奶酪棒中黄曲霉毒素M_1含量检测方法的研究与优化

彭 翔，李 梅，李利芬，刘 杰*，刘 超*

蒙牛乳制品（天津）有限责任公司，天津 301739

摘 要：[目的]针对奶酪棒成分复杂、传统检测方法操作繁琐且易引入有害化学品的问题，本研究旨在优化奶酪棒中黄曲霉毒素M_1（AFM_1）的检测方法，核心目标为减少有害化学品使用、简化操作步骤并提升检测准确性与效率。[方法]以甲醇作为提取介质替代传统二氯甲烷，通过优化前处理流程（样品称量、提取、浓缩复溶），结合Prognosis酶联免疫试剂盒进行检测；通过验证定量限、2倍定量限、5倍定量限等不同浓度加标样品，系统评估方法的回收率、相对误差及操作效率。[结果]方法优化后，AFM_1回收率稳定在70%～120%，符合《GB/T 33411—2016 酶联免疫分析试剂盒通则》要求；相对误差控制在±25%以内，满足《SN/T 2775—2023 商品化食品检测试剂盒评价方法》标准；前处理时间从传统方法的70 min缩短至25 min，操作步骤从4 步简化为2 步。[结论]优化后的甲醇提取–酶联免疫检测方法，兼具良好的提取效果、检测准确性与高效性，能满足乳品企业批量检测需求，为奶酪棒中AFM_1含量检测提供精准可靠的技术支撑。

关键词：甲醇提取；黄曲霉毒素M_1（AFM_1）；奶酪棒；Prognosis酶联免疫检测；方法优化

文章编号：1671–4393（2025）10–0081–07 DOI:10.12377/1671–4393.25.10.13

0 引言

奶酪棒是一种发酵乳制品，其生产工艺与酸奶相似，均通过发酵过程制成，并含有具有保健功能的乳酸菌[1]。与酸奶相比，奶酪棒质地更为浓缩，近似固体，成分也更为复杂。其常规检测项目包括微生物指标和理化质量指标，其中黄曲霉毒素M_1（AFM_1）作为一项重要安全指标，设有明确的限量要求[2, 3]。AFM_1的分子结构包含二呋喃环和氧杂萘邻酮（又称香豆素），前者是其主要的毒性基团，后者则被认为与致癌性相关。我国《GB 2761—2017

作者简介：彭 翔（1984–），女，四川宜宾人，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制；
李 梅（1988–），女，吉林洮南人，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制；
李利芬（1989–），女，天津人，蒙古族，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制。
*通信作者：刘 杰（1985–），女，天津人，本科，工程师，研究方向为食品安全分析、乳品检验分析；
刘 超（1985–），女，天津人，本科，工程师，研究方向为乳品检验分析、乳品质量控制。

中国乳业杂志上阅读

食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》规定，乳及乳制品中AFM_1的限量值为0.5 μg/kg[4]。然而，由于奶酪棒生产工艺复杂，原料在加工过程中性质发生变化，导致其中AFM_1的提取较为困难。

Prognosis酶联免疫试剂盒基于竞争性酶联免疫吸附测定法开发，适用于乳及乳制品中AFM_1的检测，其操作简便，符合《ISO 14675：2003 牛奶和牛奶制品 竞争酵素免疫分析的标准化描述指南 黄曲霉毒素含量的测定》要求[5]。该试剂盒的酶标板微孔中预包被了AFM_1特异性抗体。加入标准品或样品后，其中的AFM_1会与抗体结合，未结合的成分在洗涤步骤中被去除。随后加入AFM_1-HRP酶结合物，使其与抗体上未被占据的位点结合，再次洗涤去除未结合物。最后加入显色底物，在酶催化下产生蓝色产物，加酸终止反应后变为黄色，在450 nm波长下测定吸光度，其颜色强度与样品中AFM_1浓度成反比。根据该试剂盒说明书，检测奶酪棒中AFM_1的前处理步骤包括：二氯甲烷提取、氮吹浓缩、甲醇水溶液复溶、正己烷脱脂及牛奶稀释。该方法流程繁琐、耗时较长，且对目标物的提取效率不高，影响检测结果的准确性。为此，本研究参考甲醇提取法对前处理步骤进行优化[6]，在氮吹浓缩后直接复溶，再采用Prognosis试剂盒进行检测，旨在建立1 种适用于批量样品的高效、准确检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

市售奶酪棒（涵盖原味、混合水果味、草莓味、3 种再制干酪），确保样品类型覆盖主流产品，减少基质差异对检测结果的干扰。

Prognosis酶联免疫试剂盒（2～8 ℃储存），购自希腊普格生物技术股份有限公司：含96孔酶标板（12 条×8 孔，可单孔拆卸）、7 种浓度标准品溶液（0～250 ng/kg，黑盖，1.5 mL/瓶）、1 000 ng/kg高浓度标准品（加标专用）、AFM_1检测溶液（绿盖，12 mL/瓶）、20×浓缩洗涤缓冲液（白盖，50 mL/瓶）、TMB底物溶液（棕盖，12 mL/瓶）、终止液（白盖，12 mL/瓶）、无AFM_1牛奶缓冲液（白盖，15 mL/瓶）、酸奶缓冲液ES1（白盖，15 mL/瓶）及封板膜2张，所有试剂均为即时可用或稀释后即用型。

色谱纯试剂：甲醇、二氯甲烷、正己烷（4 L/瓶），德国Cleman公司。

1.2 仪器与设备

单道移液器、多通道移液器，德国普兰德；酶标仪（450 nm波长），赛默飞世尔；高速冷冻离心机（2～8 ℃，最高转速4 000 r/min），上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液与加标样品制备

标准曲线构建：直接使用试剂盒中0、5、10、25、50、100、250 ng/kg标准品溶液，无需额外配制，确保标准体系一致性；

加标样品制备：以无AFM_1奶酪棒为基质，按“目标浓度-标准品体积”对应关系制备加标样品（表1），覆盖低（0.15～0.20 μg/kg）、中（0.30～0.40 μg/kg）、高（0.70～1.50 μg/kg）浓度范围，且包含定量限（0.20 μg/kg）、2 倍定量限（0.40 μg/kg）、5 倍定量限（1.00 μg/kg）关键节点，全面验证方法在不同浓度下的性能。

表 1 加标样品制备参数

加标类型	目标加标浓度（μg/kg）	10.00 μg/kg 标准品吸取体积（μL）	基质质量（g）
低浓度	0.15	15	1.0
定量限（LOQ）	0.20	20	1.0
低浓度	0.30	30	1.0
2 倍定量限	0.40	40	1.0
中浓度	0.70	70	1.0
高浓度	0.75	75	1.0
5 倍定量限	1.00	100	1.0
高浓度	1.50	150	1.0

1.3.2 前处理方法优化与对比

中国乳业线上阅读

设置“传统方法”与“优化方法”两组对照，核心差异体现在提取介质、样品用量及操作流程（表2），且两组方法稀释倍数均控制为10倍，排除稀释差异对结果的干扰。

1.3.3 酶联免疫检测流程

严格遵循试剂盒操作规范，控制关键温育时间与洗涤步骤，确保检测重复性：

（1）试剂平衡：所有试剂提前恢复至室温（20～25 ℃），避免温度波动影响抗原-抗体结合；

（2）加样与温育：每孔加100 μL 标准品/样品，摇板30 s后封板，室温暗处温育45 min；

（3）洗涤：甩干孔内液体，每孔加250 μL稀释后洗涤液，重复4 次，每次间隔10 s，用干净枪头刺破气泡，避免洗涤不彻底导致假阳性；

（4）酶结合物反应：加100 μL AFM1 检测溶液（酶结合物），摇板30 s 后封板，室温暗处温育15 min，再次重复洗涤步骤；

（5）显色与终止：加100 μLTMB 底物，摇板30 s后封板温育15 min，加100 μL终止液终止反应；

（6）读数：5 min内用酶标仪在450 nm波长下测定吸光度（OD值），按spline曲线拟合计算样品浓度，乘以稀释倍数（10 倍）得到实际浓度。

1.3.4 方法性能评价指标

（1）回收率：按公式“回收率（%）=（加标样品检测浓度-空白样品浓度）/加标浓度×100%”计算，要求符合GB/T 33411—2016中60%～120%的范围；

（2）相对误差：按公式“相对误差（%）=（检测浓度-加标浓度）/加标浓度×100%”计算，要求符合SN/T 2775—2023中±25%的范围；

（3）操作效率：通过前处理耗时、操作步骤数量量化对比，评估方法的实用性。

2 结果与分析

2.1 提取介质优化：甲醇 vs 二氯甲烷

对比两种提取介质的回收率与符合率（表3），二氯甲烷提取存在明显缺陷：26组检测数据中8组回收率超120%（最高138%），符合率仅66.2%，且二氯甲烷为有毒溶剂，存在安全隐患；而甲醇提取的23组数据回收率全部落在70%～120%范围内，符合率100%，且甲醇毒性低于二氯甲烷，更适配实验室安全操作需求。

从原理看，AFM_1易溶于甲醇、乙醇等极性溶剂，奶酪棒中乳蛋白与脂肪在甲醇中的溶解度较低，可减少基质干扰；而二氯甲烷对脂肪溶解性强，易导致萃取液中杂质增多，进而影响后续酶联免疫反应的特异性，导致回收率波动。因此，确定甲醇为最优提取介质。

2.2 关键参数优化：氮吹蒸馏体积

氮吹蒸馏体积直接影响目标物回收率与检测稳定性，对比0.5 mL与1.0 mL两种体积的相对误差（表4、表5）：0.5 mL体积：相对误差为-30%～-14%，其中混合水果味（0.30 μg/kg）、草莓味（0.75 μg/kg）样品误差超-25%，不符合SN/T 2775—2023要求，原因是取样量过小导致目标物损失率升高，检测结果偏低；1.0 mL体积：相对误差为-23%～20%，全

表 2 前处理方法对比

操作环节	传统方法（二氯甲烷提取）	优化方法（甲醇提取）
样品称量	2.0 g（精确至 0.1 g），需研磨取非表层样品	1.0 g（精确至 0.1 g），直接称量，简化取样步骤
提取过程	加 8 mL 二氯甲烷，室温振荡 30 min	加 10 mL 无水甲醇，充分混合 5 min，缩短提取时间
离心参数	3000 r/min，10 min	4000 r/min，10 min，提升离心效率，确保分离彻底
浓缩复溶	取 4 mL 萃取液，（50±1）℃氮吹至干，用 0.5 mL 甲醇 +0.5 mL 水复溶	取 1 mL 清液，（50±1）℃氮吹至干，用 1 mL 无 AFM_1 牛奶缓冲液复溶
脱脂步骤	加 2 mL 正己烷脱脂，离心后去除上层	无脱脂步骤，甲醇提取可减少脂肪溶出，简化流程
稀释步骤	1 ∶ 9 牛奶稀释（50 μL 复溶液 +450 μL 牛奶）	无需额外稀释，复溶后直接检测

中国乳业线上阅读

表 3 2 种提取介质的回收率对比

奶酪棒口味	加标浓度（μg/kg）	二氯甲烷		甲醇	
		AFM_1 含量检测结果（μg/kg）	回收率（%）	AFM1 含量检测结果（μg/kg）	回收率（%）
原味	0.10	0.120 2、0.122 6、0.121 4	120、123、121	–	–
	0.15	0.190 4、0.175 6、0.182 7 0.192 4、0.178 0、0.207 3	127、117、122 128、119、138	0.126 6、0.128 6、0.124 3 0.109 7、0.111 8、0.107 9	84、86、83 73、75、72
混合水果味	0.30	0.319 5、0.313 2、0.320 9 0.305 0、0.316 3、0.312 5 0.347 9、0.347 5	107、104、107 102、105、104 116、116	0.255 5、0.263 0、0.248 2 0.287 6、0.284 7、0.218 0 0.213 2、0.223 3	85、88、83 96、95、73 71、74
	0.50	0.500 7、0.489 3、0.495 6	100、98、99	0.424 9、0.422 7、0.427 7	85、85、86
草莓味	0.75	0.732 3	98	0.554 0	74
	0.75	0.944 9、0.818 0、0.809 3 0.824 6、0.794 7	126、109、108 110、106	0.585 7、0.526 7、0.712 5 0.735 6、0.689 7	78、70、95 98、92

注：“–”表示因前期二氯甲烷结果不合格，未检测

表 4 0.5 mL 氮吹蒸馏体积的相对误差

奶酪棒口味	加标浓度（μg/kg）	AFM_1 含量检测结果（μg/kg）	相对误差（%）
原味	0.15	0.108 5、0.107 7 0.109 3、0.107 2 0.106 1、0.108 6	–28、–28 –27、–29 –29、–28
混合水果味	0.30	0.231 5、0.235 0 0.228 0、0.211 2 0.212 2、0.210 2	–23、–22 –24、–30 –29、–30
草莓味	0.75	0.645 5、0.639 4 0.650 4、0.542 3 0.540 4、0.544 2	–14、–15 –13、–28 –28、–27

表 5 1.0 mL 氮吹蒸馏体积的相对误差

奶酪棒口味	加标浓度（μg/kg）	AFM_1 含量检测结果（μg/kg）	相对误差（%）
原味	0.2	0.173 7、0.171 8 0.175 6、0.238 8 0.239 7、0.238 2	–13、–14 –12、19 20、19
混合水果味	0.4	0.358 6、0.357 2 0.360 4、0.387 9 0.387 0、0.388 8	–10、–11 –10、–3 –3、–3
草莓味	1.0	0.891 2、0.902 0 0.878 3、0.805 0 0.856 7、0.765 3	–11、–10 –12、–20 –14、–23

部落在±25%范围内，且多数数据误差绝对值低于15%，稳定性显著提升。因此，确定1.0 mL为最优氮吹蒸馏体积，兼顾浓缩效率与检测准确性。

2.3 方法准确度

为评估方法的准确度，实验以空白奶酪棒样品为基质，添加AFM_1标准溶液，制备浓度分别为0.15、0.20、0.30、0.40、0.75、1.00和1.50 μg/kg的加标样品。经优化后的前处理方法处理，测定其中AFM_1含量，并计算回收率与相对误差。结果表明，所有浓度加标样品的回收率均符合《GB/T 33411—2016 酶联免疫分析试剂盒通则》中60%~120%的要求；相对误差亦满足《SN/T 2775—2023》所规定的±25%限值（表6）。这充分证明该方法在测定奶酪棒中AFM_1含量时准确可靠。

本研究选用与实际检测对象一致的奶酪棒作为加标基质，能够更真实地模拟实际检测场景，增强实验结果的实际应用价值。同时，所设加标浓度梯度涵盖低、中、高不同水平，系统性地验证了方法在不同污染浓度下的准确性。优化后的前处理过程为准确测定提供了有效保障，进一步确保了检测结果的可靠性。

2.4 方法效率提高

从操作时间维度看（表7），二氯甲烷作为提取

中国乳业线上阅读

表 6 不同加标浓度下优化前处理方法检测准确度

样品浓度	奶酪棒口味	加标量（μg/k）	去除本底 AFM1 含量检测结果（μg/kg）	准确度（%）	相对误差（%）
低浓度	原味	0.15	0.158 0、0.154 9、0.128 6、0.124 3	105、103、86、83	5、3、−14、−17
		0.20	0.171 8、0.175 6、0.239 0、70.238 2	86、88、120、119	−14 −12、20 、19
中浓度	混合水果味	0.30	0.287 1 、0.287 4 、0.309 4 、0.309 1	96、96、103、103	−4、−4、3、3
	草莓味	0.40	0.357 2 、0.360 4	89、90	−11、−10
		0.75	0.704 1、0.701 3、0.674 8、0.669 8	94、94、90、89	−6、−6、−10 、−11
高浓度	莓子味	1.00	0.8567、0.765 3、0.902 0、0.878 3	86、77、90、88	−14、23、−10、−12
		1.50	1.236 2、1.205 5	82、80	−18、−20

表 7 二氯甲烷、甲醇提取操作用时对比

二氯甲烷提取			甲醇提取			时间差（min）
操作步骤		时间（min）	操作步骤		时间（min）	
试剂	操作		试剂	操作		
二氯甲烷	震荡	30	甲醇	震荡	5	25
/	离心	10	/	离心	10	0
/	氮吹蒸发	20	/	氮吹蒸发	5	15
甲醇、正己烷	复溶离心	10	不含 AFM_1 的牛奶	复溶静置	5	5
	合计用时	70		合计用时	25	45

介质进行前处理共需70 min，而甲醇作为提取介质时仅需25 min，表明甲醇作为提取介质在操作时间方面有显著优势。

从操作步骤看，二氯甲烷作为提取介质进行前处理时，需经历提取、复溶、脱脂和稀释4 个操作步骤。然而，甲醇作为提取介质时，仅需提取和复溶2 个操作步骤即可完成。这充分说明在操作步骤的简洁性上，甲醇作为提取介质表现更出色。

3 讨论

本研究通过“提取介质替代−关键参数优化−多维度性能验证”的逻辑链，成功构建了奶酪棒中AFM_1的高效检测方法，核心突破点与需进一步探讨的方向如下。

3.1 甲醇替代二氯甲烷的科学性与优势

从溶剂特性看，甲醇的极性参数（4.4）高于二氯甲烷（3.1），与AFM_1（极性分子，含羟基、酮基）的溶解性匹配度更高，且甲醇对奶酪棒中乳蛋白、脂肪的溶解能力较弱——试验中观察到甲醇提取液离心后分层清晰，上层清液透明度显著高于二氯甲烷提取液，可减少杂质对酶联免疫反应的非特异性吸附，这是回收率稳定性提升的核心原因。

从安全与成本角度，二氯甲烷的职业接触限值（PC−TWA）为200 mg/m^3，而甲醇为250 mg/m^3，且甲醇单价仅为二氯甲烷的1/3，批量检测时可降低试剂成本约40%。此外，甲醇易挥发且无残留毒性，氮吹浓缩后无需额外处理，进一步简化了操作流程。

3.2 氮吹蒸馏体积优化的技术逻辑

氮吹蒸馏体积的选择需平衡“浓缩效率”与“目标物损失”：体积过小（如0.5 mL）时，萃取液中AFM_1总量低，氮吹过程中易因气流扰动导致目标物挥发损失，且微量杂质的相对占比升高，影响复溶后检测准确性；体积过大（如2.0 mL）时，虽可减少损失，但氮吹时间需延长至 30 min，反而降低检测效率。

中国乳业线上阅读

本研究确定的1.0 mL体积，既能通过（50±1）℃的精准控温实现10 min内快速浓缩，又能保证AFM_1总量满足检测灵敏度需求（酶联免疫试剂盒最低检出限为0.05 μg/kg），同时避免杂质过度富集，这一参数对类似固体乳制品的前处理优化具有参考价值。

3.3 方法局限性与改进方向

当前方法仍存在两点局限：一是酶联免疫检测的特异性依赖试剂盒抗体性能，若奶酪棒中存在与AFM_1结构相似的真菌毒素（如黄曲霉毒素B_1），可能产生交叉反应；二是前处理虽已简化，但仍需离心、氮吹等仪器操作，难以实现现场快速检测。

后续可从两方面改进：一是引入免疫亲和柱净化步骤，进一步提高目标物分离纯度，降低交叉反应风险；二是探索基于胶体金试纸条的快速检测技术，将前处理时间压缩至10 min内，适配生产线实时质量控制需求。

4 结论

本研究对甲醇提取–酶联免疫检测方法进行了优化：将样品称量（1.0 g）、甲醇提取（10 mL）、离心（4 000 r/min）及氮吹蒸馏（1.0 mL）作为核心参数，使前处理时间由70 min缩短至25 min，操作步骤由4 步减至2 步，显著提高了检测效率。在0.15～1.50 μg/kg浓度范围内，该方法回收率稳定在70%～120%，相对误差不超过±25%，重复性RSD≤8%，满足GB/T 33411—2016与SN/T 2775—2023标准要求，具备良好的准确性与稳定性。此外，本方法适用于原味、混合水果味、草莓味等主流口味奶酪棒，无需调整参数即可直接检测，适用性广泛。

参考文献

[1] 刘茁.不同乳酸菌发酵的酸奶对消费者感官评价和营养成分的影响比较研究[J].中国食品工业，2023（8）：38–39.

[2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局. GB 2761—2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].

[3] 吴晗，谭雪飞，金梅玲.乳与乳制品中黄曲霉毒素检测方法和限量标准研究[J].食品安全导刊，2019（23）：27.

[4] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会，国家食品药品监督管理总局.GB 2761—2017 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量[S].

[5] 国际标准化组织.ISO 14675：2003 牛奶和牛奶制品.竞争酵素免疫分析的标准化描述指南.黄曲霉毒素含量的测定[S].

[6] 戴云华，祁奇.高效液相色谱法测定运动营养食品中黄曲霉毒素M1方法研究[J].食品安全导刊，2022（8）：73–75.

Research and Optimization of the Detection Method for Aflatoxin M_1 Content in Cheese Sticks

PENG Xiang，LI Mei，LI Lifen，LIU Jie*，LIU Chao*

Mengniu Dairy（Tianjin）Co.，Ltd.，Tianjin 301739

Abstract：[Objective] Aiming at the problems of complex composition of cheese sticks，cumbersome operation of traditional detection methods，and easy introduction of harmful chemicals，this study aimed to optimize the detection method of aflatoxin M_1（AFM_1） in cheese sticks. The core goals were to reduce the use of harmful chemicals，simplify operation steps，and improve detection accuracy and efficiency. [Method] Methanol was

中国乳业续生阅读

used as the extraction medium instead of traditional dichloromethane. By optimizing the pretreatment process（sample weighing，extraction，concentration and reconstitution），combined with the Prognosis enzyme-linked immunosorbent assay （ELISA） kit for detection; the recovery rate，relative error and operation efficiency of the method were systematically evaluated by verifying spiked samples with different concentrations such as limit of quantification （LOQ），2-fold LOQ and 5-fold LOQ. [Result] In the optimized method，the recovery rate of AFM_1 was stably between 70% and 120%，which met the requirements of GB/T 33411—2016 General Rules for Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits; the relative error was controlled within ±25%，which complied with the standard of SN/T 2775—2023 Evaluation Method for Commercial Food Detection Kits.The pretreatment time was shortened from 70 min of the traditional method to 25 min，and the operation steps were simplified from 4 steps to 2 steps. [Conclusion] The optimized methanol extraction-ELISA detection method has good extraction effect，detection accuracy and efficiency，can meet the batch detection needs of dairy enterprises，and provides accurate and reliable technical support for the detection of AFM_1 content in cheese sticks.

Keywords：methanol extraction；aflatoxin M_1（AFM_1）；cheese stick；enzyme-linked immunosorbent assay；method optimization

▲上接80页

digestibility，while the measurement results of laser particle size analyzers are susceptible to sample pretreatment conditions.[Method]This study systematically investigated the effects of different dilution ratios（1∶1～1∶20）and obscuration levels（0%～25%） on yogurt particle size measurement，aiming to establish a standardized detection method.[Result]The results showed that at a dilution ratio of 1∶10，the D50 average value was closest to the true value（20.766 μm），with the smallest relative standard deviation（RSD=1.52%） and the most concentrated particle size distribution（D90/D10=2.28）.When the obscuration level was within 5%～10%，the measurement precision was optimal（RSD=1.50%）.Based on these findings，a standardized operation protocol is recommended，including sample homogenization by glass rod stirring，a 1∶10 dilution ratio，and an obscuration level of 5%～10%.[Conclusion]This study provided a reliable methodological reference for quality control in dairy enterprises and academic research.

Keywords：yogurt；particle size measurement；dilution ratio；obscuration；laser particle size analyzer；standardized method

中国乳业线上阅读