doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2019.05.042

基于赖氨酸修饰胶体金的花生黄曲霉毒素 B₁ 检测

黄星奕 叶伟涛 王成全 吕日琴 孙兆燕

(江苏大学食品与生物工程学院,镇江 212013)

摘要:通过建立赖氨酸表面修饰的胶体金体系,构建了一种检测霉变花生中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)的方法。首先, 用柠檬酸三钠还原法制备胶体金(AuNPs),然后在所制备的胶体金溶液中加入赖氨酸,制备了赖氨酸修饰的胶体 金溶液(Lys – AuNPs)。利用紫外可见分光光度计和透射电镜对其进行表征,建立了 Lys – AuNPs 溶液在 725 nm 和 525 nm 处吸光度的比值(A₇₂₅/A₅₂₅)与 AFB₁质量浓度之间的相关关系。结果表明:AFB₁质量浓度在 1 ~ 50 ng/mL 范 围内与 A₇₂₅/A₅₂₅具有良好的线性关系,决定系数为 0.996,检出限为 0.2 ng/mL。花生样品中的加标回收率范围是 85% ~110%。通过高效液相色谱法(HPLC)对花生中 AFB₁质量浓度进行验证,AFB₁质量浓度的预测值与真实值 的均方根误差为 0.865 1 ng/mL,相关系数为 0.996 1。该方法具有快速简单、灵敏度高、操作简便等优点,可运用于 霉变花生中 AFB₁的快速检测。

关键词:花生;黄曲霉毒素 B₁;胶体金;赖氨酸修饰 中图分类号: S565.2; S13 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2019)05-0370-06

Detection of Aflatoxin B₁ in Peanut Based on Lysine-functionalized Gold Nanoparticles System

HUANG Xingyi YE Weitao WANG Chengquan LÜ Riqin SUN Zhaoyan (School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Aflatoxin $B_1(AFB_1)$ is the most toxic mycotoxin, which is classified as grade 1 carcinogens by the World Health Organization. A method for detection of AFB₁ in moldy peanut was proposed by using lysine-functionalized gold nanoparticles (Lys – AuNPs). AuNPs was synthesized by the citrate reduction method, of which the color was red-wine. To obtain lysine-functionalized AuNPs, lysine solution was added to the prepared AuNPs under stirring by magnetic stirrer. It was characterized by transmission electron microscope and UV-visible spectrophotometry. The detection of AFB_1 was achieved through the competitive reaction mechanism between Hg^{2+} , AFB_1 and amino acids on lysine surface in the gold nanoparticles solution. As the concentration of AFB₁ in Lys - AuNPs solution was increased, the color of the solution was changed from grey to red. UV-visible spectrums were measured to establish the relationship between the A_{725}/A_{525} value of Lys – AuNPs solution and the concentration of AFB₁. The results showed that there was a good linear relationship in the range of $1 \sim 50$ ng/mL, and the correlation coefficient was 0.996. The detection limit of AFB_1 was 0.2 ng/mL and the recovery in peanut samples was $85\% \sim 110\%$. In addition, the concentration of AFB₁ in peanut was confirmed by high performance liquid chromatography (HPLC). The method for detection of AFB₁ in moldy peanuts had the advantages of quick simplicity, high sensitivity, and simple operation and so on, which can be applied to the rapid detection of aflatoxin B₁ in moldy peanut and make the assay widely applicable.

Key words: peanut; aflatoxin B1; gold nanoparticles; lysine-functionalized

0 引言

花生是我国产量丰富、食用广泛的一种坚

果^[1]。在夏季高温、高湿情况下,花生易发生霉变, 在霉变过程中会产生黄曲霉毒素、赭曲霉毒素、伏马 毒素、黑曲霉毒素等霉菌毒素^[2-4]。研究表明,在所

收稿日期: 2018-11-09 修回日期: 2018-12-14

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0400100)

作者简介:黄星奕(1963一),女,教授,博士生导师,主要从事农产品无损技术研究,E-mail:h_xingyi@163.com

371

有已知的霉菌毒素中,黄曲霉毒素 B_1 (Aflatoxin B_1 , AF B_1)的毒性、致畸性、致癌性均居于首位,其半数 致死量(LD50)为0.294 mg/kg^[5]。我国对农产品中 AF B_1 含量具有严格的限制,规定花生及其制品中 AF B_1 的含量(质量比)不得超过 20 µg/kg^[6]。农产 品中 AF B_1 的检测,对于减少霉菌毒素的危害具有重 要的意义。

传统的霉菌毒素检测方法主要有生物学检测 法、薄层分析法、高效液相色谱法等[7].由于这些方 法操作复杂、预处理繁琐、处理时间长,研究者正不 断开发新的检测方法^[8]。纳米材料由于其量子尺 寸效应,表现出与其他传统材料不同的特性,如光学 性质、磁学性质、光催化作用等^[9-11],国内外学者尝 试使用纳米材料检测霉菌毒素。文献[12]利用 AFB,抗体包被纳米金,制备了可用于小麦粉中 AFB₁快速检测的新型安培免疫传感器,检测限为 0.3 μg/L。文献[13]通过合成的纳米粒子与黄曲霉毒 素人工抗原抗体的竞争免疫结合,实现了新型的 AFB, 检测方法,检测限为0.03 ng/mL。文献[14]利用纳米 粒子建立了一种 OTA(赭曲霉毒素 A) 检测体系, 通 过溶液中游离的 cDNA 与加入的 Ag⁺在 NaBH₄的存 在下形成强荧光的纳米粒子,从而实现 OTA 的检 测,检测限为2 pg/mL。文献[15]以磁性材料为载 体,不同纳米材料为信号探针,构建磁控适配体比 色、荧光、电化学传感体系,成功检测出花生中赭曲 霉毒素 A 和伏马毒素 B₁。

传统的胶体金标记技术的实验步骤较为繁琐, 需要构建人工抗原抗体,从而实现标记^[16]。本文以 胶体金为介质,制备赖氨酸修饰的金胶体系,以实现 对霉变花生中 AFB₁的快速检测。

1 材料与方法

1.1 仪器

UV-2450 型紫外可见分光光度计(日本岛津 公司);JEOL 2100 型透射电镜(日本 JEOL 公司); LA-20 型高效液相色谱仪(日本岛津公司),配有 荧光检测器;11830 - RT 型氮吹仪(美国 Organomation 公司);DF-101S 型集热式磁力加热 搅拌器(河南巩义市予华仪器厂);TG16-WS 型台 式高速离心机(长沙湘仪有限公司);XH-D 型漩涡 振荡器(无锡杰瑞安仪器设备有限公司)。

1.2 试剂

 AFB_1 、OTA、 FB_1 (伏马毒素 B_1)、氯金酸 (HAuCl₄)、柠檬酸三钠,购于 Sigma – Aldrich 公司; L-赖氨酸、三氟乙酸、正己烷,购于萨恩化学技术有 限公司;HgCl₂,购于山东西亚化学股份有限公司;乙 腈,购于美国 TEDIA 公司;试验用水为二次去离 子水。

1.3 赖氨酸修饰的胶体金制备

本实验采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金^[17], 首先,称取 8.9 mg 的氯金酸固体粉末溶于 100 mL 的超纯水中,加热到沸腾,迅速加入 12 mL 的 1% 柠 檬酸三钠溶液,持续加热。观察溶液的颜色变化,当 溶液的颜色完全变为透明、澄清的酒红色时,停止加 热。待溶液冷却至室温(20℃),4℃ 避光保存^[18]。 然后将 5 mL 的 15 mol/L 赖氨酸水溶液加入 45 mL 所制 备 的 AuNPs(胶体金)中,150 r/min 搅拌 10 min,制备得到赖氨酸修饰的胶体金(Lys – AuNPs)溶液。利用紫外可见分光光度计和透射电 镜对其进行表征。

1.4 AFB₁测定原理与方法

Hg²⁺能够与 AFB₁形成稳定的螯合物。Hg 是过 渡金属元素,并且容易形成配位数为6的络合物。 它的几何构型通常相当于由6个配位原子形成的八 面体,使得配合物 AFB₁-Hg²⁺的共轭平面增强,刚 性结构增加^[19]。

本实验通过柠檬酸三钠还原 HAuCl₄制得胶体 金,生成的溶液是一种胶体溶液,Lys – AuNPs 粒子 的表面覆盖着赖氨酸,颗粒之间通过静电排斥作用 使得赖氨酸修饰的胶体金溶液保持着稳定性^[20]。 如图 1 所示,当溶液中加入 HgCl₂时,Hg²⁺会与赖氨 酸上的氨基发生作用,破坏胶体溶液的稳定性,使溶 液产生凝聚,颜色变成灰黑色。当溶液中混入 AFB₁,则 Hg²⁺会与 AFB₁发生螯合反应,生成稳定的 配合物,从而使破坏胶体溶液稳定性的 Hg²⁺减少, 随着 AFB₁浓度的升高,溶液中游离的 Hg²⁺不断减 少,颜色逐渐变为红色。通过紫外可见分光光度计 对溶液进行吸光度测定,然后建立 AFB₁浓度与吸光 度之间的相关关系。



图 1 赖氨酸修饰的胶体金溶液检测 AFB₁原理示意图

Fig. 1 Schematic of AFB₁ detection by lysinefunctionalized gold nanoparticles

在 5 mL 的离心管中加入 15 μmol/L 的 HgCl₂溶 液 100 μL 和不同浓度的 AFB₁900 μL, 漩涡振荡 3 min, 混匀。在混合液中加入 1 mL 的 Lys – AuNPs 溶液, 漩涡振荡 5 min。用紫外可见分光光度计测其 吸收光谱, 根据在 725 nm 和 525 nm 处吸光度比值 建立 AFB₁浓度的校准曲线。

1.5 花生样本的制备

本批次实验花生仁样本均产于江苏省南通市, 品种为冀花4号,并参考GB 5009.22—2016的方法 进行预处理。首先,将花生样品研磨成粉末,称取 0.5g试样(精确至0.01g)于50mL离心管中。再 加入20mL质量分数25%的乙腈,漩涡混匀。然后 用均质机均质3min,在6000r/min下离心10min,取 其上清液备用。

1.6 AFB₁的高效液相色谱法测定

色谱条件:流动相为 25% 乙腈;色谱柱为 C18 柱;流速1.0 mL/min;柱温 40℃;进样体积 50 μL;检 测波长 360 nm;发射波长 440 nm。

柱前衍生:用移液管吸取 4 mL 的待测液于 10 mL 的离心管中,然后在 50℃下用氮气慢慢地吹 至近干,再加入 200 μL 的正己烷与 100 μL 的三氟 乙酸,漩涡振荡 30 s。在 40℃ 的恒温箱中衍生 15 min,在 50℃下用氮气缓缓地吹至近干。用 25% 乙腈定容至1 mL, 漩涡振荡 30 s 溶解残留物, 最后 过 0.45 μm 滤膜, 收集滤液于进样瓶中备用。

2 结果与讨论

2.1 Lys - AuNPs 溶液的表征与分析

将制备得到的赖氨酸修饰的胶体金溶液在透射 电镜下进行观察,Lys - AuNPs 的粒径大约为 25 nm, 图 2 为胶体金溶液在不同状态下的电镜图,图 2a 为 赖氨酸修饰的胶体金溶液,颗粒间分散性良好; 图 2b 中颗粒之间发生凝聚现象;图 2c 中颗粒之间 又重新分散开。如图 3 所示,从紫外可见光谱图中 可以发现 Lys - AuNPs 溶液仅在 525 nm 处存在一个 吸收峰;当溶液中加入 Hg²⁺时,溶液颜色会变成灰 黑色,且溶液发生凝聚现象,会在 525 nm 和 725 nm 处形成 2 个吸收峰;当溶液中加入 Hg²⁺和 20 ng/mL 的 AFB₁时,溶液在 525 nm 处的吸光度增加,在 725 nm 处的吸光度减小。



图 2 胶体金溶液不同状态下的透射电镜图









2.2 梯度实验

在 Lys - AuNPs 和 Hg²⁺离子浓度一致的情况 下,向体系中加入不同质量浓度(0、1、2.5、5、10、20、 50、100、300、400、500 ng/mL)的 AFB₁溶液,混匀、平 衡后观察其在不同质量浓度 AFB₁下 Lys - AuNPs 溶 液的颜色变化和凝聚情况,并用紫外可见分光光度 计测量混合后溶液的吸光度,其紫外可见光谱图如





当 AFB₁的质量浓度发生变化时,溶液的颜色也 会产生相应的变化,如图 5 所示。当溶液中没有混 入 AFB₁,只有 Lys - AuNPs 和 Hg²⁺时,溶液呈灰黑 色,此时溶液在 525 nm 处和 725 nm 处有两个吸收 峰;随着 AFB₁质量浓度的不断增加,溶液的颜色由 灰黑色逐渐变淡,最后向红色转变,Lys - AuNPs 溶 液在 525 nm 处的吸光度缓慢下降,而725 nm 处的







吸光度不断增加; 当溶液中 Hg^{2+} 全部与 AFB_1 形成 配合物时,溶液颜色变为红色,此时,紫外可见光谱 图中只剩下一个吸收峰。观察溶液在 525 nm 和 725 nm 处双峰吸光度与 AFB_1 浓度之间的关系可 知, Lys – AuNPs 溶液在 725 nm 处的吸光度 A_{725} 与 在 525 nm 处的吸光度 A_{525} 之间的比值 A_{725}/A_{525} 随 着 AFB_1 质量浓度的增加而减小,逐渐趋向 0。通 过分析 Lys – AuNPs 溶液中 AFB_1 质量浓度与 A_{725}/A_{525} 的相关关系发现,当溶液中 AFB_1 质量浓度有较好 的线性关系,如图 6 所示,线性回归方程为 y =-0.010 5x + 1.144 7,决定系数 $R^2 = 0.996$,检出 限为 0.2 ng/mL。





2.3 回收率和相对标准偏差

选取正常花生将其研磨成粉末,在 50 mL 的离 心管中称取 4 份花生粉末,每份 0.5 g,将等体积不 同质量浓度的 AFB₁(0.5、1、10、50 ng/mL),加入 20 mL 的50% 乙腈,漩涡混合,用均质机均质 3 min, 在 6 000 r/min 下 离 心 10 min。然 后 利 用 Lys - AuNPs 溶液测 AFB₁的质量浓度,得其加标回收率分 别为 85.0%、97.2%、110%、95.5%,平均加标回收 率为 96.9%,相对标准偏差为 8.9%。

2.4 Lys - AuNPs 溶液的特异性

为了研究本实验中制备的 Lys - AuNPs 溶液的 特异性,通过选用霉变花生仁中其它霉菌毒素,如 OTA 和 FB₁作为干扰霉菌毒素,进行验证。取 900 µL 质量浓度为 5 ng/mL 的 AFB1、OTA、FB1分别 加入3支10mL的离心管内,在离心管中分别加入 15 μmol/L的HgCl,溶液 100 μL,漩涡振荡 3 min,使 其充分混合。然后在每个离心管的混合液中分别加 入1 mL 的 Lys - AuNPs 溶液, 漩涡振荡 5 min, 并用 紫外可见分光光度计测其吸收光谱。图7为分别加 入 AFB₁、FB₁、OTA 后的紫外可见光谱图, 与空白组 相比,加入5 ng/mL AFB,的溶液在525 nm 处的吸光 度明显上升,725 nm 处的吸光度显著降低,而加入 OTA 与 FB₁的溶液的吸光度几乎没有变化。数据表 明,目标物中混入 AFB,时的吸光度变化率远高于混 Λ OTA 与 FB₁。由以上结果表明,此方法所构建的 赖氨酸修饰的胶体金体系有较好的选择性,霉变花 生仁中存在的 OTA 和 FB1并不会影响 AFB1质量浓 度的检测,基于此建立的花生仁中 AFB1含量的检测 方法具有良好的特异性。





2.5 AFB₁含量的高效液相色谱法测定

用本研究提出的 Lys - AuNPs 溶液检测 AFB₁的 方法检测溶液中 AFB₁的质量浓度,并用高效液相色 谱法(HPLC)对 AFB₁的质量浓度进行验证。选取 40 个花生样品对其 AFB₁质量浓度进行测定与比较,







相关系数为 0.996 1。结果表明由本实验所建立的 赖氨酸修饰的胶体金体系可用于花生中 AFB₁的 检测。

3 结束语

提出了一种新的霉变花生中 AFB₁检测方法:用 赖氨酸修饰的胶体金溶胶体系对霉变花生中 AFB₁ 进行检测。该方法无需使用光敏材料、酶试剂等,具 有快速、简单、特异性好等优势,并且无需制备复杂 的特异性抗体来检测黄曲霉毒素。Lys – AuNPs 溶 液检测 AFB₁的线性范围为 1~50 ng/mL,决定系数 0.996,检出限为 0.2 ng/mL,平均加标回收率为 96.9%,相对标准偏差为 8.9%。该方法快速、准 确、灵敏,可用于霉变花生中 AFB₁的检测。

参考文献

- [1] 王叶群,姚刚,张绍英. 污染黄曲霉毒素花生的检测及分选技术研究进展[J]. 农业工程,2014,4(6):59-63.
 WANG Yequn, YAO Gang, ZHANG Shaoying. Development of detection and sorting technology for aflatoxins contaminated peanuts[J]. Agricultural Engineering, 2014,4(6):59-63. (in Chinese)
- [2] 刘焱,蔡静平.储粮中黄曲霉毒素检测和预警方法研究进展[J].粮食与油脂,2015,28(3):1-5.
- LIU Yan, CAI Jingping. Research progress on methods of aflatoxins detecting and warning in stored grain[J]. Cereals & Oils, 2015,28(3):1-5. (in Chinese)
- [3] CHEN F, LUAN C, WANG L, et al. Simultaneous determination of six mycotoxins in peanut by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector[J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2016, 97(6):1805-1810.
- [4] 孙冰洁,朱伟,张波.黄曲霉毒素检测技术的研究进展[J].热带医学杂志,2017,17(9):1268-1274.
 SUN Bingjie, ZHU Wei, ZHANG Bo. Review on the methodology of aflatoxin detection[J]. Journal of Tropical Medicine, 2017,17(9):1268-1274. (in Chinese)
- [5] 谢芳,赖卫华,史爱武,等.免疫磁珠富集结合酶联免疫吸附法检测酱油中黄曲霉毒素 B₁[J].食品科学,2013,34(18): 165-169.

XIE Fang, LAI Weihua, SHI Aiwu, et al. Immunomagnetic bead enrichment and ELISA for detection of aflatoxin B_1 in sauce [J]. Food Science, 2013, 34(18):165 - 169. (in Chinese)

[6] 李少晖,任丹丹,谢云峰,等. 食品中黄曲霉毒素检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(4):1107-1115.

LI Shaohui, REN Dandan, XIE Yunfeng, et al. Research progress on determination methods of aflatoxins in foodstuffs [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2015,6(4):1107-1115. (in Chinese)

- [7] VIDAL J C, BONEL L, EZQUERRA A, et al. Electrochemical affinity biosensors for detection of mycotoxins: a review [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 49(4):146-158.
- [8] GEORGIEVSKI B, KOSTIK V, MEMETI S, et al. Qualitative and quantitative analysis of aflatoxins in raw peanuts [J]. Journal of Environmental Protection and Ecology, 2016, 17(3):961-969.
- [9] MOON J, KIM G, LEE S. Development of nanogold-based lateral flow immunoassay for the detection of ochratoxin A in buffer systems[J]. Journal of Nanoscience & Nanotechnology, 2013, 13(11):7245-7249.
- [10] 王馨,胡文忠,陈晨,等. 纳米材料在果蔬保鲜中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2017,43(1):281-286.
 WANG Xin, HU Wenzhong, CHEN Chen, et al. Application of nanomaterials in storage of fruits and vegetables[J]. Food and Fermentation Industries, 2017,43(1):281-286. (in Chinese)
- [11] 杨华,徐霞红,郭玉娜,等. 基于 MOCPs MWCNTs 的大肠杆菌电化学免疫传感器[J/OL]. 农业机械学报, 2017, 48(6):328-333.

YANG Hua, XU Xiahong, GUO Yu'na, et al. Electrochemical immunosensor assay of *E. coli* O157:H7 based on MOCPs – MWCNTs with highly efficient antibody immobilization [J/OL]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2017,48(6):328 – 333. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx? flag = 1&file_no = 20170643&journal _id = jcsam. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.06.043. (in Chinese)

[12] 干宁,谢东华,李榕生,等.小麦粉中黄曲霉毒素 B₁现场检测用纳米修饰传感器[J].中国粮油学报,2009,24(12): 124-128.

GAN Ning, XIE Donghua, LI Rongsheng, et al. A novel screen print amperomatric immunosensor to determine aflatoxin B_1 in flour based on antibody coated nano gold particles modified electrode [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(12):124 – 128. (in Chinese)

[13] 李响,李向丽,谭贵良,等.磁分离结合 CdTe 发光量子点标记黄曲霉毒素 B₁ 免疫检测新方法[J].食品与生物技术学报,2013,32(3):258-264.

LI Xiang, LI Xiangli, TAN Guiliang, et al. A new immunoassay method for aflatoxin B_1 using CdTe luminescent quantum dots as labels [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(3):258 – 264. (in Chinese)

- [14] CHEN J, ZHANG X, CAI S, et al. A fluorescent aptasensor based on DNA-scaffolded silver-nanocluster for ochratoxin A detection [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2014, 57(10):226-231.
- [15] 王成全. 基于磁控适配体传感体系的农产品中典型霉菌毒素检测研究[D]. 镇江:江苏大学, 2016. WANG Chengquan. Research on detection of typical mycotoxins in agricultural products based on magnetically controlled aptasensor[D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2016. (in Chinese)
- [16] GOPAL J, ABDELHAMID H N, HUANG J H, et al. Nondestructive detection of the freshness of fruits and vegetables using gold and silver nanoparticle mediated graphene enhanced Raman spectroscopy [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2016, 224:413-424.
- [17] LI X, LI P, ZHANG Q, et al. Multi-component immunochromatographic assay for simultaneous detection of aflatoxin B₁, ochratoxin A and zearalenone in agro-food[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 49(22):426-432.
- [18] 刘颖沙,李建科,张琳. 胶体金制备技术的改进与优化[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(11):110-114. LIU Yingsha, LI Jianke, ZHANG Lin. Improvement and optimization of preparation technology of colloidal gold[J]. Food and Fermentation Industries, 2015, 41(11):110-114. (in Chinese)
- [19] 刘雪芬. 基于环糊精的黄曲霉毒素 B₁ 荧光增敏检测技术研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2011.
 LIU Xuefen. Study on cyclodextrins-based fluorescence enhancement technology for aflatoxin B₁ detection [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011. (in Chinese)
- [20] 庞世琦,刘青,李志勇,等. 胶体金技术快速测定葡萄酒中赭曲霉毒素 A[J]. 食品安全质量检测学报, 2016,7(8): 3073-3076.

PANG Shiqi, LIU Qing, LI Zhiyong, et al. Rapid detection of ochratoxin A in wines by gold immunochromatography assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2016,7(8):3073-3076. (in Chinese)