王耀, 李燕飞, 曹金博, 等. 叶酸的高灵敏竞争 ELISA 方法建立及其初步应用 [J]. 食品工业科技, 2026, 47(1): 339−347. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120390

WANG Yao, LI Yanfei, CAO Jinbo, et al. Establishment and Preliminary Application of Highly Sensitive Competitive ELISA for Folic Acid[J]. Science and Technology of Food Industry, 2026, 47(1): 339−347. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120390

· 分析检测 ·

叶酸的高灵敏竞争 ELISA 方法建立及其初步应用

王　耀[1,*], 李燕飞[1], 曹金博[2], 杨喜燕[1], 黄佳翔[1], 黄明月[1], 韩　露[1], 王凯乐[1],
陈秀金[1], 李兆周[1], 张　敏[1], 康怀彬[1,*]

(1.河南科技大学食品与生物工程学院/河南省食品绿色加工与质量安全控制国际联合实验室, 河南洛阳 471000;
2.华南师范大学化学学院, 广东广州 510000)

摘　要: 为实现叶酸含量的高灵敏快速检测，本研究通过制备叶酸单克隆抗体，并对检测体系进行优化，建立了高灵敏竞争酶联免疫吸附试验（Competitive enzyme-linked immunosorbent assay，cELISA）方法。结果表明，当包被抗原浓度为 0.5 μg/mL，抗体稀释倍数为 16000，二抗稀释倍数为 10000，一抗、二抗孵育时间和显色时间分别为 15、30、10 min 时，建立的 cELISA 方法半数抑制浓度为 1.12 ng/mL，最低检测限为 0.028 ng/mL。该方法与维生素 B_1、B_2、烟酸等 B 族维生素无交叉反应，特异性良好，与叶酸结构类似物二氢叶酸、四氢叶酸、蝶酸的交叉反应率分别为 12.21%、2.07% 和 2.72%，检测牛奶和能量饮料样品的加标回收率分别为 88.32%~94.12% 和 88.00%~93.29%，初步应用于复合 B 族维生素片和婴幼儿奶粉中叶酸含量的检测一致率分别为 102.01%~114.72% 和 99.04%~111.62%，相对标准偏差均小于 5%。本研究为快速检测叶酸含量提供了一种灵敏、特异、准确的方法，能够提高现场检测效率，对于营养强化剂含量的快速检测方法研究具有参考价值。

关键词: 叶酸, 单克隆抗体, 酶联免疫吸附试验, 应用

中图分类号: TS207.3　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1002−0306(2026)01−0339−09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2024120390　　本文网刊:

Establishment and Preliminary Application of Highly Sensitive Competitive ELISA for Folic Acid

WANG Yao[1,*], LI Yanfei[1], CAO Jinbo[2], YANG Xiyan[1], HUANG Jiaxiang[1], HUANG Mingyue[1], HAN Lu[1], WANG Kaile[1], CHEN Xiujin[1], LI Zhaozhou[1], ZHANG Min[1], KANG Huaibin[1,*]

(1.College of Food and Bioengineering/Henan International Joint Laboratory of Food Green Processing and Quality Safety Control, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China;
2.College of Chemistry, South China Normal University, Guangzhou 510000, China)

Abstract: In order to achieve high sensitivity and rapid detection of folic acid, this study established a highly sensitive competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) by preparing folic acid monoclonal antibody and optimizing the detection system. The results showed that when the concentration of coated antigen was 0.5 μg/mL, the dilution of antibody was 16000 times, and the dilution of secondary antibody was 10000 times, and the incubation time of primary antibody and secondary antibody and color development time were 15, 30, and 10 min, respectively, the established

收稿日期: 2024−12−30

基金项目: 国家自然科学基金项目（31702218）; 国家级大学生创新训练计划项目（202410464052）; 河南省高校青年骨干教师培养计划（2023GGJS046）; 河南省科技攻关项目（242102321131）; 河南省研究生教育改革与质量提升工程项目（HNYJS2020JD06）; 河南科技大学大学生创新创业训练计划项目（2024209）。

作者简介/通信作者*: 王耀（1986−）, 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全快速检测, E-mail: wangyao@haust.edu.cn。

*** 通信作者:** 康怀彬（1963−）, 男, 硕士, 教授, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: khbin001@163.com。

cELISA method had half inhibition concentration of 1.12 ng/mL, and the limit of detection of 0.028 ng/mL. The method had good specificity and no cross-reaction with vitamin B_1, B_2, niacin and other B vitamins, the cross-reaction rates of dihydrofolic acid, tetrahydrofolic acid and pteric acid were 12.21%, 2.07% and 2.72%, respectively. The recoveries of milk and energy drink samples were 88.32%~94.12% and 88.00%~93.29%, respectively. The consistency rates of folic acid content in B complex vitamin tablets and infant milk powder were 102.01%~114.72% and 99.04%~111.62%, respectively, with relative standard deviation less than 5%. This study provides a sensitive, specific and accurate method for the rapid detection of folic acid content, which can improve the efficiency of field detection, and has a reference value for the rapid detection method of nutrient fortification content.

Key words: folic acid; monoclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; application

叶酸(Folic acid, FA)也称蝶酰谷氨酸, 是一种重要的水溶性维生素(VB_9), 广泛存在于绿叶植物中[1]。FA 在 DNA 合成、红细胞生成和神经系统发育等过程中发挥着关键作用[2−3], 也常作为食品营养强化剂添加到多种食品中, 以预防 FA 缺乏引发的健康问题[4]。FA 的缺乏可导致巨幼红细胞性贫血、白细胞减少、心脑血管疾病等多种疾病[5−6]。特别是对于孕妇, FA 的补充在预防胎儿神经管畸形方面具有重要意义[7]。因此, 适当的 FA 摄入对于不同人群, 尤其是孕妇和婴幼儿的健康至关重要。世界卫生组织(WHO)推荐 FA 剂量为 400 μg/d, 哺乳期妇女建议应补充 FA 至产后 3 个月[8]。我国的 FA 推荐摄入量根据不同人群进行具体规定, 如成人 400 μg/d, 孕妇 600 μg/d, 婴幼儿 117 μg/d, 乳母 550 μg/d 等[9]。在食品中, FA 的添加也有严格标准, 如 GB 14880-2012《食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准》规定, 儿童用调制乳粉和孕产妇用调制乳粉中 FA 的添加水平应分别为 420~3000 μg/kg 和 2000~8200 μg/kg[10]。然而, 过量摄入 FA 也可能引发健康问题, 例如影响锌的代谢, 导致维生素 B_{12} 缺乏, 甚至引发孕妇的惊厥等症状[11−12]。因此, 需开发出灵敏准确的 FA 快速检测方法, 以保障食品中 FA 含量的高效监测。

目前, FA 的检测方法主要包括微生物法[13]、液相色谱串联质谱法[14]、高效液相色谱串联质谱法[15]等, 这些方法虽然具有较高的灵敏度和准确度, 但存在操作复杂、样品预处理繁琐、无法进行高通量快速筛查等缺点, 限制了其在大批量食品样品的现场检测中应用。酶联免疫吸附试验(ELISA)是通过抗原抗体的特异性结合以及抗体或者抗原上标记的酶催化特定底物发生显色反应, 实现目标物检测的免疫分析方法, 其涵盖了夹心法、间接法和竞争法等多种检测机制, 能够适应不同类型的样品检测[16−17]。ELISA 由于具有简便、灵敏和特异等特性, 已逐渐成为 FA 快速检测的主要方法之一。有研究通过制备多克隆抗体(Polyclonal antibody, pAb), 建立 FA 的纳米酶联免疫吸附试验方法[18]; 也有研究通过制备单克隆抗体(Monoclonal antibody, mAb), 研制出 ELISA 检测试剂盒[19]。但已有方法均只进行了加标回收试验, 并未在含有 FA 的实际样品中进行检测应用, 且灵敏度有待提高。

本研究利用免疫原性较强的钥孔血蓝蛋白(Keyhole limpet hemocyanin, KLH)合成人工抗原并免疫 BALB/c 小鼠, 制备免疫学特性良好的 mAb。基于竞争原理, 通过优化检测体系, 建立了高灵敏竞争酶联免疫吸附试验(Competitive enzyme-linked immunosorbent assay, cELISA)方法, 并且应用于牛奶、能量饮料、复合维生素片和婴幼儿奶粉中 FA 含量的快速检测, 为食品中 FA 含量的灵敏准确检测提供了有效技术手段。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

FA、二氢叶酸(DHF)、四氢叶酸(THF)、蝶酸、维生素 B_1(VB_1)、维生素 B_2(VB_2)、烟酸(VB_3)、泛酸(VB_5)、维生素 B_6(VB_6)、KLH、鸡卵清蛋白(OVA)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、N-羟基丁二酰亚胺(NHS) 上海麦克林生化科技有限公司; 弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA)、聚乙二醇-1500(PEG-1500) 美国 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基 12100 北京索莱宝科技有限公司; Goat Anti-Mouse IgG HRP(GaMIgG-HRP, 以下简称二抗) 美国 Jackson ImmunoResearch 公司; 二甲基亚砜(DMSO) 色谱纯, 天津市德恩化学试剂有限公司; 96 孔聚苯乙烯酶标板(ELISA 板) 海门施海英实验分析仪器经营部; 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 3 只(体重约 18 g, 生产许可证号: SCXK(豫)2020-0005) 河南斯克贝斯生物科技股份有限公司。

Multiskan FC 型酶标仪、3111 型 CO_2 培养箱 美国 Thermo 公司; UV-2600 紫外可见分光光度计 日本岛津有限公司; H1650R 台式高速冷冻离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; Vortex 1 涡旋混合机 德国 IKA 公司; JJ224BF 型电子分析天平 德国 Sartorius 公司; MS-H280-Pro LED 数显加热型磁力搅拌器 大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人工抗原合成与鉴定 采用碳二亚胺法[20]将 FA 标准品分别与载体蛋白 KLH、OVA 偶联合成 FA-KLH、FA-OVA 人工抗原。3 mg FA 溶解于 150 μL DMSO, 再加入 2.43 mg EDC 和 1.5 mg NHS, 在磁力搅拌器上室温避光活化 4~5 h。称量

3.16 mg KLH 溶解于 3 mL 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(CBS, pH9.6)中, 然后将活化后的反应液滴加到 KLH 溶液中。在磁力搅拌器上室温避光反应 5 h 后, 用 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.4)透析 3 d, 每天更换两次透析液。透析完成后 3000 r/min, 离心 10 min, 取上清, −20 ℃ 贮存备用。FA-OVA 人工抗原以相同方法制备。

将质量浓度一致的 FA、KLH、OVA、FA-KLH、FA-OVA 溶液, 采用 UV-2600 紫外可见分光光度计在波长 200~400 nm 范围内进行扫描鉴定, 比较 FA-KLH、FA-OVA 与 FA、KLH、OVA 的特征峰, 初步鉴定 FA 与载体蛋白是否成功偶联。

1.2.2　单克隆抗体的制备与鉴定　单克隆抗体制备过程中动物饲养和实验按照学校医学伦理委员会审查进行, 严格遵守实验动物福利伦理规范。将免疫原 FA-KLH 采用背部皮下注射的方法免疫 3 只雌性 BALB/c 小鼠, 首次免疫剂量为 50 μg/200 μL/只, 每间隔 14 d 后进行加强免疫, 将 FCA 替换为 FIA, 免疫剂量与首次免疫相同。在第 4 次加强免疫 10 d 后采集小鼠尾尖静脉血, 获得 FA 多抗血清(Polyclonal antibody serum, pAbs)。通过多抗血清的鉴定, 来验证人工抗原的合成效果, 并选择血清效价和敏感性最好的小鼠进行冲击免疫, 以 100 μg/只的剂量与无菌 PBS 等体积混合。冲击免疫 3 d 后, 在无菌条件下制备小鼠的脾细胞, 使用 PEG-1500 将脾细胞和 SP2/0 细胞进行细胞融合, 通过阳性孔的筛选和有限稀释法进行亚克隆, 筛选出具有抗 FA 的单克隆杂交瘤细胞株[21]。以细胞接种量为 5×10^5 个/1 mL/只, 腹腔注射到提前用灭菌液体石蜡处理的 2 只 BALB/c 小鼠体内[22], 5 d 后采集腹水。采用饱和硫酸铵法[23] 纯化得到 mAb。

采用间接 ELISA(Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, iELISA)方法测定抗体效价[24], 将 FA-OVA 作为包被原包被 ELISA 板, 通过加入不同稀释倍数的抗体(设立空白孔)进行检测, 在酶标仪中读取 450 nm 处的吸光值(OD_{450})。当待测孔 OD_{450} 大于空白孔 OD_{450} 的 2.1 倍, 则判定为阳性孔, 以阳性孔最小 OD_{450} 所对应的抗体稀释倍数作为抗体效价。敏感性鉴定是通过梯度加入不同稀释倍数的 FA 标准品, 再加入一定稀释浓度的抗体(效价测定时 OD_{450} 为 1.2 左右), 并设阳性孔和空白孔[25]。绘制抗体对 FA 的标准抑制曲线, 以 B/B_0 为纵坐标(B 是不同质量浓度 FA 所对应的 OD_{450}, B_0 是 FA 质量浓度为 0 时的 OD_{450}), 以 FA 质量浓度的对数值为横坐标。最后由标准曲线回归方程计算抗体对 FA 的 IC_{50}, 并以此来评价抗体的敏感性。

1.2.3　检测体系的优化　采用棋盘法确定最佳抗原包被浓度和抗体稀释倍数。用 CBS 溶液将包被原 FA-OVA 分别稀释至 0.125、0.25、0.5、1、2、4 μg/mL 进行包被。采用 iELISA 和 cELISA 方法分别测定 6 个包被浓度下抗体的效价及敏感性, 以 IC_{50} 值最低的一组所对应的抗原包被浓度和抗体稀释浓度为最佳工作浓度。

基于确定的最佳工作浓度, 进一步确定二抗稀释倍数、一抗孵育时间、二抗孵育时间和显色时间。二抗稀释倍数以 5000、8000、10000、12000、15000 倍稀释, 一抗、二抗孵育时间和显色时间设定为 15、30 和 10 min; 确定二抗稀释倍数后, 按照以上条件, 参照实验室常用工作时间, 分别设置一抗孵育时间 15、20、25 min, 二抗孵育时间 15、30、45 min, 显色时间 5、10、15 min 进行优化[26−27]。以 IC_{50} 值最低所对应的稀释倍数或工作时间为最佳工作条件。

1.2.4　灵敏度鉴定　在上述优化条件下, 测定不同质量浓度的 FA 进行方法灵敏度鉴定。以抑制率 B/B_0 为纵坐标, 以 FA 质量浓度的对数值为横坐标, 绘制 cELISA 标准抑制曲线。通过曲线计算得到 IC_{50} 和检测范围(IC_{10}~IC_{90})。对不含 FA 的空白样品重复检测 10 次, 计算其平均值($\overline{X}$)以及标准偏差(SD), 然后将 $\overline{X}-2SD$ 值代入建立的 cELISA 标准曲线方程, 根据公式计算得出检测限(LOD), 以此评价该方法的灵敏度。

1.2.5　精密度鉴定　取不同批次和同一批次包被的 ELISA 板, 利用所建立的 cELISA 法进行检测, 绘制标准曲线, 计算 IC_{50} 值和阳性孔 OD_{450} 的批间和批内变异系数(Coefficient of variation, CV)[28]。通过批间和批内 CV 进行精密度鉴定, CV 值越低, 精密度越高。

1.2.6　特异性鉴定　通过测定与 FA 类似物及其它 B 族维生素的交叉反应率(Cross reactivity rate, CR)[29] 进行特异性鉴定。利用建立的 cELISA 方法分析 DHF、THF、蝶酸、VB_1、VB_2、VB_3、VB_5、VB_6。依据公式 $CR(\%)=IC_{50}(FA)/IC_{50}(其它化合物)\times100$, 计算 CR 值, CR 值越小, 说明 FA 与其交叉反应越小, 抗体的特异性越好。

1.2.7　准确度鉴定　将不含 FA 的牛奶和能量饮料样品中添加不同浓度的 FA 标准品溶液, 进行加标回收试验。牛奶样品经过热处理(100 ℃)10 min, 室温下 8000 r/min, 离心 10 min, 去除上层脂肪取上清; 能量饮料样品通过 0.2 μm 的过滤膜, 去除样品中的颗粒物。用 PBS 溶液将牛奶和能量饮料样品分别稀释 5、10、15、20 倍后按照建立的 cELISA 方法对样品分析。通过对比建立的基质曲线和标准曲线, 选取基质影响基本消除的稀释倍数进行后续实验。经过处理的牛奶和能量饮料样品溶液, 分别配制成 0.5、1.0、2.0 ng/mL 三个浓度的 FA 溶液, 利用建立的 cELISA 方法进行检测, 以平均回收率和相对标准偏差(Relative standard deviation, RSD)鉴定方法准确度。

1.2.8　实际样品检测的初步应用　FA 在食品中通常作为营养强化剂用于调制乳粉中, 也用于固体饮料等

其他食品。根据婴幼儿奶粉和复合 B 族维生素片产品标明的 FA 含量，婴幼儿奶粉中每 100 g 含 90 μg 的 FA，复合 B 族维生素片中每 1.8 g 含 260 μg 的 FA。将婴幼儿奶粉用纯水溶解，超声 5 min，热处理（100 ℃）10 min，室温下 8000 r/min，离心 10 min，取上清[30]，配制 5 mg/mL 的婴幼儿奶粉溶液，其所含 FA 的浓度为 4.5 ng/mL；将复合 B 族维生素片研磨成粉末状，用 0.1 mol/L NaOH 溶液溶解，室温下 8000 r/min，离心 10 min，取上清，配制 100 μg/mL 的复合 B 族维生素溶液，其所含 FA 的浓度为 14.5 ng/mL。将上述样品按照建立的 cELISA 方法检测，计算得出 FA 检测值，与样品实际标明的 FA 含量进行对比，通过检测一致率（检测值/实际值×100）和 RSD 验证方法用于实际样品检测的有效性和准确性。

1.3 数据处理

在实验数据中所有未标明数据均为 3 次平行实验结果。数据采用 Microsoft Office 2021 软件进行处理，使用 Origin 2022 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体的制备与鉴定

2.1.1 人工抗原的紫外鉴定 高免疫原性抗原的合成是制备高亲和力 mAb 的关键，KLH 比牛血清白蛋白（BSA）有更高的免疫原性[31−32]。本研究选择 KLH 和 OVA 作为免疫原和包被原的偶联蛋白，合成人工抗原 FA-KLH 和 FA-OVA，经紫外分光光度计鉴定结果如图 1 所示，FA 的吸收峰在 280 nm 和 365 nm 处，人工抗原 FA-KLH 和 FA-OVA 在 280 nm 的吸光度比载体蛋白 KLH 和 OVA 增大 4.6 倍和 4.8 倍，并在 365 nm 处出现特征峰，初步表明人工抗原合成成功。

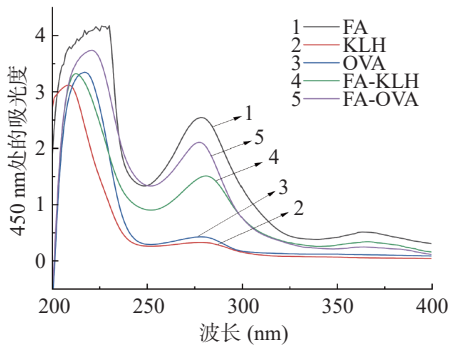


图 1 FA 人工抗原紫外扫描图谱

Fig.1 Ultraviolet scanning of FA artificial antigens

2.1.2 抗体的制备与鉴定 采用 iELISA 方法检测 FA pAbs 的效价，结果如表 1 所示，用 FA-KLH 免疫小鼠可以刺激小鼠产生抗体，免疫的 3 只小鼠多抗血清效价均在 1∶64000 以上，进一步表明 FA 人工抗原合成成功，且具有较好的免疫效果。经过 4 次加强免疫后 FA 对抗体的抑制效果显著，其中 3 号小鼠的抑制效果最好。如图 2 所示，3 号小鼠的线性回归方程为 y=−0.363x+0.920，R^2=0.908，IC_{50} 为 14.35 ng/mL。

表 1 pAbs 效价测定结果

Table 1 Results of pAbs titer determination

小鼠编号	血清稀释倍数(×10³)											空白
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	
1	3.110	2.155	1.238	0.700	0.401	0.217	0.126	0.085	0.067	0.060	0.054	0.054
2	2.997	2.350	1.261	0.672	0.399	0.218	0.131	0.086	0.065	0.057	0.056	0.049
3	3.280	2.246	1.166	0.681	0.358	0.201	0.127	0.084	0.065	0.057	0.051	0.047

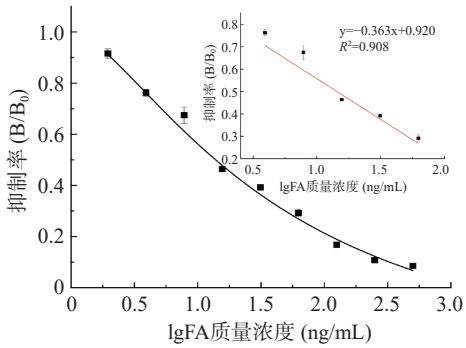


图 2 3 号小鼠敏感性鉴定

Fig.2 Sensitivity identification of mouse No.3

冲击免疫 3 号小鼠后，将小鼠脾细胞和 SP2/0 细胞进行融合。在 HAT 培养基培养 7 d 后，取每孔细胞上清，用 iELISA 筛选出强阳性孔（OD_{450}>2.0），用 cELISA 对强阳性孔进一步筛选，使用有限稀释法对筛选出抑制效果好的强阳性孔进行亚克隆。最终获得了杂交瘤细胞株 11A6-1A4，经诱生腹水法获得了 FA-mAb，其效价为 2.56×10⁵。

2.2 检测体系的优化

通过棋盘实验来确定抗原包被浓度和抗体稀释倍数，由表 2 和图 3 可以看出，当抗原包被浓度为 0.5 μg/mL，抗体稀释倍数为 16000 时，IC_{50} 最低，敏感性最好，最终确定此包被浓度和抗体稀释倍数为最佳工作浓度。

表 2 抗原包被浓度和抗体稀释倍数的优化

Table 2 Optimization of antigen coating concentration and antibody dilution

抗体稀释倍数(×10³)	包被浓度(μg/mL)					
	0.125	0.25	0.5	1	2	4
4	2.435	2.716	2.940	3.326	3.473	3.511
8	1.523	1.836	2.230	2.361	2.443	2.764
16	0.930	1.138	1.580	1.654	1.774	1.848
32	0.486	0.636	0.895	0.990	0.97	1.084
64	0.366	0.438	0.556	0.558	0.576	0.698
128	0.203	0.297	0.315	0.328	0.343	0.372
256	0.131	0.153	0.211	0.212	0.214	0.212
空白	0.048	0.046	0.056	0.057	0.064	0.076

根据 1.2.3 中确定的反应条件，对二抗稀释倍数、一抗孵育时间、二抗孵育时间和显色时间进行优化，以 IC_{50} 值最低所对应的稀释倍数和工作时间为

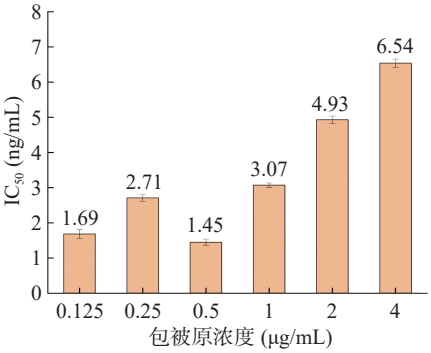


图 3　不同包被原浓度下的 IC_{50}

Fig.3　IC_{50} at different coated concentration

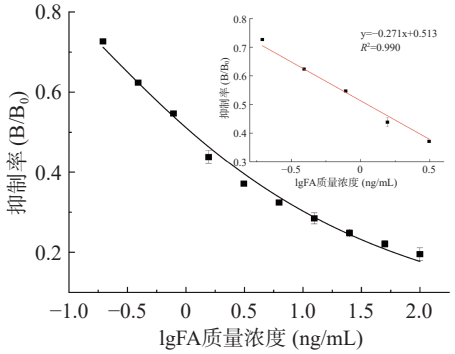


图 5　cELISA 标准曲线

Fig.5　Standard curve of cELISA

最佳工作条件。如图 4(a)所示，当二抗稀释倍数为 10000 时，IC_{50} 值最小。如图 4(b)所示，当一抗孵育时间为 15 min 时，IC_{50} 值最小。如图 4(c)所示，当二抗孵育时间为 30 min 时，IC_{50} 值最小。如图 4(d)所示，当显色时间为 10 min 时，IC_{50} 值最小。因此，最终确定二抗稀释倍数为 10000 倍，一抗孵育时间为 15 min，二抗孵育时间为 30 min，显色时间为 10 min。

2.3　灵敏度鉴定

通过确定最佳包被浓度、抗体稀释倍数、二抗稀释倍数、一抗孵育时间、二抗孵育时间和显色时间，建立了 cELISA 方法。方法标准抑制曲线如图 5 所示，线性方程为 y=−0.271x+0.513，R^2=0.990，IC_{50} 为 1.12 ng/mL，检测范围为 0.037~33.42 ng/mL，检测不含 FA 的空白样品得到 LOD 为 0.028 ng/mL，具有高灵敏度。

2.4　精密度鉴定

采用 cELISA 法对不同批次和同一批次包被的 ELISA 板分别测定 IC_{50} 值。结果如表 3 所示，批间 IC_{50} 值和阳性孔 OD_{450} 的 CV 分别为 7.184% 和 5.963%，批内 IC_{50} 值和阳性孔 OD_{450} 的 CV 分别为 6.192% 和 6.784%，均小于 10%，说明所建立的 cELISA 方法具有良好的精密度。

2.5　特异性鉴定

采用 cELISA 法分析 FA 类似物及其它 B 族维生素的交叉反应率，结果如表 4 所示，由于类似物 DHF、THF、蝶酸与 FA 在蝶呤环和对氨基苯甲酸部分结构相似[33]，导致抗体存在一定的交叉反应，交叉反应率分别为 12.21%、2.07% 和 2.72%，但这三种物质不作为食品添加剂使用，不影响实际样品中 FA 的检测结果；与 VB_1、VB_2、VB_3、VB_5、VB_6 无交叉反应，表明在检测过程中 FA 抗体对非目标物的亲和力较低，特异性较好，可有效排除其它物质干扰。

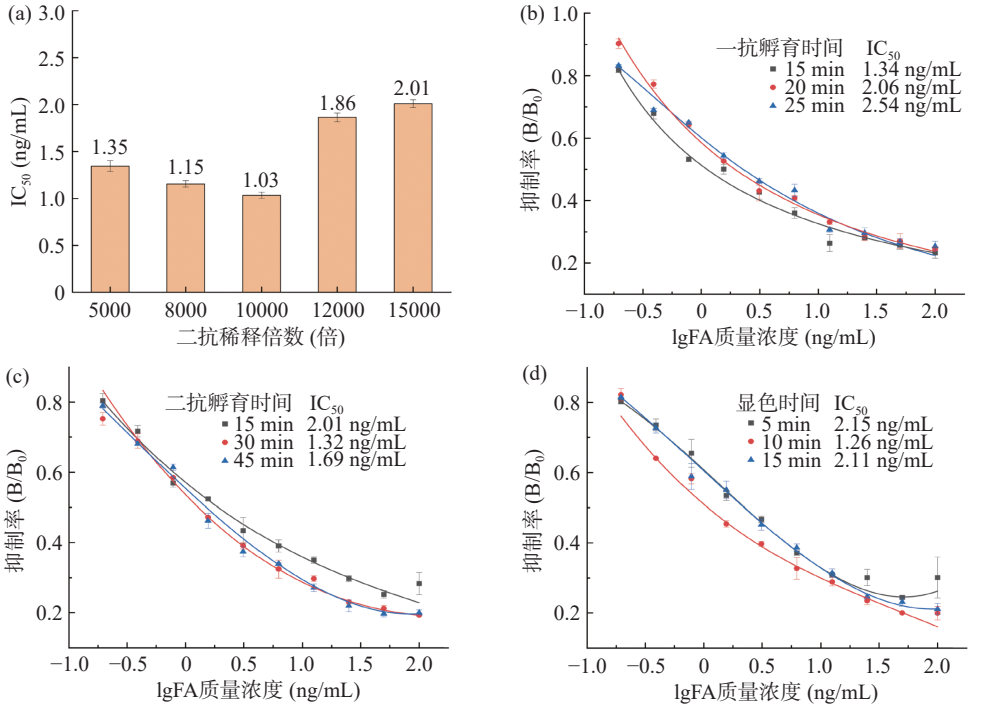


图 4　cELISA 检测体系的优化

Fig.4　Optimization of experimental conditions of cELISA

注：(a)二抗稀释倍数的优化；(b)一抗孵育时间的优化；(c)二抗孵育时间的优化；(d)显色时间的优化。

表 3 cELISA 精密度鉴定

Table 3 Precision identification of cELISA

批间精密度(n=3)			批内精密度(n=3)		
批号	IC_{50}(ng/mL)	OD_{450}	平行	IC_{50}(ng/mL)	OD_{450}
1	1.25	1.174	1	1.14	1.035
2	1.39	1.033	2	1.22	1.177
3	1.15	1.040	3	1.10	0.990
4	1.33	1.084	4	1.30	1.105
5	1.31	0.989	5	1.26	1.064
6	1.40	0.995	6	1.19	0.992
平均值	1.31	1.053	平均值	1.19	1.077
CV(%)	7.184	5.963	CV(%)	6.192	6.784

2.6 准确度鉴定

牛奶样品中含有大量的蛋白质、脂肪、维生素和矿物质等，基质成分复杂。这些基质成分在 ELISA 检测过程中会干扰抗原和抗体的结合反应，从而影响检测结果的准确性。牛奶和能量饮料样品经过处理后分别稀释 5、10、15、20 倍，按照建立的 cELISA 方法绘制其标准曲线。如图 6 所示，牛奶和能量饮料样品在 5、10、15、20 倍稀释下的 IC_{50} 分别为 1.81、1.44、1.17、1.52 ng/mL 和 2.56、1.29、1.36、1.61 ng/mL。结果表明，牛奶和能量饮料样品分别在 15 倍和 10 倍稀释下与 cELISA 条件下的 IC_{50} 最为接近，且标准曲线基本吻合。因此，最终确定将牛奶和能量饮料样品经过前处理后使用 PBS 溶液稀释 15 倍和 10 倍以消除其基质干扰。

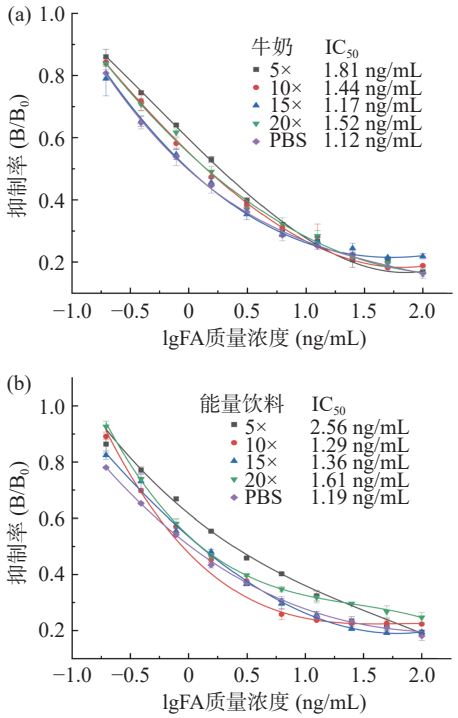


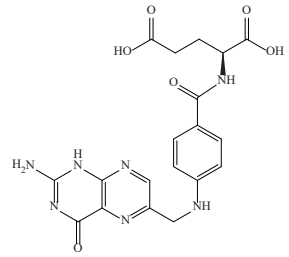
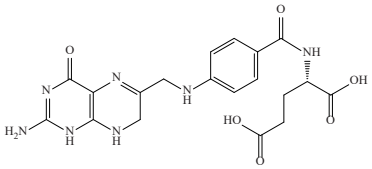
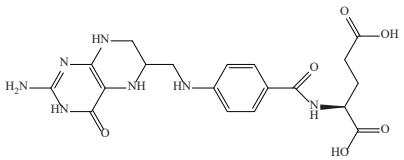
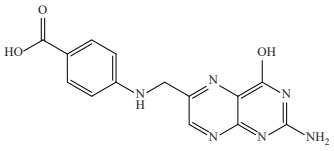
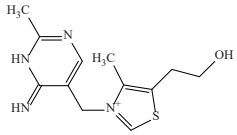
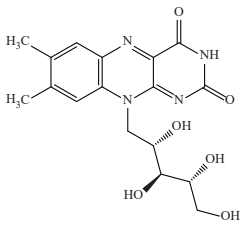
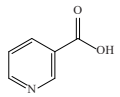
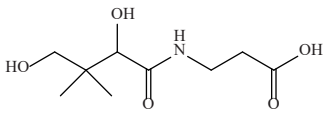
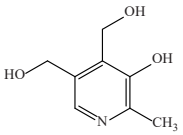
图 6 牛奶(a)和能量饮料(b)样品基质效应消除

Fig.6 Elimination of sample matrix effects in milk (a) and energy drink (b)

牛奶和能量饮料样品溶液中 FA 加标回收试验结果如表 5 所示，牛奶和能量饮料样品溶液中 FA 的回收率范围分别为 88.32%~94.12% 和 88.00%~93.29%，RSD 分别为 1.26%~5.99% 和 2.71%~7.23%，说明建立的 cELISA 方法具有较高的准确度。

表 4 cELISA 特异性鉴定

Table 4 Specificity identification of cELISA

化合物	结构	IC_{50} (ng/mL)	CR (%)
FA		1.12	100
DHF		9.17	12.21
THF		54.08	2.07
蝶酸		41.12	2.72
VB_1		>10^4	<0.02
VB_2		>10^4	<0.02
VB_3		>10^4	<0.02
VB_5		>10^4	<0.02
VB_6		>10^4	<0.02

2.7 cELISA 方法的初步应用

由表 6 可知，复合 B 族维生素溶液中所含 FA 的浓度为 14.791~16.634 ng/mL，与所含浓度 14.5 ng/mL 相比，检测一致率为 102.01%~114.72%，RSD 为 4.60%；婴幼儿奶粉溶液中所含 FA 的浓度

表 5　加标回收试验结果

Table 5　Recovery experiment results

实际样品	添加值（ng/mL）	检测值（ng/mL）	回收率（%）	RSD（%）
牛奶	0.5	0.44±0.03	88.32±5.3	5.99
	1.0	0.86±0.02	86.33±2.1	2.41
	2.0	1.88±0.02	94.12±1.2	1.26
能量饮料	0.5	0.45±0.03	90.39±6.5	7.23
	1.0	0.88±0.03	88.00±2.6	3.01
	2.0	1.87±0.05	93.29±2.5	2.71

为 4.457~5.023 ng/mL，与所含浓度 4.5 ng/mL 相比，检测一致率为 99.04%~111.62%，RSD 为 4.79%。因此，所建立的 cELISA 方法能够有效应用于实际样品中 FA 含量的检测，且具有较高的准确性。将本方法与现有文献报道其它检测方法的检测性能进行比较，如表 7 所示，本方法灵敏度高，检测限达到 0.028 ng/mL，不需要复杂的仪器设备即可进行痕量分析，在资源有限或现场快速检测的情况下具有显著优势，对于提高 FA 含量的检测效率具有实际意义。

表 6　cELISA 检测复合 B 族维生素片和婴幼儿奶粉

Table 6　Determination of complex vitamin B tablets and infant milk powder by cELISA

实际样品	实际样品的OD_{450}	阴性孔的OD_{450}	$OD_{实}/OD_{阴}$	浓度（ng/mL）	检测一致率(%)	RSD（%）
复合B族维生素片	0.206	1.099	0.187	15.959	110.06	4.60
	0.186	0.949	0.196	14.791	102.01	
	0.167	0.911	0.183	16.520	113.93	
	0.201	1.102	0.182	16.634	114.72	
	0.178	0.948	0.188	15.812	109.05	
婴幼儿奶粉	0.361	1.086	0.332	4.655	103.44	4.79
	0.285	0.871	0.327	4.853	107.84	
	0.324	1.003	0.323	5.023	111.62	
	0.334	0.991	0.337	4.457	99.04	
	0.318	0.977	0.325	4.940	109.78	

表 7　其它检测方法与本方法的比较

Table 7　Comparison between other detection methods and this method

检测方法	检测范围	IC_{50}	检测限	实际样品	检测时间	文献
化学发光法	5.0~150.0 mg/L	*	1.3 mg/L	叶酸片、人体尿液	120 min	[34]
比色传感检测法	40~260 nmol/L	*	22 nmol/L	叶酸片、人血清和尿液	*	[35]
荧光分析法	4~20 μg/mL	*	0.17 μg/mL	叶酸片	15 min	[36]
电化学传感检测法	5.0~600 μmol/L	*	2.0 μmol/L	叶酸片、菠菜、芹菜、苹果	50 min	[37]
icELISA法	1~100 ng/mL	15.0 ng/mL	3.0 ng/mL	牛奶、奶粉、能量饮料	75 min	[38]
ELISA法	1~81 μg/L	3.0 μg/L	10.0 μg/L	牛奶	45 min	[19]
ELISA法	2.5~100 ng/mL	*	2.22 ng/mL	牛奶	75 min	[39]
FLISA法	2~47 ng/mL	24 ng/mL	0.1 ng/mL	果汁	120 min	[40]
本方法	0.037~33.42 ng/mL	1.12 ng/mL	0.028 ng/mL	牛奶、能量饮料、婴幼儿奶粉、维生素片	55 min	本方法

注：“*”表示参考文献中未提及。

3　结论

抗体是建立免疫分析方法的关键试剂，本研究以 FA-KLH 作为免疫原，通过动物免疫制备出了高效价和高敏感性的 mAb，通过优化检测体系，成功建立了 cELISA 方法。本方法实现了对 FA 的高灵敏快速检测，IC_{50} 为 1.12 ng/mL，LOD 为 0.028 ng/mL，检测范围为 0.037~33.42 ng/mL。经鉴定，cELISA 方法具有良好的精密度，与 FA 结构类似物 DHF、THF、蝶酸的交叉反应率分别为 12.21%、2.07% 和 2.72%，与其他 B 族维生素无交叉反应，特异性良好。牛奶和能量饮料样品的加标回收率分别为 88.32%~94.12% 和 88.00%~93.29%，RSD 分别为 1.26%~5.99% 和 2.71%~7.23%，复合 B 族维生素溶液和婴幼儿奶粉溶液中的 FA 含量检测一致率分别为 102.01%~114.72% 和 99.04%~111.62%，RSD 分别为 4.60% 和 4.79%。本方法具有灵敏、快速、准确等优势，而且能够应用于含有 FA 的实际样品检测，对于提高 FA 含量检测效率具有实际意义。尽管本研究在 FA 的高灵敏快速检测方面取得了一定进展，但对于复杂样品基质效应的消除需要进一步探索与改进，以应用于更多实际样品的检测。

© 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] WU Xiaoling, CHEN Xi, GAO Fengli, et al. SERS encoded nanoparticle heterodimers for the ultrasensitive detection of folic acid[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 75: 55−58.

[2] TAMENE A, KARILUOTO S, BAYE K, et al. Quantification of folate in the main steps of traditional processing of tef Injera, a cereal based fermented staple food[J]. Journal of Cereal Science, 2019, 87: 225−230.

[3] CHOU Y F, YU C C, HUANG R S. Changes in mitochondrial DNA deletion, content, and biogenesis in folate-deficient tissues of young rats depend on mitochondrial folate and oxidative DNA injuries[J]. The Journal of Nutrition, 2007, 137(9): 2036−2042.

[4] ZWART N R K, FRANKEN M D, TISSING W J E, et al. Folate, folic acid, and chemotherapy-induced toxicities: A systematic literature review[J]. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2023, 188: 104061.

[5] SKÓRKA A, GIERUSZCZAK-BIAŁEK D, PIEŚCIK M, et al. Effects of prenatal and/or postnatal (maternal and/or child) folic acid supplementation on the mental performance of children[J].

Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2012, 52(11): 959−964.
[6] CARBONI L. Active folate versus folic acid: The role of 5-MTHF (methylfolate) in human health[J]. Integrative Medicine, 2022, 21(3): 36−41.
[7] HOEGGER D, MORIER P, VOLLET C, et al. Disposable microfluidic ELISA for the rapid determination of folic acid content in food products[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2007, 387(1): 267−275.
[8] OBEID R, SCHÖN C, WILHELM M, et al. The effectiveness of daily supplementation with 400 or 800 μg/day folate in reaching protective red blood folate concentrations in non-pregnant women: A randomized trial[J]. European Journal of Nutrition, 2018, 57(5): 1771−1780.
[9] 李文, 汪求真, 马爱国, 等. 膳食叶酸参考摄入量研究进展[J]. 营养学报, 2023, 45(4): 326−330. [LI Wen, WANG Qiuzhen, MA Aiguo, et al. Research progress in dietary reference intake of folic acid[J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2023, 45(4): 326−330.]
[10] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准: GB 14880-2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. [Ministry of Health of the People's Republic of China. National food safety standard for the usage of nutrition enrichment: GB 14880-2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.]
[11] XU Xiguang, ZHANG Ziyu, LIN Yu, et al. Risk of excess maternal folic acid supplementation in offspring[J]. Nutrients, 2024, 16(5): 755.
[12] SHAH T, JOSHI K, MISHRA S, et al. Molecular and cellular effects of vitamin B_{12} forms on human trophoblast cells in presence of excessive folate[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2016, 84: 526−534.
[13] 陈琼, 王子威, 辛博, 等. 微生物法测定特殊食品中叶酸含量的研究[J]. 食品科技, 2023, 48(1): 240−245. [CHEN Qiong, WANG Ziwei, XIN Bo, et al. Determination of folate content in special foods by microbial method[J]. Food Science and Technology, 2023, 48(1): 240−245.]
[14] LI Juan, HU Wenchao, LIU Mengxue, et al. Simultaneous determination of folic acid photolysis products and oxidized guanine derivatives in plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Separation Science, 2024, 47(7): e2300763.
[15] SIDDIQUI B, AHMED H, HAQ I U, et al. Development and validation of HPLC method for simultaneous determination of Leflunomide and folic acid in the nanoparticulate system by reversed-phase HPLC[J]. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2023, 49(8): 497−507.
[16] NADERI N, HOUSE J D. Recent developments in folate nutrition[J]. Advances in Food and Nutrition Research, 2018, 83: 195−213.
[17] ZHANG Yao, WANG Ting, ZHANG Pengfei, et al. Facile construction of sandwich ELISA based on double-nanobody for specific detection of α-hemolysin in food samples[J]. Talanta, 2024, 274: 126021.
[18] PAN Junkang, HE Qiyi, LAO Zhiting, et al. A bifunctional immunosensor based on osmium nano-hydrangeas as a catalytic chromogenic and tinctorial signal output for folic acid detection[J]. Analyst, 2022, 147(1): 55−65.
[19] 刘小军, 冯才伟, 冯静, 等. 一种叶酸的酶联免疫快速检测试剂盒的研制[J]. 食品工业科技, 2013, 34(23): 303−306,310. [LIU Xiaojun, FENG Caiwei, FENG Jing, et al. Study on the folic acid enzyme linked immunosorbent assay kit for rapid detection[J]. Science and Technology of Food Industry, 2013, 34(23): 303−306,310.]
[20] HAN Li, LI Yuetao, JIANG Jinqing, et al. Comparison of synthetic methods and identification of several artificial antigens of deoxynivalenol[J]. Molecules, 2023, 28(6): 2789.
[21] 孙亚宁, 李青梅, 杨苏珍, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 方法建立[J]. 中国兽医学报, 2021, 41(4): 689−696. [SUN Yaning, LI Qingmei, YANG Suzhen, et al. Preparation of monoclonal antibody against deoxynivalenol and establishment of indirect competitive ELISA[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2021, 41(4): 689−696.]
[22] YUAN Meifang, XIONG Zhijuan, FANG Bolong, et al. Preparation of an antidanofloxacin monoclonal antibody and development of immunoassays for detecting danofloxacin in meat[J]. ACS Omega, 2020, 5(1): 667−673.
[23] DUAN Yaping, LUO Jiaoyang, LIU Congmin, et al. Rapid identification of triptolide in *Tripterygium wilfordii* products by gold immunochromatographic assay[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 168: 102−112.
[24] 曹金博, 王耀, 胡骁飞, 等. 免疫分析技术在四环素类抗生素残留检测中的应用[J]. 饲料工业, 2019, 40(12): 53−59. [CAO Jinbo, WANG Yao, HU Xiaofei, et al. The application of immunoassay technique in the detection of tetracycline antibiotics residue[J]. Feed Industry, 2019, 40(12): 53−59.]
[25] ZENG Lu, JIANG Wei, LIU Liqiang, et al. Development of ic-ELISA and lateral-flow immunochromatographic strip for detection of vitamin B_2 in an energy drink and vitamin tablets[J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 121−132.
[26] WANG Yao, CAO Jinbo, SUN Yaning, et al. Development and validation of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for clonidine hydrochloride in pig urine and pork samples[J]. Food and Agricultural Immunology, 2021, 32(1): 851−862.
[27] 王耀, 郭开通, 王成宾, 等. 基于化学发光酶免疫分析法检测花生过敏原 Ara h 2[J]. 食品与发酵工业, 2024, 50(20): 266−272. [WANG Yao, GUO Kaitong, WANG Chengbin, et al. Detection of peanut allergen Ara h 2 based on chemiluminescence enzyme immunoassay[J]. Food and Fermentation Industries, 2024, 50(20): 266−272.]
[28] ZHANG Qing, WU Aihong, LI Jinyan, et al. Development of an ic-ELISA and immunochromatographic assay strip for the rapid detection of chloridazon in oranges and celery[J]. Analyst, 2024, 149(2): 467−474.
[29] JIN Yaqi, JIN Zihui, SUN Di, et al. Preparation of spirodiclofen monoclonal antibody and establishment of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Food Chemistry, 2023, 417: 135936.
[30] 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 Jiang, YAN Jiajun, QI Yan, et al. Rapid detection of folic acid in milk powder by enzyme linked immunosorbent assay[J]. China Dairy Industry, 2017, 45(10): 37−38,50.]
[31] LIU Yanting, ZHONG Qingping, LEI Hongtao, et al. Study

on the antibody against tetrodotoxin made by the immunogen with different carrier proteins[J]. Wei Sheng Yan Jiu, 2008, 37(2): 234−236.

[32] DOLASHKA-ANGELOVA P, STEFANOVA T, LIVANIOU E, et al. Immunological potential of *Helix vulgaris* and *Rapana venosa* hemocyanins[J]. Immunological Investigations, 2008, 37(8): 822−840.

[33] NAZKI F H, SAMEER A S, AHMAD GANAIE B. Folate: Metabolism, genes, polymorphisms and the associated diseases[J]. Gene, 2014, 533(1): 11−20.

[34] ZHAO Tangjuan, LIN Huaping, LI Nan, et al. Determination of folic acid by capillary zone electrophoresis with indirect chemiluminescence detection[J]. RSC Advances, 2021, 11(33): 20063−20069.

[35] NGHIA N N, THE HUY B, LEE Y I. Paper-based colorimetric probe for highly sensitive detection of folic acid based on open-ring form amplification of rhodamine B derivative[J]. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2020, 81: 352−359.

[36] QADER A F. Validated spectrofluorometric assay for folic acid determination in pure and pharmaceutical forms via basic fuchsin fluorescence quenching[J]. Luminescence, 2024, 39(11): e70022.

[37] 王苏霞, 马永钧. 用复合修饰电极示差脉冲伏安法快速测定叶酸含量[J]. 云南化工, 2020, 47(4): 113−117. [WANG Suxia, MA Yongjun. Rapid determination of folic acid by differential pulse voltammetry at the composite modified electrode[J]. Yunnan Chemical Technology, 2020, 47(4): 113−117.]

[38] ZHANG Taichang, XUE Huyin, ZHANG Bo, et al. Determination of folic acid in milk, milk powder and energy drink by an indirect immunoassay[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2012, 92(11): 2297−2304.

[39] 李贞. ELISA 方法检测牛奶中叶酸含量[J]. 食品研究与开发, 2016, 37(19): 137−141. [LI Zhen. ELISA method for the detection of folate in milk[J]. Food Research and Development, 2016, 37(19): 137−141.]

[40] NOVIKOVA A S, PONOMARYOVA T S, GORYACHEVA I Y. Fluorescent AgInS/ZnS quantum dots microplate and lateral flow immunoassays for folic acid determination in juice samples[J]. Microchimica Acta, 2020, 187(8): 427.