

直接竞争酶联免疫吸附法检测食品中 三聚氰胺残留

樊晓博^{1,2*}

(1. 渭南职业技术学院护理学院, 渭南 714000; 2. 渭南市农产品食品检验检测研究中心, 渭南 714000)

摘要: **目的** 采用酶标抗原建立高效、高灵敏的三聚氰胺直接竞争酶联免疫吸附法(direct competitive enzyme linked immunosorbent assay, dc-ELISA)检测食品中三聚氰胺(melamine, MEL)残留。**方法** 以三聚氰胺单克隆抗体包被作为固相抗体, 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的抗原与标准品(或样品)中三聚氰胺竞争结合抗体, 建立了直接竞争酶联免疫检测体系, 以三聚氰胺标准品建立标准曲线进行定量。**结果** 方法的 IC_{50} 为8.84 $\mu\text{g/L}$, 灵敏度为0.65 $\mu\text{g/L}$, 线性范围0.9~35 $\mu\text{g/L}$; 检测样品的回收率在70%~120%之间, 与三聚氰酸交叉反应率为60%, 其他结构类似物基本无交叉反应。**结论** 本方法灵敏度高、特异性强, 可以满足实际样品的快速检测需求。

关键词: 三聚氰胺; 酶标抗原; 直接竞争酶联免疫吸附法

Detection of melamine in food by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay method

FAN Xiao-Bo^{1,2*}

(1. Nursing College, Weinan Vocational & Technical College, Weinan 714000, China; 2. Weinan Testing & Inspection and Research Center of Agricultural Products and Food, Weinan 714000, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid, high sensitive method to detect melamine (MEL) residues in food by direct competitive enzyme linked immunosorbent assay (dc-ELISA). **Methods** The MEL antigen was labeled by horseradish peroxidase (HRP), monoclonal antibody was bounded on the surface of a micro titer plate, the standards (or the samples) competed with MEL antigen for the antibody binding sites, a dc-ELISA was established, and the standard curve of melamine was prepared for quantitative analysis. **Results** The IC_{50} of dc-ELISA was 8.84 $\mu\text{g/L}$, the limit of detection was 0.65 $\mu\text{g/L}$, the linear detection ranges were 0.9–35 $\mu\text{g/L}$, the recoveries of all kinds of samples were range from 70.0% to 120%, and the cross reaction with cyanuric acid was 60%, and there was almost no cross reaction with other drugs with similar construction. **Conclusion** The established method is sensitive and specific, which can meet the rapid detection demand of actual samples.

KEY WORDS: melamine; enzyme labeled antigen; direct competitive enzyme linked immunosorbent assay

*通信作者: 樊晓博, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: shine2786@163.com

*Corresponding author: FAN Xiao-Bo, Master, Lecturer, Weinan Testing & Inspection and Research Center of Agricultural Products and Food, Weinan Vocational & Technical College, Weinan 714000, China. E-mail: shine2786@163.com

0 引言

三聚氰胺(melamine, MEL)是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,分子中含有大量氮元素^[1],又被称为蛋白精^[2]。三聚氰胺作为一种化工原料,不能作为食品添加剂加入食品中^[3-4]。但一些不法分子为牟取暴利,提高食品中蛋白质的检测值,在牛奶、畜禽饲料中添加三聚氰胺,造成牛奶及奶制品、各种饲养肉类及蛋类等动物性食品中三聚氰胺残留严重超标^[5]。世界卫生组织规定人体三聚氰胺的每日耐受摄入量为 0.2 mg/kg·BW^[6],超过此标准将可能引起肾脏、泌尿系统的健康问题,如膀胱和肾脏中形成泥沙样结晶或结石^[7]。不同人群对三聚氰胺存在不同的反应,由于婴幼儿的生理结构和饮食结构与成人明显不同^[8],婴幼儿时期如果摄入含有三聚氰胺的奶粉除了容易引起泌尿系结石^[9-10],还会造成严重的营养不良,影响婴幼儿正常生长发育^[11-12]。2008 年三聚氰胺毒奶粉事件对国产奶粉的影响延续至今^[13]。

目前,针对食品中三聚氰胺残留量检测方法主要有仪器法和免疫法。仪器法包括高效液相色谱法^[14]、液相色谱-质谱联用法^[15]和气相色谱-质谱联用法等^[16],但仪器设备昂贵,操作烦琐,对操作员要求较高,不适合基层监督管理。免疫法主要包括酶联免疫法^[17]和胶体金层析法^[18],免疫法基于抗原抗体反应,特异性高,操作简单、准确,前处理简单,弥补了仪器法的不足,非常适用于样品快速筛查。目前市场中三聚氰胺酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测主要采用进口试剂盒^[19]。进口试剂盒价格比较昂贵,检测成本高。国内 ELISA 技术在检测三聚氰胺残留方面的研究多采用间接竞争的方法,其检测灵敏度和稳定性不如高效液相色谱法及其联用技术^[20]。本研究通过酶标记抗原,固相包被抗体,建立直接竞争 MEL-ELISA 检测方法,并通过实际样品检测验证方法的准确性,以期提高三聚氰胺残留量检测方法的稳定性和灵敏度,希望后期通过大批量、商品化生产,为三聚氰胺的检测提供快速准确的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

三聚氰胺(99%)、三聚氰酸(98%)、环丙氨嗪(97%)、阿特拉津(99%)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) (250 U/mg)、牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA); 卵清蛋白(ovalbumin, OVA) (美国 Sigma 公司); 三聚氰胺试剂盒(美国 Reagen 公司); MEL-OVA、抗 MEL 单克隆抗体(本实验室自制); 96 孔微量反应板(美国 Costar 公司); 乙腈、正己烷、甲醇、盐酸、醋酸钠、乙酸、乙二醇、过碘酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠(分析纯,天津市康

科德科技有限公司)。

虾肉、鱼肉、鸡肉、猪肉、牛奶、全蛋均购于本地超市; 饲料样品(安徽宜源农牧科技有限公司),经高效液相色谱测定为阴性样品。

1.2 仪器与设备

G16-2 恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司); P200 微量可调移液枪(法国 Gilson 公司); Well wash MK-2 洗板机、MK-3 酶联免疫检测仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ZWF-211 往复式大容量恒温摇床(上海智城分析仪器制造有限公司); 1-13 型快速离心机(美国 Sigma 公司); dc-12 型水浴氮吹仪(上海安普科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 MEL 标准曲线的配制

MEL 以甲醇配制质量浓度为 10 mg/L 溶液,用 20% 甲醇稀释到 1 mg/L 作为标准储备液。使用前配制质量浓度梯度为 0、1、3、9、27、81 $\mu\text{g/L}$ 的 MEL 标准工作溶液。

1.3.2 抗原的制备

通过戊二醛法将三聚氰胺半抗原与载体蛋白 BSA 和 OVA 分别偶联,获得免疫抗原 MEL-BSA 和包被抗原 MEL-OVA,通过偶联物的紫外光图谱,判定其偶联是否成功。

1.3.3 抗 MEL 单克隆抗体制备

通过免疫抗原 MEL-BSA 免疫 BALB/c 小鼠,将产生抗体的小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞进行融合,多次筛选培养得到抗 MEL 单克隆细胞。

1.3.4 MEL-OVA 酶标记物的制备

用 0.2 mol/L 醋酸盐缓冲液(pH 5.6)配制 5 mg/mL HRP,加入 0.5 mL 新配制的 0.1 mol/L 过碘酸钠溶液,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱反应 30 min。反应完成后,加 0.5 mL 2.0% 的乙二醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。将 0.5 mL、3 mg/mL MEL-OVA (20% 甲醇溶解)溶液加入到活化后的酶溶液中混匀,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 先用蒸馏水透析 2 次,0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4)透析 2 d。透析完毕后取出,3000 r/min 离心 30 min,弃沉淀,留上清液即为酶标记物。

1.3.5 固相包被抗体制备

将单克隆抗体用碳酸盐缓冲液(pH 9.6)稀释至适宜浓度,96 孔微孔板每孔各加入 200 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,弃去包被液,加入封闭液,每孔 220 μL ,封闭 3 h。弃去封闭液,烘干,备用。

1.3.6 酶标记物效价测定

将标记好的酶标记物从 1:200 (V:V)开始倍比稀释,包被抗体板条中每孔依次加入 100 μL 倍比稀释的酶标记物,室温避光反应 1 h,加入显色液 100 μL 反应 20 min,终止后,在波长 450 nm 处测定每孔吸光值。以蒸馏水为空白对照。

1.3.7 反应条件优化

将单克隆抗体以 1:2000、1:4000、1:8000、1:12000、

1:16000的5种稀释度包被,加入100 μL标准品和100 μL MEL-OVA 酶标记物,确定最佳包被稀释度。用最佳包被稀释度包板,加入100 μL标准品和100 μL质量浓度为0.1、0.4、0.8、1.2、1.6 mg/L的酶标记物,确定最佳的酶标记物浓度。

1.3.8 直接竞争 ELISA 操作步骤

取包被好的板条,加入100 μL标准品(或处理好的样品)到相应的微孔中,加入分析缓冲液稀释的酶标记物100 μL,室温(25 °C)避光反应30 min,将微孔中的反应液排出清洗3次。在每一微孔加入底物溶液100 μL后,在室温下避光静置20 min。每一微孔加入100 μL反应终止液,酶标仪以单波长450 nm或双波长450 nm/650 nm判读。

1.3.9 样品处理

组织样品(鱼肉、虾肉、鸡肉):取2.0 g均匀组织样本于50 mL离心管,加入8 mL乙腈-0.1 mol/L NaOH充分振荡5 min,4000 r/min以上离心10 min,取2 mL上清液在60 °C氮气流下完全干燥,用1 mL正己烷溶解干燥残留物,再加入1 mL 20%甲醇复溶,离心去除上层正己烷相待测。

生乳:3000 r/min离心10 min,避开上层乳脂,取下层液2 mL置入离心管,加入8 mL乙腈-0.1 mol/L NaOH充分振荡5 min,4000 r/min以上离心10 min,取2 mL上清液在60 °C氮气流下完全干燥。其他步骤同组织样。

饲料:称取2.0 g研碎的饲料样品,加入2 mL 1 mol/L HCl,加入16 mL去离子水均质,旋流3 min,振荡5 min,4000 r/min离心15 min,取出10 mL上清液并用1 mol/L NaOH将pH值调至6~8。4000 r/min离心15 min,取上清液,20%甲醇10倍稀释待测。

蛋类:均质器低速均匀样本,称取2.0 g均质样本,加入8 mL乙腈-0.1 mol/L NaOH充分振荡5 min,4000 r/min离心10 min,取1 mL上清液60 °C氮气流下完全干燥,1 mL正己烷溶解干燥残留物,加入1 mL 20%甲醇混合,离心去除上层正己烷相,取下层相用20%甲醇3倍稀释待测。

1.3.10 方法学考查

灵敏度:以10%抑制率的对应浓度作为最低检测限(limit of detection, LOD),抑制率20%~80%作为定量线性检测范围,计算方法参见公式(1)。

$$\text{抑制率} / \% = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

公式中: B 为标准溶液或样本溶液的平均吸光度值; B_0 为0浓度空白的平均吸光度值。

特异性:将MEL的结构类似物三聚氰酸、环丙氨嗪和阿特拉津配成不同质量浓度的溶液,采用ELISA法检测其半抑制浓度(50% inhibiting concentration, IC_{50}),按公式(2)计算交叉反应率。

$$\text{交叉反应率} / \% = \frac{IC_{50}(\text{MEL})}{IC_{50}(\text{结构类似物})} \times 100\% \quad (2)$$

精密性:取10块包被好酶标板,每块板随机取10微孔测定9 μg/L标准溶液吸光值,进行板间、板内差异分析。

回收率:向各种阴性样品中分别添加不同质量浓度的MEL标准品,处理后用ELISA方法检测,每个浓度作3个平行测定。

1.3.11 进口试剂盒检测结果对比

以美国 REAGEN 试剂盒和本研究建立的方法检测相同的样品,计算美国 REAGEN 试剂盒检测样品的回收率,以进口试剂盒检测结果为参考计算试剂盒样品检测回收率。

2 结果与分析

2.1 HRP-MEL-OVA 酶标记物效价测定

效价的测定是判定酶标记物标酶活力高低的重要指标。酶标记物浓度微小变化,可导致实验结果产生很大的波动。如果酶标记浓度过高,可使非特异性反应增加,反之浓度过低又可影响测定的敏感性。因此,必须确定其工作浓度在合理的范围内。由图1可知,酶在标记抗原以后,酶活损失较小,标记后酶活力较高,酶标记物效价在1:130000以上,可以满足后期检测的要求。

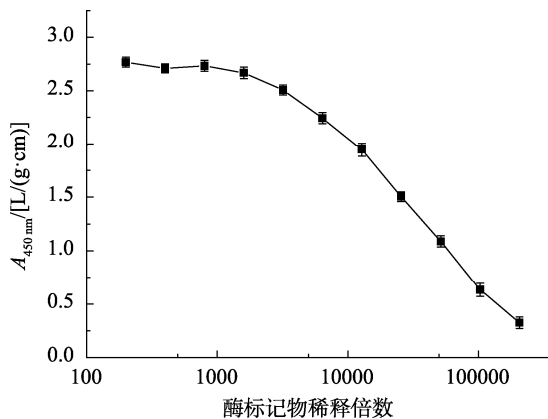


图1 酶标记物效价曲线($n=3$)

Fig.1 Titer determination curve of enzyme labeled antigen ($n=3$)

2.2 反应条件优化

2.2.1 包被缓冲液的优化

为了评价不同pH的缓冲体系对包被效果的影响,以最高OD值(A_{max})、 IC_{50} 和 A_{max}/IC_{50} 为综合参考指标,对比0.05 mol/L的pH 9.6的碳酸盐缓冲液、pH 7.6的磷酸盐缓冲液和pH 7.6的Tris-盐酸缓冲液3种包被液的包被效果。由表1可知,与其他2种缓冲液相比,pH 9.6的碳酸盐缓冲液作为包被液时, A_{max} 数值适宜, IC_{50} 最小,体系的灵敏度最高,因此选择0.05 mol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲液作为抗体包被液。

表 1 包被液的优化
Table 1 Optimization of coating buffer

评价指标	缓冲溶液		
	碳酸盐缓冲液	磷酸盐缓冲液	Tris-盐酸缓冲液
A_{max}	1.876	1.642	1.545
IC_{50}	8.43	9.35	10.76
A_{max}/IC_{50}	0.22	0.18	0.14

2.2.2 最佳抗体稀释度的确定

以最高 OD 值(A_{max})、 IC_{50} 和 A_{max}/IC_{50} 为综合参考指标, 由图 2 可知, 最高 OD 值与包被抗体浓度呈正比, 抗体浓度过高时, 抗体与酶标抗原结合过多, 方法的灵敏度下

降。当抗体稀释度 1:8000 时, 与稀释度为 1:12000 时 IC_{50} 比较接近, 但稀释度表示灵敏度的 A_{max}/IC_{50} 数值最大, 灵敏度最高, 其最高 OD 值也在适宜的范围内, 所以选择包被抗体的稀释度为 1:8000。

2.2.3 最佳酶标抗原浓度确定

选择包被抗体稀释度为 1:8000, 选择不同浓度的酶标抗原做直接竞争 ELISA 实验, 结果如图 3 所示。随着酶标抗原的浓度上升, 最高 OD 值随之变大, 在酶标抗原浓度为 0.8 mg/L 时, A_{max} 值在适宜的范围内, IC_{50} 值最小, A_{max}/IC_{50} 最大, 此浓度下体系的灵敏度最高。故选择此浓度为最佳的酶标抗原浓度。

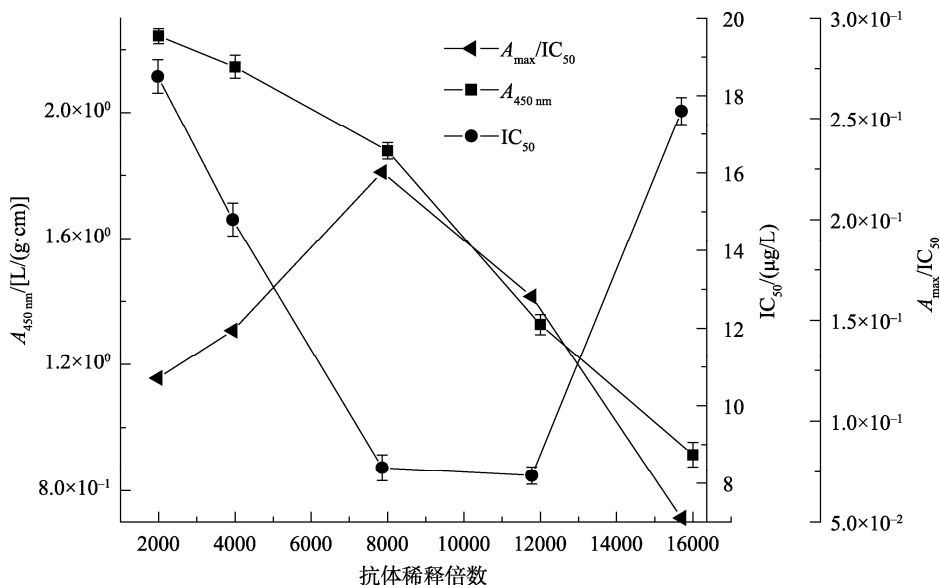


图 2 包被抗体稀释度曲线(n=3)

Fig.2 Dilution curve of antibody (n=3)

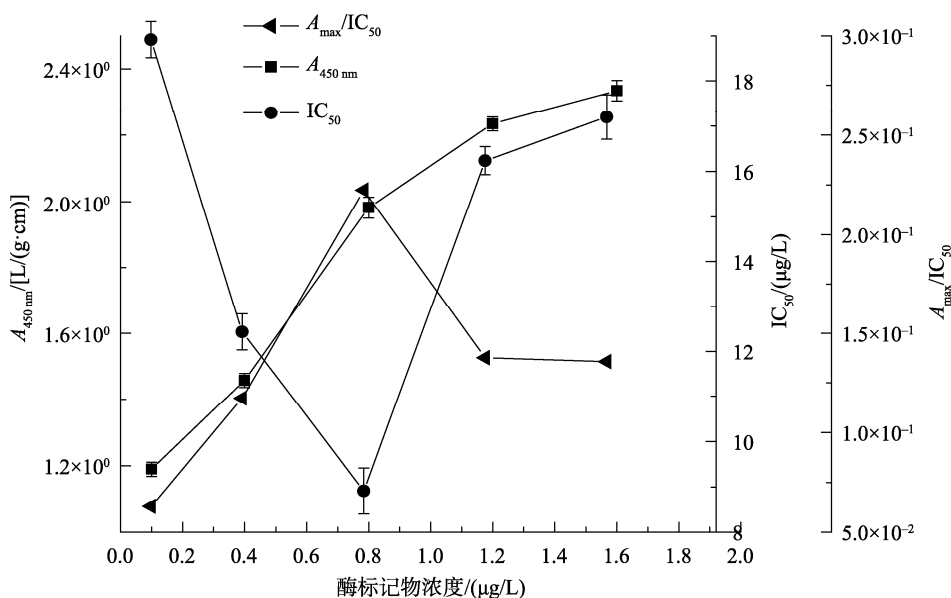


图 3 酶标抗原浓度曲线

Fig.3 Concentration curve of HRP-MEL-OVA

2.2.4 甲醇含量对反应的影响

有机溶剂会对反应体系中抗原抗体结合产生影响, 实验中使用甲醇作为复溶剂, 因此需考察其浓度对整个反应体系灵敏度的影响。由图 4 可知, 当甲醇含量不超过 20% 时, 对体系的 A_{\max} 与 IC_{50} 均没有太大影响, 当甲醇含量超过 20% 后, A_{\max} 与 IC_{50} 都开始逐渐上升, 体系灵敏度下降, 因为在样品处理中 20% 的甲醇提取效果较好, 故选择使用 20% 的甲醇溶液。

2.3 MEL-ELISA 方法学考查

2.3.1 方法灵敏度

在优化的条件下以 MEL 标准溶液质量浓度(0、1.0、3.0、9.0、27、81 $\mu\text{g/L}$)的对数值做横坐标(X), 以抑制率为纵坐标(Y)绘制标准曲线, 在一系列条件优化的基础上 ELISA 方法的灵敏度(IC_{10})为 0.65 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} 为 8.44 $\mu\text{g/L}$, $R^2=0.997$, 线性关系良好, 线性检测范围为 0.9~35 $\mu\text{g/L}$ 。

2.3.2 方法特异性

将 MEL 的结构类似物配成不同质量浓度的溶液作为

被测物, 采用 ELISA 方法测定其 IC_{50} 。结果如表 2 所示, 与三聚氰酸的交叉反应率为 60%, 与其他结构类似物基本没有交叉反应。三聚氰胺与三聚氰酸同时摄入时会在体内形成大量肾结晶^[21], 因此抗体对三聚氰酸有较高的交叉率更符合实际样品的检测要求。

2.3.3 方法精密度

酶标板精密度测定, 10 块酶标板板内变异系数不超过 5%, 板内和板间变异系数均未超过 10%, 说明建立的方法精密度良好, 稳定性高。

2.3.4 方法准确度

样品加标回收率是评价 ELISA 检测方法准确度的一个重要指标。添加回收实验中, 模拟实际样品, 向待测样品中添加 3 个不同浓度的 MEL 标准品进行回收实验, 结果见表 3。各种肉类、全蛋和生乳样品添加回收率在 80%~110% 之间, 饲料样品添加回收率在 70%~120% 之间, 变异系数基本在 10% 以内, 符合检测的要求, 说明该方法重复性好, 准确度高, 满足实际样品的检测要求。

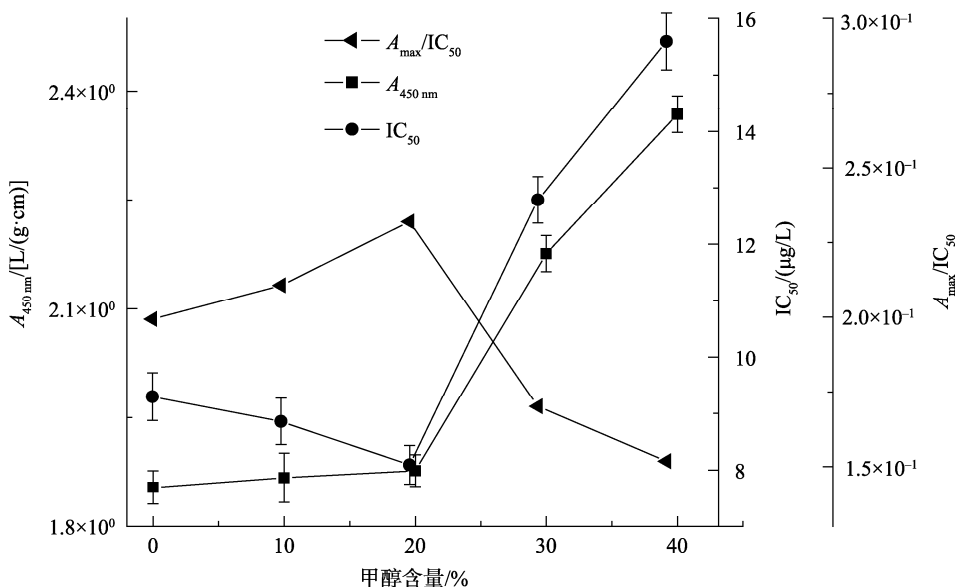


图 4 甲醇含量对 dc-LIESA 的影响

Fig.4 Influence of concentration of methanol on dc-ELISA

表 2 交叉反应率的测定

Table 2 Determination of cross-reactivity

化合物	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	交叉反应率/%
三聚氰酸	14.1	60
环丙氨嗪	>100	<10
阿特拉津	>100	<10

2.3.5 美国 REAGEN 试剂盒检测结果对比

将美国 REAGEN 试剂盒与本研究建立的 ELISA 方法

进行比较, 检测相同的样品, 确定其回收率, 检测方法的可信度。以 REAGEN ELISA 试剂盒的检测结果为依据计算回收率, 结果如表 4 所示, 回收率在可接受的范围内, 两种方法对同样品的测定值接近, 本研究建立直接竞争 ELISA 的方法结果准确、可靠。

3 结论与讨论

本研究利用辣根过氧化物酶标记抗原, 固相包被单克隆抗体, 建立了直接竞争三聚氰胺酶联免疫吸附分析方

法。该方法包被抗原的稀释倍数为 1:8000, 酶标抗原的最适浓度为 0.8 mg/L; MEL 质量浓度在 0.9~35 $\mu\text{g/L}$ 时有较好的线性关系, 检测限为 0.65 $\mu\text{g/L}$, 与 Beacon 公司生产的试剂盒 20 $\mu\text{g/L}$ 的检测限相比, 敏感度更高, IC_{50} 为 8.44 $\mu\text{g/L}$, 与三聚氰酸交叉反应率为 60%, 三聚氰胺与三聚氰酸同时存在时会增加毒性, 与三聚氰酸的高交叉率可以实现样品危害的全面检测。与其他结构类似物不存在交叉反应, 实

际样品检测平均回收率在 70%~120%之间, 结果准确可靠, 操作更加简便, 具有良好的应用前景。

本方法距离成熟的商业化试剂盒还有一定的差距, ELISA 方法在实际样品检测过程中影响因素很多, 在今后的工作中要加强产品的质量, 制定标准化流程, 建立可追溯体系, 才能保证科研成果的商品转化, 为三聚氰胺的快速检测提供新途径。

表 3 回收率实验结果($n=3$)
Table 3 Results of recovery test ($n=3$)

样品	添加浓度/ $(\mu\text{g/kg})$	测定平均值/ $(\mu\text{g/kg})$	平均回收率 $\pm\text{SD}$	变异系数/%
虾肉	4.0	3.81	95.2% \pm 0.21	5.51
	8.0	8.12	102% \pm 0.54	6.65
	16	15.8	98% \pm 1.61	10.06
鱼肉	4.0	4.21	105% \pm 0.36	9.01
	8.0	8.04	101% \pm 0.67	8.37
	16	16.7	105% \pm 1.58	9.88
鸡肉	4.0	3.87	96.8% \pm 0.22	5.5
	8.0	7.98	99.7% \pm 0.76	9.5
	16	16.2	101% \pm 1.58	9.87
猪肉	4.0	4.17	104% \pm 0.31	7.74
	8.0	8.09	101% \pm 0.78	9.75
	16	15.36	96% \pm 0.96	6.01
生乳	10	9.78	97.8% \pm 0.67	6.71
	40	38.5	96.4% \pm 2.78	6.95
	60	61.2	102 \pm 3.76	6.27
全蛋	40	38.2	95.5% \pm 2.98	7.45
	150	154.9	103% \pm 9.78	6.52
	400	398.2	99.5% \pm 18.34	4.58
饲料	200	215.2	107.6% \pm 16.27	7.56
	400	443.3	110.8% \pm 17.12	3.86
	800	712.4	89.5% \pm 19.45	2.73

表 4 2 种试剂盒检测结果比较
Table 4 Comparison of determination results of 2 kinds of different ELISA kits

样品	添加量/ (mg/kg)	REAGEN 试剂盒			MEL-ELISA 试剂盒		
		测定值/ (mg/kg)	回收率/%	变异系数/%	测定值/ (mg/kg)	回收率/%	变异系数/%
虾肉	0.2	0.18	90	7.06	0.21	116	6.5
	0.4	0.43	107	2.46	0.38	88.3	7.5
	1.0	1.01	101	7.79	1.05	103.9	8.85
牛奶	0.2	0.17	85	3.01	0.22	129.4	5.46
	0.4	0.42	105	2.56	0.39	83.9	5.65
	1.0	1.04	104	1.75	1.05	101.6	6.78
饲料	0.5	0.44	88	6.97	0.51	115.9	4.37
	1	0.86	86	8.02	0.83	96.5	5.36
	1.5	1.66	110.7	7.63	1.32	79.5	4.93

参考文献

- [1] LI W, LI H, ZHANG J, *et al.* Effect of melamine toxicity on *Tetrahymena thermophila* proliferation and metallothionein expression [J]. Food Chem Toxicol, 2015, 80: 1–6.
- [2] 孙美琦, 李翠枝, 张文, 等. 三聚氰胺的毒理学研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, 33(7): 46–52.
SUN MQ, LI CZ, ZHANG W, *et al.* The research progress of toxicology of melamine [J]. Anim Husb Feed Sci, 2012, 33(7): 46–52.
- [3] MENA R, PAMELA M. Melamine detection in milk and dairy products: Traditional analytical methods and recent developments [J]. Food Anal Method, 2018, 11(1): 128–147
- [4] LIANG X, ZHANG XJ, YOU TT, *et al.* Three-dimensional MoS₂-NS@Au-NPs hybrids as SERS sensor for quantitative and ultrasensitive detection of melamine in milk [J]. J Raman Spectrosc, 2017, (6): 1–11.
- [5] KIRTI S, MANISH P. The melamine adulteration scandal [J]. Food Secur, 2010, (2): 97–107.
- [6] CHEN XY, HA W, SHI YP. Sensitive colorimetric detection of melamine in processed raw milk using asymmetrically PEGylated gold nanoparticles [J]. Talanta, 2019, 194: 475–484.
- [7] PUSCHNER B, POPPENGA RH, LOWENSTINE LJ, *et al.* Assessment of melamine and cyan uric acid toxicity in cats [J]. J Vet Diagn Invest, 2007, 19(6): 616–624.
- [8] 常宏. 三聚氰胺致婴幼儿泌尿系结石的实验研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
CHANG H. The experimental studies of urinary stone in infants children induced by melamine [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2012.
- [9] CRAIG BL. A position statement on kidney disease from powdered infant formula-based melamine exposure in Chinese infants [J]. Pediatr Nephrol, 2009, 24(7): 1263–1266.
- [10] HUANG J, YANG GZ, XIA FQ, *et al.* Reproductive toxicity of melamine against male mice and the related mechanism [J]. Toxicol Mech Method, 2018, 28(5): 345–352.
- [11] XU ZJ, LIU YN, QIAN C, *et al.* Tuning the morphology of melamine-induced tetraphenylethene self-assemblies for melamine detecting [J]. Org Electron, 2020, 76: 105476
- [12] LIU Y, HU JR, ZHONG M, *et al.* A novel, simple and rapid method for the detection of melamine from milk based on tribology measurements [J]. Tribol Int, 2018, 119, 66–72.
- [13] 冯彦婷, 林沛纯, 谢慧风, 等. 基于纳米银颗粒团聚反应的表面增强拉曼光谱法测定牛奶中三聚氰胺的含量[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 256–261.
- FENG YT, LIN PC, XIE HF, *et al.* Surface-enhanced Raman spectroscopy based on the agglomeration of silver nanoparticles to determine the content of melamine in milk [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(15): 256–261.
- [14] ROGHAYEH A, GHOLAMREZA JK, EBRAHIM MA, *et al.* Determination of melamine contamination in chocolates containing powdered milk by high-performance liquid chromatography (HPLC) [J]. J Environ Health Sci, 2021, 19: 165–171.
- [15] XU L, LI DX, JIANG BY, *et al.* Melamine-mediated base mismatch for label-free and amplified sensitive fluorescent detection of melamine in milk [J]. Food Anal Method, 2019, 12(5): 1255–1261.
- [16] LIU SJ, KANNEGULLA A, KONG XM, *et al.* Simultaneous colorimetric and surface-enhanced Raman scattering detection of melamine from milk [J]. Spectrochim Acta A, 2020, 231: 118130.
- [17] LI YZ, HAO WQ, WANG YB, *et al.* Determination of melamine and ammeline in eggs and meat using hydrophilic interaction liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2012, 30(7): 716–720.
- [18] 张威, 郭丹, 兰伟, 等. 液体乳中三聚氰胺的快速检测产品评价研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 8533–8539.
ZHANG W, GUO D, LAN W, *et al.* Evaluation of rapid detection products for melamine in liquid milk [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(20): 8533–8539.
- [19] 谢体波, 李平, 易重任, 等. 三聚氰胺 ELISA 试剂盒在食品检测中的检测效果研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(3): 1016–1021.
XIE TB, LI P, YI ZR, *et al.* Research on detection results of melamine enzyme-linked immune sorbent assay detection kit in food [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(3): 1016–1021.
- [20] 祝海珍. 乳制品中三聚氰胺检测方法的现状及研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(3): 1009–1014.
ZHU HZ. Current situation and research progress of detection methods of melamine in dairy products [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(3): 1009–1014.
- [21] AN L, SUN W. A brief review of neurotoxicity induced by melamine [J]. Neurotox Res, 2017, 2(32): 301–309.

(责任编辑: 郑丽 张晓寒)

作者简介



樊晓博, 硕士, 讲师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: shine2786@163.com