

基于磁珠-适配体的高效液相色谱-串联质谱法  
检测食品中的黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

古鑫宇<sup>a</sup> 郎 乐<sup>b\*</sup> 王建伟<sup>c</sup> 赵丽辉<sup>a\*</sup>

(<sup>a</sup>长春理工大学生命科学技术学院 长春 130022; <sup>b</sup>吉林省食品检验所 长春 130103;  
<sup>c</sup>中国科学院长春应用化学研究所, 国家电化学和光谱研究分析中心 长春 130022)

**摘 要** 本文构建了特异性识别黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) 的磁珠-适配体, 并与高效液相色谱-串联质谱联用 (LC-MS/MS), 建立食品中 AFB<sub>1</sub> 的定量检测方法。利用碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化法, 将羧基磁珠进行活化。活化后的羧基磁珠与 5' 端氨基修饰的适配体进行孵育结合, 通过酰胺反应将适配体共价连接在羧基磁珠表面, 固定在磁珠表面的适配体作为捕捉探针将样品提取液中的 AFB<sub>1</sub> 分离, 通过 LC-MS/MS 对 AFB<sub>1</sub> 进行定性和定量分析。检测结果表明: AFB<sub>1</sub> 在浓度 0.25 ~ 25 ng/mL 呈良好的线性关系, 相关系数  $R^2 = 0.999$ , 定量检出限为 0.25 ng/mL, 回收率达到 80.3% ~ 92.5%, 相对标准偏差 (RSD) 低于 8%。该方法操作简单、快速便捷、可痕量地检测 AFB<sub>1</sub>, 所制备的磁珠-适配体可重复利用, 为定量检测 AFB<sub>1</sub> 提供了另一种技术支持。

**关键词** 磁珠; 适配体; 高效液相色谱-串联质谱; 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>

中图分类号: O652.6 文献标识码: A 文章编号: 1000-0518(2020)11-1324-09  
DOI: 10.11944/j.issn.1000-0518.2020.11.200125

曲霉毒素主要是由黄曲霉和寄生曲霉产生的次级代谢产物, 是一种剧毒的真菌毒素, 一旦进入食物链, 会给人类的健康和生命安全带来威胁。黄曲霉毒素又被分为: 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>)、黄曲霉毒素 B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>)、黄曲霉毒素 G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) 和黄曲霉毒素 G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) 等多种霉菌毒素, 其中 AFB<sub>1</sub> 毒性最强, 具有很强的致癌性、致毒性和致畸性<sup>[1]</sup>。自 20 世纪 60 年代发现以来, AFB<sub>1</sub> 一直被世界各地所报道, 约 35% 的人类癌症病例与饮食中 AFB<sub>1</sub> 的存在直接相关, 因此被国际癌症研究机构列为 I 类致癌物<sup>[2]</sup>。

AFB<sub>1</sub> 的污染问题日益突出, 严重威胁了人们的身体健康, 随着国家经济水平的提高和社会的不断进步, 人们对于食品安全的关注也越来越高。同时, 我国对食品中 AFB<sub>1</sub> 的限量标准制定了严格的限量指标, 见表 1。

表 1 食品中 AFB<sub>1</sub> 的限量  
Table 1 Limits of AFB<sub>1</sub> in food

Food category	Limited/( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )
Corn and corn products	20
Rice, brown rice, rice	10
Malt, barley, other grains	5.0
Peanut and peanut products	20
Fermented bean products	5.0
Peanut oil, corn oil	20
Vegetable oil (except peanut oil and corn oil)	10
Soy sauce, vinegar, brewing sauce (mainly from grain)	5.0

因此建立灵敏、快速、便捷的检测方法至关重要。食品检测中 AFB<sub>1</sub> 的前处理方法约占整个分析检测时间的 60%, 免疫亲和柱前处理方法结合高效液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 的检测方法是目前检

2020-04-29 收稿, 2020-06-09 修回, 2020-07-08 接受  
通讯联系人: 赵丽辉, 教授; Tel/Fax: 0431-85583891; E-mail: 1252042806@qq.com; 研究方向: 纳米材料的合成及肿瘤的诊断、治疗  
共同通讯联系人: 郎乐, 高级工程师; Tel/Fax: 0431-88675932; E-mail: langle2000@163.com; 研究方向: 食品质量与安全

测 AFB<sub>1</sub> 的主要方法<sup>[3]</sup>。免疫亲和柱是该类检测方法的主要耗材,其前处理方法存在耗时、价格昂贵、不可重复利用等问题<sup>[4]</sup>,限制了它的应用,因此急需开发新的前处理方法来替代传统的免疫亲和柱前处理方法。

近年来随着纳米材料的广泛应用,Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 系列的磁性纳米微球(Magnetic Beads,简称磁珠)因其具有良好的超顺磁性引起了广泛关注<sup>[5]</sup>。磁珠可以通过外部磁场的控制使待测物进行分离,操作简单无需离心或过滤从而节省时间,并且减少了有机试剂的使用避免了实验人员身体的伤害以及环境的污染。由于磁珠成本低、分离速度快、表面易于修饰、灵敏度高、选择性广泛等优点,在生物检测领域有着重要的应用<sup>[6]</sup>。但是磁珠对靶标分子存在着特异性和识别性差的弊端,因此限制了它们的发展。适配体的出现能够有效解决这个问题,适配体是单链寡核苷酸(单链 DNA 或 RNA)具有特定的和复杂的三维空间结构,如凸环、发夹、假结、三链或者是四链体。适配体最大的优点是可以识别各种靶标分子并与其高特异性、高稳定性地结合<sup>[7]</sup>。适配体的亲和力和特异性与抗体相似,与抗体相比,适配体通过化学合成获得从而低成本生产,消除批次间的差异。王舒鹤等<sup>[8]</sup>为提高适配体在血清中的稳定性,对适配体进行化学基团修饰,改善适配体的药动学性质,提高其稳定性和靶标分子亲和力。因此,适配体可以通过引入基团以促进稳定性而不损失亲和力,对靶标分子表现出更好的选择性,具有高亲和力和特异性。

适配体可以广泛地捕获各种靶分子,如细胞<sup>[9]</sup>、核酸<sup>[10]</sup>、氨基酸<sup>[11]</sup>和蛋白质<sup>[12]</sup>等。目前已有研究表明,适配体可以代替抗体用于实际样品中各种霉菌毒素的检测,例如:黄曲霉毒素、赭曲霉毒素 A 和四环素等多种霉菌毒素<sup>[13]</sup>。

本实验根据磁珠和适配体的优点,建立了基于磁珠-适配体前处理的高效液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法检测食品中的 AFB<sub>1</sub>。其原理是利用碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化方法将羧基磁珠进行活化,活化后的羧基磁珠与 NH<sub>2</sub> 修饰的适配体孵育结合<sup>[14]</sup>,利用酰胺反应将 5'端 NH<sub>2</sub> 修饰的适配体共价连接在羧基修饰的磁珠上,固定在磁珠表面的适配体作为捕捉探针,可以特异性捕获样品提取液中适配体所对应的 AFB<sub>1</sub> 靶标分子,行使磁珠-适配体的特异性结合功能。通过 LC-MS/MS 检测适配体所捕获的 AFB<sub>1</sub> 含量,并与免疫亲和柱前处理方法的回收率、精密度、可重复利用性进行比较。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器和试剂

Quattro Premier XE 型三重四极杆质谱仪(美国沃特世科技有限公司);Waters Acquity UPLC 型高效液相色谱仪(HPLC,美国沃特世科技有限公司);KQ5200E 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);IKAMS3 型样品混合振荡器(上海圣科仪器设备有限公司);Tecan Infinite M200 型酶标仪(瑞士 Tecan 集团);Basic pH 计(赛多利斯科学仪器北京有限公司);LEICA TCS SP8 型激光扫描共聚焦显微镜(LSCM,德国莱卡微系统海德堡有限公司)。

羧基修饰 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 磁珠悬浮液(20 mg/mL,羧基含量 400 μmol/g,天津市信思乐色谱技术开发中心);AFB<sub>1</sub> 的适配体(apt-AFB<sub>1</sub>)序列:5'-GTTGGGCACGTGTTGTCTCTCTGTGTCTCGTGCCCTTCGCTAGGCCCCA-3'(5'端 NH<sub>2</sub> 修饰,生工生物工程上海股份有限公司);AFB<sub>1</sub> 标准品溶液,黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 免疫亲和柱(青岛普瑞邦生物工程有限公司);吗啉乙磺酸(MES,纯度 99%),*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS,纯度 99.5%),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC,纯度 98%),三(羟甲基)氨基甲烷(Tris,纯度 99.9%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);Tween20,乙腈,乙醇,甲酸,乙酸铵(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);NaCl,磷酸氢二钾(分析纯,北京北化精细化学品有限责任公司);实验中所用的水皆为去离子水。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 磁珠的活化

取 100 μL 羧基磁珠悬浮液于 2 mL 离心管中,用 25 mmol/L MES 缓冲液(pH=6.0)洗涤两次后,依次加入 17 μL EDC 和 NHS 溶液(均在预冷的 25 mmol/L MES 配制,最终浓度为 50 mg/mL),混合均匀

后室温振摇活化反应 30 min。

1.2.2 磁珠与适配体的结合

用 100 μL MES 缓冲液将活化后的羧基磁珠洗涤两次后,加入 100 μL 100 μmol/L apt-AFB<sub>1</sub> (在 25 mmol/L MES 中配制),室温振摇孵化 60 min。孵化结束后用 Tris 缓冲液(50 mmol/L, pH = 7.4)将磁珠-适配体结合物室温洗涤 4 次。最后将洗涤后的磁珠-适配体结合物重新悬浮于 100 μL 磁珠-适配体储备液(50 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、50 mmol/L NaCl、5 μL Tween20,去离子水配制)中,4 ℃ 保存,用于后续实验。

1.2.3 计算磁珠-适配体结合率

磁珠与适配体的结合率的计算公式(1):

$$W = \frac{\rho_1 V_2}{\rho_0 V_0} \times 100\%$$

(1)

式中,  $W$  为结合率,  $\rho_1$  为所测磁珠-适配体结合物的质量浓度 (ng/μL),  $V_1$  为所测磁珠-适配体结合物的体积 (μL),  $\rho_0$  为加入的适配体所测质量浓度 (ng/μL),  $V_0$  为加入的适配体体积 (μL)。

1.2.4 标准溶液和样品制备

取 1 mL 的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液(100 μg/mL)于 10 mL 容量瓶中,用甲醇水溶液(体积比 1:9)定容至刻度线,稀释成 10 μg/mL,摇匀,备用。

称取 5 g 粉碎后的谷物样品于 50 mL 离心管中,加入 1 g NaCl 与 25 mL 甲醇水溶液体积比 70:30),涡旋混匀 2 ~ 3 min,超声提取 30 min,8000 r/min 离心 15 min,取 6 mL 上清液转至 50 mL 离心管中,加入 14 mL 去离子水,用 0.22 μm 滤膜过滤,取 1 mL 续滤液备用。

1.2.5 磁珠-适配体捕获 AFB<sub>1</sub>

上述样品续滤液中加入 1 mL 磁珠-适配体结合物,室温振摇孵化 4 min,得到磁珠-适配体捕获 AFB<sub>1</sub> 的结合物,去除上清液。加入 100 μL 去离子水洗涤结合物 3 次,随后使用 100 μL 乙腈/水(体积比 60:40)洗脱 3 次,收集洗脱液于样品瓶中,4 ℃ 保存,用于 LC-MS/MS 对 AFB<sub>1</sub> 的检测。

1.2.6 LC-MS/MS 方法

液相色谱条件 色谱柱: Waters BEH C<sub>18</sub> 液相色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流速: 0.25 mL/min;进样量:10 μL,柱温:45 ℃;流动相:A 为 10 mmol/L 乙酸铵-0.1% 甲酸溶液;B 为甲醇溶液;梯度洗脱:0 ~ 2.5 min,33% B;2.5 ~ 25 min,33% ~ 98% B;25 ~ 30 min,98% B;30 ~ 31 min,98% ~ 33% B;31 ~ 35 min,33% B。

质谱条件 离子源模式:电喷雾离子源 ESI + ;检测方式:多反应监测(MRM);去溶剂温度:380 ℃;锥孔电压:35 V;离子源温度:110 ℃;毛细管电压:3.00 kV;锥孔气流:80 L/Hr;去溶剂化气流:600 L/Hr。

表 2 AFB<sub>1</sub> 的 MRM 扫描参数  
Table 2 MRM scanning parameters of AFB<sub>1</sub>

Compound name	Parent ion	Product ion	Cone/V	Collision/eV
AFB <sub>1</sub>	313.15	241.15	35.00	27.00
	313.15	284.84 *	35.00	23.00

Note: “\*” is the quantitative ion pair of AFB<sub>1</sub>.

2 结果与讨论

2.1 检测适配体含量的校准曲线建立

通过酶标仪检测反应体系里的适配体含量,进而计算适配体的结合率。由于磁珠对适配体的紫外吸收具有淬灭作用,导致磁珠溶液中的适配体浓度测得结果偏低,因此需要对磁珠溶液中的适配体浓度进行校准。配制浓度为 25、50、75、100 和 125 μmol/L 的适配体溶液,通过酶标仪检测适配体含量制作校准曲线如图 1A 所示。在 20 mg/mL 的羧基磁珠悬浮液中配制 25、50、75、100 和 125 μmol/L 浓度的适配体溶液作为磁珠-适配体的校准工作液,通过酶标仪检测适配体含量制作校准曲线图 1B。

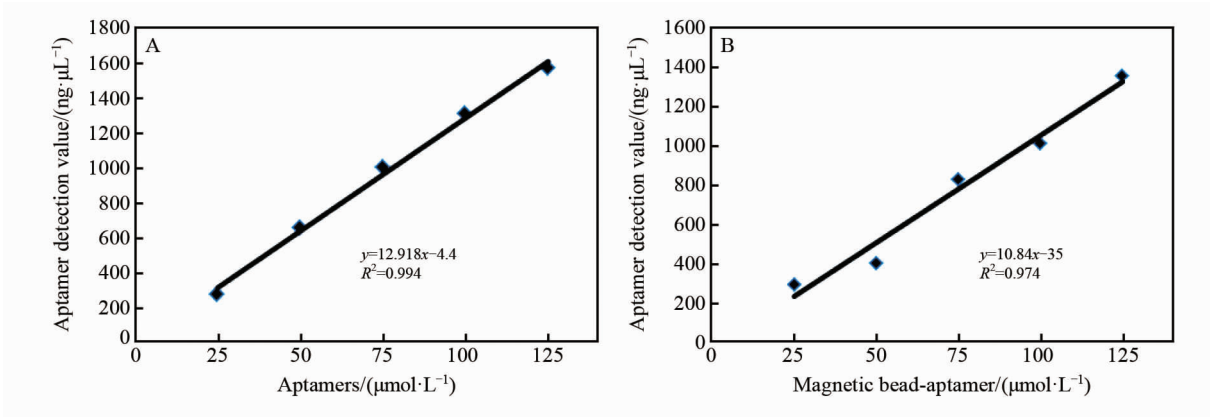


图 1 适配体(A)及磁珠-适配体(B)含量的标准曲线  
Fig.1 Standard curves of the aptamer (A) and magnetic bead-aptamer(B) content

适配体含量的校准曲线的线性回归方程为  $y = 12.918x - 4.4$ , 相关系数为  $R^2 = 0.994$ , 加入磁珠的适配体标准曲线的线性回归方程为  $y = 10.84x - 35$ , 相关系数为  $R^2 = 0.974$ 。结果表明,磁珠对适配体的含量测定有一定的影响。因此后续实验磁珠溶液中适配体的含量均采用图 1B 的校准曲线计算。

2.2 磁珠与适配体的结合方式

磁珠与适配体的结合条件和结合方式对磁珠-适配体的结合率有一定的影响<sup>[15]</sup>, 在本实验中考察了不同的结合条件和方式对磁珠-适配体结合率的影响。磁珠与适配体分别在室温和 4℃ 条件下进行不避光、避光实验并伴随振摇、涡旋、超声的方式进行孵育结合; 通过酶标仪检测磁珠-适配体的结合物, 并且计算磁珠-适配体的结合率。如图 2A 所示, 在室温不避光并伴随振摇的条件下, 磁珠-适配体的结

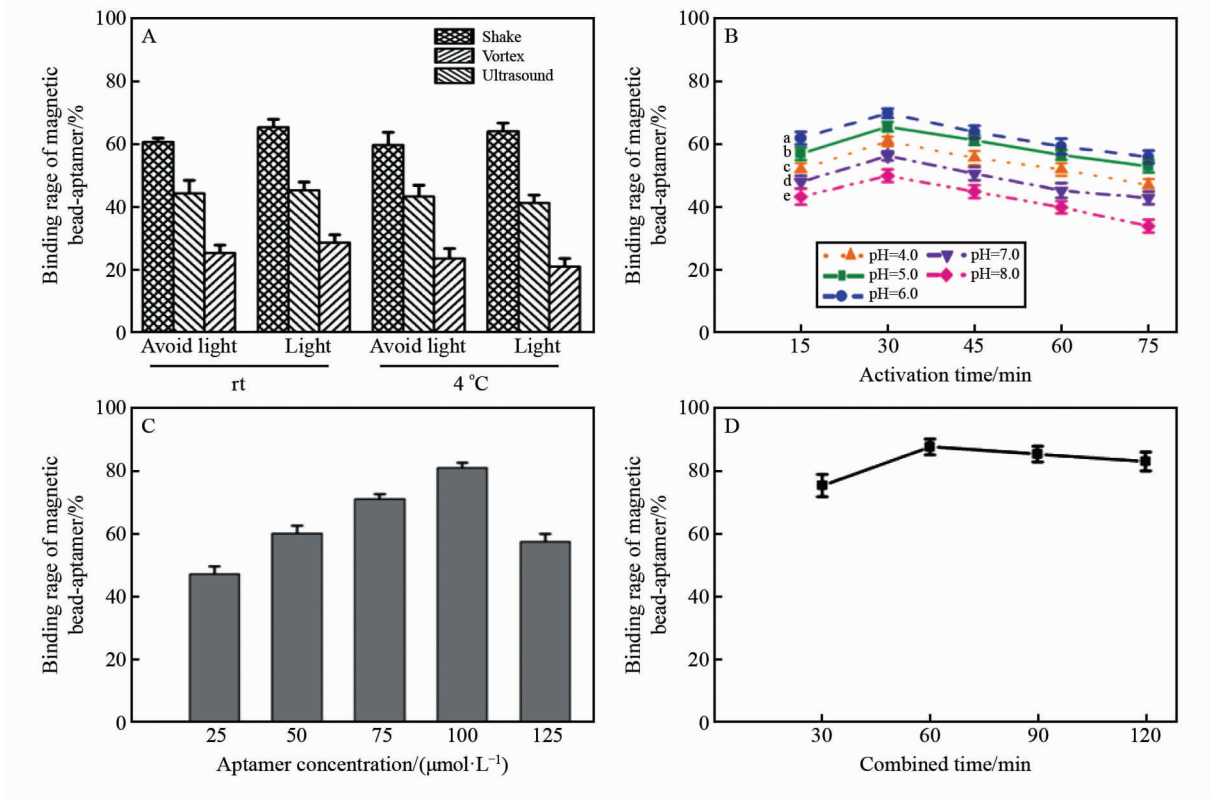


图 2 结合方式及条件(A)、活化时间与 pH 值(B)、适配体浓度(C)、结合时间(D)对磁珠-适配体结合率的影响  
Fig.2 Effect of combination method and conditions(A), activation time and pH value (B), aptamer concentration (C), binding time (D) on the binding rate of magnetic bead-aptamers

合率达到 65%。在同样条件下,涡旋、超声的结合方式造成磁珠-适配体的结合率偏低,这可能是由于涡旋、超声对磁珠的磁性造成不利的影响,或者对磁珠表面的外壳造成一定的损坏导致的。并且,由于磁珠与适配体的结合反应是固液相之间的化学反应,振摇比超声更能增加固液相分子之间接触的概率。因此,在实验中选用室温不避光条件伴随振摇的方式作为磁珠-适配体的结合条件。

### 2.3 结合条件对磁珠-适配体结合率的影响

为提高磁珠-适配体的结合率,在实验中优化了缓冲液的 pH 值、活化时间、适配体的浓度、结合时间等参数,筛选磁珠与适配体最佳的结合条件。磁珠的羧基活化后所形成的 O-酰基异脲中间体需要在偏酸性环境中。因此,控制 pH 值对 EDC 介导的连接反应非常重要。如图 2B 所示,在 pH = 6.0,活化时间 30 min 时,磁珠-适配体结合率达到 70%。当 pH = 4.0、5.0 时磁珠-适配体的结合率均在 62% 以下, pH = 7.0、8.0 时磁珠-适配体的结合率均在 58% 以下。因此, pH 值偏低或者偏高磁珠-适配体的结合率均有所下降。在 pH 值过低的情况下,EDC 与羧基反应形成的中间体不稳定易于水解,在 pH 值过高的情况下,一些不稳定的中间产物水解并释放出 EDC 或者与氨基反应的中间产物减少,从而影响磁珠-适配体的结合率,造成磁珠-适配体结合率下降<sup>[16-17]</sup>。此外,活化时间对磁珠-适配体的结合率也具有一定的影响,当活化时间在 30 min 时,磁珠-适配体的结合率达到最佳值。相反,活化时间过长,则会导致磁珠-适配体的结合率下降。综上所述,MES 缓冲液最佳 pH = 6.0,最佳活化时间为 30 min。因此,在后续的实验中使用该条件进行。

适配体的浓度,磁珠适配体的结合时间能够影响磁珠-适配体的结合率<sup>[18]</sup>。因此,在确定缓冲液 pH、活化时间的基础上,进一步探究了适配体的浓度与结合时间。如图 2C 所示,适配体在 100  $\mu\text{mol/L}$  时磁珠-适配体的结合率达到 85%。适配体在 25 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  之间磁珠-适配体的结合率呈增长趋势,当适配体浓度大于 100  $\mu\text{mol/L}$  时磁珠-适配体结合率呈下降趋势。适配体浓度过高导致磁珠-适配体结合率下降,可能是由适配体与适配体之间形成的复合物所导致。另外探究了不同结合时间对磁珠-适配体结合率的影响。结果如图 2D 所示,结合时间为 60 min 时,磁珠-适配体的结合率达到最高值。在此之后,磁珠-适配体的结合率随着活化时间的增加而降低,根据上述实验结果,适配体浓度 100  $\mu\text{mol/L}$ ,结合时间 60 min 为磁珠-适配体结合实验的最佳条件。

### 2.4 磁珠-适配体在显微镜下的表征

为进一步验证适配体连接在磁珠表面,通过 LSCM 来表征。在适配体的 3'端进行 Cy3 荧光染料标记,根据磁珠-适配体结合实验,将 3'-Cy3 标记的适配体固定在磁珠表面。因此结合了适配体的磁珠在 LSCM 下能观察到绿色荧光。如图 3B 所示,磁珠连接了 Cy3 标记的适配体,在激光扫描共聚焦显微镜 ( $\lambda = 550 \text{ nm}$ ) 下展现了明亮且稳定的荧光图像。在磁珠表面上观察到绿色荧光,这表明适配体在磁珠表面上是均匀分布的。

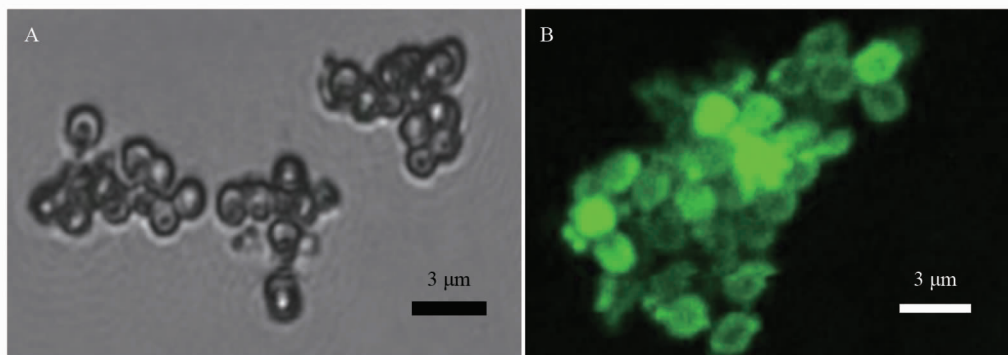


图 3 磁珠(A)及 Cy3 标记适配体-磁珠(B) LSCM 图像

Fig. 3 LSCM images of magnetic beads (A) and Cy3 labeled aptamer-magnetic beads (B)

### 2.5 AFB<sub>1</sub> 捕获条件的优化

在捕获实验中,对 AFB<sub>1</sub> 的前处理条件进行优化,研究了捕获时间与甲醇浓度对捕获 AFB<sub>1</sub> 的影响。将磁珠-适配体捕获 AFB<sub>1</sub> 的时间分别设置成 1、2、4、8、12 min 进行捕获,以确保磁珠-适配体与 AFB<sub>1</sub> 之



间达到吸附平衡。如图 4A 所示,在 4 min 时 AFB<sub>1</sub> 被磁珠-适配体捕获,然后达到吸附平衡。AFB<sub>1</sub> 通常是由提取液从实际样品中所提取,但由于甲醇会破坏目标物与适配体的相互作用。因此,在实验中进一步探究了甲醇浓度对 AFB<sub>1</sub> 回收率的影响。用不同比例的甲醇水溶液,将 100 μL 的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液 (10 μg/mL) 稀释至 1 mL。如图 4B 所示,甲醇水溶液中甲醇体积分数为 10% 时,AFB<sub>1</sub> 回收率达到 86%。结果表明,磁珠-适配体在 4 min 能够捕获 AFB<sub>1</sub>,甲醇体积分数为 10% 时,AFB<sub>1</sub> 的回收率达到最值。

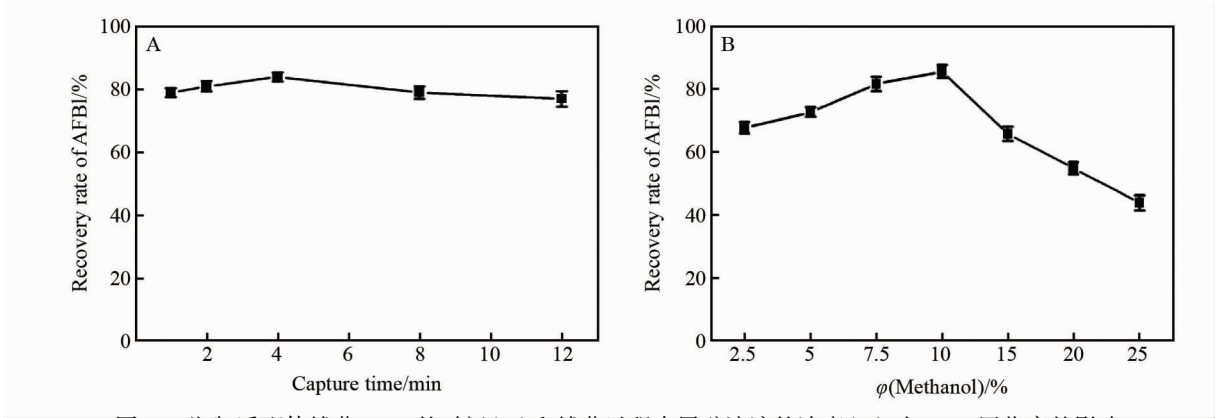


图 4 磁珠-适配体捕获 AFB<sub>1</sub> 的时间 (A) 和捕获过程中甲醇溶液的浓度 (B) 对 AFB<sub>1</sub> 回收率的影响

Fig.4 The influence of magnetic bead-aptamer capture time of AFB<sub>1</sub> (A) and concentration of methanol solution during capture(B) on the recovery rate of AFB<sub>1</sub>

2.6 AFB<sub>1</sub> 洗脱条件的优化

磁珠-适配体捕获 AFB<sub>1</sub> 后,洗脱条件对 AFB<sub>1</sub> 的富集效果有显著的影响。因此,优化了洗脱液组成和洗脱液的体积,以有效地将 AFB<sub>1</sub> 从适配体上洗脱下来。选择不同比例的乙腈水溶液作为洗脱液进行洗脱。根据图 5A 所示,当乙腈/水 (体积比 60:40) 时,洗脱液能有效地将 AFB<sub>1</sub> 与适配体分离,继续提高有机相比例,AFB<sub>1</sub> 的回收率无显著变化。因此选择乙腈/水 (体积比 60:40) 作为洗脱液。为考察洗脱液中 AFB<sub>1</sub> 的含量,以确定洗脱液的最终体积,分别用不同体积的洗脱液洗脱 AFB<sub>1</sub>。每次用 100 μL 的洗脱液进行洗脱,洗脱 4 次并分别收集洗脱液,检测洗脱液中 AFB<sub>1</sub> 的含量。图 5B 所示,在 2.2.4 节的空白样品提取液中加入 25 ng/mL 的 AFB<sub>1</sub>,其它步骤按照 1.2.5 节处理,用乙腈/水 (体积比 60:40) 洗脱 AFB<sub>1</sub> 4 次,每次 100 μL,测得前 3 次洗脱液中 AFB<sub>1</sub> 的浓度分别为 15.6、6.3 及 1.2 ng/mL;洗脱液体积为 400 μL 时,未检测到洗脱液中 AFB<sub>1</sub>。因此洗脱液的体积为 300 μL 时,AFB<sub>1</sub> 能够被完全洗脱下来。

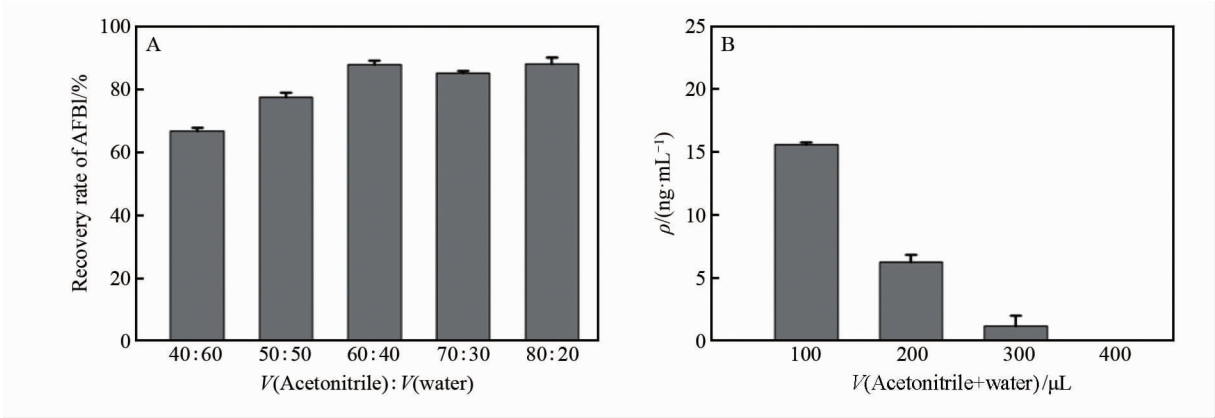


图 5 洗脱液的优化 (A) 和洗脱液体积的考察 (B)

Fig.5 Optimization of the eluent (A) and the eluent volume(B)

2.7 标准曲线的绘制

将 AFB<sub>1</sub> (100 μg/mL) 标准品溶液用甲醇水溶液 (体积比 1:9) 分别配制成浓度为 0.25、0.5、2.5、5、10、12.5、25 ng/mL 的标准溶液。用 LC-MS/MS 进行测定,并绘制标准曲线。结果表明:AFB<sub>1</sub> 的浓度在 0.25 ~ 25 ng/mL 范围内与其对应的色谱峰面积呈现良好的线性关系,线性回归方程  $y = 505.2x +$

14. 73, 相关系数  $R^2 = 0.999$ , 定量检出限为 0. 25 ng/mL。

2. 8 回收率与精密度

将小麦、玉米两种空白样品按照 1. 2. 4 节样品制备方法进行处理。其中在两种空白样品基质中分别加入 4 种不同浓度的 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液, 加标浓度分别为 2、5、10、20 μg/kg, 每个浓度进行 6 次重复实验, 在 1. 2. 6 节的仪器条件下检测两种样品基质的 AFB<sub>1</sub>。计算回收率和相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) 见表 3。

表 3 加标回收率及精密度 (n = 6)  
Table 3 Spiked recovery and precision (n = 6)

Sample	Spiked/(μg·kg <sup>-1</sup> )	Recovery/%	RSD/%
Wheat	2	80. 3	4. 7
	5	82. 3	2. 3
	10	86. 0	2. 8
	20	88. 5	1. 9
Corn	2	81. 2	7. 4
	5	85. 0	6. 1
	10	87. 8	4. 7
	20	92. 5	2. 9

小麦、玉米两种样品的回收率为 80. 3% ~ 92. 5%, RSD 低于 8%。低浓度的加标样品回收率低, 可能是由于基质干扰所致, 或者分析物在低浓度下无法与其它未知组分准确地区分开, 导致回收率低。结果表明, 磁珠-适配体前处理方法切实可行, 具有较高的回收率和精密度。

2. 9 磁珠-适配体与免疫亲和柱的重复利用性

玉米空白样品按照 1. 2. 4 节样品制备方法进行处理, 在空白样品基质中加入 AFB<sub>1</sub> 标准品溶液, 制备成 6 组 AFB<sub>1</sub> 含量为 10 μg/kg 的加标样品, 分别对 6 组加标样品重复采用一套磁珠-适配体与免疫亲和柱 (免疫亲和柱处理方法按照 GB5009. 22-2016 第一法) 进行样品前处理, 采用 1. 2. 6 节仪器方法对玉米中 AFB<sub>1</sub> 进行检测, 比较磁珠-适配体与免疫亲和柱重复利用性。磁珠-适配体每次使用后, 加入 100 μL 磁珠-适配体储备液, 以确保适配体复性。

如图 6 所示, 免疫亲和柱首次使用时 AFB<sub>1</sub> 的回收率达到 97%, 但是在第 2 次使用时 AFB<sub>1</sub> 回收率为 65%, 随着免疫亲和柱的重复使用次数的增加, AFB<sub>1</sub> 的回收率呈下降趋势。免疫亲和柱上偶联的抗体为蛋白质, 在某些条件比如有机溶剂、失去缓冲液条件等条件下可能变性失活, 这种变性失活是不可逆的, 导致免疫亲和柱重复利用率低。适配体为单链寡核苷酸, 其合成过程即为反复变性复性的过程。使用磁珠-适配体前处理 AFB<sub>1</sub>, 在第 1 次至第 4 次测得的回收率分别为 90%、89%、87% 和 89%; 在第 4 次至第 6 次 AFB<sub>1</sub> 的回收率趋于缓慢下降。结果表明, 磁珠-适配体的性能稳定, 可重复使用。

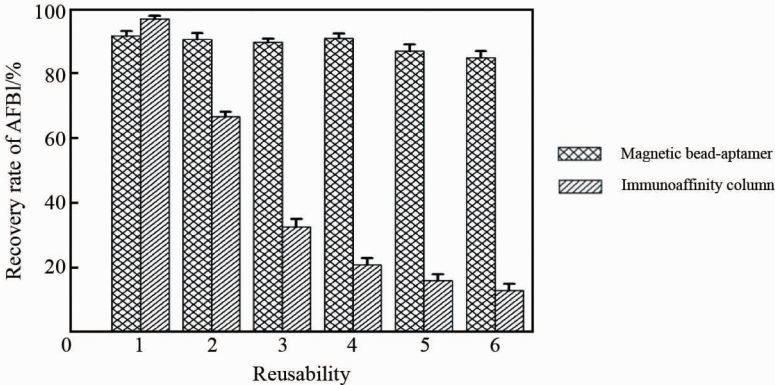


图 6 磁珠-适配体与免疫亲和柱重复利用回收率

Fig. 6 Recycling recoveries of the magnetic bead-aptamer and the immunoaffinity column

## 2.10 实际样品的测定

从某超市采购了花生、杏仁、玉米、小麦、陈皮、大枣 6 份食品,每种采购 3 批。将样品进行处理后,采用 1.2.5 节方法将待测样品与磁珠-适配体进行结合,对磁珠-适配体捕获的 AFB<sub>1</sub> 进行含量测定。6 份样品中花生和玉米均有检出,其中花生的 3 批样品中 AFB<sub>1</sub> 检出的含量分别为 2.15、1.47 和 0.80 μg/kg;玉米的两批样品中 AFB<sub>1</sub> 检出的含量分为 8.26、5.37 μg/kg;其余样品未检测出 AFB<sub>1</sub>。同时采用国标中免疫亲和柱前处理方法进行对比,发现磁珠-适配体前处理方法所测的数值与免疫亲和柱所测的数值没有显著的差异。结果表明,磁珠-适配体可应用于食品中 AFB<sub>1</sub> 的检测。

## 3 结 论

本研究建立了基于磁珠-适配体的 LC-MS/MS 定量检测 AFB<sub>1</sub> 的方法。该方法具有快速便捷,灵敏度和回收率高等优点。与免疫亲和柱相比,所构建的磁珠-适配体结合物性能稳定,能够重复使用,同时其前处理过程简单、快捷,减少了有机溶剂的使用量,能够满足 LC-MS/MS 检测 AFB<sub>1</sub> 的前处理要求,为定量检测 AFB<sub>1</sub> 提供了另一种技术支持。

## 参 考 文 献

- [1] MA Jiangyuan, SANG Xiaoxia, HUNAG Dengyu. Detection Method of Aflatoxin B<sub>1</sub> [J]. *J Food Safe Qual Test*, 2019, **10**(24):8399-8404 (in Chinese).  
马江媛,桑晓霞,黄登宇. 黄曲霉毒素 B<sub>1</sub> 的检测方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, **10**(24):8399-8404.
- [2] Aiko V, Mehta A. Occurrence, Detection and Detoxification of Mycotoxins [J]. *J Biosci*, 2015, **40**(5):943-954.
- [3] WANG Caiqin. Development of Superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Composite and Its Application in Food Pretreatment [D]. Gansu: Lanzhou University, 2018 (in Chinese).  
汪彩琴. 超顺磁性 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 复合材料的研制及在食品前处理中的应用[D]. 甘肃:兰州大学, 2018.
- [4] Wu X M, Zhu B H, Lu L, et al. Aptamer-targeted Magnetic Nanospheres as a Solid-Phase Extraction Sorbent for Determination of Ochratoxin A in Food Samples [J]. *J Chromatogr A*, 2011, **1218**(41):7341-7346.
- [5] Ma Y Y, Chen T X, Iqbal M Z, et al. Applications of Magnetic Materials Separation in Biological Nanomedicine [J]. *Electrophoresis*, 2019, **40**(16/17):2011-2028.
- [6] Sui C J, Yin H S, Wang L S, et al. Electrochemiluminescence Biosensor for DNA Hydroxymethylation Detection Based on Enzyme Catalytic Covalent Bonding Reaction of CH<sub>2</sub> OH an Thiol Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Beads [J]. *Biosens Bioelectron*, 2020, **2**(150):111-908.
- [7] HUANG Zike, LIU Chao, FU Qiangqiang, et al. Research Progress of Aptamer Fluorescent Probes in Biochemical Analysis and Biological Imaging [J]. *Chinese J Appl Chem*, 2018, **35**(1):28-39 (in Chinese).  
黄子珂,刘超,付强强,等. 核酸适配体荧光探针在生化分析和生物成像中的研究进展[J]. 应用化学, 2018, **35**(1):28-39.
- [8] WANG Shuhe, ZHOU Xinyang, ZHU Yuejie, et al. Modification and Encapsulation of Nucleic Acid Aptamers and Their Application in Targeted Treatment and Detection of Diseases [J]. *Chinese J Med Chem*, 2019, **29**(6):456-468 (in Chinese).  
王舒鹤,周新洋,朱月洁,等. 核酸适配体修饰与包载及其在疾病靶向性治疗和检测中的应用[J]. 中国药物化学杂志, 2019, **29**(6):456-468.
- [9] Zhang P, Zhao N X, Zeng Z H, et al. Using an RNA Aptamer Probe for Flow Cytometry Detection of CD30 Expressing Lymphoma Cells [J]. *Lab Invest*, 2009, **89**(12):1423-1432.
- [10] Pavlov V, Shlyahovsky B, Willner I. Fluorescence Detection of DNA by the Catalytic Activation of an Aptamer/Thrombin Complex [J]. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(18):6522-6523.
- [11] Huang G H, Li B Q, Zhang Y C, et al. Prediction of Aptamer Target Interacting Pairs with Pseudo Amino Acid Composition [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(1):e86729.
- [12] Hamaguchi N, Ellington A, Stanton M. Aptamer Beacons for the Direct Detection of Proteins [J]. *Anal Biochem*, 2001, **294**(2):126-131.
- [13] Liu H, Luan Y, Lu A, et al. An Oligosorbent-Based Aptamer Affinity Column for Selective Extraction of Aflatoxin B<sub>2</sub> Prior to HPLC with Fluorometric Detection [J]. *Microchim Acta*, 2018, **185**(1):71-76.
- [14] Marques A C, Costa P J, Velho S, et al. Amaral. Functionalizing Nanoparticles with Cancer-Targeting Antibodies: A Comparison of Strategies [J]. *J Controlled Release*, 2020, **320**(4):180-200.



- [15] WANG Yanjia, JIANG Huiliang, FANG Yinjun, *et al.* Study on New Magnetic Nanoparticles Immobilized Lipase[J]. *J Food-Biotechnol*, 2008, **27**(6):98-102 (in Chinese).  
王燕佳, 蒋惠亮, 方银军, 等. 新型磁性纳米粒子固定脂肪酶的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, **27**(6):98-102.
- [16] Lepvri r E, Doigneaux C, Moullintraffort L, *et al.* Optimized Protocol for Protein Macrocomplexes Stabilization Using the EDC, 1-Ethyl-3-(3-(dimethylamino) Propyl) Carbodiimide, Zero Length Cross Linker[J]. *Anal Chem*, 2014, **86**(21):10524-10530.
- [17] Nakajima N, Ikada Y. Mechanism of Amide Formation by Carbodiimide for Bioconjugation in Aqueous Media[J]. *Bioconjugate Chem*, 1995, **6**(1):123-130.
- [18] Sarkar T R, Irudayaraj J. Carboxyl Coated Magnetic Nanoparticles for mRNA Isolation and Extraction of Supercoiled Plasmid DNA[J]. *Anal Biochem*, 2008, **379**(1):130-132.

## Determination of Aflatoxin B<sub>1</sub> in Food by LC-MS/MS Method Based on Magnetic Bead-Aptamer

GU Xinyu<sup>a</sup>, LANG Le<sup>b\*</sup>, WANG Jianwei<sup>c</sup>, ZHAO Lihui<sup>a\*</sup>

(<sup>a</sup>College of Life Science and Technology, Changchun University of  
Science and Technology, Changchun 130022, China;

<sup>b</sup>Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103, China;

<sup>c</sup>National Analytical Research Center of Electrochemistry and Spectroscopy, Changchun  
Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China)

**Abstract** In this study, a magnetic bead-aptamer that specifically recognizes aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) was constructed and coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to establish a quantitative detection method for AFB<sub>1</sub> in food. Carboxy magnetic beads were activated by carbodiimide hydrochloride (EDC) and incubated with 5' terminal amino modified aptamers. The aptamers were covalently linked to the surface of the carboxy magnetic beads by amidation reaction and used as capture probes to separate AFB<sub>1</sub> in the extracted sample. The qualitative and quantitative analysis of AFB<sub>1</sub> was carried out by LC-MS/MS. The results show that the method has a good linear relationship at the concentration of 0.25 ~ 25 ng/mL with the correlation coefficient  $R^2 = 0.999$ , the quantitative detection limit is 0.25 ng/mL, the recovery is 80.3% ~ 92.5%, and the relative standard deviation (RSD) is less than 8%. The method is simple, fast and convenient, and can detect trace AFB<sub>1</sub>. The magnetic bead aptamer can be reused, which provides another technical support for the quantitative detection of AFB<sub>1</sub>.

**Keywords** magnetic beads; aptamers; LC-MS/MS; aflatoxin B<sub>1</sub>

Received 2020-04-29; Revised 2020-06-09; Accepted 2020-07-08

Corresponding author: ZHAO Lihui, professor; Tel/Fax: 0431-85583891; E-mail: 1252042806@qq.com; Research interests: synthesis of nanomaterials, diagnosis and treatment of tumors

Co-corresponding author: LANG Le, associate professor; Tel/Fax: 0431-88675932; E-mail: langle2000@163.com; Research interests: food quality and safety