

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241014004

引用格式: 朱青, 曹美萍, 任兴发, 等. 全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法对食品中黄曲霉毒素 B₁ 检测结果的影响比对[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(8): 93-99.

ZHU Q, CAO MP, REN XF, *et al.* Effect and comparison of detection results of aflatoxin B₁ in foods by fully automated immunomagnetic bead purification method and immunoaffinity column method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(8): 93-99. (in Chinese with English abstract).

全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法对食品中黄曲霉毒素 B₁ 检测结果的影响比对

朱青¹, 曹美萍¹, 任兴发^{2,3}, 陈睿¹, 邵锋伟², 胡桂霞¹, 石春红^{1*}

[1. 上海市松江食品药品检验所, 上海 201306; 2. 月旭科技(上海)股份有限公司, 上海 201613;
3. 上海理工大学, 上海食品快速检测工程技术研究中心, 上海 200093]

摘要: **目的** 采用全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法对大米、小麦制品、花生制品等多种基质进行前处理, 检测其黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxin, AFB₁)含量, 并比较两种前处理方法的检测结果。**方法** 样品经甲醇:水(70:30, V:V)提取后, 一部分提取液采用免疫亲和柱法经 AFB₁ 专用免疫亲和柱净化, 另取一部分提取液采用搭配免疫磁珠试剂盒的全自动免疫磁珠纯化仪进行前处理, 最后都采用高效液相色谱法-柱后衍生法进行检测。**结果** 免疫磁珠纯化试剂盒效能和免疫亲和柱柱效均大于 95%, 皆能满足实验要求。在质量浓度为 1.00~50.00 ng/mL 的线性范围内, 线性相关系数(r)为 0.99993, 线性关系良好。在大米基质中进行 3 水平加标回收率实验($n=6$), 两种前处理方法回收率范围为 98.2%~106.0%, 相对标准偏差为 1.0%~5.0%; 在小麦制品中进行单水平加标回收率实验($n=6$), 回收率超过 80%, 相对标准偏差为 3.7%~7.2%。AFB₁ 阳性花生制品、玉米粉基质质控样品采用两种前处理方法进行检测, 并对结果进行 t 检验, 显示所得结果无显著性差异; 对玉米粉基质质控样品采用两种前处理方法进行检测后所得结果进行 Bland-Altman 统计分析, 结果表明在检测该基质 AFB₁ 时两种方法可以相互替代。免疫亲和柱法净化步骤耗时长, 20 批样品耗时约 3~4 h; 只能人工操作, 产生大约 1000 mL 废液; 而免疫磁珠法采用全自动磁珠纯化仪, 净化步骤一次 40 min, 可自动完成 20 批样品, 几乎无废液产生。**结论** 全自动免疫磁珠纯化法与免疫亲和柱法检测多种基质中的 AFB₁ 均能取得良好效果, 且免疫磁珠纯化法效率高、处理简便、产生废液少, 成本可降低大约 50%。

关键词: 黄曲霉毒素 B₁; 免疫磁珠纯化法; 免疫亲和柱法; 高效液相色谱法-柱后衍生法

收稿日期: 2024-10-14

基金项目: 面向食品质量安全领域的 MOFs 高效富集及快速检测关键技术研究项目(22XD1434700)

第一作者: 朱青(1988—), 女, 硕士, 中级检验师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 417326698@qq.com

*通信作者: 石春红(1969—), 女, 硕士, 正高级工程师, 主要研究方向为食品检验质量控制及管理。E-mail: 2039824469@qq.com

Effect and comparison of detection results of aflatoxin B₁ in foods by fully automated immunomagnetic bead purification method and immunoaffinity column method

ZHU Qing¹, CAO Mei-Ping¹, REN Xing-Fa^{2,3}, CHEN Rui¹, SHAO Feng-Wei²,
HU Gui-Xia¹, SHI Chun-Hong^{1*}

[1. Shanghai Songjiang Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201306, China; 2. Welch Materials (Shanghai), Inc., Shanghai 201613, China; 3. Shanghai Engineering Research Center of Food Rapid Detection, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China]

ABSTRACT: Objective To compare the detection results of aflatoxin B₁ (AFB₁) content in various matrices such as rice, wheat products, and peanut products using 2 kinds of different pretreatment methods: Fully automated immunomagnetic bead purification and immunoaffinity column pretreatment method. **Methods** After extraction with methanol:water (70:30, V:V), a portion of the extract was purified using the immunoaffinity column method with an AFB₁-specific immunoaffinity column, while another portion of the extract was processed by a fully automated immunomagnetic bead purification system paired with an immunomagnetic bead kit. Finally, both purified extracts were analyzed using high performance liquid chromatography coupled with post-column derivatization for detection. **Results** The efficacy of the immunomagnetic bead purification kit and the column efficiency of the immunoaffinity column were both greater than 95%, which could meet the experimental requirements. Within mass concentration range of 1.00–50.00 ng/mL, the linear correlation coefficient (*r*) was 0.99993, indicating a good linear relationship. The 3 level spiked recovery experiments were conducted in rice matrix (*n*=6), and the recovery rates of the 2 kinds of pretreatment methods ranged from 98.2%–106.0%, with a relative standard deviation range of 1.0%–5.0%; single level spiked recovery experiments were conducted in wheat products (*n*=6), with a recovery rate exceeding 80% and a relative standard deviation of 3.7%–7.2%. Meanwhile, the 2 kinds of methods were used to detected AFB₁ positive peanut products and the quality control sample of corn flour matrix, their results were subjected to *t*-test, which showed no significant difference. Further, Bland-Altman statistical analysis was carried out on the results obtained from the quality control samples of corn flour matrix after 2 kinds of pretreatment methods were used. The results showed that the 2 kinds of methods could replace each other in the detection of AFB₁ in this matrix. The purification step of the immunoaffinity column method was time-consuming, 20 batches of samples take about 3–4 hours. And could only be manually operated, which generated about 1000 mL waste liquid; while the immunomagnetic bead method used a fully automatic magnetic bead purifier, which automatically completed 20 batches of samples in 40 minutes at one time, with almost no waste liquid generated. **Conclusion** The fully automated immunomagnetic bead purification method and the immunoaffinity column method both can achieve good results in detecting AFB₁ in various matrices. Also, the immunomagnetic bead purification method is more efficient, easy to handle, generates less waste liquid, and the cost can be reduced by about 50%.

KEY WORDS: aflatoxin B₁; immunomagnetic bead purification method; immunoaffinity column method; high performance liquid chromatography-post-column derivatization method

0 引 言

真菌毒素污染是世界性食品安全问题,也是我国食品安全监管的重点^[1]。世界卫生组织(World health Organization, WHO)和联合国粮农组织(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)把真菌毒素列为食源性疾病的3大根源之首。其中,黄曲霉毒素B₁(aflatoxin, AFB₁)因其热稳定性好,268℃以上的高温下

才能裂解^[2],对人类具有致癌、致畸、致肝损伤作用^[3];引起农作物污染及产量降低等严重问题^[4-5],因此WHO将黄曲霉毒素确定为1A类致癌物^[6-7]。霉菌处于高温(25~32℃)、高湿(90%~110%)环境时易产生霉菌毒素,且经常在粮食(如稻谷、小麦、花生等作物)及其制品中检测到^[8-9]。因此,对粮食及油料作物中黄曲霉毒素进行检测就显得十分关键。目前,世界各国(如美国、欧盟、日本等国家)均为其制定了相应的限量标准,欧盟要求花生、谷物及

其制品中 AFB₁ 限量不超过 2 μg/kg, 美国要求黄曲霉毒素总量(除牛奶外)不超过 20 μg/kg^[10]。我国 GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量标准》也对不同食品中 AFB₁ 做了相应的限量规定。

目前的黄曲霉毒素定量检测前处理方法主要有免疫亲和柱(immunoaffinity column, IAC)法^[11-13]、固相萃取法^[14-15]、QuEChERS 法^[16-17]等,然而这些方法存在着前处理复杂、自动化水平低、成本高、效率低、需要专业人员操作等问题。我国现行检测黄曲霉毒素的 GB 5009.22—2016《食品中黄曲霉毒素 B 族和 G 族的测定》,前三法前处理均采用免疫亲和柱法,在实践中该方法不仅成本较高,耗时较长,且对于较为复杂的基质,易出现柱子堵塞问题,影响实验结果,极大降低实验效率^[18]。因此,亟需开发一种新的效率高、准确度高、精密度良好的方法对黄曲霉毒素类含量进行检测,以期可以替代或改善原有的方法。近年来,由于免疫磁珠纯化(immunomagnetic bead purification method, IMB)法净化食品、中药材、生化材料等前处理简单、自动化水平高、便捷高效、结果准确度和精密度良好,并且可以重复利用等诸多优点,受到检测人员的欢迎^[19-21]。例如文献^[21]中 IMB 法可检测食品中的食源性致病菌、重金属离子以及转基因大豆中的 DNA 等,但其产量低、易团聚等也是其遇到瓶颈问题。IMB 法在生物化学^[22]、蛋白质组学^[23]等方面已有成熟研究,在食品安全特别是真菌毒素方面的研究也受到颇多关注^[24-28]。

基于此,本研究采用将 AFB₁ 抗体偶联在磁珠上形成的 AFB₁ 免疫磁珠制作而成的检测试剂盒,并结合全自动免疫纯化仪进行检测。免疫磁珠净化方法即通过免疫磁珠上的 AFB₁ 抗体特异性的亲和作用将 AFB₁ 从样品提取液中识别和富集起来,清洗杂质,从而起到富集和净化作用;再利用有机溶剂破坏免疫磁珠上 AFB₁ 抗体的空间结构,将 AFB₁ 从免疫磁珠上洗脱下来,便于后续收集、分析和检测^[29]。仅需将样品提取液放入混合液中,试剂盒在免疫磁珠纯化仪中自动完成抗体识别、抗原抗体结合、淋洗、洗脱等步骤,最终得到可进一步检测的纯化液。

本研究按照现行 GB 5009.22—2016 中的第三法 高效液相色谱法-柱后衍生法进行检测,采用 AFB₁ 免疫磁珠试剂盒与自动化前处理过程相结合制造的免疫磁珠纯化仪,对不同食品基质中 AFB₁ 进行快速批量前处理,并与免疫亲和柱法前处理所得结果进行比较,为日常检测工作提供方法参考。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

大米、小麦制品(阳春面)及花生制品(花生仁炒货):市售;质控样品购自中国检验检疫科学研究院货号

QC-WM-705,质控样品基质为玉米粉。

氯化钠(分析纯,上海凌峰化学试剂有限公司);甲醇、乙腈(色谱级,德国 Merck 公司);磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solutions, PBS)(色谱纯, pH 为 7.4±0.1,上海市松江食品药品检验所配制);AFB₁ 标准溶液(质量浓度 2.00 μg/mL,美国 ROMER 公司)、AFB₁&AFB₂&AFG₁&AFG₂ 混合标准溶液(总质量浓度 5.04 μg/mL,印度 BIO PURE 公司)。

1.2 仪器与设备

SECURA224-1CN 分析天平(精度 0.0001 g,德国赛多利斯公司);Milli-Q 超纯水系统(密理博中国有限公司);Watbule P11 全自动磁珠纯化仪、Welch AFB₁ 磁珠纯化试剂盒、Welch Welview 型光化学衍生器、Welch Welchrom AFB₁ 免疫亲和柱[月旭科技(上海)股份有限公司];FM200 超离心研磨仪(北京格瑞德曼仪器设备有限公司);Waters Arc 高效液相色谱仪(配荧光检测器)(美国 Waters 公司);Welch Ultimate XB-C₁₈ [0.46 cm×50 mm, 5 μm, 月旭科技(上海)股份有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫磁珠法

准确称取 5 g 经过磨细(粒度小于 2 mm)的试样,与 20.0 mL 样品提取液[甲醇:水(7:3, V:V)]混合;转移至 50 mL 离心管中,振荡提取 20~30 min;4000 r/min 离心 5 min;取 2 mL 上清液注入样品槽中;打开 Watbule P11 全自动磁珠纯化仪样品仓,把磁棒套安装到磁棒套筒支架上;把试剂盒托盘拉出,将试剂盒放到试剂盒托盘上,将试剂盒托盘再推回到仪器里面,确保试剂托盘推到位,关闭样品仓;点击开始按钮,仪器开始进行试剂盒扫码,扫码完成后,仪器界面上对应的试剂盒位置出现绿色和白色,为正确状态。仪器按预定程序自动进行样品纯化。运行完毕后,用纯净水将试剂盒洗脱管中的洗脱液定容至 2.0 mL(视 AFB₁ 浓度也可定容至 1.0 mL),混匀后经 0.22 μm 滤膜过滤,上机检测。

1.3.2 免疫亲和柱法

准确称取 5 g(精确至 0.01 g)粉碎的样品于 50 mL 离心管中,精密加入 25.00 mL 甲醇:水溶液(70:30, V:V)混匀,加入 5.0 g 氯化钠以均质器高速搅拌,提取 2 min,在 4000 r/min 离心 5 min。准确移取 2.00 mL 滤液并加入 20 mL 纯净水稀释,用玻璃纤维滤纸过滤,玻璃纤维滤纸快速、高载量、液体中颗粒保留 1.6 μm。取稀释后液体待测。

净化:将恢复室温的免疫亲和柱内的液体放弃后,连接于 20 mL 注射器下,将上述提取液注入注射器;将空气压力泵与注射器连接,调节压力使溶液以约 6 mL/min (1~2 滴/s)流速缓慢通过免疫亲和柱,直至 2~3 mL 空气通过柱体。以 10.0 mL 水淋洗柱子两次,弃去全部流出液,并使 2~3 mL 空

气通过柱体。准确加入 1.0 mL 甲醇洗脱, 流速为 1~2 mL/min (小于 1 滴/s), 收集全部洗脱液于玻璃试管中, 用水定容至 2.0 mL。混匀后 0.22 μm 滤膜过滤, 收集滤液于进样瓶, 上机检测。

1.3.3 液相色谱条件

色谱柱: Welch Ultimate XB-C₁₈ (0.46 cm \times 50 mm, 5 μm); 柱后连接光化学衍生器; 流动相: A 相: 水, B 相: 乙腈: 甲醇(50:50, V:V)。等度洗脱: A 相:B 相(25:75, V:V); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积: 50 μL ; 检测波长: 激发波长 360 nm; 发射波长 440 nm。

1.4 数据处理

通过 Waters ARC 仪器配置工作站系统进行数据采集, 利用 Microsoft Office Excel 2007 软件、SPSS 24.0 软件进行数据分析及图形绘制。95%置信区间内, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 免疫磁珠试剂盒效能及免疫亲和柱柱效考察

2.1.1 免疫磁珠试剂盒效能评价

于样品槽中加入 2 mL 70%甲醇水溶液, 加入终浓度为 10 ng/mL 的 AFB₁ 标准溶液, 以下按 1.3.1 方法进行。经计算试剂盒效能为 95.7% ($n=3$)。

2.1.2 免疫亲和柱柱效评价

于 50 mL 具塞离心管中, 加入 2 mL 70%甲醇水溶液及约 20 mL 水, 加入终质量浓度为 10 ng/mL 的 AFB₁ 标准溶液, 以下按 1.3.2 方法进行。经计算柱效为 95.0% ($n=3$)。

经考察, 该批免疫磁珠试剂盒效能及该批次免疫亲和柱柱效均符合 GB 5009.22—2016 中附录 B.2 (>80%) 的要求, 可以用于进一步实验。

2.2 线性范围、标准曲线与相关系数

准确移取适量 AFB₁ 标准储备溶液制备标准中间溶液, 用流动相配制相应浓度的标准曲线工作溶液。上机后, 以 AFB₁ 浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标得标准曲线, 结果表明, 在 1.00~50.00 ng/mL AFB₁ 质量浓度范围内, 峰面积(Y)与质量浓度(X , ng/mL)呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y=2.22e+0.06X$ 。线性相关系数 r 为 0.99993。

2.3 两种方法的检出限、定量限

IAC 法定量限(limit of quantitation, LOQ)按照 GB 5009.22—2016 实验后取得, 确认信噪比(signal/noise, S/N)大于 10。IMB 法检出限(limit of detection, LOD)、LOQ 用稀释法取得, 以 S/N 大于 3 作为 LOD, S/N 大于 10 作为 LOQ。两种方法可达到相同的 LOQ (0.10 $\mu\text{g}/\text{kg}$); IMB 法可达到 GB 5009.22—2016 规定的 LOD (0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$); IAC 的

LOD 未进行检测。

2.4 大米基质中 IMB 法和 IAC 法加标回收率和精密度实验结果

与对照品溶液相比, 两种方法对于大米样品, 均可有效净化去除杂质, 高效液相色谱图如图 1。

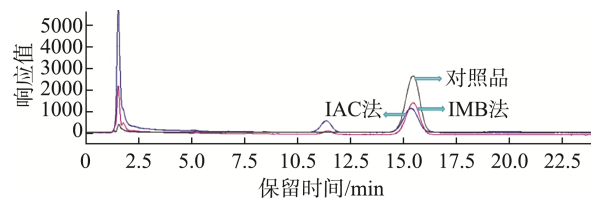


图 1 大米样品经 IMB 法和 IAC 法处理后 AFB₁ 的高效液相色谱图

Fig.1 High performance liquid chromatography of AFB₁ in rice matrix treated by IMB method and IAC method

根据 1.3.1 免疫磁珠实验方法, 在大米阴性样本中进行低、中、高 3 水平加标实验。3 水平平均回收率为 98.2%~106.0%, 相对标准偏差(relative standard deviations, RSDs)为 2.56%~4.93%, 如表 1 所示。根据 1.3.2 免疫亲和柱法, 在大米阴性样本中进行低、中、高 3 水平加标实验。3 水平加标平均回收率范围为 99.4%~102.0%, RSDs 为 1.03%~2.50%, 如表 1 所示。比较用两种方法检测大米中 AFB₁ 加标结果, 3 水平平均回收率均不低于 98%, RSDs 不超过 5.0%。表明大米基质中两者准确度、精密度均较好。

表 1 大米中 AFB₁ 加标回收率及精密度实验($n=6$)
Table 1 Recoveries and precisions tests of AFB₁ in rice matrix ($n=6$)

| 方法 | 加标浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$ | 平均回收率/% | RSDs/% |
|-------|---------------------------------|---------|--------|
| IMB 法 | 5.0 | 99.3 | 4.21 |
| | 10.0 | 98.2 | 4.93 |
| | 30.0 | 106.0 | 2.56 |
| IAC 法 | 5.0 | 102.0 | 2.50 |
| | 10.0 | 102.0 | 1.03 |
| | 30.0 | 99.4 | 1.46 |

采用两种方法在大米基质中进行低、中、高水平加标实验, 均取得了良好的准确度和精密度。表明免疫亲和柱法和 IMB 法均适合于大米的检测。大米基质在免疫亲和柱中未引起堵塞; 免疫磁珠在大米基质中充分分散, 抗原抗体充分结合, 洗脱充分, 取得了较好的结果。

2.5 小麦制品(阳春面)中 IMB 法和 IAC 法加标回收率和精密度实验结果

向小麦制品阴性基质中添加浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 AFB₁ 标准溶液, 分别用两种方法进行检测($n=6$), IMB 法平均回收率为 84.7%, RSD 为 3.7%; IAC 法平均回收率为 81.1%, RSD 为 7.2%。两者平均回收率均在 80%~85%之间, 淀粉含量较高, 易引起免疫亲和柱堵塞, 影响回收率结果; 在

免疫磁珠实验中, 高淀粉含量可能导致了磁珠聚集, 影响了抗原抗体结合, 从而降低了回收率。但由于其相对更大的表面积, 其精密度表现优于 IAC 法。

2.6 花生制品中 AFB₁ 的 IMB 法和 IAC 法检测结果比较

某花生仁炒货中含有 AFB₁, 采用两种方法对该花生样品中的 AFB₁ 含量进行检测, 比较两种方法在检测 AFB₁ 含量方面的差异性。 t 检验结果显示 95% 置信区间内, 显著性 P 为 0.099, $P > 0.05$ 。通过 t 检验结果可知, 在检验油料作物(花生)中 AFB₁ 含量时, 两种方法所得结果没有显著性差异。

2.7 IMB 法日间重复性

采用 IMB 法连续 3 d 检测加标回收率, 结果见表 2。本检测方法连续 3 d 的平均加标回收率稳定在 83.9%~92.2% 左右, 日间 RSDs 在 0.51%~1.99% 之间, 日间

重复性良好。

本研究考察了 IMB 法, 即免疫磁珠试剂盒联合免疫磁珠纯化仪, 连续 3 d 测定大米基质加标的回收率和精密度。回收率和精密度均较好。表明该方法稳定可靠, 实验结果具有可信度。

2.8 质控样品检测结果

质控样品采用以上两种方法进行测定, 结果如表 3。两种方法所得结果均在特性值区间内, 表明两种方法均有较高的准确性。进一步对检验结果分别进行独立样本 t 检验及 Bland-Altman 统计分析。

通过对样品进行正态性分布检验和方差齐性检验后, 可知, 质控样品检测结果基本呈正态分布, 且通过了方差齐性检验, 可进行独立样本 t 检验, 结果显示 95% 置信区间内显著性 P 为 0.385, $P > 0.05$, 对质控样品的检验两种方法没有显著性差异。

表 2 IMB 法日间精密度
Table 2 Intra-day precisions of IMB method

| 加标回收率 1(第 1 d) | | | 加标回收率 2(第 2 d) | | | 加标回收率 3(第 3 d) | | |
|----------------|-------|--------|----------------|-------|--------|----------------|-------|-------|
| 测定值/% | 平均值/% | RSDs/% | 测定值/% | 平均值/% | RSDs/% | 测定值/% | 平均值/% | RSD/% |
| 89.0 | | | 84.6 | | | 90.4 | | |
| 88.1 | 88.5 | 0.51 | 83.4 | 83.9 | 0.73 | 91.6 | 92.0 | 1.99 |
| 88.5 | | | 83.8 | | | 94.0 | | |

表 3 两种方法质控样品检测结果
Table 3 Detecting results of AFB₁ in the quality control samples by 2 kinds of methods

| 货号 | 标准值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 特性值区间 /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | 方法 名称 | 测定值/($\mu\text{g}/\text{kg}$) | | | | | | 平均值 /($\mu\text{g}/\text{kg}$) | RSDs /% | 准确度 /% |
|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|----------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------------|------------|-----------|
| | | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | |
| 中国检科院 QC-WM-705 | 38.91 | 30.33~47.49 | IMB | 35.68 | 35.48 | 33.79 | 33.57 | 35.92 | 35.81 | 35.04 | 3.05 | -9.9 |
| | | | IAC | 33.66 | 33.14 | 34.50 | 34.27 | 34.98 | 36.29 | 34.47 | 3.19 | -11.4 |

进一步对质控样品采用 Bland-Altman 方法^[30]并统计两者数据是否具有有一致性。全部数据分布在控制线内, 两组数据差值的标准偏差(standard deviation, SD)为 $\pm 1.96\text{SD}$ 。说明两种方法检测结果具有较好的一致性, 在检测该基质(玉米粉)中 AFB₁ 含量时可以互相代替使用, 结果如图 2 所示。

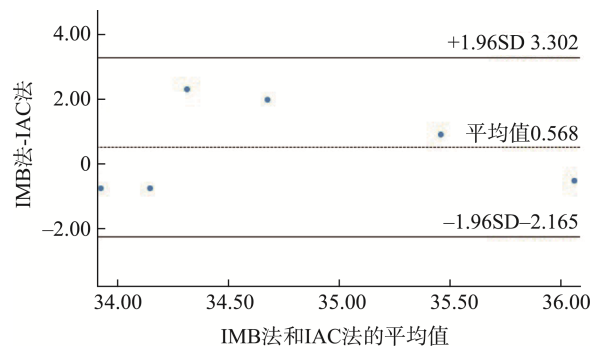


图 2 质控样品 IMB 法与 IAC 法 Bland-Altman 统计结果
Fig.2 Bland-Altman statistics results of IMB and IAC methods for quality control samples

3 结 论

以大米、小麦制品(阳春面)、花生制品(花生仁炒货)为基质, 以玉米粉基质质控样品进行质量控制, 采用现行 GB 5009.22—2016 中第三法 高效液相色谱法 柱后衍生法, 比较了全自动 IAC 和 IMB 检测 AFB₁ 的效果, 经比较图谱, 两种方法, 净化除杂质方面效果基本相似。免疫磁珠试剂盒效能及免疫亲和柱性能均符合 GB 5009.22—2016 附录 B.2 的要求, 均可进行样品中 AFB₁ 含量的检测。

通过稀释法获得大米基质 IMB 法检出限为 0.03 $\mu\text{g}/\text{kg}$, LOQ 为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 不低于 GB 5009.22—2016 第三法 高效液相色谱法-柱后衍生法(IAC 法)LOQ 水平。

在大米和小麦制品中进行加标回收率实验, IMB 法和 IAC 法均取得了良好的准确度和精密度。分别采用 IMB 法和 IAC 法检测花生 AFB₁ 阳性样品, 经独立样本 t 检验统计, 两种方法统计结果, 没有显著性差异。连续 3 d 采用 IMB 法测定大米基质 AFB₁ 浓度, 回收率稳定在 83%~92% 左右,

相对标准偏差在 0.5%~2.0%之间。表明方法具有很好的可靠性和稳定性,这对于确保实验结果的准确性和可信性至关重要。

用两种方法对玉米粉基质质控样品进行检测,结果均在特性值区间内,说明两种方法准确性均较高。经独立样本 t 检验和 Bland-Altman 方法数据统计,两种方法在检测玉米粉基质中 AFB₁ 含量时没有显著性差异,数据具有一致性,可以互相代替使用。此外,全自动免疫磁珠纯化法不仅取得了良好的实验结果,且实验过程中,免疫磁珠纯化仪控温准确、温度波动较小;仪器操作方便、处理简单、比 IAC 法检测 AFB₁ 实验效率高,一次可同时处理 20 个样品,处理量大;可大量缩短实验时间(净化步骤一次 40 min);产生废液较少(几乎无废液),绿色环保,且未有交叉污染情况产生,同时,成本可降低约 50%;而免疫亲和柱法净化步骤耗时长,20 批样品耗时约 3~4 h;只能人工操作,产生大约 1000 mL 废液。

本研究基本展现出了 IMB 法检测食品中 AFB₁ 的优势,但其在制备过程中仍有一定的局限性,导致其在应用过程中遇到易团聚、分散性低等问题。这将是今后磁珠研究过程中重点解决的问题。

参考文献

- [1] 朱燕,姚香澳,宫智勇. 稻谷中真菌毒素的暴露污染、检测技术及防控研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(15): 264-274.
ZHU Y, YAO XAO, GONG ZY. Research progress on exposure, detection and control of mycotoxins in rice grains [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(15): 264-274.
- [2] 劳文艳,林素珍. 黄曲霉毒素对食品的污染及危害[J]. 北京联合大学学报(自然科学版), 2011, 25(1): 64-69.
LAO WY, LIN SZ. The contamination and hazards of aflatoxin on food [J]. Journal of Beijing Union University (Natural Science), 2011, 25(1): 64-69.
- [3] 朱青,曹美萍,李梦贝,等. 超高效液相色谱-质谱联用法检测地理标志产品松江大米中 8 种真菌毒素的含量[J]. 中国粮油学报, 2024, 39(5): 189-195.
ZHU Q, CAO MP, LI MB, et al. Determination of 8 mycotoxins in products of geographical indication Songjiang rice by ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2024, 39(5): 189-195.
- [4] REDDY KRN, SALLEH B, SAAD B, et al. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health [J]. Toxin Reviews, 2010, 29(1): 3-26.
- [5] YAO Y, GAO S, DING X, et al. Topography effect on *Aspergillus flavus* occurrence and aflatoxin B₁ contamination associated with peanut [Z]. 2021.
- [6] 黄力,杨静,李滑滑,等. 不同前处理方法对粮油中黄曲霉毒素 B₁ 检测效果对比[J]. 中国粮油学报, 2022, 37(1): 182-186.
HUANG L, YANG J, LI HH, et al. Comparison of detection effect of aflatoxin B₁ in cereals and oils by different sample pretreatments [J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2022, 37(1): 182-186.
- [7] 于泽,张凯淇,王毅,等. 黄曲霉毒素的危害及预防[J]. 农产品加工, 2022(8): 76-82.
YU Z, ZHANG KQ, WANG Y, et al. Harm and prevention of aflatoxins [J]. Farm Products Processing, 2022(8): 76-82.
- [8] 曹晶晶,刘莹,王雅楠,等. 全自动免疫磁珠法与免疫亲和柱法测定食用油中 AFB₁ 的对比研究[J]. 粮油食品科技, 2023, 31(3): 153-158.
CAO JJ, LIU Y, WANG YN, et al. Comparative study on the determination of aflatoxin B₁ in edible oil by automated immunomagnetic bead purification method and immunoaffinity column purification method [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2023, 31(3): 153-158.
- [9] 胡小猛,李强,包金阳,等. 油脂中黄曲霉毒素 B₁ 的控制及光催化降解研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(15): 182-190.
HU XM, LI Q, BAO JY, et al. Research progress on the control and photocatalytic degradation of aflatoxin B₁ in edible oil [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(15): 182-190.
- [10] 吴限鑫,林秋君,郭春景,等. 国内外主要粮油产品中真菌毒素限量、检测标准及风险评估现状分析[J]. 中国粮油学报, 2019, 34(9): 130-138.
WU XX, LIN QJ, GUO CJ, et al. Analysis of limits, testing standards and risk assessment of mycotoxins in major grain and oil products at home and abroad [J]. Journal of Chinese Cereals and Oils Association, 2019, 34(9): 130-138.
- [11] 崔业波,张亦萌,马晓静,等. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定炒僵蚕中黄曲霉毒素[J]. 中国医药导刊, 2023, 25(5): 506-509.
CUI YB, ZHANG YM, MA XJ, et al. Detection of aflatoxin in fried bombyx batryticatus by immunoaffinity chromatography-high performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Medical Guide, 2023, 25(5): 506-509.
- [12] 任兴发,邹天骏,袁凯旭,等. 免疫亲和柱净化-HPLC 柱后光化学衍生技术同时检测何首乌中的 4 种黄曲霉毒素[J]. 生命科学仪器, 2023, 21(2): 94-100.
REN XF, ZOU TJ, YUAN KX, et al. Determination of four aflatoxin in polygonum multiflorum thunb by immunoaffinity column purification-HPLC photochemical post column derivatization [J]. Life Science Instruments, 2023, 21(2): 94-100.
- [13] ŞENYUVA HZ, GILBERT J. Immunoaffinity column clean-up techniques in food analysis: A review [J]. Journal of Chromatography B, 2010, 878(2): 115-132.
- [14] 刘飞,任安书,葛萍,等. 在线固相萃取/高效液相色谱-四级杆/静电场轨道阱高分辨质谱检测饲料中的黄曲霉毒素[J]. 分析测试学报, 2018, 37(6): 696-701.
LIU F, REN AS, GE P, et al. Determination of aflatoxins in feeds by high performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry with online solid phase extraction [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2018, 37(6): 696-701.
- [15] 李俊毅,李窈妍. 全自动固相萃取-HPLC-FLD 柱后衍生法测定粮食中的黄曲霉毒素 B₁[J]. 食品安全导刊, 2024, 15: 80-82, 86.
LI JY, LI YY. Determination of aflatoxin B₁ in grain by automatic solid phase extraction with HPLC-FLD post-column derivatization [J]. China Food Safety, 2024, 15: 80-82, 86.
- [16] 范志辰,韩铮,郭文博,等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定不

- 同饲料中 30 种真菌毒素[J]. 色谱, 2017, 35(6): 627–633.
- FAN ZC, HAN Z, GUO WB, *et al.* Simultaneous determination of 30 mycotoxins in different feed products by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2017, 35(6): 627–633.
- [17] 栾杰, 刘阳, 白应皓. 火腿中 14 种真菌毒素含量的 QuEChERS 提取-超高效液相色谱串联四级杆质谱测定法[J]. 职业与健康, 2024, 40(10): 1329–1337.
- LUAN J, LIU Y, BAI YH. Determination of 14 mucotoxins in hams with QuEChERS based extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Occupation and Health, 2024, 40(10): 1329–1337.
- [18] 陈金男, 王蒙, 董泽民, 等. 高通量自动化免疫磁珠净化-超高效液相色谱法检测饲料中四种黄曲霉毒素[J]. 色谱, 2023, 41(6): 504–512.
- CHEN JN, WANG M, DONG ZM, *et al.* Determination of four aflatoxins in feeds by high throughput automated immunoaffinity magnetic beads purification-ultra performance liquid chromatography [J]. Chinese Journal of Chromatography, 2023, 41(6): 504–512.
- [19] XUAN Z, YE J, ZHANG B, *et al.* An automated and high-throughput immunoaffinity magnetic bead-based sample clean-up platform for the determination of aflatoxins in grains and oils using UPLC-FLD [J]. Toxins, DOI: 10.3390/toxins11100583
- [20] YE J, XUAN Z, ZHANG B, *et al.* Automated analysis of ochratoxin A in cereals and oil by immunoaffinity magnetic beads coupled to UPLC-FLD [J]. Food Control, 2019, 104: 57–62.
- [21] 柳心梅, 田巍, 肖治理. 免疫磁珠的制备及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(18): 4775–4780.
- LIU XM, TIAN W, XIAO ZL. Preparation of immunomagnetic beads and their application in food safety detection [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(18): 4775–4780.
- [22] 周小合, 谭红, 李宝花, 等. 烟曲霉毒素免疫磁珠富集方法建立研究[J]. 医学理论与实践, 2024, 37(7): 1205–1208.
- ZHOU XH, TAN H, LI BH, *et al.* Establishment of immunomagnetic bead enrichment method for aspergillus fumigatus [J]. The Journal of Medical Theory and Practice, 2024, 37(7): 1205–1208.
- [23] VÁRADI C, LEW C, GUTTMAN A. Rapid magnetic bead sample preparation for automated and high throughput n-glycan analysis of therapeutic antibodies [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86(12): 5682–5687.
- [24] SAÇLIGIL D, ŞENEL S, YAVUZ H, *et al.* Purification of transferrin by magnetic immunoaffinity beads [J]. Journal of Separation Science, 2015, 38(15): 2729–2736.
- [25] 李红洲, 卢红祥, 鲍闯业, 等. 粮食中黄曲霉毒素 B₁ 检测的免疫磁珠法样本前处理应用研究[J]. 粮食与饲料工业, 2021(2): 54–57.
- LI HZ, LU HY, BAO CY, *et al.* Study on the application of immunomagnetic beads for samples pretreatment in the detecton of aflatoxin B₁ in grain [J]. Cereal & Feed Industry, 2021(2): 54–57.
- [26] 李丽, 叶金, 轩志宏, 等. 基于免疫磁珠黄曲霉毒素全自动净化方法适用性评价[J]. 粮油食品科技, 2020, 28(3): 37–41.
- LI L, YE J, XUAN ZH, *et al.* Evaluation of the applicability of an automatic method for aflatoxon purification based on immunomagnetic beads [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2020, 28(3): 37–41.
- [27] 郭姜里, 杜娟, 李宗双, 等. 免疫磁分离技术在食源性致病菌前处理中的应用进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(21): 97–106.
- GUO JL, DU J, LI ZS, *et al.* Application of immunomagnetic separation technology in pretreatment of foodborne pathogenic bacteria [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(21): 97–106.
- [28] DENG Q, QIU M, WANG Y, *et al.* A sensitive and validated immunomagnetic-bead based enzyme-linked immunosorbent assay for analyzing total T-2 (free and modified) toxins in shrimp tissues [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 142: 441–447.
- [29] BABU D, MURIANA P. Sensitive quantification of aflatoxin B₁ in animal feeds, corn feed grain, and yellow corn meal using immunomagnetic bead-based recovery and real-time immunoquantitative-PCR [J]. Toxins, 2014, 6(12): 3223–3237.
- [30] 朱红梅, 高蕾, 谢冰, 等. 两种测量方法在成年女性冠状面形体测量中的 Bland-Altman 一致性评价[J]. 中国妇产科临床杂志, 2023, 24(3): 285–288.
- ZHU HM, GAO L, XIE B, *et al.* Consistency of two measurements in coronary-plane posture measurement of adult women by bland-altman analysis [J]. Chinese Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology, 2023, 24(3): 285–288.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)