DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20260302004
**引用格式**: 段迪瀚, 陈渝峰, 陈鑫, 等. 基于纳米酶的驼乳掺假高灵敏快速检测方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(13): 250–257.
Duan Dihan, Chen Yufeng, Chen Xin, et al. Research on a highly sensitive and rapid detection method for camel milk adulteration based on nanozyme [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(13): 250–257. (in Chinese with English abstract).

# 基于纳米酶的驼乳掺假高灵敏快速检测方法研究

段迪瀚[1,2], 陈渝峰[3], 陈 鑫[3], 董 雪[3], 潘 莉[3], 曾婷婷[1], 洪 莎[1], 李 瑜[4], 高 帅[5], 美丽古丽•穆合买提[4], 刘 键[1*]

(1. 中国质量检验检测科学研究院, 北京 100176; 2. 伯明翰大学生物科学学院, 微生物与感染研究所, 伯明翰 B15 2TT; 3. 重庆康巨全弘生物科技有限公司, 重庆 400026; 4. 新疆维吾尔自治区质量基础发展研究院, 乌鲁木齐 830011; 5. 招商新疆质量检测技术研究院有限公司, 乌鲁木齐 830011)

**摘 要: 目的** 利用纳米酶催化底物增强检测信号的特性, 研制一种高灵敏度且可快速检测驼乳中是否掺入牛乳或羊乳的纳米酶免疫层析试剂条。**方法** 采用竞争法研制免疫层析试剂条, 将四氧二铁酸钴(cobalt iron oxide, $CoFe_2O_4$)纳米酶标记的 *β*-乳球蛋白兔抗体(antibody, Ab)喷在结合垫上, *β*-乳球蛋白抗原和鼠抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)分别包被在硝酸纤维素膜的检测线(T 线)和质控线(C 线)处, 组装成纳米酶免疫层析试剂条。将纳米酶试剂条与商品化胶体金免疫层析试剂盒进行一致性、灵敏度、检出限、特异性评价。**结果** 纳米酶试剂条检测抗原的灵敏度为 5 μg/mL, 比商品化胶体金试剂条灵敏度(1000 μg/mL)高 200 倍; 检出限为 0.02%(即牛乳稀释 5000 倍可检测), 相比商品化胶体金试剂条检出限(0.1%)具有明显优势; 具有良好特异性; 与商品化胶体金试剂条一致性为 100%。**结论** 该方法操作简便, 可在现场快速筛查出驼乳中是否掺假, 比商品化胶体金试剂条具有更高灵敏度。

**关键词:** 驼乳; 掺假; *β*-乳球蛋白; 纳米酶; 免疫层析
**中图分类号:** TS262.3 **文献识别码:** A **文章编号:** 2095–0381(2026)13–0250–08

## Research on a highly sensitive and rapid detection method for camel milk adulteration based on nanozyme

DUAN Di-Han[1,2], CHEN Yu-Feng[3], CHEN Xin[3], DONG Xue[3], PAN Li[3], ZENG Ting-Ting[1], HONG Sha[1], LI Yu[4], GAO Shuai[5], MEILIGULI•Mu-He-Mai-Ti[4], LIU Jian[1*]

(1. *Chinese Academy of Quality and Inspection & Testing*, *Beijing* 100176, *China*; 2. *Institute of Microbiology and Infection*, *School of Biosciences*, *University of Birmingham*, *Birmingham* B15 2TT, *UK*; 3. *Chongqing Kangjuquanhong Biotechnology Co*., *Ltd*., *Chongqing* 400026, *China*; 4. *Xinjiang Uyghur Autonomous Region Quality Basic Development Research Institute*, *Urumqi* 830011, *China*; 5. *China Merchants Xinjiang Quality Inspection Technology Research Institute Co*., *Ltd*., *Urumqi* 830011, *China*)

**收稿日期:** 2026-03-02
**基金项目:** 国家市场监督管理总局科技计划项目(2022MK134)
**第一作者:** 段迪瀚(2000—), 男, 硕士, 研究实习员, 主要研究方向为食品营养与安全。E-mail: dihanduan@foxmail.com
***通信作者:** 刘键(1978—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为分子生物学检验检测方法研究。E-mail: Liuj9919@163.com

**ABSTRACT: Objective**　To develop a nanozyme-based immunochromatographic test strip with high sensitivity for rapid identification of bovine milk or goat milk adulteration in camel milk, utilizing the property that nanozymes can catalyze substrates to amplify detection signals. **Methods**　The competitive method was adopted to develop the immunochromatography test strip. The rabbit antibody (Ab) of *β*-casein labeled with cobalt iron oxide ($CoFe_2O_4$) nanozyme was sprayed onto the binding pad. The *β*-casein antigen and mouse anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) were respectively coated on the detection line (T line) and the control line (C line) of the nitrocellulose membrane to assemble the nanozyme immuno-chromatographic test strip. The nanozyme test strip was evaluated for consistency, sensitivity, limit of detection and specificity with the commercial colloidal gold immuno-chromatographic kit. **Results**　The nanozyme strip demonstrated a sensitivity of 5 μg/mL for antigen detection, which was 200 times higher than that of the commercial colloidal gold strip (1000 μg/mL). The limit of detection was 0.02% (capable of detecting cow milk diluted up to 5000 times), demonstrating a significant advantage over commercially colloidal gold strips with a limit of detection was 0.1%. It exhibited excellent specificity and achieved 100% consistency with the commercial colloidal gold strip. **Conclusion**　This method is simple to operate, and can quickly screen out adulteration in camel milk on the spot. It has higher sensitivity than the commercial colloidal gold reagent strip.

**KEY WORDS:** camel milk; adulteration; *β*-casein; nanozyme; immunochromatography

## 0　引　言

驼乳是一种优质的乳制品, 近年来因其营养成分丰富对健康有益而受到全球消费者的青睐。相比牛乳和羊乳, 驼乳富含乳铁蛋白、锌、乳活性肽、单不饱和与多不饱和脂肪酸等多种营养成分[1–2]。研究表明, 驼乳具有抗氧化、抗癌、抗炎、抗菌、免疫调节、降血压以及降低胆固醇等功效[3]。随着人们生活品质的提升, 对驼乳的需求也越来越大。驼乳市场需求迅速扩张, 但驼乳价格高昂, 是普通牛乳价格的 10 多倍[4], 且产量有限(骆驼产乳量远低于奶牛), 为驼乳掺假行为提供了经济动机[5–7]。

市场供需之间的不平衡以及高额利润的诱惑, 导致驼乳市场出现了严重的掺假问题。不法商贩通过在驼乳中掺入低价乳源(如牛乳、羊乳)替代驼乳成分。由于驼乳和牛乳等在颜色、味道等方面无明显区别, 对于普通消费者而言根本无法肉眼鉴别驼乳是否掺假[6–7]。这类掺假行为不仅侵犯了消费者权益, 还对消费者健康构成威胁, 如 *β*-乳球蛋白过敏风险[8], 同时也破坏了市场秩序和合法企业的经营环境。因此, 针对驼乳掺假问题开发灵敏便捷的检测方法并制定相应管理措施, 具有重要的现实意义。

*β*-乳球蛋白是牛乳中的主要蛋白质, 分子量 18.2 kDa, 等电点 5.39[9]。*β*-乳球蛋白是反刍动物如牛、羊和单胃动物乳中的主要成分, 容易引发免疫反应出现过敏现象, 是牛乳中最主要的过敏原之一[10–11]。而驼乳中不含 *β*-乳球蛋白[12]。只要在驼乳样本中检测出了 *β*-乳球蛋白, 就可以断定该驼乳中掺入了牛乳或羊乳等外来乳源。因此, *β*-乳球蛋白成为了一个极其可靠的标志物[13]。目前基于检测 *β*-乳球蛋白的驼乳掺假方法主要有以下几类: 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)[14]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)[15]、免疫层析法[16]; ELISA 虽然灵敏度高, 但整个操作流程复杂且耗时; HPLC 准确度高, 能够精确定量掺假的比例, 但设备购置和维护成本高, 并且需要专业的人员操作[17]; 免疫层析试剂条检测法, 亦称为侧流免疫测定法, 是一种基于层析原理的免疫学检测方法[18]。该技术具有易于施行、耗时短、成本低、无需依赖专业设备或技术人员操作等优点, 适用于现场快速检测[19]。目前, 市面上驼乳掺假免疫层析试剂条通常是胶体金免疫层析方法, 灵敏度相对较低。纳米酶材料具有过氧化物酶活性, 可以催化过氧化氢分解产生羟基自由基(-OH), 这些具有强氧化性的自由基会迅速氧化 3,3’-二氨基联苯胺四盐酸盐(diaminobenzidine, DAB)分子, 夺取电子并引发聚合反应, 生成大量棕褐色聚合物, 显著增强肉眼可见的色度[20–22]。现在越来越多的研究者选择应用纳米酶为探针, 制作成各种类型的免疫层析试剂条, 纳米酶显著提升了试剂灵敏度[23], 应用于疾病诊断、食品安全检测、环境分析等领域[24–26]。其中四氧二铁酸钴(cobalt iron oxide, $CoFe_2O_4$) 纳米酶具有过氧化物酶和过氧化氢酶等活性, 有磁性, 且结构稳定在复杂的环境中仍能保持催化活性[27–29]。本研究通过采用 $CoFe_2O_4$ 纳米酶偶联 *β*-乳球蛋白抗体, 建立了一种具有更高灵敏度且可现场快速检测驼乳是否掺假的纳米酶免疫层析试剂条定性检测方法[30–31], 以期解决驼乳掺假检测的迫切需求, 提升检测灵敏度与便捷性, 实现现场快速检测。该工作为解决驼乳掺假问题提供了有效的技术手段, 对保障消费者权益、规范市场秩序及促进驼乳产业健康发展具有重要应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

驼乳掺假试剂条(8 条/桶)、液体牛乳、液体驼乳、液体马乳、羊乳粉、驼乳粉、牛乳粉均从本地超市和网站上购买。

$CoFe_2O_4$ 纳米酶(8.123 U/mg)、β-乳球蛋白兔多抗(重庆康巨全弘生物科技有限公司); 胶体金专用底板[通晟(福州)纸业有限公司]; 样本垫、结合垫(上海杰一生物技术有限公司); 硝酸纤维素膜(密理博中国有限公司); 吸水垫(上海金标生物科技有限公司); β-乳球蛋白(生物试剂)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐[N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, EDC]、N-羟基丁二酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)[分析纯, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 鼠抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG)(武汉奥科博泰生物科技有限公司); 六水氯化铁、乙二醇、六水合氯化钴、醋酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 聚丙烯酸、DAB、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、柠檬酸、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris](分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 30%过氧化氢[分析纯, 重庆川东化工(集团)有限公司]。

### 1.2 仪器与设备

HM3030XYZ 三维划膜喷金仪、HM8000 连续式划膜仪、CTS300 数控裁条机(上海金标生物科技有限公司); 5424R 冷冻离心机[艾本德(上海)国际贸易有限公司]; DHG-9070A 鼓风干燥箱、UV-1800PC 自动紫外可见光发光光度计(上海精其仪器有限公司); ZLB98FD 防潮箱(杭州亿捷科技有限公司); ME104E 分析天平(精度 0.0001 g, 瑞士梅特勒-托利多集团); SK2200LHC 超声波清洗器(上海科导超声仪器有限公司); HSH1-40L-Y 超纯水机(重庆华创水处理工程有限公司); FEI Tecnai G2 120KV 低电压透射电镜(日本电子株式会社); NanoDrop One 超微量紫外-可见光发光光度计(美国赛默飞世尔科技公司); CIC-S100 胶体金试纸定量分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司)。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 检测原理

采用竞争法检测 β-乳球蛋白, 检测原理[32]如图 1[33]所示。试剂条上的硝酸纤维素膜检测线(T 线) 包被 β-乳球蛋白抗原, 质控线(C 线)包被鼠抗兔 IgG。结合垫上含有 $CoFe_2O_4$ 纳米酶标记的 β-乳球蛋白兔多抗。

测试含待测 β-乳球蛋白的样本时, 将待测样本液滴入试剂条样本垫处, 液体在毛细作用下向前层析。样本中的β-乳球蛋白在层析过程中先与纳米酶标记的β-乳球蛋白兔多抗结合, 然后向前层析: (1)若样本中 β-乳球蛋白含量充分时, 纳米酶标记的 β-乳球蛋白兔多抗完全与样本中的β-乳球蛋白结合, 则没有多余的纳米酶标记的 β-乳球蛋白兔多抗与 T 线处的 β-乳球蛋白抗原结合, 在 T 线位置不会形成纳米酶条带; 随着样本液继续向前层析, 则该结合物会与 C 线处的鼠抗兔 IgG 二抗结合, 形成棕褐色的纳米酶条带(质控线), 检测结果为阳性(+)。(2)当样本中含有 β-乳球蛋白较少时, T 线位置会捕捉未被样本 β-乳球蛋白结合的剩余纳米酶标记的 β-乳球蛋白兔多抗, 从而在 T 线位置形成较浅的棕褐色纳米酶条带, C 线位置也同时会形成纳米酶条带, 检测结果为弱阳性(弱+)。(3)当测试样本中不含β-乳球蛋白时, T线和C线位置均会形成较深的纳米酶条带, 检测结果为阴性(–)。

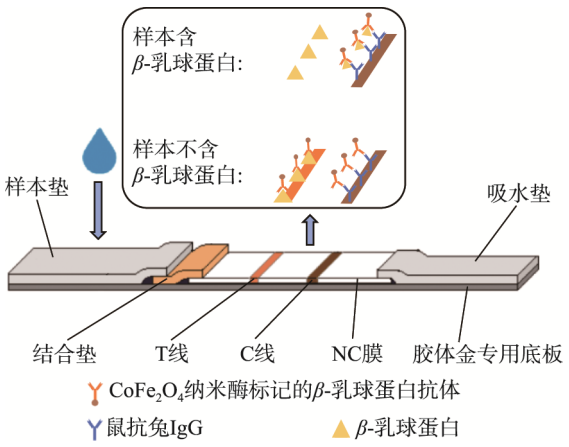



图 1 竞争法检测抗原示意图

Fig.1 Schematic diagram of competitive method for antigen detection

#### 1.3.2 检测方法

取 140 μL 待测样本加入到试剂条中, 反应 5 min 后观察结果。为更好地判读结果, 在层析 5 min 后加入 150 μL DAB 显色液, 反应 10 min 后观察结果。同时使用商品化胶体金试剂条, 按照其说明书操作步骤进行样本的检测。

### 1.4 $CoFe_2O_4$ 纳米酶的制备

$CoFe_2O_4$ 纳米酶按照文献[34]的方法来进行制备并稍作修改, 具体流程为: 取乙二醇试剂 400 mL, 加入聚丙烯酸 3 g, 六水氯化铁 7.2 g, 六水合氯化钴 3.17 g, 醋酸钠 30 g。快速搅拌 30 min 后将溶液转移至反应釜, 200 ℃反应 12~14 h, 用乙醇多次洗涤后, 放入 60 ℃中干燥。

### 1.5 纳米酶免疫层析试剂条的制备

#### 1.5.1 纳米酶结合垫的制备

用纯化水将 $CoFe_2O_4$ 纳米酶稀释成 1.0 mg/mL 的溶液, 超声 2 min 然后 4 ℃、10000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清液。沉淀物中加入 EDC 和 NHS 溶液, 避光活化 15 min 后, 4 ℃、10000 r/min 离心 10 min, 吸弃上清液。在活化好的

纳米酶溶液中加入 0.012 mg 的 $\beta$-乳球蛋白兔多抗, 2~8 ℃反应 22~24 h。反应后磁吸弃去上清液, 沉淀物中加入 Tris 缓冲液, 超声至溶液中无明显颗粒。使用 XYZ 三维划膜喷金仪, 将溶液均匀喷在结合垫上, 放入鼓风干燥箱中, 37 ℃干燥 22~24 h 后, 保存在 15~25 ℃、湿度小于 20%的环境中备用。

1.5.2　含检测线和质控线的硝酸纤维素膜制备

检测线包被液的配制: 称取 5 mg $\beta$-乳球蛋白, 加入 5 mL 磷酸盐缓冲溶液, 充分溶解后, 放入 2~8 ℃中备用。质控线包被液的配制: 鼠抗兔 IgG 中加入磷酸盐缓冲液, 配制成质量浓度为 1 mg/mL 溶液, 充分混合均匀后, 放入 2~8 ℃中备用。使用连续划膜仪将检测线包被液和质控线包被液均匀划线到硝酸纤维素膜上, 放入鼓风干燥箱中, 37 ℃干燥 22~24 h 后, 保存在 15~25 ℃、湿度小于 20%环境中备用。

1.5.3　试剂条组装

将样本垫、纳米酶结合垫、含检测线和质控线的硝酸纤维素膜、吸水垫、胶体金专用底板, 按照图 1 所示顺序进行组装, 将组装好的大板放入数控裁条机中, 切割成 4 mm 的试剂条, 保存在 15~25 ℃、湿度小于 20% 环境中备用。

### 1.6　DAB 显色液的制备

显色液-1 的配制: 称取 10 mg DAB, 加入 10 mL 柠檬酸盐缓冲液, 充分溶解后, 放入 2~8 ℃中备用。显色液-2 的配制: 量取 10 mL 30%过氧化氢, 加入 90 mL 柠檬酸盐缓冲液, 充分溶解后, 放入 2~8 ℃中备用。DAB 显色液使用前, 按照显色液 1:显色液 2=1:19 ($V$:$V$)比例混合均匀后进行使用。

### 1.7　试剂条灵敏度和检出限测试

灵敏度样本配制: 取 5 mg $\beta$-乳球蛋白, 加入 5 mL Tris 缓冲液, 充分溶解后, 用 Tris 缓冲液进行稀释, 分别配制成 1000、100、10、5、1 μg/mL、空白的待测样本。

检出限样本配制: 将牛乳用 Tris 缓冲液进行稀释, 分别配制成稀释 100 倍、稀释 1000 倍、稀释 5000 倍、空白的待测样本。

将配制好的灵敏度样本和检出限样本加入试剂条中, 观察试剂条的 T 线和 C 线变化, 能明显区分 T 线和 C 线的样本浓度作为试剂条的灵敏度和检出限。

### 1.8　试剂条特异性测试

分别将牛乳、羊乳、马乳、驼乳用 Tris 缓冲液进行稀释, 将配制好的特异性样本加入试剂条中, 观察试剂条的 T 线和 C 线变化。

### 1.9　试剂条一致性评价

外购 20 份市售的乳制品, 由其产品包装上的配料表可知, 其中 3 份为牛乳制品; 1 份为羊乳制品; 1 份为马乳制品; 9 份为纯驼乳制品, 6 份为复合驼乳制品。20 份乳制品中有巴氏消毒、超高温瞬时灭菌的乳液; 运用低温干燥技术和喷雾干燥技术制得的纯乳粉; 添加各种生牛乳、乳球蛋白粉、益生菌等复合乳制品。将液体乳制品恢复至室温后, 按照液体乳制品:Tris 缓冲液=1:3 ($V$:$V$)比例进行稀释。称取 0.1 g 乳粉制品, 加入 2 mL Tris 缓冲液(50~60 ℃)进行振荡混匀, 溶解至溶液中无明显粉末颗粒, 待样本恢复至室温就可以进行测试。本研究使用盲测法, 将 20 份待测样本进行随机编号。采用纳米酶试剂条和商品化胶体金试剂条对配制好的待测样本同时进行检测, 观察试剂条的 T 线和 C 线变化。参考 WS/T 505—2017《定性测定性能评价指南》计算纳米酶试剂条和商品化胶体金试剂条的检测结果的阳性符合率、阴性符合率和总符合率。同时进行假设检验, 以评价二者一致性, 并进行 Kappa 检验[35–36]。

### 1.10　数据处理

使用 Origin 2024 版对 $CoFe_2O_4$ 纳米酶的酶活比和纳米酶试剂条加 DAB 显色液后 T 线灰度值进行绘制。利用 Microsoft Excel 2010 版对实验结果进行统计, 并结合 SPSS 17.0 版对其进行 Kappa 检验。

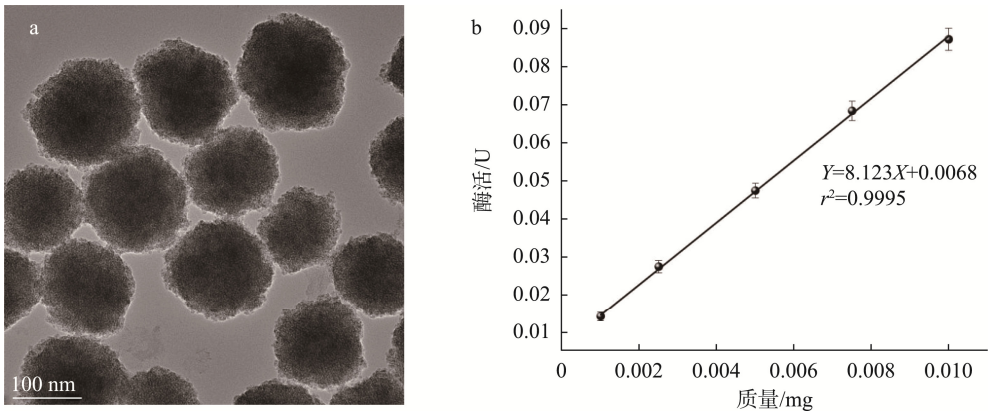
## 2　结果与分析

### 2.1　$CoFe_2O_4$ 纳米酶表征

通过透射电子显微镜图像(图 2a)分析可知, $CoFe_2O_4$ 纳米酶平均粒径约为 100 nm; 比酶活为 8.123 U/mg(图 2b), 总体呈现为均一的球形结构, 粒径分布均一, 颗粒轮廓清晰, 边缘完整, 无明显团聚现象, 表明该纳米酶具有良好的分散性, 有利于其活性位点与底物充分接触, 从而展现出较高的催化效率。$CoFe_2O_4$ 纳米酶因其晶石结构中 $Co^{2+}/Co^{3+}$、$Fe^{2+}/Fe^{3+}$多价态共存, 电子转移快, 使得其比传统金属氧化物纳米酶($Fe_3O_4$、CuO、$MnO_2$、ZnO 等)的类过氧化物酶活性高, 且具备超顺磁性, 可通过外加磁场进行有效分离, 避免因离心产生的高机械应力导致纳米酶团聚。$CoFe_2O_4$ 纳米酶的稳定性优异, 其表面-$COO^-$提供强静电排斥, 并形成水化层, 可减少金属离子溶出, 有效抑制团聚。

### 2.2　$CoFe_2O_4$ 纳米酶-$\beta$-乳球蛋白兔多抗复合物表征

3 批 $CoFe_2O_4$ 纳米酶-$\beta$-乳球蛋白兔多抗复合物标记结束后, 溶液中颗粒分布均匀, 无聚集现象出现。用超微紫外-可见分光光度计进行测试其标记前后的吸光度值, 由表 1 可知, 3 批复合物标记效率均在 70%以上。将 3 批标记好的复合物喷涂在玻璃纤维膜上, 组装成试剂条, 由表 2 可知, 3 批纳米酶试剂条空白样本 T 线灰度值明显高于 5 μg/mL 和 100 μg/mL $\beta$-乳球蛋白样本。由图 3 可知, 随着加入 DAB 显色液后反应时间的增加, T 线灰度值先增加后降低, 当反应时间为 10 min 时其灰度值最高。




注: a. 透射电子显微镜图像; b. 比酶活图。

图 2 $CoFe_2O_4$ 纳米酶的电镜表征与比酶活测定

Fig. 2 Electron microscopy characterization and specific enzymatic activity determination of $CoFe_2O_4$ nanozymes

**表 1 3 批纳米酶-*β*-乳球蛋白兔多抗偶联效率统计表**

**Table 1 Statistical table of conjugation efficiency for 3 batches of nanozyme-*β*-lactoglobulin rabbit polyclonal antibody**

| 批次 | 标记前吸光度值 | 标记后吸光度值 | 偶联效率/% |
|---|---|---|---|
| 1 | 0.071 | 0.020 | 71.83 |
| 2 | 0.065 | 0.018 | 72.31 |
| 3 | 0.064 | 0.017 | 73.44 |

**表 2 3 批纳米酶试剂条 T 线灰度值统计表**

**Table 2 Statistical table of T-line gray values for 3 batches of nanozyme strips**

| 批次 | 空白 | 5 μg/mL *β*-乳球蛋白 | 100 μg/mL *β*-乳球蛋白 |
|---|---|---|---|
| 1 | 2031 | 813 | 12 |
| 2 | 1973 | 782 | 8 |
| 3 | 2027 | 809 | 15 |

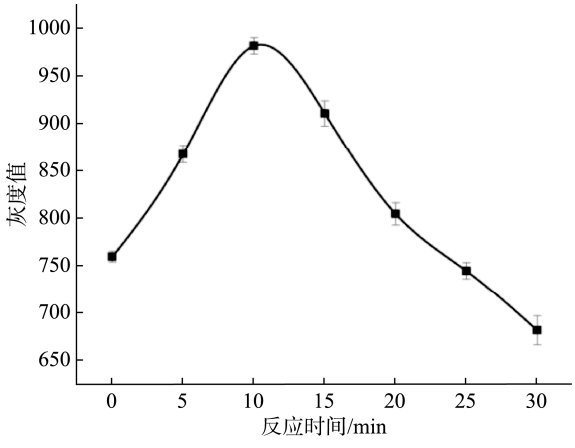



图 3 纳米酶试剂条加 DAB 显色液后 T 线灰度值

Fig.3 Gray value of the T-line on the nanozyme strip after adding DAB chromogenic solution

## 2.3 试剂条灵敏度和检出限结果

纳米酶免疫层析试剂条的判读方法与商品化胶体金试剂条一致: T 线颜色比 C 线颜色深或者 T 线颜色和 C 线颜色一致时为阴性“–”, 即样本中不含 *β*-乳球蛋白; 只有 C 线无 T 线, 或者 T 线颜色比 C 线颜色浅为阳性“+”, 即样本中含有 *β*-乳球蛋白。

由表 3 可知, 纳米酶试剂条灵敏度在 5 μg/mL 和检出限在 0.02%(即牛乳稀释 5000 倍)时, T 线颜色明显比 C 线颜色浅。商品化胶体金试剂条灵敏度为 1000 μg/mL, 可以检测到稀释 1000 倍的牛乳即最低检出限为 0.1%。相对于商品化胶体金试剂条, 纳米酶免疫层析试剂条的检出限和灵敏度均明显优于商品化胶体金试剂条。

**表 3 纳米酶试剂条和商品化胶体金试剂条灵敏度和检出限结果统计表**

**Table 3 Statistical table of sensitivity and limit of detection between nanozyme strip and commercial colloidal gold strip**

| 样本信息 | 纳米酶试剂条 | 商品化胶体金试剂条 |
|---|---|---|
| 抗原 1000 μg/mL | + | + |
| 抗原 100 μg/mL | + | – |
| 抗原 10 μg/mL | + | – |
| 抗原 5 μg/mL | + | – |
| 抗原 1 μg/mL | – | – |
| 空白 | – | – |
| 牛乳稀释 100 倍 | + | + |
| 牛乳稀释 1000 倍 | + | + |
| 牛乳稀释 5000 倍 | + | – |
| 空白 | – | – |

注: +表示阳性, –表示阴性。下表同。

## 2.4 试剂条特异性测试结果

由表 4 可知, 试剂条检测特异性样本时, 驼乳检测结果仍为阴性, 牛乳、羊乳、马乳检测结果均仍为阳性。与商品化胶体金试剂条的检测结果一致。说明纳米酶免疫层

析试剂条和商品化胶体金试剂条均能将驼乳与牛乳、羊乳、马乳进行区别, 特异性良好。

**表 4　纳米酶试剂条和商品化胶体金试剂条特异性结果统计表**
**Table 4　Statistical table of specificity between nanozyme strip and commercial colloidal gold strip**

| 样本信息 | 纳米酶试剂条 | 商品化胶体金试剂条 |
|---|---|---|
| 牛乳 | + | + |
| 羊乳 | + | + |
| 马乳 | + | + |
| 驼乳 | – | – |

## 2.5　试剂条一致性

由表 5 可知, 纳米酶试剂条检测 20 份样本时, 9 份样本的检测结果为阴性, 11 份样本检测结果为阳性。检测结果为阴性的 9 份样本均为驼乳制品; 检测结果为阳性的 11 份样本, 其中 3 份牛乳制品、1 份羊乳制品、1 份马乳制品、6 份驼乳制品。使用商品化胶体金试剂条检测时, 其结果与纳米酶试剂条检测结果一致。由表 6、表 7 的结果可知, 纳米酶试剂条与商品化胶体金试剂条的总符合率达到 100%; 两种试剂条的 Kappa 值为 1.0, 说明两种试剂条结果具有高度一致性[30]。

**表 5　纳米酶试剂条和商品化胶体金试剂条检测 20 个乳制品结果统计表**
**Table 5　Statistical table of nanozyme strip and commercial colloidal gold strip in testing 20 dairy products**

| 样本编号 | 样本 | 纳米酶试剂条 | 比对试剂 | 备注 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 牛乳 | + | + | 配料表: 生牛乳 |
| 2 | 脱脂纯牛乳粉 | + | + | 配料表: 生牛乳 |
| 3 | 驼乳 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 4 | 羊乳粉 | + | + | 配料表: 生羊乳 |
| 5 | 复合驼牛乳 | + | + | 配料表: 纯驼乳、牛乳 |
| 6 | 全脂纯牛乳粉 | + | + | 配料表: 生牛乳 |
| 7 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 纯驼乳 |
| 8 | 复合驼乳 | + | + | 配料表: 纯驼乳、牛乳 |
| 9 | 驼乳 | – | – | 配料表: 生鲜纯驼乳 |
| 10 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 11 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 12 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 13 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 14 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 15 | 驼乳粉 | – | – | 配料表: 生驼乳 |
| 16 | 马乳 | + | + | 配料表: 生马乳 |
| 17 | 复合驼乳粉 | + | + | 配料表: 全脂驼乳粉、乳清蛋白粉等 |
| 18 | 复合驼乳粉 | + | + | 配料表: 全脂驼乳粉、乳清蛋白粉等 |
| 19 | 复合驼乳粉 | + | + | 配料表:全脂驼乳粉、乳清蛋白粉等 |
| 20 | 复合驼乳粉 | + | + | 配料表:全脂驼乳粉、乳清蛋白粉等 |

**表 6　纳米酶试剂条和商品化胶体金试剂条一致性结果**
**Table 6　Agreement results of nanozyme strip and commercial colloidal gold strip**

| | | 商品化胶体金试剂条 | | 总计 | 阳性符合率/% | 阴性符合率/% | 总体符合率/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 阳性 | 阴性 | | | | |
| 纳米酶试剂条 | 阳性 | 11 | 0 | 11 | 100 | 100 | 100 |
| | 阴性 | 0 | 9 | 9 | | | |
| 总计 | | 11 | 9 | 20 | | | |

**表 7 纳米酶试剂条与商品化胶体金试剂条检测结果的对比表**
**Table 7 Comparison table of detection results between nanozyme strip and commercial colloidal gold strip**

| | 值 | 渐进标准误差 | 近似值 (*T*) | 渐进显著性 (*P*) |
|---|---|---|---|---|
| 一致性度量 Kappa | 1.000 | 0.000 | 4.472 | 0.000 |
| 有效案例中的 N | 20 | / | / | / |

注: Kappa=1.0 表明两个评估者完全一致; ASE=0.000 说明这个一致性是确定的(没有随机误差); *T*=4.472 和 *P*≈0 表明 Kappa 值显著大于 0, 完全一致的结果统计意义上高度显著; /表示无数据。

## 3 结 论

本研究构建了一种基于 $CoFe_2O_4$ 纳米酶的免疫层析检测方法, 用于驼乳掺假的现场快速筛查。该方法具有灵敏度高、特异性好、操作简便、分析快速、成本低廉且无需依赖大型仪器等突出优势。该技术为驼乳掺假鉴别提供了一种可靠的现场筛查工具, 具有广阔的应用前景和推广价值。

## 参考文献


[1] Bruno S N F, Vaitsman D S, Kunigami C N, et al. Influence of the distillation processes from Rio de Janeiro in the ethyl carbamate formation in Brazilian sugar cane spirits [J]. Food Chemistry, 2007, 104(4): 1345–1352.

[2] 陆洋, 杨波涛, 陈凤香. 复配天然抗氧化剂对食用油脂抗氧化效果研究[J]. 食品科学, 2009, 30(11): 55–57.
Lu Yang, Yang Botao, Chen Fengxiang. Study on antioxidation of natural antioxidant compound on edible oil [J]. Food Science, 2009, 30(11): 55–57.

[3] Alhassani W E. Camel milk: nutritional composition, therapeutic properties, and benefits for human health [J]. Open Veterinary Journal, 2024, 14(12): 3164–3180.

[4] 照日格图, 乌尼蒙和, 汪治同. 骆驼奶营养成分的测定[J]. 中国畜牧业, 2016(7): 51–52.
Zhaorigetu, Wunimenghe, Wang Zhitong. Determination of nutritional components in camel milk [J]. China Animal Industry, 2016(7): 51–52.

[5] Faye B. The camel, new challenges for a sustainable development [J]. Tropical Animal Health and Production, 2016, 48(4): 689–692.

[6] Chi S X, Liu B H, Zhang B, et al. Development of an ELISA method to determine adulterated cow milk in camel milk [J]. International Dairy Journal, 2024(155): 105953.

[7] Authors F. Camel milk: alternative milk for human consumption and its health benefits [J]. Nutrition & Food Science, 2016, 46(2): 217–227.

[8] Zeng Jianhua, Wang Qingfei, Yi Huaxi, et al. Recent insights in cow's milk protein allergy: clinical relevance, allergen features, and influences of food processing [J]. Trends in Food Science & Technology, 2024, 156: 104830.

[9] 徐雨佳, 钟俊桢, 刘成梅, 等. 糖基化对 *β*–乳球蛋白致敏性的影响[J]. 食品与机械, 2012, 28(1): 82–85.
Xu Yujia, Zhong Junzhen, Liu Chengmei, et al. Effect of glycosylation on the allergenicity of *β*–lactoglobulin [J]. Food & Machinery, 2012, 28(1): 82–85.

[10] Li Ti, Hu Peng, Dai Taotao, et al. Comparing the binding interaction between *β*–lactoglobulin and flavonoids with different structure by multi–spectroscopy analysis and molecular docking [J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018(201): 197–206.

[11] 王亚玲, 贾舸, 赵军英, 等. 牛乳 *β*–乳球蛋白变异体检测方法研究进展[J]. 中国食品学报, 2024, 24(3): 446–457.
Wang Yaling, Jia Ge, Zhao Junying, et al. Research progress on detection methods for *β*–lactoglobulin variants in bovine milk [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2024, 24(3): 446–457.

[12] 刘燕, 温嘉和, 赵子慧, 等. 骆驼乳、牛乳、山羊乳中蛋白质和脂肪酸成分的比较[J]. 食品科学, 2024, 45(16): 161–168.
Liu Yan, Wen Jiahe, Zhao Zihui, et al. Comparison of protein and fatty acid components in camel milk, bovine milk, and goat milk [J]. Food Science, 2024, 45(16): 161–168.

[13] 李玲玉, 王俊, 李敏婧, 等. 基于乳清蛋白的骆驼乳中掺假牛乳的检测及热处理对方法的影响[J]. 食品科学, 2022, 43(10): 329–335.
Li Lingyu, Wang Jun, Li Minjing, et al. Detection of adulterated bovine milk in camel milk based on whey proteins and the effect of heat treatment on the method [J]. Food Science, 2022, 43(10): 329–335.

[14] Xie Qinggang, Huang Yuhao, Zhang Xianli, et al. Development of an indirect competitive ELISA based on a stable epitope of *β*–lactoglobulin for its detection in hydrolyzed formula milk powder [J]. Foods, 2024, 13(21): 3477.

[15] 李志伟, 得力努尔•拜山别克, 李东健, 等. 基于液相色谱–质谱联用代谢组学方法分析比较驼乳与牛乳代谢物的差异[J]. 食品科学, 2025, 46(4): 154–162.
Li Zhiwei, Dilinuer Baishanbieke, Li Dongjian, et al. Comparative analysis of metabolites in camel milk and bovine milk based on liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics [J]. Food Science, 2025, 46(4): 154–162.

[16] 王士峰, 姚添淇, 冯荣虎, 等. 胶体金免疫层析法快速检测配方羊奶粉中的牛 *β*–乳球蛋白[J]. 食品工业科技, 2018, 39(15): 60–64.
Wang Shifeng, Yao Tianqi, Feng Ronghu, et al. Rapid detection of bovine *β*–lactoglobulin in formulated goat milk powder by colloidal gold immunochromatographic assay [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(15): 60–64.

[17] 薛海燕, 吴剑, 张颖, 等. 牛 *β*–乳球蛋白胶体金免疫层析试纸条的研制及检测应用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 259–266.
Xue Haiyan, Wu Jian, Zhang Ying, et al. Development and application of a colloidal gold immunochromatographic strip for bovine *β*–lactoglobulin [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 259–266.

[18] 淦露. 黄曲霉毒素检测技术研究进展[J]. 现代食品, 2022, 28(15): 114–117.
Gan Lu. Research progress on detection technologies for aflatoxins [J]. Modern Food, 2022, 28(15): 114–117.

[19] Di-Nardo F, Baggiani C, Giovannoli C, et al. Multicolor immunochromatographic strip test based on gold nanoparticles for the determination of aflatoxin $B_1$ and fumonisins [J]. Microchim Acta, 2017(184): 1295–1304.

[20] 张家豪, 黄焯林, 刘英菊. 基于纳米酶的电化学传感技术在食品安全检测中的应用进展[J]. 食品与发酵工业, 2025, 51(13): 408–419.

Zhang Jiahao, Huang Chuolin, Liu Yingju. Application progress of electrochemical sensing technology based on nanozymes in food safety detection [J]. Food and Fermentation Industries, 2025, 51(13): 408–419.

[21] Gao L Z, Zhuang J, Nie L, et al. Intrinsic peroxidase–like activity of ferromagnetic nanoparticles [J]. Nature Nanotechnology, 2007(2): 577–583.

[22] 闫灵芝. 免疫层析试纸条信号放大技术研究进展[J]. 食品工业科技, 2022, 43(11): 34–44.
Yan Lingzhi. Research progress on signal amplification technology for immunochromatographic test strips [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(11): 34–44.

[23] 刘紫洋, 胡高爽, 郝建雄, 等. 纳米酶标记免疫分析技术在食品安全检测应用中的研究进展[J]. 食品与机械, 2025, 41(1): 234–242.
Liu Ziyang, Hu Gaoshuang, Hao Jianxiong, et al. Research progress on the application of nanozyme–labeled immunoassay technology in food safety detection [J]. Food & Machinery, 2025, 41(1): 234–242.

[24] 符娜, 向均, 张永江, 等. 纳米酶免疫层析试纸条法检测玉米褪绿斑驳病毒[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(6): 1154–1159.
Fu Na, Xiang Jun, Zhang Yongjiang, et al. Detection of maize chlorotic mottle virus by nanozyme immunochromatographic test strip [J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2021, 58(6): 1154–1159.

[25] 刘键, 张永江, 李小盼, 等. 诺如病毒纳米酶试纸条检测方法的建立[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2020, 43(2): 88–90.
Liu Jian, Zhang Yongjiang, Li Xiaopan, et al. Establishment of a nanozyme test strip detection method for norovirus [J]. Chinese Journal of Frontier Health and Quarantine, 2020, 43(2): 88–90.

[26] 柯瑞卿, 张琪, 陈洋, 等. 基于 Fe–N–C@Hemin 纳米酶的比色法快速检测食品中硒元素含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(23): 103–110.
Ke Ruiqing, Zhang Qi, Chen Yang, et al. Rapid colorimetric detection of selenium content in food based on Fe–N–C@Hemin nanozyme [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(23): 103–110.

[27] Yang Yang, Gu Hongmei, Qin Shuheng, et al. $CoFe_2O_4$–based multifunctional nanozymes remodel tumor redox balance for enhanced osteosarcoma treatment [J]. International Journal of Nanomedicine, 2025(20): 13741–13758.

[28] He Fei, Li Weikang, Zhao Fengyang, et al. Pt deposited on magnetic $CoFe_2O_4$ nanoparticles: double enzyme–like activity, catalytic mechanism and fast colorimetric sensing of dopamine [J]. Microchemical Journal, 2020(158): 105264.

[29] Han Yu, Zhang Zhijia, Guo Ling. Theoretical study on cobalt ferrite $ConFe_3$–$nO_4$ ($n$=1–2) nanoparticles with multi–enzyme activities [J]. Catalysis Surveys from Asia, 2020(24): 166–177.

[30] 汲涵蕾, 刘倩宇, 李可旋, 等. 基于纳米颗粒标记的新烟碱类农药残留快速检测试纸条的开发与应用[J]. 农业开发与装备, 2025(2): 49–51.
Ji Hanlei, Liu Qianyu, Li Kexuan, et al. Development and application of rapid detection test strips for neonicotinoid pesticide residues based on nanoparticle labeling [J]. Agricultural Development & Equipments, 2025(2): 49–51.

[31] 张子怡, 周双, 梅雪娜, 等. 基于纳米酶的纸基比色传感器在即时检测领域的应用研究进展[J]. 化学学报, 2025, 83(2): 170–183.
Zhang Ziyi, Zhou Shuang, Mei Xuena, et al. Research progress on the application of nanozyme–based paper–based colorimetric sensors in point–of–care testing [J]. Acta Chimica Sinica, 2025, 83(2): 170–183.

[32] 邓家军, 杨琳芬, 张富生, 等. 胶体金免疫层析法与酶抑制率法快速检测果蔬中农药残留比较研究[J]. 安徽农业科学, 2021, 49(4): 191–197.
Deng Jiajun, Yang Linfen, Zhang Fusheng, et al. Comparative study on rapid detection of pesticide residues in fruits and vegetables by colloidal gold immunochromatography and enzyme inhibition rate method [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2021, 49(4): 191–197.

[33] Shen Chanjuan, Cheng Anchun, Wang Mingshu, et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip test based on the recombinant UL51 protein for detecting antibody against duck enteritis virus [J]. Virology Journal, 2010(7): 268.

[34] Hong Juanji, Guo Zhanjun, Duan Dihan, et al. Highly sensitive nanozyme strip: An effective tool for forensic material evidence identification [J]. Nano Research, 2024, 17(2): 1785–1791.

[35] Mchugh M L. Interrater reliability: the kappa statistic [J]. Biochemia Medica, 2012, 22(3): 276–282.

[36] 颜虹, 徐勇勇. 医学统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 220–221.
Yan Hong, Xu Yongyong. Medical statistics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2015: 220–221.

(责任编辑: 蔡世佳　韩晓红)