DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260115003
引用格式: 李轲, 乔香君, 张淑霞, 等. 量子点荧光法检测粮油作物及坚果中赭曲霉毒素 A 系统开发及性能评价[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 13–21.
Li Ke, Qiao Xiangjun, Zhang Shuxia, et al. Development and performance evaluation of quantum dot fluorescence system for detection of ochratoxin A in grain and oil crops nuts [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 13–21. (in Chinese with English abstract).

量子点荧光法检测粮油作物及坚果中赭曲霉毒素 A 系统开发及性能评价

李 轲[1*], 乔香君[2], 张淑霞[1], 巴哈提古丽·马那提拜[3], 苗小星[1], 郑 悦[1]

(1. 郑州海关技术中心, 郑州 450003; 2. 郑州航空港经济综合实验区口岸业务综合服务中心, 郑州 451162; 3. 乌鲁木齐海关技术中心, 乌鲁木齐 830063)

摘 要: 目的 开发量子点荧光法快速定量检测粮油作物及坚果中赭曲霉毒素 A 的方法。**方法** 采用聚苯乙烯微球量子点负载技术, 通过共价偶联构建了具有高荧光强度的量子点微球探针, 并采用活化偶联法将赭曲霉毒素 A 单克隆抗体偶联至探针表面, 构建出赭曲霉毒素 A 量子检测体系。**结果** 通过实验参数优化, 所建立的量子点荧光检测体系对赭曲霉毒素 A 表现出优异的分析性能, 在 1~20 ng/mL 范围内线性关系良好(r^2>0.99), 检出限与定量限分别低至 0.5 ng/mL 和 2.0 ng/mL; 该方法特异性强, 与呕吐毒素、玉米赤霉烯酮等常见真菌毒素无显著交叉反应; 依据 LS/T 6142—2023《粮食真菌毒素快速检测方法性能评价》标准进行方法学验证, 加标回收率在 90.3%~114.5%范围, 相对标准偏差小于 15%, 准确度与精密度均符合赭曲霉毒素 A 检测规范要求。**结论** 本研究构建的赭曲霉毒素 A 量子点荧光检测系统具有灵敏度高、特异性好、操作简便、分析快速, 适用于粮油作物及坚果中赭曲霉毒素 A 的快速、准确定量, 为农产品真菌毒素的现场筛查与监测提供了有效技术手段。

关键词: 赭曲霉毒素 A; 量子点荧光法; 粮油作物; 坚果
中图分类号: TS207.3 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0013–09

Development and performance evaluation of quantum dot fluorescence system for detection of ochratoxin A in grain, oil crops and nuts

LI Ke[1*], QIAO Xiang-Jun[2], ZHANG Shu-Xia[1], BAHATIGULI Ma-Na-Ti-Bai[3], MIAO Xiao-Xing[1], ZHENG Yue[1]

(1. *Technical Center of Zhengzhou Customs District*, *Zhengzhou* 450003, *China*; 2. *Port Business Service Center of Zhengzhou Airport Economic Comprehensive Experimental Zone*, *Zhengzhou* 451162, *China*; 3. *Urumqi Customs Technical Center*, *Urumqi* 830063, *China*)

收稿日期: 2026-01-15
基金项目: 海关总署 2024 年度科研项目(2024HK020); 海关总署 2024 年度科研项目(2024HK133); 新疆维吾尔自治区少数民族特殊培养计划项目(2023D03002)

第一作者/*通信作者: 李轲(1976—), 女, 硕士, 正高级兽医师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: like77312@163.com

ABSTRACT: Objective To develop a method for the rapid quantitative detection of ochratoxin A in grain, oil crops and nuts by quantum dot fluorescence. **Methods** Using polystyrene microsphere quantum dot loading technology, a quantum dot microsphere probe with high fluorescence intensity was constructed by covalent coupling, ochratoxin A monoclonal antibody was coupled to the probe surface by activation coupling method, and the quantum detection system of ochratoxin A was constructed. **Results** Through the optimization of experimental parameters, the established quantum dot fluorescence detection system showed excellent analytical performance for ochratoxin A. The linear relationship was good in the range of 1–20 ng/mL (r^2>0.99), and the limits of detection and limits of quantitation were as low as 0.5 ng/mL and 2.0 ng/mL. The method had strong specificity, there was not significant cross reaction with common mycotoxins such as deoxynivalenol and zearalenone. The method was validated by methodology according to the standard of LS/T 6142—2023 *Evaluation protocol for rapid detection method of mycotoxins in grains*, spiked recovery rates were 90.3%–114.5%, and the relative standard deviation was less than 15%, the method of accuracy and precision met the requirements of the detection specification about ochratoxin A. **Conclusion** The quantum dot fluorescence detection system for ochratoxin A has the advantages of high sensitivity, good specificity, simple operation and rapid analysis, it is suitable for rapid and accurate quantitative detection of ochratoxin A in grain, oil crops and nuts, it provides an effective technical means for the field screening and monitoring of mycotoxins in agricultural products.

KEY WORDS: ochratoxin A; quantum dot fluorescence method; grain and oil crops; nuts

0 引 言

赭曲霉毒素 A (ochratoxin A, OTA)是由丝状真菌赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)产生的一种关键次生代谢产物[1–3], 其产毒量高、污染广泛、性质稳定, 不易被代谢降解。由于赭曲霉在自然界中广泛存在, 导致 OTA 广泛分布于各种动植物源性食品中, 其中粮油作物、坚果及动物肝脏、血液等污染最为严重且风险突出[4–5]。该毒素具有神经毒性、免疫毒性, 损伤人类和动物的肝脏、肾脏, 并有致畸、致癌、致突变危害[6–8], 已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)评估为II(B)类人类可能致癌物[9–11], 对食品安全和公众健康构成严重威胁。

为有效管控 OTA 污染水平, 全球主要监管机构及国家/地区已建立起严格的限量标准体系, 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)基于风险评估, 确立了人类每日可耐受摄入量(tolerable daily intake, TDI), 规定每千克体重 OTA 单日最大摄入量不得超过 16 ng[12–13]; 国际食品法典委员会(Codex Alimentarius Commission, CAC)针对未加工谷物(如大麦、小麦、黑麦)设定了统一的 OTA 最大限量标准为 5.0 μg/kg; 欧洲联盟(European Union, EU)则实施了更为精细化的分类管控, 对多达 20 类食品制定了严苛的 OTA 残留限量: 其中, 未加工谷物及速溶咖啡限值为 5.0 μg/kg; 面向最终消费者的成品及烘焙咖啡限值为 3.0 μg/kg; 葡萄酒限值为 2.0 μg/kg; 而婴幼儿特殊医学用途食品、婴儿食品及婴幼儿谷物加工食品的限值最为严格, 不得超过 0.5 μg/kg[14–15]; 瑞士在饲料安全领域也制定了相应标准, 规定猪、禽饲料中 OTA 检出量分别不得超过 200 μg/kg 和 1000 μg/kg[16]; 韩国与澳门地区亦将谷物(韩国)及豆类、发酵豆制品(澳门)中的 OTA 限量标准设定为 5.0 μg/kg; 我国对此高度重视, 在强制性标准 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》中明确规定: 谷物、豆类及其制品中 OTA 的最大允许限量同样为 5.0 μg/kg。

为保障食品安全并满足全球日益严格的 OTA 监管限量要求, 研究者开发了多种 OTA 检测技术, 主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[17–18]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)[19–20]、薄层色谱法(thin-layer chromatography, TLC)[21–22]、酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)[23]、适配体技术[24–25]、免疫层析技术[26–27]等。HPLC、LC-MS/MS 方法目前最常用, 适用于复杂基质样品的高精度定量分析, 但操作流程烦琐, 检测周期长, 仪器成本及维护费用较高[28], 很难满足现场快速检测的要求; TLC 仅能实现初步定性分析且灵敏度低、精确性差, 且用到大量有害的有机溶剂[29]; ELISA 操作简单, 抗体交叉反应导致特异性不足, 假阳性风险较高[30]; 适配体技术筛选过程复杂耗时, 成功率受靶标性质、文库设计及筛选策略影响很大[31]; 免疫层析技术基于抗原-抗体竞争抑制结合机制, 实现 OTA 的定性与半定量分析[32], 操作简单, 经济高效, 适合大批量样本的现场快速筛查, 但检测灵敏度高度依赖标记材料的性能, 传统标记材料存在稳定性差、信号强度不均等问题, 制约定量准确性。

量子点作为革新性的半导体纳米晶材料, 具有激发波长宽、光学稳定性好、发射波长窄等特点[33–35], 但其作为标记物应用于免疫层析方法, 还面临着一系列从材料本

身到检测性能的挑战, 比如荧光信号强度不足、生物偶联效率不高等。为进一步突破单一量子点的性能极限, 本研究探索使用聚苯乙烯(polystyrene, PS)微球量子点负载技术, 通过共价键将量子点固定在已功能化的 PS 微球表面, 制备出新型高荧光量子点微球(quantum dot nanobeads, QBs)探针, 开发高灵敏度 OTA 量子点检测系统, 并依据 LS/T 6142—2023《粮食真菌毒素快速检测方法性能评价》, 对其性能进行评价, 旨在探索基于量子点标记技术的粮油作物及坚果 OTA 现场快速定量检测方法, 为量子点在农产品安全检测领域的深入应用提供重要的理论依据和数据支撑。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

小麦、芝麻、稻米、开心果、玉米、腰果、花生、大豆、核桃为市售样品。

OTA、赭曲霉毒素 B (ochratoxin B, OTB)、赭曲霉毒素 C (ochratoxin B, OTC)、玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)(质量浓度 100 μg/mL)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)(质量浓度 1000 μg/mL)、伏马霉素 B_1 (fumonisin B_1, FB_1)标准品(质量浓度 10 mg/L)(坛墨质检科技股份有限公司); 黄曲霉毒素 B_1 (aflatoxin B_1, AFB_1)、黄曲霉毒素 B_2 (aflatoxin B_2, AFB_2)、黄曲霉毒素 G_1 (aflatoxin G_1, AFG_1)、单端孢霉烯族毒素(trichothecene toxins, T-2)标准品(质量浓度 100 μg/mL)(上海安谱璀世标准技术服务有限公司); 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)、单甲氧基聚乙二醇胺(methoxy polyethylene glycol amine, mPEG-NH_2)、PEG200、1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(ethyldimethylaminopropyl carbodiimide, EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxy succinimide, NHS)、吐温-20、甲醇、乙腈、无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(浓度 0.01 mol/L)、磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB)、碳酸盐缓冲液(carbonate buffer solution, CBS)(浓度 0.05 mol/L)、2-吗啉乙磺酸缓冲液(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES)(浓度 0.1 mol/L)、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐[tris(hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride, Tris-HCl](浓度 1 mol/L)、QBs 探针稀释液[含 1%蔗糖、0.2%牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、0.01 mol/L PBS](河南省华丰化学试剂有限公司); BSA、鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)、羊抗鼠二抗(美国 Sigma 公司); 氨基水溶性 CdSe/ZnS 量子点溶液(发射波长 600 nm±10 nm)(质量浓度 5 mg/mL, 北京北达聚邦科技有限公司); OTA 单克隆抗体、OTA-OVA 包被抗原、羧基化聚苯乙烯(polystyrene, PS)微球悬浮液(质量浓度 10 mg/mL)、萃取液(60%乙醇-水体系)(实验室前期制备); 聚氯乙烯黏性底板(polyvinyl chloride, PVC)、样品垫、结合垫(玻璃纤维垫)、硝酸纤维素膜(nitrocellulose membrane, NC)、吸水垫(河北伊莱莎生物科技有限公司)。

1.2　仪器与设备

Sigma 3K15 低温高速离心机(德国 SIGMA 公司); HJ-3 数显恒温磁力搅拌器(上海龙跃仪器设备有限公司); X-only 单向喷点仪(美国 BioDot 公司); DZF-6020N(24L)台式真空干燥箱、MS3 涡旋振荡器(上海捷呈实验仪器有限公司); CM4000 全自动斩切机(上海金标生物科技有限公司); HF6500 荧光读数仪(山东美正生物科技有限公司); ME203 电子天平(感量 0.01 g, 梅特勒托利多科技(中国)有限公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　QBs 探针的制备

采用 PS 微球量子点负载法制备 QBs 探针, 通过 PS 微球表面的羧基与量子点表面氨基的共价偶联, 实现量子点定向固定。取 1.0 mL 羧基化 PS 微球悬浮液(10 mg/mL), 加入 3.0 mL MES (pH 6.0)混匀, 4000 r/min 离心 10 min, 弃上清, MES (pH 6.0)重复洗涤 2 次后重悬于 1.0 mL MES (pH 6.0)中。立即加入 5.0 μL EDC (100 mg/mL) 和 5.0 μL NHS (50 mg/mL)室温活化 30 min。取质量浓度为 5 mg/mL 的氨基水溶性 CdSe/ZnS 量子点溶液 1.0 mL, 用 MES (pH 6.0)进行缓冲液置换, 最终重悬于 1.0 mL MES (pH 6.0)中。将上述准备好的氨基量子点溶液全部迅速加入活化好的 PS 微球悬液中, 室温磁力搅拌(300 r/min)反应 2 h。反应结束后, 加入 50.0 μL Tris-HCl (pH 8.0), 室温淬灭 10 min, 5000 r/min 离心 10 min, 弃上清, MES (pH 6.0)洗涤 3 次。

1.3.2　QBs 探针的偶联

采用 EDC/NHS 活化偶联法将 OTA 单克隆抗体直接偶联至 QBs 探针表面: 取 0.5 mg QBs 探针重悬于 1.0 mL MES (pH 6.0)中, 加入 1.0 mg EDC、0.5 mg NHS 室温活化反应 25 min; 离心, 弃去上清后重悬于 1.0 mL PBS (pH 7.4)中, 立即加入 5.0 μL OTA 单克隆抗体(1 mg/mL)室温振荡偶联 2 h, 离心, 弃上清, 用 PBS (pH 7.4)洗涤 2 次, 去除未结合抗体。产物重悬至 MES (pH 6.0)中, 加入 mPEG-NH_2(终质量浓度 2 mg/mL)、10.0 μ L EDC (100 mg/mL)和 10.0 μL NHS (50 mg/mL)室温反应 1 h 后加入 BSA 至终浓度 1%, 继续反应 1 h 后进行封闭, PBS (pH 7.4)充分离心洗涤 3 次。重悬于含 1% BSA 的 PBS (pH 7.4)中, 4 ℃避光保存。

1.3.3　赭曲霉毒素 A 量子检测系统开发

OTA 量子检测系统由 PVC 黏性底板、样品垫、结合垫、NC 膜、吸水垫、测试线(T 线)和质控线(C 线)等几个部分组成。组装的 OTA 量子检测系统结构如图 1。

将结合垫浸泡在预处理液中 30 min, 37 ℃烘干 2 h; 用 X-only 单向喷点仪将偶联好 QBs 探针溶液(0.2 mg/mL)均匀喷涂在结合垫上(1 μL/cm), 37 ℃真空干燥 1 h, 避光保存; 将一定浓度的 OTA-OVA 和羊抗鼠二抗分别喷涂在测试线(T 线)和质控线(C 线)上, 喷量 1 μL/cm, 线宽约 1 mm,

T 线与 C 线间距 5 mm, 37 ℃干燥 2 h, 密封避光保存。将样品垫、预处理好的结合垫、NC 膜、吸水垫按照一定的组装工艺依次黏贴于 PVC 底板上, 压实固定, 用切割机将层压好的底板切割成 4 mm 宽的单条, 密封后 4 ℃保存备用。

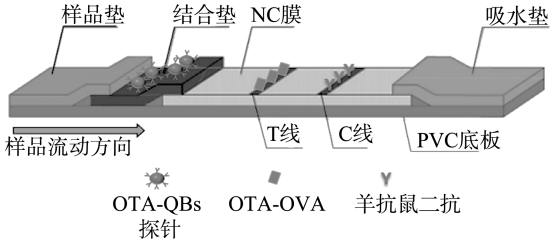


图 1 OTA 量子检测系统结构示意图

Fig.1 Structural diagram of OTA quantum detection system

1.3.4 OTA 检测系统测试方法建立

称取 5 g 研磨好(约 50%能通过 20 目网筛)的样品于装有 15.0 mL 萃取液(60%乙醇-水体系)的样品管中, 涡旋振荡混匀 2 min, 取出 1.0 mL 于 1.5 mL 离心管中, 2000 r/min 低速离心 2 min 后取 100 μL 上清液于另一干净 1.5 mL 离心管中, 调 pH 至 6.2~7.0, 将组装好的检测系统垂直放入离心管中, 反应 3 min, 取出用 HF6500 荧光读数仪读取 T 线和 C 线的荧光信号值。

1.4 关键工艺参数的优化

1.4.1 OTA-OVA、QBs 探针稀释倍数的确定

将 OTA-OVA 稀释成 0.05、0.07、0.10、0.15 mg/mL 不同的质量浓度划线包被在 NC 膜 T 线上, 将 QBs 探针按 1:5、1:10、1:15、1:20、1:30 倍数稀释后喷涂于结合垫上, 羊抗鼠二抗固定 0.1 mg/mL 包被在 C 线上, 样品垫、结合垫、NC 膜、吸水垫按照一定工艺组装, 将组装好的一系列测试系统对应垂直放入盛有 100 μL PBS 的离心管中, 反应 3 min, 读取荧光强度, 选择最短时间内(抗体与抗原的亲和力最高、结合速率最快, 能够实现快速检测)T/C > 1(包被在 T 线上的 OTA-OVA 能够高效地捕获游离的 QBs 探针)的相应参数组合, 确保方法兼具高灵敏度和现场快检的即时性。

1.4.2 OTA-OVA 稀释液的优化

选择 PBS、CBS、PB、Tris-HCl 缓冲液、含有 0.1% 吐温-20 的 PB、含有 1% BSA 的 PB 作为 OTA-OVA 稀释液, 分别稀释 OTA-OVA 至 0.05 mg/mL, 并将其与 0.1 mg/mL 羊抗鼠二抗一同划线包被于 NC 膜上, 组装检测系统, 对应垂直放入盛有 100 μL OTA 标准品(0.5 ng/mL)离心管中, 反应结束后观察 T 线和 C 线清晰度及荧光信号情况。

1.4.3 结合垫处理液的优化

采用玻璃纤维垫作为结合垫, 分别用不同处理液浸泡过夜, 将浸泡的结合垫取出 60 ℃烘干 1 h 后取出组装测试系统, 对应垂直放入盛有 100 μL OTA 标准品(0.5 ng/mL)的离心管中, 反应结束后观察 T 线和 C 线显色情况、清晰度与层析速度。

1.5 OTA 量子检测系统性能评价

1.5.1 标准曲线建立

准确称取一定量的 OTA 标准品, 用甲醇-乙腈(1:1, *V*:*V*)溶解, 配制成 1 mg/mL 标准储备液, 参照 GB 5009.96—2016《食品安全国家标准 食品中赭曲霉毒素 A 的测定》, 独立配制不同质量浓度的 OTA (0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、20.0、40.0 ng/mL), 各取 100 μL 上述 OTA 标准品稀释液及 PBS(空白对照)依次滴加至离心管中, 取组装好的 OTA 量子检测系统垂直放入室温反应 3 min, 进行 3 平行独立测试, 荧光读数仪测定 T 线和 C 线的荧光信号值, 以 T/C 平均值为纵坐标, OTA 标准品质量浓度为横坐标, 拟合曲线得到线性回归方程, 确定方法线性范围、最低检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)。

1.5.2 特异性

将高、中、低质量浓度的 OTA (20、8、2 ng/mL)标准品溶液和高质量浓度(20 ng/mL)的其他标准品(OTB、OTC、DON、ZEN、FB_1、AFB_1、AFB_2、AFG_1、T-2)按 1.3.4 进行萃取反应、读取结果, 每个质量浓度进行 3 平行独立测试。

1.5.3 添加回收试验评价

依据 LS/T 6142—2023 设计回收试验, 收集的不同基质样品稻米、开心果、玉米、腰果、花生、大豆、核桃, 粉碎后每个样本分成 3 组, 每组分成 3 份, 各称取 5 g 于 50 mL 离心管中; 分别配制高、中、低质量浓度的标准溶液, 各取 100 μL 对应添加至上述 50 mL 离心管中混匀后按 1.3.4 萃取检测。每组由 3 位评价人员独立测试。

1.6 量子点荧光法的应用及与 HPLC 的比较

选取小麦、玉米、花生、芝麻、核桃及无花果共 6 种不同基质的样品作为检测对象。并分别采用量子点荧光微球检测系统与高效液相色谱法进行测定, 3 平行测定, 以评估量子点荧光法的应用效果。

1.7 数据处理

本研究采用 Origin 2022、S-Flow v2.0 软件进行数据和图表处理, 每个实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 OTA-OVA、QBs 探针稀释倍数优化结果

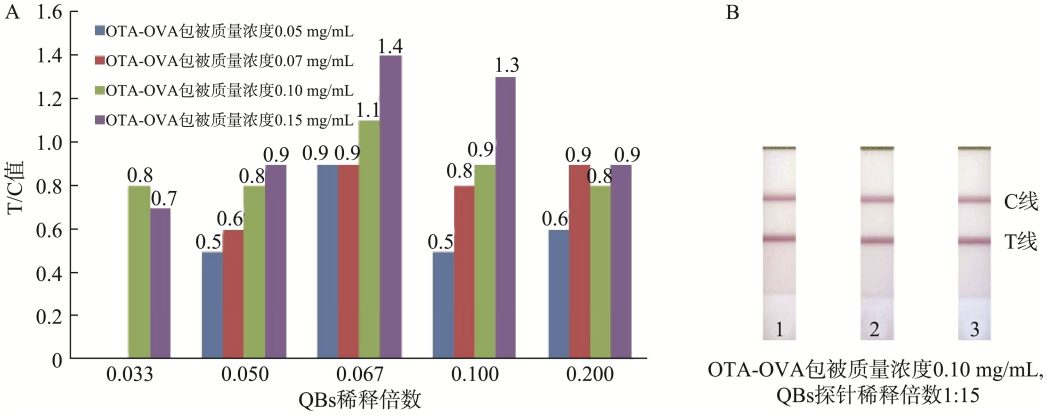
实验结束观察 T 线、C 线荧光信号强度并记录结果见表 1; 荧光读数仪读取 T/C 值并通过可视化图表分析, 综合 T 线和 C 线荧光信号情况及成本分析, 选择 T 线、C 线条带荧光信号相对较强且 T 线显色值大于 C 线即 T/C 值大于 1(如图 2)时组合, 最终确定 OTA-OVA 的最佳包被质量浓度为 0.1 mg/mL, QBs 探针稀释倍数为 1:15, 如图 2。

表 1　OTA-OVA 包被质量浓度和 QBs 探针稀释倍数实验结果

Table 1　Experimental results of OTA-OVA coating mass concentration and QBs probe dilution ratio

QBs 探针稀释倍数		OTA-OVA 包被质量浓度/(mg/mL)			
		0.05	0.07	0.10	0.15
OTA	1:5	C+++/T++	C+++/T+++	C+++/T+++	C+++/T+++
	1:10	C++/T+	C++/T++	C++/T++	C++/T+++
	1:15	C+/T+	C+/T+	C+/T++	C+/T++
	1:20	C+/T–	C+/T–	C+/T+	C+/T+
	1:30	C-/T–	C-/T–	C+/T–	C+/T–

注: +++表示荧光信号较强; ++表示荧光信号中等; +表示有荧光信号; –表示无荧光信号。表 2 同。



注: 图 B 中 1、2、3 表示选择的包被液浓度的 3 次平行试验结果。

图 2　不同 OTA-OVA 包被浓度和 QBs 探针稀释倍数的 T/C 值

Fig.2　T/C values of different OTA-OVA coating concentrations and dilution times of QBs probe

2.2　OTA-OVA 稀释液优化结果

在以上最佳 OTA-OVA、QBs 探针稀释倍数条件下, 对 OTA-OVA 稀释液进行优化, 选择实验室常用的 6 种稀释液分别将 OTA-OVA 稀释至 0.05 mg/mL 和 0.1 mg/mL, 与羊抗鼠二抗一同划线包被于 NC 膜上。实验结果如图 3, 综合比较相同时间内各检测系统上 T 线、C 线荧光信号情况、清晰度, 选择 PBS 作为包被原稀释液。

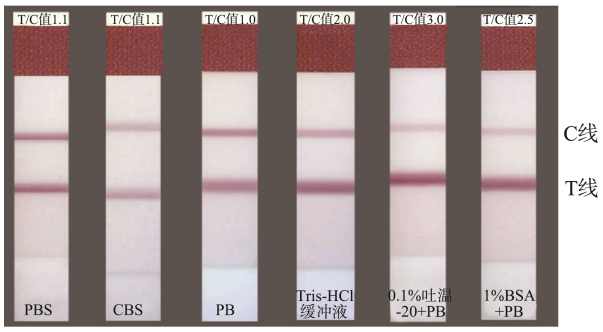


图 3　各稀释液测试结果图

Fig.3　Test result diagrams of each dilution solution

2.3　结合垫处理液的优化结果

选择 0.01 mol/L PBS、0.1%吐温-20+0.01 mol/L PBS、0.1% PEG200+0.01 mol/L PBS、0.1% 吐温 -20+0.1% PEG200+0.01 mol/L PBS 分别浸泡结合垫过夜, 处理后的结合垫在上述最佳条件下荧光信号强度及反应灵敏度结果见表 2, T 线和 C 线清晰度及 T/C 值结果见图 4。0.01 mol/L PBS 处理结合垫后, 检测结果荧光信号直观较强且亮度接近(即 T/C 值接近 1), 层析速度最快, 两线清晰度较好。最终选择 0.01 mol/L PBS 作为结合垫处理液。

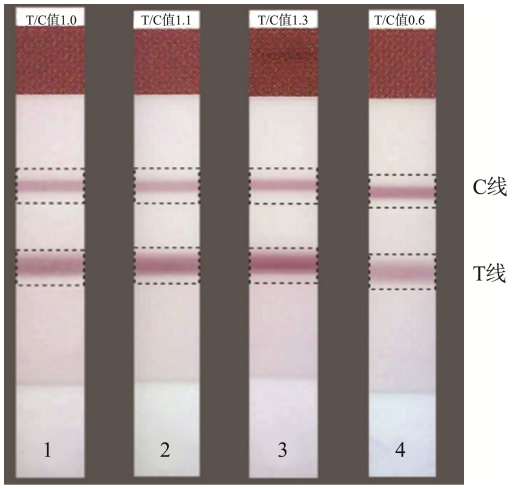
2.4　OTA 标准曲线建立及检出限、定量限评估

参照 GB 5009.96—2016 选取 OTA 标准品不同的质量浓度, 3 平行独立测试, 得到 9 组有效数据如表 3, 以 T/C 平均值为纵坐标(Y), OTA 标准品质量浓度为横坐标(X, ng/mL), 绘制成散点图, 首先采用多项式拟合确定合适的标准曲线范围如图 5, 线性回归方程 Y=0.0012X^2–0.0692X+1.077, 决定系数 r^2=0.9898, 线性预拟合, 保留决定系数 r^2 最大且符合标准曲线要求的 6 组连续校准点数据, 线性拟合标准曲线如图 6, 线性回归方程 Y=–0.0599X+1.0546, 决定系数 r^2=0.9966, 确定 1~20 ng/mL 为定量线性范围, 符合 GB/T 27417—2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》标准中准确定量需求。OTA 标准品质量浓度为 0.5 ng/mL 时, 能够部分检出且平均 T/C 值接近 1, 评估 LOD 为 0.5 ng/mL; 标准曲线起始质量浓度为 1.0 ng/mL, T/C 值稳定且小于 1, 评估 LOQ 为 1.0 ng/mL。满足 GB 2761—2017 限量需求。

表 2 各结合垫处理液条件下的荧光信号强度及反应灵敏度

Table 2 Fluorescence signal intensity and reaction sensitivity at each binding pad treatment solution

	结合垫处理液	荧光信号强度	灵敏度
OTA	0.01 mol/L PBS	+++	高
	0.1%吐温-20+0.01 mol/L PBS	++	中等
	0.1% PEG200+0.01 mol/L PBS	++	中等
	0.1%吐温-20+0.1% PEG200+0.01 mol/L PBS	+	中等



注: 1. 0.01 mol/L PBS, 2. 0.1%吐温-20+0.01 mol/L PBS, 3. 0.1% PEG200+0.01 mol/L PBS, 4. 0.1%吐温-20+0.1% PEG200+0.01 mol/L PBS。

图 4 各结合垫处理液条件下 T 线和 C 线情况

Fig.4 Situations of T line and C line under the condition of treatment solution of each bonding pad

表 3 OTA 标准品各质量浓度测试结果

Table 3 Test results of each mass concentration of OTA standard

序号	OTA 标准品各质量浓度/(ng/mL)	T/C 值			平均 T/C 值
1	0.5	1.40	0.99	0.97	1.10
2	1.0	1.00	0.99	0.98	0.99
3	2.0	0.94	0.96	0.94	0.95
4	4.0	0.79	0.83	0.80	0.81
5	6.0	0.68	0.70	0.70	0.69
6	8.0	0.57	0.57	0.55	0.56
7	10.0	0.48	0.47	0.47	0.47
8	20.0	0.26	0.19	0.19	0.21
9	40.0	0.13	0.15	0.17	0.15

2.5 特异性结果

通过对粮油作物、坚果污染常见的 8 种真菌毒素及赭曲霉毒素常见的 2 种共存毒素检测评估 OTA 量子检测系统的特异性，由图 7 中结果可知，检测高质量浓度(20 ng/mL)的其余 7 种真菌毒素及 2 种其他赭曲霉毒素时，T/C 值均在 1.1~1.5 之间，与空白对照结果接近，而 OTA 阳性样本(20、8、2 ng/mL)的 T/C 值均小于 1，证明该 OTA 量子检测系统对 OTA 有优异的选择性，与其他常见真菌毒素无交叉反应，能够从复杂的样本基质和结构类似物中准确识别出 OTA，同时也证实了实验室前期制备的 OTA 单克隆抗体的高特异性。

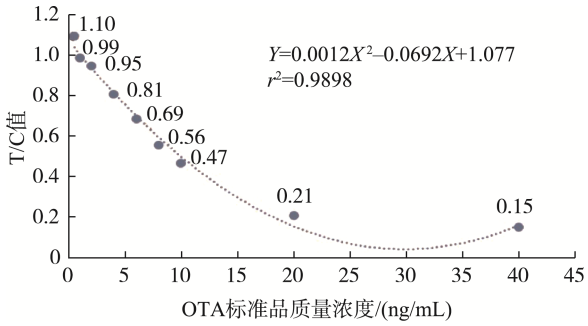


图 5 OTA 标准品不同质量浓度结果多项式拟合图

Fig.5 Polynomial fitting diagram of different mass concentration results of OTA standard

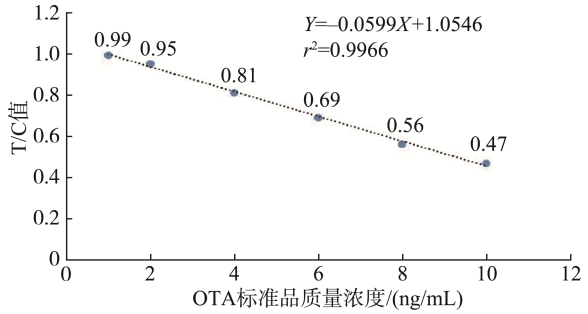


图 6 准确定量线性拟合图(标准曲线)

Fig.6 Accurate quantitative linear fitting diagram (standard curve)

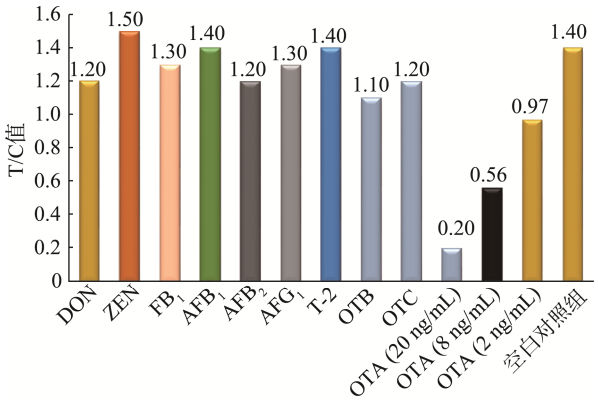


图 7 特异性结果分析图

Fig.7 Analysis chart of specificity results

2.6　添加回收测试结果分析评价

高、中、低3组评价含量测试结果见表4, 参考LS/T 6142—2023计算回收率和相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)值, 3 组回收率在均在 90.3%~114.5%之间, RSDs 均小于 15%, 在 3 种不同评价含量下的准确度和精密度均符合 LS/T 6142—2023 要求, 表明 OTA 量子检测系统对各评价含量响应值稳定, 适合粮油作物及坚果中真菌毒素快速检测。

2.7　量子点荧光法的应用及与 HPLC 的比较

选取小麦、玉米、花生、芝麻、核桃及无花果 6 种不同基质样品, 分别采用所建立的量子点荧光法与 HPLC 法进行 OTA 含量测定, 结果如表5所示。以HPLC法作为参比方法, 两种方法对不同基质样品的测定结果具有良好的一致性, 各基质样品两组结果相对偏差均小于15%, 符合国家标准的精密度试验要求, 表明量子点荧光法具有较高的检测准确性。

表 4　回收试验测试结果及分析评价情况

Table 4　Results of the recovery test and the analysis and evaluation situation

样品名称	评价含量 /(ng/mL)	评价人 1 结果 /(ng/mL)	评价人 2 结果 /(ng/mL)	评价人 3 结果 /(ng/mL)	回收率/%	RSDs/%
稻米	20	22.20	24.11	21.01	112.2	11.0
开心果		21.31	22.01	19.11	104.0	
玉米		23.21	23.09	18.21	107.5	
腰果		26.34	20.04	22.33	114.5	
花生		19.32	22.01	20.35	102.8	
大豆		20.41	19.31	17.39	95.1	
核桃		22.01	18.22	17.41	96.0	
稻米	8	8.99	8.11	8.31	105.8	5.2
开心果		7.82	8.02	7.91	98.9	
玉米		8.12	7.99	8.01	100.5	
腰果		7.89	7.62	7.85	97.3	
花生		8.19	8.92	7.49	102.5	
大豆		7.68	7.92	7.48	96.1	
核桃		8.01	8.14	7.22	97.3	
稻米	2	1.65	2.03	1.97	94.1	6.40
开心果		1.62	1.97	1.93	92.0	
玉米		1.91	1.94	1.95	96.6	
腰果		1.93	1.89	1.94	96.0	
花生		1.96	1.87	1.63	91.0	
大豆		1.87	1.83	1.72	90.3	
核桃		1.85	2.01	1.90	96.0	

表 5　量子点荧光法与 HPLC 检测不同样品的测试结果比较

Table 5　Comparison of test results of different samples detected by quantum dot fluorescence and HPLC

样品名称	量子点荧光法结果/(μg/kg)				HPLC 法结果/(μg/kg)				精密度/%
	平行 1	平行 2	平行 3	平均值	平行 1	平行 2	平行 3	平均值	
小麦	6.84	5.88	6.75	6.49	6.36	7.11	7.26	6.91	6.07
玉米	22.23	21.69	21.45	21.79	21.84	21.57	21.93	21.78	0.04
花生	24.78	23.16	24.60	24.18	24.93	21.33	22.05	22.77	6.19
芝麻	11.34	11.49	11.91	11.58	11.22	11.82	11.88	11.64	0.51
核桃	52.56	53.10	53.07	52.91	45.39	52.98	50.79	49.72	6.4
无花果	3.75	4.74	4.92	4.47	4.35	4.11	3.69	4.05	10.37

3 讨论与结论

本研究通过将量子点负载于 PS 微球表面, 构建了量子点微球复合信号标记物, 成功开发了一种基于 PS 微球量子点负载技术的新型荧光免疫层析检测系统, 用于粮油作物及坚果中 OTA 的快速定量分析。

该设计在传统量子点标记技术基础上实现了重要改进: 单个 PS 微球可携带大量量子点, 相当于对荧光信号进行集成放大, 从而在免疫层析平台上实现了高检测灵敏度, 检出限可达 0.5 ng/mL; QBs 探针偶联结束时使用 mPEG-NH_2 和 BSA 进行双重封闭, 能有效减少非特异性结合。

针对坚果样品(花生、核桃、开心果等), 其高脂肪、高蛋白的特性是提取的主要难点, 本研究尝试使用 60%乙醇-水体系作为萃取液, 最大限度地去除脂肪、蛋白质等干扰物质, 通过实验参数优化达到了萃取液与检测环境兼容, 实现了环保、安全与实用。

以 HPLC 作为参比, 两种方法检测结果一致性良好, 而量子点荧光微球检测系统操作简便、响应快速、结果直观, 无需大型精密仪器及复杂的样品前处理过程, 更适用于真菌毒素的现场快速筛查及大批量样本的日常检测, 具有良好的实用价值和推广应用前景。

尽管本研究已对主要粮油作物及坚果基质进行了性能评价, 但对于咖啡豆、葡萄酒、香料等其他 OTA 常见污染载体, 其样品基质更为复杂, 可能存在更强的干扰效应。因此, 后续可探索研究该方法在不同基质中的适用性与抗干扰能力。还可进一步探索基于多种量子点编码与多抗体并行检测技术, 实现在同一检测平台上对 OTA、AFB_1、伏马毒素等多种真菌毒素的同步检测, 从而构建高通量、多功能集成检测系统, 提升检测效率。

综上所述, 本研究建立的基于 PS 微球量子点负载技术的 OTA 量子检测系统, 具有灵敏度高、特异性强、定量快速和操作简便等优点。标准化方法学评价验证了该方法可靠、准确, 可为粮油作物及坚果中 OTA 的现场监测提供有效的技术手段, 在食品安全风险预警与管控方面具有良好的应用前景和推广价值。

参考文献

[1] 沈润琳, 林权佳, 李勇. 潮汕粿品中赭曲霉毒素 A 的检测与污染状况分析[J]. 现代食品, 2024, 30(21): 195–198, 209.
Shen Runlin, Lin Quanjia, Li Yong. Detection and pollution analysis of ochratoxin A in Chaoshan rice cakes [J]. Modern Food, 2024, 30(21): 195–198, 209.

[2] 杨焕春, 常向彩, 孙向东. 哈尔滨地区水稻真菌产毒力及市售大米真菌毒素污染风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(13): 291–298.
Yang Huanchun, Chang Xiangcai, Sun Xiangdong. Toxigenic capacity of rice fungi in Harbin Area and risk assessment of fungal toxin contamination in commercially available rice [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(13): 291–298.

[3] Chen Xiujin, Gao Dong, Sun Fengxia, *et al*. Nanomaterial-based aptamer biosensors for ochratoxin A detection: a review [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2022, 414(9): 2953–2969.

[4] 杜宏举, 宁钧宇, 高珊, 等. 赭曲霉毒素 A 的健康危害评估[J]. 毒理学杂志, 2024, 38(3): 185–192.
Du Hongju, Ning Junyu, Gao Shan, *et al*. Hazard assessment of the effects of ochratoxin A on health [J]. Journal of Toxicology, 2024, 38(3): 185–192.

[5] 陈文倩, 杨宁, 林丽芳, 等. 基于核酸适配体与 DNA 长距自组装的电化学传感器定量检测赭曲霉毒素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(19): 181–187.
Chen Wenqian, Yang Ning, Lin Lifang, *et al*. Quantitative detection of ochratoxin A based on aptamer and DNA long-range self-assembly electrochemical sensor [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(19): 181–187.

[6] Stiborove M, Barta F, Levova K, *et al*. The influence of ochratoxin A on DNA adduct formation by the carcinogen aristolochic acid in rats [J]. Archives toxicology, 2015, 89(11): 2141–2158.

[7] Awuchi C G, Ondari E N, Ogbonna C U, *et al*. Mycotoxins affecting animals, foods, humans, and plants: types, occurrence, toxicities, action mechanisms, prevention, and detoxification strategies-a revisit [J]. Foods, 2021, 10(6): 1279–1279.

[8] 刘军, 曾施宇, 朱浩宇, 等. 集成化酶联免疫微流控平台检测红酒中的赭曲霉毒素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(17): 222–231.
Liu Jun, Zeng Shiyu, Zhu Haoyu, *et al*. Determination of ochratoxin A in red wine by integrated enzyme-linked immune microfluidic platform [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(17): 222–231.

[9] 孙忠清, 林滢, 密叶, 等. 坚果及籽类食品中霉菌与真菌毒素防控技术研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2023, 35(5): 795–800.
Sun Zhongqing, Lin Ying, Mi Ye, *et al*. Research progress in prevention and control of mold and mycotoxin in nuts and seed foods [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2023, 35(5): 795–800.

[10] Al-Jaal B A, Jaganjac M, Barcaru A, *et al*. Aflatoxin, fumonisin, ochratoxin, zearalenone and deoxynivalenol biomarkers in human biological fluids: a systematic literature review, 2001—2018 [J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 129: 211–228.

[11] Zhang Ru, Yan Chao, Zong Ziwen, *et al*. Taking glucose as intermediate bridge-signal-molecule for on-site and convenient detection of ochratoxin A in rice with portable glucose meter [J]. Food Chemistry, 2023, 400: 134007.

[12] 王丙辰, 王逸凡, 张秀媛, 等. 基于磁性固相萃取的赭曲霉毒素 A 检测方法构建及优化[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(4): 162–168.
Wang Bingchen, Wang Yifang, Zhang Xiuyuan, *et al*. Construction and optimization of a detection method for OTA based on magnetic solid phase extraction [J]. Food Research and Development, 2025, 46(4): 162–168.

[13] Cappozzo J, Jackson L, Lee H J, *et al*. Occurrence of ochratoxin A in infant foods in the United States [J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(2): 251–256.

[14] 侯晨, 王云政, 张驰, 等. 食品中赭曲霉毒素样品前处理及其检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(8): 163–170.

Hou Chen, Wang Yunzheng, Zhang Chi, *et al*. Advances in sample pretreatment and detection methods of ochratoxin in foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(8): 163–170.

[15] 刘晓然, 张蕴哲, 徐慧, 等. 纳米材料电化学生物传感器检测食品中赭曲霉毒素 A 的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(14): 172–178.
Liu Xiaoran, Zhang Yunzhe, Xu Hui, *et al*. Detection of ochratoxin A in food by nanostructured electrochemical bio-sensors: a review [J]. Food Research and Development, 2024, 45(14): 172–178.

[16] 姜雪. 粮食中赭曲霉素 A 检验方法的研究进展[J]. 食品安全导刊, 2024(10): 169–171.
Jiang Xue. Research progress on the detection method of ochratoxin A in grain [J]. Journal of Food Safety Guide, 2024(10): 169–171.

[17] Appell M, Evans K O, Jackson M A, *et al*. Determination of ochratoxin A in grape juice and wine using nanosponge solid phase extraction clean-up and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2019, 41(15–16): 949–954.

[18] Tang Zhentao, Fang Fang, Lou Tingting, *et al*. Determination of ochratoxin A in licorice extract based on modified immunoaffinity column clean-up and HPLC analysis [J]. Food Addittive & Contaminants: Part A Chemistry Analysis Control Exposure Risk Assessment, 2023, 40(11): 1470–1481.

[19] Zhang Zhaowei, Hu Xiaofeng, Zhang Qi, *et al*. Determination for multiple mycotoxins in agricultural products using HPLC–MS/MS via a multiple antibody immunoaffinity column [J]. Journal of Chromatography B, 2016, 1021: 145–152.

[20] Campone L, Piccinelli A L, Celano R, *et al*. Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC-MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples [J]. Food Chemistry, 2018, 244: 128–135.

[21] 李蝶, 曹梅荣, 王敬, 等. 色谱技术在真菌毒素检测中的研究进展[J]. 河北省科学院学报, 2025, 42(5): 58–65.
Li Die, Cao Meirong, Wang Jing, *et al*. Advances in chromatographic techniques for detection of mycotoxins [J]. Journal of the Hebei Academy of Sciences, 2025, 42(5): 58–65.

[22] Teixeira T R, Hoeltz M, Einloft T C, *et al*. Determination of ochratoxin A in wine from the southern region of Brazil by thin layer chromatography with a charge-coupled detector [J]. Food Additives and Contaminants: Part B, Surveillance, 2011, 4(4): 289–293.

[23] Okuma T A, Huynh T P, Hellberg R S. Use of enzyme-linked immunosorbent assay to screen for aflatoxins, ochratoxin A, and deoxynivalenol in dry pet foods [J]. Mycotoxin Research, 2018, 34(1): 69–75.

[24] Zhu Chengxi, Liu Dong, Li Yuye, *et al*. Ratiometric electrochemical aptasensor for ultrasensitive detection of ochratoxin A based on a dual signal amplification strategy: engineering the binding of methylene blue to DNA [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2020, 150: 111814.

[25] 彭臻菲, 魏碧娜, 叶丽颖, 等. 基于核酸适配体检测玉米中的赭曲霉毒素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(19): 7617–7621.
Peng Zhenfei, Wei Bina, Ye Liying, *et al*. Determination of ochratoxin A in corn based on aptamer [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(19): 7617–7621.

[26] 卢迪莎, 王序, 杨金易, 等. 同时检测玉米中黄曲霉毒素 B_1 和赭曲霉毒素 A 的时间分辨荧光免疫层析试纸条的研制[J]. 食品科学, 2022, 43(2): 346–354.
Lu Disha, Wang Xu, Yang Jinyi, *et al*. Development of a time-resolved fluorescence immunochromatographic strip for the simultaneous detection of aflatoxin B_1 and ochratoxin A in corn samples [J]. Food Science, 2022, 43(2): 346–354.

[27] Zhang Huixia, Li Bingyan, Liu Yipeng, *et al*. Immunoassay technology: research progress in microcystin-LR detection in water samples [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 424: 127406.

[28] 张淑霞, 牛春玲, 乔香君, 等. 基于量子检测技术的呕吐毒素高灵敏检测系统的构建及应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(18): 265–273.
Zhang Shuxia, Niu Chunling, Qiao Xiangjun, *et al*. Construction and application of a high sensitivity detection system for vomitoxin using quantum detection technology [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(18): 265–273.

[29] 龙泽坤, 王秀雯, 丁耀魁, 等. 基于量子点的电致化学发光传感器及其在食品真菌毒素残留检测中的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2025, 46(15): 166–176.
Long Zekun, Wang Xiuwen, Ding Yaokui, *et al*. Progress of quantum dot-based electrochemiluminescence sensors and their application in mycotoxin residue detection in foods [J]. Food Research and Development, 2025, 46(15): 166–176.

[30] 乔香君, 邵翠萍, 古绍彬, 等. 坚果类食品中真菌毒素污染现状及其检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(16): 186–192.
Qiao Xiangjun, Shao Cuiping, Gu Shaobin, *et al*. Research progress of fungal toxin contamination status and detection technologies in nut foods [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(16): 186–192.

[31] Canoura J, Yu H, Alkhamis O, *et al*. Accelerating post-SELEX aptamer engineering using exonuclease digestion [J]. Journal of the American Chemical Society, 2021, 143(2): 805–816.

[32] 张蕴哲, 张先舟, 袁耀武, 等. 免疫亲和层析技术协同酶联免疫吸附法检测赭曲霉毒素 A[J]. 食品科学, 2024, 45(10): 257–264.
Zhang Yunzhe, Zhang Xianzhou, Yuan Yaowu, *et al*. Detection of ochratoxin A using immunoaffinity chromatography combined with enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Food Science, 2024, 45(10): 257–264.

[33] Li Xue, Li Wenbin, Yang Qiuhua, *et al*. Rapid and quantitative detection of prostate specific antigen with a quantum dot nanobeads-based immunochromatography test strip [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6(9): 6406–6414.

[34] Hu Jiao, Zhang Zhiling, Wen Congying, *et al*. Sensitive and quantitative detection of C-reaction protein based on immunofluorescent nanospheres coupled with lateral flow test strip [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(12): 6577–6584

[35] Bhand G R, Chaure N B. Synthesis of CdTe, CdSe and CdTe/CdSe core/shell QDs from wet chemical colloidal method [J]. Materials Science in Semiconductor Processing, 2017, 68: 279–287.

(责任编辑: 韩晓红　蔡世佳)