

均质化技术在分析检测中的研究进展

杨 松¹, 韩 裕², 何长根², 李威然², 李振荣³, 耿东晔^{1,2}

(1. 成都大学 机械工程学院, 四川 成都 610106; 2. 四川省分析测试服务中心, 四川 成都 610066;
3. 四川省科学器材公司, 四川 成都 610066)

摘要: 样品均质化是样品分析检测过程中的重要步骤, 也是影响分析结果可靠性和准确性的重要环节。综述了样品均质化对检测结果影响的理论研究进展, 表明均质化处理对检测结果具有显著影响。对比了不同原理均质设备的优缺点, 并总结了均质化技术在不同领域的应用进展, 以期为均质技术的选用和推广提供参考。同时, 系统分析了均质效果的评价方法、指标以及影响因素, 为分析检测过程中均质效果的评价方法提供科学依据。对均质化技术的应用和发展进行了展望, 以期均质化技术在分析检测中的应用研究提供参考。

关键词: 均质化技术; 分析检测; 应用领域; 评价方法; 影响因素

中图分类号: O65; O69

文献标志码: A

文章编号: 1006-3757(2025)01-0034-11

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2025.01.005

CSTR: 32263.14.j.1006-3757.2025.01.005

Research Progress on Homogenization Technology in Analysis and Detection

YANG Song¹, HAN Yu², HE Changgen², LI Weiran², LI Zhenrong³, GENG Dongxian^{1,2}

(1. College of Mechanical Engineering, Chengdu University, Chengdu 610106, China; 2. Analytical and Metrical Center of Sichuan Province, Chengdu 610066, China; 3. Scientific Equipments Company of Sichuan Province, Chengdu 610066, China)

Abstract: Sample homogenization is an important step in the process of sample analysis and detection, which affects the reliability and accuracy of analytical results. The theoretical on the effect of sample homogenization on detection results was reviewed, and the results showed that homogenization has a significant impact on detection results. The advantages and disadvantages of different principles of homogenization equipment were compared, and the applications of homogenization technology in different fields were summarized to provide a reference for the selection and promotion of homogenization technology. Meanwhile, the evaluation methods, indexes and influencing factors of homogenization effect were systematically analyzed to provide a scientific basis for the evaluation method of homogenization effect in the analysis and detection process. The application and development of homogenization technology were prospected to provide a reference for the research of homogenization technology in analysis and detection.

Key words: homogenization technology; analysis and detection; application; evaluation method; influencing factor

在实验室进行痕量检测过程中, 为了浓缩被测痕量组分, 提高分析方法的灵敏度, 降低检测限, 往往会对样品进行前处理。样品前处理是耗时长且容

易引入误差的一个环节, 对最终分析结果起到非常重要的作用。以食品、药品检测为例, 样品前处理消耗的时间占据了整个检测过程的 60% 以上, 同时,

收稿日期: 2024-11-13; 修订日期: 2024-12-17

基金项目: 成都市技术创新研发项目 (2024-YF05-02707-SN) [Chengdu Technology Innovation and Development Program (2024-YF05-02707-SN)]

作者简介: 杨松 (2001—), 男, 硕士生, 研究方向: 自动化仪器研究, E-mail: 1432560941@qq.com

通信作者: 耿东晔 (1989—), 男, 副研究员, 研究方向: 仪器仪表研发, E-mail: geng0909@126.com

样品前处理导致的检测误差占比最大,约为30%^[1]。在前处理过程中,为了保证样品的均匀性,使样品具有代表性和一致性,通常需要使用均质化技术对样品进行处理。然而,样品均质化需要考虑的因素较多,不仅需要根据不同的样品类型(如液体、固体或生物组织)采用不同的均质化技术,还需要考虑均质过程中可能引入的污染、样品中分析物质的损失或样品性质的改变对检测结果的影响等,以确保试验数据的可靠性。在二十世纪40年代以前,样品均质化主要靠人工简单的切碎和混合,随着均质机在实验室进行实践应用,研究者们根据不同均质原理逐渐开发出了不同的均质化技术,并广泛应用于不同的领域,其中包括食品安全检测、生物组织中化合物分析、土壤污染物及成分检测和天然产物成分检测等。近年来,国外许多实验室逐渐实施了标准化的采样程序方法,其中包括样品均质化程序,而国内对于均质化技术在分析检测中的系统性研究还相对较少,开展均质化技术在分析检测领域中的系统研究,对于在实验室中获得可靠、准确和具有代表性的结果非常关键。

本文从样品均质化的理论出发,综述了样品均质化对检测结果影响的理论研究进展,对比了国内外目前主流均质化方法的优缺点和适用样品类型。对均质化技术在不同领域的最新应用研究情况进行了综述,系统探讨了实际应用中均质化效果的评价方法,并分析了影响均质化效果的因素。总结并展望了样品均质化技术的发展方向和应用前景,对样品均质化技术和相关仪器提出了几点研究建议,以期进一步推动我国分析检测行业高质量发展。

1 样品均质化对检测结果影响的理论研究与方法分类

1.1 样品均质化对检测结果影响的理论研究

在分析检测中,样品均质化是使用一定的方法使样品(固体或悬浮液)体系中的颗粒微粒化和均匀化的过程^[2],其主要包括两个环节:减小样品颗粒尺寸和混合。减小样品颗粒尺寸即利用各种设备通过研磨、剪切、捶打和冲击等方式将样品颗粒尺寸减小的过程。混合是使待测物质在样品中均匀地随机分布的过程。

在实验室进行痕量目标组分分析时,分析流程涵盖采样、均质化、样品制备和分析等多个环节,其

中,每一个环节都会引入误差。Lichon^[3]对典型的食品农残色谱分析整个步骤的误差贡献进行了评估,并用相对标准偏差来描述这些步骤的误差。结果表明,引入误差最大的环节是采样,其次是均质化,最后是样品制备和分析。由于样品的痕量分析非常复杂,任何样品都是异质的,分析目标物分布往往在时间和空间上存在非常大的不均匀性,这就导致了分析结果受到样品类型和样品制备技术的影响。制备均质且具有代表性的实验室样品是不均匀分布污染物分析程序中的关键步骤,所以在取出实验室分析的代表性样品之前,必须将其完全均质化,以尽可能消除样品之间的异质性和不均匀性,减小由此带来的误差。Lehotay等^[4]在研究农药残留取样和样品处理的问题时,将Gy^[5]在采矿工作中发展的取样理论应用于水果、蔬菜和动物组织等食品类样品的分析。Gy的取样理论将样品的异质性分为成分异质性和分布异质性,并且解析了减小样品颗粒直径和增大样品质量可以减小基础误差,混合和粉碎可以减小分离误差的机理。Gy的取样理论的应用能让研究人员更好地了解样品分析物的分布,降低取样和样品处理产生的误差。Lyman等^[6]在研究霉菌毒素污染谷物的问题上,通过考虑相同子样品之间的方差或标准差来量化材料的异质性,其中包括分布异质性和固有异质性。并且通过理论公式证明了通过粉碎可以减小样品颗粒的大小,增加单位体积或单位质量中所采样本颗粒的数量,从而减小子抽样的变异性,同时,通过混合可以减少样品的分布异质性。HJ/T 166—2004 土壤环境监测技术规范^[7]中指出由于土壤组成的不均匀性造成土壤监测的基础误差,该误差不能消除,但可通过研磨成小颗粒和混合均匀而减小。其中,用于土壤农药、土壤有机质或土壤全氮量等项目分析的样品要研磨到小于0.25 mm的粒度,用于土壤元素全量分析的样品要研磨到小于0.15 mm的粒度。

1.2 均质方法的分类

均质化方法可以根据其工作原理和产生力的类型分为研磨、剪切、捶打和超声波^[8]。

1.2.1 研磨

研磨主要通过将样品夹在两个相互滑动的坚硬表面之间以产生摩擦,进而使样品撕裂和破碎来实现均质。研磨可以用于湿样品、干样品和冷冻样品。湿法研磨将样品与液体介质一起研磨,一般用

于组织样品. 干磨一般用于种子、植物材料、沉积物和土壤样品. 冷冻研磨使用液氮或干冰冷冻样品, 冷冻后的样品容易变脆或断裂, 同时也保留了热不稳定的分析物, 一般用于植物或组织样品. 研磨具

有高通量和多功能性, 可用于各种样品类型和尺寸, 需要根据所使用的研磨技术和材料的目标尺寸选用合适的设备. 研磨类均质化方法采用的设备及其优缺点如表 1 所列.

表 1 研磨类均质化方法采用的设备及其优缺点
Table 1 Equipment used in grinding homogenization method and its advantages and disadvantages

均质化设备	优点	缺点
研钵和研杵	适用于许多不同类型的材料, 易于使用, 价格低廉	低通量, 产生灰尘, 玻璃和瓷器易碎裂, 清洁要求高
使用研钵和研杵进行低温研磨	主要应用于生物样品, 产生非常小的颗粒, 价格低廉, 可用于玻璃、陶瓷或金属	小样品可能会丢失, 样品通量低, 研钵和研杵需要在样品之间进行清洁和预冷冻
用于小样品研磨的CryoGrinder	可实现粒径减小、混合、细胞破碎, 适用于低温和环境温度, 可干磨或湿磨, 高通量	成本高, 样品量必须少
玻璃均质机	价格低廉, 易于使用、清洁和去污, 产生非常细的匀浆	某些组织(纤维和膜状)难以分解, 通量低, 玻璃容易破裂
振动盘式研磨机	对中硬、硬、脆和纤维样品进行快速且可重复的研磨, 多种材料可供选择	成本高
行星式球磨机	适用于许多不同类型的材料, 高效研磨至纳米级, 高通量, 多种配置	成本高

1.2.2 剪切

剪切主要通过剪切作用产生切向力来对样品进行破坏以实现均质. 剪切类均质设备适合粉碎柔软、有弹性和含纤维的样品材料. 剪切作用能在非常短的时间内产生非常均匀的样品, 但是在机械作用下会产生热量加热样品. 剪切类均质化方法采用的设备及其优缺点如表 2 所列.

1.2.3 捶打

捶打主要通过将样品和珠子放入试管中快速

晃动, 珠子对样品施加压力压碎样品来实现均质. 捶打类均质设备广泛用于微生物和组织样品, 简单有效, 但是处理的样品数量有限, 同时还要保持珠子清洁, 避免样品间的交叉污染. 捶打类均质化方法采用的设备及其优缺点如表 3 所列.

1.2.4 超声波

超声波主要通过空穴作用和高频振动对样品进行细化和均匀来实现均质. 超声波均质机可以针对不同量的样品提供各种功率和尺寸的探头, 主要

表 2 剪切类均质化方法采用的设备及其优缺点
Table 2 Equipment used in shear homogenization method and its advantages and disadvantages

均质化设备	优点	缺点
Waring搅拌机	可以快速处理大型样品, 易于使用、清洁、去污和灭菌	起泡风险, 产生粗均质化并不总是适合高效萃取
带珠子的涡流剪切机	易于获得, 价格低廉, 适用于所有尺寸的管子	对样品破坏效果较差, 可能会因摩擦而加热样品
Ultra turrax均质器	适用于软质物料的均质化, 易于使用和维护	样品通量低, 仅限于小样品
转子-定子均质机	可有效均质化各种样品, 体积范围广, 生成均质样品	成本高, 轴难以清洁, 纤维样品的均质性差, 产生使蛋白质变性的热量
Dounce均质器	价格低廉, 对轻度裂解细胞非常有效, 易于使用、清洁和去污	实体组织不能有效均质化, 样品通量低, 易碎
Potter-Elvehjem PTFE研杵和玻璃管	价格低廉, 易于使用和清洁样品, 在加工过程中保持低温有效破坏细胞	对实体组织效率不高, 肌肉样本均质化差, 完全均质化需要多个步骤
法式压榨机	有效和高效, 非常均匀的均质	样品量少, 样品通量低, 需要预均质化, 成本高, 易堵塞

表 3 捶打类均质化方法采用的设备及其优缺点

Table 3 Equipment used in hammering homogenization method and its advantages and disadvantages

均质化设备	优点	缺点
珠子打浆机	用于破坏细胞, 简单有效	样品通量低, 必须去除和清洁微珠
涡流珠打浆机	易于获得, 价格低廉, 适用于所有尺寸的管子	对样品破坏效果较差, 可能会因摩擦而加热样品
多管均质机	样品通量高, 对于微生物和许多组织有效	均质有弹性的组织效果差, 会产生热量, 成本高
高通量均质机/ 混合粉碎机	高通量, 最大限度减少清洁工作量和交叉污染问题	成本高

针对乳液和分散颗粒有效, 可处理小体积样品, 设备相对便宜, 样品产热少, 操作维护简单, 可提高混合速度和分散稳定性. 但是, 超声波均质主要局限于液体体系, 难以用于大体积或连续体积, 可降解热敏性成分, 气蚀可损坏易碎颗粒.

2 均质化技术在不同检测领域的应用

2.1 食品安全检测

近年来, 食品安全问题逐渐成为社会的焦点, 引起食品安全问题的污染物类型多, 如农药、兽药和微生物等, 并且食品种类丰富, 形态各异, 污染物在食品中的分布非常不均匀, 这给食品污染物的检测带来了困难, 因此, 均质化技术对保证食品安全检测结果的可靠性意义重大^[9].

针对食品安全的各项指标检测, 研究人员采用转子-定子均质机、切割机和研磨机等方法对蔬菜水果、坚果等进行均质化处理, 并对回收率、精密度等指标进行研究, 以评价均质化处理对检测结果的影响. 封丽娟等^[10]建立了一种均质提取, 凝胶色谱净化(GPC), 三重四极杆气相色谱质谱(GC-MS)检测蔬菜中多种农药残留的方法. 该方法前处理简单快速, 提取均匀, 对 13 种农药的回收率在 76.6%~112.4% 之间, 相对标准偏差(RSD)<10.5%, 符合分析要求. Riter 等^[11]开发并验证了一种两阶段细磨方法, 以提高原始农产品中草甘膦残留分析流程的效率. 该方法首先采用垂直切割机粗磨以产生克级的分析样品, 然后采用液氮冷冻研磨产生毫克级的分析样品, 而后采用二级细磨串联质谱法与已经建立的邻苯二甲醛法分析草甘膦及其降解产物氨甲基膦酸. 结果表明, 二级细磨串联质谱法在回收率方面与邻苯二甲醛法相比略低, 但新方法的变异系数较低, 表明新方法具有更好的重复性和精密度. 钱正等^[12]采用 REEKO AH-20 全自动均质器和 SCIENTZ

XHF-D 高速分散器开展了蔬菜水果农残检测对比试验, 除百菌清和乙烯菌核不符合 GB/T 27404—2008 检验方法确认的技术要求外, 用 REEKO AH-20 全自动均质器均质的样品在方法回收率、精密度都略高于 SCIENTZ XHF-D 高速分散器均质的样品. 黄挺普等^[13]分析了旋刀式均质和拍击式均质两种均质方法对食品中微生物检验的影响. 在结果上, 大肠菌群和金黄色葡萄球菌检测采用旋刀式均质方法处理的回收率要明显高于拍击式均质方法, 霉菌检测采用拍击式均质方法处理的回收率要明显高于旋刀式均质方法. Spanjer 等^[14]采用干磨和浆料研磨两种方法对可可、咖啡、杏仁和开心果样品进行均质, 通过粒度分布测试和霉菌毒素分析对比两种研磨方法的均质效果和变异系数. 结果表明, 由于浆料研磨的样品粒度更小, 从而产生了更小变异系数的均质样品. Velasco 等^[15]开发了一种使用水浆研磨分析黄曲霉素的方法, 该方法采用浆料研磨的方法代替传统干磨, 并分析了花生等产品中的黄曲霉素. 结果表明, 传统干磨方法的分析精度在 5.7%~20.8% 之间, 而采用浆料研磨分析的精度在 2.6%~7.8% 之间, 并且采用浆料研磨更简单、经济.

2.2 生物组织中化合物分析

均质化技术在生命科学研究中也应用广泛, 为了分析生物组织样品中的化合物, 需要破坏组织结构本身, 所以组织类型和分析目标化合物特性将决定均质化方法的选取^[16]. 研究人员主要采用研钵和研杵、玻璃均质器、研磨珠均质仪、球磨机和珠子打浆机等方法处理生物组织样品, 并对生物组织中的化合物进行分析, 研究表明不同均质方法对蛋白质、DNA、RNA、线粒体和微生物的提取均有不同程度的影响.

杜雅静等^[17]采用玻璃匀浆器、研磨珠均质仪等方法, 从临床增生性瘢痕组织样本中提取蛋白质.

结果表明,玻璃匀浆器与研磨珠均质仪联合方法残渣呈均匀絮状,获得蛋白质量最大,差异具有统计学意义($P < 0.05$),蛋白凝胶电泳考马斯亮蓝染色样本均未降解,Western blot 测得联合方法提取样本中前列腺素 D 合成酶含量更高.该方法获得蛋白质较为高效,可以解决人工研磨效率低、不均匀和不完全的问题.Ostapowicz 等^[18]采用研钵和研杵与球磨机对两种肿瘤组织进行均质化处理,提取 DNA、RNA 和蛋白质.结果表明,对于 DNA 和蛋白质的提取,两种癌症组织均质化方法都是合适的.对于 RNA 提取和进一步的基因表达分析,球磨机是一种更合适的癌症组织匀浆方法,因为其效果更好, RNA 降解更少.Varrathyarom 等^[19]使用珠子打浆方法提取烧焦骨头和牙齿样本的 DNA,均质后提取到的骨骼样本 DNA 质量浓度为 $136 \mu\text{g/mL}$,而提取到的牙齿样本 DNA 质量浓度更高,为 $267 \mu\text{g/mL}$.珠子打浆技术效率高、成本低、化学暴露品更少,但仍需与其他方法在片段长度、产量和 DNA 纯度方面进行比较.徐凡等^[20]探讨了研磨珠匀浆仪、乳化分散仪和玻璃匀浆器对小鼠心肌组织线粒体提取质量的影响.结果表明,3 种组织匀浆法均能获得高纯度的线粒体,但与研磨珠匀浆仪相比,乳化分散仪和玻璃匀浆器得到的线粒体膜电位降低,部分结构不完整或破碎.研磨珠匀浆法结合差速离心法分离的心肌组织线粒体,其形态结构完整、功能良好.Jazmati 等^[21]建立了一种使用珠子打浆技术进行假体周围感染组织样本均质化处理并结合血培养瓶富集组织样本的方法,并验证了均质化过程对细菌活性的影响.结果表明,微生物的活性没有因均质化过程而降低,且该方法具有快速、有效、无污染和高通量的特点.珠子打浆结合血培养瓶的使用,为微生物学诊断提供了一种高灵敏度的流程.Fang 等^[22]为了优化组织预处理方法以提高微生物的检测能力,采用机械均质化、手动铣削、二硫苏糖醇处理、超声处理和直接培养 5 种组织处理方法均质收集到的假体周围组织样本,并进行微生物培养.结果表明,经过机械均质化处理的组织具有最高的敏感性,并且机械均质和二硫苏糖醇处理无需特殊设备便可联合使用,可有效提高假体周围组织中细菌的检测率.

2.3 土壤污染物及成分检测

土壤污染检测是对土壤中各种有害物质含量

进行检测和评估的过程,旨在了解土壤质量状况,为污染治理和环境保护提供科学依据.均质化处理是土壤样品污染物检测和化学成分分析中常用的方法,目的是减少同一样品间的不均匀性.在土壤污染物检测中,研究人员通过筛分,并采用不同种类的研磨方法来实现土壤样品的均质化,研究表明均质化处理提高了土壤中污染物的均匀性,进而改善了提取效率、分析精度和可重复性.

Beriro 等^[23]为了研究粉碎类型对煤气厂土壤中多环芳烃定量的影响,采用研磨和球磨两种方法处理土壤样品,使用高效液相色谱法分析了 18 种多环芳烃.结果表明,与筛分样品相比,研磨样品显示出更高的均匀性,提供了更好的分析精度.球磨通过破坏土壤的物理结构,改善了溶剂对多环芳烃吸附位点的接触,从而提高了提取效率和分析的一致性.Burgess 等^[24]通过测量受污染的海洋沉积物间隙水中多氯联苯的浓度和分布,研究了沉积物均质化的地球化学效应.结果表明,与未干扰相相比,在分离间隙水之前,均质化显著增加了溶解相和胶体相中多氯联苯的浓度.证明了在未受干扰和均质化的情况下,储存 3 个月的沉积物间隙水中有机碳含量的统计差异,并表明样品均质化的做法可能会改变污染物的生物利用度.Dubé 等^[25]研究了粒径大小和研磨过程对城市人为土壤中痕量金属元素浓度测量的影响.试验采用筛分和研磨对城市人为土壤进行处理,结果表明,研磨处理平均增加了 13% 的痕量金属元素浓度,并显著降低了测量的相对方差,提高了测定结果的可重复性.

2.4 天然产物成分检测

天然产物成分因复杂性和多样性大大增加了提取和检测工作的难度.均质提取技术可以通过机械作用在很短的时间内将材料中的成分萃取到溶剂中,方法简单易操作、耗时短、提取效率高,与多种检测技术联用能有效地对天然产物成分进行定性和定量分析.

秦宗会等^[26]建立了组织匀浆法测定青蒿中青蒿素的方法.该方法与传统冷浸提取法相比,选择性良好,相关系数为 $0.9989 \sim 0.9997$,样品测定相对标准偏差在 $1.08\% \sim 1.54\%$ 之间,回收率为 $98.5\% \sim 103.7\%$,检出限为 $0.520 \mu\text{g/mL}$.不但具有稳定性好、抗干扰因素强、精密度高和准确度高等优点,而且提取率高、节约检测时间,尤其是对新鲜样品效果

更加明显. 沈向阳等^[27]采用高速匀浆法处理钝顶螺旋藻获得藻蓝蛋白, 在优化的提取条件下得率为213.32 mg/g, 该工艺可充分释放藻粉中的藻蓝蛋白, 并且耗时短, 易操作. 王富豪等^[28]在浸提法提取植物叶绿素中增加了匀浆步骤, 与试剂盒法和直接浸提法进行比较. 结果表明, 匀浆浸提法比试剂盒法和直接浸提法提取效率更高、更稳定, 并使用多种浸提液加快浸提过程. 薛景娇等^[29]比较了3种前处理方法(匀浆法、热回流提取法和超声波提取法)对金银花中绿原酸提取效果的影响, 并使用高效液相色谱法进行检测. 研究表明, 匀浆法提取效率高, 能耗低, 所需时间短, 样品前处理步骤简单, 目标物损失少, 样品平均加标回收率为118%, RSD为4.5%, 适用于金银花中绿原酸含量的分析. 崔柱文等^[30]采用匀浆法提取-高效液相色谱法测定烟草料液中的苯甲酸和山梨酸. 研究表明, 该研究方法重现性好, RSD为2.8%~3.2%, 回收率为92%~104%, 检出限较低, 可用于烟草料液中苯甲酸和山梨酸的含量分析.

3 均质效果评价方法与指标研究

目前, 我国对于均质效果评价方法的系统研究相对较少, 在分析检测的相关标准中描述也较为简单. 国内外目前对于均质效果的评价方法一般分为最终效果评价指标和中间过程评价方法. 最终效果评价指标通常与研究应用目标相关, 主要指标一般考虑提取效率、回收率和精密度. 中间过程评价方法在测量评价时一般不考虑最终应用目标, 一般以均质后的粒度与粒度分布作为评价均质好坏的参数, 通过研究不同粒度分布与最终效果的关系, 制定粒度分布评价标准.

3.1 最终效果评价指标

3.1.1 提取效率

样品均质的提取效率是指在样品制备过程中, 通过均质化方法将目标成分从样品基质中有效提取出来的能力. 提取效率衡量的是样品制备过程中分析目标物被提取出来的程度. 提取效率的提高意味着可以从相同的原料中获得更多的分析目标物, 提高检测方法的灵敏度, 提高物质制备的产量. Herrmann等^[31]研究了颗粒大小和研磨温度对谷物面粉中农药残留提取效率的影响. 结果表明, 冷冻状态下研磨的谷物更容易操作, 得到的样品更均匀,

粒径更小, 对热敏感的农药提取效率最多可提高31%. Alsaud等^[32]研究了研磨对选取的两种不同植物叶片中生物活性化合物提取效率的影响. 结果表明, 随着粒度的减小, 生物活性化合物提取效率增加, 这与减小粒径可以增加固体表面积、提高溶质的扩散速率有关.

3.1.2 回收率

回收率反映了分析过程中目标物的可回收程度, 能够有效验证分析方法的准确性和可靠性, 其在一定程度上受均质效果影响. Lolo等^[33]开发了一种采用冷冻研磨分析鸡肉组织中氟喹诺酮类药物的方法. 该方法采用液氮冷冻研磨鸡肉样品, 相比于使用Ultra turrax均质机均质后的鸡肉样品, 冷冻研磨将恩诺沙星的回收率提高到了65%~101%之间, 实现了氟喹诺酮类药物的高效提取.

3.1.3 精密度

样品均质效果的精密度是指在样品制备过程中, 通过均质化方法实现样品一致性的程度, 对试验结果的准确性和重复性有重要影响. 均质效果的精密度通常通过测定样品中目标分析物的相对标准偏差(RSD)来评估, RSD越低, 表示样品的均质性越好. Zeisler等^[34]对均质后的卷心菜中的有机农药残留物和无机成分进行分析, 用测量到的RSD来粗略估计均质后的卷心菜的不均匀度. 结果表明, 无论是有机农药残留物还是无机成分, 其不均匀性都在3%以内, 均质后的卷心菜具有良好的均匀性. Donati等^[35]采用3种不同的均质方法(刀片、低温和研钵研磨)处理早餐谷物样品并分析样品中的多种元素. 结果表明, 刀片研磨和低温研磨方法能提供较高的均匀性, 从而提高分析精度. 较小的粒度也有助于提高样品的代表性和分析精度.

3.2 中间过程评价方法

最终效果评价指标虽然直接体现了均质的最终影响, 但评价过程复杂, 采用样品均质后的粒度和粒度分布的中间过程评价方法, 评价过程相对简单. 通过测量粒度能非常直观地体现出均质前后物料颗粒的直接变化, 物料颗粒的粒度越小, 比表面积越大, 颗粒与溶剂接触的面积也越大, 提取效率随之增加. 粒度分布表示不同粒度颗粒的分布情况. 粒度测试是最直接也是最简单能体现均质效果的方法, 主要的测定方法有3种: (1)显微镜法. 光学显微镜和电子显微镜; (2)筛分法. 手动筛分法、机械

筛分法和空气喷射筛分法; (3) 激光衍射法. 激光粒度仪. 粒度的测定方法多种多样, 不同的方法适用于不同大小范围和类型的颗粒.

Zeisler 等^[36] 采用球磨机和圆盘磨机两种均质方法均质牛肝组织样品, 并通过筛分法来获取匀浆的粒度分布. 结果表明, 使用圆盘磨机均质牛肝组织产生的颗粒更小, 几乎所有材料都能通过 40 目 (0.350 mm) 筛, 颗粒直径小于 0.46 mm. Koglin 等^[37] 采用不同研磨程序以及超声波对鹿肝和鲷鱼肌肉进行处理, 使用激光粒度仪分析均质后的样品材料. 结果表明, 多次研磨能显著减小样品颗粒, 在低温条件下, 经过 5 次研磨过程后, 鹿肝和鲷鱼肌肉 90% 的粒径小于 200 μm . 与用磁力搅拌器处理的样品相比, 超声波处理后的大颗粒样品明显减小. Quan 等^[38] 采用四因素三水平的正交试验研究人参中有机氯农药残留量的测定方法, 对提取条件进行优化. 结果表明, 在试验选取的 20 ~ 40 目 (0.850 ~ 0.425 mm)、40 ~ 60 目 (0.425 ~ 0.250 mm) 和 60 ~ 80 目 (0.250 ~ 0.180 mm) 三个粒度等级中, 最佳提取条件的粒径等级为 60 ~ 80 目. Yuan 等^[39] 将豆类研磨至不同的颗粒大小 (2.00 ~ 0.850 mm、0.850 ~ 0.425 mm、0.425 ~ 0.250 mm 和 >0.250 mm), 研究豆类样品颗粒大小与农药提取率的关系. 结果表明, 对于啮菌酯、氟菌腈和依托芬普, 当粒径从 2.00 ~ 0.850 mm 减小到 0.250 mm 时, 平均提取率显著提高. 对于所有目标农药, 当粒径为 0.425 ~ 0.250 mm 时, 提取效率最高. 说明了粒度大小显著影响豆类中残留农药的提取效率. Bernaerts 等^[40] 探讨了粒径减小和微观结构改变对胡萝卜果渣果胶提取效率和结构的影响. 在不同的压力水平下进行高剪切混合和高压均质化, 粒径减小使果胶的提取效率提高了 50%, 达到提取总量的 62%. 而且, 粒径减小并没有改变提取果胶的分子结构.

4 影响均质效果的因素研究

4.1 不同均质原理的方法对均质效果的影响

基于不同均质原理的方法众多, 不同样品需要采取不同的均质方法. 这是由于不同样品的物理特性存在差异, 样品的粘度、密度和颗粒大小各不相同. 此外, 某些样品含有敏感性的成分, 一些均质方法会导致成分破坏或活性降低. 因此, 在不同的应用领域样品需要达到的粒度和粒度分布不同, 需要

根据实际场景选取均质方法, 以实现最佳的均质效果. Krejčová 等^[41] 为了简化不同食物样品的制备流程, 采用不同均质方法 (玛瑙研磨、咖啡研磨机和低温研磨) 对麦片、种子和速溶样品等非常不均匀的食品样品进行均质, 并采用不同元素含量测定的 RSD 来评估均质效果. 结果表明, 玛瑙研钵和咖啡研磨机研磨后样品元素含量的 RSD 较差, 而低温研磨后样品元素含量的 RSD 偏好, 约为 4%. Clausen 等^[42] 比较了不同研磨方法 (圆盘磨、环形圆盘磨、球磨、研钵和研杵) 对土壤样品金属元素残留浓度的影响. 结果表明, 研磨显著提高了土壤样品的金属元素测定精度, 采用圆盘磨、环形圆盘磨和球磨方法处理的土壤样品金属元素残留浓度测量 RSD 均低于 15%, 而采用研钵和研杵处理的土壤样品金属残留浓度测定的 RSD 较高 (40% 以上).

4.2 均质机的结构及工作参数对均质效果的影响

均质机的结构和工作参数也是影响均质效果的关键, 不同均质机的结构和工作参数对均质效果影响的相关报道相对较少, 尚待进一步深入研究. 杨俊^[43] 采用高速剪切均质法提取沙棘叶中的黄酮, 发现随着转速的增加, 总黄酮的产率逐渐增加, 当高剪切转速为 19 000 r/min 时, 总黄酮产量最高. 与乙醇-水溶液提取法和超声波提取法相比, 高速剪切提取法在相同条件下提取沙棘叶中黄酮的提取效率更高, 并且通过红外分析发现该过程不会破坏黄酮结构. Kong 等^[44] 使用高速剪切法在不同剪切条件 (pH、转速和温度) 下探究对蛋白溶解度的影响. 研究发现, 通过在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下高速剪切 (15 000 r/min) 处理 5 min, 当 pH 为 8.0 时, 核桃蛋白的溶解度从 24.33% 大幅提高到 62.81%; 当 pH 为 9.0 时, 溶解度从 50.93% 提高至 76.65%. 表明高速剪切处理, 特别是在碱性 pH 值下, 能很好地减小粒径和提高蛋白质溶解度.

4.3 外部环境条件对均质效果的影响

温度是影响均质过程好坏非常重要的参数. 温度对样品的影响主要体现在两个方面: 对于物料的特性, 温度可以直接影响均质后物料的粒度分布, 尤其对于植物纤维和动物组织等韧性比较强的物料, 采用冷冻均质可以使物料变脆, 从而产生更小的粒度; 对于提取物质的性质, 均质机在均质过程由于机械作用会产生热量, 对于一些热敏感的物质可能会导致热敏感物质挥发和变性等问题. 采用冷

冻均质可以减小均质过程提取物质的热损失,提高提取效率和检出率。

冷冻和非冷冻均质方法对均质效果影响的相关研究表明,冷冻方法不仅能获得更小更均匀的粒度,而且能有效减小热敏感物质的损失。Lichon 等^[45]评估了一系列可用于不同食品的均质化方法,包含冷冻和非冷冻方法。结果表明,非冷冻方法在处理较大样品时较为适用,而冷冻方法通过在低温下使食品基质变脆,易于粉碎,从而获得更细小的粒度和均匀度,能够有效提高分析精密度。Manohar 等^[46]研究了常规研磨和低温研磨对姜黄粉末粒度和形状的影响,使用扫描电子显微镜对姜黄颗粒的粒度和形状进行了分析。其结果表明,冷冻研磨姜黄的体积平均直径或重量平均直径比传统研磨姜黄小 50 μm ,颗粒形状参数比常规研磨好,并且冷冻研磨可以减少热敏感材料(如姜黄油)的挥发损失。Murthy 等^[47]采用锤磨机对黑胡椒进行研磨,采用筛分法测定黑胡椒粉末的平均粒度,并评估了精油产量。结果表明,由于香料含有热敏感的精油成分,虽然研磨有助于香料中的风味成分释放,但过高的粒度会导致精油损失。黑胡椒研磨过程中精油损失和能耗随着粒度的细化而增加,粒度为 0.7 mm 的粉末在精油产量上表现最佳。Hemery 等^[48]为了找到有效减少小麦麸皮粒径的方法,研究了研磨温度(室温或冷冻)对颗粒粒度分布、组成和微观结构的影响。结果表明,冷冻研磨比室温研磨更高效,粒度分布更均匀,能降低研磨能耗的同时有效保留热敏感化合物。Fussell 等^[49]为了验证蔬菜和水果在低温加工过程中农药的稳定性,对冷冻粉碎后 134 种农药的回收率进行评估。结果表明,120 种农药在低温处理的过程中是稳定的,即回收率的差异小于 20%,只有 14 种农药在低温处理的过程中不稳定或损失。低温处理改善了样品的均匀性,提高了农药残留的稳定性。Lehotay 等^[50]提出了一种直接将液氮加入到新鲜样品中的一步高效粉碎大批样品的方法,以分析果蔬中的农药残留。结果表明,使用液氮粉碎法可以有效地减少测试样本量,同时保持分析结果的准确性和精密度。

针对常温均质方法在某些样品应用上的局限性,利用低温冷冻均质样品的方法已有相关报道。Phillips 等^[51]开发了一种利用自动化冷冻研磨机制备细胞提取物的方法,该方法采用液氮将细胞冷冻

至 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$,避免了因机械破坏产热导致的蛋白质变性和降解,同时可以连续性地生产。比较了玻璃珠研磨和自动化冷冻研磨两种酵母细胞裂解方法,结果表明,冷冻研磨方法可以获得更高的总蛋白产量,并且可以更好地回收标记蛋白。冷冻研磨是一种高效的从多种样本中分离蛋白质和其他大分子的方法,适用于多种生化应用。Singh 等^[52]采用低温研磨在 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下脆化破坏酵母细胞。低温研磨将蛋白质释放率提高到近 1 000 倍。尽管与蛋白质相比,DNA 释放率相对较低,但可以获得高分子量的 DNA 链。低温研磨减少了常温研磨由于高剪切和升温导致的蛋白质和 DNA 变性,是一种有应用前景的蛋白质和 DNA 释放技术。Zelentsova 等^[53]提出了一种基于切片机-低温恒温器装置的新方法,其分别采用切片机-低温恒温器和传统珠子打浆器处理乳腺导管和动脉样品。结果表明,珠子打浆器会导致蛋白质水解增加蛋白质氨基酸的浓度,同时因热降解会导致核苷酸浓度的降低。而切片机-低温恒温器不会引起样品加热,样品制备过程中的材料损失较小。切片机-低温恒温器法是一种新的、对热敏感化合物友好的均质化方法,特别适用于处理弹性胶原蛋白丰富的组织样本。

5 总结与展望

本文总结和分析了样品均质化对检测结果的影响,对不同原理均质方法在不同领域的研究进展进行了综述,表明样品均质化技术在分析检测中起到至关重要的作用。同时,本文探讨了均质化效果的不同评价方法和评价指标,以及不同均质方法、不同仪器结构和工作参数、不同外界环境条件等对均质效果评价的影响。分析表明随着均质化技术的发展,对均质效果评价标准的系统性研究相对发展缓慢,另外针对仪器本身在具体应用中的标准相对欠缺,仪器设备质量、均质效果参差不齐,这都将影响分析检测结果的可靠性。

对于未来均质技术在分析检测中的应用与发展,一方面均质化技术种类多,应针对不同样品特性建立不同的均质化流程,并在均质化流程中实施质量控制程序,以确保整个均质过程的质量;另一方面,针对现有均质化设备种类繁多、自动化程度低等问题,研究自动化和智能化的均质化设备,加强自动化均质仪器在实验室的应用与推广,提高均

质处理的效果和效率;最后,应加强开展均质化技术对直接评价方法与间接评价方法、环境影响的关联性研究,可进一步研究建立针对均质仪器本身在使用环境、工作参数和均质效果等方面更加统一的标准测试方法,以促进均质技术的标准化发展,进一步提升我国分析检测行业水平。

参考文献:

- [1] 王凡,王春雷.食品药品检验前处理技术研究[J].食品安全导刊,2023(13):162-164. [WANG Fan, WANG Chunlei. Research on pre-treatment technology of food and drug inspection[J]. Food Science and Technology, 2023(13): 162-164.]
- [2] Markert B. Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices[J]. *Science of the Total Environment*, 1995, 176(1-3): 45-61.
- [3] Lichon M J. Sample preparation for chromatographic analysis of food[J]. *Journal of Chromatography A*, 1992, 624(1-2): 3-9.
- [4] Lehotay S J, Cook J M. Sampling and sample processing in pesticide residue analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(18): 4395-4404.
- [5] Gy P M. Sampling for analytical purposes[M]. Royle A G, 译. New York: Wiley, 1998.
- [6] Lyman G J, Bourgeois F, Gawalko E, et al. Estimation of the sampling constants for grains contaminated by mycotoxins and the impact on sampling precision[C]//Proceedings of the 4th world conference on sampling & blending, 2009: 19-24.
- [7] 土壤环境监测技术规范: HJ/T 166—2004[S]. 北京: 中国环境出版社, 2004.
- [8] Markert B. Sample handling. Comminution of samples[M]//Encyclopedia of analytical science (second edition). Amsterdam: Elsevier, 2005: 163-169.
- [9] 肖尧,杨琪,孙鑫泽,等.食品安全问题及食品检测技术分析[J].现代食品,2024,30(8):139-141. [XIAO Yao, YANG Qi, SUN Xinze, et al. Analysis of food safety issues and food testing technologies[J]. Food Safety, 2024, 30(8): 139-141.]
- [10] 封丽娟,周文梅,冯琦.均质-GPC-GCMS法测定蔬菜中13种农药残留[J].中国标准化,2019(S2):98-102. [FENG Lijuan, ZHOU Wenmei, FENG Qi. Determination of 13 pesticide residues in vegetables by homogeneous-GPC-GCMS method[J]. China Standardization, 2019(S2): 98-102.]
- [11] Riter L S, Wujcik C E. Novel two-stage fine milling enables high-throughput determination of glyphosate residues in raw agricultural commodities[J]. *Journal of AOAC International*, 2018, 101(3): 867-875.
- [12] 钱正,裔群英,丁立彤,等.蔬菜水果农残检测中不同均质器前处理对比试验[J].农业与技术,2015(2):14-15,227. [QIAN Zheng, YI Qunying, DING Litong, et al. Comparative experiment on pretreatment of different homogenizers in pesticide residue detection of vegetables and fruits[J]. Agriculture and Technology, 2015(2): 14-15, 227.]
- [13] 黄挺普,马金华,贾钊,等.食品微生物检验中均质对检验结果的影响分析[J].食品安全导刊,2022(14):95-97. [HUANG Tingpu, MA Jinhua, JIA Chai, et al. Analysis of the influence of homogenization on the test results in food microbial inspection[J]. China Food Safety Magazine, 2022(14): 95-97.]
- [14] Spanjer M C, Scholten J M, Kastrup S, et al. Sample comminution for mycotoxin analysis: dry milling or slurry mixing?[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23(1): 73-83.
- [15] Velasco J, Morris S L. Use of water slurries in aflatoxin analysis[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1976, 24(1): 86-88.
- [16] Smith K M, Xu Y. Tissue sample preparation in bioanalytical assays[J]. *Bioanalysis*, 2012, 4(6): 741-749.
- [17] 杜雅静,王宇意,章丹婷,等.研磨珠均质仪提取增生性瘢痕组织蛋白质的方法[J].医学信息,2018,31(15):51-54. [DU Yajing, WANG Yuyi, ZHANG Danting, et al. Method for extracting hyperplastic scar tissue protein by grinding bead homogenizer[J]. Medical Information, 2018, 31(15): 51-54.]
- [18] Ostapowicz J, Maćkowiak B, Ostrowska K, et al. Comparison of tumour tissue homogenisation methods: mortar and pestle versus ball mill[DB/OL]. (2023-01-31) [2024-12-17]. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2510226/v1>.
- [19] Varrathayom P, Sathirapatya T, Worrapitirungs W, et al. DNA extraction of burnt bone and teeth casework samples using bead-beating homogenization technique[J]. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 2022, 8: 156-158.
- [20] 徐凡,张艳美.不同组织匀浆法对心肌组织线粒体提取质量的影响[J].汕头大学医学院学报,2021,34(2):100-103. [XU Fan, ZHANG Yanmei. Effects of

- different tissue homogenization methods on the quality of mitochondria extracted from myocardial tissue[J]. *Journal of Shantou University Medical College*, 2021, 34(2): 100-103.]
- [21] Jazmati N, Liebold C, Offerhaus C, et al. Rapid high-throughput processing of tissue samples for microbiological diagnosis of periprosthetic joint infections using bead-beating homogenization[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2024, 62(4): e0148623.
- [22] Fang X Y, Zhang L H, Cai Y Q, et al. Effects of different tissue specimen pretreatment methods on microbial culture results in the diagnosis of periprosthetic joint infection[J]. *Bone & Joint Research*, 2021, 10(2): 96-104.
- [23] Beriro D J, Vane C H, Cave M R, et al. Effects of drying and comminution type on the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in a homogenised gasworks soil and the implications for human health risk assessment[J]. *Chemosphere*, 2014, 111: 396-404.
- [24] Burgess R M, McKinney R A. Effects of sediment homogenization on interstitial water PCB geochemistry[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, 33(2): 125-129.
- [25] Dubé J S, Sona M, Boudreault J P, et al. Influence of particle size and grinding on measurement of trace metal concentrations in urban anthropogenic soils[J]. *Journal of Environmental Engineering*, 2014, 140(6): 04014011.
- [26] 秦宗会, 谢朝怀. 组织匀浆法测定青蒿素初探 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(7): 1210-1211. [QIN Zonghui, XIE Zhaohuai. Determination of artemisinin by tissue homogenization[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2007, 17(7): 1210-1211.]
- [27] 沈向阳, 梁霄, 付云, 等. 钝顶螺旋藻藻蓝蛋白的提取工艺研究 [J]. 现代食品科技, 2019, 35(7): 198-204, 136. [SHEN Xiangyang, LIANG Xiao, FU Yun, et al. Study of the extraction process of phycocyanin from *Spirulina platensis*[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(7): 198-204, 136.]
- [28] 王富豪, 郭婧华, 程有普. 匀浆法快速提取叶绿素对比试验 [J]. 中南农业科技, 2024, 45(1): 36-39.
- [29] 薛景娇, 和顺琴, 杨光宇, 等. 匀浆法提取-高效液相色谱法测定金银花中的绿原酸 [J]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2011, 20(2): 86-88. [XUE Jingjiao, HE Shunqin, YANG Guangyu, et al. Determination of chlorogenic acid in flos *Lonicerae* by homogenization extraction-HPLC[J]. *Journal of Yunnan Minzu University (Natural Sciences Edition)*, 2011, 20(2): 86-88.]
- [30] 崔柱文, 陈章玉, 贺宾, 等. 匀浆法提取: 高效液相色谱法测定烟草料液中苯甲酸·山梨酸 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5598-5599. [CUI Zhuwen, CHEN Zhangyu, HE Bin, et al. Study on the determination of benzoic acid and sorbic acid in tobacco sauce by homogenate extraction high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(11): 5598-5599.]
- [31] Herrmann S S, Hajeb P, Andersen G, et al. Effects of milling on the extraction efficiency of incurred pesticides in cereals[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2017, 34(11): 1948-1958.
- [32] Alsaud N, Farid M. Insight into the influence of grinding on the extraction efficiency of selected bioactive compounds from various plant leaves[J]. *Applied Sciences*, 2020, 10(18): 6362.
- [33] Lolo M, Pedreira S, Vázquez B I, et al. Cryogenic grinding pre-treatment improves extraction efficiency of fluoroquinolones for HPLC-MS/MS determination in animal tissue[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387(5): 1933-1937.
- [34] Zeisler R, Strachnov V, Perschke H, et al. The preparation of a cabbage candidate reference material to be certified for residues of agrochemicals[J]. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 1993, 345(2): 202-206.
- [35] Donati G L, Santos M C, Fernandes A P, et al. Sampling and sample homogeneity as introductory topics in analytical chemistry undergraduate courses[J]. *Spectroscopy Letters*, 2008, 41(5): 251-257.
- [36] Zeisler R, Langland J K, Harrison S H. Cryogenic homogenization of biological tissues[J]. *Analytical Chemistry*, 1983, 55(14): 2431-2434.
- [37] Koglin D, Backhaus F, Schlodt J D. Particle size distribution in ground biological samples[J]. *Chemosphere*, 1997, 34(9-10): 2041-2047.
- [38] Quan L, Li S F, Tian S J, et al. Determination of organochlorine pesticides residue in ginseng root by orthogonal array design soxhlet extraction and gas chromatography[J]. *Chromatographia*, 2004, 59(1): 89-93.
- [39] Yuan X, Kim C J, Noh H H. An LC-MS/MS method for the simultaneous analysis of 380 pesticides in soybeans, kidney beans, black soybeans, and mung beans:

- the effect of bean grinding on incurred residues and partitioning[J]. *Foods*, 2023, 12(24): 4477.
- [40] Bernaerts T, De Laet E, Hendrickx M, et al. How particle size reduction improves pectin extraction efficiency in carrot pomace[J]. *LWT*, 2024, 201: 116242.
- [41] Krejčová A, Pouzar M, Černohorský T, et al. The cryogenic grinding as the important homogenization step in analysis of inconsistent food samples[J]. *Food Chemistry*, 2008, 109(4): 848-854.
- [42] Clausen J L, Beal S A, Georgian T, et al. Effects of milling on the metals analysis of soil samples containing metallic residues[J]. *Microchemical Journal*, 2020, 154: 104583.
- [43] 杨俊. 沙棘叶中黄酮类化合物的提取及脱色工艺研究 [D]. 石河子: 石河子大学, 2023.
- [44] Kong X Z, Zhang L N, Lu X, et al. Effect of high-speed shearing treatment on dehulled walnut proteins[J]. *LWT*, 2019, 116: 108500.
- [45] Lichon M J, James K W. Homogenization methods for analysis of food stuffs[J]. *Journal of AOAC International*, 1990, 73(5): 820-825.
- [46] Manohar B, Sridhar B S. Size and shape characterization of conventionally and cryogenically ground turmeric (*Curcuma domestica*) particles[J]. *Powder Technology*, 2001, 120(3): 292-297.
- [47] Murthy C T, Rani M, Srinivasa Rao P N. Optimal grinding characteristics of black pepper for essential oil yield[J]. *Journal of Food Process Engineering*, 1999, 22(2): 161-173.
- [48] Hemery Y, Chaurand M, Holopainen U, et al. Potential of dry fractionation of wheat bran for the development of food ingredients, part I: Influence of ultra-fine grinding[J]. *Journal of Cereal Science*, 2011, 53(1): 1-8.
- [49] Fussell R J, Hetmanski M T, Colyer A, et al. Assessment of the stability of pesticides during the cryogenic processing of fruits and vegetables[J]. *Food Additives & Contaminants*, 2007, 24(11): 1247-1256.
- [50] Lehotay S J, Michlig N, Lightfield A R. Assessment of test portion sizes after sample comminution with liquid nitrogen in an improved high-throughput method for analysis of pesticide residues in fruits and vegetables[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(5): 1468-1479.
- [51] Phillips E O N, Giovinazzi S, Menz S L, et al. Preparation of cell extracts by cryogrinding in an automated freezer mill[J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2021(167): 61164.
- [52] Singh M R, Roy S, Bellare J R. Influence of cryogenic grinding on release of protein and DNA from *saccharomyces cerevisiae*[J]. *International Journal of Food Engineering*, 2009, 5(1): 1-23.
- [53] Zelentsova E A, Yanshole V V, Tsentalovich Y P. A novel method of sample homogenization with the use of a microtome-cryostat apparatus[J]. *RSC Advances*, 2019, 9(65): 37809-37817.