提取剂对酶联免疫法检测芝士粉中黄曲霉毒素M_1的影响

伍 蓝，黄 华，戴晓红，方 娟，马后扬，王 丹，吴建勋

蒙牛乳制品武汉有限责任公司，湖北武汉 430040

摘 要：[目的]本研究使用酶联免疫法（ELISA法）评估了一级水、无水甲醇、二氯甲烷3 种不同提取剂在检测芝士粉中黄曲霉毒素M_1含量方面的效果。[方法]通过对比一级水、无水甲醇、二氯甲烷3 种不同提取剂提取效果的相对标准偏差，比较平均回收率。[结果]用一级水提取时，相对标准偏差2.56%，平均回收率35.30%～51.12%；用无水甲醇提取时，相对标准偏差4.20%，平均回收率81.32%～90.18%；用二氯甲烷提取时，样品组织状态异常，氮流蒸发后残留物呈油状，无法进行后续检测。[结论]以无水甲醇作为提取剂时，ELISA法的提取准确性较高，更适用于食品检测领域。

关键词：酶联免疫法；芝士粉；黄曲霉毒素M_1；提取剂

文章编号：1671–4393（2025）04–0084–05 DOI:10.12377/1671–4393.25.04.15

0 引言

黄曲霉毒素M_1（Aflatoxin M_1，AFM_1）是一种常见真菌毒素，主要污染粮食、食品和饲料等。AFM_1具有强烈的致癌性和遗传毒性，严重威胁人类健康，属于2B类致癌物[1]，世界卫生组织和国际癌症研究机构将其划分为Ⅰ类致癌物[2～4]。因此，准确、快速检测食品中的AFM_1对保障公众健康至关重要。酶联免疫法（ELISA法）是一种灵敏、特异的检测方法，广泛应用于食品检测领域。ELISA法测定的准确性和可靠性很大程度上取决于样品的前处理步骤，特别是提取剂的选择。不同提取剂可能对AFM_1的提取效率、检测灵敏度以及特异性产生显著影响。目前，一级水、无水甲醇和二氯甲烷是常用的提取剂，但由于它们在极性、溶解性和毒性上有差异，本研究旨在通

作者简介：伍 蓝（1990–），女，湖北安陆人，本科，研究方向为食品分析与检测；
黄 华（1978–），男，内蒙古呼和浩特人，硕士，研究方向为企业管理；
戴晓红（1987–），女，湖北黄冈人，本科，研究方向为食品安全；
方 娟（1981–），女，湖北武汉人，本科，研究方向为企业管理；
马后扬（1986–），男，湖北武汉人，本科，研究方向为企业管理；
王 丹（1983–），女，内蒙古呼和浩特人，硕士，副高级工程师，研究方向为企业管理；
吴建勋（1981–），男，内蒙古乌兰浩特人，本科，研究方向为企业管理。

中国乳业线上阅读

过比较一级水、无水甲醇和二氯甲烷三种提取剂在ELISA法测定芝士粉中AFM_1时的效果，评估它们对测定结果的影响，研究它们在测定中的应用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芝士粉样品，市售。AFM_1阳性试样，以经空白试验验证其中不含AFM_1的芝士粉为本底，使用AFM_1标准品对其进行理论浓度为150 ng/kg、300 ng/kg、500 ng/kg和750 ng/kg的加标。酶联免疫试剂盒，北京陆桥生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

电子天平（XP205DR），梅特勒-托利多仪器（上海）有限公司；振荡器（MS 3D S25），德国IKA公司；高速冷冻离心机（Neofuge 23R），上海力申科学仪器有限公司；酶标仪（ELx800），美国博腾仪器有限公司；洗板机，美国赛默飞世尔科技公司；单道移液器，呼和浩特市普菲斯特科贸有限责任公司；氮气吹干仪（5085），美国Organomation Associates公司。

1.3 试验方法

1.3.1 一级水作为提取剂处理方法

称取1.0 g芝士粉样品于离心管中，加入10 mL一级水，混合均匀后，（60±5）℃水浴5 min，冷却至室温后，在2～8 ℃，3 000 r/min离心10 min脱脂，检测100 μL处理后的样品。

1.3.2 无水甲醇作为提取剂处理方法

称取1.0g芝士粉样品于离心管中，加入10 mL 无水甲醇，充分混合5 min，3 000 r/min离心10 min。吸取1 mL上清液于干净离心管中，使用氮流在（50±1）℃下蒸发吹干，向残留物中加入1 mL不含AFM_1的牛奶缓冲液充分溶解，涡旋混合1 min，静置5 min，检测100 μL处理后的样品。

1.3.3 二氯甲烷作为提取剂处理方法

称取2.0 g芝士粉样品于离心管中，加入8 mL二氯甲烷，充分涡旋混合，室温下放置30 min，3 000 r/min离心10 min。吸取2 mL上清液于干净离心管中，使用氮流在（50±1）℃下蒸发吹干，向残留物中加入1 mL不含AFM_1的牛奶缓冲液充分溶解，混合均匀后静置5 min，检测100 μL处理后的样品。

1.4 ELISA 法检测原理及步骤

1.4.1 ELISA法检测原理

基于ELISA法原理。酶标板上的微孔被特异性地包被了针对AFM_1的抗体。将AFM_1标准品和待测样品加入这些微孔中，如果存在AFM_1，它将与微孔中预先包被的抗体发生特异性结合，在随后的洗涤步骤中，所有未与抗体结合的AFM_1将被洗去。向微孔中加入AFM_1-HRP酶标记物（即检测溶液），这种酶标记物将与尚未被AFM_1标准品或样品中的AFM_1占据的抗体结合位点进行特异性结合。在洗涤步骤中，所有未与抗体结合的AFM_1-HRP酶标记物也将被洗去。向微孔中加入显色底物，该底物与检测出的抗体反应，逐渐形成一种蓝色的络合物。该显色过程在加入终止液后停止，并将生成的最终物质变成黄色。最后，在450 nm波长下测定微孔中的吸光度值。所形成的有色络合物的光强度与样品及AFM_1标准品中AFM_1的浓度成反比，即吸光值的高低反映了AFM_1含量的多少。

1.4.2 ELISA法检测步骤

检测前将所有试剂回温至20～25 ℃，取所需数量的酶标微孔置于微孔板架上，记录AFM_1标准品和待测样品位置。加入100 μLAFM_1标准品或待测样品在20～25 ℃避光孵育45 min后用洗板机洗板，拍干后加入100 μL AFM_1检测样品后20～25 ℃避光孵育15 min，再次用洗板机洗板后加入100 μL底物在20～25 ℃避光孵育15 min后加入100 μL终止液终止反应，酶标仪设定450 nm处测定各孔吸光度值A。

1.5 试验数据分析

标准曲线的绘制与检测结果计算按照ELISA试剂

中国乳业线上阅读

盒所提供的RIDAWIN软件绘制标准曲线图，通过绘制标准曲线计算样品中AFM_1的含量[5]，从精密度和回收率等方面，比较一级水、无水甲醇和二氯甲烷的提取效果。

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的绘制

标准品1~7号的工作浓度梯度分别为0.00 ng/kg、5.00 ng/kg、10.00 ng/kg、25.00 ng/kg、50.00 ng/kg、100.00 ng/kg、250.00 ng/kg，标号为Std1、Std2、Std3、Std4、Std5、Std6、Std7。设置酶标仪于450 nm处检测OD值，检测数据通过配套RIDAWIN软件分析后得到检测结果和标准曲线（表1、图1）。

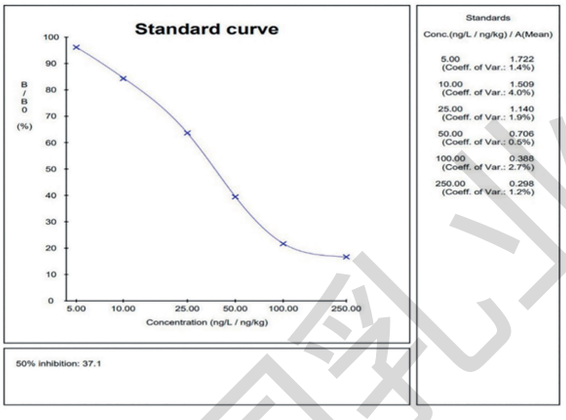


图1 AFM_1 标准曲线

由表1、图1可知，曲线的形状为倒S型的上半段， AFM1标准品为7 个点，拐点数量为2，最大百分吸光度为96.1%，零标准品吸光度平均值为1.791，各标准品的变异系数均小于10%，标准曲线线型关系良好，完全符合ELISA试剂盒的检测要求[6~8]。

2.2 3 种处理方法结果对比

二氯甲烷作为提取剂处理的样品组织状态异常，为非均匀流体，氮流蒸发后残留物呈油状，无法进行后续检测，结果见图2。

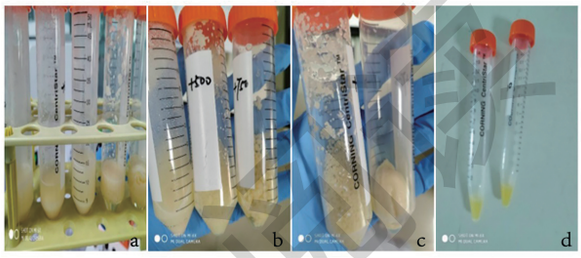


图2 二氯甲烷作为提取剂前处理结果

注：（a）（b）（c）为加入二氯甲烷涡旋混匀后组织状态 （d）为氮流蒸发后残留物呈油状

用一级水和无水甲醇作为提取剂处理同一理论浓度为150 ng/kg的样品，重复测定该样品中AFM_1质量分数（n=10），在同一块包被抗体的微孔反应板中进行反应，计算其标准偏差和相对标准偏差，结果见表2。

由表2可知，相同理论浓度的样品用不同提取剂处理得出的结果不同。用一级水提取时，相对标准偏差为2.56%；用无水甲醇提取时，相对标准偏差为4.20%。

待测样品中添加AFM_1标准品溶液150 ng/kg、300 ng/kg、500 ng/kg、750 ng/kg，分别按照ELISA法检测步骤处理样品后，测定AFM_1含量，每个浓度平行测定10 次并计算回收率[9]，结果如表3所示。

由表3可知，待测样品中添加AFM_1标准

表1 $ASFM_1$ 标准品检测结果

标准品序号	标准浓度（ng/kg）	吸光度平均值	百分吸光度（%）	计算浓度（ng/kg）	变异系数（%）
Std1	0.00	1.791	100.0	–	–
Std2	5.00	1.722	96.1	5.00	0.0
Std3	10.00	1.509	84.3	10.02	0.2
Std4	25.00	1.140	63.7	24.91	0.4
Std5	50.00	0.706	39.4	50.07	0.1
Std6	100.00	0.388	21.7	100.57	0.6
Std7	250.00	0.298	16.6	243.44	2.6

中国乳业线上投稿

表 2 一级水和无水甲醇作为提取剂处理结果对比

结果	一级水作为提取剂处理	无水甲醇作为提取剂处理
测量值（ng/kg）	51.4	114.53
	55.9	116.25
	53.1	129.60
	52.1	129.60
	51.9	119.30
	52.4	121.70
	54.1	119.12
	52.2	118.66
	54.1	127.32
	52.3	123.76
平均值（ng/kg）	53.0	121.98
标准偏差（ng/kg）	1.3	5.12
相对标准偏差（%）	2.56	4.20

品溶液后，用一级水提取时，平均回收率为35.30%～51.12%；用无水甲醇提取时，平均回收率为81.32%～90.18%。

2.3 讨论

无水甲醇是一种常用的有机溶剂，能有效溶解AFM_1，同时对样品中其他成分的影响较小。一级水作为提取剂时，虽然对样品成分影响较小，但对于水溶性较差的样品来说，提取效率较低。二氯甲烷是一种强极性溶剂，或许能有效提取AFM_1，但对样品中其他成分的影响较大，提取出的油状物需进一步脱脂处理等较复杂。选择提取剂时，需综合考虑提取效率、检测准确性和对样品成分的影响。

3 结论

本研究比较了 一级水、无水甲醇和二氯甲烷作为提取剂在ELISA法测定芝士粉中AFM_1含量的应用。试验结果表明，无水甲醇作为提取剂时，ELISA法提取准确性较高。因此，无水甲醇是一种较理想的提取剂。实际检测工作中，应根据样品性质和检测要求选择合适的提取剂，提高检测准确性和效率。

4 展望与建议

尽管本试验取得较好的结果，但仍有改进和优化的空间。对于不同食品基质，可能存在更合适的提取剂。未来可进一步探讨其他溶剂的提取效果。如在样品中加入无水硫酸钠，用乙酸乙酯提取，氮气吹干，用正己烷脱脂等。为提高检测准确

表 3 样品加标回收率结果

样品名	芝士粉							
样品原含量（ng/kg）	0	0	0	0	0	0	0	0
标准添加量（ng/kg）	150	150	300	300	500	500	750	750
	一级水	无水甲醇	一级水	无水甲醇	一级水	无水甲醇	一级水	无水甲醇
检测值（ng/kg）	51.40	114.53	156.80	267.84	241.10	466.00	339.50	714.84
	55.90	116.25	146.40	279.02	239.10	451.35	352.40	769.16
	53.10	129.60	148.60	261.94	233.90	490.20	355.10	658.82
	52.10	129.60	160.12	259.37	269.31	390.20	369.25	670.95
	51.90	119.30	157.35	281.24	247.22	385.14	349.23	575.10
	52.40	121.70	152.15	263.39	234.19	487.23	338.98	735.29
	54.10	119.12	162.30	259.83	239.12	469.59	352.68	742.38
	52.20	118.66	156.23	262.03	234.98	471.51	348.94	587.24
	54.10	127.32	142.39	259.12	246.59	419.98	345.27	619.62
	52.30	123.76	151.29	275.32	237.37	399.94	361.22	690.18
平均值（ng/kg）	52.95	121.98	153.36	266.91	242.29	443.11	351.26	676.36
平均回收率（%）	35.30	81.32	51.12	88.97	48.46	86.62	46.83	90.18

中国乳业线上阅读

性和可靠性，可考虑采用其他仪器分析方法（薄层色谱法（TLC）[10]、超高效液相色谱仪串联质谱法（UHPLC-MS/MS）[11]和高效液相色谱法（HPLC）等[12, 13]进行比较研究。

参考文献

[1] 华律.世界卫生组织国际癌症研究机构致癌物清单[EB/OL].https：//m.66law.cn/contractmodel/5589955.aspx，2025-01-09.

[2] Umaya S R，Vijayalakshmi Y C，Sejian V.Exploration of plant products and phytochemicals against aflatoxin toxicity in broiler chicken production：Present status[J].Toxicon，2021，200：55-68.

[3] Ostry V，Malir F，Toman J，et al.Mycotoxins as human carcinogens—the IARC monographs classification[J].Mycotoxin Research，2017，33（1）：65-73.

[4] Du B B，Su X O，Yang K H，et al.Antibody-free colorimetric detection of total aflatoxins in rice based on a simple two-step chromogenic reaction[J].Analytical Chemistry，2016，88（7）：3775-3780.

[5] 卢晓霞，谢海军，宋崴，等.黄曲霉毒素M1酶联免疫吸附检测方法的建立[J].食品工程，2017（2）：58-60.

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会. GB/T 33411—2016 酶联免疫分析试剂盒通则[S].

[7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 2775—2011，商品化食品检测试剂盒评价方法[S].

[8] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局，中国国家标准化管理委员会. GB/T 27403—2008，实验室质量控制规范食品分子生物学检测[S].

[9] 刘冬儿.酶联免疫吸附分析法测定食品中的黄曲霉毒素B1[J].食品工业科技，2002，23（10）：79-80.

[10] Shundo L，Sabino M.Aflatoxin M1 in milk by immunoaffinity column cleanup with TLC/HPLC determination[J].Brazilian Journal of Microbiology，2006，37（2）：164-167.

[11] Chen M，Liu X，Yang S，et al.HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of aflatoxins in blood：Toxicokinetics of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in rats[J].Journal of Analytical Science and Technology，2022，13（1）：27-11.

[12] Shuib N S，Makahleh A，Salhimi S M，et al.Determination of aflatoxin M1 in milk and dairy products using high performance liquid chromatography-fluorescence with post column photochemical derivatization[J].Journal of Chromatography A，2017，1510：51-56.

[13] 乔宽，王路阳，王艳飞，等.酶联免疫吸附和胶体金技术对黄曲霉毒素M1检测的结合验证[J].中国乳业，2024（1）：69-72，77.

Effect of Extracts on Determination of Aflatoxin M_1 in Cheese Powde by ELISA

WU Lan，HUANG Hua，DAI Xiaohong，FANG Juan，MA Houyang，WANG Dan，WU Jianxun

Mengniu Dairy Products Wuhan Co.，Ltd.，Wuhan Hubei 430040

Abstract：[Objective]Enzyme-linked immunoassay（ELISA）was used to evaluate the effects of three different extractants of primary water，anhydrous methanol and dichloromethane on the determination of aflatoxin M_1 in cheese powder.[Method]The average recovery rate was compared by comparing the relative standard deviation of extraction effects of primary water，anhydrous methanol and dichloromethane.[Result]When extracted with primary water，the relative standard deviation was 2.56% and the average recovery was 35.30%~51.12%. When extracted with anhydrous methanol，the relative standard deviation was 4.20%，and the average recovery was 81.32%~90.18%. When extracted with dichloromethane，the tissue status of the sample was abnormal，and the residue after nitrogen evaporation was oily，which could not be further determinated. [Conclusion]When extracted with anhydrous methanol. ELISA method had higher extraction accuracy and is more suitable for food determination.

Keywords：ELISA；cheese powder；Aflatoxin M_1；extractant

中国乳业线上阅读