-wavelength fluorescent biosensor with high sensitivity and accuracy [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 94: 643–650.
- [61] VARRIALE A, PENNACCHIO A, PINTO G, *et al.* A fluorescence polarization assay to detect steroid hormone traces in milk [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(41): 9159–9164.
- [62] LI CN, LI J, LIANG AH, *et al.* Aptamer turn-on SERS/RRS/fluorescence tri-mode platform for ultra-trace urea determination using Fe/N-Doped carbon dots [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2021, 9: 613083.
- [63] WANG LY, DONG LY, CHEN L, *et al.* A novel water-soluble quantum dot-neutral red fluorescence resonance energy transfer probe for the selective detection of megestrol acetate [J]. *New Journal of Chemistry*, 2015, 39(1): 555–565.
- [64] WEI QY, ZHANG PY, PU HB, *et al.* A fluorescence aptasensor based on carbon quantum dots and magnetic Fe_3O_4 nanoparticles for highly sensitive detection of 17β -estradiol [J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131591.
- [65] SAFARIAN SM, KUSOV PA, KOSOLOBOV SS, *et al.* Surface-specific washing-free immunosensor for time-resolved cortisol monitoring [J]. *Talanta*, 2021, 225: 122070.
- [66] LIU Y, WU B, TANYI EK, *et al.* Label-free sensitive detection of steroid hormone cortisol based on target-induced fluorescence quenching of quantum dots [J]. *Langmuir*, 2020, 36(27): 7781–7788.
- [67] ZHANG Y, ZHOU J, ZHANG XX, *et al.* NIR persistent luminescence nanoparticles based turn-on aptasensor for autofluorescence-free determination of 17β -estradiol in milk [J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131432.
- [68] NI X, XIA B, WANG LM, *et al.* Fluorescent aptasensor for 17β -estradiol determination based on gold nanoparticles quenching the fluorescence of rhodamine B [J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 523: 17–23.
- [69] HONG SC, MURALE DP, LEE M, *et al.* Bulk aggregation based fluorescence turn-on sensors for selective detection of progesterone in aqueous solution [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2017, 56(46): 14642–14647.
- [70] ARAFA RM, YEHIA AM, ABBAS SS, *et al.* Exploiting steroid-cyclodextrin complexes for selective determination of estradiol valerate and norethisterone acetate by synchronous fluorescence spectrofluorimetry [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2019, 222: 117237.
- [71] HAYNES AZ, LEVINE M. Detection of anabolic steroids via cyclodextrin-promoted fluorescence modulation [J]. *RSC Advances*, 2020, 10(42): 25108–25115.
- [72] TAN YN, HU XX, LIU M, *et al.* Simultaneous visualization and quantitation of multiple steroid hormones based on signal-amplified biosensing with duplex molecular recognition [J]. *Chemistry-A European Journal*, 2017, 23(44): 10683–10689.
- [73] WU JZ, AHMAD W, ZHANG JG, *et al.* Ratiometric upconversion-luminescence in-situ sampling aptasensing platform integrated with smartphone-based device for visual detection of 17β -estradiol [J]. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2023, 390: 133999.
- [74] POMELOVA VG, OSIN NS, BYCHENKOVA TA, *et al.* Application of Eu(III) nanoparticle labels in time-resolved phosphorescence analysis for detection of thyroid stimulating hormone [J]. *Russian Journal of*

- Bioorganic Chemistry, 2017, 43(4): 377–385.
- [75] CHEN GL, ZHOU J, FENG H, *et al.* A simple and efficient phosphorescent probe for iodide-specific detection based on crystallization-induced phosphorescence of organic ionic crystals [J]. Journal of Materials Chemistry C, 2019, 7(1): 43–47.
- [76] ZHOU YS, QIN W, DU C, *et al.* Long-lived room-temperature phosphorescence for visual and quantitative detection of oxygen [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2019, 58(35): 12102–12106.
- [77] FENG C, DONG K, WU YJ, *et al.* Study of Raman technique applied to estrogen [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2011, 31(8): 2127–2130.
- [78] XUE JQ, LI DW, QU LL, *et al.* Surface-imprinted core-shell Au nanoparticles for selective detection of bisphenol a based on surface-enhanced Raman scattering [J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 777: 57–62.
- [79] VEDAD J, MOJICA ERE, DESAMERO RZB. Raman spectroscopic discrimination of estrogens [J]. Vibrational Spectroscopy, 2018, 96: 93–100.
- [80] ALBUQUERQUE CDL, NOGUEIRA RB, POPPI RJ. Determination of 17 β -estradiol and noradrenaline in dog serum using surface-enhanced Raman spectroscopy and random forest [J]. Microchemical Journal, 2016, 128: 95–101.
- [81] MUGO SM, LU W. Determination of β -estradiol by surface-enhance Raman spectroscopy (SERS) using a surface imprinted methacrylate polymer on nanoporous biogenic silica [J]. Analytical Letters, 2022, 55(3): 378–387.
- [82] LIU XH, DENG H, CHANG L, *et al.* Recent progress of SERS for environmental estrogen detection [J]. Spectroscopy and Spectral Analysis, 2020, 40(10): 3038–3047.
- [83] LIU JX, PAN MD, JIN JZ, *et al.* Prepared three-dimensional flowerlike MoS₂/Ag@rGO nanocomposite as a self-cleaning SERS substrate for the trace detection of 17 β -estradiol in environmental water [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2024, 12(2): 893–903.
- [84] WANG ZZ, WANG JJ, LAI YT, *et al.* Rapid detection of estrogen compounds using surface-enhanced Raman spectroscopy with a Zn/Au-Ag/Ag sandwich-structured substrate [J]. Optical Materials, 2021, 112: 110759.
- [85] KISSELL LN, SHEOKAND M, STROBBIA P. Rational design enabling aptamer-based sensors for surface-enhanced Raman detection of small molecules [J]. Journal of Raman Spectroscopy, 2023, 54(9): 966–975.
- [86] WANG ZW, YAN RX, LIAO SW, *et al.* In situ reduced silver nanoparticles embedded molecularly imprinted reusable sensor for selective and sensitive SERS detection of bisphenol A [J]. Applied Surface Science, 2018, 457: 323–331.
- [87] LIU JX, ZHENG J, LU YS, *et al.* Prepared sandwich structure WS₂/ag@MIP composite for ultrasensitive SERS detection of trace 17beta-estradiol in food [J]. Food Chemistry, 2024, 460(Pt 3): 140731.
- [88] LIU SY, CHENG RJ, CHEN YQ, *et al.* A simple one-step pretreatment, highly sensitive and selective sensing of 17 β -estradiol in environmental water samples using surface-enhanced Raman spectroscopy [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2018, 254: 1157–1164.
- [89] ZHANG MM, WU ZY, YANG YH, *et al.* Fabrication of molecularly-imprinted gold nanoparticle-embedded Fe-MOFs for highly selective SERS detection of 17 β -estradiol in milk [J]. Analyst, 2023, 148(11): 2472–2481.
- [90] XING CR, LIU LQ, SONG SS, *et al.* Ultrasensitive immunochromatographic assay for the simultaneous detection of five chemicals in drinking water [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2015, 66: 445–453.
- [91] WANG M, GUO LQ, YU M, *et al.* The application of a lateral flow immunographic assay to rapidly test for dexamethasone in commercial facial masks [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019, 411(22): 5703–5710.
- [92] DALIRIRAD S, HAN D, STECKL AJ. Aptamer-based lateral flow biosensor for rapid detection of salivary cortisol [J]. ACS Omega, 2020, 5(51): 32890–32898.
- [93] XU ZH, SUN TQ, HE HQ, *et al.* Simultaneous detection of diethylstilbestrol and estradiol residues with a single immunochromatographic assay strip [J]. Food Science & Nutrition, 2021, 9(3): 1824–1830.
- [94] YANG XD, WANG FY, SONG CM, *et al.* Establishment of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the rapid detection of estradiol in milk samples [J]. LWT-Food Science and Technology, 2015, 64(1): 88–94.
- [95] WANG ZX, GUO LL, LIU LQ, *et al.* Colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for the rapid detection of three natural estrogens in milk [J]. Food Chemistry, 2018, 259: 122–129.
- [96] YAO XL, WANG ZH, ZHAO M, *et al.* Graphite-like carbon nitride-laden gold nanoparticles as signal amplification label for highly sensitive lateral flow immunoassay of 17 β -estradiol [J]. Food Chemistry, 2021, 347: 129001.
- [97] YAO XL, WANG ZH, DOU L, *et al.* An innovative immunochromatography assay for highly sensitive detection of 17 β -estradiol based on an indirect probe strategy [J]. Sensors and Actuators B-Chemical, 2019, 289: 48–55.
- [98] KIM HT, JIN E, LEE MH. Portable chemiluminescence-based lateral flow assay platform for the detection of cortisol in human serum [J]. Biosensors, 2021, 11(6): 191.
- [99] ZHANG Y, YANG HJ, XU ZH, *et al.* An ultra-sensitive photothermal lateral flow immunoassay for 17 β -estradiol in food samples [J]. Food Chemistry, 2023, 404: 134482.
- [100] DENG YW, WANG Y, LIN MF, *et al.* High-density Au anchored to Ti₃C₂-based colorimetric-fluorescence dual-mode lateral flow immunoassay for all-domain-enhanced performance and signal intercalibration [J]. Analytical Chemistry, 2024, 96(13): 5106–5114.
- [101] ZHOU L, WANG JP, LI DJ, *et al.* An electrochemical aptasensor based on gold nanoparticles dotted graphene modified glassy carbon electrode for label-free detection of bisphenol A in milk samples [J]. Food Chemistry, 2014, 162: 34–40.
- [102] JIA M, SHA JY, LI ZH, *et al.* High affinity truncated aptamers for ultra-sensitive colorimetric detection of bisphenol A with label-free aptasensor [J]. Food Chemistry, 2020, 317: 126459.
- [103] IVANOVA T, GODJEVARGOVA T, DIMOVA N. Magnetic nanoparticle-based fluorescent immunoassay for determination of progesterone in milk [J]. International Journal of Dairy Technology, 2018, 71(2): 309–320.
- [104] LI QY, LI GL, FAN LH, *et al.* Click reaction triggered turn-on fluorescence strategy for highly sensitive and selective determination of steroid hormones in food samples [J]. Food Chemistry, 2022, 374: 131565.
- [105] XU XX, GUO LL, XU LG, *et al.* Multiplex lateral flow immunochromatographic assay for the qualitative and quantitative detection of six steroid hormone residues in chicken and pork [J]. Food Bioscience, 2023, 53: 102498.

(责任编辑: 安香玉 蔡世佳)