

实验技术与方法

酶联免疫吸附法快速测定不同样品基质中三聚氰胺

汤慕瑾 张 恒 郑晓燕 吕敬章 朱 海 陈昊翰
(深圳出入境检验检疫局,广东深圳 518067)

摘要:目的 探求不同样品基质中三聚氰胺残留量的快速检测方法。为快速筛查不同种类食品中非法添加三聚氰胺提供技术保障。方法 采用酶联免疫吸附法在奶制品(奶粉、液态奶)、成品饲料(鸡饲料、猪饲料)、饲料原料(鱼粉、肉骨粉、豆粕、麸皮)、肉类(鸡肉、猪肉、内脏)等样品基质中添加一定浓度的三聚氰胺进行测定,并对检测结果进行分析。结果 酶联免疫试剂盒对奶制品和肉类检出限均能达到1.0 mg/kg;对成品饲料基质中的三聚氰胺的检测,检出限可达到2 mg/kg,而对饲料原料中的三聚氰胺的检测,检出限都不能达到2 mg/kg。结论 对奶制品中的三聚氰胺检测完全符合我国的临时限量标准;对成品饲料中的三聚氰胺残留的检测同样符合其限量标准(2.5 mg/kg),而对饲料原料中的三聚氰胺的检测,由于不同基质中检出限不同,不能直接采用酶联免疫法进行快速筛查;酶联免疫法也适用于肉类中的三聚氰胺的检测。

关键词:三聚氰胺;酶联免疫吸附法;奶制品;饲料;肉类;基质

中图分类号:Q503;S816.17 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)04-0340-04

Rapid Detection of Melamine in Different Matrixes of Food Samples by ELISA

TANG Mu-jin, ZHANG Heng, ZHENG Xiao-yan, LÜ Jing-zhang, ZHU Hai, CHEN Hao-han
(Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangdong Shenzhen 518067, China)

Abstract: Objective To investigate the method of rapid screening melamine in different matrixes of food samples, and to provide technical support for the detection of melamine unlawfully added to foods. **Method** Adding melamine to different matrixes of food samples such as dairy products (milk powder, liquid milk), animal feeds (chicken feed, pig feed), raw material of feeds (fish meal, meat and bone meal, soybean meal, wheat bran), meat (chicken, pork, organ meat), and detecting the melamine with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The detectable limits of melamine for dairy products and meat were lower than 1.0 mg/kg; the detectable limits for feeds were lower than 2.0 mg/kg, whereas the detectable limits for raw materials of feeds were more than 2.0 mg/kg. **Conclusion** The detection results of melamine in dairy products was fully conformed with China's temporary limited standard (1.0 mg/kg); the results of melamine in feeds were also suited to the limited standards (2.5 mg/kg). However, the ELISA method used for screening melamine in raw materials of feeds should be further improved. ELISA method can also be applicable to the detection of melamine in meat.

Key words: Melamine; ELISA; Dairy Product; Feed; Meat; Matrix

三聚氰胺是一种三嗪类含氮杂环有机化合物,重要的氮杂环有机化工原料,广泛应用于塑料、涂料、粘合剂、食品包装材料生产。由于通用的蛋白质测试方法“凯氏定氮法”是通过测出含氮量来估算蛋白质含量,而三聚氰胺的含氮量高达66.6%(三聚氰胺分子式: $C_3N_6H_6$),因此,三聚氰胺常被不法商人用作食品、饲料添加剂,以提升食品、饲料检测中的蛋白质含量指标^[1]。农业部已明令禁止在饲

料和食品中人为添加三聚氰胺,对非法在饲料中添加三聚氰胺的,依法追究法律责任。2008年9月,三鹿奶粉中添加三聚氰胺的事件在全国曝光,引起了强烈的反响,而近期又在部分饲料中检测出三聚氰胺,更是引起广泛重视。由此引发的食品、饲料安全问题成为公众关注的焦点。

目前,国内检测三聚氰胺的方法主要是高效液相色谱法,确证方法是气相质谱联用法,但这两种方法比较复杂、耗时,而且检测成本较高,会浪费大量的人力物力^[2]。而酶联免疫吸附法(ELISA)具有特异性高、灵敏度高、稳定性好、操作简单,并可同时对大批量样品进行快速检测的特点,目前广泛应用于

收稿日期:2009-08-10

作者简介:汤慕瑾 女 高级工程师 博士 研究方向为食品检测

E-mail:tmj1113@hotmail.com

食品中兽药、毒素检测的初筛中^[3]。但是酶联免疫吸附法对样品基质反应敏感,并非所有样品都能够采用酶联免疫吸附法进行初筛。美国 FDA 已对采用 ELISA 法对食品中三聚氰胺的检测进行了初步的研究^[4]。为了确证三聚氰胺酶联免疫法是否能成功应用于不同的样品基质中,选取美国 Abraxis 的三聚氰胺酶联免疫检测试剂盒对奶制品、成品饲料、饲料原料、肉类等不同的样品基质进行实验。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

酶标仪(芬兰雷勃 Multiscan Ascent 354 型);电子天平(德国 Sartorius BS2202S 型);冷冻离心机(德国 Sigma 3-18K);八道移液器(德国 Brand)。

三聚氰胺检测试剂盒(美国 Abraxis,批号 9B4272)。三聚氰胺标准品(Chem service 383-7A,99.5%)。20 mmol PBS:0.62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + 5.73 g $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ + 9.0 g NaCl 定容于 1 L 水中;A 稀释液:60% 甲醇 + 20 mmol/L PBS(6 + 4);B 稀释液:10% 甲醇 + 20 mmol/L PBS(1 + 9)。在分析中,除有特殊说明,所有试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.2 标准工作液

精确称取 10.05 mg 三聚氰胺标准品至 100 ml 容量瓶中,用 70% 甲醇定容至 100 ml,溶液中三聚氰胺的浓度为 100 mg/kg,2 ~ 8 °C 保存。

1.3 加标样品的制备

取已知阴性样品。奶粉按 0.5、1.0、2.5 mg/kg 3 个浓度水平进行添加;液态奶按 1.0、2.5、5.0 mg/kg 3 个浓度水平进行添加;饲料基质按 2.0、3.0、4.0 mg/kg 3 个浓度水平进行添加;肉类基质按 1.0、2.0、3.0 mg/kg 3 个浓度水平进行添加。

1.4 样品处理

1.4.1 奶粉 取阴性样品,每管称取 1.00 g 到 50 ml 离心管中。取 10 ml B 稀释液加入到奶粉中,40 °C 水浴加热至奶粉完全溶解,4 °C 4 000 r/min 离心 10 min 后取中间的清液,用 B 稀释液 1:5 进一步稀释,直接用于后续实验。

1.4.2 液态奶 取阴性样品,每管取 1.00 ml 到 Eppendorf 离心管中。4 °C 12 000 r/min 离心 5 min 后取中间的清液,用 B 稀释液以 1:20 稀释液态奶样品,直接用于后续实验。

1.4.3 饲料 取阴性样品,每管称取 1.00 g 到 50 ml 离心管中。加入 5 ml A 稀释液,剧烈漩涡振荡后超声裂解样品 25 min,室温 12 000 r/min 离心 5 min,0.22 μm 过滤器过滤至干净的管子中,用 B

稀释液 1:20 进一步稀释,直接用于后续实验。

1.4.4 肉 取阴性样品,每管称取 10.00 g 到 50 ml 离心管,加入 10 ml PBS 混合振荡,取 1 ml 均质样品加入到一干净的离心管,加入 3 ml 3% 三氯乙酸混合均匀,室温 4 000 r/min 离心 10 min,取出 500 μl 上清液加入 200 μl 1 mol/L 硫酸盐缓冲液。最后用 B 稀释液再进行 1:10 倍稀释后,用于后续实验。

1.4.5 加标样处理 加标样处理方式按照对应的基质空白样处理方法中相同的步骤、试剂进行操作。

1.5 测定程序

采用竞争酶联免疫法(ELISA),控制室温(20 ~ 25 °C),取出试剂盒,室温下放置以使试剂盒在使用前与室温平衡。取出所需酶联板的条数插入框架。记录下标准品、加标样、待测样品的位置,并于 450 nm 波长处测定吸光度(A)。并根据曲线图计算出曲线方程。根据曲线方程,代入酶标仪测定的样品的最大吸光的百分数计算三聚氰胺含量,最后乘以相应的稀释倍数就是样品中测定的浓度。

2 结果和分析

2.1 三聚氰胺标准曲线

三聚氰胺标准浓度分别为 0、20、50、100、200 和 500 $\mu\text{g/L}$,对浓度取自然对数和测定的相应浓度吸光值的百分比形成线性回归方程,在 20 ~ 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度范围内有着良好的线性关系($R^2 \geq 0.98$)。

2.2 检出限

为验证酶联免疫试剂盒在不同样品基质中的灵敏度,选取已由理化方法确证过的阴性空白样品,对奶制品、成品饲料、饲料原料和肉类进行了样品测定,并每类基质设计了 10 ~ 15 个平行孔。根据空白平均值加上 3 倍标准偏差来定义检出限,用于反映体系的检测灵敏度。对空白样检测结果见表 1,可以看出对奶粉和液态奶的检出限分别达到 0.528 和 0.138 mg/kg,完全符合中国及欧盟等国的限量标准(2008 年卫生部第 25 号公告,1 mg/kg)。对成品饲料(鸡饲料和猪饲料)基质中的三聚氰胺的检测,检出限分别为 1.5 和 1.8 mg/kg,也符合中国对饲料规定的限量标准(2009 年农业部第 1218 号公告,2.5 mg/kg),而对饲料原料(鱼粉、麸皮、豆粕、肉骨粉)中的三聚氰胺的检测,除麸皮外,其他 3 种基质的检出限都不能达到 2.5 mg/kg,不能满足对饲料原料中三聚氰胺的检测。对肉类基质(鸡肉、猪肉、内脏)中的三聚氰胺的检测,检出限也都能达到 1.0 mg/kg 以下,目前还没有肉类中三聚氰胺的限量标准,但是检测结果对肉类基质表现出了很好的检测能力。

从实验结果中可以看出,本批次的 Abraix 三聚氰胺检测试剂盒对奶制品中三聚氰胺检测有着较为理想的结果[相对标准偏差(RSD) < 10%],并且能用于成品饲料、肉类基质中的三聚氰胺的检测(相

对标准偏差 $\leq 18.1\%$)。而对饲料原料的检测,采用酶联免疫法时,并不是所有的饲料原料都能满足现时的限量需求,造成差异的可能原因应该是饲料原料基质的复杂性,破坏了整个酶联免疫反应体系。

表1 不同样品基质中三聚氰胺检出限

基质	平均值(\bar{x} , $\mu\text{g}/\text{kg}$)	平行次数	标准偏差(s)	RSD (%)	检出限($\mu\text{g}/\text{kg}$) ($\bar{x} + 3s$)	
奶制品	奶粉	411	10	39	9.5	528
	液态奶	127	10	7.9	6.2	138
成品饲料	鸡饲料	1040	15	156.8	15.0	1511
	猪饲料	1146	15	207.3	18.1	1768
饲料原料	鱼粉	2743	15	348.5	14.0	3787
	肉骨粉	1966	15	298.0	15.1	2859
	豆粕	1762	15	418.0	23.7	3015
	麸皮	1325	15	272.2	20.0	2140
肉类	鸡肉	433	15	64.6	14.9	626
	猪肉	554	15	78.8	14.2	790
	内脏	540	15	97.1	17.9	831

2.3 回收率

根据三聚氰胺检测试剂盒说明书,本实验结果低于最低标准(20 $\mu\text{g}/\text{L}$)应该不乘以稀释倍数,故定义体系中空白样检测浓度为20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。根据线性回归方程计算出样品添加三聚氰胺的浓度减去空白样检测浓度(20 $\mu\text{g}/\text{L}$)除以实际添加的浓度,再乘以100%即为三聚氰胺的回收率。如表2所示,酶联免疫试剂盒对奶制品中的三聚氰胺检测均具有较为良好的检测能力,均满足我国规定的临时限量值的要求(婴幼儿配方乳粉中三聚氰胺的限量值为1 mg/kg ;液态奶(包括原料乳)、奶粉、其他配方乳粉中三聚氰胺的限量值为2.5 mg/kg)。

表2 奶粉和液态奶中三聚氰胺加标回收试验结果($n=5$)

基质	加标浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (%)
奶粉	0.5	0.65	10.0	126.0
	1.0	0.98	6.6	95.6
	2.5	2.05	8.8	82.0
液态奶	1.0	0.79	3.5	77.0
	2.5	2.36	6.3	93.6
	5.0	5.34	2.7	106.0

对成品饲料中三聚氰胺的检测结果见表3。酶联免疫试剂盒对成品饲料中的三聚氰胺残留的检测也能达到较为理想的结果,并且其检测范围也完全符合农业部第1218号公告中规定的饲料原料和饲料产品中三聚氰胺限量值2.5 mg/kg ,而检测试剂盒对饲料原料中三聚氰胺的检测结果却不能都满足该公告的规定,其结果见表4,鱼粉、豆粕和肉骨粉的实测回收率均在125.0%以上(只有肉骨粉中4.0 mg/kg 的加标回收率为115.0%),其检测灵敏度不能达到2.5 mg/kg 。因此本实验结果表明其酶免试剂盒不适用于饲料原料中所有基质的三聚氰胺

的检测。

表3 鸡饲料和猪饲料中三聚氰胺加标回收试验结果($n=6$)

基质	加标浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (%)
鸡饲料	2.0	2.09	14.2	104.0
	3.0	3.13	9.3	104.0
	4.0	2.05	7.5	95.0
猪饲料	2.0	1.81	12.9	90.5
	3.0	2.63	10.4	87.7
	4.0	3.22	16.0	80.5

表4 饲料原料中三聚氰胺加标回收试验结果($n=6$)

基质	加标浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (%)
鱼粉	2.0	3.57	19.5	178
	3.0	4.46	14.6	148.0
	4.0	5.47	10.4	136.0
肉骨粉	2.0	3.39	14.2	196.0
	3.0	3.75	5.5	125.0
	4.0	4.60	15.2	115.0
豆粕	2.0	3.17	18.0	158.0
	3.0	4.21	10.4	140.0
	4.0	5.34	15.5	133.0
麸皮	2.0	3.30	12.3	165.0
	3.0	3.37	8.3	112.0
	4.0	4.90	11.0	122.0

目前对肉类中三聚氰胺检测的相关报道较少,本实验选取鸡肉、猪肉和动物内脏作为肉类基质,加标对其进行三聚氰胺的检测,其检出限能达到1.0 mg/kg 以下,回收率见表5,对基质样中添加浓度分别为1.0、2.0和3.0 mg/kg 而测定的回收率分布在61.8%~100.6%之间。其中鸡肉中3.0 mg/kg 浓度水平的加标,其回收率为54.0%,结果偏低,其原因可能是系统误差或者特定样品基质

造成,在实际肉类检测中,这种情况需进一步实验进行反复验证。

表5 肉类基质中三聚氰胺加标回收试验结果 ($n=6$)

基质	加标浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	RSD (%)	回收率 (%)
鸡肉	1.0	0.70	13.2	70.0
	2.0	1.23	7.5	61.8
	3.0	1.62	5.9	54.0
猪肉	1.0	1.01	16.5	100.6
	2.0	1.39	13.3	69.4
	3.0	1.87	16.9	62.2
内脏	1.0	0.99	13.7	99.4
	2.0	1.39	13.1	69.2
	3.0	2.07	11.6	68.9

3 讨论

三聚氰胺的 ELISA 进口检测试剂盒主要有美国 Abraxis、Beacon 以及 Strategic Diagnostics 公司的产品,其中 Abraxis 公司的三聚氰胺检测试剂盒由于快速、可靠,在国内应用最为广泛。自我国三聚氰胺事件后,该公司陆续推出了不同的样品前处理方法,以使该检测试剂盒适用于不同基质(奶粉、液态奶、豆粉、饲料、肉类和糖)中三聚氰胺的检测。验证结果表明对乳制品(奶粉、液态奶)中三聚氰胺的检测,检出限也可达到1 mg/kg(见表1),符合我国的临时限量标准;对肉类基质(鸡肉、猪肉、内脏)中三聚氰胺的检测,检出限可达到1 mg/kg(见表1);而对饲料中三聚氰胺的检测,不同的基质中检出限有所不同。

对饲料基质的选取主要依赖于深圳出入境检验检疫局食检中心自开展三聚氰胺检测项目以来所检测的饲料的数据统计结果,在检测的饲料样品中,成品饲料和饲料原料分别占 54.9% 和 45.1%。根据所检饲料不同基质的数量,分别选取成品饲料中检测数量较多的鸡饲料(42.1%)和猪饲料(40.0%),饲料原料中检测数量较多的鱼粉(33.5%)、麸皮(14.0%)、豆粕(11.6%)和肉骨粉(6.0%)作为基质进行验证。验证结果显示成品饲料(鸡饲料、猪饲料)中检出限达到2 mg/kg,但饲料原料(鱼粉、麸皮、豆粕、肉骨粉)中检出限都达不到2 mg/kg(见表1)。饲料中的基质非常复杂,ELISA 方法作为酶联免疫的检测方法,对某些基质的干扰很敏感,本验证

试验中选取的4种饲料原料(鱼粉、肉骨粉、豆粕、小麦麸皮),检出限都高于2 mg/kg,其中以鱼粉的检出限最高,达到了3.8 mg/kg。虽然成品饲料是由不同的饲料原料组成,但是在制作过程中经历了一系列的加工工艺,如原料的接收、清理、粉碎、混合、调质与膨化、制粒与喷涂等工序,有可能其中某些干扰基质产生了相应的理化变化,从而导致在本实验中用 ELISA 方法检测成品饲料中的三聚氰胺的效果更好。但是本实验只选取了2种成品饲料和4种饲料原料,在实际检测时,其他不同的成品饲料以及饲料原料也许会有不同的实验结果。

根据对食检中心检测饲料中三聚氰胺的结果统计,鱼粉的三聚氰胺阳性检出率非常高,因此对饲料中鱼粉的监控非常重要,但是建议不要采用 ELISA 方法。陈锡拢等^[5]曾报道过对饲料中三聚氰胺的 ELISA 法检测,但是本研究对不同种类的饲料进行了更为详细的研究,建议如果用 ELISA 方法检测饲料中三聚氰胺,需先做好所检测的饲料基质的验证并对饲料原料基质进行样品前处理的研究,以确保饲料基质用 ELISA 方法的检出限可以达到最高残留限量的要求。

ELISA 方法由于高通量、简单、快速,在食品检测中应用非常广泛,但是该方法存在一定的假阳性,只能作为一种筛选方法,其阳性结果必须经相应的确证方法确证。因此虽然验证结果显示 ELISA 方法检测乳制品和肉类中三聚氰胺都可以满足1 mg/kg,但是检出的阳性结果必须经过液相色谱-质谱/质谱(LC-MS/MS)确证。

参考文献

- [1] 李海燕,占春瑞,郭平. 动物性食品中三聚氰胺研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(2): 90-92.
- [2] 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, 2008, 10(94): 42-47.
- [3] 张也,刘以祥. 酶联免疫技术与食品安全快速检测[J]. 食品科学, 2003, 24(8): 200-204.
- [4] GARBER E A. Detection of Melamine Using Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Technology [J]. J Food Prot, 2008, 71(3): 590-594.
- [5] 陈锡龙,黄瑾,钱莘莘. 使用酶联免疫吸附法测定饲料中三聚氰胺的研究[J]. 饲料工业, 2008, 29(18): 53-55.