基于多克隆抗体的糠氨酸 ic-ELISA 检测方法的建立

杨敏仪[1,2,3]，罗雯倩[1,2,3]，贾荣业[1,2,3]，刘宇轩[1,2,3]，王荣智[*1,2,3]
（1. 福建农林大学 生命科学学院，福建 福州 350002；2. 福建农林大学 生物农药与化学生物学教育部重点实验室，福建 福州 350002；3. 福建农林大学 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室，福建 福州 350002）

摘要：采用甲醛法制备了糠氨酸完全抗原，通过交叉验证确保了多克隆抗体的特异性，从而建立了基于该抗体的糠氨酸间接竞争酶联免疫吸附测定（indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA）检测方法。结果显示，建立的 ic-ELISA 检测方法有效检测范围为 12.20~2 143.42 ng/mL，最低检测限为 2.69 ng/mL。该方法操作简便、迅速，成本低廉，同时具备高灵敏度和优异特异性，为高效检测食品中糠氨酸质量浓度提供了新的选择，具有一定实际应用价值。

关键词：糠氨酸；动物免疫；多克隆抗体；ic-ELISA
中图分类号：TS 207　**文章编号**：1673-1689(2024)05-0138-08　**DOI**：10.12441/spyswjs.20230921001

Development of ic-ELISA for Furosine Detection Based on Polyclonal Antibodies

YANG Minyi[1,2,3]，*LUO Wenqian*[1,2,3]，*JIA Rongye*[1,2,3]，*LIU Yuxuan*[1,2,3]，*WANG Rongzhi*[*1,2,3]
(1. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 3. Key Laboratory of Pathogenic Fungi and Mycotoxins of Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A complete furosine complete antigen was prepared using the formaldehyde method, and cross-verification was employed to ensure the specificity of the polyclonal antibodies. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was successfully established based on the antibodies. The results demonstrated that the established ic-ELISA exhibited a detection range of 12.20 to 2 143.42 ng/mL, with a limit of detection (LOD) at 2.69 ng/mL. This method is simple, rapid, and cost-effective, offering high sensitivity and excellent specificity. It provides a novel option for the efficient detection of furosine in food, demonstrating its potential for practical application.

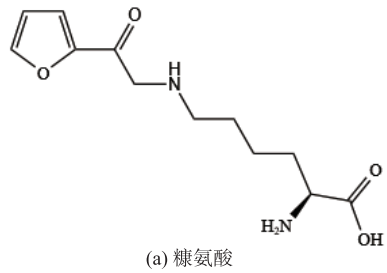
Keywords: furosine, animal immunization, polyclonal antibodies, ic-ELISA

收稿日期：2023-09-21　**修回日期**：2024-01-30
基金项目：福建省科技厅高校产学合作项目(2021N5009)。
* **通信作者**：王荣智(1979—)，男，博士，副教授，硕士研究生导师，主要从事抗体工程与生物毒素检测研究。E-mail：wrz0629@126.com

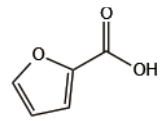
糠氨酸(furosine)是一种小分子化合物(见图 1(a))[1]，由乳蛋白和乳糖在高温下发生美拉德反应后伴随着酸水解而产生[2]。在不同的灭菌方法与温度下形成的美拉德反应产物和产物剂量有所不同[3]，但这些过程普遍会产生营养成分的损失[4]和有毒化学物的生成。Saeed 等研究发现，糠氨酸对 Hek-293 肾脏细胞有毒性作用[5]。Li 等提出，这种毒害作用可能是通过脱铁途径引起的[6]。此外，Li 等通过小鼠灌胃和小鼠原代肝细胞模型进一步研究后发现，糠氨酸会调动 PLA2-3 激活 RIPK1/RIPK3/MLKL 坏死途径，以调节肝细胞中的 LPC 水平，从而导致肝损伤[7]。赵男提出，摄入一定剂量的糠氨酸对小鼠的生命健康具有损害作用[8]。Baskal 等的研究表明，人体排泄物中的糠氨酸含量越高，得肾病的概率越小[9]，间接说明了糠氨酸的毒性。因此，糠氨酸含量检测在确保食品安全方面至关重要。

糠氨酸最早在 1966 年被检出[10]，并广泛应用于食品的品质评价中，例如：乳制品[11]、谷类食品[12]、人参[13]、蜂蜜[14]等。在乳制品中，郝欣雨等提出，即使在低温中储存超高温消毒（ultra high temperature treated，UHT）灭菌乳，其糠氨酸含量仍有微量增加，且储存温度越高、时间越长，乳制品内糠氨酸含量越高，这种增量可持续 6 个月[15]。最初采用离子交换色谱（ion exchange chromatography，IEC）[1]检测糠氨酸。目前，高效液相色谱（high performance liquid chromat-ography，HPLC）[16]的应用更为广泛，但前处理复杂、成本高限制了其高效检测糠氨酸。一些基于 HPLC 方法改进的检测技术，如超高效液相色谱（ultra performance liquid chromatography，UPLC）[17]、液质联用（high performance liquid chromatography-mass spectrometr，HPLC-MS）技术[13,18]等，主要通过选择不同的色谱分离系统与检测器[19]、调整流动相试剂[20]或与质谱仪联用，以优化检测精度。结合电泳、色谱或质谱联用的气质联用(gas chromatograohy-mass spectrometry，GC-MS)[21]、毛细管电泳(capillary electrophoresis，CE)[22-23]等技术在糠氨酸检测方面都有一定的应用，但均未能实现成本缩减和效率提升。此外，田桂艳等还开发了中红外光谱技术结合偏最小二乘法检测 UHT 灭菌乳中糠氨酸的含量[24]。光谱检测法能够缩短检测总时长，但建立标准曲线的成本较高，限制了其应用。

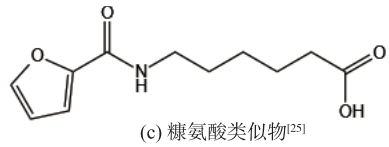
目前，国外尚无免疫检测法检测糠氨酸的相关报道。在国内市场上，存在一款名为糠氨酸(bran-acid)ELISA 试剂盒的产品，其实际用于检测血浆、血清、组织匀浆液内糠酸(结构如图 1(b)所示)，而非糠氨酸。此外，在一篇相关专利中描述了一种糠氨酸类似物[25]，其结构如图 1(c)所示，与糠氨酸标准品比较，少了一个氨基。该专利基于糠酸和糠氨酸类似物采用较为常用的混合酸酐法制备了多种糠氨酸人工完全抗原以及糠酸人工完全抗原，以糠氨酸人工完全抗原为免疫原、糠酸人工完全抗原为检测原制备了鼠多抗，并建立了检测曲线，其 IC_{50} 为 750 ng/mL，其余数据并未详细说明。因其检测原使用糠酸，该方法筛选出的多克隆抗体可能存在检测特异性的问题。



(a) 糠氨酸



(b) 糠酸



(c) 糠氨酸类似物[25]

图 1　化学结构对比

Fig. 1　Comparison of chemical structure

为了实现糠氨酸的精准甄别与检测，作者以糠氨酸标准品为基础，采用甲醛交联载体蛋白（牛血清白蛋白(BSA)、人血清白蛋白(HSA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)）制备了多种糠氨酸完全抗原。其中，糠氨酸-KLH 完全抗原作为免疫原，糠氨酸-HSA 完全抗原和糠氨酸-BSA 完全抗原作为检测原，并通过多种交叉验证，确保了多克隆抗体的特异性。最终，成功获得了高特异性、高灵敏度的抗糠氨酸标准品多克隆抗体，并借助该抗体建立了针对糠氨酸的间接竞争酶联免疫吸附测定(ic-ELISA)检测方法，为食品中糠氨酸的检测提供了新的选择。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 雌性6周龄BALB/c小鼠：上海吴氏实验动物中心[26]，动物实验伦理审查编号为PFMFAFU201610。

1.1.2 试剂 糠氨酸标准品：德国Iris Biotech G-MBH公司；牛血清白蛋白、人血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、BCA(bicinchoninic acid)试剂盒：北京索莱宝科技有限公司[27]；脱脂奶粉：内蒙古伊利实业集团股份有限公司；弗氏完全佐剂(complete freunds adjucant，CFA)、弗氏不完全佐剂(incomplete freunds adjucant，IFA)：美国Sigma-Aldrich公司；辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(HRP H+L)：北京中杉金桥生物技术有限公司；实验所用化学试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 糠氨酸完全抗原的制备 以PBS(pH 7.4)作为溶剂，配制1 mL糠氨酸标准溶液(2 mg/mL)、1 mL HSA溶液(10 mg/mL)、1 mL BSA溶液(10 mg/mL)和1 mL KLH溶液(5 mg/mL)。将100 μL糠氨酸标准溶液分别加至上述配制好的蛋白质溶液中，然后逐滴加入100 μL甲醛水溶液，37 ℃避光条件下80 r/min反应72 h。交联成功的完全抗原通过琼脂糖(0.16 g蔗糖溶于20 mL TAE溶液中)凝胶电泳进行验证，采用BCA试剂盒测定完全抗原质量浓度，保存于-20 ℃。

1.2.2 抗糠氨酸多克隆抗体的制备 免疫小鼠步骤参照文献[28]，以糠氨酸-KLH完全抗原为免疫原通过皮下多点注射免疫健康的雌性6周龄BALB/c小鼠。初次免疫时，将100 μg的糠氨酸-KLH完全抗原与弗氏完全佐剂等体积混合，使用乳化仪乳化至抗原呈乳滴状态，乳化液滴于清水中15 s内不扩散，即为乳化完成，随后免疫小鼠。隔14 d进行再次免疫，此时使用弗氏不完全佐剂，乳化完成后免疫小鼠。

1.2.3 抗糠氨酸多克隆抗体的效价测定 多克隆抗体的获取参考文献[29]，并略加修改。待小鼠免疫4次后取尾血，37 ℃恒温水浴30 min，4 ℃下于13 000 r/min离心20 min，获得的上层血清内含有抗糠氨酸多克隆抗体。糠氨酸-HSA完全抗原使用包被缓冲液(CBS，0.75 g碳酸钠和1.46 g碳酸氢钠溶于500 mL ddH_2O，pH 9.6)稀释至5 μg/mL，按100 μL/孔加入酶标孔中，37 ℃孵育包被2 h，弃液后每孔加入200 μL PBSM(1.25 g脱脂奶粉溶于25 mL PBS)，37 ℃孵育封闭2 h。封闭完成后，使用PBST(750 μL Tween-20溶于1.5 L PBS)和PBS各洗板3次，拍干孔内液体，置于4 ℃备用。多克隆抗体血清按以下步骤[30]进行效价检测：将获得的多克隆抗体血清使用PBSM从1∶2 000倍半稀释至1∶256 000，以100 μL/孔分别加至预先包被的酶标条中，37 ℃孵育1 h，洗板步骤同上。使用PBSM按1∶8 000的比例稀释辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(HRP H+L)，按100 μL/孔加至酶标条中，37 ℃孵育1 h，洗板步骤同上。每孔加入100 μL TMB显色液，37 ℃孵育15 min，按50 μL/孔加入H_2SO_4(2 mol/L)终止酶联反应，测定450 nm处的吸光度。

1.2.4 抗糠氨酸多克隆抗体的特异性鉴定 使用包被缓冲液稀释不同的抗原，分别配制5 μg/mL的糠氨酸-HSA完全抗原、糠氨酸-BSA完全抗原、BSA、HSA、OVA以及γ-干扰素包被液，按100 μL/孔分别加至酶标条中，包被、封闭以及洗板操作同1.2.3。使用PBSM按1∶2 000比例稀释小鼠多克隆抗体血清并进行特异性测定。

1.2.5 糠氨酸ic-ELISA检测方法的建立 ic-ELISA检测方法的建立参考文献[31-32]，稍加修改。糠氨酸-HSA完全抗原从5 μg/mL倍半稀释至0.039 062 5 μg/mL，每个质量浓度纵向包被8孔于酶标条中，包被和封闭操作同1.2.3。使用PBSM稀释小鼠血清，按100 μL/孔分别横向添加到酶标条中，后续操作同1.2.3。选取糠氨酸-HSA完全抗原最适包被质量浓度与抗糠氨酸多克隆抗体最佳稀释倍数。使用PBSM稀释糠氨酸-BSA完全抗原，从80 μg/mL倍半稀释16个梯度，将糠氨酸-BSA完全抗原与抗糠氨酸多克隆抗体等体积混合后37 ℃孵育1 h，反应后溶液按100 μL/孔加至预先包被的酶标条中，37 ℃孵育1 h，后续检测操作同1.2.3。结果使用Origin 2021进行分析，IC_{50}表示糠氨酸的半抑制质量浓度。

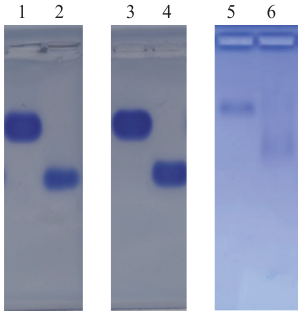
2 结果与分析

2.1 糠氨酸完全抗原的制备与分析

为验证蛋白质与糠氨酸是否交联成功，对制备好的糠氨酸-HSA完全抗原、糠氨酸-BSA完全抗原、糠氨酸-KLH完全抗原以及其相应的载体蛋白

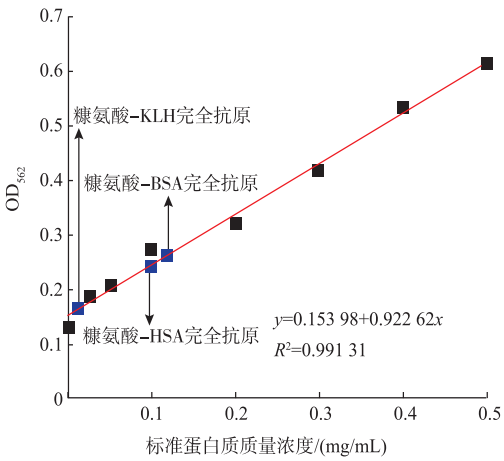
进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2(a)所示。由于糠氨酸带有负电荷,交联后的完全抗原负电荷更多,导致在电泳过程中迁移更快。通过对比载体蛋白与完全抗原的迁移速率,可以确定完全抗原是否制备成功。由图 2(a)可知,与 HSA、BSA、KLH 相比,制备的糠氨酸-HSA 完全抗原、糠氨酸-BSA 完全抗原、糠氨酸-KLH 完全抗原在电泳过程中呈现不同程度的迁移差异,从而证实了糠氨酸完全抗原制备成功。

通过 BCA 试剂盒测定糠氨酸完全抗原的质量浓度,所建立的标准曲线如图 2(b)所示,y=0.153 98+0.922 62x,R^2=0.991 31。据此,测得的糠氨酸-HSA 完全抗原质量浓度为 9.972 mg/mL,糠氨酸-BSA 完全抗原质量浓度为 11.869 mg/mL,糠氨酸-KLH 完全抗原质量浓度为 1.187 mg/mL。



1. HSA; 2. 糠氨酸-HSA完全抗原; 3. BSA; 4. 糠氨酸-BSA完全抗原; 5. KLH; 6. 糠氨酸-KLH完全抗原。

(a) 糠氨酸完全抗原的琼脂糖凝胶电泳分析



(b) 糠氨酸完全抗原质量浓度测定

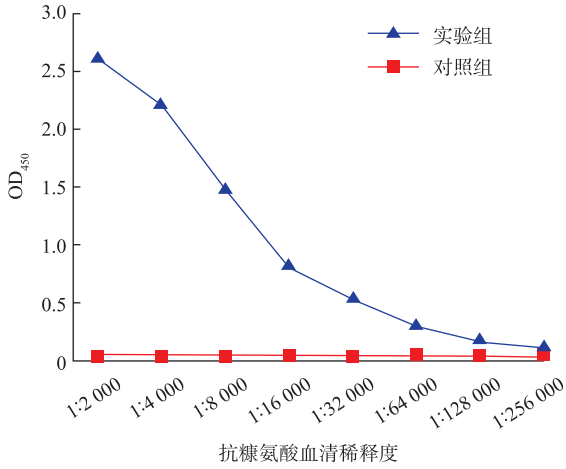
图 2 甲醛法交联糠氨酸的琼脂糖凝胶电泳分析与糠氨酸完全抗原质量浓度测定

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis analysis of furosine conjugates crosslinked by formaldehyde and determination of complete antigen mass concentration of furosine

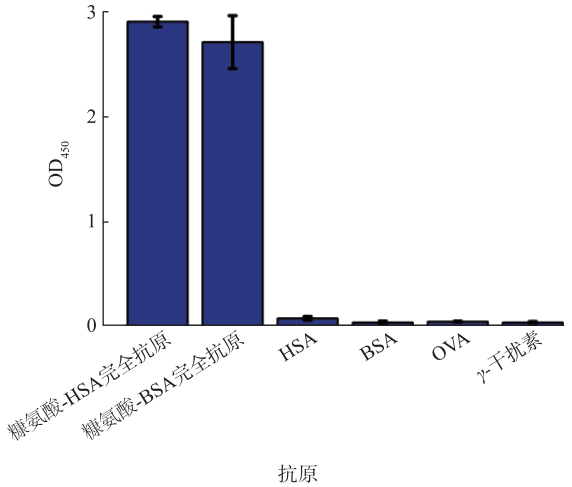
2.2 抗糠氨酸多克隆抗体的制备与表征

完全抗原制备成功后,使用糠氨酸-KLH 完全抗原免疫小鼠(实验组),获得了小鼠多克隆抗体血清,并以未经免疫处理的空白小鼠血清作对照。小鼠多克隆抗体血清效价结果如图 3(a)所示,在稀释至 1∶8 000 时,其在 450 nm 波长下的吸光度为 1.485,表明小鼠体内抗体滴度较高。

随后,使用糠氨酸-HSA 完全抗原进行多克隆抗体血清交叉检测,并使用糠氨酸-BSA 完全抗原、HSA、BSA、OVA 和 γ-干扰素进行多克隆抗体血清特异性检测,结果见图 3(b)。可以看出,多克隆抗体只对糠氨酸完全抗原有反应,对其载体蛋白及相似物基本没有交叉反应。这表明该多克隆抗体具有对糠氨酸的特异性,且特异性效果显著。



(a) 以糠氨酸-HSA完全抗原为检测原的小鼠血清效价测定



(b) 以糠氨酸-HSA完全抗原为检测原的小鼠血清特异性测定

图 3 小鼠血清效价与特异性的测定

Fig. 3 Determination of serum titer and specificity in mice

2.3 糠氨酸 ic-ELISA 检测方法的建立

通过棋盘法,测定了完全抗原最适包被质量浓度与抗糠氨酸多克隆抗体最佳稀释倍数,结果见图4。同时由图 5 可知, 当糠氨酸-HSA 完全抗原包被质量浓度为 5 μg/mL 时,与多克隆抗体稀释倍数为 16 000 结合的点,其 OD_{450} 约为 1,相应的点还有糠氨酸-HSA 完全抗原包被质量浓度为2.5 μg/mL 和多克隆抗体稀释倍数为 8 000、糠氨酸-HSA 完全抗原包被质量浓度为 1.25 μg/mL 和多克隆抗体稀释倍数4 000、糠氨酸-HSA 完全抗原包被质量浓度为 0.625 μg/mL 和多克隆抗体稀释倍数为 2 000。综合考虑, 使用 5 μg/mL 糠氨酸-HSA 完全抗原包被质量浓度时,多克隆抗体消耗量最少,因此选择糠氨酸-HSA 完全抗原最适包被质量浓度为5 μg/mL,抗糠氨酸多克隆抗体最佳稀释倍数为 16 000。

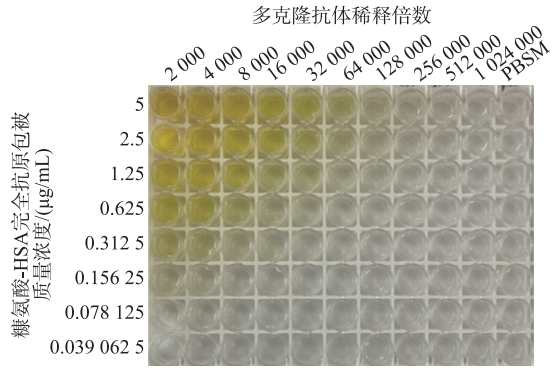


图 4 棋盘法测定完全抗原最适反应质量浓度及抗体稀释倍数

Fig. 4 Chessboard method for determining the optimal reaction mass concentration of complete antigens and dilution times of antibody

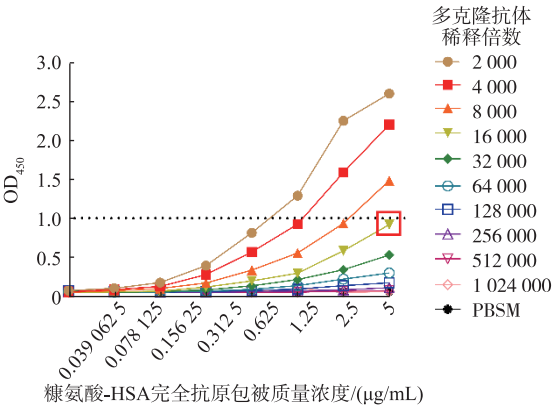
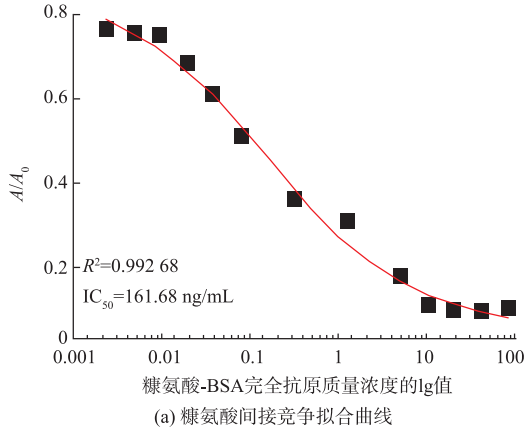


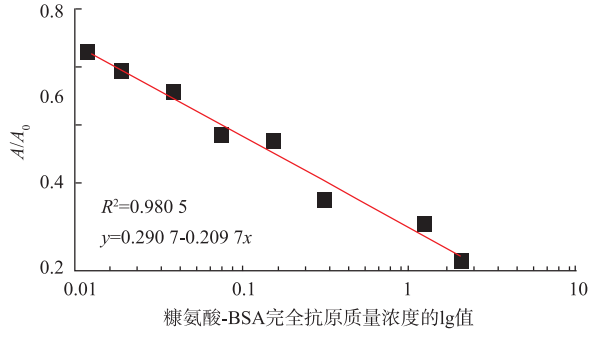
图 5 抗原抗体最适反应条件

Fig. 5 Optimal reaction conditions for antigen and antibody

利用这一最适反应条件,建立了 ic-ELISA 检测方法,并拟合了检测曲线,确认了检测区间。如图 6 所示,糠氨酸竞争拟合曲线 y=0.055 98+(0.861 71−0.055 98)÷[1+(x÷0.161 68)$^{0.536\ 38}$],R^2=0.992 68,IC_{50}=161.68 ng/mL。其抑制率如表 1 所示。在 IC_{20}~IC_{80} 建立竞争标准曲线, 得到 y=0.290 7−0.209 7x,R^2=0.980 5(见图 6(b)),表明在 IC_{20}~IC_{80} 有良好的线性关系。因此, 该检测方法的有效检测范围为 12.20~2 143.42 ng/mL,最低检测限为 2.69 ng/mL。



(a) 糠氨酸间接竞争拟合曲线



(b) 糠氨酸间接竞争标准曲线

A_0 为阴性对照组在 450 nm 处的吸光度,A 为糠氨酸-BSA 完全抗原实验组在 450 nm 处的吸光度。

图 6 糠氨酸 ic-ELISA 方法的建立

Fig. 6 Establishment of ic-ELISA method for furosine

表 1 竞争曲线的抑制率

Table 1 Inhibition rate of the competition curve

抑制率	糠氨酸质量浓度/(ng/mL)
IC_{10}	2.69
IC_{20}	12.20
IC_{50}	161.68
IC_{80}	2 143.42
IC_{90}	9 720.65

2.4 讨论

将研究中的方法与其他常用的检测方法进行了对比,如表 2 所示。可以看出,常用的HPLC[16]方法具有更宽泛的线性范围和更好的精度。UPLC 则在 HPLC 的基础上通过采用更小颗粒的固定相色谱柱,实现了更高的分辨率、更快的检测速度和更高的灵敏度[17]。然而,这两种方法均需要相对烦琐的样品处理过程和较长的处理时间,因此难以适用于大规模样品的检测,HPLC-MS 方法也存在相似情况。相比之下,CE[22]方法极大地减少了检测时间,且线性范围最为优越,但同样需要定时维护仪器和具备较高的专业技能人员,成本较高[33]。在ELISA 检测方面,其线性范围不如 HPLC 和 CE,应用也需进一步开发,但精度和速度综合了以上方法的优点,因此更具优势。

表 2 不同检测方法测定糠氨酸的比较

Table 2 Comparison of different methods for determination of furosine

检测方法	检测限	检测总时长	线性范围/(mg/L)	IC_{50}/(ng/mL)	优点	缺点
高效液相色谱(HPLC)[16]	5 mg/kg(以蛋白质质量计)	约 25 h	1.0~20.0	—	精度高	时间长,成本高,专业性强
超高效液相色谱(UPLC)[17]	0.003 mg/L	约 24 h	0.2~5.0	—	精度更高,检测时间减少	时间长,成本高,专业性强,线性范围较窄
液质联用(HPLC-MS)[13]	0.000 5 mg/L	约 24 h	0.3~10.0	—	精度更高	时间长,成本高,专业性强,线性范围较窄
毛细管电泳(CE)[22]	0.07 mg/L	约 3 h	0.25~30.00	—	精度高,检测时间大幅减少	成本较高,专业性较强
ic-ELISA[25]	—	约 2 h	—	750	检测时间少,IC_{50}高	检测范围不明确,特异性存在缺陷
本研究	0.002 69 mg/L	约 2 h	0.012 20~2.143 42	161.68	精度高且检测时间短,结果可靠	线性范围较窄,需进一步开发应用

注:—代表无法获得。

3 结 语

作者成功制备了 3 种糠氨酸完全抗原并获得了相应的抗糠氨酸多克隆抗体,并在此基础上探索并建立了用于糠氨酸的 ic-ELISA 检测方法。其中,通过交叉验证获得了具有较高滴度与特异性的抗糠氨酸多克隆抗体。通过棋盘法,确认以 5 μg/mL 糠氨酸-HSA 完全抗原和稀释倍数为 16 000 的抗糠氨酸多克隆抗体作为最适反应条件,成功建立了 ic-ELISA 检测方法,其在 IC_{20}~IC_{80} 有很好的线性区间(R^2=0.980 5),有效检测范围为 12.20~2 143.42 ng/mL,表明该检测方法具有较好的可信度及较宽泛的检测范围,为高效检测食品中的糠氨酸及相关检测标准奠定了基础。接下来,将尝试通过 IgG 亚型抗体富集和抗原抗体亲和纯化的方法[34]纯化多克隆抗体,再尝试通过基因重组抗体技术进一步筛选抗体[35-36]。综上所述,作者建立了一种高效检测糠氨酸的方法,为大批量检测食品中的糠氨酸提供了方法支持。

参考文献:

[1] FINOT P A,BRICOUT J,VIANI R,et al. Identification of a new lysine derivative obtained upon acid hydrolysis of heated milk [J]. **Experientia**,1968,24(11):1097-1099.

[2] TROISE A D,FIORE A,WILTAFSKY M,et al. Quantification of Nε-(2-furoylmethyl)-*L*-lysine(furosine),Nε-(carboxymethyl)-*L*-lysine (CML),Nε- (carboxyethyl)-*L*-lysine (CEL) and total lysine through stable isotope dilution assay and tandem mass spectrometry[J]. **Food Chemistry**,2015,188:357-364.

[3] LI Y,WU Y R,QUAN W,et al. Quantitation of furosine,furfurals,and advanced glycation end products in milk treated with pasteurization and sterilization methods applicable in China[J]. **Food Research International**,2021,140:110088.

[4] 白祥,胡赠彬,谭建林,等. 液相色谱法测定核桃乳中糠氨酸含量[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(13):4258-4261.

BAI X,HU Z B,TAN J L,et al. Determination of furosine content in walnut milk by liquid chromatography[J]. **Journal of Food Safety & Quality**,2020,11(13):4258-4261. (in Chinese)

[5] SAEED Y,WANG J Q,ZHENG N. Furosine induces DNA damage and cell death in selected human cell lines:a strong toxicant to kidney Hek-293 cells[J]. **Food Science and Biotechnology**,2017,26(4):1093-1101.

[6] LI H Y,YANG H G,LI P,et al. Maillard reaction products with furan ring,like furosine,cause kidney injury through triggering ferroptosis pathway[J]. **Food Chemistry**,2020,319:126368.

[7] LI H Y,WANG Y Z,YANG H G,et al. Furosine,a Maillard reaction product,triggers necroptosis in hepatocytes by regulating the RIPK1/RIPK3/MLKL pathway[J]. **International Journal of Molecular Sciences**,2019,20(10):2388.

[8] 赵男. 采用小鼠模型评价糠氨酸的毒性作用[D]. 合肥:安徽农业大学,2018.

[9] BASKAL S,POST A,KREMER D,et al. Urinary excretion of amino acids and their advanced glycation end-products(AGEs) in adult kidney transplant recipients with emphasis on lysine:furosine excretion is associated with cardiovascular and all-cause mortality[J]. **Amino Acids**,2021,53(11):1679-1693.

[10] ERBERSDOBLER H F,ZUCKER H. Untersuchungen zum gehalt an lysin und verfugbarem lysin in trockenmagermilch[J]. **Milchwissenschaft**,1966,21:564-568.

[11] LI Y,JIA X D,WANG Z J,et al. Characterizing changes in Maillard reaction indicators in whole milk powder and reconstituted low-temperature pasteurized milk under different preheating conditions[J]. **Journal of Food Science**,2022,87(1):193-205.

[12] MESÍAS M,SÁEZ-ESCUDERO L,MORALES F J,et al. Occurrence of furosine and hydroxymethylfurfural in breakfast cereals:evolution of the Spanish market from 2006 to 2018[J]. **Foods**,2019,8(5):158.

[13] LI Y L,LIU X X,MENG L L,et al. Qualitative and quantitative analysis of furosine in fresh and processed ginsengs[J]. **Journal of Ginseng Research**,2018,42(1):21-26.

[14] MASHHADI A,BAVALI A,MOKHTARI F. Assay of honey freshness by a novel optical technique[J]. **Scientific Reports**,2022,12:901.

[15] 郝欣雨,陈美霞,刘慧敏,等. 不同储运条件对 UHT 灭菌乳中糠氨酸含量的影响[J]. 中国乳品工业,2022,50(8):31-34.
HAO X Y,CHEN M X,LIU H M,et al. Effects of storage and transportation conditions on the furosine content in UHT milk[J]. **China Dairy Industry**,2022,50(8):31-34. (in Chinese)

[16] GIANNETTI V,MARIANI M B,MANNINO P. Furosine as a pasta quality marker:evaluation by an innovative and fast chromatographic approach[J]. **Journal of Food Science**,2013,78(7):994-999.

[17] WANG F G,ZHANG Y D,WEN F,et al. Rapid determination of furosine in milk using microwave-assisted HCl hydrolysis and ultra-performance liquid chromatography[J]. **Journal of Dairy Science**,2020,103(12):11086-11093.

[18] 周鑫,王雪松,谷守国,等. 液质联用法测定掺有复原乳的巴氏杀菌乳中的糠氨酸[J]. 食品工业,2021,42(9):304-308.
ZHOU X,WANG X S,GU S G,et al. Determination of furosine in pasteurized milk mixed with reconstituted milk by LC-MS/MS [J]. **The Food Industry**,2021,42(9):304-308. (in Chinese)

[19] 王峰恩,张养东,郑楠,等. 奶及奶制品中糠氨酸检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(6):2304-2312.
WANG F E,ZHANG Y D,ZHENG N,et al. Research progress on the determination of furosine in milk and dairy products[J]. **Journal of Food Safety & Quality**,2021,12(6):2304-2312. (in Chinese)

[20] 黄文强,苏玉芳,张彩霞. 乳制品中糠氨酸检测方法改进[J]. 食品安全导刊,2021(18):112-113.
HUANG W Q,SU Y F,ZHANG C X. Improvement of detection method of furoic acid in dairy products[J]. **China Food Safety Magazine**,2021(18):112-113. (in Chinese)

[21] LI M,LU J,HUANG Y,et al. Quantitative assessment of furosine,furfurals,and advanced glycation end products in different types of commercially available cheeses[J]. **Food Control**, 2022,136:108866.

[22] BIGNARDI C,CAVAZZA A,CORRADINI C. Determination of furosine in food products by capillary zone electrophoresis-tandem mass spectrometry[J]. **Electrophoresis**,2012,33(15):2382-2389.

[23] DELGADO-ANDRADE C, RUFIÁN-HENARES J A, MORALES F J. Fast method to determine furosine inbreakfast cereals by capillary zone electrophoresis[J]. **European Food Research and Technology**, 2005, 221(5): 707-711.

[24] 田桂艳,李慧,白晓玲,等. 中红外光谱技术检测灭菌乳中糠氨酸的研究[J]. 中国乳业,2023(4):82-86.
TIAN G Y,LI H,BAI X L,et al. Study on detection of sterilized milk furosine by mid-infrared spectroscopy[J]. **China Dairy**,

2023(4):82-86. (in Chinese)
[25] 肖治理,刘谦,徐振林,等. 一种检测糠氨酸的间接竞争 ELISA 方法:CN109307761B[P]. 2021-06-15.
[26] LING S M,ZHAO Q,IQBAL M N,et al. Development of immunoassay methods based on monoclonal antibody and its application in the determination of cadmium ion[J]. **Journal of Hazardous Materials**,2021,411:124992.
[27] LING S M,LI X L,ZHAO Q,et al. Preparation of monoclonal antibody against penicillic acid(PA) and its application in the immunological detection[J]. **Food Chemistry**,2020,319:126505.
[28] WANG R Z,WANG J C,LIU H M,et al. Sensitive immunoassays based on specific monoclonal IgG for determination of bovine lactoferrin in cow milk samples[J]. **Food Chemistry**,2021,338:127820.
[29] 张银志,金萍,孙秀兰,等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)直接竞争 ELISA 方法的建立[J]. 食品与生物技术学报,2012,31(1):28-32.
ZHANG Y Z, JIN P, SUN X L,et al. Establishment of the direct competition ELISA method for deoxynivalenol (DON)[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2012,31(1):28-32. (in Chinese)
[30] LING S M,DONG M K,XU Y,et al. Development of sensitive and portable immunosensors based on signal amplification probes for monitoring the mercury(II) ions[J]. **Biosensors and Bioelectronics**,2022,217:114676.
[31] CAI P Y,WANG R Z,LING S M,et al. A high sensitive platinum-modified colloidal gold immunoassay for tenuazonic acid detection based on monoclonal IgG[J]. **Food Chemistry**,2021,360:130021.
[32] 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.
WANG L L,CHEN F F,WU C,et al. Establishiment of ELISA methods for detecting melamine based on monoclonal antibodies [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(6):962-966. (in Chinese)
[33] 徐大江,马占峰,赵丽娟,等. 乳制品中糠氨酸和乳铁蛋白常用检测方法综述[J]. 中国乳业,2023(1):52-57.
XU D J, MA Z F, ZHAO L J,et al. Common methods of furosine and lactoferrin in dairy products[J]. **China Dairy**,2023(1):52-57. (in Chinese)
[34] 贾瑞勤,贾航,郑学超,等. 莱茵衣藻 IFT20 的原核表达、纯化及多克隆抗体鉴定[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(11):106-112.
JIA R Q, JIA H, ZHENG X C,et al. Prokaryotic expression,purification,and polyclonal antibody identification of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT20[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2023,42(11):106-112. (in Chinese)
[35] 王云云,石广革,孙嘉笛,等. 玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇双特异性抗体的制备及检测方法构建[J]. 食品与生物技术学报,2023,42(11):1-10.
WANG Y Y,SHI G G,SUN J D,et al. Preparation of bispecific antibodies against zearalenone and deoxynivalenol and construction of detection methods[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2023,42(11):1-10. (in Chinese)
[36] 黄小林,李倩影,吴雨豪,等. 多重免疫层析试纸辅助食品安全快速检测的研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2021,40(11):12-21.
HUANG X L,LI Q Y,WU Y H,et al. Research progress of multiplex immunochromatographic test strips for rapid food safety detection[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2021,40(11):12-21. (in Chinese)

(责任编辑:许艳超)