

基于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs}/\text{MWCNTs}-\text{COOH}$ 纳米免疫传感器快速测定水产品的呋喃它酮代谢产物

李 亭, 何欢歌, 鲁 航, 李书国*

(河北科技大学食品与生物学院, 河北 石家庄 050018)

摘 要: 采用磁性四氧化三铁 (Fe_3O_4)、纳米金 (gold nanoparticles, AuNPs)、羧基化多壁碳纳米管 (carboxylated multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs-COOH) 复合纳米材料固定化呋喃它酮代谢产物3-氨基-5-多酚甲基-2-恶唑烷酮 (3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone, AMOZ) 抗体制备磁性纳米免疫传感器, 建立一种快速检测水产品中呋喃它酮代谢产物的方法。利用紫外-可见光谱和红外光谱技术对制备的纳米 Fe_3O_4 和纳米复合材料 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs}$ 的结构进行分析, 利用扫描电子显微镜和透射电子显微镜对纳米材料的微观形貌进行表征; 运用循环伏安法、电化学交流阻抗法对传感器的电化学性能进行表征, 以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 为探针, 用微分脉冲伏安法对实验条件进行优化, 优化结果如下: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs}$ 和MWCNTs-COOH体积比为1:2, 电解质溶液pH值为7.0, 抗体质量浓度为80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 孵育温度为37 $^{\circ}\text{C}$, 孵育时间为30 min。在此条件下, 该免疫响应电流与 $\lg C_{[\text{AMOZ}]}$ 在 $1.0 \times 10^{-10} \sim 8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 范围内具有良好的线性关系, 检出限为 $2.4 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$, 在鲫鱼样品实际检测中, 加标回收率为92.78%~102.61%, 与高效液相色谱-串联质谱法检测结果基本一致, 但该方法具有前处理简便、检测速度快的优势, 可用于实际水产品中呋喃它酮代谢产物AMOZ的快速检测。

关键词: 食品安全; 呋喃它酮代谢产物; 纳米免疫传感器; 水产品; 快速检测

Rapid Determination of the Furaltadone Metabolite in Aquatic Products Based on $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs}/\text{MWCNTs}-\text{COOH}$ Immunosensor

LI Ting, HE Huange, LU Hang, LI Shuguo*

(College of Food Science and Biology, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: A nano-immunosensor for the rapid determination of 3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone (AMOZ) in aquatic products was prepared by immobilizing anti-AMOZ antibodies onto a glass carbon electrode modified with a hybrid nanocomposite ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs}/\text{MWCNTs}-\text{COOH}$) consisting of magnetic ferric oxide (Fe_3O_4), gold nanoparticles (AuNPs), and carboxylated multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs-COOH). The microstructure of the prepared nanoparticles of Fe_3O_4 and $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs}$ was analyzed using ultraviolet-visible (UV-vis) spectroscopy and infrared (IR) spectroscopy, and their microscopic morphology was characterized using scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). The electrochemical performance of the prepared immunosensor was studied by cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy, and the experimental conditions were optimized by differential pulse voltammetry using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as the probe. The optimized conditions were as follows: $V(\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{AuNPs})$ to $V(\text{MWCNTs}-\text{COOH})$ ratio 1:2, electrolyte solution pH 7.0, antibody concentration 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, incubation temperature 37 $^{\circ}\text{C}$, and incubation time 30 minutes. Under these conditions, the current response of the immunosensor showed a good linear relationship with $\lg C_{[\text{AMOZ}]}$ in the range from 1.0×10^{-10} to $8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$, with a detection limit of $2.4 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$. The recovery rates of spiked crucian carp samples were between 92.78% and 102.61%, which was basically consistent with the results of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Furthermore, the immunosensor method

收稿日期: 2024-07-26

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (20876165); 河北省市场监督管理局科技计划重点项目 (2020ZD15)

第一作者简介: 李亭 (1996—) (ORCID: 0009-0004-7498-859X), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品加工中有害物质快速检测与安全控制技术。E-mail: liting1592@126.com

*通信作者简介: 李书国 (1969—) (ORCID: 0000-0001-7795-7474), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全控制及快速检测技术。E-mail: shuguolee@126.com

has the advantages of simple pre-treatment and fast detection speed, and can be used for the rapid detection of AMOZ in actual aquatic products.

Keywords: food safety; furaltadone metabolite; nano-immunosensor; aquatic product; rapid determination

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240726-256

中图分类号: TS254.7; O657.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2025) 02-0222-09

引文格式:

李亨, 何欢歌, 鲁航, 等. 基于 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{AuNPs/MWCNTs-COOH}$ 纳米免疫传感器快速测定水产品的呋喃它酮代谢产物[J]. 食品科学, 2025, 46(2): 222-230. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240726-256. <http://www.spkx.net.cn>

LI Ting, HE Huange, LU Hang, et al. Rapid determination of the furaltadone metabolite in aquatic products based on $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{AuNPs/MWCNTs-COOH}$ immunosensor[J]. Food Science, 2025, 46(2): 222-230. (in Chinese with English abstract)

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20240726-256. <http://www.spkx.net.cn>

呋喃它酮是一种硝基呋喃类抗生素药物, 广泛用于水产养殖领域的疾病防治^[1], 大剂量或长期使用呋喃它酮会对水生生物有毒性作用, 会产生致癌物、致畸物和诱变效果, 呋喃它酮在动物体内会被迅速代谢, 不易检测, 但其代谢物3-氨基-5-多酚甲基-2-恶唑烷酮(3-amino-5-methylmorpholino-2-oxazolidinone, AMOZ)在体内能稳定存在并有累积倾向, 具有潜在的致癌性和致突变性^[2-3], 因此严格监管水产品中的AMOZ残留水平具有重要意义。

对AMOZ的检测方法主要包括酶联免疫法、高效液相色谱-串联质谱法等高灵敏度方法^[4-6]。色谱法和质谱-质谱联用法虽然灵敏度高、准确度好, 但前处理时间长、检测成本高、需要训练有素的操作人员, 难以满足快速检测的要求^[7-9]; 酶联免疫法具有较高的特异性和灵敏度, 但可能出现假阳性结果。鉴于以上方法的局限性, 需要选择特异性强、稳定性好、精度高的快速检测方法, 而电化学免疫传感器法可满足要求^[10-12]。

Yu Wenlong等^[13]通过羧基化单壁碳纳米管/壳聚糖复合材料作为修饰材料, 用于检测头孢氨苄的灵敏且选择性高的电化学免疫传感器, 该免疫传感器线性范围为1~800 ng/mL, 结果表明, 所制备的电化学免疫传感器适用于定量真实样品中的头孢氨苄。Liu Su等^[14]基于石墨烯三维纳米结构/金纳米复合材料和辣根过氧化物酶纳米探针制备了电化学传感器, 应用该电化学传感器对土霉素进行了灵敏、选择性检测, 检测限为 4.98×10^{-10} g/L。电化学免疫传感器法是一种将免疫法和电化学技术巧妙结合的先进检测方法, 具有检测灵敏度高、预处理简便、特异性强等特性。特别适用于生物医学、食品安全、环境监测等多个领域的痕量分析。

本研究以 $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ 纳米金(gold nanoparticles, AuNPs)/羧基化多壁碳纳米管(carboxylated multi-walled carbon nanotubes, MWCNTs-COOH)为复合磁性纳米材料, 固定化AMOZ抗体, 制备 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{AuNPs/MWCNTs-COOH}$ 免疫传感器, 用于快速检测水产品中呋喃它酮代

谢产物AMOZ, 为水产品中AMOZ的定量测定提供一种新的方法选择。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鲫鱼(体长 (129.7 ± 9.9) mm、体质量 (200 ± 5) g)购自本地超市。

呋喃它酮代谢产物(纯度99.8%)、呋喃它酮代谢产物单克隆抗体(6.6 mg/mL) 上海安谱实验科技股份有限公司; 四氯金酸三水合物(纯度99.8%)、壳聚糖(chitosan, CS)(脱乙酰度 $\geq 90\%$) 北京索莱宝科技技术有限公司; MWCNTs-COOH(纯度 $> 95\%$) 北京德科岛金科技有限公司; N,N -二甲基甲酰胺、乙酸乙酯(均为分析纯) 天津市永大化学试剂有限公司; 铁氰化钾、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (均为分析纯) 天津市博迪化工有限公司; 实验用水为纯净水。

1.2 仪器与设备

LK8BII微机电化学分析系统 天津兰立科化学电子技术有限公司; CHI660E电化学分析仪、三电极系统(玻碳电极(glassy carbon electrode, GCE)、铂丝电极、 Ag/AgCl 电极) 上海辰华仪器有限公司; KQ3200DE数控超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司; FA2204N电子分析天平 上海菁海仪器有限公司; HH-S6电热恒温水浴锅 北京科伟永兴仪器有限公司; ST3100 pH计 奥豪斯仪器(常州)有限公司; TGL-10B台式离心机 上海安亭科学仪器厂; SHZ-B水浴恒温振荡器 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; DZF-6020真空干燥箱 上海力辰邦西仪器科技有限公司; UV-6000PC紫外-可见分光光度计 上海元析仪器有限公司; Nexus 470傅里叶变换红外光谱仪 德国珀金埃尔默有限公司; JEM-2100透射电子显微镜、JSM-7610扫描电子显微镜 日本电子株式会社; DQJ-11 A氮气减压器 青岛华青集团股份有限公司; 500-MS液相色谱-质谱联用仪 美国Varian公司。

1.3 方法

1.3.1 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH复合修饰材料的制备

1.3.1.1 Fe_3O_4 @AuNPs复合纳米粒子的制备

在磁力搅拌下将5.838 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 和2.147 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 溶解于100 mL水中,立即向溶液中加入体积分数为25%的氨水,将溶液的pH值调至10,此时体系迅速形成由 Fe_3O_4 组成的黑色沉淀,在80 °C条件下搅拌25 min,冷却至室温,借助磁铁分离沉淀。所得纳米颗粒用水洗涤和离心(5 000 r/min、20 min)3次,50 °C真空干燥24 h,得到 Fe_3O_4 纳米颗粒^[15]。

所有玻璃器皿在使用前用新配制的王水溶液($\text{HNO}_3:\text{HCl}=1:3$, V/V)浸泡一夜,并用去离子水冲洗干净。取10 mg制备好的 Fe_3O_4 纳米颗粒,溶解于10 mL质量分数0.5%的壳聚糖-醋酸溶液(体积分数为10%)中,混合均匀,超声处理2 h。壳聚糖可以在80 °C条件下将 Au^{3+} 还原为纳米金粒子,下一步将15 mL 0.5 mg/mL的四氯金酸三水合物溶液加入上述超声的混合溶液中,室温振荡30 min,随后将温度升高至80 °C,恒温振荡2 h,观察到溶液颜色变为酒红色,反应结束,冷却至室温后4 °C保存待用^[16]。

1.3.1.2 MWCNTs-COOH悬浮液的制备

取0.01 g MWCNTs-COOH加入到10 mL N,N -二甲基甲酰胺中,超声分散10 min,制得均匀分散的MWCNTs-COOH悬浮液。

分别取MWCNTs-COOH悬浮液、 Fe_3O_4 @AuNPs悬浮液各1 mL,混合均匀后超声10 min,制得 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH复合修饰液,4 °C保存待用。

1.3.2 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH复合修饰材料的表征

1.3.2.1 紫外-可见光谱测定

采用1.3.1.1节中的方法制备 Fe_3O_4 @AuNPs溶液,将制得的 Fe_3O_4 @AuNPs溶液稀释一定倍数后,在400~700 nm范围内进行紫外-可见光谱扫描。

1.3.2.2 红外光谱测定

取适量 Fe_3O_4 颗粒和 Fe_3O_4 @AuNPs溶液,烘干后在4 000~400 cm^{-1} 范围内进行红外光谱扫描,观察颗粒的特征。

1.3.2.3 微观结构观察

利用扫描电子显微镜对制备的AuNPs颗粒进行粒径分布分析。

利用透射电子显微镜对 Fe_3O_4 颗粒和 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH复合纳米颗粒的形貌、尺寸和粒径分布进行研究。

1.3.3 电化学免疫传感器的制备

1.3.3.1 GCE预处理

将GCE(直径3 mm)用 Al_2O_3 粉末(粒径0.05 μm)打磨抛光成镜面,然后再依次在50%硝酸溶液、无水乙醇、去离子水中分别清洗3 min,氮气吹干待用。

1.3.3.2 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH免疫传感器的制备

检测AMOZ的免疫传感器制备流程如图1所示。采用三电极系统,以经过预处理的GCE为工作电极、Ag/AgCl电极为参比电极、铂丝电极为辅助电极。取5 μL 的 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH复合修饰液固定在电极表面,红外灯烤干后滴加5 μL AMOZ抗体(Anti-AMOZ),37 °C条件下温育30 min,冲洗后滴加5 μL 质量分数为1%的牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)溶液,4 °C条件下封闭30 min,制得Anti-AMOZ/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH修饰的纳米免疫传感器,4 °C条件下保存备用。

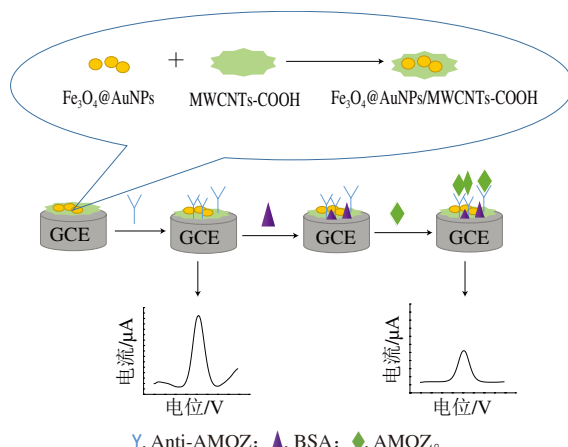


图1 AMOZ免疫传感器制备流程

Fig. 1 Preparation process of AMOZ immunosensor

1.3.4 电化学分析

在电化学分析方法中,以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 为探针,0.1 mol/L KCl溶液和0.2 mol/L磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(pH 7.0)为底液,针对电极在修饰以及免疫过程中的电化学特征,运用循环伏安(cyclic voltammetry, CV)法和电化学阻抗(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)法记录探针氧化峰电流值。

将AMOZ标准品配制浓度为0、 1×10^{-10} 、 2×10^{-9} 、 4.5×10^{-9} 、 9×10^{-9} 、 4×10^{-8} 、 1.8×10^{-7} 、 8×10^{-7} mol/L的溶液,滴涂在制备好的纳米免疫传感器表面,在恒温恒湿箱中孵育(37 °C、30 min)后冲洗去掉多余的AMOZ得到AMOZ/Anti-AMOZ/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH电极,在优化条件下运用差分脉冲伏安法(differential pulse voltammetry, DPV)(电位: -0.2~0.6 V)测定信号探针氧化峰电流值,计算不同浓度的AMOZ标准品孵育前后的免疫响应电流差值(ΔI)。将 $-\lg C_{[\text{AMOZ}]}$ 作为自变量, ΔI 作为因变量,通过分析 ΔI 与不同AMOZ浓度($C_{[\text{AMOZ}]}$)对应的 $-\lg C_{[\text{AMOZ}]}$ 之间的关系,建立标准曲线方程。

1.3.5 实验条件优化

1.3.5.1 修饰液配比的优化实验

将 Fe_3O_4 @AuNPs修饰液和MWCNTs-COOH悬浮液按照体积比为1:3、1:2、1:1、2:1、3:1的比例混合均匀,超声10 min,采用CV法扫描并记录氧化还原峰电流值变化,得到 Fe_3O_4 @AuNPs修饰液和MWCNTs-COOH的最佳体积比。

1.3.5.2 电解质溶液pH值的优化实验

将制备好的免疫传感器在pH值为6.0、6.5、7.0、7.5和8.0的PBS中进行CV扫描,记录探针峰电流的变化。

1.3.5.3 抗体质量浓度的优化实验

在免疫传感器制备过程中,将AMOZ抗体分别以40、60、80、100、120 $\mu\text{g/mL}$ 滴涂在修饰电极表面,随后与同一质量浓度AMOZ孵育后采用DPV扫描并记录免疫前后的峰电流值变化。

1.3.5.4 孵育温度的优化实验

抗原抗体分别在温度27、32、37、42、47 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育30 min,运用DPV扫描并记录免疫前后的峰电流值变化。

1.3.5.5 孵育时间的优化实验

抗原抗体在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,分别孵育10、20、30、40、50 min,DPV扫描并记录免疫前后的峰电流值变化。

1.3.6 样品处理及检测

1.3.6.1 样品处理

选用6条健康鲫鱼幼鱼。将一定浓度的呋喃它酮与鱼饲料混合均匀,每天的喂食与停喂时间均为12 h。同时设立空白对照组,实验室驯养一周,一周后对空白对照组和食用目标药物的鲫鱼样品进行检测。

从样品中取可食用部分,捣碎均匀,准确称取1.0 g肉糜,加入4 mL 0.2 mol/L HCl溶液,8 000 r/min离心10 min,加入约3 mL K_2HPO_4 溶液,调整pH值为7.4左右。加入10 mL乙酸乙酯后室温振荡摇匀15 min,8 000 r/min离心10 min,收集乙酸乙酯层5 mL,氮气吹干,加入2 mL 0.01 mol/L PBS复溶,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待测。

1.3.6.2 样品检测

吸取待测样品5 μL 滴涂在制备好的纳米免疫传感器上,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育30 min,采用DPV扫描记录免疫传感器免疫反应前后的峰电流,将免疫响应电流 ΔI 代入线性回归方程,求得鲫鱼样品中AMOZ的浓度。

1.3.6.3 加标回收实验

在经1.3.6.1节处理后的样品中分别加入0、 1×10^{-7} 、 2×10^{-7} 、 6×10^{-7} mol/L 4个AMOZ加标水平,空白样品中分别加入0、 3×10^{-9} 、 9×10^{-9} 、 5×10^{-8} mol/L 4个加标水平。在最优检测条件下利用Anti-AMOZ/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH免疫传感器进行DPV扫描,记录信号探针氧化电流值,代入线性回归方程计算加标回收率。

1.3.6.4 高效液相色谱-串联质谱法测定

采用高效液相色谱-串联质谱法^[17]对空白对照组以及食用目标药物后的鲫鱼样品中AMOZ的残留进行检测。

1.3.7 免疫传感器的特异性、重复性与稳定性

1.3.7.1 免疫传感器的特异性

将Anti-AMOZ/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE传感器分别与AMOZ (5.5×10^{-10} mol/L)和4种干扰物质(呋喃唑酮代谢产物3-氨基-2-恶唑烷酮(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)、氨基脒(semicarbazide, SEM)、孔雀石绿(malachite green, MG)和隐孔雀石绿(leucoma-lechite green, LMG))孵育,干扰物质的浓度为 5.5×10^{-9} mol/L。DPV扫描,得到电流变化值 ΔI 。

1.3.7.2 免疫传感器的重复性

制备12支Anti-AMOZ/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE传感器,在相同的条件下,对同一浓度的AMOZ进行DPV检测,连续扫描20次,计算 ΔI 值的相对标准偏差。

1.3.7.3 免疫传感器的稳定性

制备好的免疫传感器在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存7、14、21、28 d后,采用DPV扫描,计算 ΔI 值。

1.4 数据统计与分析

测定结果为3次平行实验取其平均值,运用SPSS软件进行数据统计分析,利用Origin Pro v9.0软件绘制相关数据图。

2 结果与分析

2.1 Fe_3O_4 @AuNPs复合修饰材料的表征

2.1.1 紫外-可见光谱和红外光谱分析

Fe_3O_4 @AuNPs的紫外-可见光谱如图2A所示。合成的复合 Fe_3O_4 @AuNPs溶液在525 nm处有一个明显的特征吸收峰, Fe_3O_4 在整个紫外-可见范围内吸收光的能力较为均匀,没有显著的峰值或谷值^[18]。而当金纳米结构与光相互作用时,自由电子会集体振荡,导致在近红外至可见光范围内光吸收显著增强,发生等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)现象,在525 nm左右产生一个明显的特征吸收峰,证实了 Fe_3O_4 @AuNPs的成功合成^[19]。

合成的 Fe_3O_4 纳米颗粒和 Fe_3O_4 @AuNPs颗粒的红外光谱如图2B所示,1 588 cm^{-1} 和1 376 cm^{-1} 处是附着在铁原子表面的O—H键的对称和非对称模式的振动峰^[20],尽管纳米颗粒本身不含有O—H键,但在制备 Fe_3O_4 @AuNPs复合材料的过程中,引入的有机物中可能含有O—H键^[21]。539 cm^{-1} 处是 Fe_3O_4 纳米粒子的Fe—O键的伸缩振动峰^[22],大部分 Fe_3O_4 纳米颗粒的Fe—O键的伸缩振动峰在570 cm^{-1} 处,但由于本研究制备的 Fe_3O_4 纳米颗粒尺寸

小,影响了Fe—O键的振动频率,导致特征峰位置发生蓝移,即峰位置向更短的波长移动^[23]。AuNPs颗粒由于其特殊的结构在4 000~400 cm^{-1} 范围内没有吸收,Fe₃O₄@AuNPs复合材料在4 000~400 cm^{-1} 范围内没有观察到除了预期的Fe₃O₄相关峰之外的其他杂峰,表明没有引入除了AuNPs之外的杂质或未预期的化学组分,综上表明Fe₃O₄@AuNPs颗粒已成功制备。

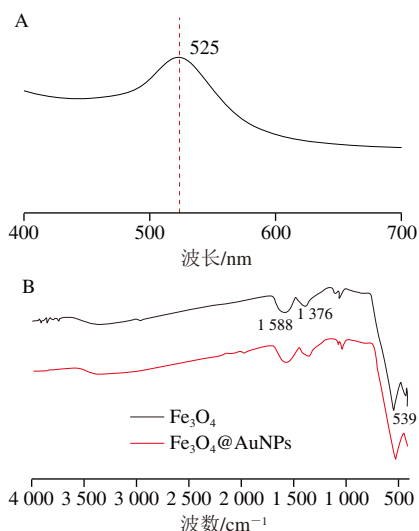


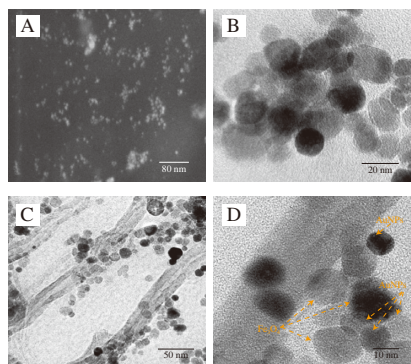
图2 Fe₃O₄@AuNPs紫外-可见光谱(A)和红外光谱(B)

Fig. 2 UV-vis (A) and IR (B) spectra of Fe₃O₄@AuNPs

2.1.2 电子显微镜表征

如图3A所示, AuNPs呈现出良好的单分散性,经CS还原而成的AuNPs颗粒的粒径约为10 nm,与文献[21-22]结果相符。

利用透射电子显微镜对Fe₃O₄颗粒和Fe₃O₄@AuNPs/MWCNTs-COOH复合纳米颗粒的形貌、尺寸和粒径分布进行研究。如图3B所示, Fe₃O₄颗粒呈规则球形,并具有较好的分散性,尺寸约为17 nm。如图3C和图3D所示, Fe₃O₄颗粒和Fe₃O₄@AuNPs颗粒均匀分布在呈管状的MWCNTs-COOH周围,与文献[23-24]结果相符。



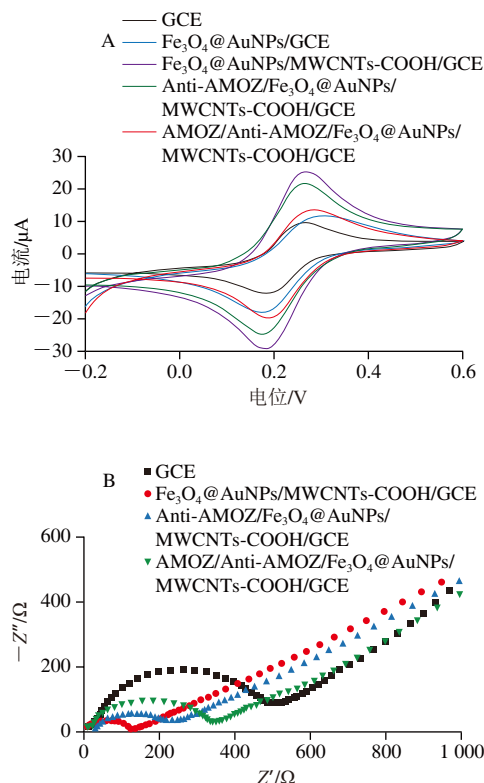
A. AuNPs颗粒的扫描电子显微镜图; B. Fe₃O₄的透射电子显微镜图; C和D. Fe₃O₄@AuNPs/MWCNTs-COOH在不同观察倍数下的透射电子显微镜图。

图3 修饰材料的电子显微镜图

Fig. 3 SEM and TEM micrographs of modified materials

2.2 免疫传感器的表征

在电解质溶液中记录了不同传感器的CV曲线,如图4A所示, GCE上出现了探针的特征氧化还原峰,与GCE相比, Fe₃O₄@AuNPs的峰电流明显增大,这是因为Fe₃O₄@AuNPs高比表面积和高导电性可以加速传质速率,当修饰MWCNTs-COOH之后,电流进一步增大,表明MWCNTs-COOH的存在进一步增大了传质速率。与修饰电极Fe₃O₄@AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE相比,添加Anti-AMOX后的电极上探针的氧化还原峰电流明显降低,这是由于被固载的抗体蛋白阻断了探针[Fe(CN)₆]^{3-/4-}与电极表面之间的电子转移,进而造成电流下降;与抗原AMOX孵育30 min后,免疫传感器的免疫响应电流进一步降低,原因是形成了抗原-抗体复合物,进一步阻碍了电极表面电子的转移速度,这表明Fe₃O₄@AuNPs/MWCNTs-COOH、Anti-AMOX和AMOX已成功固载在电极表面。



A.不同修饰电极的CV图; B.不同修饰电极的交流阻抗图。

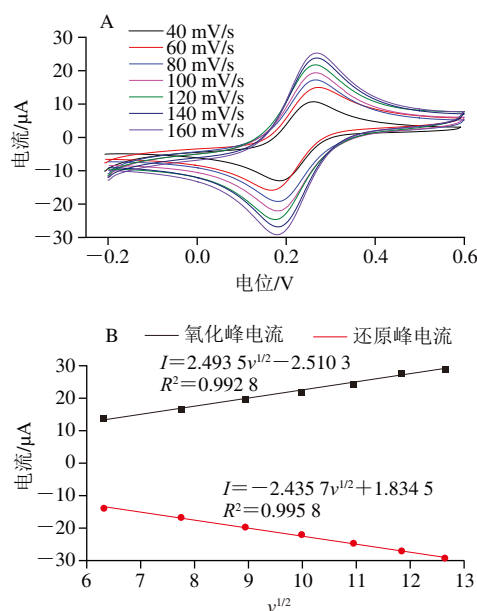
图4 免疫传感器的表征

Fig. 4 Characterization of immunosensors

EIS法可以分析电极表面电阻的变化,是检测电化学传感器组装过程的一种重要手段。在0.1 mol/L KCl和5 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-}的混合溶液中,记录了交流电压幅值为0.007 V、起始频率为1×10⁶ Hz、结束频率为0.1 Hz的EIS曲线。如图4B所示,与裸电极GCE相比, Fe₃O₄@AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE的阻抗较小,证明

该修饰材料不仅具有优异导电性,也能促进电子的传质。当传感器组装Anti-AMTZ后,电极的电阻增大,这是因为由抗体组成的蛋白膜阻碍了电极表面的电子传递,增加了电阻。最后将抗原AMTZ修饰在电极上,电极的阻抗进一步增大,表明抗原抗体复合物进一步阻碍了电流传递。图4B中所示的结果与CV法图4A的实验结果一致。

为确定免疫传感器对AMTZ的定量测定过程是受扩散控制的过程,对制得的Anti-AMTZ/Fe₃O₄@AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE进行扫描速率研究,将免疫传感器在不同扫描速率下进行CV扫描。如图5A所示,随着扫描速率的增加,CV峰电流逐渐增大,且CV峰电流大小与扫描速率的平方根有良好的线性关系(图5B),表明此免疫传感器检测过程是一个浸渗控制的过程。



A. 不同扫描速度对免疫传感器响应电流的影响;

B. CV峰电流大小与扫描速率平方根的关系。

图5 免疫传感器在不同扫描速度下的CV图

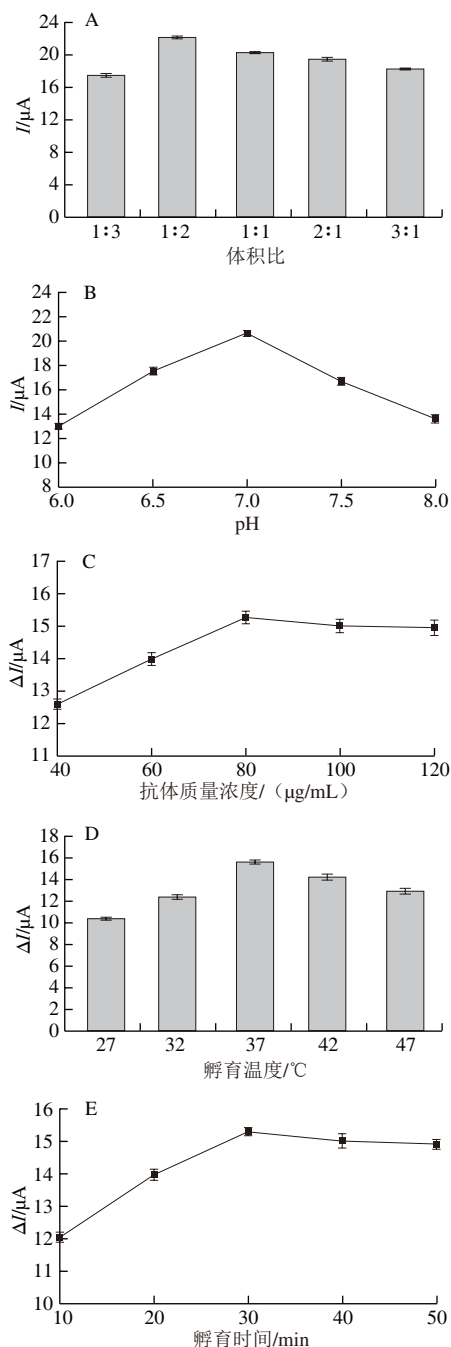
Fig. 5 Cyclic voltammetry plots of immunosensor at different scanning speeds

2.3 实验条件优化

2.3.1 修饰液配比对免疫响应电流的影响

将Fe₃O₄@AuNPs修饰液与MWCNTs-COOH悬浮液按照体积比为1:3、1:2、1:1、2:1和3:1的比例混合均匀,取5 μL滴涂在GCE表面,运用CV法观察修饰液比对免疫传感器CV峰电流的影响,结果如图6A所示。体积比为1:2时,免疫传感器的CV峰电流值最大,这归因于Fe₃O₄@AuNPs的磁性、高导电性和MWCNTs-COOH大比表面积的特点,由于Fe₃O₄@AuNPs修饰液具有磁性,Fe₃O₄@AuNPs可以使MWCNTs-COOH更好地附着在电极

表面,两者适宜的比例对增大氧化还原探针的峰电流可以起到协同的作用,当两者以体积比为1:2混合时,能达到良好的增大电信号的效果。当增大MWCNTs-COOH占比,探针的CV峰电流减小,这是由于电极上修饰膜厚度增加,阻碍电子的传质。因此选择Fe₃O₄@AuNPs和MWCNTs-COOH体积比为1:2作为最优比例。



A. 修饰液配比; B. 底液 pH 值; C. 抗体质量浓度; D. 孵育温度; E. 孵育时间。

图6 不同实验条件对免疫传感器响应电流的影响

Fig. 6 Impacts of different experimental conditions on the current response of immunosensors

2.3.2 电解质溶液pH值对免疫响应电流的影响

在免疫传感器构建过程中,测试底液pH值的选择对抗原和抗体的存活率以及电化学信号有至关重要的影响。不同pH值的测试底液的CV峰值电流变化如图6B所示,pH值为7.0时,免疫传感器的电化学信号最大,这归因于强碱性或强酸性的pH值会破坏固定化蛋白的活性和稳定性。因此,选择7.0为最佳pH值。

2.3.3 抗体质量浓度对免疫响应电流的影响

AMoz抗体的质量浓度在免疫传感器定量检测AMoz中起重要作用。在1.0 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$ +0.1 mol/L KCl+0.2 mol/L PBS (pH 7.0) 中研究不同AMoz抗体质量浓度在免疫反应前后的DPV电流差,结果如图6C所示。 ΔI 随着抗体质量浓度的增加,先增大后逐渐平缓,当质量浓度达到80 $\mu\text{g/mL}$ 后, ΔI 趋于稳定,这是由于电极只能负载一定数量的信号标签,当Anti-AMoz在电极表面达到饱和时,与抗原AMoz之间的特异性结合亦趋于饱和,因此免疫响应电流值的变化不再显著。因此, Anti-AMoz的最佳质量浓度为80 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.4 孵育温度对免疫响应电流的影响

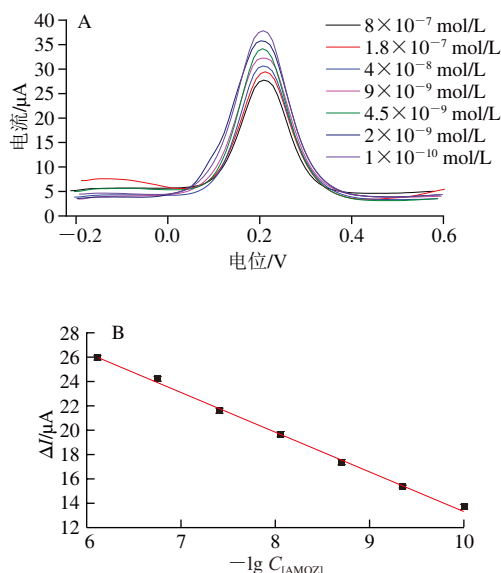
为了研究免疫反应中孵育温度对免疫传感器的影响,将Anti-AMoz/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE经BSA封闭后,与抗原AMoz在27~47 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育, ΔI 随孵育温度的变化如图6D所示。在37 $^{\circ}\text{C}$ 有最大的免疫响应电流值,继续升高温度, ΔI 开始减小,这是因为高温会破坏负载在电极表面抗原-抗体复合物的稳定性。因此,选择37 $^{\circ}\text{C}$ 作为最佳的孵育温度。

2.3.5 孵育时间对免疫响应电流的影响

免疫传感器的电化学信号受抗原抗体孵育时间的影响,抗原与抗体在传感器表面发生特异性反应时,需要一定的时间才能形成免疫复合物。如图6E所示, ΔI 随着孵育时间的延长而增大,30 min后趋于稳定,表明30 min时免疫反应基本完成。因此选择30 min为最佳孵育时间。

2.4 AMoz标准曲线

在优化条件下研究免疫传感器的检测性能,以 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 为信号探针,采用DPV法检测不同浓度AMoz标准品的DPV扫描曲线,如图7A所示,免疫响应电流值随抗原AMoz浓度的增加而降低,表明抗原-抗体复合物的形成会抑制探针在测试底液中氧化峰电流信号的表达。以不同浓度免疫响应电流值(ΔI)为纵坐标,不同浓度的AMoz标准溶液对应的 $-\lg C_{[AMoz]}$ 为横坐标进行线性回归拟合,如图7B所示, ΔI 与 $-\lg C_{[AMoz]}$ 在 $1.0 \times 10^{-10} \sim 8.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ 范围内呈良好的线性关系,线性回归方程为 $\Delta I = 3.262 \lg C_{[AMoz]} + 45.945$, $R^2 = 0.9975$,检出限($R_{SN}=3$)为 $2.4 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ 。



A.不同浓度的AMoz标准溶液的DPV曲线;
B.免疫响应峰电流差与AMoz的线性关系图。

图7 AMoz标准曲线

Fig. 7 Standard curve for quantitation of AMoz

2.5 免疫传感器的特异性、重复性与稳定性

通过比较特异性蛋白AMoz与水产品中可能存在的干扰物质的响应电流来研究免疫传感器的选择性,结果见图8, AOZ、SEM、MG和LMG免疫响应电流值的变化远小于特异性蛋白AMoz,表明制备的免疫传感器特异性较好。

在相同的条件下,12支免疫传感器对同一浓度的AMoz进行DPV检测,连续扫描20次, ΔI 值的相对标准偏差均小于5%,确保了每一批传感器的免疫响应电流的相对标准偏差都在误差范围之内。结果表明,该免疫传感器具有良好的重复性^[25]。

制备好的免疫传感器在7、14、21、28 d后检测的平均响应电流值分别维持在初始 ΔI 的97.51%、95.29%、93.98%、92.4%,说明抗体的活性会受保存时间的影响,该免疫传感器在放置了一定时间后,免疫响应电流略有下降但基本上在误差范围内,表明构建的免疫传感器具有良好的稳定性。

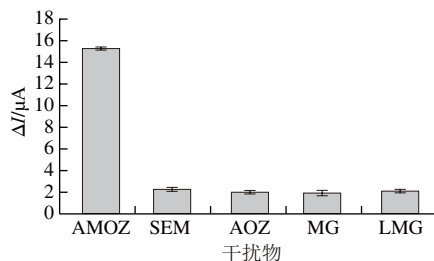


图8 免疫传感器的特异性测定

Fig. 8 Specificity analysis of immunosensors

2.6 样品检测及其加标回收实验

2.6.1 纳米免疫传感器检测及其加标回收实验

对实际鲫鱼样品进行不同AMOZ浓度的加标回收实验,每个浓度平行测定5次,代入线性回归方程计算最终浓度,结果见表1。采用电化学纳米免疫传感器测定鲫鱼样品的回收率在92.78%~102.61%之间,相对标准偏差在1.09%~2.52%之间,表明该方法的测定结果准确可靠,可用于实际样品检测。

表1 样品中AMOZ测定结果及其加标回收率
Table 1 Recovery rates of AMOZ from spiked samples

样品	加标量/(mol/L) (n=5)	测定值/ (mol/L)	平均 回收率/%	相对标准 偏差/%
	0	0	—	—
空白对照 样品	3×10^{-9}	2.86×10^{-9}	95.33	1.09
	9×10^{-9}	9.15×10^{-9}	101.67	1.53
	5×10^{-8}	4.87×10^{-8}	97.40	2.28
	0	1.77×10^{-7}	—	—
阳性 样品1	1×10^{-7}	2.57×10^{-7}	92.78	1.37
	2×10^{-7}	3.64×10^{-7}	96.55	1.87
	6×10^{-7}	7.71×10^{-7}	99.23	2.52
	0	1.30×10^{-7}	—	—
阳性 样品2	1×10^{-7}	2.36×10^{-7}	102.61	2.12
	2×10^{-7}	3.18×10^{-7}	96.36	1.22
	6×10^{-7}	7.24×10^{-7}	99.18	1.31

注:—.加标量为0,数据无法计算。

2.6.2 实际样品AMOZ的检测

采用高效液相色谱-串联质谱法测定样品,得到的检测结果如表2所示。采用1.3.6.1节处理后的样品,用本方法构建的Anti-AMOZ/ Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH/GCE传感器进行检测,与高效液相色谱-串联质谱法的检测结果进行比对,两者基本一致,本法的检测结果略低于高效液相色谱-串联质谱法。

表2 鲫鱼样品检测结果
Table 2 Results of AMOZ detection in carp samples

样品	保留 时间/min	响应值	高效液相色谱-串联质谱法 检测结果/(ng/mL)	本法检测结果/ (ng/mL)
空白对照样品	2.223	0	0	0
阳性样品1	2.287	34 404	41.182 9	35.524 8
阳性样品2	2.295	28 620	30.667 2	26.239 4

本法与其他方法对比结果如表3所示。其他常用的方法包括色谱法、酶联免疫法。尽管液相色谱技术在样品分析中应用广泛,但设备成本昂贵,预处理复杂,在提取、分离方面较为严格,且试剂使用量大、检测时间长;酶联免疫法检测用时短,但检测限高,检测精度不高,容易出现假阳性或假阴性的结果。同时与其他方法作比较发现,本法建立的电化学免疫传感器对AMOZ的检出限更低,电化学免疫传感器在检测时表现出了快速、经济且操作简便的优势。

表3 不同方法检测样品中AMOZ对比

Table 3 Comparison of different methods for AMOZ detection in samples

检测方法	样品	线性范围	检出限	回收率/%	参考文献
表面增强拉曼光谱法	鸭肉	0.5~12 mg/L	0.5 mg/L	97.2~119.1	[26]
侧向免疫层析法	水产品	—	9.45×10^{-10} mol/L	96.0~102.6	[27]
酶联免疫吸附法	虾肉	2.90~53.28 $\mu\text{g/L}$	1.48 $\mu\text{g/L}$	74.3~86.6	[28]
超高效液相色谱法	鱼类	1~20 $\mu\text{g/kg}$	0.29 $\mu\text{g/kg}$	89.8~101.9	[29]
高效液相色谱-串联质谱法	水产品	—	0.1 $\mu\text{g/kg}$	91.6~107.3	[30]
电化学传感器	水样	5.0×10^{-8} ~ 5.0×10^{-6} mol/L	1.2×10^{-8} mol/L	94.5~104.5	[31]
电化学免疫传感器	鲫鱼	1.0×10^{-10} ~ 8.0×10^{-7} mol/L	2.4×10^{-11} mol/L	92.78~102.61	本法

注:—.缺失数据。

3 结 论

通过采用加碱法制备了 Fe_3O_4 颗粒,并经CS还原制得 Fe_3O_4 @AuNPs复合修饰液,与MWCNTs-COOH悬浮液混合制得 Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH修饰液。紫外-可见光谱和红外光谱分析发现合成的复合 Fe_3O_4 @AuNPs溶液在525 nm处有AuNPs的特征吸收峰,表明AuNPs颗粒成功包裹在 Fe_3O_4 颗粒表面;电子显微镜显示 Fe_3O_4 @AuNPs颗粒呈球状均匀分布在MWCNTs-COOH周围,表明 Fe_3O_4 @AuNPs纳米材料已成功制备;采用CV法和交流阻抗法进行电化学表征,结果表明该纳米免疫传感器具有良好的特异性、稳定性和重复性;通过DPV法优化了传感器的性能,在优化条件下,该方法对AMOZ的检测范围为 1.0×10^{-10} ~ 8.0×10^{-7} mol/L,检出限为 2.4×10^{-11} mol/L。在鲫鱼阳性样品检测中,该方法的加标回收率位于92.78%~102.61%之间,经高效液相色谱-串联质谱法验证,结果基本一致,但该法具有前处理简便、特异性好、精测精度高、检测速度快的优势。可用于实际水产品中呋喃它酮代谢产物残留量的快速检测。

Fe_3O_4 @AuNPs/MWCNTs-COOH磁性纳米材料不仅具备良好的生物相容性,同时还拥有富集待测物质的能力,确保了即使在低浓度下也能准确检测到目标物质。相较于传统检测方法,本法具有样品预处理过程简单快捷、检测时间短、灵敏度高的优势。然而,工业化制备电极及现场检测仪器的研究仍然是一个挑战。为了克服这一难题,可以通过批量化生产检测传感器,并开发专用的现场检测设备,以实现现场检测和在线检测。未来可进一步研究将该修饰材料用于固定化其他待测物质的分子识别元件,例如孔雀石绿、抗生素残留等,拓展传感器的应用范围,以期实现对更多种类物质的高效检测,从而更好地服务于水产品安全、环境保护等领域。

参考文献:

- [1] ZHU X D, ZHANG K, WANG Y, et al. Fluorescent metal-organic framework (MOF) as a highly sensitive and quickly responsive chemical sensor for the detection of antibiotics in simulated wastewater[J]. *Inorganic Chemistry*, 2018, 57(3): 1060-1065. DOI:10.1021/acs.inorgchem.7b02471.
- [2] ZHANG Z W, WU Y P, LI X W, et al. Multi-class method for the determination of nitroimidazoles, nitrofurans, and chloramphenicol in chicken muscle and egg by dispersive-solid phase extraction and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*, 2017, 217: 182-190. DOI:10.1016/j.foodchem.2016.08.097.
- [3] WU W, SUN N, ZHU S M, et al. Ultrasensitive strips for the quadruple detection of nitrofurantol metabolite residues[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(5): 2812-2815. DOI:10.1039/c8ra10589h.
- [4] WU W L, YANG S Y, LIU J L, et al. Progress in immunoassays for nitrofurans detection[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2020, 31(1): 907-926. DOI:10.1080/09540105.2020.1786672.
- [5] DING X, LIU L Q, SONG S S, et al. Rapid and ultrasensitive detection of 3-amino-2-oxazolidinone in catfish muscle with indirect competitive enzyme-linked immunosorbent and immunochromatographic assays[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(3): 463-475. DOI:10.1080/09540105.2017.1297778.
- [6] KWON J W. Semicarbazide: natural occurrence and uncertain evidence of its formation from food processing[J]. *Food Control*, 2017, 72: 268-275. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.02.022.
- [7] LUO X Z, SUN Z W, WANG X, et al. Determination of nitrofurantol metabolites in marine products by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with microwave-assisted derivatization[J]. *New Journal of Chemistry*, 2019, 43(6): 2649-2657. DOI:10.1039/C8NJ05479G.
- [8] VANDER HEYDEN Y, NIJHUIS A, SMEYERS-VERBEKE J, et al. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, 24(5/6): 723-753. DOI:10.1016/S0731-7085(00)00529-X.
- [9] YU Y X, LI N, JIN Q Q, et al. Novel fluorescence labeling reagent 4-(carbazole-9-yl)-benzyl chloroformate and its application in the determination of nitrofurantol metabolites compounds in foodstuffs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Microchemical Journal*, 2019, 145: 9-17. DOI:10.1016/j.microc.2018.10.021.
- [10] FERNANDO R, MUNASINGHE D M S, GUNASENA A R C, et al. Determination of nitrofurantol metabolites in shrimp muscle by liquid chromatography-photo diode array detection[J]. *Food Control*, 2017, 72: 300-305. DOI:10.1016/j.foodcont.2015.08.044.
- [11] PARK M. Orientation control of the molecular recognition layer for improved sensitivity: a review[J]. *BioChip Journal*, 2019, 13(1): 82-94. DOI:10.1007/s13206-019-3103-0.
- [12] MIN P. Surface display technology for biosensor applications: a review[J]. *Sensors*, 2020, 20(10): 2775. DOI:10.3390/s20102775.
- [13] YU W L, SANG Y X, WANG T Y, et al. Electrochemical immunosensor based on carboxylated single-walled carbon nanotube-chitosan functional layer for the detection of cephalixin[J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(2): 1001-1011. DOI:10.1002/fsn3.1382.
- [14] LIU S, WANG Y, XU W, et al. A novel sandwich-type electrochemical aptasensor based on GR-3D Au and aptamer-AuNPs-HRP for sensitive detection of oxytetracycline[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 88: 181-187. DOI:10.1016/j.bios.2016.08.019.
- [15] BAGHAYERI M, AMIRI A, MALEKI B, et al. A simple approach for simultaneous detection of cadmium(II) and lead(II) based on glutathione coated magnetic nanoparticles as a highly selective electrochemical probe[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 273: 1442-1450. DOI:10.1016/j.snb.2018.07.063.
- [16] 曾齐. 电化学传感器超灵敏检测鸡蛋清S-卵白蛋白与卵类粘蛋白的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- [17] 国家质量监督检验检疫总局, 国家标准化管理委员会. 动物源性食品中硝基咪唑类药物代谢物残留量检测方法高效液相色谱/串联质谱法: GB/T 21311—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007: 16.
- [18] 彭菊村, 吴波英, 陈杰. Fe₃O₄/Au磁性纳米复合微粒的制备及表征[J]. *稀有金属材料与工程*, 2008, 37(3): 504-508. DOI:10.3321/j.issn:1002-185X.2008.03.030.
- [19] 王超男, 方靖淮. Fe₃O₄@Au纳米材料的制备和光谱性质[J]. *光谱实验室*, 2011, 28(4): 1869-1872. DOI:10.3969/j.issn.1004-8138.2011.04.072.
- [20] LUO S Z, ZHENG X X, XU H, et al. Magnetic nanoparticle-supported Morita-Baylis-Hillman catalysts[J]. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2007, 349(16): 2431-2434. DOI:10.1002/adsc.200700318.
- [21] IZADIYAN Z, SHAMELI K, MIYAKE M, et al. Green fabrication of biologically active magnetic core-shell Fe₃O₄/Au nanoparticles and their potential anticancer effect[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2019, 96: 51-57. DOI:10.1016/j.msec.2018.11.008.
- [22] KASSAEE M Z, MASROURI H, MOVAHEDI F. Sulfamic acid-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as an efficient and reusable catalyst for one-pot synthesis of α -amino nitriles in water[J]. *Applied Catalysis A: General*, 2011, 395(1/2): 28-33. DOI:10.1016/j.apcata.2011.01.018.
- [23] KABIRAJ A, RATH S. Green synthesis of silver nanoparticles: their optical and rheological properties[J]. *Journal of Physics: Conference Series*, 2023, 2663(1): 012026. DOI:10.1088/1742-6596/2663/1/012026.
- [24] XU X H, QI X, WANG X Q, et al. Highly efficient enzyme immobilization by nanocomposites of metal organic coordination polymers and carbon nanotubes for electrochemical biosensing[J]. *Electrochemistry Communications*, 2017, 79: 18-22. DOI:10.1016/j.elecom.2017.04.011.
- [25] WANG Y G, WANG Y L, WU D, et al. Label-free electrochemical immunosensor based on flower-like Ag/MoS₂/rGO nanocomposites for ultrasensitive detection of carcinoembryonic antigen[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 255: 125-132. DOI:10.1016/j.snb.2017.07.129.
- [26] 郭红青, 刘木华, 袁海超, 等. 应用表面增强拉曼光谱法快速检测鸭肉中呋喃它酮代谢物残留[J]. *分析实验室*, 2017, 36(10): 1141-1145. DOI:10.13595/j.cnki.issn1000-0720.2017.0245.
- [27] MEI Q, MA B, LI J L, et al. Simultaneous detection of three nitrofurantol antibiotics by the lateral flow immunoassay based on europium nanoparticles in aquatic products[J]. *Food Chemistry*, 2024, 439: 138171. DOI:10.1016/j.foodchem.2023.138171.
- [28] 杨武英, 王弘, 洪艳平, 等. 呋喃它酮代谢物单抗抗体制备和酶联免疫分析方法[J]. *食品科学*, 2020, 41(24): 251-258. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190817-191.
- [29] WANG K K, KOU Y L, WANG M, et al. Determination of nitrofurantol metabolites in fish by ultraperformance liquid chromatography-photodiode array detection with thermostatic ultrasound-assisted derivatization[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(30): 18887-18893. DOI:10.1021/acsomega.0c02068.
- [30] YUAN G X, ZHU Z, YANG P, et al. Simultaneous determination of eight nitrofurantol residues in shellfish and fish using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 92: 103540. DOI:10.1016/j.jfca.2020.103540.
- [31] SHI S C, CAO G J, CHEN Y M, et al. Facile synthesis of core-shell Co-MOF with hierarchical porosity for enhanced electrochemical detection of furaltadone in aquaculture water[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2023, 1263: 341296. DOI:10.1016/j.aca.2023.341296.