DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260113004
引用格式: 束广萍, 林慈, 岳绪辉, 等. 乳胶微球免疫层析法定量检测芦笋中重金属汞和铅[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(16): 29–39.
Shu Guangping, Lin Ci, Yue Xuhui, et al. Quantitative detection of heavy metals mercury and lead in *Asparagus officinalis* L. by latex microsphere immunochromatography [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(16): 29–39. (in Chinese with English abstract).

乳胶微球免疫层析法定量检测芦笋中重金属汞和铅

束广萍[1], 林　慈[1], 岳绪辉[1], 周文欣[1], 王　珏[1], 王元凤[1], 令狐克勇[2*]
(1. 上海师范大学生命科学学院, 上海　200234; 2. 贵州国芯生物科技有限公司, 贵阳　550027)

摘　要: 目的　制备快速检测芦笋中重金属汞和铅残留的乳胶微球免疫层析试纸条。**方法**　将重金属汞和铅抗体与乳胶微球进行偶联, 用硝酸纤维膜为固相载体包被重金属汞、铅抗原作为检测线(T 线)、羊抗鼠抗体作为质控线(C 线)。经一系列条件优化, 分别检测灵敏度、特异性及稳定性, 并对芦笋样品进行检测。**结果**　乳胶微球免疫层析试纸条检测重金属汞的最佳抗体添加量为 40 μg/mL, 最佳包被原质量浓度为 0.5 mg/mL, 最佳探针添加量为 3 μL, 最优检测 pH 为 7, 最低检出限为 0.28 ng/mL, 半数抑制率为 5.60 ng/mL, 定量范围为 1.00~50.00 ng/mL。乳胶微球免疫层析试纸条检测重金属铅的最佳抗体添加量为 40 μg/mL, 最佳包被原质量浓度为 0.5 mg/mL, 最佳探针添加量为 4 μL, 最优检测 pH 为 6, 最低检出限为 0.29 ng/mL, 半数抑制率为 2.15 ng/mL, 定量范围为 0.10~10.00 ng/mL。两种乳胶微球免疫层析试纸条具有良好特异性, 能够保存一年以上。**结论**　本研究成功制备了一种基于乳胶微球免疫层析技术的重金属汞及铅的快速检测试纸条, 具有高特异性、高灵敏度, 可用于芦笋中汞及铅残留的现场筛查。

关键词: 乳胶微球; 免疫层析法; 汞; 铅
中图分类号: TS207.5; R392; O614　　**文献识别码:** A　　**文章编号:** 2095–0381(2026)16–0029–11

Quantitative detection of heavy metals mercury and lead in *Asparagus officinalis* L. by latex microsphere immunochromatography

SHU Guang-Ping[1], LIN Ci[1], YUE Xu-Hui[1], ZHOU Wen-Xin[1], WANG Jue[1], WANG Yuan-Feng[1], LINGHU Ke-Yong[2*]
(1. *College of Life Sciences*, *Shanghai Normal University*, *Shanghai* 200234, *China*; 2. *Guizhou Guoxin Biotechnology Co*., *Ltd*., *Guiyang* 550027, *China*)

ABSTRACT: Objective　To develop a rapid detecting heavy metal mercury and lead residues in *Asparagus officinalis* L. by latex microsphere immunochromatographic test strips. **Methods**　Heavy metal mercury and lead antibodies were conjugated to latex microspheres. Nitrocellulose membranes were coated with heavy metal mercury and lead antigens as the test line (T line) and goat anti-mouse antibody as the control line (C line). After optimizing conditions, sensitivity,

收稿日期: 2026-01-13
基金项目: 2023 年贵阳贵安科技人才培养项目(筑科合同[2024]2-6 号); 上海市科技计划项目(20392002100)
第一作者: 束广萍(2001—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为单克隆抗体制备及其免疫快检方法建立。E-mail: 2934162470@qq.com
***通信作者:** 令狐克勇(1987—), 男, 主要研究方向为食品安全快速检验检测技术。E-mail: 383464980@qq.com

specificity and stability were evaluated, followed by testing *Asparagus officinalis* L. samples. **Results** The optimal antibody concentration for mercury detection was 40 μg/mL, with an optimal coating antigen mass concentration of 0.5 mg/mL. optimal probe volume of 3 μL, optimal detection pH of 7, minimum limit of detection 0.28 ng/mL, half-inhibition rate of 5.60 ng/mL and quantitative range of 1.00–50.00 ng/mL. For lead detection, the optimal antibody concentration was 40 μg/mL, with an optimal coating stock mass concentration of 0.5 mg/mL, optimal probe addition volume of 4 μL, optimal detection pH of 6, minimum limit of detection was 0.29 ng/mL, half-inhibition rate of 2.15 ng/mL and quantitative range of 0.10–10.00 ng/mL. Both latex microsphere immunochromatographic test strips demonstrated good specificity and could be stored for over one year. **Conclusion** This study successfully develope a rapid test strip for heavy metals mercury and lead based on latex microsphere immunochromatography technology. It exhibits high specificity and sensitivity, making it suitable for on-site screening of mercury and lead residues in *Asparagus officinalis* L..

KEY WORDS: latex microsphere; immunochromatography; mercury; lead

0 引 言

随着矿业开采、工业燃煤等产业的高速发展, 大量重金属污染物排入自然环境, 造成水体、土壤、大气的重金属累积污染, 且重金属具有难降解、易迁移、生物富集性强的特点, 可通过灌溉、沉降等途径富集于农产品中, 并经由食物链逐级传递进入人体, 严重威胁食品安全与人体健康[1–3]。重金属汞进入人体后可诱发肝脏损伤, 穿透血脑屏障破坏神经系统, 具有极强的蓄积毒性与致癌风险; 重金属铅可长期滞留于人体造血、肾脏及生殖系统, 生物积累周期可达 30~50 年, 易造成不可逆的机体损伤[4]。

芦笋作为营养价值丰富、市场流通广泛的蔬菜, 富含膳食纤维、多种维生素、氨基酸以及钾、硒等矿物质, 口感清甜、食用价值高, 深受消费者喜爱[5]。但芦笋在种植生长过程中易富集汞、铅等重金属, 造成重金属残留超标问题[6–7]。因此, 建立精准、高效、低成本的芦笋重金属残留检测方法, 对大众饮食健康具有重要意义。

目前, 检测重金属的方法主要包括原子光谱法[8–10]、质谱法[11–13]、电感耦合等离子体发射光谱法[14–16]等。此类仪器检测方法成熟、检测灵敏度高、结果精准度好, 是现阶段重金属定量检测的标准方法。但该类检测技术检测前需对样品进行消解、萃取等复杂前处理操作, 且依赖精密检测设备与专业操作人员, 检测流程烦琐、检测周期长、检测成本高昂, 仅适用于实验室精准检测, 无法适配现场、批量、快速筛查需求。免疫层析技术凭借操作简便、检测快速、成本低廉等优势, 弥补了仪器检测方法的短板, 现已广泛应用于食品、环境样品的污染物快速筛查领域。现阶段已有诸多学者开展重金属免疫层析试纸条相关研究, 王玉珍等[17]研发了用于水样汞离子检测的胶体金免疫层析试纸条, 检出限为 100 μg/L, 单次检测时长 10 min; 李杨阳等[18]制备了可检测小龙虾中铅残留的胶体金试纸条, 最低检出限为 6 ng/mL, 检测耗时 15 min, 但上述试纸条的灵敏度有待提升且检出时间较长。乳胶微球是由聚苯乙烯乳液聚合形成的球形颗粒, 相比于传统胶体金具有更强的稳定性, 且表面含羧基、羟基等化学基团, 能够与抗体实现共价偶联, 内部可负载染料, 且颜色稳定不易脱落[19–20]。基于此, 本研究建立了基于乳胶微球免疫层析的、可分别快速检测芦笋中汞、铅重金属残留的免疫层析试纸条方法, 进一步完善果蔬类农产品重金属快速检测技术体系, 为农产品常态化筛查、市场质量监管提供简便、高效的方案。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芦笋(上海市崇明岛农村合作社)。

N-羟基丁二酰亚胺(*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-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, EDC](纯度≥98%)、氢氧化钠(纯度≥96%)、聚乙烯吡咯烷酮 1000、碳酸钾(纯度≥99%)、氯化钠(纯度≥99.5%)、氯化钾(纯度≥95%)、十二水合磷酸氢二钠(纯度≥99%)、聚山梨醇酯-20(纯度≥97%)、磷酸二氢钾(纯度≥99.5%)、碳酸氢钠(纯度≥99.5%)、磷酸二氢钠(纯度≥99%)、磷酸氢二钠(纯度≥99%)、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)(纯度≥99.5%)(国药基团化学试剂有限公司); 2-吗啉乙磺酸[2-(n-morpholino)ethanesulfonic acid, MES](纯度 99%, 北京沃凯生物有限公司); 4-羟乙基哌嗪乙磺酸[2-(4-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, HEPES](纯度≥99%, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(纯度≥96%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 蔗糖(纯度≥99%)、海藻糖(纯度≥99%)、叠氮钠(纯度≥99.5%)、标准品铅、汞、铁、铬、砷、铜、镍(质量浓度 1000 μg/mL, 纯度 99%)、汞、铅单克隆抗体(质量浓度 1 mg/mL)(苏州鸿信生物技术有限公司); 羧基化蓝黑色乳胶微球(苏州为度生物技术有限公司); 硝酸纤维素膜(NC 膜)(德国赛多利斯公司)。

1.2　仪器与设备

F-100SD 型超声波清洗器(深圳福洋科技基团有限公司); ME204E 电子天平(精度: 0.001 g, 瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司); DHG-9070A 型鼓风干燥箱(上海安竞实验设备有限公司); STU4100UVR 型超纯水机(上海穗天环保科技有限公司); XW-80A 型涡旋混匀器(上海嘉鹏科技有限公司); TALOS F200X 型场发射透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)(分辨率≤0.25 nm, 美国赛默飞世尔科技公司); H1850R 型高速低温离心机(湖南赫西仪器设备有限公司); ZQ2000 型微电脑自动斩切机、HM 3035 型 XYZ 三维划膜喷金仪(上海金标科技有限公司)。

1.3　溶液配制

50 mmol/L MES 溶液: 称取 9.76 g MES, 溶解于 1 L 超纯水中, 用 1 mmol/L 氢氧化钠调节酸度至 pH 6.0。

20 mg/mL EDC 溶液: 称取 2 mg EDC 于 1.5 mL 的离心管中, 溶解于 100 μL 超纯水中, 现配现用。

20 mg/mL NHS 溶液: 称取 2 mg NHS 于 1.5 mL 离心管中, 溶解于 100 μL 超纯水中, 现用现配。

0.01 mol/L EDTA-HBS 缓冲液: 称取 8.77 g 氯化钠、0.20 g 氯化钾、2.38 g HEPES、0.29 g EDTA, 溶解于 1 L 的超纯水中, 调节 pH 至 1 L。

0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PB): 称取 5.2 g 的磷酸氢二钠及 0.67 g 的磷酸二氢钠于容量瓶中, 超纯水定容至 1 L。

0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS): 称取 8 g 氯化钠、0.2 g 氯化钾、3.6 g 十二水合磷酸氢二钠、0.24 g 磷酸二氢钾溶解于 800 mL 的超纯水中, 调制 pH 至 7.4, 定容至 1000 mL。

探针复溶液: 50 g 蔗糖, 3 g 聚乙烯吡咯烷酮 1000, 5 g 牛血清白蛋白, 3 g 叠氮钠, 2 mL 聚山梨醇酯-20 溶于 1 L 0.01 mol/L PBS 缓冲液。

1.4　实验方法

1.4.1　乳胶微球的 TEM 表征

取 10 μL 的 0.5 mg/mL 乳胶微球溶液, 滴加在普通铜网碳膜正面, 将碳膜置于 40 ℃干燥箱中烘干。取出碳膜上样, 在 TEM 下观察乳胶微球的形貌特征。

1.4.2　汞、铅免疫探针的制备及抗体添加量的优化

(1)免疫探针的制备

取 25 μL 蓝黑色乳胶微球溶液(10 mg/mL)加入 2 mL MES 溶液中, 振荡混匀, 加入 10 μL NHS 溶液和 5 μL EDC 溶液, 振荡混匀, 离心(12000 r/min; 30 min), 弃上清, 用 1 mL MES 溶液复溶, 超声分散, 加入一定量的抗体, 室温涡旋 2 h, 加入 10% BSA 溶液封闭 1 h, 离心(12000 r/min, 30 min), 用 1 mL 探针复溶液重悬。

(2)偶联汞抗体添加量的优化

按照上述步骤, 向 1 mL 的探针溶液中加入不同量(20、40、60、80、100 μg)的汞抗体, 制备免疫探针, 取 3 μL 的探针溶液加入 95 μL 的 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液及 50 ng/mL 的汞标准液加至微孔中混匀, 将试纸条插入微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较 T_0 和抑制率。

(3)偶联铅抗体添加量的优化

将上述汞抗体改为铅抗体, 抗体添加量为 30、40、50、60、70 μg, 待测液为 50 ng/mL 的铅标准液。其余步骤与条件同偶联汞抗体添加量的优化一致。

1.4.3　免疫层析试纸条的参数优化

(1)汞试纸条参数的优化

在最适抗体添加量下, 固定 C 线处二抗的质量浓度为 0.8 mg/mL, 采用棋盘法对 T 线包被原浓度和探针用量进行优化。包被原质量浓度分别为 0.5、0.6、0.7 mg/mL, 探针用量为 3、4、5 μL。取 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液及 50 ng/mL 的汞标准液加至微孔中混匀, 将试纸条插入微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较 T/C 的值和抑制率。

(2)铅试纸条参数的优化

包被原质量浓度分别为 0.4、0.5、0.6 mg/mL, 探针用量为 4、5、6 μL。其余步骤及条件同汞试纸条参数优化一致。

1.4.4　免疫层析试纸条的组装

将样品垫、硝酸纤维膜(NC 膜)、吸水纸依次黏贴于背板上, 相邻部件间交叠 2 mm 以保证液体顺向层析。通过 X、Y、Z 三维全自动喷金划膜仪, 分别将汞/铅抗原, 作为检测线(T 线)与质控线(C 线)。完成喷涂后烘干, 再经斩切机切制成宽度 3.8 mm 的试纸条。试纸条结构示意图如图 1 所示。

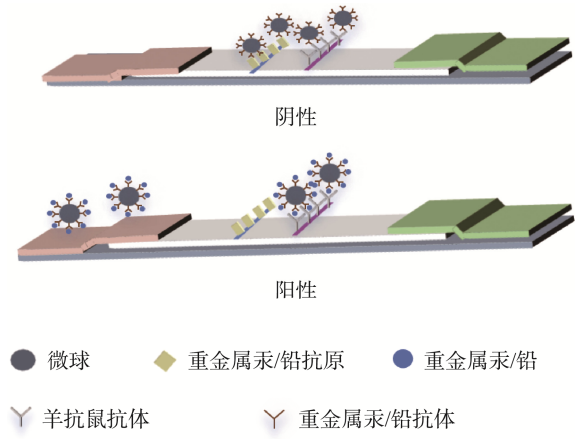


图 1　试纸条结构示意图

Fig.1　Schematic diagram of the test strip structure

1.4.5 试纸条检测体系 pH 的优化

(1)汞试纸条检测体系 pH 的优化

最适抗体添加量、试纸条参数情况下, 配制 pH 为 5、6、7、8、9 的 EDTA·HBS 缓冲液, 及 pH 为 5、6、7、8、9 的 50 ng/mL 汞标准液加至微孔中混匀。将试纸条插入微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较 T_0/C_0 (其中 T_0 为不加标准品时 T 线的灰度值, C_0 为不加标准品时 C 线灰度值)的值和抑制率。

(2)铅试纸条检测体系 pH 的优化

配制 pH 为 5、6、7、8、9 的 10 ng/mL 铅标准液, 其余步骤及条件同汞试纸条检测体系 pH 优化一致。

1.4.6 标准曲线测定

(1)汞试纸条标准曲线的测定

在上述最适抗体添加量、试纸条参数、pH 情况下, 配制 0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 的汞标准溶液加至微孔中混匀, 将试纸条插入微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较 B/B_0 (其中 B 为 T/C, B_0 为 T_0/C_0)。

(2)铅试纸条标准曲线的测定

配制 0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 ng/mL 的铅标准溶液加至微孔中混匀, 其余步骤及条件同汞试纸条标准曲线的测定一致。

1.4.7 特异性测定

(1)汞试纸条特异性测定

用 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液配制质量浓度为 1 μg/mL 的铅、铁、铬、镍、砷、铜标准液和 10 ng/mL 的汞标准液, 以 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液为阴性对照。将试纸条插入微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较半数抑制率(half inhibition rate, IC_{50}), 计算交叉反应率。

(2)铅试纸条特异性测定

铅试纸条特异性测定: 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液配制质量浓度为 1 μg/mL 的铜、汞、铁、铬、镍、砷、镉标准液和 10 ng/mL 的铅标准液, 以 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液为阴性对照。其余步骤及条件同汞试纸条特异性的测定一致。

1.4.8 稳定性测定

试纸条的保质期通过试纸条在高温下烘烤加速老化进行模拟, 通过阿伦尼乌斯公式推断烘烤温度下试纸条对应的老化天数[21–23]。在上述最适抗体添加量、试纸条参数及检测体系 pH 条件下, 将试纸条置于 55 ℃烘箱中, 保存 20 d, 前 7 d 每天将试纸条插入添加 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液的微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较 T/C 的值。之后的 13 d 每隔 1 d, 按照相同方法对试纸条进行检测, 同时记录。

1.4.9 实际样的工作曲线

(1)样品前处理

重金属在芦笋中主要存在形式为水溶态[24]、与蛋白质及多糖等结合、以及难溶盐类, 主要分布于芦笋全株中[25–27]。样品前处理参考文献[28–29]并进行调整: 将芦笋烘干, 采用研磨机进行研磨并过筛, 加入样品提取液(0.2 g 氯化钠、2.0 g 胃蛋白酶、1 L 超纯水), 振荡 2 h, 离心取上清, 加入硝酸和高氯酸消解, 加热至干, 加入 PBS 缓冲液溶解, 得样品溶液。

(2)汞试纸条实际样工作曲线

汞试纸条的实际样工作曲线: 用 0.5 μmol/L EDTA·HBS 缓冲液将样品稀释一倍后, 配制质量浓度为 1、2、5、10、20、50、100、200 ng/mL 的阴性样品汞标准溶液。将试纸条插入微孔中, 反应 5 min 后, 取出, 平行测试 3 次, 拍照记录。用 ImageJ 1.54f 读数, 对比试纸条的 T 线灰度值和 C 线灰度值, 比较 B/B_0。

(3)铅试纸条实际样工作曲线

铅试纸条的实际样工作曲线: 配制质量浓度为 1、2、5、10、20、80、160、320 ng/mL 的阴性样品汞标准溶液。其余步骤及条件同汞试纸条实际样工作曲线测定一致。

1.5 数据处理

实验重复 3 次, 实验结果以平均值表示。试纸条结构示意图采用 Power Point 2021 绘制, 采用 Imagej 1.54f 软件读取 T 线及 C 线信号强度, 运用 Origin 2018 软件进行图像绘制, 本研究所有表格均采用 Word 2021 绘制。

2 结果与分析

2.1 乳胶微球的 TEM 表征结果

通过透射电镜对乳胶微球进行表征, 由图 2 可知, 乳胶微球的粒径均一, 表面光滑且呈现规则的球形, 对 TEM 形貌图进行统计分析, 得到乳胶微球的光学粒径约为 290 nm[30–33]。

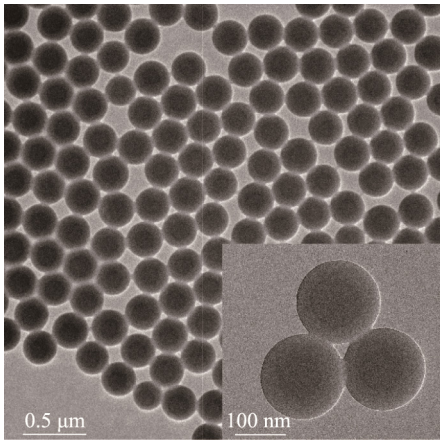


图 2 乳胶微球的 TEM 图

Fig.2 TEM image of latex microspheres

2.2　偶联抗体添加量优化结果

在探针制备过程中，抗体的投入量决定了探针表面的抗体数量以及生物活性，抗体添加量不足会降低抗原-抗体结合效率，而过量添加抗体会削弱抗原抗体间的竞争[34]。由图 3A 可知，随着抗体用量的增加，T_0 呈现先增后减，当抗体添加量为 40 μg/mL 时，T_0 达到最高；抑制率随抗体用量的增加而下降，推测过高的抗体用量增加了空间位阻。综合考虑选择 40 μg/mL 作为偶联汞抗体的最佳质量浓度。

由图 3B 可知，随着抗体用量的增加，T_0 呈现先增后减，当投入量为 40 μg/mL 的时候抑制率最佳，推测随着抗体用量不断增加，探针的生物活性也提升至最大值，并且 T 线灰度值与其他的偶联量的 T 线灰度值相比也较高。综合考虑选择选择 40 μg/mL 作为偶联铅抗体的最佳质量浓度。

2.3　试纸条参数优化结果

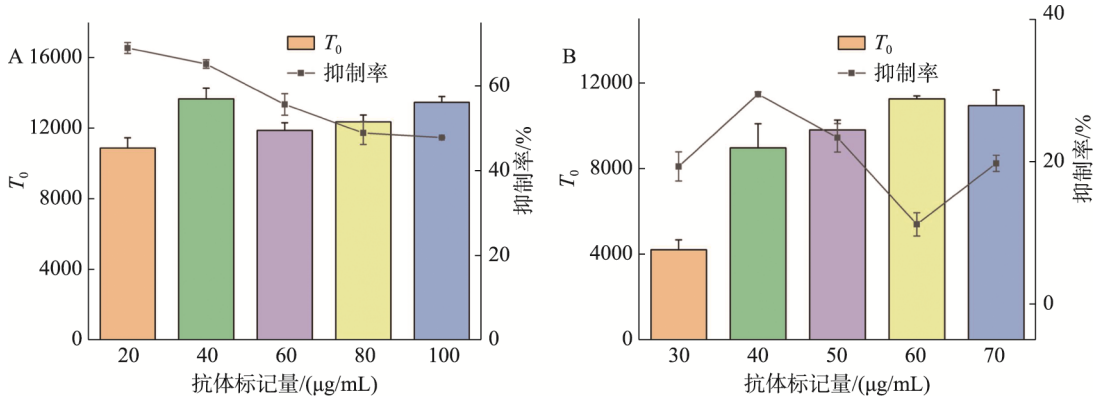
采用棋盘滴定法对探针用量与竞争抗原喷涂量两个因素进行优化，结果由表 1 可见，固定加入汞标准溶液的质量浓度为 50 ng/mL，当探针用量为 3 μL、包被原质量浓度为 0.5 mg/mL 时，T 线灰度值和 T/C 值均最低，同时抑制率最高。因此选择探针用量为 3 μL、包被原质量浓度为 0.5 mg/mL 作为汞试纸条最佳参数。

由表 2 可见，固定加入铅标准溶液的质量浓度为 10 ng/mL，当探针用量为 4 μL、包被原质量浓度为 0.5 mg/mL 时，T 线灰度值和 T/C 值均最低，同时抑制率最高。因此选择探针用量为 4 μL、包被原质量浓度为 0.5 mg/mL 作为铅试纸条最佳参数。

2.4　试纸条检测体系 pH 优化结果

在免疫层析过程中，pH 会影响抗体的空间构象，同时过高或者过低的 pH 会导致乳胶微球聚集。由图 4A 可见，当体系 pH 增大时，T_0/C_0 呈下降趋势，推测随着 pH 过高，微球表面电荷反转，发生聚集，导致层析受阻；抑制率在 pH 为 7 时达到最大，过酸环境下抗体的空间构象改变，亲和力下降，过碱环境下抗体发生变性，因此选择 pH 为 7 时，作为最适 pH。

由图 4B 可见，当体系 pH 增大时，T_0/C_0 呈先上升后下降趋势，抑制率在 pH 为 6 时达到最大，因此选择 pH 为 6 时，作为最适 pH。



注：A. 重金属汞；B. 重金属铅；抑制率/%=(1–B/B_0)×100%。图 4、7 同。

图 3　抗体标记量优化结果

Fig.3　Results of optimized antibody labeling quantity

表 1　棋盘滴定实验优化汞试纸条 T 线包被原质量浓度与探针用量结果

Table 1　Results of optimizing the original mass concentration of T-line coated mercury test paper strips and probe dosage in the chessboard titration experiment

编号	探针用量/μL	包被原质量浓度/(mg/mL)	T 线灰度值	T/C	抑制率/%
NO.1	5	0.5	7187±655	0.60±0.09	39.4
NO.2		0.6	7836±226	0.83±0.02	32.4
NO.3		0.7	7834±702	0.86±0.08	31.2
NO.4	4	0.5	4296±75	0.39±0.03	62.5
NO.5		0.6	6180±253	0.65±0.05	43.7
NO.6		0.7	8352±335	0.88±0.04	30.9
NO.7	3	0.5	3393±380	0.31±0.04	68.0
NO.8		0.6	5406±682	0.60±0.09	44.9
NO.9		0.7	5580±50	0.64±0.03	43.9

表 2 棋盘滴定实验优化铅试纸条 T 线包被原浓度与探针用量结果

Table 2 Results of optimizing the original mass concentration of T-line coated lead test paper strips and probe dosage in the chessboard titration experiment

编号	探针用量/μL	包被原质量浓度/(mg/mL)	T 线灰度值	T/C	抑制率/%
NO.1	4	0.4	3853±789	0.35±0.06	80.9
NO.2		0.5	3900±309	0.33±0.03	87.4
NO.3		0.6	4770±382	0.38±0.03	86.4
NO.4	5	0.4	3988±143	0.31±0.01	85.9
NO.5		0.5	4496±224	0.35±0.02	85.7
NO.6		0.6	5208±173	0.39±0.01	85.7
NO.7	6	0.4	4260±842	0.39±0.07	86.1
NO.8		0.5	4489±224	0.41±0.02	83.2
NO.9		0.6	5322±965	0.43±0.06	84.3

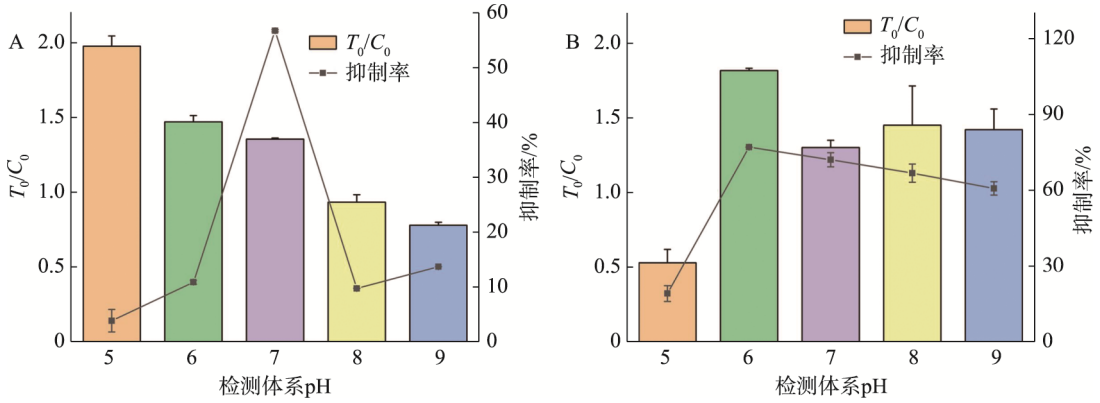


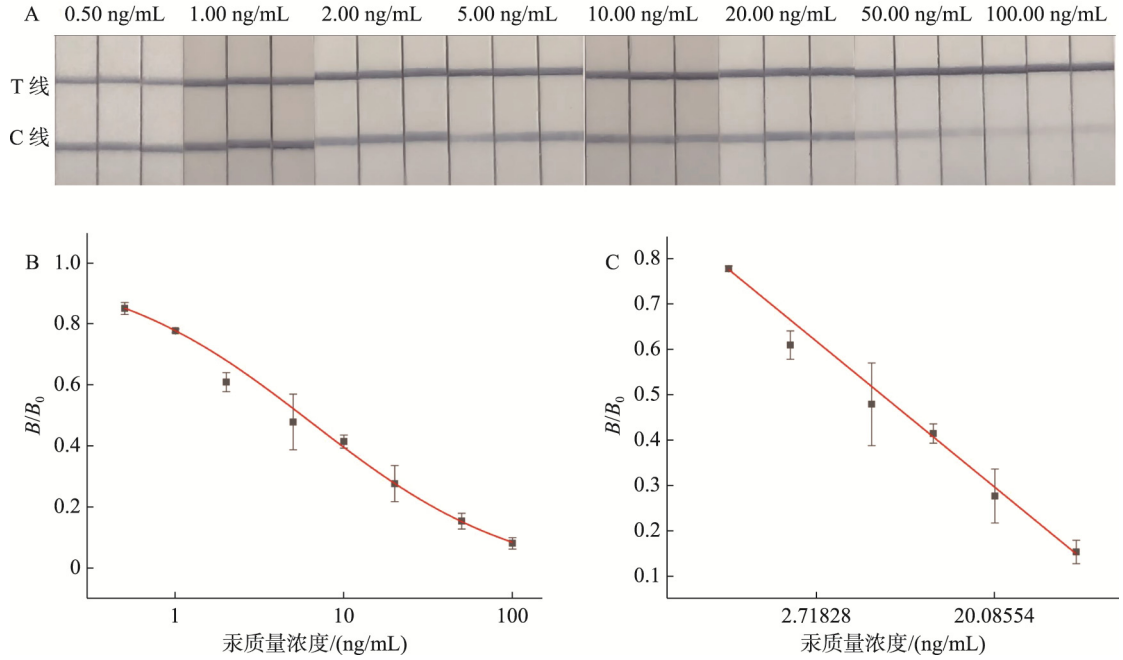
图 4 检测体系 pH 优化结果

Fig.4 Results of optimized pH detection system

2.5 标准曲线测定结果

在 40 μL 抗体添加量，探针添加量 3 μL，C 线浓度为 0.5 mg/mL，试纸条检测 pH 为 7 的最佳条件下，对 0、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、50.0、100.0 ng/mL 的汞标准溶液进行检测。如图 5 所示，随着汞的加标浓度逐步升高，试纸条的 T 线梯度变浅，显色变化与汞浓度有良好的剂量依赖关系。T/C 也逐渐降低，最终导致 B/B_0 逐渐减小，以汞的质量浓度为横坐标(X，ng/mL)、B/B_0 为纵坐标(Y)绘制曲线。汞免疫试纸条的四参数方程为 $Y=-0.05+1.04/[1+(X/6.44)^{0.70}]$，相关系数为 0.9985，当汞质量浓度为 1.00~50.00 ng/mL 时，与 B/B_0 呈现较好的线性关系 $Y=-0.1604\ \mathrm{Ln}(X)+0.7765$，相关系数为 0.9978，最低检出限(limit of detection, LOD，以抑制率达到 10%时待测物的浓度表示[35–38])为 0.28 ng/mL，IC_{50} 为 5.60 ng/mL，定量范围为 1.00~50.00 ng/mL。该试纸条对汞具有较高灵敏度，能够对汞离子具有较强的特异性识别和良好的免疫抑制效应，1.00~50.00 ng/mL 的定量范围能够覆盖实际样品中汞的常见污染浓度水平，能够满足实际样品中汞残留的快速定量检测需求。

在 40 μL 抗体添加量，探针添加量 4 μL，C 线质量浓度为 0.5 mg/mL，试纸条检测 pH 为 6 的最佳条件下，对 0、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00、10.00、20.00、40.00 ng/mL 的铅标准溶液进行检测。如图 6 所示，铅免疫试纸条的四参数方程为 $Y=1.00-0.003/[1+(X/2.15)^{1.10}]$，相关系数为 0.9981，当铅质量浓度为 0.10~10.00 ng/mL 时，与 B/B_0 呈现较好的线性关系 $Y=-0.1692\ \mathrm{Ln}(X)+0.5362$，相关系数为 0.9824，LOD 为 0.29 ng/mL，IC_{50} 为 2.15 ng/mL，定量范围为 0.10~10.00 ng/mL。以上结果表明，该试纸条对铅具有高灵敏度，检测最低浓度低至 0.10 ng/mL，且试纸条四参数方程的相关系数高达 0.9981，数据可靠性强，能够用于该区间内铅的定量检测。



注: A. 免疫层析试纸条实物图; B. 四参数拟合曲线; C. 定量曲线，图 6、8~9 同。

图 5　汞乳胶微球免疫层析试纸条的工作曲线

Fig.5　Working curve of mercury latex microsphere immunoassay test strips

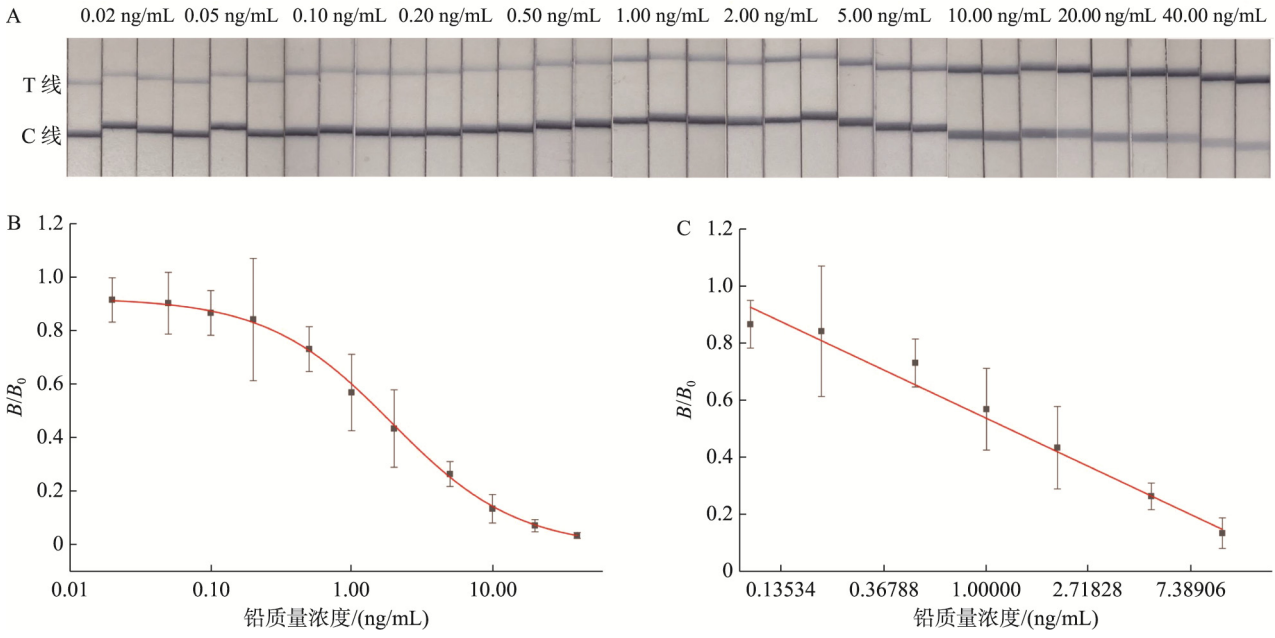


图 6　铅乳胶微球免疫层析试纸条的工作曲线

Fig.6　Working curve of lead latex microsphere immunoassay test strips

2.6　特异性测定结果

利用试纸条分别检测 1.0 μg/mL 的铅、铁、铬、镍、砷、铜标准液，每个样本重复 3 次，同时记录 T/C 及 T_0/C_0，进行比较。得到不同重金属的 IC_{50}，并计算交叉反应率。结果如表 3 可见，汞免疫层析试纸条与重金属铅、铁、铬、镍、砷、铜的 IC_{50} 均大于 1.0 ng/mL，交叉反应率小于 1.1%，说明该试纸条的特异性好。

利用试纸条分别检测 1.0 μg/mL 的铜、汞、铁、铬、镍、砷、镉标准液，如表 3 可见，铅免疫层析试纸条与重金属汞、铁、铬、镍、砷、铜的 IC_{50} 均大于 1.0 ng/mL，交

叉反应率小于 0.2%，说明该试纸条的特异性好。

表 3 乳胶微球试纸条特异性测定结果

Table 3 Specificity test results for latex microsphere test strips

重金属	重金属汞的特异性测定		重金属铅的特异性测定	
	IC_{50}/(ng/mL)	交叉反应率/%	IC_{50}/(ng/mL)	交叉反应率/%
汞	10.87	100	>1000	<0.2
铅	>1000	<1.087	2.13	100
铁	>1000	<1.087	>1000	<0.2
铬	>1000	<1.087	>1000	<0.2
镍	>1000	<1.087	>1000	<0.2
砷	>1000	<1.087	>1000	<0.2
铜	>1000	<1.087	>1000	<0.2

2.7 稳定性测定结果

随着试纸条的存放时间变长，试纸条表面 NC 膜，会吸收空气中的水分，导致膜溶胀、孔径变大[39–41]，氧气会引发抗体的氧化反应，破坏活性位点。图 7A 可知，前 15 d 的加速老化试验中，重金属汞免疫层析试纸条的 T/C 值保持较为稳定，根据阿伦尼乌斯公式推算试纸条在常温保存时，保质期一年以上。同理，如图 7B 所示，根据阿伦尼乌斯公式计算可得重金属铅试纸条保质期至少可达一年以上。

2.8 实际样品检测结果

如图 8 可见，汞免疫试纸条四参数拟合方程为 $Y=0.23+0.77/[1+(X/11.14)^{1.09}]$，相关系数为 0.9993，当汞质量浓度为 5.00~100.00 ng/mL 时，呈现良好的线性关系 $Y=-0.16\ \mathrm{Ln}(X)+0.98$，LOD 为 1.96 ng/mL，$IC_{50}$ 是 20.62 ng/mL，定量范围为 5.00~100.00 ng/mL。

如图 9 可见，铅免疫试纸条四参数拟合方程为 $Y=-0.05+1.05/[1+(X/6.44)^{0.70}]$，相关系数为 0.9970，当铅质量浓度为 1.00~80.00 ng/mL 时，呈良好的线性关系 $Y=-0.16\ \mathrm{Ln}(X)+0.78$，LOD 为 0.28 ng/mL，$IC_{50}$ 是 6.44 ng/mL，定量范围为 0.90~46.19 ng/mL。

综上，汞、铅两种免疫试纸条拟合度高、线性关系良好，具备良好的灵敏度和定量检测能力，可实现芦笋样品中汞、铅的快速定量检测。

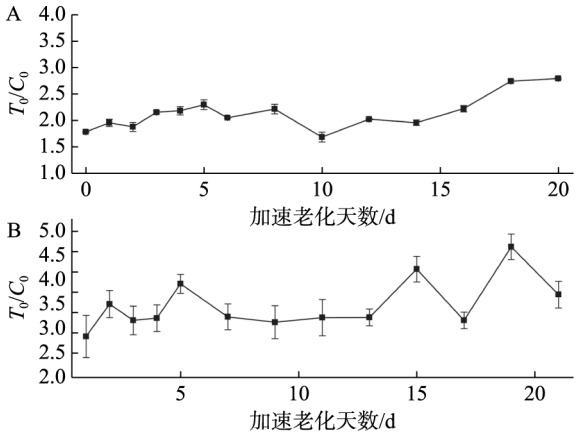


图 7 免疫试纸条老化实验结果图

Fig.7 Chart of immunological test strip aging experiment results

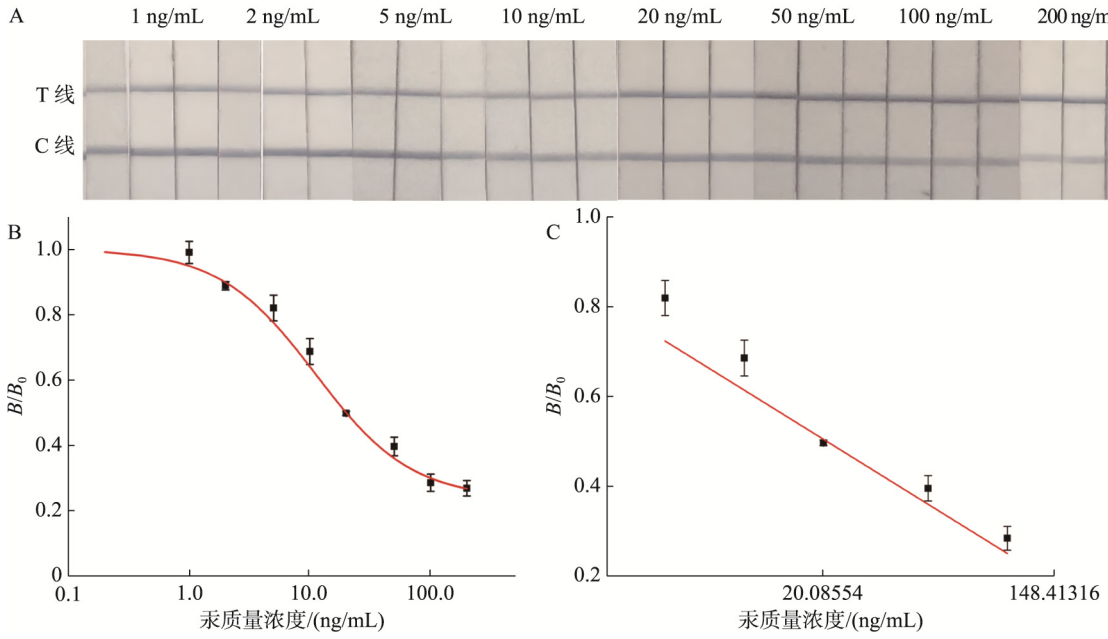


图 8 汞乳胶微球免疫层析试纸条的实际样工作曲线

Fig.8 Actual sample working curve for mercury latex microsphere immunoassay test strips

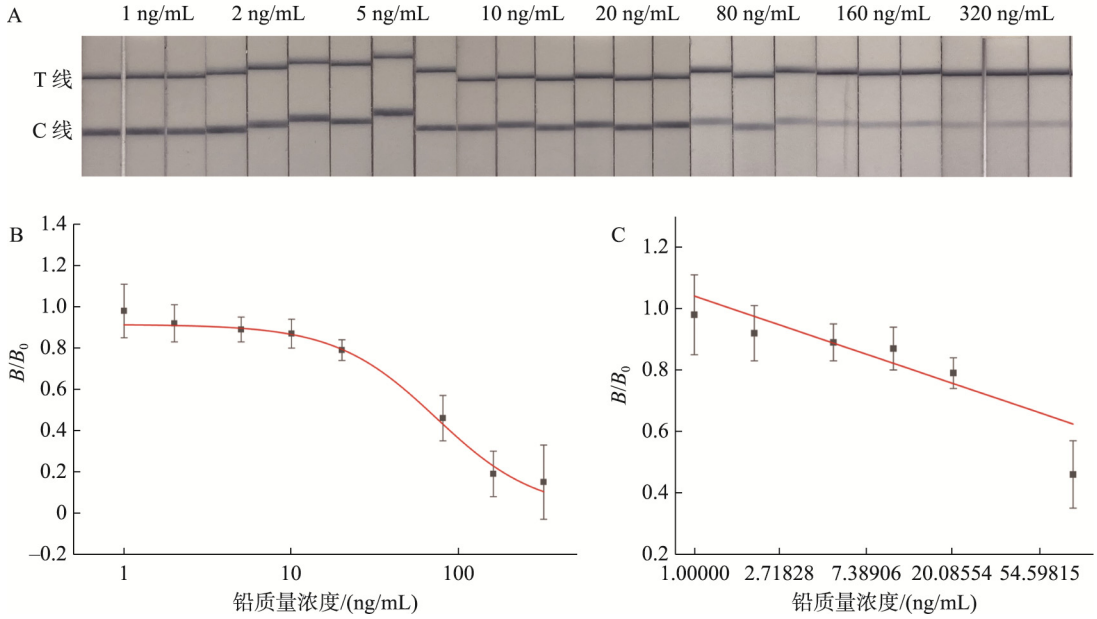


图 9　铅乳胶微球免疫层析试纸条的实际样工作曲线

Fig.9　Actual sample working curve for lead latex microsphere immunoassay test strips

2.9　与其他方法学比较

与表 4 所列举文献相比，本研究所建立的检测重金属汞、铅离子的乳胶微球免疫层析方法，相较于同类免疫层析法及电感耦合等离子体-质谱法，展现出更优的检测灵敏度；原子吸收光谱法对汞离子的最低检测限虽低于本研究所制备的试纸条，但其检测过程需专业人员操作，并依赖精密仪器，在检测便捷性上存在问题。

表 4　与其他重金属汞/铅免疫分析方法对比

Table 4　Comparison with some recent literatures on heavy mental mercury/lead immunoassay

检测方法	检测对象	LODs/(ng/mL)	IC_{50}/(ng/mL)	参考文献
免疫层析法	汞	100	-	[17]
免疫层析法	铅	6	-	[18]
电感耦合等离子体-质谱法	汞	37.33	-	[42]
电感耦合等离子体-质谱法	铅	0.64	-	[43]
冷原子吸收光谱法	汞	0.06	-	[44]
原子吸收光谱法	铅	0.3	0.3~88.8	[45]

3　结　论

本研究基于间接免疫竞争原理，建立了一种用于检测芦笋样品中重金属汞及铅残留的快速检测方法，免疫探针质量直接影响免疫层析试纸条的灵敏度，本研究设计优化了乳胶微球免疫探针的制备过程，确定了最佳检测条件：抗体投入量为 40 μg/mL；试纸条包被原浓度为 0.5 mg/mL；汞乳胶微球的探针用量为 3 μL；铅乳胶微球的探针用量为 4 μL；汞乳胶微球的检测缓冲液最佳 pH 为 7；铅乳胶微球的检测缓冲液 pH 为 6。所建立方法检测重金属汞离子的 LOD 为 0.28 ng/mL，IC_{50} 为 5.60 ng/mL，检测重金属铅离子的 LOD 为 0.29 ng/mL，IC_{50} 为 2.15 ng/mL。将该方法应用于芦笋的实际样品检测中，对芦笋样品中重金属汞的 LOD 为 1.96 ng/mL，IC_{50} 为 20.62 ng/mL，定量范围为 5.00~100.00 ng/mL，对重金属铅的 LOD 为 0.28 ng/mL，IC_{50} 是 6.44 ng/mL，定量范围为 0.90~46.19 ng/mL。综上所述，本研究建立了基于乳胶微球的重金属汞和铅免疫层析试纸条，可实现重金属汞及铅离子的定量可视化检测，具有操作简单、灵敏度高、检测时间短等优点，能够满足现场高通量检测需求，适用于基层检测机构及个人的现场初筛。

参考文献

[1] Orr S E, Barnes M C, Joshee L, et al. Potential mechanisms of cellular injury following exposure to a physiologically relevant species of inorganic mercury [J]. Toxicology Letters, 2019, 304: 13–20.

[2] Park H, Oh E T, Park J, et al. Real-time detection of methylmercury and Hg(II) using a reversible ratiometric fluorescent probe in cellular and

aqueous environments [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(11): 5982–5991.

[3] Saisree S, Nair A S, Dais E, et al. Electrochemical sensors for monitoring water quality: recent advances in graphene quantum dot-based materials for the detection of toxic heavy metal ions Cd(II), Pb(II) and Hg(II) with their mechanistic aspects [J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2025, 13(3): 116545.

[4] Kjellström T, Nordberg G F. A kinetic model of cadmium metabolism in the human being [J]. Environmental Research, 1978, 16(1–3): 248–269.

[5] Chitrakar B, Min Z, Adhikari B. *Asparagus* (*Asparagus officinalis*): processing effect on nutritional and phytochemical composition of spear and hard-stem byproducts [J]. Trends in Food Science & Technology, 2019, 93: 1–11.

[6] Zhang Qiuhong, Li Min, Dou Chuanhao, et al. Exploring the feasibility of multi-element fingerprinting with chemometrics for discriminating the geographical origins of *Asparagus* and its risk assessment [J]. Food Chemistry, 2025, 495(Pt 1): 146395.

[7] Liu Xingmei, Song Qiujin, Tang Yu, et al. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: a multi-medium analysis [J]. Science of the Total Environment, 2013, 463–464: 530–540.

[8] Chirita L, Covaci E, Ponta M, et al. Mercury determination in various environmental, food and material complex matrices using unified operating conditions for a cold vapor generation high-resolution continuum source quartz tube atomic absorption spectrometry method [J]. Analytical Methods, 2023, 15(45): 6294–6301.

[9] Szeredai B D, Frentiu T, Muntean N, et al. High-resolution continuum source quartz tube atomic absorption spectrometry for the determination of As, Sb, Bi, Hg, Se and Te in food and environmental matrices after chemical vapor generation [J]. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2025, 40(4): 942–953.

[10] Jamali M R, Khaleghi-Gorji S, Rahnama R. Assessment of *in situ* sorbent formation solid-phase extraction for the determination of cadmium in natural water samples and plant leaves by flame atomic absorption spectrometry [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2025, 80(8): 1445–1453.

[11] Narukawa T, Okabayashi S, Tsuboi M, et al. Combination of isotope dilution with liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous monitoring and evaluation of cadmium and inorganic arsenic in polished rice [J]. Analytical Methods, 2024, 16(10): 1523–1530.

[12] Zhang Hongxing, Rui Yukui. Determination of trace elements, heavy metals and rare earth elements in corn seeds from Beijing by ICP-MS simultaneously [J]. Journal of Chemistry, 2011, 8(2): 782–786.

[13] Yang Jianzhou, Fu Yangang, Gong Qiuli, et al. Contamination assessment, source apportionment and associated health risks of PTEs in agricultural soil under five land-use patterns in Sanya, China [J]. China Geology, 2024, 7(3): 469–479.

[14] Aslani R, Shavali-Gilani P, Bakhtiyari A, et al. Determination and health risk assessment of heavy metals in some canned food in Tehran, Iran [J]. Biological Trace Element Research, 2026, 204(2): 1130–1140.

[15] Kia S A, Aslani R, Khaniki G J, et al. Determination and health risk assessment of heavy metals in chicken meat and edible giblets in Tehran, Iran [J]. Journal of Trace Elements and Minerals, 2024, 7: 100117.

[16] Poopak H, Raeeszadeh M, Salimi B. Accumulation of heavy metals in meat and their relationship with water and food intake of aquatic animals in Kermanshah, western Iran [J]. International Journal of Environmental Health Research, 2024, 34(3): 1453–1465.

[17] 王玉珍, 温雅琼, 陈泽忠, 等. 汞离子胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(11): 107–112.
Wang Yuzhen, Wen Yaqiong, Chen Zezhong, et al. An immunochromatographic assay for rapid and direct detection of Hg^{2+} in water samples [J]. Journal of Southwest University (Natural Science), 2017, 39(11): 107–112.

[18] 李杨阳, 曲文莉, 杨庆, 等. 铅胶体金免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 Yangyang, Qu Wenli, Yang Qing, et al. Development of lead ions immuno-colloidal gold chromatographic test strip and its application in *Procambarus clarkii* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2022, 13(8): 2413–2418.

[19] Mao Xun, Wang Wei, Du Tinge. Dry-reagent nucleic acid biosensor based on blue dye doped latex beads and lateral flow strip [J]. Talanta, 2013, 114: 248–253.

[20] 贾博涵, 张琳, 陈耀, 等. 环介导等温扩增技术结合乳胶微球试纸条检测副溶血性弧菌[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(1): 74–84.
Jia Bohan, Zhang Lin, Chen Yao, et al. Detection of *Vibrio* parahaemolyticus using loop-mediated isothermal amplification combined with latex microsphere test strips [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(1): 74–84.

[21] 王琳, 石鑫泰, 石正旺, 等. 猪伪狂犬病病毒 gB 抗体检测的胶体金免疫层析试纸条研制[J]. 生物工程学报, 2026, 42(4): 1745–1754.
Wang Lin, Shi Xintai, Shi Zhengwang, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic test strip for detecting gB antibodies of porcine pseudorabies virus [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(4): 1745–1754.

[22] 杨继飞, 潘蓓珍, 刘岩, 等. 蜡样芽孢杆菌 *cytK* 和 *nhe* 毒素基因双重核酸试纸条快速检测方法的建立及其评价[J]. 吉林大学学报(医学版), 2025, 51(2): 516–525.
Yang Jifei, Pan Beizhen, Liu Yan, et al. Establishment and evaluation of method for rapid detection of *Bacillus cereus cytK* and *nhe* toxin genes by dual nucleic acid test strips [J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2025, 51(2): 516–525.

[23] Justo C A C, Jauset-Rubio M, Skouridou V, et al. Development of a protein-free nucleic acid lateral flow assay for *Trichomonas vaginalis* [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97(28): 15093–15103.

[24] 关云静, 周林燕, 毕金峰, 等. 绿芦笋不同部位营养成分及活性评价研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 343–347.
Guan Yunjing, Zhou Linyan, Bi Jinfeng, et al. Evaluation of nutritive composition and antioxidant activity in different parts of green *Asparagus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(5): 343–347.

[25] Wang Zhen, Bao Jianguo, Wang Tong, et al. Hazardous heavy metals accumulation and health risk assessment of different vegetable species in contaminated soils from a typical mining city, Central China [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(5): 2617.

[26] Conversa G, Miedico O, Chiaravalle A E, et al. Heavy metal contents in green spears of *Asparagus* (*Asparagus officinalis* L.) grown in Southern

Italy: variability among farms, genotypes and effect of soil mycorrhizal inoculation [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 256: 108559.

[27] Ma Xiaolei, Duan Duomo, Ji Yansu, et al. Structural analysis and flocculation performance of ASP-1: a polysaccharide bioflocculant from *Asparagus* root waste [J]. Industrial Crops and Products, 2025, 235: 121805.

[28] Xu Naifeng, Zhang Hongxia, Jia Jingze, et al. Assessment of contents and health impacts of four metals in Chongming *Asparagus*-geographical and seasonal aspects [J]. Foods, 2022, 11(5): 624.

[29] Zhu Zhanwang, Jia Jingze, Xu Naifeng, et al. Comparative analysis of three immunochromatographic test strips for rapid detection of cadmium ion in *Asparagus* [J]. International Journal of Food Science & Technology, 2023, 58(12): 6598–6608.

[30] Wang Jie, Fu Wangzhuo, Ma Xuezhen, et al. Development of latex microsphere-based immunochromatographic strips for detecting key aflatoxins [J]. Toxins, 2025, 17(9): 426.

[31] Wang Yunpeng, Dai Xiaoru, Wang Songle, et al. Procion red dye chemically bonded PGMA microspheres towards leakage free and sensitivity improved lateral flow immunoassay [J]. Materials Advances, 2025, 6(12): 4016–4026.

[32] Dong Tao, Sun Guangze, Yang Zhonghuang, et al. Sensitive dual-channel lateral flow immunoassay tagged with high brightness latex microsphere for simultaneous detection of respiratory viral antigens [J]. Chemical Engineering Journal, 2024, 497: 154826.

[33] Tabilin E J, Gordon C A, Mu Yi, et al. Development of a latex microsphere-based lateral flow immunoassay for the diagnosis of schistosomiasis Japonica [J]. PLoS Neglected Tropical Diseases, 2024, 18(12): e0012742.

[34] 曹舒洁, 曹慧, 徐斐, 等. 基于量子点荧光微球的噻虫嗪快速定量免疫层析试纸条的研制[J]. 分析试验室, 2023, 42(5): 646–651.
Cao Shujie, Cao Hui, Xu Fei, et al. Preparation of rapid quantitative immunochromatographic strip for the deter-mination of thiamethoxam based on quantum dot fluorescent microspheres [J]. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2023, 42(5): 646–651.

[35] 邹淑珍. 汞、铬、铅三种重金属免疫快速检测方法的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017, 33–40.
Zou Shuzhen. Development of rapid immunoassay for Hg Cr and Pb [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017, 33–40.

[36] 邢广旭, 邢云瑞, 孙亚宁, 等. 玉米赤霉烯酮荧光免疫层析快速检测方法的研究[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(8): 105–109.
Xing Guangxu, Xing Yunrui, Sun Yaning, et al. Development of fluorescence immunochromatographic assay for the determination of ZEN [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(8): 105–109.

[37] 陈发荣, 韩琰旭, 吴月皓, 等. 检测花生油中黄曲霉毒素 B_1 免疫胶体碳层析试纸条的制备[J]. 粮食与油脂, 2022, 35(10): 146–149, 158.
Chen Farong, Han Yanxu, Wu Yuehao, et al. Preparation of immunocolloidal carbon chromatographic strips for detection of aflatoxin B^1 in peanut oil [J]. Cereals & Oils, 2022, 35(10): 146–149, 158.

[38] 孙燕燕, 李昕, 林密, 等. Pt-Pd 合金纳米颗粒标记口蹄疫 A 型病毒抗体检测的免疫层析方法[J]. 中国农业科学, 2021, 54(3): 653–661.
Sun Yanyan, Li Xin, Lin Mi, et al. Establishment of a novel immunochromatographic assay based on foot-and-mouth disease virus serotype a labeled by Pt-Pd bimetal nanoparticles [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(3): 653–661.

[39] Toley B J, Kaur N, Kaimal M. Effect of storage conditions on the performance of nitrocellulose test strips used in lateral flow assays [J]. ChemRxiv, 2021. https: //doi.org/10.26434/chemrxiv-2021-4xjh5.

[40] Chen Jiawei, Zhang Gan, Xiao Xiaoyue, et al. Bifunctional bovine serum albumin modification driven sensitivity-enhanced lateral flow immunoassay for small molecule hazards monitoring in food [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 282(Pt 3): 136915.

[41] Way C, Hudson M D, Williams I D, et al. Evidence of underestimation in microplastic research: a meta-analysis of recovery rate studies [J]. Science of the Total Environment, 2022, 805: 150227.

[42] Anil A S, Alam S, Thakur L K. Optimized mercury speciation analysis using LC-ICP-MS and microwave assisted extraction for precise determination of methylmercury in fish, rice and soil [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2024, 129: 106092.

[43] Kwon S Y, Kim Y I, Kim Y K, et al. Microwave-assisted sample preparation for screening of heavy metal elements in food additives by ICP-MS [J]. LWT, 2024, 208: 116708.

[44] Qin Pinzhu, Cai Ziyu, Wei Cuilan, et al. Comparative study of two common methods for the determination of total mercury in soil [J]. Royal Society Open Science, 2025, 12(2): 240757.

[45] Schlotthauer J, Mántaras L, Brusa L, et al. A robust method for the determination of lead in water samples using flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry [J]. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2024, 212: 106851.

(责任编辑: 曹岱琳　蔡世佳)