

三聚氰胺 ELISA 试剂盒在食品检测中的 检测效果研究

谢体波¹, 李平^{1*}, 易重任¹, 刘天雷¹, 罗贵昆¹, 何方洋^{1,2}

(1. 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司, 贵阳 550009; 2. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 100012)

摘要: **目的** 为验证本公司生产的三聚氰胺 ELISA 检测试剂盒的检测效果。**方法** 用酶联免疫法对牛奶、奶粉、鸡肉和鸡蛋等 4 种样品中三聚氰胺的残留量进行检测, 并与高效液相色谱法进行对照。**结果** 结果表明: 该试剂盒对 4 种样品的最低检测限分别为 19.22、46.86、51.64、21.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 试剂盒板内板间变异系数均小于 10%; 对 4 种样品做加标回收试验, 其回收率均在 95%~120%之间, 变异系数均小于 10%; 该方法与高效液相色谱法检测实际样品的阴、阳性判断结果一致。**结论** 该方法稳定、可靠, 可满足食品中三聚氰胺残留快速检测的需要。

关键词: 三聚氰胺; 酶联免疫法; 高效液相色谱法; 检测

Research on detection results of melamine enzyme-linked immune sorbent assay detection kit in food

XIE Ti-Bo¹, LI Ping^{1*}, YI Zhong-Ren¹, LIU Tian-Lei¹, LUO Gui-Kun¹, HE Fang-Yang^{1,2}

(1. Guizhou Kwinbon Food Safety Science-Technology Co., Ltd., Guiyang 550009, China; 2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100012, China)

ABSTRACT: Objective To verify the test effect of melamine enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) detection kit developed by Beijing Kwinbon Biotechnology company. **Methods** The method of ELISA was used to detect the residues of melamine in milk, milk powder, chicken and eggs, and compared with that of high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** The results showed that the minimum detection limitation of the kit for the 4 kinds of samples were 19.22, 46.86, 51.64, 21.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the coefficient of variation was less than 10%. The recovery of the method was in the range of 95%~120%, and the coefficient of variation was less than 10%. The ELISA's judgments of positive and negative were the same as the HPLC's. **Conclusion** This method was efficient, reliable and sensitive, and could meet the fast-tested for the determination of melamine residues in food.

KEY WORDS: melamine; enzyme linked immune sorbent assay; high performance liquid chromatography; detection

基金项目: 2013 创新人才计划项目(筑科合同[2013]209-01); 贵州省技术创新项目;

Fund: Supported by 2013 Innovative Talents Scheme([2013]209-01); Guizhou Technology Innovation;

*通讯作者: 李平, 中级工程师, 主要从事食品安全快速检测技术的研究与开发. E-mail: 294173456@qq.com

*Corresponding author: Li Ping, Intermediate Engineer, Guizhou Kwinbon Food Safety Science-Technology Co., Ltd., Guiyang 550009, China. E-mail: 294173456@qq.com

1 引言

三聚氰胺俗称密胺、蛋白精,是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,因其分子中含有大量氮元素,一些不法商家利用该特点向食品中添加三聚氰胺来提高蛋白质含量,但其具有肾毒性^[1-3],长期摄入可导致肾衰竭、肾结石等^[4],并可诱发膀胱癌。目前,针对乳制品及其他食品中三聚氰胺残留量的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)^[5,6]、液相色谱-质谱/质谱法(LC-MS/MS)^[7]、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)^[8]等,但这些方法通常需要昂贵的仪器和高素质的检验人员,而且检测成本较高,会浪费大量人力、物力^[9],这些因素限制了大型仪器检测方法的大面积推广和批量检测,不便于终端消费者进行快速筛选和诊断。快速检测方法主要有酶联免疫法,胶体金免疫层析法等,其中酶联免疫法是一种灵敏度高、特异性强、重复性好的检测方法^[10],具有操作方便、成本较低等优点,被广泛应用于食品中残留三聚氰胺检测。市场上针对三聚氰胺快速检测的进口试剂盒主要有美国Rome Labs、Abraxis、Beacon及Strategic Diagnostics公司的产品^[11],Beacon公司生产的试剂盒的检测结果略高于HPLC方法的检测结果^[12],Rome Labs公司的试剂盒检出限为9 ng/mL;国内也有许多用于食品中三聚氰胺或三聚氰酸残留检测的试剂盒,例如,北京维德维康生物技术有限公司及农科院质量标准与检测技术研究所开发的试剂盒,但这些试剂盒在三聚氰胺类似检测及相关性能评估方面的数据较少^[13]。

为验证本公司生产的三聚氰胺酶联免疫检测试剂盒的检测效果,本研究采用酶联免疫检测方法对牛奶等4种样品中三聚氰胺残留量进行检测,并与高效液相色谱法检测结果进行对照,以期为我国食品安全快速检测方面提供一些简单、快速、准确的检测方法。结果表明,我公司生产的试剂盒回收率在95%~120%,损失较少,检测牛奶样品的灵敏度为0.5 mg/kg,比国内一些试剂盒的灵敏度高(10^{-6})^[13]。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品与试剂

牛奶、奶粉、鸡肉、鸡蛋均为市售;三聚氰胺

(Melamine)ELISA检测试剂盒(北京勤邦生物技术有限公司);乙腈、浓盐酸、甲醇、丙酮(分析纯,天津市富宇精细化工有限公司)。

2.1.2 仪器与设备

微孔板酶标仪(KHB ST-360,上海科华实验系统有限公司),振荡器(SHA-C,金坛市白塔金昌实验仪器厂),涡旋仪(QL-901,海门市其林贝尔仪器制造有限公司),离心机(DT5-2,北京时代北利离心机有限公司),匀浆机(MJ-BL2504,美的),天平(ESJ200-4,沈阳龙腾电子有限公司),微量移液器(Thermo)。

2.2 方法

2.2.1 样品前处理方法

(1) 牛奶样品前处理方法

移取400 μ L牛奶样本至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入800 μ L乙腈,用涡旋仪涡动1 min,3000 g以上,室温(20~25 $^{\circ}$ C)离心5 min;移取100 μ L上清液至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入500 μ L复溶工作液,用涡旋仪涡动1 min,混匀;取50 μ L用于分析。

(2) 奶粉样品前处理方法

称取(1.0 \pm 0.05) g奶粉样本至10 mL聚苯乙烯离心管中,加入2.5 mL去离子水,用振荡器振荡3 min至奶粉完全溶解;移取400 μ L样本液至2 mL聚苯乙烯离心管中,分别加入400 μ L乙腈、400 μ L甲醇,用涡旋仪涡动1 min,3000 g以上,室温(20~25 $^{\circ}$ C)离心5 min;移取100 μ L上清液至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入500 μ L复溶工作液,用涡旋仪涡动1 min,混匀;取50 μ L用于分析。

(3) 鸡肉样品前处理方法

称取(1.0 \pm 0.02) g组织样本至50 mL聚苯乙烯离心管中;分别加入2 mL丙酮、2 mL去离子水,用振荡器振荡5 min,3000 g以上,室温(20~25 $^{\circ}$ C)离心5 min;移取100 mL上清液至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入900 mL复溶工作液,用涡旋仪涡动1 min,混匀;取50 mL用于分析。

(4) 鸡蛋样品前处理方法

称取(1.0 \pm 0.05) g鸡蛋样本至50 mL聚苯乙烯离心管中,分别加入4.5 mL去离子水、0.5 mL甲醇,用振荡器振荡5 min,3000 g以上,室温(20~25 $^{\circ}$ C)离心10 min;移取100 μ L上清液至2 mL聚苯乙烯离心管中,再加入300 μ L复溶工作液用涡旋仪涡动1 min,混匀;取50 mL用于分析。

2.2.2 样品检测方法

所有试剂与酶标板放在实验桌上回温至室温(20~25)℃,试剂摇匀;将样品和标准品编号,每样做2个平行;取50 μL样品(标准品)加入到对应微孔中,再加入酶标二抗和抗体工作液50 μL,震荡摇匀,用盖板膜盖板后于25℃避光反应30 min;揭开盖板膜,将孔内液体甩干,加入洗涤工作液250 μL,充分洗涤4~5次,每次间隔10 s,倒掉洗涤液,用吸水纸拍干;每孔加入50 μL底物液A液和B液,震荡摇匀后用盖板膜盖板置于25℃避光反应15 min;反应后加入终止液50 μL,震荡摇匀,设定酶标仪于450 nm处,测定每孔OD值。

2.2.3 三聚氰胺浓度的计算

百分吸光率的计算,标准品或样品百分吸光率等于标准品或样品的吸光度值的平均值除以第一个标准品(0 ppb)的吸光度值的平均值,再乘以100%,即

$$\text{百分吸光率}(\%) = B/B_0 \times 100\%$$

B—标准品或样品溶液的平均吸光度值

B_0 —0ppb标准溶液的平均吸光度值

将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应浓度,乘以其对应稀释倍数即为样品中三聚氰胺实际浓度。

2.2.4 试剂盒相关指标检测方法

分别对试剂盒的检测限、精密度、准确度进行试验,并将灵敏度、精密度和准确度与HPLC检测的灵敏度、精密度和准确度进行对比。

(1) 试剂盒检测限测定方法

分别对20份空白牛奶、奶粉、鸡肉、鸡蛋样品进行检测,计算三聚氰胺浓度,以20份样品中三聚氰胺浓度的平均值(\bar{x})和标准差(S)来表示检测限(LOD),即 $LOD = (\bar{x}) + 3S$,为试剂盒检测限。

(2) 试剂盒精密度测定方法

取10个试剂盒,每盒随机取1块酶标板,每块酶标板中随机抽取20个微孔,测定9 μg/L标准溶液的吸光度值(OD),计算变异系数。

(3) 样品准确度和精密度测定方法

向空白样品中加入三聚氰胺标准品,使牛奶中三聚氰胺终浓度为0.5、1.0、2.0 mg/kg,奶粉、鸡肉和鸡蛋中三聚氰胺终浓度为1.0、2.5、5.0 mg/kg;每种样品、每个浓度均5个平行,按2.2.2操作方法测定,分别计算板内、板间变异系数及回收率。

2.2.5 仪器测定方法

参照国标GB/T 22288-2008、GB 29704-2013和GB/T 22388-2008^[14-16]。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

分别测定0、1、3、9、27、81 ppb标准品的吸光度值,以三聚氰胺标准品浓度的对数为横坐标,三聚氰胺标准品的百分吸光率为纵坐标,绘制标准曲线。以三聚氰胺标准品浓度的对数为横坐标, $\ln[B/(B_0-B)]$ 为纵坐标建立双对数直线拟合曲线,数学模型为 $\ln[B/(B_0-B)] = a + b \log C$ 。从图1和图2中可知,标准曲线方程为: $Y = -2.134X + 1.243$, $R^2 = 0.996$;说明三聚氰胺的ELISA检测试剂盒线性关系良好。

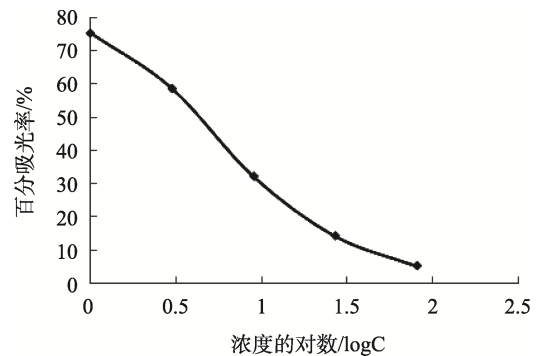


图1 标准曲线

Fig. 1 The standard curve

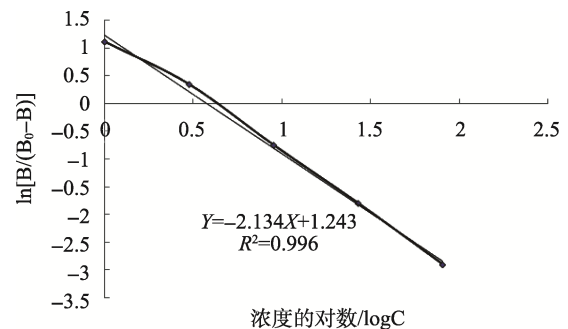


图2 标准曲线方程

Fig. 2 Standard curve equation

3.2 试剂盒检测限测定结果

按照2.2.4方法,得到三聚氰胺ELISA检测试剂盒对牛奶、奶粉、鸡肉、鸡蛋样品的检测限如表1,从

表中结果可知, 该试剂盒对牛奶、奶粉、鸡肉、鸡蛋几种样品的最低检测限分别为 19.22、46.86、21.38、51.64 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 远低于国际食品法典委员会对婴儿配方奶粉 (1 mg/kg) 和其他食品中 (2.5 mg/kg) 的限量要求, 说明该试剂盒灵敏度较高。

3.3 试剂盒精密度测定结果

酶标板精密度测定结果如表 2, 从表中可知, 三聚氰胺 ELISA 检测酶标板的板内变异系数在 1%~5% 范围内, 板内板间变异系数均小于 10%, 说明该试剂盒重现性较好, 性能较为稳定。

3.4 样品准确度和精密度的测定结果

向牛奶、奶粉、鸡肉、鸡蛋四种空白样品中分别添加不同浓度的三聚氰胺, 每个浓度各 5 个平行, 同时做空白对照, 按 2.2.4 操作方法测定。分别计算标准偏差及回收率, 从表 3 中可知, 四种样品回收率均在 95%~120% 之间, 变异系数均小于 10%, 符合《农业部文件》农医发[2005]17 号附件 2 中试剂盒备案参考证券标准中第 4 点关于精密度和准确度的规定, 说明该三聚氰胺 ELISA 检测试剂盒精密度良好。

3.5 ELISA 试剂盒与高效液相色谱(HPLC)法检测结果比较

3.5.1 灵敏度比较

随机抽取市售牛奶、奶粉、鸡肉和鸡蛋样品各 5 份, 分别用 ELISA 试剂盒和高效液相色谱测定样品

中三聚氰胺残留量, 由表 4 可知, ELISA 试剂盒检测结果与仪器检测结果复核率为 100%, 说明 ELISA 检测试剂盒灵敏度较高; 检测 20 个样品中三聚氰胺残留量均未超标, 合格率达到 100%, 说明相关部门已经加大对食品安全监管力度, 违法现象大大减少, 保障人民食品安全和健康。

3.5.2 准确度和精密度比较

在同等条件下, 对空白牛奶样品做三聚氰胺添加量为 0.5 mg/kg 的添加回收试验(其中, ELISA 试剂盒检测方法中, 随机选取 3 块酶标板, 每块板做 4 个平行), 比较 ELISA 试剂盒和高效液相色谱法回收率和变异系数, 由表 5 可知, 仪器检测方法的回收率在

表 1 检测限测定结果
Table 1 Result of detection limit

样品 (samples)	三聚氰胺浓度均值(\bar{x})	标准差 (S)	最低检测限 LOD($\mu\text{g}/\text{kg}(\text{L})$)
牛奶	18.66	0.19	19.22
奶粉	45.78	0.36	46.86
鸡肉	20.38	0.34	21.38
鸡蛋	50.63	0.34	51.64

表 2 精密度结果
Table 2 Results of accuracy

酶标板号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CV%	2.42	3.86	1.34	3.38	3.10	1.25	1.79	1.57	1.08	1.57

表 3 样品准确度和精密度测定结果
Table 3 Results of precision and accuracy on samples

分类	加标量, $\text{mg}/\text{kg}(\text{L})$	测定均值, $\text{mg}/\text{kg}(\text{L})$	标准差	回收率/%	CV/%
牛奶	0.5	0.50	0.01	99.12	1.63
	1.0	1.07	0.05	106.70	4.44
	2.0	2.04	0.05	101.92	2.67
奶粉	1.0	1.03	0.07	102.66	6.97
	2.5	2.47	0.13	98.64	5.11
	5.0	5.15	0.10	103.00	1.96
鸡蛋	1.0	1.07	0.07	107.40	6.13
	2.5	2.50	0.08	100.08	3.08
	5.0	5.08	0.09	101.52	1.87
鸡肉	1.0	0.98	0.02	98.00	2.28
	2.5	2.53	0.11	101.12	4.39
	5.0	5.36	0.22	107.28	4.08

表4 ELISA 试剂盒与仪器方法灵敏度比较(mg/kg(L))
Table 4 Comparison of sensitivity between ELISA kit and HPLC (mg/kg(L))

样品	方法	1	2	3	4	5
牛奶	ELISA	0.25	0.56	0.73	0.82	0.13
	HPLC	0.16	0.52	0.63	0.85	0.11
奶粉	ELISA	1.01	0.97	0.53	1.21	0.87
	HPLC	0.98	1.03	0.57	1.17	0.91
鸡蛋	ELISA	1.38	1.56	2.13	1.02	0.83
	HPLC	1.35	1.48	2.07	0.89	0.91
鸡肉	ELISA	1.01	1.32	1.79	1.06	0.13
	HPLC	1.21	1.16	1.65	0.97	0.19

表5 ELISA 试剂盒与仪器方法精密度和准确度比较
Table 5 Comparison of precision and accuracy between ELISA kit and HPLC

分类	三聚氰胺的回收率/%			平均回收率/%	变异系数 CV/%
ELISA	99.70	103.33	97.78	98.99	3.74
	98.56	99.34	101.56	102.19	
	104.78	103.22	109.98	99.78	
HPLC	96.78	105.38	98.23	96.89	4.12

96.78%~105.38%，平均回收率为 99.32%，变异系数为 4.12%；同样添加浓度，ELISA 试剂盒的回收率在 97.78%~109.98%之间，平均回收率为 102.19%，试剂盒板间变异系数为 3.74%；ELISA 法和 HPLC 法测定结果基本一致，符合度基本达到 100%，适用于牛奶样品中三聚氰胺残留检测。

4 结论

本研究采用酶联免疫法对牛奶、奶粉、鸡肉和鸡蛋 4 种样品中三聚氰胺残留量进行检测，验证本公司生产的三聚氰胺 ELISA 检测试剂盒检测效果，并将其检测效果与仪器检测方法做对照。结果表明，三聚氰胺 ELISA 检测试剂盒检测灵敏度较高，对牛奶、奶粉、鸡肉、鸡蛋样品最低检测限较低，远低于国家规定最高残留量；与高效液相色谱检测法相比，检测结果一致，且试剂盒检测用时短(30 min)，样品前处理方法简单，操作方便，检测设备投入少，耗能低，可满足对奶粉等样品中残留三聚氰胺的快速检测。

参考文献

- [1] Carl G Skinner, Jerry D, Thomas, *et al.* Melamine Toxicity [J]. *J Med Toxicol*, 2010, (6): 50-55.
- [2] Kirti Sharma, Manish Paradakar. The melamine adulteration scandal [J]. *Food Sec*, 2010, 2: 97, 107.
- [3] Vivek B, Paul CG, Glenn M. *et al.* Melamine nephrotoxicity: an emerging epidemic in an era of globalization [J]. *Kidney Int*, 2009(75): 774, 779.
- [4] Puschner B, Poppenga RH, Lowenstine LJ, *et al.* Assessment of melamine and cyanuric acid to xicity in cats [J]. *J Vet Diagn Invest*, 2007, 19(6): 616-624.
- [5] 王亚吨, 林海丹, 邓国东, 等. 反相高效液相色谱法测定饲料中三聚氰胺的含量[J]. *广东饲料*, 2008, 17(3): 41-43.
Wang YD, Lin HD, Deng GD, *et al.* Determination of melamine in feed by RP-HPLC [J]. *Guangdong Feed*, 2008, 17(3): 41-43.
- [6] Li Y, Hao W, Wang Y, *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.
- [7] 栾伟. 液相色谱串联质谱法(LC- MSPMS)分析宠物食品中三聚氰胺[J]. *分析测试学报*, 2007, 26(增刊): 285-286.
Luan W. Analysis of melamine in pet food by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MSPMS) [J]. *J Instrum Anal*, 2007, 26: 285-286.
- [8] GC-MS screen for the presence of melamine [EB/OL]. USA: FDA/ORA forensic chemistry center SOP T015. (2007-04-10) [2013-05-06]. <http://www.instrument.com.cn/download/shtml/044127.shtml>.

- [9] 孙贵朋, 谢云飞, 隋丽敏, 等. 三聚氰胺的危害及其检测[J]. 上海食品药品监管情报研究所, 2008, 10(94): 42-47.
Sun GP, Xie YF, Sui LM, *et al.* Harm and detection of melamine [J]. Shanghai Food Drug Inf Res, 2008, 10(94): 42-47.
- [10] Garber EA. Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology [J]. J Food Prot, 2008, 71(3): 590-594.
- [11] 汤慕瑾, 张恒, 郑晓燕, 等. 酶联免疫吸附法快速测定不同样品基质中三聚氰胺[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(04): 340-343.
Tang MJ, Zhang H, Zheng XY, *et al.* Rapid detection of melamine in different matrixes of food samples by ELISA [J]. Chin J Food Hyg, 2010, 22(04): 340-343.
- [12] 云雯, 李红, 黄锐, 等. 食品中三聚氰胺及类似物检测技术研究进展[J]. 中国调味品, 2014, 39(02): 110-114.
Yun W, Li H, Huang R, *et al.* Research progress of detection technology for melamine and its analogs in food [J]. China Cond, 2014, 39(02): 110-114.
- [13] 王维. 三聚氰胺的检测方法[J]. 盐城工学院学报, 2008, 21(4): 1-3, 7.
Wang W. Analytical methods for melamine [J]. J Yancheng I Technol, 2008, 21(4): 1-3, 7.
- [14] GB/T 22288-2008 植物源产品中三聚氰胺、三聚氰酸-酰胺、三聚氰酸二酰胺和三聚氰酸的测定气相色谱-质谱法[S].
GB/T 22288-2008 Determination of melamine, ammeline, ammelide and cyanuric acid in original plant products-GC-MS method [S].
- [15] GB 29704-2013 动物性食品中环丙氨嗪及代谢物三聚氰胺多残留的测定[S].
GB 29704-2013 Determination of cyromazine and melamine residue in animal derived food by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometric method [S].
- [16] GB/T 22388-2008 原料乳和乳制品中三聚氰胺的检测方法[S].
GB/T 22388-2008 Determination of melamine in raw milk and dairy products [S].

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



谢体波, 中级工程师, 主要从事食品安全快速检测技术的研究与开发。
E-mail: 394736614@qq.com



李平, 中级工程师, 主要从事食品安全快速检测技术的研究与开发。
E-mail: 294173456@qq.com