陈佳文, 陈嘉欣, 杜英杰, 等. 玉米赤霉烯酮金属酚醛网络涂层免疫磁珠的制备及在检测前处理中的应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 348−356. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010234
CHEN Jiawen, CHEN Jiaxin, DU Yingjie, et al. Preparation of Zearalenone Metal Phenolic Network-coated Immunomagnetic Beads and Their Application in Pre-treatment of the Assay[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 348−356. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010234

· 分析检测 ·

玉米赤霉烯酮金属酚醛网络涂层免疫磁珠的制备及在检测前处理中的应用

陈佳文[1,2], 陈嘉欣[1,2], 杜英杰[3], 简　姗[2,4], 赵令波[2,4], 周宝青[2,3], 张　威[2,4], 熊勇华[3], 郭　平[2,4,*]
（1.江西农业大学食品科学与工程学院, 江西南昌 330000;
2.江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院, 江西南昌 330200;
3.南昌大学食品学院, 江西南昌 330000;
4.南昌市食品快速检测重点实验室, 江西南昌 330200）

摘　要: 本研究旨在建立一种基于金属-酚醛网络（MPN）修饰的免疫磁珠特异性快速富集玉米赤霉烯酮（ZEN）的前处理方法，用于粮食及饲料中 ZEN 的高效检测。通过将金属酚醛网络涂层包覆在 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 磁性微球表面，利用金属-酚羟基配位及氢键作用定向固定 ZEN 单克隆抗体。系统优化结果显示，在 pH5.5 缓冲体系、80 μg/mg 抗体标记量、孵育 10 min 的最佳条件下，所制备免疫磁珠对 ZEN 的饱和吸附量为 35 ng/mg，Langmuir 吸附平衡常数 K_L 值为 595.1 L/mg。使用玉米、小麦及饲料进行加标回收试验，加标浓度为 30~60 μg/kg 时，回收率均大于 90%，变异系数在 1.3%~4.5% 之间；当加标浓度为 120 μg/kg 时，回收率分别为 81.0%、83.7% 和 77.6%，变异系数≤6.5%。针对玉米、小麦、饲料等复杂基质中淀粉、色素等干扰物，该方法展现出较好的抗干扰性能。将该方法与免疫亲和柱法同时应用在真实样本检测前处理中，两者结果相对标准偏差≤7.30%，一致性良好。该策略通过特异性识别与可控解离的协同作用，为粮食和饲料中 ZEN 的高效富集提供了可靠解决方案。

关键词: 玉米赤霉烯酮, 免疫磁珠, 磁富集, 粮谷, 饲料
中图分类号: TS201.6　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0348−09
DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2025010234　　本文网刊:

Preparation of Zearalenone Metal Phenolic Network-coated Immunomagnetic Beads and Their Application in Pre-treatment of the Assay

CHEN Jiawen[1,2], CHEN Jiaxin[1,2], DU Yingjie[3], JIAN Shan[2,4], ZHAO Lingbo[2,4], ZHOU Baoqing[2,3], ZHANG Wei[2,4], XIONG Yonghua[3], GUO Ping[2,4,*]
（1.College of Food Science and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330000, China;
2.Jiangxi Provincial General Institute of Testing and Certification Food Inspection and Testing Research Institute, Nanchang 330200, China;
3.College Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330000, China;
4.Nanchang Key Laboratory of Food Rapid Testing, Nanchang 330200, China）

Abstract: The present study aimed to establish a pretreatment method for specific and rapid enrichment of zearalenone (ZEN) using metal-phenolic network (MPN)-modified immunomagnetic beads (IMBs) for efficient detection of ZEN in grains and feed. Surfaces of Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 magnetic microspheres were coated with MPNs to enable directional

收稿日期: 2025−01−23
基金项目: 江西省重点研发计划项目（20232BBG70030）; 江西省检验检测认证总院科研项目（ZYK202403）; 国家重点研发计划（2022YFF1101004）。
作者简介: 陈佳文（1999−）, 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: chenjiawen257@163.com。
*** 通信作者:** 郭平（1980−）, 男, 博士, 正高级工程师, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: jxftgp@163.com。

immobilization of anti-ZEN antibodies via metal-phenolic hydroxyl coordination and hydrogen bonding. The results revealed that at pH5.5, 80 μg antibody immobilized per mg magnetic beads, and 10 min incubation duration, the IMBs had a saturated adsorption capacity of 35 ng/mg, with the Langmuir adsorption equilibrium constant K_L of 595.1 L/mg. Spiked recovery tests performed in corn, wheat, and feed matrices, with recoveries >90% and coefficients of variation (CVs) within 1.3%~4.5% at spiking levels of 30~60 μg/kg. At the elevated spiking level of 120 μg/kg, consistent recoveries of 81.0%, 83.7%, and 77.6% were maintained with CVs≤6.5% across the three matrices. This method demonstrated excellent anti-interference performance towards interfering substances such as starch and pigments in complex substrates, including corn, wheat, and feed. When this method and the immunoaffinity column method were separately applied for sample pretreatment, the results showed a relative standard deviation of ≤7.30%, indicating good consistency between the two methods. By achieving synergy between specific recognition and controllable dissociation, our strategy provides a reliable solution for efficient ZEN enrichment in grains and feed.

Key words: zearalenone; immunomagnetic beads; magnetic enrichment; cereal; feed

近年来, 真菌毒素(Mycotoxin)引起的食品安全问题已成为最突出的公共卫生问题之一。真菌毒素是由真菌或霉菌在适宜的条件下产生的小分子次级代谢产物, 其化学性质稳定且不易被破坏[1−2]。联合国粮农组织数据显示, 世界上每年约有 25% 的农产品受到真菌毒素污染, 被污染的农产品易产生毒害作用, 严重的甚至会威胁生命健康[3]。此外, 真菌毒素多具有较强的热稳定性, 加热或烹饪不能使其破坏或降解[4]。常见污染食品的真菌毒素主要有玉米赤霉烯酮(Zearalenone, ZEN)、黄曲霉毒素 B_1(Aflatoxin B_1, AFB_1)、赭曲霉毒素 A(Ochratoxin, OTA)、脱氧雪腐镰刀菌烯醇(Deoxynivalenol, DON)等[5]。ZEN 是目前污染范围最广的镰刀菌毒素之一, 常污染谷物粮食作物和动物饲料等, 对人类健康造成很大的威胁[6−9]。ZEN 是一种具有雌激素作用的真菌毒素, 可导致人或动物流产、死胎、畸胎[10−13]。针对 ZEN 污染现状, 许多国家都制定了限量标准, 我国规定谷物及其制品中 ZEN 的限量为 60 μg/kg, 饲料及其产品中的限量为 0.1~1.5 mg/kg[14]。

目前精准检测食品中 ZEN 的方法有液相色谱法[15−17]、液相色谱-质谱分析法[18−20]、酶联免疫吸附法(ELISA)[21] 等。由于食品样品基质复杂, 一般都需要使用固相萃取柱, 免疫亲和柱(IAC)或 QuEChERS 方法等进行提取和纯化[22], 前处理操作繁琐、耗时、成本较高, 且不能有效去除与待分析物化学性质相似的杂质[23]。

免疫磁珠(Immunomagnetic bead, IMBs)技术, 是通过磁场作用特异性分离目标产物的新兴技术[24−25]。以表面具有活化基团的磁性微球与抗体结合, 利用抗原-抗体的特异性结合, 形成磁珠-抗原抗体复合物, 在磁力作用下, 达到分离特异性抗原的目的。金属-酚醛网络(Metal-phenolic networks, MPN)是由金属离子与酚类配体配位的超分子网络结构[26]。利用 MPN 与各功能组分之间的相互作用(氢键、π-π 相互作用、疏水相互作用等)可以简化抗体与磁珠的偶联过程, MPN 的金属离子可以引导抗体在 MPN 表面的定向固定, 从而实现抗体-抗原(目标物质)的高特异性识别[27]。

本研究以磁性复合微球为基底, 以单宁酸和 Zr^{4+}作为有机配体和交联剂[27], 通过单宁酸的氧化和自聚合[28−29] 在磁性复合微球表面包覆金属酚醛网络涂层, 制备了 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN。本研究通过整合 MPN 涂层对抗体的高亲和力以及磁性微球快速磁响应性的优点, 首次开发了以 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 为载体的 ZEN 免疫磁珠, 并建立了粮谷及饲料样本中 ZEN 的高效前处理方法。

1　材料与方法

1.1　材料与仪器

聚乙烯吡咯烷酮(Polyvinyl pyrrolidone, PVP)、四甲基氢氧化铵(Tetramethylammonium hydroxide, TMAH)、单宁酸(Tannic acid, TA)、八水氯氧化锆(Zirconyl chloride solution, $ZrOCl_2{\cdot}8H_2O$)、四乙氧基硅烷(Tetraethoxysilane, TEOS)、3-氨丙基三乙氧基硅烷(3-Aminopropyl-triphenyloxy-silane, APTES) 上海麦克林生化股份有限公司; 3-吗啉丙磺酸(3-Morpholinopropanesulfoinc acid, MOPS)缓冲液　自行配制; 胶体金免疫层析试纸条、磁性 Fe_3O_4 微球　南昌大学中德食品研究院; 玉米赤霉烯酮单克隆抗体　实验室制备; 甲醇　色谱纯, 美国 HoneyWell (B&J)公司; 免疫亲和层析柱　北京华安麦科生物技术有限公司; 0.22 μm 尼龙滤膜　岛津仪器有限公司; 玉米、小麦、饲料等真实样本　江西省检验检测认证总院食品检验检测研究院。

Direct-Q5 超纯水仪　Millipore 公司; HZ-2014B 恒温鼓风干燥箱　上海福玛设备有限公司; QT-1 涡旋振荡仪　上海琪特分析仪器有限公司; TGL-20M 高速冷冻离心机　湘仪仪器开发有限公司; BD202 电子天平　日本岛津公司; UP5200H 超声波处理器　上海生析超声仪器有限公司; Agilent 1260 Infinity 液相色谱-质谱联用仪　配有电喷雾离子源(ESI), Agilent 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　磁性 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 的合成及金属酚醛网络涂层的修饰　称取 2.5 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP), 溶于 20 mL 去离子水中, 超声溶解。取 100 mg Fe_3O_4 加入到 250 mL 三颈瓶中, 加入 PVP 溶液并补

水至 100 mL。机械搅拌反应 14~16 h。反应结束后，产物经去离子水和无水乙醇洗涤数次，保存于无水乙醇中。取上述 PVP 修饰的磁性 Fe_3O_4 微球，重悬于 100 mL 乙醇-水（7∶3, V/V）混合液中，超声分散 5 min，加入 0.4 mL TMAH，机械搅拌反应。另将 0.3 mL 四乙氧基硅烷（Tetraethoxysilane, TEOS）和 0.3 mL 3-氨丙基三乙氧基硅烷（3-Aminopropyl-triphenyloxy-silane, APTES）溶于 30 mL 乙醇，逐滴加入反应体系。继续搅拌反应 13 h，产物经去离子水和无水乙醇洗涤后保存于去离子水中[30]。

取 10 mg Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 复合微球，去除上清液后分散于 5 mL 去离子水中。在超声辅助下，依次加入 115 μL 单宁酸溶液（10 mg/mL）和 70 μL 氯氧化锆溶液（10 mg/mL）。随后加入 5 mL MOPS 缓冲液（100 mmol/L, pH 为 8.5）以调节 pH。反应完成后，磁性分离去除上清，用去离子水洗涤磁珠 3 次，以去除多余的 TA 和 Zr^{4+}，最后将 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 重悬于 0.01 mol/L MES（2-吗啉乙磺酸）缓冲液（pH8.0）中保存。

利用透射电镜（TEM）、能量色散 X 射线谱（EDS）、Zeta 电位及动态光散射（DLS）等，对磁珠的形貌及表面特性进行系统表征。

1.2.2 玉米赤霉烯酮免疫磁珠的制备 取 1 mg Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 磁珠，经 PBST 缓冲液（0.01 mol/L, pH7.0, 0.1% 吐温-20）洗涤 2~3 次，磁分离 1 min 去除上清；取 0.1 mg 磁珠重悬于 0.5 mL MES 缓冲液（pH6.5）中，加入 40 μg ZEN 单克隆抗体，室温振荡反应 30 min；随后加入 10% 酪蛋白封闭 30 min。PBST 缓冲液洗涤 3 次，用去离子水重悬并于 4 ℃ 保存。该磁珠标记为 ZEN 免疫磁珠。

1.2.3 ZEN 免疫磁珠偶联、吸附条件的优化 基于胶体金免疫层析试纸条定量分析免疫磁珠吸附后上清液中玉米赤霉烯酮的残留量，系统优化其制备及吸附条件。首先以 0.01 mol/L PBS 配制 0.0625~32 ng/mL 的 ZEN 标准溶液梯度，通过试纸条测定 T/C 值（OD_T/OD_C），建立 B/B0（B/B0 为各浓度与空白 T/C 值之比）与 ZEN 对数浓度的标准曲线。基于该曲线，探究不同 pH（5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0）的 MES 缓冲液及抗体标记量（20、40、60、80、100、120 μg/mg）对免疫磁珠偶联效果的影响，通过胶体金免疫层析法检测上清液 ZEN 含量，结合 T/C 值与吸附效率（吸附效率（%）=（初始浓度−吸附后上清浓度）/初始浓度×100）确定最佳偶联条件。以优化后偶联条件合成免疫磁珠，评估不同吸附时间（0、3、5、10、15、20、25 min）下的吸附效率以此来确定最佳吸附时长，随后将其与系列浓度 ZEN 标准溶液（0、0.5、1、2、4、6、8、10、12、14、16 ng/mL）反应，通过平衡浓度与吸附量绘制吸附等温线，并利用 Langmuir 和 Freundlich 模型拟合分析吸附机制，经模型参数计算得出免疫磁珠的饱和吸附容量。该模型可表示为：

$$C_e/q_e = 1/(K_L q_m) + C_e/q_m$$

式中，C_e 为吸附达平衡时清液中 ZEN 的浓度（mg/L）；q_e 为吸附平衡时单位质量磁珠对 ZEN 的吸附量（mg/g）；q_m 为单位质量免疫磁珠对 ZEN 的最大吸附容量（mg/g）；K_L 为 Langmuir 吸附平衡常数（L/mg）。

1.2.4 免疫磁珠洗脱条件的优化 0.1 mg 免疫磁珠与 1 mL ZEN 标准溶液（4 ng/mL）于室温静置吸附 10 min，磁分离并洗涤后，分别用 500 μL 浓度 100% 的乙醇、正己烷、乙酸乙酯、甲醇、乙腈洗脱 10 min，收集洗脱液，氮气吹干后用乙腈-水-甲醇（46∶8∶46, V/V/V）复溶，过 0.22 μm 尼龙滤膜后用 LC-MS 上机检测，定量分析洗脱效率（洗脱效率（%）=洗脱液中测得的目标物浓度/初始浓度×100）。基于最佳洗脱溶剂，进一步优化洗脱条件参数：洗脱剂浓度（10%、20%、40%、60%、80%、90%、100%）、洗脱时间（1、3、5、10、15、20 min）、洗脱剂体积（300、400、500、600、700 μL）。

1.2.5 玉米赤霉烯酮免疫磁珠在真实样本检测中的应用 基于免疫磁珠富集净化，结合 LC-MS/MS 检测玉米、小麦及饲料中玉米赤霉烯酮含量。通过方法学考察验证了其准确度与精密度，并与免疫亲和柱方法对比，证实其可靠性。

1.2.5.1 ZEN 免疫磁珠前处理方法 参考国标 GB 5009.209-2016[31] 对真实样本进行提取，准确称量 4 g 粉碎样品于 50 mL 离心管，加入 20 mL 乙腈-水（80∶20, V/V）提取液，涡旋振荡 2 min 后超声处理 20 min，4000 r/min 离心 10 min，取 0.5 mL 上清液与 10 mL PBST 缓冲液混合。取 1 mL 混合液加入 500 μL 玉米赤霉烯酮免疫磁珠，涡旋分散后静置吸附 10 min，磁分离弃上清后，用 1 mL 甲醇洗脱（1 滴/s），洗脱液经 50 ℃ 氮吹浓缩，用 1 mL 初始流动相（乙腈-水-甲醇（46∶8∶46, V/V/V））复溶，过 0.22 μm 尼龙滤膜后，进行 LC-MS 检测。本研究采用液相色谱-质谱联用技术对目标物进行分析，具体条件如下：色谱分离使用 C_{18} 反相色谱柱（50 mm×2.0 mm, 0.25 μm），流动相流速为 0.2 mL/min，柱温维持在 40 ℃，进样量为 5 μL。质谱检测采用电喷雾电离负离子模式（ESI^-），主要参数包括：毛细管电压 3.0 kV，离子源温度 120 ℃，去溶剂气温度 350 ℃；氮气作为锥孔气（100 L/h）和去溶剂气（600 L/h），氩气作为碰撞气（压力 2.60×10^{-4} Pa）。

1.2.5.2 方法学考察 分别称取 4 g 玉米、小麦、饲料，添加 ZEN 标准溶液使其终浓度分别为 30、60、120 μg/kg，每个浓度设置 3 个平行，按 1.2.5 中 ZEN 免疫磁珠富集分离方法进行前处理，用 LC-MS 测定样品中 ZEN 浓度。计算回收率和变异系数（Coefficient of variation, CV）。

采用 ZEN 免疫磁珠富集净化前处理方法和免疫亲和柱前处理方法分别对玉米、小麦、饲料等真实样本进行处理，通过对比两种方法的检测结果，评价两种前处理方法的一致性。

1.3　数据处理

通过实验得到的数据使用 Excel 2020 进行相应的计算和分析，LC-MS 测定的数据使用 MassHunter 进行处理和分析。使用 Origin 2021 绘图、对数据拟合等。

2　结果与分析

2.1　Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 的合成及其金属酚醛网络包覆

本研究参考 Graf 等[32] 提出的快速的硅胶胶体涂层方法，结合 Stöber 生长法制备 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 复合微球。首先在 Fe_3O_4 磁性微球的制备过程中引入聚乙烯吡咯烷酮(PVP)作为分散剂，借助其分子链的空间位阻效应与静电排斥作用，有效抑制纳米颗粒的自聚集倾向[32]。然后直接将其转移到氨和乙醇的混合溶液中，加入四乙氧基硅烷(TEOS)和 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES)混合溶液，TEOS 和 APTES 作为功能互补性硅烷偶联剂，可在 Fe_3O_4 表面实现 SiO_2 包覆与氨基修饰的协同效应。反应结束后其表面便能生成光滑均匀、厚度可调的二氧化硅壳，同时在二氧化硅表面修饰氨基基团。如图 1(a)透射电镜结果所示，与初始状态下 Fe_3O_4 磁性微球相比，复合微球 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 呈现清晰的核壳结构，SiO_2 壳层厚度均匀，且 Fe_3O_4 核与壳层界面分明；Zeta 电位变化如图 1(b)，经 SiO_2 包覆和氨基修饰后因为氨基(-NH_2)质子化形成带正电的-NH_3^+，使 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 表面为正电性(20.2 mV)[33]，以上表征结果表明磁性微球表面成功修饰 SiO_2 和氨基。

利用金属酚醛网络涂层对复合微球进行修饰，得到 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN。MPN 通过 Zr^{4+}与 TA 的配位作用形成，赋予磁珠表面丰富的酚羟基和金属配位位点。金属酚醛网络包覆后，透射电镜结果如图 1(a)所示，Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 磁珠的壳层厚度有所增加。由于 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 表面 TA 分子的脱质子作用[34]，其 Zeta 电位也发生明显变化。如图 1(b)所示，磁珠表面由原来的正电(20.2 mV)变为负电(−20.5 mV)。通过 EDS 元素映射对其进一步表征，结果如图 1(c)所示，Fe、C、O 元素在磁珠表面高度重叠，说明 Fe^{3+}与单宁酸中的邻苯二酚基团(C-O 配位位点)形成了稳定的配位键。此外，磁珠表面分散的 Zr 元素(源自 MPN 中 Zr^{4+}-TA 配位网络)，也可表明 MPN 涂层的成功修饰。动态散射仪表征结果如图 1(d)，包覆 MPN 的磁珠粒径增大至 400 nm 左右。以上结果表明磁珠表面成功包覆金属酚醛网络涂层。

2.2　玉米赤霉烯酮免疫磁珠的制备

金属酚醛网络表面富含的羟基基团，使 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 复合材料对抗体具有较强的非特异性吸附能力[27]。该材料可以通过氢键、疏水作用和离子相互作用等物理作用方式与抗体偶联。Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 粒径的增加和 Zeta 电位的变化可以证明 ZEN 单克隆抗体(mAb_{ZEN})成功地偶

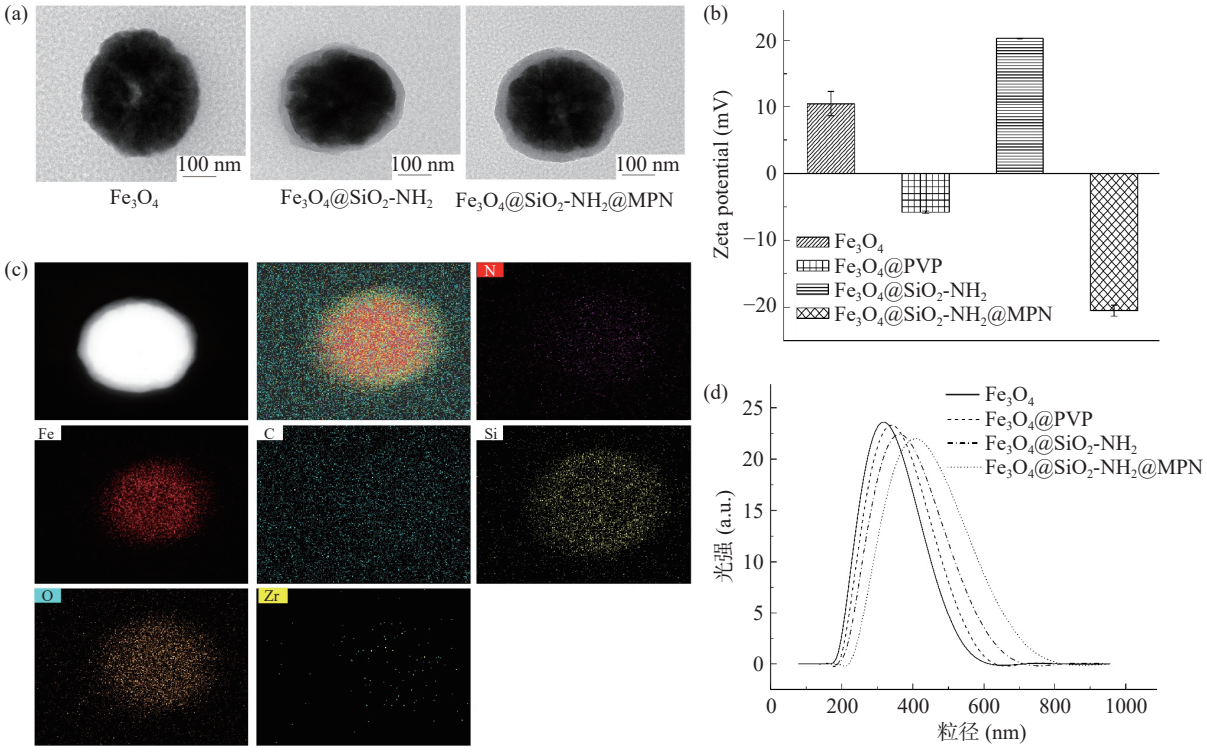


图 1　材料表征

Fig.1　Material characterization

注：(a)透射电镜；(b)电位；(c)Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN EDS 元素映射表征；(d)粒径。

联到 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 表面。如图 2(a)所示，偶联 ZEN 单克隆抗体后，材料的粒径显著增大。在偶联过程中，MPN 表面的羟基会与抗体氨基酸残基中的氨基(-NH_2)和巯基(-SH)发生反应，导致 Zeta 电位值的变化[35]。如图 2(b)所示，偶联后的 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN-mAb_{ZEN} 的 Zeta 电位值从−20.5 mV 变为−16.7 mV，这种电位变化进一步验证了抗体的成功偶联。

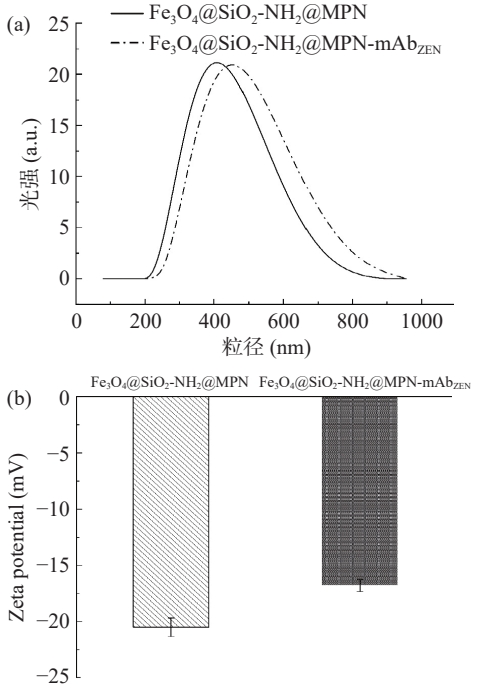


图 2 磁珠偶联抗体后粒径和电位的变化

Fig.2 Changes in particle size and potential after coupling antibodies to magnetic beads

注：(a)粒径变化；(b)电位变化。

2.3 免疫磁珠偶联、吸附条件的优化

2.3.1 免疫磁珠偶联缓冲液 pH 的优化 使用不同 pH 的缓冲液制备 ZEN 免疫磁珠，结果如图 3(a)所示，当 MES 缓冲液 pH 为 5.5~7.5 时，免疫磁珠对 ZEN 的吸附效率均在 80% 以上；pH 为 5.5 时，吸附效率最高，为 92.21%。并且在该 pH 下试纸条 T/C 值最高，反映了该 pH 下抗体偶联效率相对较高。随着 pH 的升高吸附效率下降，当 pH 大于 7.5 时，吸附效率降到 80% 以下；可能是因为在弱酸条件下，MPN 涂层中的酚羟基(-OH)部分解离，形成带负电的酚氧基团[36]。而抗体在 pH5.5 时，表面带正电，两者之间存在静电吸引作用。其次，金属离子在该条件下仍保持配位能力，能够与抗体中的氨基(-NH_2)或羧基(-COOH)发生配位作用。因此，选择 pH5.5 为 ZEN 免疫磁珠的最佳偶联缓冲液 pH。

2.3.2 免疫磁珠抗体标记量的优化 抗体标记量与免疫磁珠的吸附效率密切相关，为了提高吸附效率，本研究对抗体标记量进行了优化。吸附效率随抗体标记量变化关系如图 3(b)所示，抗体标记量在

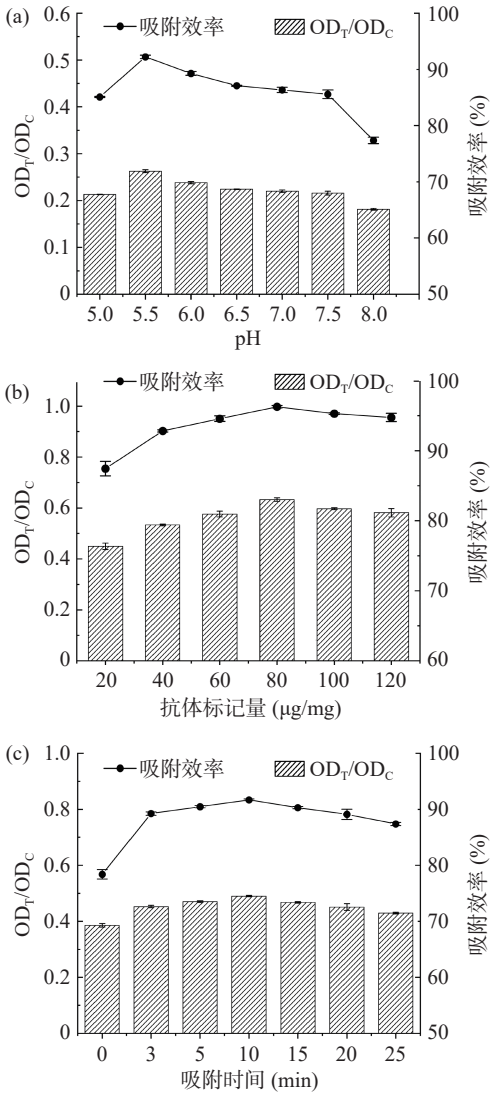


图 3 免疫磁珠偶联、吸附条件优化

Fig.3 Optimization of immunobead coupling and adsorption conditions

注：(a)抗体偶联缓冲液 pH 优化；(b)抗体标记量优化；(c)吸附时间优化。

20~80 μg/mg 时，随着抗体标记量的增加免疫磁珠的吸附效率提高。当抗体标记量为 80 μg/mg 时吸附效率最高达到 96.27%，但磁珠表面抗体过多时(100、120 μg/mg)，吸附效率和试纸条 T/C 信号值有所下降。这可能是抗体在磁珠表面过多堆积造成空间位阻，阻碍了抗原-抗体的结合。因此，免疫磁珠合成时最佳抗体标记量为 80 μg/mg。

2.3.3 免疫磁珠吸附反应时间的优化 吸附反应时间是免疫磁珠吸附净化效果的影响因素之一，在一定范围内吸附反应时间的延长，可以提高免疫磁珠与目标物的结合效率。这主要归因于有效结合位点的充分利用。ZEN 免疫磁珠吸附效率随时间变化结果见图 3(c)所示，在反应初期阶段，随着反应时间的增加吸附效率也随之提高，10 min 时吸附效率最高为 91.68%，且试纸条 T/C 值相对最高。然而，当吸附进行至特定时间阈值后，体系逐渐达到吸附-解离平衡状态，此时继续延长反应时间无法提高捕获效率。从

实验结果来看，当吸附时间超过 10 min 后，吸附效率开始下降。这一现象可通过抗原-抗体结合动力学理论进行解释：即在平衡状态下，单位时间内被捕获的毒素分子数量与解离的分子数量达到动态平衡，从而导致总体吸附量趋于稳定[37]。在长时间的吸附过程中，抗原-抗体复合物的解离速率加剧。当解离速率开始超过结合速率时，净吸附量不再维持平衡，而是开始减少，最终在实验数据上表现为吸附效率的下降。通过系统优化实验确定的最佳吸附时间，既可确保获得理想的富集效果，又能有效提高实验效率。因此吸附时间不宜过长，本实验优化的最优吸附时间为 10 min。

2.3.4　免疫磁珠饱和吸附量的确定　在不同浓度 ZEN 标准溶液中加入 0.1 mg ZEN 免疫磁珠进行吸附，并收集吸附反应后的上清液，用胶体金免疫层析试纸条检测上清中 ZEN 浓度，通过对不同初始浓度条件下免疫磁珠吸附 ZEN 的性能研究，建立了吸附平衡体系中 ZEN 浓度（C_e，mg/L）与固相吸附量（q_e，mg/g）的定量关系（如图 4（a）所示）。为深入了解吸附机制，采用 Langmuir 等温吸附模型对实验数据进行拟合分析。拟合结果如图 4（b）所示，C_e/q_e 与 C_e 呈现良好的线性相关性，线性方程 y=28.568x+0.0048，相关系数 R^2=0.9939。经模型参数计算得出，该免疫磁珠对 ZEN 的饱和吸附容量为 35 ng/mg，K_L 值为 595.1 L/mg。该结果表明磁珠表面抗体与 ZEN 分子间具有较高的亲和力，这些数据为后续优化免疫磁珠的应用条件提供了重要的理论依据。

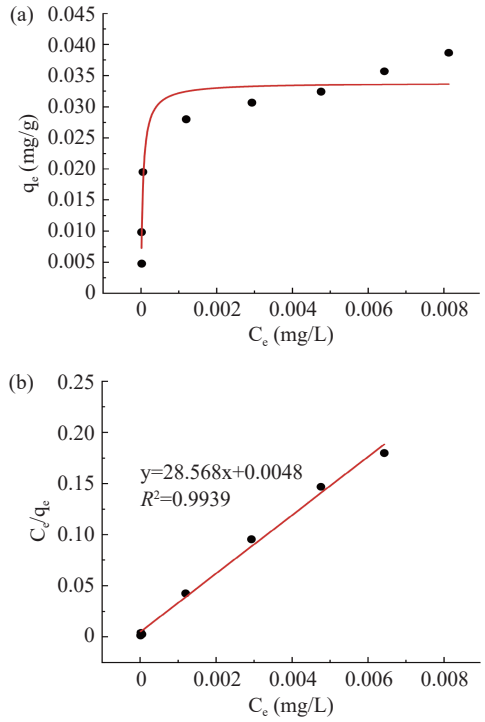


图 4　ZEN 免疫磁珠饱和吸附容量

Fig.4　Saturation capacity of ZEN immunomagnetic beads

注：（a）ZEN-免疫磁珠吸附平衡曲线；（b）Langmuir 方程拟合结果。

2.4　免疫磁珠洗脱条件的优化

2.4.1　免疫磁珠洗脱液种类的优化　抗原-抗体的非共价键结合是一种可逆的免疫反应，洗脱是指利用有机试剂破坏抗原-抗体复合物之间的非共价键结合来实现抗原-抗体的解离[38]。分别使用乙醇、乙酸乙酯、乙腈、甲醇、正己烷进行洗脱，结果如图 5（a）所示，其中甲醇的洗脱效率最高，可达到 90.71%。因此，选用甲醇作为洗脱液。

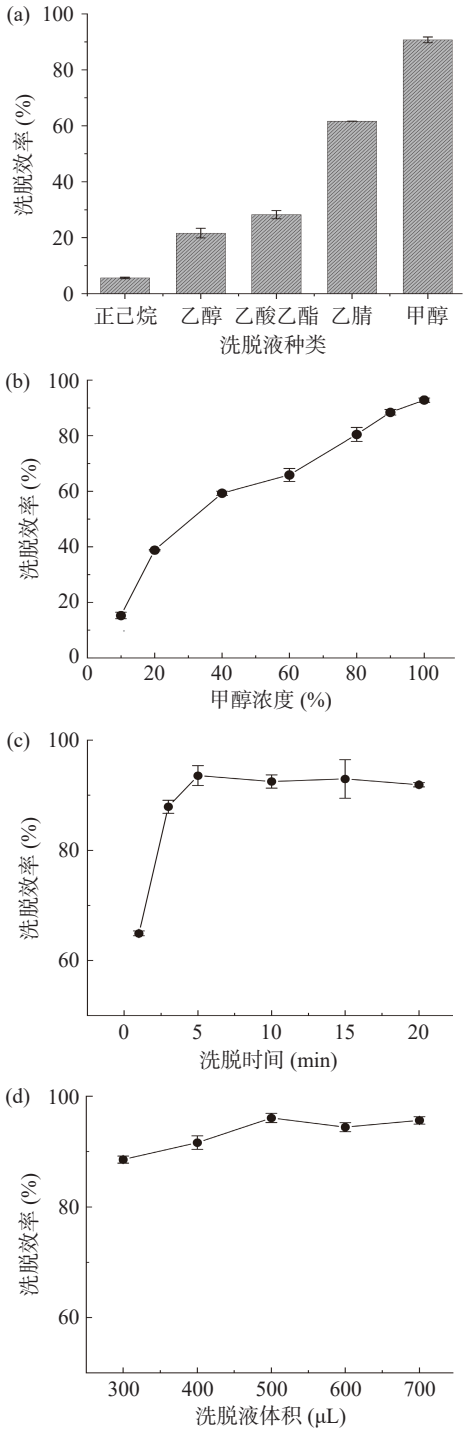


图 5　免疫磁珠洗脱条件优化

Fig.5　Optimization of elution conditions for immunomagnetic beads

注：（a）洗脱液种类优化；（b）甲醇浓度优化；（c）洗脱时间优化；（d）洗脱液体积优化。

2.4.2 免疫磁珠洗脱液浓度优化 本研究系统考察了甲醇-水体系中甲醇体积分数(10%~100%)对免疫磁珠洗脱效率的影响规律。如图 5(b)所示,洗脱效率与甲醇浓度呈正相关。当甲醇比例低于 80% 时,洗脱效率维持在较低水平(<80%);当浓度提升至 90% 时,效率明显提高至 87%;而采用纯甲醇时,洗脱效率达到最优值 92.8%。基于此实验结果,为确保实际样本检测的可靠性,最终选择纯甲醇作为最优洗脱溶剂,该条件可有效破坏抗原-抗体的偶联,从而实现目标物的高效回收。

2.4.3 免疫磁珠洗脱液时间优化 洗脱时间是影响洗脱效率的因素之一。如图 5(c)所示,在初始阶段,洗脱效率随时间的延长而快速上升,这主要归因于有机溶剂对抗原-抗体复合物的逐步解离作用。当洗脱时间达到 5 min 时,达到最佳解离平衡状态,此时洗脱效率可达 96.3%。进一步延长洗脱时间至 5 min 以上,洗脱效率维持在 95%~97% 的稳定区间,趋于平衡。这一现象表明,5 min 的洗脱时间已足以使目标物从免疫磁珠表面解吸附。基于上述实验结果,本研究确定 5 min 为最优洗脱时间。

2.4.4 免疫磁珠洗脱液体积优化 为探究洗脱体积对免疫磁珠洗脱效率的影响,分别使用 300、400、500、600、700 μL 100% 甲醇进行洗脱。如图 5(d)所示,随洗脱液体积增加,洗脱效率逐渐提高,由 87.8% 提高至 95%,洗脱液体积增加到 500 μL 后,洗脱效率无明显变化。基于绿色化学理念和实验效率考量,最终确定 500 μL 为最佳洗脱体积,该条件既可确保 95% 以上的洗脱效率,又能最大限度减少有机溶剂消耗。

2.5 方法学考察

2.5.1 加标回收 用 ZEN 免疫磁珠富集净化前处理方法对真实样本进行加标回收试验,结果如表 1 所示,加标浓度为 30~60 μg/kg 时,回收率大于 90%,变异系数在 1.3%~4.5% 之间;当加标浓度为 120 μg/kg 时,三种样本的回收率分别为 81.0%、83.7% 和 77.6%,可能是 ZEN-免疫磁珠在富集高浓度样本时已经达到饱和,所以在加标 120 μg/kg 时回收率有所下降。

表 1 样本的加标回收率及变异系数

Table 1 Spiked recoveries and coefficients of variation for samples

样本	加标浓度(μg/kg)	检测浓度(μg/kg)			回收率(%)	变异系数(%)
玉米	30	29.5	31.1	32.4	103.3	3.8
	60	58.6	54.5	56.1	97.5	2.9
	120	97.1	100.0	111.5	81.0	6.4
小麦	30	29.5	28.7	32.4	100.7	2.0
	60	57.2	57.3	58.8	96.3	1.3
	120	97.0	109.6	94.9	83.7	6.5
饲料	30	27.2	30.3	28.3	95.5	4.5
	60	53.4	51.2	55.6	89.1	3.3
	120	93.1	98.2	89.1	77.6	4.1

2.5.2 真实样本的方法学对比 分别采用国标方法(免疫亲和层析柱法)和建立的 ZEN 免疫磁珠富集净化前处理方法对玉米、小麦、饲料样本进行前处理,通过对比两种前处理方法的检测结果,评价两种前处理方法的一致性。如表 2 所示,在玉米、小麦、猪饲料及鸡饲料基质中两种前处理方法的相对标准偏差分别为 1.83%~7.10%、3.56%~7.30%、1.31%~3.14%、2.19%~4.04%,以上结果证明了两种前处理方法的结果一致性良好。该性能指标与 Zhang 等[39] 报道的自动化免疫磁珠-HPLC 联用技术(方法间偏差<10%)相吻合。

表 2 免疫亲和层析柱和免疫磁珠净化结果比较

Table 2 Comparison of immunoaffinity chromatography column and immunomagnetic bead purification result

样品名称	免疫亲和柱测定结果(μg/kg)	免疫磁珠测定结果(μg/kg)	相对标准偏差(%)
玉米1	25.59±1.73	23.15±2.06	7.10
玉米2	34.10±1.19	31.54±1.83	5.53
玉米3	41.25±3.89	40.21±2.06	1.83
小麦1	39.07±3.11	37.17±1.82	3.56
小麦2	35.34±1.92	31.89±3.04	7.30
小麦3	21.09±2.10	22.95±1.42	5.93
猪饲料1	87.86±5.27	84.09±5.68	3.14
猪饲料2	120.37±9.75	119.22.±12.8	1.31
猪饲料3	63.75±6.04	66.01±4.67	2.43
鸡饲料1	76.31±1.83	72.11±5.80	4.04
鸡饲料2	112.67±8.89	109.28±8.93	2.19
鸡饲料3	53.06±3.51	50.17±5.90	3.99

3 结论

本研究以 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 为基底,加入单宁酸(TA)与 Zr^{4+},利用单宁酸的氧化和自聚合反应,成功在 Fe_3O_4@SiO_2-NH_2 表面包覆金属酚醛网络涂层。Fe_3O_4@SiO_2-NH_2@MPN 可以通过氢键、离子相互作用和疏水相互作用等物理作用与抗体偶联,在 30 min 内实现抗体在其表面直接、高效偶联。以此为基础创建了一种富集净化方法,并将其应用于玉米、小麦及饲料等真实样本中 ZEN 含量检测的前处理,平均回收率分别为 81.0%~103.3%、83.75%~100.7%、77.6%~99.5%,变异系数分别为 2.9%~6.4%、1.3%~6.5%、3.3%~4.5%。该方法与免疫亲和柱法的平行比对结果显示,两种方法检测结果的相对标准偏差≤7.30%,具有良好的一致性。上述结果表明本研究建立的免疫磁珠富集净化前处理方法适用于真实样本中 ZEN 含量的检测。

© The Author(s) 2026. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

参考文献

[1] CHAUHAN R, SINGH J, SACHDEV T, et al. Recent ad-

vances in mycotoxins detection[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 81: 532−545.
[2] ZHAO Zitong, ZHANG Zhenzhen, ZHANG Haoxiang, et al. Small peptides in the detection of mycotoxins and their potential applications in mycotoxin removal[J]. Toxins, 2022, 14(11): 795.
[3] ESKOLA M, KOS G, ELLIOTT C T, et al. Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25%[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020, 60(16): 2773−2789.
[4] OUYANG Binbin, ZHANG Wenli, GUANG Cuie, et al. Opportunities and challenges in developing promising mycotoxin-degrading enzymes with high thermostability and strong pH activity/stability[J]. Food Bioscience, 2024, 62: 105239.
[5] GRUBER-DORNINGER C, JENKINS T, SCHATZMAYR G. Global mycotoxin occurrence in feed: A ten-year survey[J]. Toxins, 2019, 11(7): 375.
[6] GAJĘCKA M, ZIELONKA Ł, GAJĘCKI M. The effect of low monotonic doses of zearalenone on selected reproductive tissues in pre-pubertal female dogs-A review[J]. Molecules, 2015, 20(11): 20669−20687.
[7] BEN TAHEUR F, FEDHILA K, CHAIEB K, et al. Adsorption of aflatoxin B1, zearalenone and ochratoxin A by microorganisms isolated from Kefir grains[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 251: 1−7.
[8] JING Siyuan, LIU Chunmei, ZHENG Jian, et al. Toxicity of zearalenone and its nutritional intervention by natural products[J]. Food & Function, 2022, 13(20): 10374−10400.
[9] AHMED ADAM M A, TABANA Y M, MUSA K B, et al. Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer (Review)[J]. Oncology Reports, 2017, 37(3): 1321−1336.
[10] LI Weibin, WANG Zedong, WANG Xinwei, et al. Highly efficient detection of deoxynivalenol and zearalenone in the aqueous environment based on nanoenzyme-mediated lateral flow immunoassay combined with smartphone[J]. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2023, 11(5): 110494.
[11] REN Z H, DENG H D, DENG Y T, et al. Effect of the *Fusarium* toxins, zearalenone and deoxynivalenol, on the mouse brain[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016, 46: 62−70.
[12] AGAHI F, JUAN C, FONT G, et al. *In silico* methods for metabolomic and toxicity prediction of zearalenone, *α*-zearalenone and *β*-zearalenone[J]. Food and Chemical Toxicology, 2020, 146: 111818.
[13] HUANG Zhipeng, HE Juan, LI Yuanyuan, et al. Preparation of dummy molecularly imprinted polymers for extraction of zearalenone in grain samples[J]. Journal of Chromatography A, 2019, 1602: 11−18.
[14] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 2761-2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 2761-2017 National food safety standard: Maximum levels of mycotoxins in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2017.]
[15] 王燕, 林明娥. 免疫亲和柱-高效液相色谱法测定食品中玉米赤霉烯酮的含量[J]. 食品安全导刊, 2022(7): 124−127. [WANG Yan, LIN Ming'e. Determination of zearalenone in food by immunoaffinity column and high performance liquid chromatography[J]. China Food Safety Magazine, 2022(7): 124−127.]
[16] 刘坚, 孙婷琳, 秦时聪, 等. 高效液相色谱同步检测小麦中脱氧雪腐镰刀菌烯醇和玉米赤霉烯酮的方法研究[J]. 食品科技, 2024, 49(2): 329−333. [LIU Jian, SUN Tinglin, QIN Shicong, et al. Simultaneous determination of deoxynivalenol and zearalenone in wheat by high performance liquid chromatography[J]. Food Science and Technology, 2024, 49(2): 329−333.]
[17] HU Meihua, GE Wen, LIU Xiujuan, et al. Preconcentration and determination of zearalenone in corn oil by a one-step prepared polydopamine-based magnetic molecularly imprinted polymer (MIP) with high-performance liquid chromatography with fluorescence (HPLC-FLD) detection[J]. Analytical Letters, 2022, 55(3): 343−354.
[18] ALBERO B, FERNÁNDEZ-CRUZ M L, PÉREZ R A. Simultaneous determination of 15 mycotoxins in aquaculture feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Toxins, 2022, 14(5): 316.
[19] WU Zhuqiang, JIANG Xiangqiong, YANG Yanqun, et al. Amphiphilic polymers facilitated solid-phase extraction coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for direct extraction and analysis of zearalenone and zearalanone in corn juice samples[J]. Journal of Separation Science, 2023, 46(14): 2300112.
[20] YOUNG J, AH P, SUNG K, et al. Simultaneous determination of trichothecenes and zearalenone in food by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)[J]. Analytical Letters, 2024, 57(16): 2585−2597.
[21] 王文珺, 刘怡菲, 韩霄, 等. 玉米赤霉烯酮一步 ELISA 法的建立及应用[J]. 食品工业科技, 2016, 37(14): 78−82,89. [WANG Wenjun, LIU Yifei, HAN Xiao, et al. Development and application of one-step enzyme-linked immunosorbent assays for zearalenone[J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(14): 78−82, 89.]
[22] NI Baoxia, YE Jin, XUAN Zhihong, et al. Automatic pretreatment of dispersive liquid liquid microextraction based on immunomagnetic beads coupled with UPLC-FLD for the determination of zearalenone in corn oils[J]. Toxins, 2023, 15(5): 337.
[23] 李超辉, 熊勇华, 郭亮, 等. 纳米免疫磁珠富集猪肉中的盐酸克伦特罗[J]. 食品科学, 2013, 34(14): 182−186. [LI Chaohui, XIONG Yonghua, GUO Liang, et al. Enrichment of clenbuterol in pork using immunomagnetic nanobeads[J]. Food Science, 2013, 34(14): 182−186.]
[24] WANG Zhouli, CAI Rui, GAO Zhenpeng, et al. Immunomagnetic separation: An effective pretreatment technology for isolation and enrichment in food microorganisms detection[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2020, 19(6): 3802−3824.
[25] HOEPPENER A E L M, SWENNENHUIS J F, TERSTAPPEN L W M M. Immunomagnetic separation technologies[J]. Recent Results Cancer Res, 2012, 195: 43-58.
[26] EJIMA H, RICHARDSON J J, CARUSO F. Metal-phenolic networks as a versatile platform to engineer nanomaterials and biointerfaces[J]. Nano Today, 2017, 12: 136−148.
[27] LIN Zhixing, LIU Hai, RICHARDSON J J, et al. Metal-phenolic network composites: From fundamentals to applications[J]. Chemical Society Reviews, 2024, 53(22): 10800−10826.
[28] LEE H, HAN Y, PARK J H. Enhanced deposition of Fe(III)-tannic acid complex nanofilm by Fe(III)-embedded dextran nanocoating[J]. Applied Surface Science, 2022, 573: 151598.
[29] LI Dongdong, XU Xun, WANG Xingwei, et al. General sur-

face modification method for nanospheres via tannic acid-Fe layer-by-layer deposition: Preparation of a magnetic nanocatalyst[J]. ACS Applied Nano Materials, 2019, 2(6): 3510−3517.

[30] 刘传勇. 磁性四氧化三铁微球的溶剂热法制备及其二氧化硅包覆研究[D]. 青岛: 青岛大学, 2014. [LIU C Y. Study on solvothermal preparation of magnetic Fe_3O_4 microspheres and their silica coating[D]. Qingdao: Qingdao University, 2014.]

[31] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. GB 5009.209-2016 食品安全国家标准 食品中玉米赤霉烯酮的测定[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016. [National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, China Food and Drug Administration. GB 5009.209-2016 National food safety standard: Determination of zearalenone in foods[S]. Beijing: China Standards Press, 2016.]

[32] GRAF C, VOSSEN D L J, IMHOF A, et al. A general method to coat colloidal particles with silica[J]. Langmuir, 2003, 19(17): 6693−6700.

[33] NGUYEN M D, TRAN H V, XU Shoujun, et al. Fe_3O_4 nanoparticles: Structures, synthesis, magnetic properties, surface functionalization, and emerging applications[J]. Applied Sciences, 2021, 11(23): 11301.

[34] 魏夏夏. 聚集诱导发光微球免疫层析试纸条的研制及在氯霉素、降钙素原、玉米赤霉烯酮检测中的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2024. [WEI X X. Preparation of immunochromatographic strip based on aggregation-induced luminescence nanobeads for the chloramphenicol procalcitonin and zearalenone detection[D]. Nanchang: Nanchang University, 2023.]

[35] CHEN Zongyou, TANG Yanyan, GUO Ping, et al. Integration of a biocompatible metal-phenolic network and fluorescence microspheres as labels for sensitive and stable detection of carbendazim with a lateral flow immunoassay[J]. Food Chemistry, 2024, 450: 139260.

[36] GUO Zhenhu, XIE Wensheng, LU Jingsong, et al. Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: A review[J]. Journal of Materials Chemistry B, 2021, 9(20): 4098−4110.

[37] DINH T L, NGAN K C, SHOEMAKER C B, et al. Using antigen-antibody binding kinetic parameters to understand single-molecule array immunoassay performance[J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(23): 11335−11339.

[38] 刘文韬. 玉米赤霉烯酮免疫磁珠净化及分析方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2023. [LIU W T. Study on zearalenone immunomagnetic beads clean-up and analytical method[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2023.]

[39] ZHANG Bo, LIU Wenting, LIU Zhenjiang, et al. High-performance liquid chromatography for the sensitive zearalenone determination by the automated immunomagnetic beads purifier for one-step sample pre-treatment[J]. European Food Research and Technology, 2022, 248(1): 109−117.