

乳制品中有害成分检测技术研究进展

刘程^{1,2}, 李浩林^{1,2}, 刘箐^{1,*}, 梁玮¹, 韩舜愈², 杨玉萍¹, 方水琴³, 郭慧琴³, 陈艳³
(1.上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093; 2.甘肃农业大学食品科学与工程学院, 甘肃兰州 730070;
3.上海慧耘生物科技有限公司, 上海 200093)

摘要: 乳制品安全是我国近年来食品安全的焦点, 检测新技术运用滞后, 部分标准缺乏, 是乳制品安全事件屡禁不绝的原因之一。本文对乳制品中各种污染源及检测技术进行分析和总结, 重点介绍色谱、分析化学、免疫学、分子生物学、环介导等温扩增、生物芯片等技术, 并通过比较分析各种技术的优缺点, 对乳制品未来检测技术进行综合分析, 以期快速、准确地检测乳制品中有害成分及检测技术的发展提供一定的参考。

关键词: 乳制品; 有害成分; 检测技术; 研究进展

Research Progress of Detection Technology for Harmful Ingredients in Dairy Products

LIU Cheng^{1,2}, LI Hao-lin^{1,2}, LIU Qing^{1,*}, LIANG Wei¹, HAN Shun-yu², YANG Yu-ping¹, FANG Shui-qin³,
GUO Hui-qin³, CHEN Yan³
(1. School of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093,
China; 2. College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China;
3. Shanghai Prajna Biotechnology Co. Ltd., Shanghai 200093, China)

Abstract: In recent years, the safety of dairy products is the focus of food security in our country. The lagged application of new detection technology and the lack of the standards are one of the major reasons of dairy safety events. In this paper, various pollution sources and detection techniques of dairy products are summarized and analyzed. The chromatography, analytical chemistry, immunology, molecular biology, LAMP and biochips are applied, and the advantages and disadvantages of these technologies are discussed through comprehensive analysis for future detection technology of dairy products, which will provide a reference to fast and accurate detection of harmful ingredients in dairy products and the development of detection technologies.

Key words: dairy; harmful ingredients; detection technology; research progress

中图分类号: R155.57

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)21-0425-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201321083

近年来, 不法分子为牟取高额利润, 向原料乳及乳成品中添加多种有害物质, 例如将皮革水解物、三聚氰胺添加到生乳或奶粉中增加蛋白含量, 将能分解牛奶中 β -内酰胺的 β -内酰胺酶^[1]加到生乳中生产“无抗奶”等。不法商家种种制售假行为, 导致乳制品安全事件屡次爆发, 如蒙牛黄曲霉毒素^[2]、乳品检出三聚氰胺^[3-4]、重金属超标^[5]等, 这些乳制品安全事件不仅暴露了监管和标准的缺失, 而且说明乳制品检测新技术普及的迫切性。

为了应对新的乳制品检测问题, 规范有害成分的检测技术体系, 国家质检总局、卫生部将三聚氰胺、皮革水解物(L-羟脯氨酸)、硫氰酸钠和 β -内酰胺酶4种化学成分确定为非法添加物; 并颁布了乳制品非法添加物、

微生物的多个标准, 这些国家标准的颁布, 虽然规范了乳制品中有害成分的检测, 但监管部门、乳制品企业在面临巨大的检测压力下, 标准规定的检测技术远远无法满足实际检测的需要, 为了应对乳制品快速、准确检测的需求, 近年来我国的乳制品检测技术取得了长足的进步, 现综述如下。

1 乳制品化学性污染的检测

乳制品化学性污染多见于原料乳的掺假: 为了提高乳的蛋白含量, 向乳中添加三聚氰胺和皮革水解物; 为了乳及乳制品的保鲜, 向乳中添加硫氰酸钠; 为了避

收稿日期: 2012-09-19

基金项目: 上海市科委重点支撑计划项目(13430502400); 甘肃省科技支撑计划项目(1304FKCA056);

国家质检总局科技项目(GSCIQ_2010IK220)

作者简介: 刘程(1989—), 男, 硕士研究生, 研究方向为胶体金试纸条快速联检食源性致病菌。E-mail: liucheng0523@sohu.com

*通信作者: 刘箐(1970—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食源性致病菌致病机理及快速检测技术。E-mail: liuq@usst.edu.cn

免检测部门检测出乳中可能含有的抗生素,向乳中添加 β -内酰胺酶等。这一系列有毒有害物质的污染造成食用者急性中毒或慢性蓄积性中毒等危害,因此,为减少此类危害的发生,乳制品化学性污染的检测必不可少,下面简单介绍乳制品化学性污染检测技术。

1.1 色谱法

1.1.1 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法目前已经发展了多种不同的固定相,有多种不同的分离模式。刘震^[6]以离子对试剂缓冲液为流动相,选择240nm波长检测鲜乳制品中的三聚氰胺,能够准确快速地得到检测结果,同时加标回收率和灵敏度良好;吴剑平等^[7]运用高效液相色谱法检测牛奶中硫氰酸钠质量浓度,检测限可达到0.2mg/kg; Salman等^[8]通过高效液相色谱离子配对紫外检测法对不同浓度婴儿奶粉中的三聚氰胺进行鉴定和检测,最低检出限可达0.01 μ g/mL; Furusawa^[9]运用100%水流动相高效液相色谱-二极管矩阵检测器法检测三聚氰胺,具有较高的灵敏度和稳定性,总运行时间仅需8min,检出限范围为23~46ng/mL。高效液相色谱法具有检测灵敏度高、结果准确、检测范围广等特点,在化学污染的检测领域中是比较重要的一种检测技术,但该技术对仪器设备的要求较高。

1.1.2 色谱-质谱联用技术

色谱-质谱联用是为了提高色谱灵敏度衍生出的新技术,如液相色谱-质谱联用(LC-MS)、高效液相色谱-质谱联用(HPLC-MS)和气相色谱-质谱联用(GC-MS),由于乳制品样品处理相对简单,因此较早运用到乳制品有害成分的检测中。邢丽红等^[10]建立的高效液相色谱-串联质谱分析方法,通过检测三聚氰胺的含量间接地定量三聚氰胺,用乙腈和水提取样品中的三聚氰胺,乙腈二次去蛋白,10000r/min离心后,以电喷雾离子源负离子多反应监测模式进行质谱分析,用内标法定量,三聚氰胺在0.005~0.2 μ g/mL范围内线性关系良好,相关系数 $r>0.999$,液态奶类样品和奶粉的定量限均为0.2mg/kg。Kaklamanos等^[11]成功通过高效液相色谱串联质谱测定分析肉和乳中的氨苯砒,肉样和乳样的回收率分别为105%~117%和101%~108%。通过色谱法和质谱技术的联用,既能得到纯化的未知物,又能比较准确地分析未知待检物的分子结构,但色谱-质谱联用对仪器的要求较高,尤其GC-MS对色谱和质谱间仪器接口的要求更高,LC-MS对与溶剂沸点相近的组分较难检测。另外这些依赖于高端设备的检测技术虽然结果准确可靠,但无法在基层一线乳品检测部门普及,同时也存在检测效率低、无法现场检测等问题。

1.1.3 毛细管电泳法(CE)

毛细管电泳法是给分离通道毛细管施加高压直流电

场后所达到的新型液相分离技术,高效毛细管电泳(HPCE)是在高压电场的作用下,毛细管内的不同带电粒子以不同的速率在电泳介质中迁移,从而进行分析鉴定。卢日刚等^[12]通过固相萃取-毛细管电泳法测定了奶粉中三聚氰胺含量,向30mmol/L的硼砂缓冲液中加入15mmol/L的十二烷基硫酸钠,运行电压为15kV,压力进样为10s,柱温为25℃,200nm波长处检测波长,其结果表明三聚氰胺的线性范围20~50 μ g/mL,检出限为1 μ g/mL,定量限为2 μ g/mL。毛细管电泳法分离效率高、需样量少、分析速度较快,一般在1h以内,并通过多种不同的分离机制使该技术应用范围逐渐扩大,但不同的温度、毛细管长短粗细、运行时间长短和运行电压大小对其结果都有较大影响,运用于乳品实际检测有一定局限性。

1.2 分光光度法

分光光度法是在特定波长处或一定波长范围内测定被测物质的吸光值,达到对该被测物质进行定性和定量分析的方法。李卫群等^[13]通过分光光度法测定乳及乳制品中硫氰酸钠的含量,向样品中加三氯乙酸溶液和双氧水,在60℃水浴中进行蛋白沉淀,过滤,滤液用硝酸酸化,再用硫酸铁铵溶液进行显色,465nm波长处测吸光度,结果显示对奶粉的最低检出限为2mg/kg,对鲜奶的最低检出限为1mg/L;李琴^[14]通过分光光度法建立了检测原料乳中硫氰酸钠的方法,用三氯乙酸提取硫氰酸钠,与三价铁反应生成红色的络合物,用分光光度计测定其吸光度,再根据绘制的吸光度曲线确定硫氰酸钠的含量,结果显示该方法可用于原料奶中硫氰酸钠的快速检测。

L-羟脯氨酸是皮革水解物中胶原的特征性氨基酸之一,常采用分光光度法测定*L*-羟脯氨酸的含量,检测时间6h以上。张笑等^[15]对乳及乳制品中*L*-羟脯氨酸进行测定,检出限为2.1 μ g/g,回收率为91.6%~101.3%。Kim等^[16]通过分光光度法建立检测乳制品的*L*-羟脯氨酸-氯胺T法,其原理是游离的*L*-羟脯氨酸可以被氯胺T氧化,生成吡咯类化合物,该化合物在一定的温度条件下能与对二甲氨基苯甲醛生成红色化合物,在可见光波长条件下通过分光光度计来测定其质量浓度。该方法具有操作简单、实验成本低、分析周期短等优点,但该方法精确度和准确度较低,尚未在乳品检测中普及运用。

1.3 免疫学方法

1.3.1 酶联免疫吸附测定(ELISA)

ELISA原理是待检样品利用抗原和抗体的免疫反应和酶的催化作用进行定性和定量的检测技术,具有灵敏度高、特异性强、预处理简单、易于在基层推广等特点。目前用于临床检验的ELISA主要有双抗原夹心法测抗体、双抗体夹心法测抗原、间接法测抗体、竞争法测抗体、竞争法测抗原和捕获包被法测抗体6种类型。Yin Weiwei等^[17]制备三聚氰胺单克隆抗体,并在生

牛乳、奶粉和饲料中进行间接竞争ELISA法检测三聚氰胺,结果显示样品稀释度为1:9时最佳,原料乳检测限为0.1mg/L,奶粉为0.2mg/kg,饲料为0.5mg/kg,且回收率在79%~110%之间。Eric等^[18]通过购买的Abraxis试剂盒和Romer AgraQuant试剂盒对婴儿奶粉进行检测,结果显示,婴儿奶粉的检出限为0.2~3μg/g。王黎丽等^[19]建立间接和直接竞争ELISA检测三聚氰胺,间接竞争ELISA和直接ELISA检测法的IC₅₀分别为3.12μg/L和56.88μg/L,线性检测范围分别为0.05~10μg/L和0.1~1000μg/L,该研究结果还表明间接竞争ELISA比直接竞争ELISA灵敏度高。

Khatkhatay等^[20]通过酶免疫测定法(EIAs)测定β-内酰胺酶,并从精确性、准确性、敏感性和稳定性等方面对ELISA法的测定进行讨论与展望。Jiao Sainan等^[21]研制半抗原和广谱特异性抗体,并用于牛奶中青霉素类和四环素类的同时免疫测定。ELISA法检测范围从每升几微克到几百微克,与高效液相色谱灵敏度相当或略高,其灵敏度不及液相色谱-质谱法和气相色谱-质谱法,但ELISA法以免疫学为基础,不仅可以检测化学性物质,而且在生物性污染的检测中尤为重要,并且对实验仪器的要求不高,能更方便、广泛地应用于乳制品的检测。

1.3.2 免疫胶体金法

免疫胶体金法是以胶体金作为示踪标志物,用于抗原抗体免疫反应的一种标记技术。Li Xiangmei等^[22]通过单克隆抗体的制备,运用免疫胶体金试纸检测原料乳、乳制品及饲料中三聚氰胺的残留量,检测结果显示原料乳检测限为0.5μg/L,乳饮料、酸奶、炼乳和乳酪检测限为2μg/g,奶粉检测限为1μg/g,在研究中样品的预处理仅需3~10min,该检验试纸可以作为现场检测大量样品的方法。Robin等^[23]提出了一种新的纳米金免疫学检测方法,在化学发光系统的基础上利用鲁米诺硝酸银纳米金颗粒检测除草剂2,4-二氯苯氧乙酸,通过2,4-二氯苯氧乙酸抗体的制备并与不同的纳米金粒子结合进行实验,结果表明除草剂2,4-二氯苯氧乙酸的检测限为3ng/mL,这种新的免疫形式的方法可以快速检测杀虫剂,该研究为纳米金运用于化学小分子检测提供了新的思路。李洁等^[24]用免疫胶体金法对随机抽样的120件市场乳品检测三聚氰胺,其研究结果表明,用免疫胶体金法检测限达到0.5mg/kg,该方法稳定性好,并通过国标GB/T 22388—2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》对60份随机加入不同量三聚氰胺的杀菌乳和生鲜牛乳进行验证,与国标法检测结果相比,假阳性和假阴性均为0%。该方法具有可现场检测、成本低、易操作等优点,但无法进行定量检测,且环境温度、pH值对该方法的影响较大。

综上所述,乳制品中化学有害成分的检测技术包括

化学检测技术和生物免疫检测技术,其中化学检测对仪器、检测人员、检测成本等投入较高,基层检测单位难以普及,但检测灵敏准确,适用于检测结果的确认;免疫学方法快速、准确、易操作,适用于现场、大量样品的初步筛查,由于生物技术的快速发展,在检测领域会有更好的发展前景。ELISA法和免疫胶体金法在乳制品生物性污染方面也有广泛应用,此外,近年来发展起来的免疫磁珠方法,在乳制品检测中显现出巨大的潜力,该方法将在乳制品生物性污染的检测中进行阐述。

2 乳制品生物性污染的检测

2.1 分子免疫学方法

2.1.1 定量PCR

目前定量PCR技术的方法有多种,主要包括:PCR产物的直接定量、竞争性PCR定量、实时定量PCR和实时荧光定量PCR。Singh等^[25]建立实时荧光定量PCR对60个超市原料乳和冰激凌样品中沙门氏菌和李斯特氏菌同时检测,6h的样品预浓缩使得检测灵敏度提高到 1×10^4 CFU/mL,结果显示有1个样品被检测出阳性,该实验中李斯特氏菌和沙门氏菌的检测没有交叉反应。Wang Xiang等^[26]建立了结合内部扩增控制的TaqMan探针实时定量PCR方法,实验中阪崎肠杆菌特异性检测没有交叉反应,92个样品中检测出2个阳性结果,相比国际标准化组织(ISO)标准方法更准确。

在TaqMan探针的基础上,衍生出分子信标的方法,相比常规PCR敏感性更高。李雪玲等^[27]通过建立分子信标实时定量PCR技术检测婴幼儿乳粉中阪崎肠杆菌,向PCR反应体系加入分子信标探针,探针的5'端标记FAM,3'端标记TAMRA,结果显示该方法特异性强,无非特异性扩增,纯阪崎肠杆菌菌液的检出限为 10^2 CFU/mL。Singh等^[28]又建立了同时检测单细胞增生李斯特氏菌和沙门氏菌的分子信标-双重实时定量PCR的分析方法,对60个样品进行检测,其中1份冰激凌样品中检测出沙门氏菌,1份鲜奶样品中检测出单细胞增生李斯特氏菌,该方法对2种菌的最低检测限为 1×10^1 CFU/mL,并通过微生物学方法验证结果证明分子信标-双重实时定量PCR可以有效应用于实际检测中。

2.1.2 多重PCR

多重PCR又称多重引物PCR,它是在同一PCR反应体系里加入两对或两对以上的引物同时扩增出多个核酸片段的PCR反应,该方法高效、成本低、速度快。遇晓杰等^[29]建立多重PCR同时检测食品中大肠杆菌O157:H7、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌和蜡芽孢杆菌的多重PCR快速检测方法,整个检测过程少于30h,且检测灵敏度均可达 10^2 CFU/mL。Kawasaki等^[30]通

过优化样品的预处理、DNA萃取和多重PCR条件,开发了一种多重PCR试剂盒检测单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌和大肠杆菌O157:H7。

根据多重PCR衍生出多重PCR结合高效液相色谱(MPCR-HPLC)的技术方法,该方法主要通过调节乙腈浓度,使核酸片段按分子质量的大小顺序被依次洗脱出来,避免了繁琐的琼脂糖凝胶电泳,而且具有自动化程度高和高通量检测的优点。Xu Yigang等^[31]建立MPCR-HPLC检测6种食源性致病菌,实验过程中将PCR产物进行高效液相色谱分析,每个PCR产物独特的峰代表相应的菌株。

然而,多重PCR在二十几年的发展内,随着反应体系内引物数量增加,错误引发扩增和引物相互干扰的机会大大增加,出现多个靶点扩增条件不兼容且扩增背景过高等问题,为此,美国iCubate公司研发了扩增子拯救多重PCR(arm-PCR)技术,设计出一次性全封闭卡盒及其配套的iCubate全自动多重微生物核酸检测系统^[32],解决了靶点不兼容等问题。

2.1.3 PCR-ELISA技术

PCR-ELISA技术是通过ELISA固相载体包被亲和素,并与生物素标记的探针通过交联作用结合,该探针与生物素等抗原标记的PCR扩增产物互补,使扩增产物固定在固相载体上,加入相应抗原的酶标抗体,经酶标显色达到定量检测的方法。曹玮等^[33]以单细胞增生李斯特菌的致病基因*hlyA*为基础,设计PCR引物,获得单细胞增生李斯特菌特异的地高辛标记片段,根据PCR目的片段序列,设计特异性捕获探针,建立单细胞增生李斯特菌PCR-ELISA快速检测方法,结果显示,经过12h的增菌培养,PCR-ELISA方法最低可从25mL样品中检出1CFU,检测敏感性为传统PCR方法的10~100倍。Metzger-Boddien等^[34]用沙门氏菌特异的PCR-ELISA试剂盒进行食物样品的模拟代菌实验,结果与标准的分离培养方法符合率高达98%。Kuo等^[35]通过PCR-ELISA法分析检测饮用水中的大肠杆菌。该技术将PCR和ELISA这两种高度敏感性方法结合起来,具有探针和引物双重的特异性,相对而言达到了PCR的定量检测,但步骤较多,相比传统PCR法繁琐。

2.1.4 免疫磁珠-PCR(IMB-PCR)

免疫磁珠(IMB)由抗体或抗原包被在磁性微球上构成,具有免疫反应的高度专一性,免疫磁珠与相对应的抗原或抗体结合后形成免疫复合物,在磁场条件下与其他物质快速分离,从而达到快速特异性分离纯化靶配体的作用。王晓闻等^[36]通过IMB-PCR方法检测沙门氏菌,筛选最佳的包被液和包被条件,用包被有抗沙门氏菌抗体的磁珠捕获待检样品中的沙门氏菌,进行PCR检测,结果显示检测灵敏度为9CFU/mL,所用时间为

7h,该方法操作简便、用时短、检出率高。Panneerseelan等^[37]建立了IMB-PCR信号扩增法检测食品中的沙门氏菌肠毒素,实验中用1-乙基-3-碳二亚胺试剂将抗金黄色葡萄球菌肠毒素A(SEA)和抗毒素B(SEB)抗体涂在羧基修饰的磁珠上,结果显示,通过免疫磁珠捕获、富集的作用,IMB-PCR检测食品中SEA和SEB的检出限可达到 7.5×10^6 ng/g。

2.2 环介导等温扩增(LAMP)技术

环介导等温扩增(LAMP)技术是一种新的核酸等温扩增技术,针对靶基因的6个区域设计4种特异引物,在特定恒温条件下核酸扩增在1h内即可完成,目前已在食品安全检测、生物学和临床医学等领域中应用。胡惠秩等^[38]综述了LAMP技术对乳中金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌、沙门氏菌、大肠杆菌和单细胞增生李斯特菌检测的应用。袁耀武等^[39]运用LAMP技术检测单核细胞增生李斯特菌,检测中以FTA滤膜提取的细菌DNA作为模板进行扩增,对12株菌进行LAMP检测,结果显示无交叉反应,灵敏度为 7.3×10^1 CFU/mL,该方法灵敏度高、特异性好,不需要复杂昂贵的仪器,对基层或经济不发达地区开展有实际意义。

近年来,国内外众多研究者将环介导等温扩增技术与横向流动试纸条法(LFD)结合起来建立新的方法(LAMP-LFD),将荧光素标记的探针与生物素标记的LAMP扩增产物进行特异性杂交,胶体金标记抗荧光素抗体,与杂交产物形成三元复合物,试纸条检测线处包被抗生物素抗体,三元复合物通过检测线被抗生物素抗体捕获并固定在检测线处,从而得到检测结果。Zablon^[40]通过LAMP-LFD技术对非洲人锥虫病进行快速检测,结果表明LAMP-LFD法灵敏度与凝胶电泳和SYBR Green I染料水平是相同的,但该方法避免了琼脂糖凝胶电泳或荧光染色肉眼观察由非特异性扩增造成的假阳性,进一步提高了反应的特异性和灵敏度,该方法成功地用于传染性肌肉坏死病毒^[41]、对虾白斑症病毒^[42]、桃拉病毒^[43]等养殖动物病毒性病原的检测,但目前该技术在乳品生物性污染的检测中未见报道。

2.3 生物芯片

2.3.1 基因芯片(gene chip)

基因芯片(gene chip)是基于核酸互补杂交原理研制的,固相基质上高度集成成千上万的网络状的密集排列的基因探针。黎昊雁等^[44]针对12种常见食源性致病菌,建立了可见光基因芯片技术,28例样本中有26例与常规培养方法结果完全一致,符合率达到92.9%。Cremonesi等^[45]建立一种新的基因芯片技术,基于耦合一个通用阵列结扎检测反应,用于检测和分析乳样中的病原微生物,对50份奶样进行检测,结果显示特异性高,灵敏度低于 6×10^{-15} mol。Chizhikov等^[46]建立基因芯片检测系

统,将与食源性致病菌相关的6种毒力因子通过多重PCR进行扩增,然后和芯片杂交进行鉴定。Call等^[47]建立了一种对多重PCR扩增肠出血性大肠杆菌的产物进行鉴定的基因芯片,该方法将PCR、免疫诱捕技术以及基因芯片技术相结合,对鸡肉中的致病菌进行检测,检测限低于 10^2 CFU/mL。

2.3.2 蛋白质芯片

蛋白质芯片将抗原或抗体微阵列固定在不同种类介质上,阵列中固定分子的位置及组成是已知的,用标记的抗体或抗原与芯片上的探针进行反应,并扫描检测,由计算机分析处理得到结果。蛋白芯片具有准确性高、特异性高、操作简单、高通量、快速检测等特点。田世民等^[48]发明一种快速检测食品中真菌毒素的蛋白质芯片专利,将制备的几种待检测真菌毒素固定于固相载体上,并采用竞争法检测样品中真菌毒素,根据绘制的标准曲线对待检测真菌毒素定量分析;Ewalt等^[49]将蛋白芯片与电子技术结合,建立检测葡萄球菌肠毒素B和霍乱毒素B的电子芯片,并通过电子活性分析芯片。蛋白芯片多用于临床医疗和疾病诊断,在乳制品及食品检测方面研究报道较少^[50]。

3 结 语

乳及乳制品常见有害物质的检测技术中,基于物理、化学建立的色谱法、色谱-质谱联用法等都已成熟的应用于检测领域,具有检测结果准确、灵敏度高、范围广等特点,可以对待检物质进行定性和定量检测,但该类技术对设备的要求和检测费用都比较高,这也是制约这类检测方法在实际检测工作中普及和应用的主要原因,但随着经济的发展,这类技术所依靠的仪器设备将会被逐渐引进到各个地方和企业的检测部门,使此类检测方法更广泛、更好地应用于检测中;在免疫学基础上发展起来的ELISA技术与传统的检测方法相比,具有准确、快速、操作简单、可同时检测大量样品等特点,但该技术影响因素较多,抗体对其灵敏度、准确度影响尤为重要,结构类似物也会引起不同程度的交叉反应,在未来应用中对提高灵敏度、降低各因素影响、标准化规范操作规程等方面有待进一步探索;在免疫学基础上建立的免疫胶体金法,以其检测快速、检测成本低、适合现场检测等特点在检测领域中快速发展,但该技术在检测大量、多种样品时受到了很大制约,1次实验只能单一对1个待检物进行检测,这无疑增大了进行检测的工作量和检测成本,在未来的研究中,该技术会向着高灵敏度、多重检测等方向发展;在生物化学基础上发展起来的常规PCR技术虽然只能作为定性检测,但其高度特异性的特点使该方法与多种技术、多种学科交叉联合

应用,实现了PCR的定性、定量检测,并且具有检测灵敏、准确、快速等优点;基因芯片具有高效、高特异性等特点,但在乳制品检测方面尚存在诸多问题,如不仅需要昂贵的制作试剂、仪器等,而且在结果表达、分析等方面也需要投入昂贵的设备、软件等,这使得基因芯片在检测领域中的普及和应用受到了很大的制约;基于免疫学技术的蛋白芯片,如熊亮斌等^[51]研制的可视化抗体芯片,具有高通量、低成本、操作简便、快速灵敏、对设备人员要求低等优点,也是蛋白芯片在乳制品以及整个食品安全快速检测领域的重要发展方向。

在各个学科交叉研究应用的背景下,虽然创新出了许多具有检测准确、灵敏、检测限小、重现性好等特点的检测技术,但部分技术操作复杂、仪器设备要求高、运行成本高等问题,这也是新技术和新方法在监管部门、乳品企业乃至整个食品企业较难普及应用的因素之一,也是未来乳制品安全检测技术研究重点解决的问题。

参考文献:

- [1] KORYCKA-DAHL M, RICHARDSON T, BRADLEY J R. Use of microbial β -lactamase to destroy penicillin added to milk[J]. *Journal of Dairy Science*, 1985, 68(8): 1910-1916.
- [2] 关于公布2011年17类产品质量监督抽查结果的公告[EB/OL]. (2011-12-23) [2013-01-26]. http://www.aqsiq.gov.cn/ztlm/cpzlcc-gg/2010/201112/t20111224_205610.htm.
- [3] 樊永祥, 严卫星. 三聚氰胺奶粉事件对我国食品安全管理体系建设的启示[J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21(3): 203-204.
- [4] 冯家望, 余以刚, 欧阳颖瑜, 等. 食品中三聚氰胺的检测技术现状与展望[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(10): 1048-1050.
- [5] 中国品牌与防伪编辑部. 雀巢等婴幼儿食品重金属超标[J]. *中国品牌与防伪*, 2011(5): 75.
- [6] 刘震. 鲜乳制品中三聚氰胺的高效液相色谱法检测[J]. *科技创新与应用*, 2012(1): 27.
- [7] 吴剑平, 顾欣, 李丹妮, 等. 高效液相色谱法检测牛奶中硫氰酸钠质量浓度[J]. *中国乳品工业*, 2011, 39(7): 44-46.
- [8] SALMAN M, ESSA H, MOHAMED SA, et al. Identification and determination of melamine in milk by high performance liquid chromatography-UV detector[J]. *Der Pharma Chemica*, 2012, 4(2): 737-748.
- [9] FURUSAWA N. A 100% water mobile phase HPLC-PDA analysis of melamine and related analogues[J]. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 3: 295-299.
- [10] 邢丽红, 孙伟红, 苗钧魁, 等. LC-MS/MS内标法测定乳制品中的三聚氰胺[J]. *食品科学*, 2011, 32(4): 143-147.
- [11] KAKLAMANOS G, GEORGIOU T. Determination of dapsone in muscle tissue and milk using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60: 29-35.
- [12] 卢日刚, 梁佳. 固相萃取-毛细管电泳法测定奶粉中三聚氰胺的含量[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(4): 423-425.
- [13] 李卫群, 单胜艳, 朱慧. 分光光度法测定乳与乳制品中硫氰酸钠的含量[J]. *中国食品添加剂*, 2010(3): 240-243.
- [14] 李琴. 原料乳中硫氰酸钠的检测研究[J]. *生命科学仪器*, 2010, 8(2): 23-24.
- [15] 张笑, 刘杰, 黄明娟. 乳及乳制品中L-羟脯氨酸的测定[J]. *中国乳品工业*, 2010, 38(10): 52-59.

- [16] KIM J Y, SEUNG J P, YUN K J, et al. Isoliquiritigenin isolated from the roots of glycyrrhiza uralensis inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- κ B in RAW 264.7 macrophages[J]. European Journal of Pharmacology, 2008, 584: 175-184.
- [17] YIN Weiwei, LIU Jinting, ZHANG Taichang, et al. Preparation of monoclonal antibody for melamine and development of an indirect competitive ELISA for melamine detection in raw milk, milk powder, and animal feeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: 8152-8157.
- [18] ERIC A E G, VICKERY A B. Enzyme-linked immunosorbent assay detection of melamine in infant formula and wheat food products[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(4): 701-707.
- [19] 王黎丽, 陈芳芳, 吴超, 等. 基于单克隆抗体的三聚氰胺ELISA检测方法的建立[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(6): 962-966.
- [20] KHATKHATAY M, MEENA D. A comparison of performances of four enzymes used in ELISA with special reference to β -lactamase[J]. Journal of Immunoassay, 1999, 20(3): 151-183.
- [21] JIAO Sainan, LIU Jing, ZHANG Yifen, et al. Preparation of a bi-hapten antigen and the broadspecific antibody for simultaneous immunoassay of *Penicillins* and *Tetracyclines* in milk[J]. Food and Agricultural Immunology, 2012, 23(3): 273-287.
- [22] LI Xiangmei, LUO Pengjie, TANG Shusheng, et al. Development of an immunochromatographic strip test for rapid detection of melamine in raw milk, milk products and animal feed[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(11): 6064-6070.
- [23] ROBIN C B, JYOTSNA K, YOGESH N, et al. Gold nanoparticles catalyzed chemiluminescence immunoassay for detection of herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. Analyst, 2011, 136: 2125-2130.
- [24] 李洁, 赵宇翔, 彭少杰, 等. 免疫胶体金法现场快速测定乳品中的三聚氰胺的应用研究[J]. 乳业科学与技术, 2010(3): 128-130.
- [25] SINGH J, VIRENDER K B, SUNTIA G. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products using real time PCR-melt curve analysis[J]. Food Science and Technology, 2012, 49(2): 234-239.
- [26] WANG Xiang, ZHU Changqing, XU Xinglian, et al. Real-time PCR with internal amplification control for the detection of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in food samples[J]. Food Control, 2012, 25: 144-149.
- [27] 李雪玲, 陈勇, 张莉, 等. 阪崎肠杆菌ZPX基因的分子信标-实时PCR技术研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(1): 30-33.
- [28] SINGH J, VIRENDER K B, SUNTIA G. Molecular beacon based real-time PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products[J]. Dairy Science & Technology, 2011, 91(3): 373-382.
- [29] 遇晓杰, 薛成玉, 吕琦, 等. 食品中5种致病菌多重PCR快速检测技术的建立与应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 398-401.
- [30] KAWASAKI S, FRATAMICO P M, KAMISAKI-HORIKOSHI N, et al. Development of the multiplex PCR detection kit for *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* O157:H7[J]. Journal of the Association for Research in Otolaryngology, 2011, 45(1): 77-81.
- [31] XU Yigang, CUI Lichun, TIAN Changyong, et al. A multiplex polymerase chain reaction coupled with high performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens[J]. Food Control, 2012, 25(2): 778-783.
- [32] 奥科迪. 全新的扩增子拯救多重PCR(arm-PCR)技术及其应用生物通-iCubate全自动多重微生物核酸检测系统[EB/OL]. (2012-04-01) [2012-08-25]. <http://www.ebiotrade.com/news/2012-3/2012331163247557.htm>.
- [33] 曹玮, 王宁, 王晓英, 等. 单增李斯特菌PCR-ELISA快速检测技术研究[J]. 卫生研究, 2009, 38(6): 662-666.
- [34] METZGER-BODDIEN C, BOSTEL A, KEHLE J. An DiaTec *Salmonella* sp. PCR-ELISA for analysis of food samples[J]. Journal of Food Protection, 2004, 67(8): 1585-1590.
- [35] KUO J T, CHENG C Y, HUANG H H, et al. A rapid method for the detection of representative coliforms in water samples: polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA)[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2010, 37(3): 237-244.
- [36] 王晓闻, 杨永莉. 免疫磁珠捕获-PCR检测牛乳中沙门氏菌的研究[J]. 陕西农业大学学报, 2009, 29(4): 289-293.
- [37] PANNEERSEELAN L, MURIANA P M. An immunomagnetic PCR signal amplification assay for sensitive detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in foods[J]. Journal of Food Protection, 2009, 72(12): 2538-2546.
- [38] 胡惠秋, 满朝新, 蒋亚男, 等. LAMP技术在检测原料乳及乳制品致病菌方面的应用[J]. 中国乳品工业, 2011, 39(6): 55-57.
- [39] 袁耀武, 张亚爽, 马晓燕, 等. LAMP检测单核细胞增生性李斯特氏菌的研究[J]. 中国食品学报, 2009, 9(3): 168-172.
- [40] ZABLON K N. Rapid and sensitive detection of human african trypanosomiasis by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral-flow dipstick[J]. Diagnostic Microbiology & Infectious Disease, 2011, 69(2): 205-209.
- [41] PUTHAWIBOOL T, SENAPIN S, KIATPATHOMCHAI W, et al. Detection of shrimp infectious *myonecrosis* virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Journal of Virological Methods, 2009, 156(1/2): 27-31.
- [42] JAROENRAM W, KIATPATHOMCHAI W, FLEGEL T W. Rapid and sensitive detection of white spot syndrome virus by loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Molecular and Cellular Probes, 2009, 23(2): 65-70.
- [43] KIATPATHOMCHAI W, JAROENRAM W, ARUNRUT N, et al. Shrimp taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 153(2): 214-217.
- [44] 黎昊雁, 章国祥. 十二种食源性致病菌可见光基因芯片检测方法的建立[J]. 检验检疫学刊, 2009, 19(3): 17-21.
- [45] CREMONESI P, PISONI G, SEVERGNINI M, et al. Pathogen detection in milk samples by ligation detection reaction-mediated universal array method[J]. Journal of Dairy Science, 2009, 92(7): 3027-3039.
- [46] CHIZHIKOV V, RASOOLY A, CHUMAKOV K, et al. Microarray analysis of microbial virulence factors[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(7): 3258-3263.
- [47] CALL D R, CHANDLER D, BROCKMAN F. Fabrication of DNA microarrays using unmodified oligonucleotide probes[J]. Genotyping Techniques, 2001, 30: 368-379.
- [48] 田世民, 李娇, 金涌, 等. 一种用于快速检测农产品、食品中真菌毒素的蛋白芯片及其制备方法: 中国, 201010570082.5[P]. 2011-06-15.
- [49] EWALT K L, ROBERT W H, REGINA R, et al. Detection of biological toxins on an active electronic microchip[J]. Analytical Biochemistry, 2001, 289(2): 162-172.
- [50] 梁建功, 何治柯. 蛋白质芯片及其分析应用新进展[J]. 分析化学, 2004, 32(2): 244-247.
- [51] 熊亮斌, 高丽萍, 刘箐, 等. 应用蛋白宏阵列快速检测西瓜细菌性果斑病菌[J]. 植物病理学报, 2011, 41(4): 432-436.