

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240925003

引用格式: 吴子尧, 马海灵, 吴光杰, 等. 玉米赤霉烯酮结构类似物在免疫亲和柱柱容量实时监测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(3): 25-34.

WU ZY, MA HL, WU GJ, *et al.* Application of zearalenone structural analogues in real-time monitoring of column capacity in immunoaffinity columns [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(3): 25-34. (in Chinese with English abstract).

玉米赤霉烯酮结构类似物在免疫亲和柱 柱容量实时监测中的应用

吴子尧[#], 马海灵[#], 吴光杰, 赵佳莹, 王李平, 刘仁荣^{*}

(江西科技师范大学生命科学学院, 南昌 330000)

摘要: **目的** 探索一种可以在检测过程中实时监测玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)免疫亲和柱柱容量的方法。**方法** 将两种 ZEN 的天然结构类似物: α -玉米赤霉烯醇(α -zearalanol, α -ZEL)、 β -玉米赤霉烯醇(β -zearalanol, β -ZEL)与戊二酸酐酯化反应合成了 ZEN 的两种人工结构类似物(α -ZEL-G、 β -ZEL-G), 样品纯化后, 通过荧光、紫外、高分辨率质谱法对其进行了鉴定; 利用免疫亲和柱的抗体建立了竞争酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)曲线, 通过半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})比较它们与抗体之间的亲和力。分别将 α -ZEL-G 和 β -ZEL-G 作为柱容量示踪物, 与不同浓度的 ZEN 一起加入免疫亲和柱结合, 探索建立一种免疫亲和柱柱容量实时监测的方法。**结果** ZEN、 α -ZEL-G 和 β -ZEL-G 的竞争 ELISA 曲线的 IC_{50} 分别为: 2.0、1.3 和 10.0 ng/mL, 表明 α -ZEL-G 与抗体的亲和力略高于 ZEN, 而 β -ZEL-G 与抗体的亲和力则明显低于 ZEN 与抗体的亲和力。实验结果表明: α -ZEL-G 在不同柱容量的免疫亲和柱中会影响 ZEN 的回收率, 而 β -ZEL-G 的加入量在柱容量 50% 时, 不同浓度的 ZEN 的回收率大于 80%。**结论** 与抗体亲和力更低的 β -ZEL-G 更适合用于柱容量实时监测, 在实际样品的检测中显示出良好的应用效果。

关键词: 玉米赤霉烯酮; 免疫亲和柱; 高效液相色谱法; 柱容量; 实时监测

Application of zearalenone structural analogues in real-time monitoring of column capacity in immunoaffinity columns

WU Zi-Yao[#], MA Hai-Ling[#], WU Guang-Jie, ZHAO Jia-Ying,
WANG Li-Ping, LIU Ren-Rong^{1*}

(College of Life Sciences, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330000, China)

ABSTRACT: Objective To explore a method that can monitor the immunoaffinity column capacity of zearalenone

收稿日期: 2024-09-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960501); 江西省教育厅科技落地计划项目(KJLD14067)

[#]吴子尧和马海灵为共同第一作者

第一作者: 吴子尧(1999—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: ziyaoowu2022@163.com

马海灵(1998—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 1830419452@qq.com

*通信作者: 刘仁荣(1969—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为微生物学、食品分析与安全检测。E-mail: 694700017@qq.com

(ZEN) in real time during detection. **Methods** The 2 kinds of artificial structural analogues of ZEN (α -ZEL-G and β -ZEL-G) were synthesized by esterification of α -zearalanol (α -ZEL) and β -zearalanol (β -ZEL) with glutaric anhydride in this study. The products were purified and identified by fluorescence, ultraviolet and high-resolution mass spectrometry. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) curve was established using the same antibody with immunoaffinity columns, and their affinity with the antibody was compared by half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). α -ZEL-G and β -ZEL-G were used as column capacity tracers and added to the immunoaffinity column together with different concentrations of ZEN to explore a method for real-time monitoring of immunoaffinity column capacity. **Results** The IC_{50} of the competitive ELISA curves of ZEN, α -ZEL-G and β -ZEL-G were 2.0, 1.3 and 10.0 ng/mL, respectively, indicating that the affinity of α -ZEL-G with antibody was slightly higher than that of ZEN, while the affinity of β -ZEL-G with antibody was significantly lower than that of ZEN with antibody. The experimental results showed that: α -ZEL-G in immunoaffinity columns with different column sizes would affect the recovery rates of ZEN. Whereas the recovery rates of ZEN with different concentration were more than 80% while the adding concentrations of β -ZEL-G was 50% of the column capacity. **Conclusion** β -ZEL-G with lower antibody affinity is more suitable for real-time monitoring of column volume. It shows good application results in the test of actual samples.

KEY WORDS: zearalenone; immunoaffinity column; high performance liquid chromatography; column capacity; real-time monitoring

0 引言

玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)是一种大环 β -再环酸内酯, 由镰刀菌属真菌产生, 主要是禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和 *Fusarium semiectum*^[1]。由于其结构与天然存在的雌激素相似, 在人类和动物中可引起明显的雌激素效应^[2], 被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为第三类致癌物。ZEN 分子式是 $C_{18}H_{22}O_5$, 在一些动物体内, ZEN 可在肝脏和肠黏膜中被 3-OH-类固醇脱氢酶还原为玉米赤霉烯醇(zearalanol, ZEL), ZEL 的两种非对映异构体为 α -ZEL 和 β -ZEL。其化学结构式如图 1 所示。

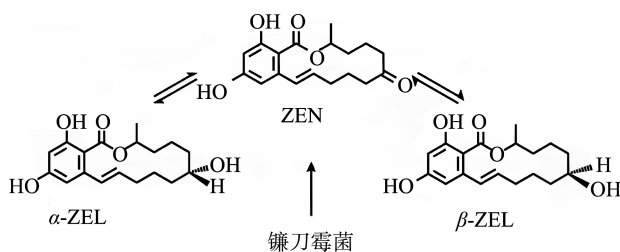


图 1 玉米赤霉烯酮及其结构类似物化学结构式

Fig.1 Chemical structure of zearalenone and its analogues

ZEN 的毒性主要表现在免疫毒性、生殖毒性、遗传毒性和细胞毒性 4 个方面^[3]。ZEN 主要存在于玉米、大米、小麦和豆类等农作物中, 对人类和动物的健康造成严重的

危害和巨大的经济损失, 世界卫生组织、欧盟和世界各国对各粮食农油产品中 ZEN 及其代谢物的含量制定了严格的标准^[4]。GB 2761—2017《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定小麦、玉米及其粉质产品中 ZEN 含量应 $\leq 60 \mu\text{g}/\text{kg}$, 相比欧盟分类较少^[5]。高效准确检测粮食中 ZEN 的方法是近年来研究的重点, 目前国内外对于 ZEN 有各种检测方法, 这些检测方法各有利弊, 其中免疫学检测方法能大量快速检测霉菌毒素, 但其精密度和准确性不高, 可用作大量样品霉菌毒素初筛, 免疫学检测方法因其灵敏度高、简单、耗时少等优点而受到更多关注, 例如酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和其他一些新兴的光学、比色或电化学免疫传感器方法^[6-8]。2023 年 HUANG 等^[9]研究了一种基于双功能金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)探针的酶联免疫吸附测定(nanoparticles-enzyme-linked immunosorbent assay, nano-ELISA), 用于检测流行的食用和药用食品薏苡仁种子中的 ZEN, 利用了 AuNPs 方便的标记特性, 允许过氧化物酶和抗体通过静电吸附相继固定在 AuNPs 上, 构建用于鉴定和信号放大的双功能探针以达到更高的灵敏度, 所提出的方法的检出限和定量限比传统 ELISA 提高了约 7 倍和 5 倍。对 ZEN 进行精确的定量需要用仪器检测法, 如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[10]、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[11]和高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)^[12]。2023 年 FATEMEH 等^[13]采用免疫亲和柱和高效液相色谱法(immune affinity column

high performance liquid chromatography, IAC-HPLC)同时测定和分析了150份水稻、小麦和玉米样品中的ZEN。在最佳条件下,ZEN的线性范围0.2~350 ng/g,检出限0.015~0.061 ng/g,定性限为0.052~0.203 ng/g。2020年XU等^[14]通过一种具有高适配体负载和快速制备亲和整体色谱柱,与HPLC偶联对ZEN的进行高效特异性识别和灵敏检测。在使用现代设备技术进行分析之前,需要对样品进行前处理,分离方法和样品制备过程对定量分析结果影响很大。ZEN的样品前处理有免疫亲和柱净化(immune affinity column, IAC)、固相萃取(solid phase extraction, SPE)、液液萃取(liquid-liquid extraction, LLE)、QuEChERS法等^[15-16]。近年来有许多新兴的前处理技术,如基于纳米吸附剂的分散固/微固相萃取(dispersed solid phase extraction, D-SPE/ dispersive micro-solid phase extraction, D- μ -SPE)^[17-22],基于介孔结构泡沫的D-SPE^[7]和中空纤维基液相微萃取^[8]。免疫亲和柱作为ZEN检测的GB 2761—2017 第一法(IAC-HPLC)前处理方法,能够快速、高效、专一地从样本中分离出ZEN^[23-25],这种方法是利用抗原抗体的特异性结合,降低基质干扰效应,从样本中分离出待测物^[26]。胡云等^[27]对免疫亲和柱提取液进行了优化,准确分析食品中ZEN的含量,回收率较优化前有了提高,方法灵敏度高,定量结果准确。LUO等^[28]建立了一种GC-MS测定饲料中ZEN及其5种衍生物,前处理选择制备有效的免疫亲和柱用于样品纯化,然后通过GC-MS对目标化合物进行免疫亲和和色谱分析,该方法经证明可靠,适用于测定饲料中的ZEN及其衍生物。BRENN-STRUCKHOFOVA等^[29]研究了一种分离ZEN的样品净化方法,通过将抗ZEN抗体固定在多孔溶胶-凝胶玻璃中制备的免疫亲和柱。该方法证明可靠,适用于小麦和小麦制品加标实验。顾一丹等^[30]通过优化免疫亲和柱的亲基质,制备出粒径大小合适且均一的壳聚糖微球并以此为载体偶联毒素的单克隆抗体制备免疫亲和柱。经验证,用于实际样品检测回收率为87.90%~96.37%。该方法证明可靠,适用于多种毒素实际样品加标实验。

IAC的柱容量是保证检测准确性的重要指标,若柱容量不足,将会影响检测结果的准确性。因此,所有标准方法都对IAC的柱容量有严格的规定。但目前IAC柱容量的测定通常是通过抽检的方式确定,由于IAC是一次性耗材,抽检并不能确保每一支IAC都是合格的,对检测结果造成一定的隐患。如果可以在检测过程中实时监测免疫亲和柱柱容量,将有效克服这一弊端^[31],但目前相关研究鲜见报道。若要实现这一目标,需要研究一种柱容量示踪物,该示踪物的理化性质应与ZEN接近且能在同一色谱条件下有效分离和检测,同时不影响ZEN的回收率和检测结果。鉴于此,本研究拟通过化学方法对ZEN的2种天然结构类

似物 α -ZEL、 β -ZEL进行修饰,获得两种ZEN人工结构类似物,并探索其作为柱容量实时监测示踪物的可行性和规律,探索建立ZEN免疫亲和柱柱容量的实时监测方法,对于基于免疫亲和柱前处理技术的食品安全检测方法具有较高的科学价值和较好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

ZEN (100 μ g/mL)、 α -ZEL (5 mg)、 β -ZEL (5 mg)标准品(纯度98%,青岛普瑞邦生物工程有限公司);ZEN免疫亲和柱、5G5ZEN抗体(深圳易瑞生物技术股份有限公司);CW01025羊抗鼠酶标二抗(100 μ L, 1 mg/mL,江苏康为世纪生物科技股份有限公司);戊二酸酐(纯度98%)、4-二甲氨基吡啶(dimethylaminopyridine, DMAP)(纯度98%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);四甲基联苯胺(tetramethyl benzidine, TMB)(分析纯,湖州英创生物科技股份有限公司);硫酸(H_2SO_4)(分析纯)、氯化钙($CaCl_2$)(纯度98%)、氯化钠($NaCl$)(纯度99.5%)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)(纯度99.5%)、十二水合磷酸氢二钠($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)(纯度99%)、氯化钾(KCl)(纯度99.5%)、四氢呋喃(tetrahydrofuran, THF)(分析纯)(西陇科学股份有限公司);吐温-20(tween-20)(分析纯,天津大茂化学试剂合伙企业);甲醇、乙腈(色谱纯,西班牙ScharLab S.L公司);高效液相色谱级水用MicroPure UV/UF超纯水仪(德国Thermo Fisher Scientific公司)制备,符合国家标准方法GB/T 6682—2008《实验室用水规格和试验方法》标准规定的I类水规格。

1.2 仪器与设备

Agilent 1260 infiniteII高效液相色谱仪、Pribolab C₁₈柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)(美国Agilent公司);BSP-400半制备液相色谱(美国Water公司);BCD-216YH旋转蒸发器(青岛海尔有限公司);JHD-006氮吹仪(上海极恒实业有限公司);Centrifuge5804R高速冷冻离心机(美国Eppendorf公司);Vortex-5-Kylin-Bell漩涡仪(青岛启麟电子有限公司);MicroPure UV/UF超纯水仪(德国Thermo Fisher Scientific公司);FW100高速粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司)。

1.3 溶液配制

无水THF:用 $CaCl_2$ 在隔绝潮气下回流,除去其中的水和过氧化物,然后蒸馏,收集66 $^{\circ}C$ 的馏分蒸馏时不要蒸干,将剩余少量残液即倒出。

20 mg/mL DMAP溶液:称取20 mg DMAP粉末,加入1 mL无水THF,摇晃均匀,静置。

20 mg/mL 戊二酸酐溶液:称取20 mg 戊二酸酐粉末,加入1 mL无水THF,摇晃均匀,静置。

10 nmol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS):

称取 8 g NaCl、0.2 g KH_2PO_4 、2.9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g KCl、溶于约 0.8 L 超纯水中，将 pH 调到 7.4，后用超纯水定容至 1 L。室温放置。

0.05% 磷酸盐缓冲液-吐温 20 洗液(phosphate buffer solution-tween-20, PBST): 在 1 L PBS 溶液中加入 500 μL 吐温-20，摇晃均匀，静置。

1.4 实验方法

配制 20 mg/mL 溶于无水 THF 的 DMAP 溶液和 20 mg/mL 溶于无水 THF 的戊二酐溶液。在 5 mg α -ZEN/ β -ZEN 粉末样品中加入 500 μL 上述 DMAP 溶液和 500 μL 戊二酐溶液，25 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 振荡反应约 72 h，制备原理如图 2 所示。待反应完成后，反应液真空抽干，用 500 μL 乙腈复溶，半制备型液相色谱仪纯化。

1.5 色谱条件

ZEN 的 GB 5009.209—2016《食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定》中第一法 IAC-HPLC 的液相色谱条件为参考，通过 α -ZEL-G/ β -ZEL-G 峰形改善对 HPLC 条件进行优化，探索不同流动相对峰形，出峰时间的影响，优化流动相。

1.6 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 紫外光谱、荧光光谱和质谱鉴定

将 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 纯品分别用乙腈溶解至 10 $\mu\text{g/mL}$ ，在紫外光度计中扫描 200~400 nm 的紫外吸光光谱。在荧光分光光度计中扫描检测 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 纯品荧光性质，确定其最大激发波长和最大发射波长，通过改变激发波长：260、270、280 nm 获得其最大发射波长在 440 nm，通过最大发射波长确定最大激发波长为 274 nm，确定了荧光峰的波长范围和峰值。将 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 样品送科学指南针高分辨质谱仪检测，检测条件如下：以电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)检测，毛细管电压，+2.5 kV；源温度，150 $^\circ\text{C}$ ；去溶剂温度，500 $^\circ\text{C}$ ；锥形气体流量，150 L/h；去溶剂气体流量，1000 L/h。检测在多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)模式下进行。Mass LynxTM 4.1 软件(Waters)用于数据采集和处理。

1.7 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 竞争 ELISA 方法的建立

用 PBS 稀释 ZEN 人工抗原质量浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ ，并在 96 孔聚苯乙烯微孔板(120 $\mu\text{L/孔}$)上于 4 $^\circ\text{C}$ 包被过夜。用 0.05% PBST 洗液在洗板机洗板 3 次并拍干板上的残留液体，后采用 5% 脱脂奶粉 37 $^\circ\text{C}$ 保湿封闭 2 h (350 $\mu\text{L/孔}$)。0.05% PBST 洗板 3 次拍干，每孔加入倍比稀释的 50 μL ZEN 标准品、 α -ZEL-G 纯品、 β -ZEL-G 纯品和 50 μL 1:8000 体积比稀释的 ZEN 抗体(与免疫亲和柱的抗体相同)，37 $^\circ\text{C}$ 保湿恒温结合 40 min。0.05% PBST 洗涤 6 次并拍干。ZEN/ α -ZEL-G/ β -ZEL-G 稀释浓度从 2000 ng/mL 开始 2.5 倍比稀释。每孔加入工作浓度的酶标二抗 100 μL ，37 $^\circ\text{C}$ 保湿恒温结合 40 min，0.05% PBST 洗涤 6 次并拍干水分。每孔加入 100 μL TMB 显色液，37 $^\circ\text{C}$ 静置显色 8 min，取出后每孔迅速加入 50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应，用酶标仪测定各孔的 450 nm 吸光值。

以 ZEN/ α -ZEL-G/ β -ZEL-G 浓度对数为横坐标，结合率($B/B_0 \times 100\%$ ， B_0 为不加 ZEN 标准品的 OD 值， B 为加 ZEN 标准品的 OD 值)为纵坐标，建立竞争 ELISA 标准曲线。

1.8 α -ZEL-G、 β -ZEL-G IAC-HPLC 方法建立及加标回收率测定

考虑到 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 和 ZEN 分子量不同，为了方便比较，以下 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的添加量通过摩尔数折算为 ZEN 的质量，将 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 用流动相稀释为 6 个不同质量浓度：10、50、100、200、500、1000 ng/mL 进行 HPLC 检测，计算其 3 次的峰面积平均值为纵坐标，横坐标为浓度，建立其线性回归方程，即建立 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的 HPLC 标准曲线。

从 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱取 10 支柱容量为 4000 ng ZEN 免疫亲和柱放置在不低于 20 $^\circ\text{C}$ 的室温复温 30 min，取下塞头，待柱内保护液自然流干后，用 10 mL 10 nmol/L PBS 淋洗免疫亲和柱。用 10% 的乙腈水配制 100 ng/mL β -ZEL-G 与 α -ZEL-G 的上样液 20 mL 各 5 只分别过柱，控制液体以每秒有 1~2 滴的速度流出，然后用 10 mL 10 nmol/L PBS 淋洗免疫亲和柱，再用 10 mL 超纯水淋洗。立刻用吹干免疫亲和柱内液体，取下上样管，向免疫亲和柱中投入 2 mL 甲醇

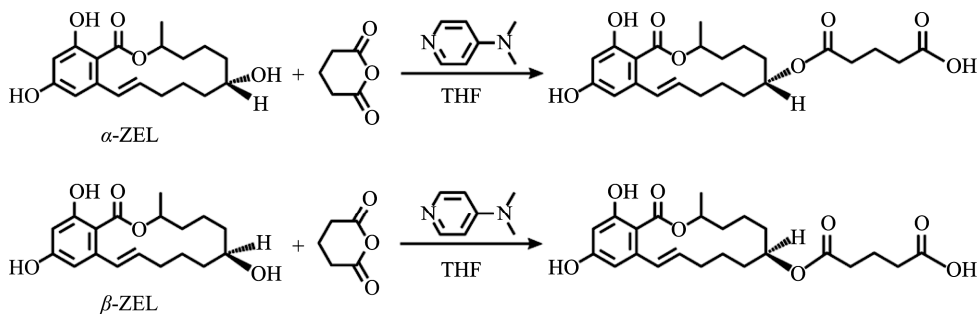


图 2 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 合成示意图

Fig. 2 Presentive graph for the synthesis of α -ZEL-G and β -ZEL-G

洗脱,若在 1~2 min 内没有液体流出,通过对亲和柱施加压力直至有液体流出,随后不再施加压力,让液体在重力作用下自然流出。收集洗脱液并混匀,55 °C 以下氮气吹干后,用 1 mL HPLC 流动相溶解样品,液相色谱定量分析测定 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的回收率。

1.9 ZEN IAC 饱和柱容量检测

根据 GB 5009.209—2016 中第一法,建立其线性回归方程,即建立 ZEN 的 HPLC 标准曲线。

从 4 °C 冰箱取 5 支标称柱容量为 4000 ng 和 5 支标称柱容量为 1000 ng 的 ZEN 免疫亲和柱,放置在室温复温 30 min,取下塞头,待柱内保护液自然流干后,用 10 mL 10 nmol/L PBS 淋洗免疫亲和柱。用 10% 的乙腈水配制含 400 ng/mL 与 200 ng/mL 的 ZEN 标准品上样液各 20 mL 分别过 4000 ng 和 1000 ng 规格的亲和柱,控制液体以每秒有 1~2 滴的速度流出,然后用 10 mL 10 nmol/L PBS 淋洗免疫亲和柱,再用 10 mL 超纯水淋洗。吹干免疫亲和柱内液体,向免疫亲和柱中加入 2 mL 甲醇洗脱。收集洗脱液并混匀,55 °C 以下氮气吹干后,用 1 mL HPLC 流动相溶解样品,液相色谱仪定量分析测定 ZEN 的回收率。

1.10 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 建立 IAC-HPLC 柱容量实时监测方法

从 4 °C 冰箱取一批标称柱容量为 4000 ng 和标称柱容量为 1000 ng 的 ZEN 免疫亲和柱,放置在室温复温 30 min 备用。用 10% 乙腈水配制含量分别为 300、200、100、75、50 和 25 ng/mL 质量浓度的 β -ZEL-G 或 α -ZEL-G 上样液 20 mL;同时用 10% 甲醇-水配制含量分别为 200、100、50、25、5、1 ng/mL 的 ZEN 上样液 20 mL。取下塞头,让免疫亲和柱内保护液自然流干,用 10 mL 10 nmol/L PBS 淋洗免疫亲和柱。按照具体浓度将配制好的 β -ZEL-G 或 α -ZEL-G 上样液 20 mL 过柱,之后 ZEN 上样液继续过柱,控制液体以每秒有 1~2 滴的速度流出,然后用 10 mL 10 nmol/L PBS 淋洗 IAC,再用 10 mL 超纯水淋洗。吹干免疫亲和柱内液体,向 IAC 中加入 2 mL 甲醇洗脱。收集洗脱液,55 °C 以下氮气吹干后,用 1 mL HPLC 流动相溶解样品,液相色谱定量分析测定 ZEN 的回收率。

1.11 β -ZEL-G IAC 柱容量实时检测方法样品加标回收验证

将建立的柱容量实时监测 IAC-HPLC 方法应用于 ZEN 最常污染的 3 种类粮食(玉米、大米和小麦)的样品提取液的加标回收实验中,验证方法的准确性,可重复性。

购买市售小麦、大米和玉米 3 种样品,在用 GB 5009.209—2016 方法确认不含 ZEN 后,各组(每组 5 份)分别称取 20.0 g 粉碎小麦、大米和玉米试样(精确到 0.1 g)于均质杯中,以均质器高速搅拌粉碎,过筛(粒径小于 2 mm),混合均匀后加入 100 mL 20% 乙腈水提取液,涡旋振荡提取 30 min,静置离心后定量滤纸过滤。每份样品移取 20 mL 滤液加入 80 mL 超纯水稀释混匀,经玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,获得小麦、大米和玉米 3 种样品的待测样品提取液,将 3 种待测样品提取液分别添加 200、100、25、5 和 1 ng/mL 的 ZEN 制备加标液,取一批柱容量为 4000 ng 的 ZEN IAC,每支加入 2000 ng 的 β -ZEL-G 作为柱容量实时监测的示踪物,再加入不同 ZEN 加标量的加标液验证柱容量实时检测方法在实际样品中的准确度和精确性。

1.12 数据处理

数据表达为平均值 \pm 标准偏差。采用 Excel 2016 软件处理数据,Graphpad prism9.5 作图。

2 结果与分析

2.1 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 色谱条件的优化

对 α -ZEL-G、 β -ZEL-G HPLC 条件优化方法如下:色谱分离采用 Pribolab C₁₈ 柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)反相分析柱,并保持在 30 °C。HPLC 分析的流动相由两种溶液组成:50% A 相(乙腈)和 50% B 相(90% 超纯水+10% 甲醇)。所有分析的流速为 1 mL/min,进样体积为 20 μ L。分析前,柱子先用 0.5 mL/min 的流动相冲洗 30 min,然后用 1.0 mL/min 的流速冲洗 30 min。 β -ZEL-G 使用二极管阵列检测器(diode array detector, DAD)检测,检测波长为 238 nm, α -ZEL-G 使用荧光检测器(fluorescence detector, FLD)检测器,激发波长:274 nm,发射波长 440 nm。用优化过后的色谱条件对 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 进行测定,得到了峰形良好的色谱峰,优化后的色谱法如图 3 所示。

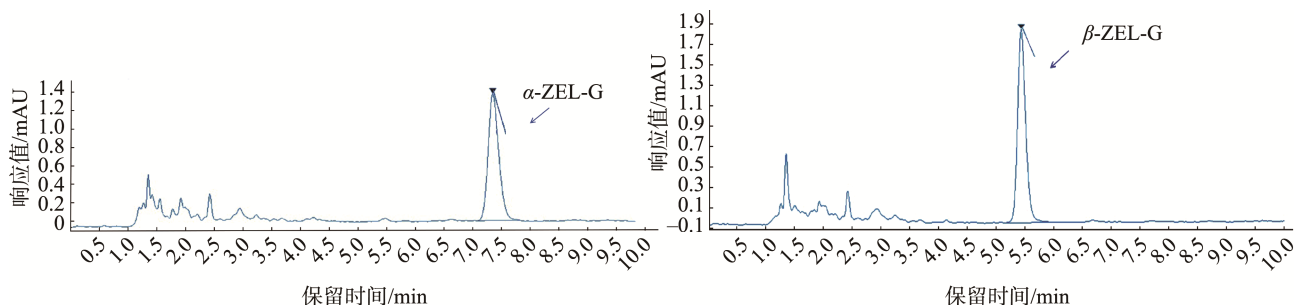


图3 优化后 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 色谱图
Fig.3 Chromatogram of α -ZEL-G and β -ZEL-G after optimization

2.2 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的纯化和定量

α -ZEL-G、 β -ZEL-G 使用半制备型液相分离纯化样品后, 在对应保留时间的峰接样获得约 20 mL 样品溶液, 经 60 °C 旋转蒸发浓缩后, 得到纯化的 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 纯品称重得到其质量, 其中 α -ZEL-G 在投入 5 mg 后反应得到 2.36 mg 纯品, 得率为 47.2%。 β -ZEL-G 在投入 5 mg 后反应得到 2.18 mg 纯品, 得率为 43.6%。

2.3 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 紫外光谱、荧光光谱和质谱鉴定

ZEN 标准品及 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的紫外扫描图谱如图 4 所示。ZEN 与 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 也有基本相同的紫外吸收光谱, 都在 238、274、316 nm 有紫外吸收峰。

ZEN 和 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 有相似的荧光特性, 但荧光强度不同, 用激发波长扫描 274 nm 扫描得到发射光谱结果如图 4 所示, ZEN 标准品和 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 都在同一波长有荧光峰, α -ZEL-G 荧光强度高略高于 ZEN, 而

β -ZEL-G 荧光吸收强度为 ZEN 与 α -ZEL-G 的十分之一。

α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的质谱检测结果如图 5 所示, 高分辨质谱 (ESI) m/z $[M+H]^+$ $C_{23}H_{30}O_8$ 理论值 434.19; 实测值 434.19 证明成功获得目标反应物。

2.4 α -ZEL-G、 β -ZEL-G ELISA 竞争抑制曲线及交叉反应率

通过竞争 ELISA 探究 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 及 ZEN 与抗体亲和力。得到 ZEN、 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的 ELISA 竞争抑制曲线如图 6 所示, 在线性范围内, ZEN 的线性方程为 $Y=-0.427X+0.6141$, 相关系数 $r^2=0.9923$, 半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}) 为 2.0 ng/mL; α -ZEL-G 的线性方程为 $Y=-0.467X+0.5521$, 相关系数 $r^2=0.9928$, IC_{50} 为 1.3 ng/mL; β -ZEL-G 的线性方程为 $Y=-0.3958X+0.8936$, 相关系数 $r^2=0.9912$, IC_{50} 为 10.0 ng/mL。 α -ZEL-G 与抗体的亲和力略高于 ZEN, 而 β -ZEL-G 与抗体的亲和力则明显低于 ZEN 与抗体的亲和力。

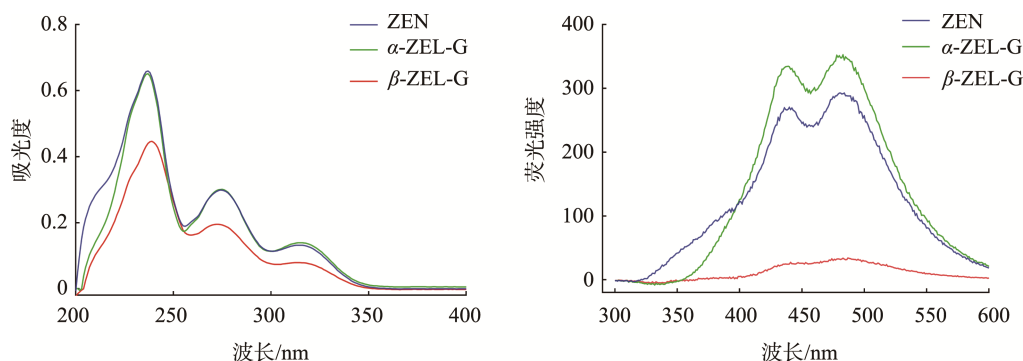


图 4 ZEN、 α -ZEL-G 及 β -ZEL-G 的紫外荧光扫描图

Fig.4 Ultraviolet fluorescence scanning of ZEN, α -ZEL-G and β -ZEL-G

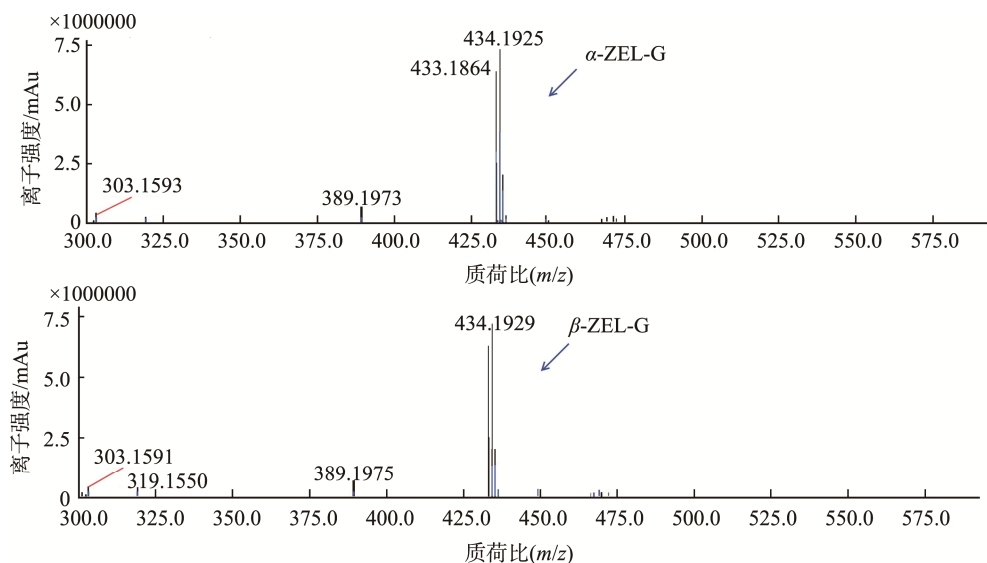


图 5 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的高分辨质谱图

Fig.5 High resolution mass spectrometry of α -ZEL-G and β -ZEL-G

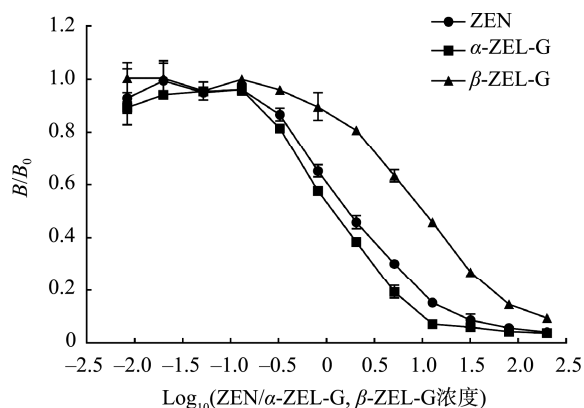


图 6 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 及 ZEN 的 ELISA 竞争抑制曲线
Fig.6 Competitive inhibition curves of ELISA for α -ZEL-G, β -ZEL-G and ZEN

2.5 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 的 IAC-HPLC 方法建立及加标回收率测定

通过优化的 HPLC 色谱条件建立 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 线性回归方程, α -ZEL-G 的线性方程为 $Y=0.019X-0.1231$, 相关系数 $r^2=0.9995$, β -ZEL-G 的线性方程为 $Y=0.2107X$, 相关系数 $r^2=0.9997$, 用于过柱后的 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 定量, 测定其加标回收率。

在标称柱容量为 4000 ng 的 ZEN IAC 中分别加入 2000 ng α -ZEL-G、 β -ZEL-G, HPLC 测定过柱后的 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 回收率。经过比较 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 过柱前后的 HPLC 色谱图, 过柱后分别得到 1845.80 ng α -ZEL-G、1828.21 ng β -ZEL-G, 均值回收率分别为 93.29%、91.41%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD, $n=5$)分别为 1.76%、0.97%, 结果良好(回收率>85%, RSD < 5%), 证明 α -ZEL-G、 β -ZEL-G、都可以被免疫亲和柱截留, 与亲和柱内抗体有较好的亲和力。

2.6 ZEN IAC 饱和柱容量检测

在 4000 ng 规格的 ZEN IAC 中投入 8000 ng ZEN, 通过液相色谱仪检测得到 ZEN 平均回收率为 52.41%, RSD 为 2.06% ($n=5$), 结果表明 4000 ng 规格的 ZEN IAC 饱和柱容量为 4193 ng, 即每支 4000 ng 规格 ZEN IAC 实际可以结合 4193 ng ZEN。在 1000 ng 规格的 ZEN IAC 中投入 4000 ng ZEN, 通过液相检测得到 ZEN 平均回收率为 26.9%, RSD 为 1.23% ($n=5$), 结果表明 1000 ng 规格的 ZEN IAC 饱和柱容量为 1076 ng, 即每支 1000 ng 规格 ZEN IAC 实际可以结合 1076 ng ZEN。

2.7 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 建立 IAC-HPLC 柱容量实时监测方法

以 4000 ng 和 1000 ng 柱容量的 ZEN IAC 为实验材料, 研究不同浓度的 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 作为 IAC-HPLC 的柱容量实时监测方法中示踪物与不同浓度的 ZEN 上柱, HPLC 可同时测定得到 α -ZEL-G、 β -ZEL-G 和 ZEN 在不同添加量条件下的回收率。

如表 1、2 所示, 结果表明在 α -ZEL-G 的投入量为 50%、100%和 150% ZEN IAC 标称柱容量时, 会影响 ZEN 与 IAC 内的抗体结合, 降低 ZEN 的回收率, 无法作为柱容量监测物; β -ZEL-G 投入上样液中, 若超过柱容量, 也会对 ZEN 的回收率有影响, 在 ZEN 标称柱容量范围内, β -ZEL-G 对 ZEN 回收率的影响明显小于 α -ZEL-G, 在 β -ZEL-G 添加量为标称柱容量的 50%时, 所有浓度的 ZEN 回收率大于 80%, 高低两种柱容量规格的亲和柱回收率情况有同样的趋势, ZEN 与 α -ZEL-G(或 β -ZEL-G)二者之和(实时柱容量= α -ZEL-G/ β -ZEL-G 添加量 \times α -ZEL-G/ β -ZEL-G 回收率+ZEN 添加量 \times ZEN 回收率)为实际测得的柱容量, 从而在测定 ZEN 的同时得到 IAC 柱容量。

表 1 α -ZEL-G 对 ZEN 回收率的影响($n=3$)
Table 1 Effects of α -ZEL-G on the recovery of ZEN ($n=3$)

IAC 柱容量/ng	添加量/ng		平均回收率/%		RSDs/%		实时柱容量/ng
	α -ZEL-G	ZEN	α -ZEL-G	ZEN	α -ZEL-G	ZEN	
4000	6000	4000	48.57	46.66	4.20	6.95	>4000
		2000	56.18	67.36	3.12	2.00	>4000
		500	71.09	84.98	2.43	5.99	>4000
		100	77.54	93.25	2.23	1.30	>4000
		20	79.23	99.34	2.94	11.93	>4000
	4000	4000	76.98	67.81	3.35	4.50	>4000
		2000	92.49	86.29	2.24	3.23	>4000
		500	90.11	91.20	5.62	4.76	>4000
		100	93.28	94.38	1.75	2.10	>4000
		20	90.48	102.40	3.72	14.82	>4000
2000	4000	83.37	74.34	1.93	8.23	>4000	
	2000	86.37	87.38	3.86	4.26	>3000	

表 1(续)

IAC 柱容量/ng	添加量/ng		平均回收率/%		RSDs/%		实时柱容量/ng
	α -ZEL-G	ZEN	α -ZEL-G	ZEN	α -ZEL-G	ZEN	
1000		500	90.37	94.56	2.00	2.43	>2000
		100	87.43	98.30	3.34	2.67	>2000
		20	94.24	103.40	2.31	8.93	>2000
	1500	1000	50.34	47.46	6.23	3.03	>1000
		500	57.17	63.50	4.14	7.08	>1000
		100	74.14	86.53	5.63	1.54	>1000
	1000	20	84.23	98.23	2.30	9.12	>1000
		1000	61.70	62.47	4.81	4.35	>1000
		500	86.23	79.40	7.93	4.75	>1000
	500	100	91.09	92.88	2.34	3.30	>1000
		20	93.12	97.25	5.91	9.43	>1000
		1000	73.40	82.30	5.65	4.65	>1000
		500	90.10	93.30	2.62	3.24	>800
		100	92.10	100.23	1.77	2.75	>500
		20	94.12	104.20	2.34	6.13	>400

表 2 β -ZEL-G 对 ZEN 回收率的影响($n=3$)
Table 2 Effects of β -ZEL-G on the recovery of ZEN ($n=3$)

IAC 柱容量/ng	添加量/ng		平均回收率/%		RSDs/%		实时柱容量/ng
	β -ZEL-G	ZEN	β -ZEL-G	ZEN	β -ZEL-G	ZEN	
4000	6000	4000	58.04	62.57	3.23	2.84	>4000
		2000	55.67	88.77	6.65	2.45	>4000
		500	73.73	90.53	2.93	4.54	>4000
		100	82.18	92.59	1.86	4.70	>4000
		20	69.19	97.88	10.56	8.76	>4000
	4000	4000	65.08	76.74	5.75	7.56	>4000
		2000	61.01	95.53	2.13	2.54	>4000
		500	81.97	91.08	2.54	5.94	>4000
		100	96.64	114.71	6.56	3.23	>4000
		20	79.26	102.92	3.43	6.60	>4000
	2000	4000	59.39	85.34	6.56	6.80	>4000
		2000	83.13	90.63	5.43	2.92	>3000
		500	89.41	104.37	3.91	2.77	>2000
		100	94.64	101.37	5.53	6.45	>1000
		20	93.64	110.72	9.91	4.56	>1000
	1500	1000	59.83	61.66	2.65	3.65	>1000
		500	58.22	74.65	5.24	6.75	>1000
		100	65.68	98.94	10.65	2.35	>1000
20		81.29	102.65	3.02	8.14	>1000	
1000	1000	65.64	72.88	6.54	5.45	>1000	
	500	65.44	91.67	1.65	3.65	>1000	
	100	86.36	105.62	3.46	5.60	>1000	
	20	91.23	99.12	5.75	7.58	>1000	
500	1000	73.36	83.77	3.54	3.95	>1000	
	500	90.49	93.04	2.75	1.94	>900	
	100	88.25	103.01	6.46	3.45	>500	
	20	93.68	104.01	5.45	12.18	>500	

2.8 β -ZEL-G IAC 柱容量实时检测方法样品加标回收验证

选用柱容量为 4000 ng 的 ZEN IAC, 以 2000 ng 的 β -ZEL-G 为柱容量实时监测示踪物, 建立柱容量实时监测 IAC-HPLC 方法。将建立的方法应用于 ZEN 最常污染的 3 种类粮食(玉米、大米和小麦)的样品提取液的加标回收实验中, 验证方法的准确性和可重复性。结果如表 3 所示, 小麦样

品柱容量实时检测方法的平均 ZEN 加标回收率为 92.84%~139.12%, RSDs 为 0.92%~13.74%, 玉米为 88.59%~115.64%, RSDs 为 1.81%~6.07%, 大米为 84.23%~108.56%, RSDs 为 3.12%~9.32%。说明在实际样品的加标回收实验验证中, ZEN 的回收率和 RSD 基本在有效范围之内, 检测结果正常。在小麦样本中的回收率和 RSD 略偏高, 可能是由于基质干扰, 提取方法需要进一步优化。

表 3 β -ZEL-G 柱容量实时监测样品加标回收实验($n=5$)
Table 3 Spiked recovery experiments of β -ZEL-G column capacity real-time monitoring sample ($n=5$)

样品	ZEN 加标量/ng	平均回收率/%		RSDs/%		实时柱容量/ng
		β -ZEL-G	ZEN	β -ZEL-G	ZEN	
小麦	4000	61.57	86.34	8.75	5.10	>4000
	2000	84.56	94.97	4.35	7.41	>3000
	500	91.28	92.84	7.88	0.92	>1500
	100	88.82	93.36	2.16	2.31	>1000
	20	79.28	139.12	5.65	13.74	>1000
玉米	4000	56.32	88.59	2.39	2.53	>4000
	2000	69.17	99.22	3.84	2.30	>3000
	500	65.97	93.82	11.37	2.72	>1000
	100	88.02	98.13	1.37	6.07	>1000
	20	71.54	115.64	4.56	1.81	>1000
大米	4000	63.83	84.23	5.57	3.24	>4000
	2000	80.09	93.15	2.55	9.32	>3000
	500	86.52	92.51	8.37	7.41	>1500
	100	88.38	97.87	6.43	3.12	>1000
	20	83.65	108.56	10.66	7.41	>1000

3 结 论

为了提高 ZEN 的检测的准确度, 简化柱容量监测程序, 本研究旨在研发一种便捷、高效应用于 IAC 柱容量检测的示踪物。本研究通过添加 β -ZEL-G 到样本中, 作为每次检测的内标物, 可保证在未知样本中对 ZEN 含量检测结果的准确性和 IAC 柱容量质量检测的有效性, 若未知样本中没有检测出 ZEN, 但 β -ZEL-G 添加量的回收率大于 80%, 表明 IAC 柱容量满足质量要求, 检测结果准确有效; 当未知样本中测出 ZEN, 且 ZEN 检出量加上 β -ZEL-G 检出量的总量大于标称柱容量 80%, 表明 IAC 柱容量满足质量要求, 检测结果准确有效。这种方法初步实现了免疫亲和柱柱容量的实时检测, 对食品安全检测方法具有较高的科学价值和前景。通过人工的方法合成的结构类似物不会与天然存在的结构类似物混淆而影响检测结果, 具有作为柱容量示踪物的潜力。由于柱容量一般影响高浓度样品的回收率, 所以高浓度样品更需要监测柱容量, 2000 ng β -ZEL-G 在加标样品中不会对 ZEN 的回收率造成影响, 不

仅可以监测高浓度样品检测时的柱容量, 也可以作为所有浓度样品的阳性对照, 保障柱容量和检测过程的有效性。通过研究发现: 结构类似物与 IAC 抗体的亲和力是选择合适的柱容量实时监测示踪物的关键, 后续会继续研究 ZEN 衍生物的改造, 进一步降低其与 IAC 抗体的亲和力, 研究更适用于免疫亲和柱柱容量示踪物的结构类似物。

参考文献

- [1] BHATNAGAR D, YU J, EHRLICH KC. Toxins of filamentous fungi [J]. *Chemical Immunology*, 2002, 81: 167-206.
- [2] BENNETT J, KLICH M. Mycotoxins [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003, 16(3): 497-516.
- [3] 吕俊美, 王文哲, 王得州. 玉米赤霉烯酮的毒性作用及检测方法研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2020, 9(4): 38-41.
LYU JM, WANG WL, WANG DZ. Research progress on toxicity and detection methods of zearalenone [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020, 9(4): 38-41.
- [4] GROMADZK A, WASKIEWICZ A, CHELKOWSKI J, et al. Zearalenone and its metabolites: Occurrence, detection, toxicity and guidelines [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2008, 1(2): 209-220.

- [5] GADZALA R, KUZNIEWSKA A, BUSZEWSKI B. Analytical approaches and preparation of biological, food and environmental samples for analyses of zearalenone and its metabolites [J]. *Analytical Chemistry*, 2020, 39(1): 157–167.
- [6] HUANG S, GOKULKUMAR K, MANI G, *et al.* Synthesis and characterization of Bi₂S₃-embedded carbon nanofibers as a novel electrochemical biosensor for the detection of mycotoxin zearalenone in food crops [J]. *FlatChem*, 2024, 45: 100652.
- [7] LU P, QIAN Y, JIN Y, *et al.* Ultrasensitive detection of zearalenone based on electrochemiluminescent immunoassay with Zr-MOF nanoplates and Au@MoS₂ nanoflowers [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1299: 342451.
- [8] SONG L, LU M, LIANG P, *et al.* Smartphone-assisted ratiometric FRET aptasensor based on quantum dots and gold nanoparticles for point-of-care testing of zearalenone in cereals [J]. *Food Control*, 2024, 165: 110666.
- [9] HUANG R, HUANG Y, LIU H, *et al.* A bifunctional AuNP probe-based enzyme-linked immunosorbent assay for facile and ultrasensitive detection of trace zearalenone in coix seed [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 184: 108152.
- [10] SHEPHARD G. Current status of mycotoxin analysis: A critical review [J]. *Journal of AOAC International*, 2016, 99(4): 842–848.
- [11] SHEPHARD G. Determination of mycotoxins in human foods [J]. *Chemical Society Reviews*, 2008, 37: 2468–2477.
- [12] 于成广. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定粮谷中的玉米赤霉烯酮 [J]. *化学分析计量*, 2018, 27(5): 64–67.
- YU CG. Rapid determination of zearalenone in grain by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chemical Analysis and Meterage*, 2018, 27(5): 64–67.
- [13] FATEMEH K, ANISEH Z, MARZIEH R, *et al.* Simultaneous evaluation and monitoring ochratoxin A, aflatoxins and zearalenone contamination levels of cereals from Iranian retail market using HPLC-FLD: A 3-year survey [J]. *Food Chemistry Advances*, 2023, 3: 100490.
- [14] XU J, LIU T, CHI J, *et al.* Online high-efficient specific detection of zearalenone in rice by using high-loading aptamer affinity hydrophilic monolithic column coupled with HPLC [J]. *J Talanta*, 2020, 21: 121309.
- [15] WANG H, JUAN H, SONG L, *et al.* Etching of halloysite nanotubes hollow imprinted materials as adsorbent for extracting of zearalenone from grain samples [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 157: 104953.
- [16] 吴雪莹, 戴琴, 付睿婕, 等. 高效液相色谱-质谱法测定 6 种玉米赤霉醇类真菌毒素 [J]. *食品工业*, 2024, 45(7): 296–301.
- WU XY, DAI Q, FU RJ, *et al.* Determination of 6 zearalol mycotoxins by high performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Food Industry*, 2024, 45(7): 296–301.
- [17] ZHAO L, ZHOU L, DIEUDONNE M, *et al.* Ultrasensitive analyses of zearalenone in grain samples with a catalytic oxidation platform involving gold nanomaterials [J]. *Food Chemistry: X*, 2024, 23: 101666.
- [18] HU Y, MA C, HUANG W, *et al.* Adsorption behavior of activated carbon for the elimination of zearalenone during bleaching process of corn oil [J]. *Grain & Oil Science and Technology*, 2023, 6(1): 24–33
- [19] DU Q, ZHANG W, XU N, *et al.* Efficient and simultaneous removal of aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ and zearalenone from vegetable oil by use of a metal-organic framework adsorbent [J]. *Food Chemistry*, 2023, 418: 135881.
- [20] GHANBARIAN M, BEHBAHANI M, ESRAFI LI A, *et al.* Application of a dispersive solid-phase extraction method using an amino-based silica-coated nanomagnetic sorbent for the trace quantification of chlorophenoxyacetic acids in water samples [J]. *Journal of Separation Science*, 2017, 40: 3479–3486.
- [21] BEHBAHANI M, BAGHERI S, AMINI M. Developing an ultrasonic-assisted d- μ -SPE method using amine-modified hierarchical lotus leaf-like mesoporous silica sorbent for the extraction and trace detection of lamotrigine and carbamazepine in biological samples [J]. *Microchemical Journal*, 2020, 158: 105268.
- [22] SOBHI H, BEHBAHANI M, GHAMBARIAN M, *et al.* Extraction of carbonyl derivatives from ozonated wastewater samples using hollow fiber liquid phase microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection [J]. *Microchemical Journal*, 2019, 148: 331–337.
- [23] PEREIRA V, FERNANDES J, CUNHA S. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2014, 36: 96–136.
- [24] RAHMANI A, JINAP S, SOLEIMANY F. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2009, 8: 202–251.
- [25] ANFOSSI L, DI-NARDO F, CAVALERA S, *et al.* A lateral flow immunoassay for straightforward determination of fumonisin mycotoxins based on the quenching of the fluorescence of CdSe/ZnS quantum dots by gold and silver nanoparticles [J]. *Mikrochimica Acta*, 2018, 185(2): 94–103.
- [26] 王清, 游丽娜, 李贤良. 免疫亲和柱净化-HPLC 法同时测定动物肌肉及牛奶中 6 种玉米赤霉醇类药物残留 [J]. *食品工业科技*, 2013, 34(17): 298–302.
- WANG Q, YOU LN, LI XL. Immunoaffinity column purification and HPLC method were used to determine 6 kinds of zearalitol residues in animal muscle and milk [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 34(17): 298–302.
- [27] 胡云, 王帅, 邹勇平, 等. 优化的免疫亲和柱净化-高效液相色谱法检测食品中的玉米赤霉烯酮 [J]. *食品安全导刊*, 2022, 33: 121–125.
- HU Y, WANG S, ZOU YP, *et al.* Optimized immunoaffinity column purification with high performance liquid chromatography for detection of zearalenone in food [J]. *China Food Safety Magazine*, 2022, 33: 121–125.
- [28] LUO S, LIU Y, GUO Q, *et al.* Determination of zearalenone and its derivatives in feed by gas chromatography-mass spectrometry with immunoaffinity column cleanup and isotope dilution [J]. *Toxins*, 2022, 14(11): 764.
- [29] BRENN-STRUCKHOFOVA Z, FUREDER C, CICHNA-MARKL M, *et al.* Co-isolation of deoxynivalenol and zearalenone with sol-gel immunoaffinity columns for their determination in wheat and wheat products [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216: 5828–5837.
- [30] 顾一丹, 马悦, 陈金男, 等. 基于壳聚糖微球的黄曲霉毒素 B₁ 免疫亲和柱开发制备 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(7): 217–224.
- GU YD, MA Y, CHEN JN, *et al.* Development and preparation of immunoaffinity column for aflatoxin B₁ based on chitosan microspheres [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(7): 217–224.
- [31] TIAN Y, LIU Z, SUN M, *et al.* Establishment, application and comparison of three immunoaffinity pretreatment techniques for mycotoxins systematically [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2024, 18: 7224–7233.

(责任编辑: 韩晓红 于梦娇)