DOI:10.12441/spyswjs.20240409004 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0106-09

荧光微球免疫分析法快速测定婴幼儿配方乳粉中的维生素 B_1

路倩倩[1,2,3] 杨 婷[1,2] 冯永巍[1,2] 胡家琳[3] 匡 华[3,4] 胥传来[3] 郭玲玲[3*]

(1. 无锡市食品安全检验检测中心,江苏 无锡 214142;2. 国家市场监管技术创新中心(特殊食品),江苏 无锡 214142;3. 江南大学食品学院,江苏 无锡 214122;4. 江南大学食品科学与资源挖掘全国重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】基于维生素 B_1 单克隆抗体建立荧光免疫层析法,以检测婴幼儿配方乳粉中的维生素 B_1。**【方法】**对维生素 B_1 单克隆抗体的性能进行评估,在此基础上,开发具有高灵敏度的荧光免疫层析试纸条。**【结果】**维生素 B_1 单克隆抗体具有高灵敏度、高亲和力和高特异性,荧光免疫层析试纸条的视觉检测限(vLOD)为 10 μg/kg,消线值为 200 μg/kg,计算检测限(cLOD)为 2.056 μg/kg。此外,该方法的回收率为 97.3%~115.4%,与液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)检测结果一致,且相对标准偏差(RSD)小于 10%,具有较好的准确度和稳定性。**【结论】**该荧光微球免疫分析法可用于实际婴幼儿配方乳粉样本的检测,并且检测速度快,不需要大型仪器设备,便于携带,对于大量样本的快速筛检具有重要意义。

关键词:维生素 B_1;婴幼儿配方乳粉;单克隆抗体;荧光试纸条

Rapid Determination of Vitamin B_1 in Infant Formula Milk Powder by Fluorescent Microsphere Immunochromatographic Assay

LU Qianqian[1,2,3] *YANG Ting*[1,2] *FENG Yongwei*[1,2] *HU Jialin*[3]
KUANG Hua[3,4] *XU Chuanlai*[3] *GUO Lingling*[3*]

(1. Wuxi Food Safety Inspection and Test Center, Wuxi 214142, China; 2. Technology Innovation Center of Special Food for State Market Regulation, Wuxi 214142, China; 3. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 4. State Key Laboratory of Food Science and Resources, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: [**Objective**] A fluorescent immunochromatographic assay was established based on vitamin B_1 monoclonal antibody to measure the vitamin B_1 in infant formula milk powder. [**Method**] The performance of vitamin B_1 monoclonal antibody was evaluated. On this basis, a highly sensitive fluorescent immunochromatographic test strip was developed. [**Result**] The vitamin B_1 monoclonal antibody showed high sensitivity, affinity, and specificity. The fluorescent immunochromatographic test strip showed a visual limit of detection (vLOD) of 10 μg/kg, a cut-off value of 200 μg/kg, and a calculated limit of detection (cLOD) of 2.056 μg/kg. In addition, the recovery rate of this method was 97.3%~115.4%. The test results of the established method were consistent with the liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) results, with the relative standard deviation (RSD) less than 10%, which indicated good accuracy and stability. [**Conclusion**] The fluorescent immunochromatographic assay can be used for the rapid detection of actual infant formula milk powder samples. It does not require large-scale

基金项目:国家市场监督管理总局科技计划项目(2022MK043)。
通信作者:郭玲玲(1988—),女,博士,助理研究员,主要从事食品安全快速检测研究。E-mail:gling0329@jiangnan.edu.cn
收稿日期:2024-04-09 **修回日期:**2024-05-29

instruments or equipment and is portable, thus being of great significance for the rapid screening of a large number of samples.

Keywords: vitamin B_1; infant formula milk powder; monoclonal antibody; fluorescent test strip

维生素 B_1，是一种重要的水溶性维生素，来源于维生素 B 族，对人体生长、发育至关重要[1]。从结构上讲，它由一个带有甲基和羟乙基侧链的噻唑环和一个由亚甲基连接的氨基嘧啶环组成[2]。它是一种人体必需的微量营养素，必须定期少量摄入才能在人体内发挥各种化学和生理功能。成人维生素 B_1 的膳食参考摄入量为 0.9~1.2 mg/d，儿童推荐日摄入量（RDA）为 0.4~0.6 mg/d，婴儿 RDA 为 0.2~0.3 mg/d[2]。维生素 B_1 广泛分布在食物中，但含量低，且在食物的研磨、加热、罐装和贮存过程中容易流失[3]。

维生素 B_1 在维持正常神经活动和增强心血管功能方面发挥着重要作用，是维持心脏、胃肠道及神经传导发挥功能的重要物质[4-5]。酗酒、艾滋病毒、呕吐和其他胃肠道疾病等可引起维生素 B_1 缺乏，对身体健康有负面影响[6]。维生素 B_1 缺乏反过来也可能导致慢性疾病，如脚气病和 Wernickes 脑病等，影响神经系统和心血管系统[7-9]。此外，有证据表明，维生素 B_1 缺乏与阿尔茨海默病之间存在密切联系。

因此，维生素 B_1 是食品中添加的重要营养素，以弥补饮食中可能存在的维生素 B_1 缺乏。此外，由于维生素 B_1 在食品中广泛使用，其质量控制也引起了关注。目前，关于维生素 B_1 的检测分析方法较多。维生素 B_1 的传统分析方法主要是微生物法，也有研究者开发了具有高灵敏度的商业试剂盒（VitaFasts vitamin B_1，德国 R-Biopharm 有限公司），但此方法需要很长的培养时间（44~48 h）。此外，仪器分析法也多用于维生素 B_1 的检测，如高效液相色谱法[10]、高效液相色谱-质谱联用法[10-11]，这些方法具有较高的灵敏度和准确度。然而，这些方法检测成本高，需要昂贵的仪器设备。分光光度法[12]、电化学法[13]、荧光分析法[14]也用于维生素 B_1 的检测，但是这些方法不适用于大量样本的现场检测。

基于抗原抗体的免疫分析方法具有灵敏度高、耗时短、简单方便等优点[15]，已被用于多种维生素的检测，包括维生素 B_2[16]、叶酸[17-18]、维生素 B_{12}[19-21]、维生素 D_3 等[22]。与酶联免疫分析法（ELISA）相比，侧流免疫分析法避免了孵育和洗涤步骤，是一种用于定性检测、半定量检测、大样本筛选的一步便携式检测方法，可以在 5~10 min 内快速获得结果[23-25]。此外，还可以使用便携式读数仪实现定量检测。作者基于维生素 B_1 的单克隆抗体，建立了一种检测婴幼儿配方乳粉中维生素 B_1 的高灵敏度、高特异性的荧光免疫层析试纸条分析方法，确保实现婴幼儿配方乳粉中维生素 B_1 的简单快速检测，以保证产品质量。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

维生素 B_1（CAS：59-43-8）、维生素 B_2（CAS：83-88-5）、维生素 B_3（CAS：98-92-0）、维生素 B_5（CAS：79-83-4）、维生素 B_6（CAS：8059-24-3）、维生素 B_7（CAS：58-85-5）、维生素 B_9（CAS：59-30-3）、维生素 B_{12}（CAS：68-19-9）标准品：北京百灵威科技有限公司；维生素 B_1 空白婴幼儿配方乳粉：无锡市食品安全检验检测中心；聚氯乙烯（PVC）底板、硝酸纤维素（NC）膜、吸水垫、样品垫：上海杰一生物技术有限公司；维生素 B_1 包被抗原、抗维生素 B_1 单克隆抗体：作者所在实验室研发；柠檬酸三钠、氯金酸、Tween-20、牛血清蛋白质（BSA）、乙氧基化油醇（ON-870）、聚乙二醇醚（R-65）、聚乙二醇（PEG）、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、曲拉通（TX）、羊抗鼠抗体 IgG：美国 Sigma-Aldrich 公司；荧光微球：北京纳诺金生物科技有限公司；其他化学品和试剂：均为分析纯，国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

超声波清洗机：Elma Select 40 型，北京汉达森机械技术有限公司；恒温水浴锅：HH-6 型，上海捷呈实验仪器有限公司；混合涡旋振荡仪：QYXW-2 型，上海乔悦电子科技有限公司；超纯水机：KL-100B/KL-100BU 型，青岛精诚仪器仪表有限公司；切条机：CM4000 型，上海百道贸易有限公司；三维喷点平台（胶体金划膜仪）：XYZ3210 型，上海百道贸易有限公司；荧光定量读数仪：FIC-H1 型，无锡迪腾敏生物科技有限公司。

1.3 间接竞争酶联免疫吸附法

参照参考文献[26]的间接竞争酶联免疫吸附法检测维生素B_1。用包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(CB),pH 9.6)将包被抗原稀释至0.1 mg/mL,在微孔板上每孔加100 μL,37 ℃下孵育2 h。用洗涤缓冲液(0.01 mol/L PBS,0.05 g/dL Tween-20)洗掉过量的抗原后,用封闭缓冲液(0.05 mol/L CB、2 g/dL 明胶)于37 ℃下封闭微孔中未与抗原结合的空白区2 h。用洗涤缓冲液洗涤后于37 ℃干燥40 min。各取50 μL一系列目标分析物加到微孔板中,每孔再加入50 μL的单克隆抗体,37 ℃下孵育30 min。将微孔板洗涤3次,加入100 μL用HRP标记的羊抗鼠IgG抗体,于37 ℃反应30 min。洗涤后,将100 μL的3,3,5,5-四甲基联苯胺底物溶液加入微孔板中,于37 ℃反应15 min,每孔加入50 μL硫酸(2 mol/L)以终止反应,并使用微孔板读取器检测450 nm处的颜色强度。

1.4 抗维生素B_1单克隆抗体性能的测定

由于单克隆抗体可与同种亚型的抗体结合,因此先用单抗亚型试剂盒测定了抗维生素B_1单克隆抗体的亚型[27]。通过间接竞争酶联免疫吸附法测定该抗体的亲和力、灵敏度和特异性[28-29]。

分别测定了8个不同质量浓度(0、0.274、0.823、2.469、7.407、22.222、66.667、200.000 ng/mL)的维生素B_1对应的OD_{450}值,以维生素B_1质量浓度为横坐标、OD_{450}值为纵坐标,用Origin 8.5软件拟合标准曲线,以半数最大抑制质量浓度(IC_{50})表示抗维生素B_1单克隆抗体的灵敏度。

在不同抗原质量浓度(0.1、0.3、1.0 mg/mL)下,测定一系列抗体浓度(mmol/L)对应的OD_{450}值,以抗体浓度为横坐标、OD_{450}值为纵坐标,用Origin 8.5软件拟合曲线。按照式(1)计算亲和常数(K_a),以此评估抗维生素B_1单克隆抗体的亲和力。

$$K_a=\frac{n-1}{2(nC_1-C_2)} \quad (1)$$

式中:

K_a——亲和常数,L/mol;

n——两条曲线中包被抗原的质量浓度比(n>1);

C_1——第一条曲线最大OD_{450}值1/2处对应的单克隆抗体浓度,mmol/L;

C_2——第二条曲线最大OD_{450}值1/2处对应的单克隆抗体浓度,mmol/L。

高特异性抗体只能识别目标分析物,可避免在实际样本分析中出现假阳性。按照式(2)测定抗维生素B_1单克隆抗体与其他结构相似物质的交叉反应率。

$$C_R=(A_1/A_2)\times 100\%。 \quad (2)$$

式中:

C_R——交叉反应率,%;

A_1——维生素B_1的IC_{50},ng/mL;

A_2——结构相似物质的IC_{50},ng/mL。

1.5 荧光免疫层析试纸条

1.5.1 荧光微球标记的抗维生素B_1抗体偶联物的合成

将100 μL羧基修饰的荧光微球加到100 μL的MES溶液(pH 6.0,0.02 mol/L)中,涡旋2 min,使荧光微球分散均匀。加入20 μL的1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)溶液(4 mg/mL)和20 μL *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液(4 mg/mL),并在室温下搅拌20 min。随后,将沉淀物以11 000 *g*离心15 min,重悬于碳酸盐缓冲液(pH 9.5,0.05 mol/L)。加入50 μL抗维生素B_1单克隆抗体(0.2 mg/mL),室温反应2 h。标记后,加入100 μL含有50 g/dL的BSA溶液反应2 h,以封闭未结合的活性位点。将荧光微球标记的抗维生素B_1抗体偶联物于11 000 *g*离心2次,每次15 min。将沉淀溶解于含有5 g/dL蔗糖、0.5 g/dL的BSA溶液和体积分数1%的Tween-20缓冲液中备用[30]。

1.5.2 荧光免疫层析试纸条的制备

样品垫、NC膜、吸水垫和PVC底板是组成试纸条的4个核心部件[31],如图1所示,样品垫用含有1 g/dL的BSA溶液和体积分数0.05%的Tween-20的PBS缓冲液(0.01 mol/L,pH 7.4)处理,在37 ℃下烘干。将包被抗原(维生素B_1-BSA)和羊抗鼠IgG抗体在0.01 mol/L的PBS缓冲液(pH 7.4)中分别稀释至0.1、0.5 mg/mL,然后以0.7 μL/cm喷洒到NC膜上,形成测试线(T线)和对照线(C线),2条线间隔0.4 cm,于37 ℃烘干。将样品垫和吸水垫组装在PVC底板上,分别与NC膜重叠3 mm。将整张组装好的底板通过CM4000切条机,横向切成3 mm的条,组装在卡壳里备用。

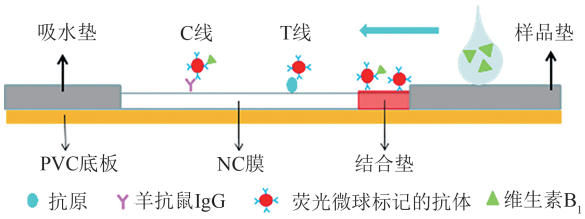


图 1　荧光免疫层析试纸条结构

Fig. 1　Structure of fluorescent immunochromatographic test strips

1.5.3　荧光免疫层析试纸条检测原理

试纸条的检测是基于待测物质与T线上的抗原竞争结合荧光微球标记的单克隆抗体的原理进行的[32-33]。当样品中的维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)为0或过低而无法检测时，荧光微球标记的抗维生素 B_1 单克隆抗体与T线上的抗原(维生素 B_1-BSA)结合，T线上显示出较强的荧光。同时，过量的荧光微球标记的抗维生素 B_1 单克隆抗体与羊抗鼠IgG抗体结合，在C线上也形成红色的荧光条带。因此，T线和C线都会出现红色的荧光。当维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)超过检测限(LOD)时，荧光微球标记的抗维生素 B_1 单克隆抗体优先与维生素 B_1 结合，导致T线上的荧光亮度较浅(比C线上的荧光亮度浅)，而C线上出现较强的荧光。当C线没有显示荧光时，试纸条无效。

1.5.4　荧光免疫层析试纸条的检测程序

将150 μL维生素 B_1 标准溶液或样品溶液与50 μL适当质量浓度的荧光微球标记的抗维生素 B_1 抗体偶联物在微孔中混合均匀，反应3 min，将150 μL该溶液滴加到样品垫中，8 min后在紫外灯(UV)下观察结果。通过试纸条读数仪评估T线和C线的荧光强度进行定量分析。

1.5.5　荧光免疫层析试纸条结果判定

试纸条的检测结果如图2所示。定性检测时，将T线的荧光强度开始比空白组的T线弱时的维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)定义为vLOD，T线消失的维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)定义为消线值[34]。定量检测时，测定一系列不同质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)维生素 B_1 的 T/C 值(T线荧光强度与C线荧光强度的比值)。以维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)为横坐标、T/C 值为纵坐标，用Origin 8.5软件拟合标准曲线。

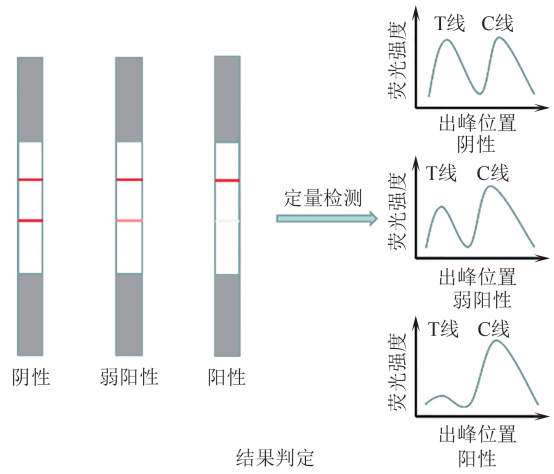


图 2　荧光免疫层析试纸条的结构和结果判定

Fig. 2　Result determination of fluorescent immunochromatographic test strips

cLOD定义为 T_0/C_0 值(阴性组对应的T线荧光强度与C线荧光强度比值)降低10%后对应的维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)，维生素 B_1 的定量范围定义为 T_0/C_0 值降低20%~80%后对应的维生素 B_1 质量浓度(ng/mL)或质量分数(μg/kg)[35]。

1.5.6　荧光免疫层析试纸条灵敏度的测定

为了获得最优灵敏度，对荧光微球标记的抗维生素 B_1 抗体重悬液中表面活性剂的种类、T线抗原质量浓度(mg/mL)和微球最佳稀释倍数进行优化。在最优条件下，对0、1、2、5、10、20、50 ng/mL维生素 B_1 标准品稀释液进行检测，建立相应的标准曲线，以测定荧光免疫层析试纸条的灵敏度。

1.5.7　样本检测

分别称取1 g空白婴幼儿配方乳粉，分别加入0、5、10、20、50、100、200 μg/kg的维生素 B_1 标准品，加入3 mL的温水(55 ℃)，振荡均匀，60 ℃超声30 min，15 000 g 离心15 min，取上清液过0.22 μm的滤膜，然后用含1 g/dL ON-870的PBS稀释2倍，取150 μL进行检测。用读数仪读出 T/C 值，建立实际样本中的标准曲线。

1.5.8　回收试验

为了评估该试纸条的稳定性及准确度，在空白婴幼儿配方乳粉样品中添加了不同质量分数(5、20、100 μg/kg)的维生素 B_1 标准品，通过该荧光免疫层析试纸条进行检测，并用LC-MS/MS法进行验证[11]。

2 结果与讨论

2.1 单克隆抗体特性

2.1.1 亚型

如图 3 所示，IgG2b 对应的 OD_{450} 值最高，表明该抗体的亚型为 IgG2b。单克隆抗体主要有 4 种亚型：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4。它们的结构和功能略有不同。其中，IgG1 和 IgG2 是常见的亚型，而 IgG3 和 IgG4 相对较少。在该研究中，抗维生素 B_1 单克隆抗体的亚型为 IgG2b，该亚型具有高稳定性并能保持较长的有效期，对免疫层析试纸条的制备具有重要意义。

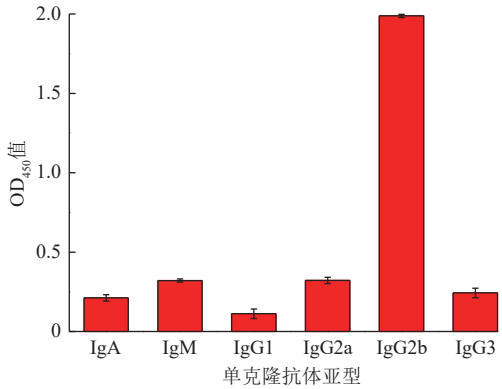


图 3 抗维生素 B_1 单克隆抗体亚型的测定

Fig. 3 Subtype determination of anti-vitamin B_1 monoclonal antibody

2.1.2 亲和力

如图 4 所示，计算得到抗维生素 B_1 的 K_a 为 8.571×10^9 L/mol，表明该抗体具有较高的亲和力。高亲和力单克隆抗体可以与抗原形成相对稳定的化学键，在短时间内与抗原结合，具有较高的活性和稳定性。

2.1.3 特异性

为了评估抗维生素 B_1 单克隆抗体的特异性，测定了对其他维生素的交叉反应性，结果见表 1。该抗体对其他维生素的 IC_{50} 均大于 2 000 ng/mL，交叉反应率小于 1%，具有很高的特异性。高特异性抗体可在实际样本检测时避免假阳性结果的出现，提高检测准确性。

2.1.4 灵敏度

以维生素 B_1 质量浓度（ng/mL）为横坐标、OD_{450} 值为纵坐标，测定抗维生素 B_1 抗体的 IC_{50}。如图 5 所示，标准曲线的方程为

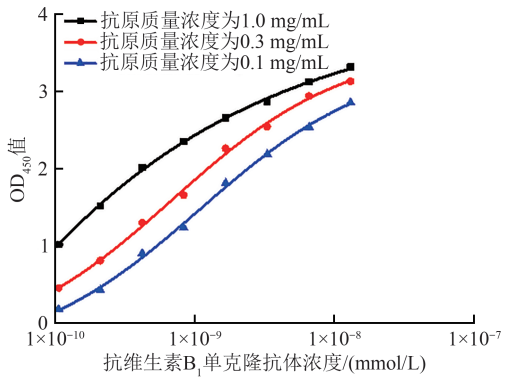


图 4 抗维生素 B_1 单克隆抗体亲和力的测定

Fig. 4 Affinity determination of anti-vitamin B_1 monoclonal antibody

表 1 抗维生素 B_1 单克隆抗体对其他药物的交叉反应性

Table 1 Cross reactivity of anti-vitamin B_1 monoclonal antibody with other drugs

药物名称	IC_{50}/（ng/mL）	交叉反应率/%
维生素 B_1	16.918	100
维生素 B_2	>2 000.000	<1
维生素 B_3	>2 000.000	<1
维生素 B_5	>2 000.000	<1
维生素 B_6	>2 000.000	<1
维生素 B_7	>2 000.000	<1
维生素 B_9	>2 000.000	<1
维生素 B_{12}	>2 000.000	<1

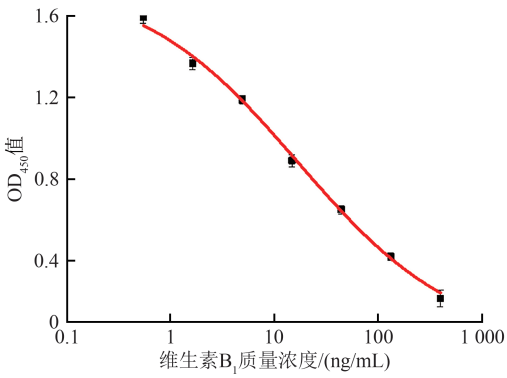


图 5 抗维生素 B_1 单克隆抗体的标准曲线

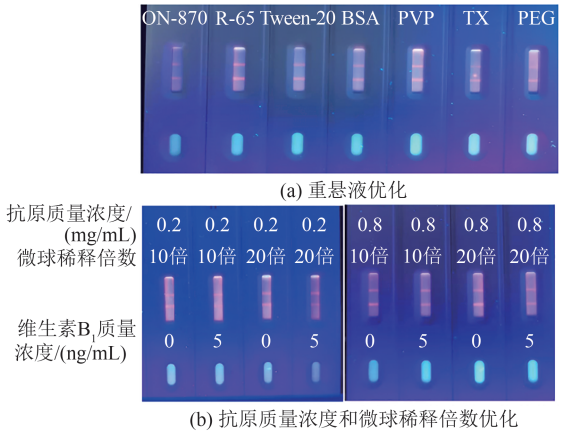
Fig. 5 Standard curve of anti-vitamin B_1 monoclonal antibody

$y=-0.006+1.779/(1+(x/16.918)^{0.571})$，$R^2=0.997\,7$，$IC_{50}$ 为 16.918 ng/mL，说明具有较好的线性关系和灵敏度。

2.2 荧光免疫层析试纸条的优化及灵敏度测定

为了提高试纸条的灵敏度，对重悬液中表面活性剂的种类、T 线包被抗原质量浓度和微球稀释倍数进行优化。分别在重悬液中加入 7 种不同的表面活性剂，在 PBS 中进行检测，结果见 6(a)。当

重悬液中含有PVP时，T线和C线荧光强度较大且无残留，因此选择PVP作为表面活性剂进行抗原质量浓度和微球稀释倍数的优化。如图6（b）所示，当微球稀释倍数为20倍，T线抗原质量浓度为0.8 mg/mL时，空白组的T线荧光强度较大，且加标量为5 ng/mL时T线明显变浅，具有较好的抑制效果。因此，当重悬液中含有PVP、微球稀释倍数为20倍、T线抗原质量浓度为0.8 mg/mL时，测试效果最佳，在该条件下对试纸条的灵敏度进行测定。如图7（a）所示，当维生素 B_1 质量浓度为2 ng/mL时，T线荧光强度开始变弱，维生素 B_1 质量浓度为50 ng/mL时，T线完全消失，因此，该荧光免疫层析试纸条的在PBS中的vLOD为2 ng/mL，消线值为50 ng/mL。由图7（b）可知，荧光免疫层析试纸条在PBS中的标准曲线方程为 $y=0.035+2.538/(1+(x/3.203)^{1.160})$，通过计算得到的cLOD为0.875 ng/mL，具有较好的灵敏度。



(a) 重悬液优化

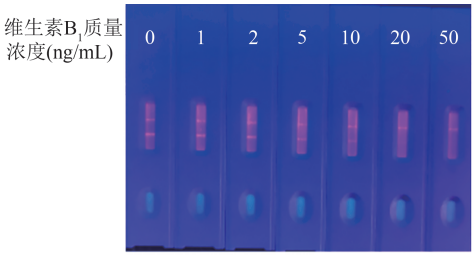
(b) 抗原质量浓度和微球稀释倍数优化

图6　荧光免疫层析试纸条的优化

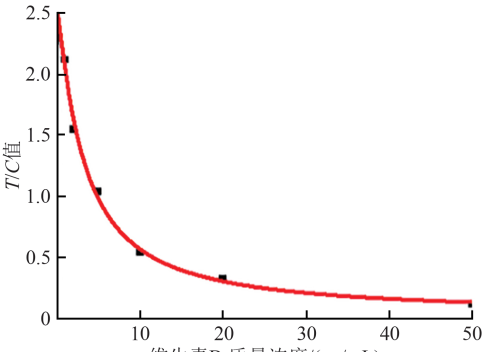
Fig. 6　Optimization of working conditions for fluorescent immunochromatographic test strips

2.3　婴幼儿配方乳粉中荧光微球免疫层析试纸条标准曲线的建立

基于上述优化结果，将试纸条应用于婴幼儿配方乳粉样本的检测，并建立了相应的标准曲线。如图8（a）所示，当维生素 B_1 质量分数为10 μg/kg时，T线开始变弱；当维生素 B_1 质量分数为200 μg/kg时，T线完全消失。因此，该试纸条在婴幼儿配方乳粉中的vLOD为10 μg/kg，消线值为200 μg/kg。维生素 B_1 在婴幼儿乳粉中的标准曲线如图8（b）所示，方程为 $y=-0.021+3.354/(1+(x/15.445)^{1.293})$，cLOD为2.056 μg/kg，线性检测范围为5.286~45.132 μg/kg。



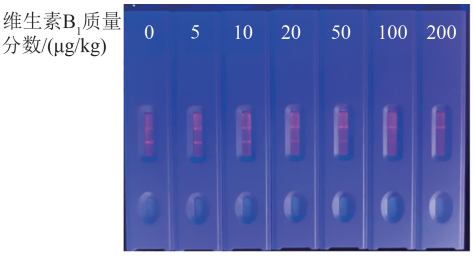
(a) PBS中维生素B_1测定结果



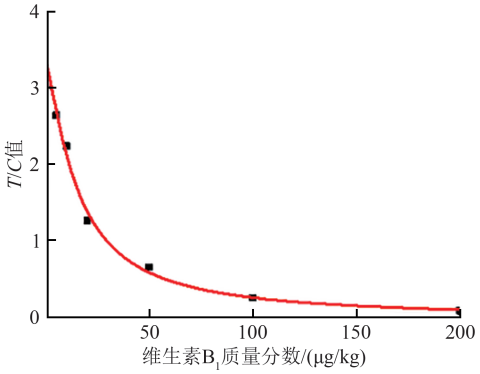
(b) PBS中维生素B_1标准曲线

图7　荧光免疫层析试纸条灵敏度的测定

Fig. 7　Sensitivity determination of fluorescent immunochromatographic test strips



(a) 婴幼儿配方乳粉中维生素B_1测定结果



(b) 婴幼儿配方乳粉中维生素B_1标准曲线

图8　婴幼儿配方乳粉中维生素 B_1 标准曲线的建立

Fig. 8　Establishment of vitamin B_1 standard curve in infant formula milk powder

2.4 回收试验结果

为了评估荧光免疫层析试纸条的性能，在婴幼儿配方乳粉中添加不同质量分数（μg/kg）的维生素 B_1，使用该试纸条进行测定，并用 LC-MS/MS 进行验证，重复测定 5 次。LC-MS/MS 测定图谱见图 9，对比结果见表 2。对于荧光免疫层析试纸条，维生素 B_1 的回收率为 97.3%~115.4%，LC-MS/MS 的回收率为 91.0%~113.4%，表明该试纸条检测结果与 LC-MS/MS 检测结果基本一致，具有较好的准确性。该试纸条的 RSD 为 2.5%~4.3%，均小于 10%，表明该试纸条具有较好的稳定性。因此，该荧光免疫层析试纸条具有较好的性能，可用于婴幼儿配方乳粉样本中维生素 B_1 的快速检测，且成本低、操作简便、易于携带、不需要专业的操作人员、方便、省时且性价比高，在维生素 B_1 快速检测中具有很大的应用前景。

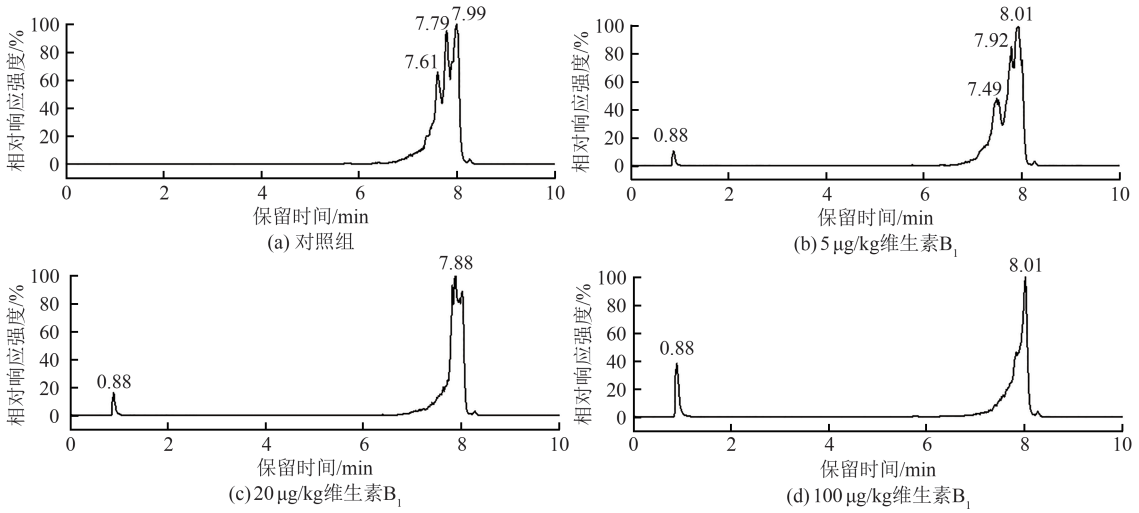


图 9 婴幼儿配方乳粉中不同质量分数维生素 B_1 的 LC-MS/MS 色谱图

Fig. 9 LC-MS/MS chromatograms of different mass fractions of vitamin B_1 in infant formula milk powder

表 2 荧光免疫层析试纸条与 LC-MS/MS 的检测结果对比

Table 2 Comparison of detection results between fluorescent immunochromatographic test strips and LC-MS/MS

添加维生素 B_1 的质量分数/（μg/kg）	荧光免疫层析试纸条			LC-MS/MS		
	维生素 B_1 测量值/（μg/kg）	回收率/%	RSD/%	维生素 B_1 测量值/（μg/kg）	回收率/%	RSD/%
5	5.77±0.25	115.4	4.3	4.55± 0.11	91.0	2.4
20	19.45±0.48	97.3	2.5	20.44±0.29	102.2	1.4
100	110.91± 2.72	110.9	2.5	113.43±2.14	113.4	1.9

3 结论

维生素 B_1 单克隆抗体的性能测定结果表明，该抗体 IC_{50} 为 16.918 ng/mL，K_a 为 8.571×10^9 L/mol，且对其他维生素没有交叉反应，具有较高的灵敏度、亲和力和特异性。在此基础上，作者建立了快速检测婴幼儿配方乳粉中维生素 B_1 水平的荧光微球免疫层析法，该方法可用于定性和定量检测。定性检测时，vLOD 为 10 μg/kg，消线值为 200 μg/kg，可直接用肉眼观察结果。定量检测时，cLOD 为 2.056 μg/kg，回收率为 97.3%~115.4%，RSD 小于 10%，具有较好的稳定性和准确性。在婴幼儿配方乳粉样本中，简单的前处理方法和快速的检测过程缩短了检测时间，这对维生素 B_1 的检测具有重要意义，可实现婴幼儿配方乳粉中维生素 B_1 的现场快速检测，弥补了仪器检测方法的不足，具有广阔的应用前景。

参考文献

[1] DUENCHAY P，KAEWJUA K，CHAILAPAKUL O，et al. Application of modifier-free gold nanoparticle colorimetric sensing for rapid screening and detection of vitamin B_1[J]. New Journal of Chemistry，2020，44（22）：9223-9229.

[2] ZENG L，WU X，LIU L Q，et al. Production of a

monoclonal antibody for the detection of vitamin B_1 and its use in an indirect enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic strip[J]. Journal of Materials Chemistry B,2020,8(9):1935-1943.

[3] ESHAK E S, ARAFA A E. Thiamine deficiency and cardiovascular disorders[J]. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases,2018,28(10):965-972.

[4] 左世梅. 与维生素B_1相关的神经系统疾病研究进展[J]. 生物学教学,2021,46(8):69-71.
ZUO S M. Research progress of nervous system diseases related to vitamin B_1[J]. Biology Teaching,2021,46(8):69-71.(in Chinese)

[5] 唐雯,黄媛. 高效液相色谱-荧光法测定饲料中维生素B_1和维生素B_2[J]. 中国饲料,2024(3):113-117.
TANG W, HUANG Y. Determination of vitamin B_1 and vitamin B_2 in feed by HPLC with fluorescence[J]. China Feed,2024(3):113-117.(in Chinese)

[6] NGUYEN H D, OH H, KIM M S. Mixtures modeling identifies vitamin B_1 and B_3 intakes associated with depression[J]. Journal of Affective Disorders,2022,301:68-80.

[7] ABDULLAH K M, AREFEEN A, SHAMSI A, et al. Insight into the *in vitro* antiglycation and *in vivo* antidiabetic effects of thiamine: implications of vitamin B_1 in controlling diabetes[J]. ACS Omega, 2021, 6(19):12605-12614.

[8] DI MARCO S, PILATI L, BRIGHINA F, et al. Wernicke-Korsakoff syndrome complicated by subacute beriberi neuropathy in an alcoholic patient[J]. Clinical Neurology and Neurosurgery,2018,164:1-4.

[9] HE H T, WANG K B, WANG Y, et al. Urinary incontinence as a main clinical manifestation of early stage Wernicke's encephalopathy: a case report[J]. Frontiers in Neurology,2023,14:1157806.

[10] 杨黎,文丽,韦春梦,等. HPLC与UPLC-MS/MS测定FAPAS液体维生素补充剂能力验证样品中的维生素B_1[J]. 食品与药品,2023,25(6):547-551.
YANG L, WEN L, WEI C M, et al. Determination of vitamin B_1 in FAPAS liquid vitamin supplement by HPLC and UPLC-MS/MS[J]. Food and Drug, 2023, 25(6):547-551.(in Chinese)

[11] 杨玉平,谢柏艳. 液质联用法同时测定保健食品中维生素B_1、维生素B_6、烟酸、烟酰胺和咖啡因的含量[J]. 湖北农业科学,2023,62(9):124-129.
YANG Y P, XIE B Y. Simultaneous determination of vitamin B_1, vitamin B_6, nicotinic acid, nicotinamide and caffeine in health foods by liquid mass spectrometry[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2023, 62(9):124-129.(in Chinese)

[12] MOLINA-DELGADO M Á, AGUILAR-CABALLOS M P, GÓMEZ-HENS A. Simultaneous photometric microplate assay for free and total thiamine using gold nanoparticles and alkaline phosphatase[J]. Microchimica Acta, 2016, 183(4):1385-1390.

[13] BRAHMAN P K, AHMAD DAR R, PITRE K S. DNA-functionalized electrochemical biosensor for detection of vitamin B_1 using electrochemically treated multiwalled carbon nanotube paste electrode by voltammetric methods[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 177:807-812.

[14] LUO Y W, MIAO H, YANG X M. Glutathione-stabilized Cu nanoclusters as fluorescent probes for sensing pH and vitamin B_1[J]. Talanta,2015,144:488-495.

[15] 操青青,赵力超,方祥,等. 基于时间分辨纳米荧光微球的免疫层析技术快速检测副溶血性弧菌[J]. 现代食品科技,2023,39(1):326-334.
CAO Q Q, ZHAO L C, FANG X, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* based on time-resolved fluorescence lateral flow immunoassay[J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(1):326-334.(in Chinese)

[16] WANG P, YIN Y M, EREMIN S A, et al. Indirect competitive immunoassay for detection of vitamin B_2 in foods and pharmaceuticals[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2013,61(29):7048-7054.

[17] LIANG Q J, YI C, JIANG L, et al. Development of a lateral flow dipstick immunoassay for evaluation of folate levels in maize[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2017,409(24):5655-5660.

[18] 李江,严家俊,綦艳,等. 酶联免疫法快速检测奶粉中的叶酸[J]. 中国乳品工业,2017,45(10):37-38,50.
LI J, YAN J J, QI Y, et al. Rapid detection of folic acid in milk powder by enzyme linked immunosor bent assay[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(10):37-38, 50.(in Chinese)

[19] KONG D Z, LIU L Q, SONG S S, et al. Development of sensitive, rapid, and effective immunoassays for the detection of vitamin B_{12} in fortified food and nutritional supplements[J]. Food Analytical Methods,2017,10(1):10-18.

[20] 李江,綦艳,田秀梅,等. 酶联免疫法检测婴幼儿配方奶粉中的维生素B_{12}[J]. 食品工业,2017,38(8):250-252.
LI J, QI Y, TIAN X M, et al. Detection of vitamin B_{12} in infant formula milk powder by enzyme linked immunosorbent assay[J]. The Food Industry, 2017, 38(8):250-252.(in Chinese)

[21] 乐振窍，成立静．ELISA法在功能饮料维生素B_{12}测定中的应用[J]．饮料工业，2014，17(10)：30-33．
LE Z Q，CHENG L J．Application of ELISA method in the measurement of vitamine B_{12} in functional drink[J]．Beverage Industry，2014，17(10)：30-33．(in Chinese)

[22] 毛旭东，吴彦，盛宏光，等．液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)和酶联免疫法(ELISA)对体内25(OH)D3水平的测定[J]．中国骨质疏松杂志，2013，19(6)：584-586．
MAO X D，WU Y，SHENG H G，et al．The measurement of 25(OH) D3 using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and enzyme-linked immunosorbent assay [J]．Chinese Journal of Osteoporosis，2013，19(6)：584-586．(in Chinese)

[23] 韩金治，李亚茹，罗林，等．胶体金免疫层析法快速检测水产品中河豚毒素的研究[J]．分析测试学报，2023，42(12)：1598-1606．
HAN J Z，LI Y R，LUO L，et al．Rapid detection of tetrodotoxin in aquatic products by colloidal gold immunochromatography assay[J]．Journal of Instrumental Analysis，2023，42(12)：1598-1606．(in Chinese)

[24] 刘猛，郑博士，程金新．免疫检测技术在食品检验中的应用分析[J]．食品安全导刊，2023(33)：161-163．
LIU M，ZHENG B S，CHENG J X．Application analysis of immune detection technique in food inspection[J]．China Food Safety Magazine，2023(33)：161-163．(in Chinese)

[25] 张振宇，崔海燕，王勇．动物源性食品中酰胺醇类药物残留检测研究进展[J]．食品与机械，2024，40(2)：233-239．
ZHANG Z Y，CUI H Y，WANG Y．Research progress in the detection of amide alcohol drugs in animal-origin foods[J]．Food & Machinery，2024，40(2)：233-239．(in Chinese)

[26] 张欣欣，齐永华，岳锋，等．达氟沙星多克隆抗体制备及间接竞争ELISA方法的建立[J]．动物医学进展，2022，43(12)：84-89．
ZHANG X X，QI Y H，YUE F，et al．Preparation of polyclonal antibodies against darfloxacin and establishment of ic-ELISA method[J]．Progress in Veterinary Medicine，2022，43(12)：84-89．(in Chinese)

[27] LIU Y，XU X X，LIU L Q，et al．Development of a GNP-based lateral flow immunoassay for the detection of isoprothiolane in rice samples [J]．Food Chemistry，2023，404：134483．

[28] LI Y，LIU L Q，KUANG H，et al．Preparing monoclonal antibodies and developing immunochromatographic strips for paraquat determination in water[J]．Food Chemistry，2020，311：125897．

[29] 贾瑞勤，贾航，郑学超，等．莱茵衣藻IFT20的原核表达、纯化及多克隆抗体鉴定[J]．食品与生物技术学报，2023，42(11)：106-112．
JIA R Q，JIA H，ZHENG X C，et al．Prokaryotic expression，purification，and polyclonal antibody identification of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT20 [J]．Journal of Food Science and Biotechnology，2023，42(11)：106-112．(in Chinese)

[30] ZHOU S Y，XU X X，WANG L，et al．Rapid，on-site quantitative determination of higenamine in functional food using a time-resolved fluorescence microsphere test strip[J]．Food Chemistry，2022，387：132859．

[31] 瞿超杰，苗银萍，赵光升，等．谷物中玉米赤霉烯酮高灵敏时间分辨荧光免疫层析定量法的建立[J]．粮食与饲料工业，2023(4)：73-79．
QU C J，MIAO Y P，ZHAO G S，et al．Establishment of high-sensitivity time-resolved fluorescence immunochromatography for the quantification of zearalenone in cereals [J]．Cereal & Feed Industry，2023(4)：73-79．(in Chinese)

[32] 苏华彬，刘蒙达，南文龙，等．荧光免疫层析技术原理及其在病原微生物检测中的研究进展[J]．中国动物检疫，2024，41(1)：67-71．
SU H B，LIU M D，NAN W L，et al．The principle of fluorescence immunochromatography and it advances in detection of pathogenic microorganisms[J]．China Animal Health Inspection，2024，41(1)：67-71．(in Chinese)

[33] 郑佳乐，何子贤，黎莹莹，等．荧光定量免疫层析法测定鸡肉和牛奶中的氯霉素[J]．食品安全质量检测学报，2023，14(19)：20-28．
ZHENG J L，HE Z X，LI Y Y，et al．Determination of chloramphenicol in chicken and milk by fluorescence quantitative immunochromatography [J]．Journal of Food Safety & Quality，2023，14(19)：20-28．(in Chinese)

[34] LIU J，GUO L L，WU A H，et al．Immunochromatographic assay for the analysis of methomyl in cabbage and tomato [J]．Food Chemistry，2023，409：135273．

[35] LEI X L，XU X X，LIU L Q，et al．Rapid quantitative determination of fentanyl in human urine and serum using a gold-based immunochromatographic strip sensor [J]．Journal of Materials Chemistry B，2020，8(37)：8573-8584．

（责任编辑：闫林红）