

## 三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条的研制

龚云飞<sup>1</sup>, 陈宗伦<sup>2</sup>, 奚茜<sup>1</sup>, 李沐洁<sup>1</sup>, 王唯芬<sup>1</sup>, 王旻子<sup>2</sup>, 应永飞<sup>3</sup>, 张明洲<sup>1</sup>

1 中国计量学院生命科学院 浙江省生物计量与检验检疫技术重点实验室, 浙江 杭州 310018

2 杭州迪恩科技有限公司, 浙江 杭州 310013

3 浙江省畜产品质量安全检测中心, 浙江 杭州 310020

龚云飞, 陈宗伦, 奚茜, 等. 三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条的研制. 生物工程学报, 2012, 28(7): 887-898.

Gong YF, Chen ZL, Xi X, et al. Colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of melamine. Chin J Biotech, 2012, 28(7): 887-898.

**摘 要:** 通过胶体金免疫层析技术建立一种特异、便捷、快速的三聚氰胺抗原检测方法, 对奶制品及饲料中的三聚氰胺残留水平监测提供参考。用柠檬酸三钠还原法制备的胶体金, 标记纯化的三聚氰胺单克隆抗体, 喷于试纸的金标垫。将 MEL-OVA (三聚氰胺和卵清白蛋白的偶联物) 和纯化的羊抗鼠 IgG 分别喷于试纸的 T (检测线) 处和 C (质控线) 处, 通过挑选试纸条材料和调试工艺参数, 并最终组装成试纸条。结果显示, 制备的试纸监测体系方法检出限为 50  $\mu\text{g/L}$ 。试纸条对牛奶、奶粉和饲料中的三聚氰胺残留的检出限分别为 100  $\mu\text{g/L}$ 、100 ng/g 和 200 ng/g。将该法与 LC-MS/MS 法对比检测牛奶、奶粉和饲料样品, 在试纸条检测范围内, 与 LC-MS/MS 法检测结果一致性好, 从而验证了该方法的有效性。制备的三聚氰胺胶体金检测试纸在常温干燥环境下至少可保质 6 个月, 能够检测出三聚氰胺含量大于 50  $\mu\text{g/L}$  的样品, 适用于现场实际样品三聚氰胺残留水平监测, 具有良好的应用前景。

**关键词:** 三聚氰胺, 胶体金, 免疫层析, 试纸

**Received:** December 16, 2011; **Accepted:** April 20, 2012

**Supported by:** Key Technology R&D Program of Zhejiang Province (No. 2009C12055), Innovation Team of Zhejiang Province (No. 2010R50028), Key Science and Technology Achievement Transformation Project of Zhejiang Province (No. 2011E61018).

**Corresponding author:** Sanhong Fan. Mingzhou Zhang. Tel: +86-571-86914476; E-mail: zmzcjlu@cjlu.edu.cn

浙江省重大科技专项 (No. 2009C12055), 浙江省重点科技创新团队 (No. 2010R50028), 浙江省重大科技成果转化项目 (No. 2011E61018) 资助。

# Colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of melamine

Yunfei Gong<sup>1</sup>, Zonglun Chen<sup>2</sup>, Xi Xi<sup>1</sup>, Mujie Li<sup>1</sup>, Weifen Wang<sup>1</sup>, Minzi Wang<sup>2</sup>, Yongfei Ying<sup>3</sup>, and Mingzhou Zhang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Zhejiang Provincial Key Laboratory of Bio-metrology, Inspection and Quarantine, College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang, China

<sup>2</sup> Hangzhou DNA Sci-tech Co., Ltd., Hangzhou 310013, Zhejiang, China

<sup>3</sup> Animal Products Quality Testing Center of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, Zhejiang, China

**Abstract:** To develop a specific, rapid, and convenient immunochromatography assay (ICA) to detect melamine residues in dairy products and feed sample. Colloidal gold particles labeled with purified monoclonal antibody against anti-melamine were used as the detector reagent. The MEL-OVA (the conjugate of melamine and ovalbumin) and goat anti-mouse melamine IgG were blotted on the test and control regions of nitrocellulose membrane. The strip was then assembled with sample pad, absorbing pad, and dorsal shield. The limit of detection (LOD) is 50  $\mu\text{g/L}$ . The test trip was applied to detect melamine in milk, milk powder, and animal feeds, with detection limits of 100  $\mu\text{g/L}$  for milk, 100 ng/g for milk powder, 200 ng/g for feeds. Compared to LC-MS/MS, the ICA could be used to screen a large number of dairy products and feed samples for melamine residue.

**Keywords:** melamine, colloidal gold, immunochromatographic, strip

三聚氰胺 (Melamine) 是一种三嗪类含氮杂环有机化工原料, 广泛应用于木材、塑料、涂料、造纸、纺织、皮革、电气等行业<sup>[1]</sup>。三聚氰胺含氮量极高, 不法商贩把廉价的三聚氰胺添加到食品中, 以虚假提高食品中的蛋白质含量。2007年3月, 美国发生4 000多起猫狗中毒死亡事件<sup>[2]</sup>; 2008年我国爆发三鹿婴幼儿奶粉受污染事件, 导致食用了受污染奶粉的婴幼儿产生肾结石病症甚至死亡; 2010年初再度爆发的问题奶粉事件, 其原因都是奶粉中含有三聚氰胺<sup>[3]</sup>, 因此开展对食品及饲料中三聚氰胺残留的检测势在必行。目前, 各国政府都禁止三聚氰胺用于食品生产, 并规定了其在食品的最低限量值。三聚氰胺的检测方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[4-6]</sup>、气-质联用色谱法 (GC-MS)<sup>[7]</sup>, 液-质联用色谱法<sup>[6,8-10]</sup>

和酶联免疫吸附法<sup>[11-15]</sup>。

胶体金免疫层析技术和酶联免疫吸附法等免疫分析技术近年来在生物各领域得到了越来越多的应用。目前, 已报道的酶联免疫吸附法对实际样品中三聚氰胺的检测限在1.8~20  $\mu\text{g/L}$ , 能满足各种食品或饲料的检测要求。胶体金免疫层析法 (GICA) 是近10年发展起来的一项新技术, 它是基于抗原抗体的特异性反应, 用胶体金作为标记物。该方法操作简单、快速、特异灵敏, 不需要仪器, 不需专业技术人员操作, 几分钟内即可通过目视判断检测结果, 并可保持检测结果, 比酶联免疫吸附法操作更简单, 更适合在现场应用。因此在食品安全及医学检验领域有广泛的应用<sup>[16-19]</sup>。本试验制备的三聚氰胺胶体金检测试纸条, 为食品中三聚氰胺残留水平监测提供了

便捷的方法,该试纸条具有较高的特异性、敏感性,而且操作简单,具有很好的应用前景。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

三聚氰胺(纯度 98.5%)购自上海凌峰化学试剂有限公司;羊抗鼠 IgG、氯金酸和柠檬酸三钠购自 Sigma 公司;硝酸纤维素膜(简称 NC 膜)分别购自 Sartorius 公司(CN140)、Millipore 公司(M135)和 Whatman 公司(Puraband impuraband);玻璃纤维素膜购自 Millipore 公司;PVC 底板、W-8 滤纸与 MF-11 吸水纸购自 Whatman 公司;其他试剂为国产分析纯。三聚氰胺单克隆抗体(1B12,  $IC_{50}=8.3 \mu\text{g/L}$ )和包被抗原 MEL-OVA 本实验室制备<sup>[20-21]</sup>。

纯牛奶(伊利)、脱脂奶粉(伊利)与宠物饲料样品(均经 HPLC 检测,为阴性),均购自杭州下沙物美超市。试验中简称为牛奶、奶粉和饲料。

### 1.2 主要仪器

ARISTA-Q5 切割机和 ARISTA-XZ100 平台系统,均购自美国 Arista 公司;恒温干燥箱 DHG-9146A,购自上海秦迈仪器有限公司;除湿机购自日本川井公司;紫外可见分光光谱仪,Shimadzu UV-2501PC;三重四级杆串联质谱仪,Waters Alliance 2695。

### 1.3 胶体金的制备与鉴定

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液:取 0.01% 氯化金溶液 100 mL 搅拌加热至沸腾,迅速加入 2.5 mL 1% 柠檬酸三钠水溶液,继续搅拌煮沸 20 min,直至溶液呈透亮状,停止加热;室温冷却,用超纯水恢复到原体积,4℃ 保存备用。

胶体金质量采用紫外扫描鉴定:胶体金溶液进行 400~600 nm 紫外扫描,观察最大吸收峰的峰形和峰宽。

### 1.4 胶体金标记抗体的制备与鉴定

室温下,将 10 mL 用 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  调 pH 为 8.2 的胶体金溶液加入 50 mL 烧杯中,边搅拌边逐滴加入 2 mL 用 0.01 mol/L PBS 稀释为 0.1 g/L 的纯化三聚氰胺单克隆抗体(1B12)溶液;继续搅拌标记反应 10 min 后,逐滴加入 2 mL 5% BSA 溶液,继续搅拌 10 min。采用高速离心法纯化金标抗体,将上述金标抗体溶液常温低速(1 831×g 离心 20 min,弃沉淀,取红色上清夜 4℃ 下 10 989×g 离心 40 min;将中层可流动的暗红色沉淀转移到另一新离心管中,用含 1% BSA 的 0.01 mol/L 的 PBS 混悬至原量;平衡过夜,4℃ 下 10 989×g 离心 40 min,中层可流动的暗红色沉淀转移到另一新离心管中,用含 1% BSA 与 0.02%  $NaN_3$  的 0.01 mol/L 的 PBS 混悬为原体积的 1/10~1/40,4℃ 保存备用。

采用紫外扫描对金标抗体质量进行鉴定,400~600 nm 紫外扫描,通过观察最大吸收峰的峰形和峰宽的完整性来判断金标抗体质量的好坏。

### 1.5 NC 膜的选择

选择了 Sartorius、Millipore 和 Whatman 三种 NC 膜进行包被抗原 MEL-OVA(检测线,1 000 mg/L)和羊抗鼠 IgG(质控线,1 000 mg/L)的包被试验,用 PBS 及其添加 100  $\mu\text{g/L}$ 、200  $\mu\text{g/L}$  三聚氰胺标准品的样品进行测试,选择出线快、清晰与灵敏度达到要求的 NC 膜进行后续试验。

## 1.6 胶体金标记抗体喷膜量、包被抗原包被量的选择

### 1.6.1 胶体金标记抗体喷膜量的选择

制备的胶体金标记 MEL 单克隆抗体 1B12 mAb 用 0.01 mol/L 的 PBS 稀释 10 倍后, 分别按每 1 cm<sup>2</sup> 玻璃纤维素膜喷涂 20  $\mu$ L、40  $\mu$ L 和 60  $\mu$ L 体积进行喷膜, 干燥后分别组装试纸条; 用 PBS 及其添加 50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L、150  $\mu$ g/L 三聚氰胺标准品的样品稀释液进行测试, 选择最佳喷膜量。

### 1.6.2 NC 膜包被抗原包被量的选择

包被抗原 MEL-OVA 稀释成 1 500 mg/L、1 200 mg/L 和 1 000 mg/L 分别在 NC 膜检测线上划线, 质控线上均用 1 000 mg/L 的羊抗鼠 IgG 进行划线, 干燥后分别组装试纸条; 用样品稀释液及其添加 50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L 三聚氰胺标准品的样品稀释液进行测试。

## 1.7 样品垫前处理试验

采用 0.01 mol/L PBS (pH 7.0)、0.01 mol/L PBS (pH 7.5)、0.01 mol/L TBS (pH 8.5) 对样品垫进行前处理, 组装试纸条, 分别用 pH 值约为 7.0 阴性液体纯牛奶样品及其添加 50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L 三聚氰胺标准品的样品进行测试, 选择样品垫最佳处理方式。

## 1.8 试纸条组装与测试

### 1.8.1 试纸条制备与组装

用 ARISTA-XZ1000 平台系统在 NC 膜检测线与质控线分别喷上最佳包被量的包被抗原 MEL-OVA 与 1 000  $\mu$ g/mL 的羊抗鼠 IgG, 在玻璃纤维素膜上最佳喷金量的胶体金标记 MEL 单克隆抗体 1B12; NC 膜和玻璃纤维素膜于烘箱中 37  $^{\circ}$ C 干燥 24 h, 均置于干燥的容器中存放备用。依次搭接地粘贴吸水纸、样本垫、玻璃纤维素膜

和 NC 膜于 PVC 粘性底板上, ARISTA 试纸条切割机切割成一定尺度的试纸条, 装入检测卡中, 再装入一袋干燥剂、封口, 室温保存。如图 1 为试纸条组装模式图。

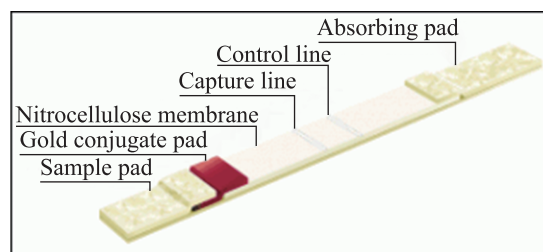


图 1 试纸条组装模式图

Fig. 1 Cross-section of immunochromatographic strip.

### 1.8.2 最低检测限测试

PBS 中分别添加 0  $\mu$ g/L、5  $\mu$ g/L、10  $\mu$ g/L、25  $\mu$ g/L、50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L 和 200  $\mu$ g/L 的三聚氰胺标准品, 以 PBS 为对照, 分别用优化条件制备的试纸条进行测试, 共对 3 个批次进行 2 个重复试验。

### 1.8.3 实际样品添加测试

阴性样品中添加三聚氰胺标准品, 采用组装的试纸条进行测试。1) 牛奶样品: 直接添加三聚氰胺标准液到阴性纯牛奶中, 使三聚氰胺的添加浓度依次为: 0  $\mu$ g/L、50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L 和 200  $\mu$ g/L; 2) 奶粉: 先将奶粉溶于水中, 再添加三聚氰胺标准液于奶粉溶液中, 使三聚氰胺的添加浓度依次为: 0  $\mu$ g/L、50  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L 和 200  $\mu$ g/L; 3) 饲料: 先将饲料溶于水中, 再添加三聚氰胺标准液于饲料溶液中, 使三聚氰胺的添加浓度依次为: 0  $\mu$ g/L、100  $\mu$ g/L、200  $\mu$ g/L 和 500  $\mu$ g/L。

### 1.8.4 与 LC-MS/MS 比对试验

1) 液相色谱条件: 色谱柱: Waters xBridge



HILIC 柱 (4.6 mm×150 mm, i.d., 3.5  $\mu$ m); 柱温: 30  $^{\circ}$ C; 进样量: 20  $\mu$ L; 流速: 0.4 mL/min; 流动相: 20 mmol/L 甲酸铵: 乙腈=8: 2。

2) 质谱条件: 采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式采集, 离子源温度为 110  $^{\circ}$ C, 脱溶剂温度为 350  $^{\circ}$ C, 脱溶剂气和锥孔气为  $N_2$ , 脱溶剂流速为 600 L/h, 光电倍增器电压为 650 V, 毛细管电压为 3.0 kV, 萃取电压为 2.0 V; 碰撞气为高纯氩气, 碰撞室压为  $3\times 10^5$  Pa; 监测模式采用 MRM 多反应监测方式, 离子对为  $m/z$ : 127.2/85.1、127.2/68.1, 其中  $m/z=127.2/85.1$  为定量离子对, 离子对驻留时间为 100 ms。

3) 样品处理: 精确量取或称取试样 2 mL 或 2 g 于 50 mL 离心管, 加入 19 mL 水-乙腈 (1:1,  $V/V$ ) 和 1 mL 饱和乙酸铅溶液, 混匀超声波提取 15 min, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 5 mL 并加入 0.2 mL 甲酸充分混匀后过 MCX 固相萃取小柱, 用 6 mL 乙腈淋洗, 5 mL 5% 氨水/甲醇溶液洗脱, 60  $^{\circ}$ C 下氮气吹干, 用 0.1 mL 20 mmol/L 乙酸铵溶液溶解后, 加入 0.9 mL 乙腈充分混匀

后, 过 0.22  $\mu$ m 滤膜后上机测定。

阴性牛奶与奶粉样品中添加三聚氰胺标准品, 使浓度达到  $w_1$   $\mu$ g/L ( $w_1=50+10n$ ,  $n=0,1,2,3,\dots$ ), 阴性饲料样品中添加三聚氰胺标准品, 使浓度达到  $w_2$   $\mu$ g/L ( $w_2=100+20n$ ,  $n=0,1,2,3,\dots$ ), 分别用 LC-MS/MS 法和本研究的试纸条对每个浓度的样品测试 5 次。

## 1.9 保存期加速试验

将制作好的三聚氰胺试纸条每 5 条装入 1 包铝箔袋中, 加干燥剂密封, 放置 60  $^{\circ}$ C 烘箱中, 每隔 1 天取出 1 包 (5 条) 分别用 3 个阴性样本和 2 个阳性样本 (添加 200  $\mu$ g/L、400  $\mu$ g/L 三聚氰胺标准品的样本) 进行测试进行试纸条保存期试验, 观察检测线的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶体金质量的鉴定

采用紫外扫描鉴定, 胶体金溶液进行 400~600 nm 紫外扫描, 观察最大吸收峰的峰形和峰宽。从图 2 可看出, A1 与 A2 瓶胶体金溶液

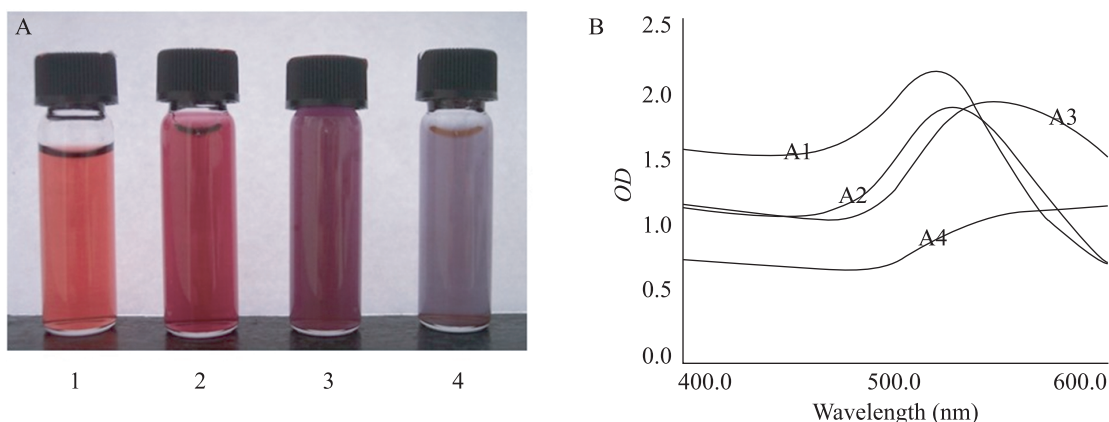


图 2 制备的胶体金溶液实物图及紫外扫描图

Fig.2 Exterior appearance and UV absorbance spectra of colloidal gold solution. (A) Preparation of colloidal gold solution. 1: 1.0 mL; 2: 1.5 mL; 3: 2.0 mL; 4: 2.5 mL. (B) The UV absorbance spectra of different colloidal golds. A1: 519.20 nm; A2: 525.00 nm; A3: 539.40 nm; A4: 594.80 nm.

质量比 A3、A4 好, 计算出 A1-A4 的胶体金金颗粒直径分别约为 15、40、60、80 nm。以下试验采用 A2 胶体金进行。

## 2.2 胶体金标记 MEL 单克隆抗体质量的鉴定

从图 3 可看出, 获得的金标抗体用 0.01 mol/L 的 PBS 稀释 50 倍后进行紫外扫描, 最大吸收峰具有很好的峰形和峰宽, 说明标记的胶体金抗体颗粒大小适中且均一, 表示金标抗体质量好, 可用于后续研究。

## 2.3 NC 膜的选择

选择了 Sartorius、Millipore 和 Whatman 三种 NC 膜进行包被抗原 MEL-OVA (检测线, 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ) 和羊抗鼠 IgG (质控线, 1 000  $\mu\text{g/mL}$ ) 的包被试验, 用 PBS 及其添加 100、200 ng/mL 三聚氰胺标准品的样品进行测试, 结果如图 4。综合考虑膜的层析速度、检测线与质控线的显色情况、最低检测限与成本等因素, 选择 Whatman 的 NC 膜。

## 2.4 胶体金标记抗体喷膜量的选择

制备的胶体金标记 MEL 抗体用 0.01 mol/L 的 PBS 稀释 10 倍后, 分别按每 1  $\text{cm}^2$  玻璃纤维素膜喷涂 20、40、60  $\mu\text{L}$  体积进行喷膜, 干燥后分别组装试纸条; 用样品稀释液及其添加 50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$ 、150  $\mu\text{g/L}$  三聚氰胺标准品的 PBS 进行测试。从图 5 可看出, 喷膜量为 60  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$  效果最佳。

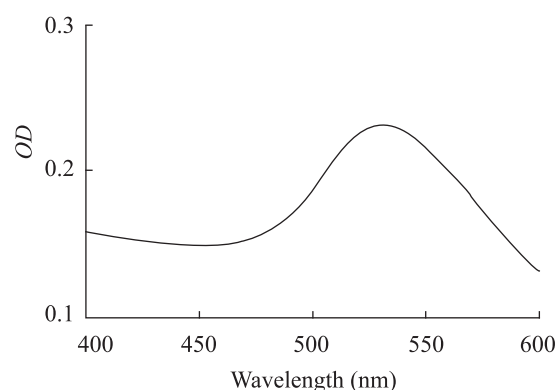


图 3 金标 MEL 抗体紫外扫描图

Fig.3 UV absorbance spectra of gold-antibody.

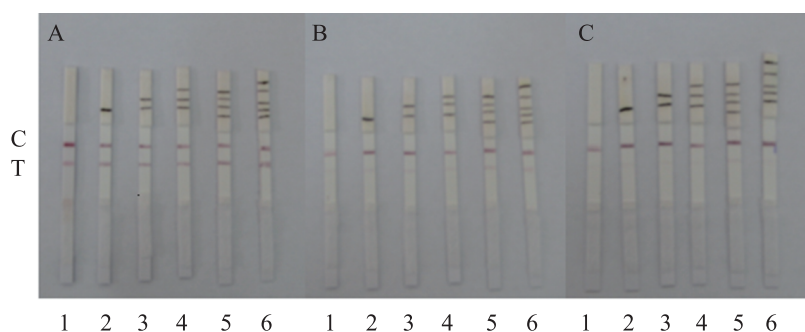


图 4 不同 NC 膜制作的试纸条效果图

Fig.4 The graph of strip produced by different NC membranes. (A) 0  $\mu\text{g/L}$  (PBS). (B) 100  $\mu\text{g/L}$ . (C) 200  $\mu\text{g/L}$ . 1,2: Millipore NC membranes; 3,4: Whatman NC membranes; 5,6: Sartorius NC membranes. Amount added: C: control line; T: detection line.

## 2.5 NC 膜包被抗原包被量的选择

包被抗原 MEL-OVA 稀释成 1 500 mg/L、1 200 mg/L 和 1 000 mg/L 分别在 NC 膜检测线上划线，质控线上均用 1000  $\mu\text{g/mL}$  的羊抗鼠 IgG

进行划线，干燥后分别组装试纸条；用样品稀释液及其添加 50  $\mu\text{g/L}$ 、100  $\mu\text{g/L}$  三聚氰胺标准品的样品稀释液进行测试。从图 6 可看出，包被抗原 MEL-OVA 为 1200 mg/L 时效果最佳。

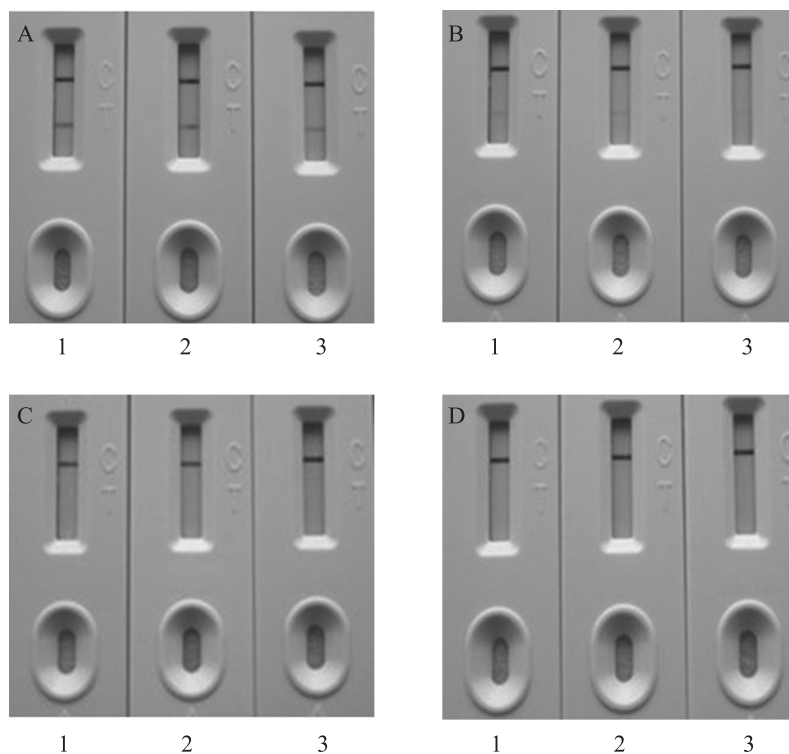


图 5 不同胶体金标记抗体喷膜量试纸条效果图

Fig.5 The graph of strip produced by different gold-antibodies. (A) PBS. (B) 50  $\mu\text{g/L}$ . (C) 100  $\mu\text{g/L}$ . (D) 150  $\mu\text{g/L}$ . 1: 60  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ; 2: 40  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ; 3: 20  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ .

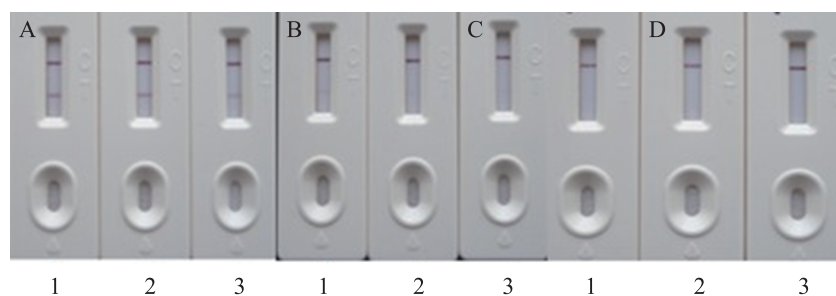


图 6 不同包被抗原包被量试纸条效果图

Fig.6 Graph of strip produced by different volumes of coating antigen. (A) PBS. (B) 50 mg/L. (C) 100 mg/L. 1: 1 500 mg/L; 2: 1 200 mg/L; 3: 1 000 mg/L.

## 2.6 样品垫前处理的选择

采用 0.01 mol/L PBS (pH 7.0)、0.01 mol/L PBS (pH 7.5)、0.01 mol/L TBS (pH 8.5) 对样品垫进行前处理, 组装试纸条, 分别用 pH 值约为 7.0 阴性液体纯牛奶样品及其添加 50 ng/mL、100 ng/mL 三聚氰胺标准品的样品进行测试。结果表明用 0.01 mol/L PBS (pH 7.5) 进行样品垫前处理具有较好的效果, 对金标记物与抗原/抗体的结合起稳定的作用, 同时也改变样品 pH 值是整个系统达到稳定; 同时可以使最低检测限得到优化 (图 7)。

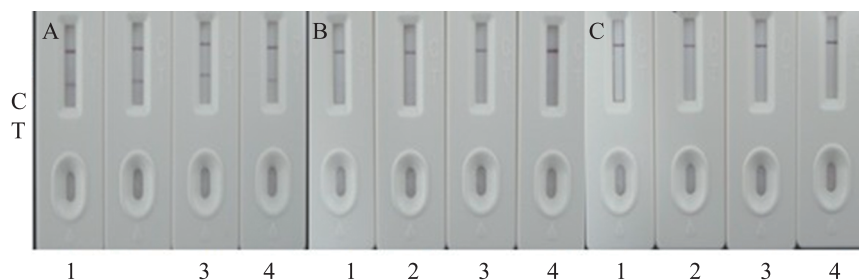


图 7 样品垫前处理试验

Fig.7 The test of sample pad pre-treatment. (A) PBS. (B) 50  $\mu\text{g/L}$ . (C) 100  $\mu\text{g/L}$ . 1: treatment by 0.01 mol/L PBS (pH 7.0); 2: treatment by 0.01 mol/L PBS (pH 7.5); 3: treatment by 0.01 mol/L TBS (pH 8.5); 4: no treatment.

### 2.7.1 最低检测限试验

试验结果如图 8 所示, 随着 MEL 添加浓度的增大, 检测线的颜色逐渐变淡, 直至消失, 在 MEL 添加浓度为 50  $\mu\text{g/L}$  时, 检测线已经很难辨别, 表明试纸条对三聚氰胺的最低检测限可达到 50  $\mu\text{g/L}$ 。

### 2.7.2 实际样本检测试验

HPLC 检测阴性牛奶、奶粉与饲料样品中添加三聚氰胺标准品, 采用组装的试纸条进行测试。由图 9 可见, 试纸条在牛奶、奶粉和饲料中

## 2.7 试纸条组装与测试

在上述研究基础上, 确定三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条的研制材料选择及工艺参数选择如下: NC 膜, Whatman; 胶体金标记三聚氰胺单克隆抗体喷膜量为 60  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ; 包被抗原 MEL-OVA 包被量为 1200 mg/L; 二抗 (质控线) 包被量为 1 000 mg/L; 0.01 mol/L PBS (pH 7.5) 进行样品垫前处理。按此参数生产一批试纸条, 进行检出限、实际样品加标、比对测试与保存期试验。

的肉眼可视最低检测限分别为 100  $\mu\text{g/L}$ 、100 ng/g 和 200 ng/g。

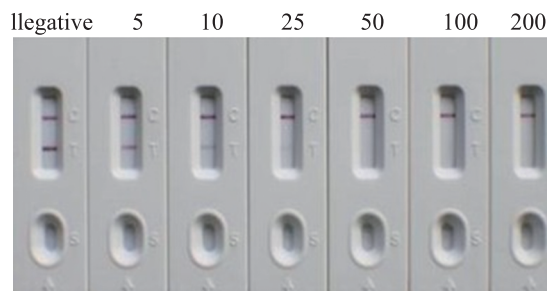


图 8 MEL 胶体金试纸条最低检测限图

Fig.8 LOD of test trip for detecting melamine.

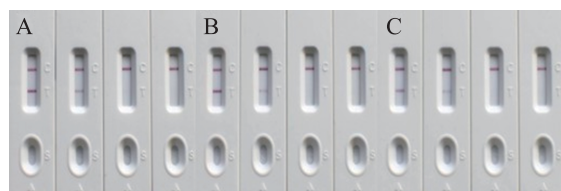


图 9 胶体金试纸条法测定牛奶、奶粉和饲料中的三聚氰胺

Fig.9 The result of detecting melamine in milk, milk powder and feed. (A) Milk, melamine concentration ( $\mu\text{g/L}$ ): 0, 50, 100 and 200. (B) Milk powder, melamine concentration ( $\text{ng/g}$ ): 0, 50, 100 and 200. (C) Feed, melamine concentration ( $\text{ng/g}$ ): 0, 100, 200 and 500.

### 2.7.3 LC-MS/MS 法与 CGIA 检测牛奶中三聚氰胺含量的比对

分别应用两种方法对不同浓度的样品测试 5

次, 主要结果见表 1。牛奶与奶粉样品中的 MEL 添加量为 50  $\text{ng/g}$  时, LC-MS/MS 法能检出, 且回收率良好, 而试纸条对牛奶与奶粉样品中的 MEL 肉眼可视最低检测限为 100  $\text{ng/g}$ , 不能检出; 牛奶与奶粉样品中的 MEL 添加量不小于为 100  $\text{ng/g}$  时, LC-MS/MS 法和试纸条均能检出。而饲料样品中的 MEL 添加量为 100  $\text{ng/g}$  时, LC-MS/MS 法能检出, 且回收率良好, 而试纸条对饲料样品中的 MEL 肉眼可视最低检测限为 200  $\text{ng/g}$ , 不能检出; 添加量不小于 200  $\text{ng/g}$  时, LC-MS/MS 法和试纸条均能检出。此结果表明, 试纸条检测结果与 LC-MS/MS 法具有很高的符合率。

表 1 LC-MS/MS 法和金标法检测 MEL 的对比试验 ( $n=5$ )

Table 1 The comparison test of melamine by LC-MS/MS and ICA ( $n=5$ )

Sample	Amount added ( $\mu\text{g/L}$ )	Amount measured by LC-MS/MS ( $\mu\text{g/L}$ )	Amount measured by ICA
Milk	0	Not detected	—
	50	42.50 $\pm$ 2.03	—
	90	92.00 $\pm$ 3.12	—
	100	98.66 $\pm$ 5.27	+
	200	185.20 $\pm$ 4.60	+
Milk powder	0	Not detected	—
	50	46.44 $\pm$ 2.79	—
	90	88.00 $\pm$ 2.98	—
	100	98.12 $\pm$ 6.46	+
	200	197.00 $\pm$ 6.89	+
Animal feed	0	Not detected	—
	100	106.00 $\pm$ 7.25	—
	180	176.00 $\pm$ 8.24	—
	200	204.20 $\pm$ 5.07	+
	500	502.40 $\pm$ 9.15	+

“—”negative; “+” positive.

### 2.7.4 试纸条保存期测试

保存期加速实验结果如表 2 所示,表明 60 °C 条件下可保存 12 d。根据试纸条保存期经验:胶体金免疫层析试纸条 60 °C 下稳定 1 d,相当于常温干燥环境下可保质 1 个月。可推论,三聚氰胺胶体金免疫层析试纸条常温干燥环境下至少可保质 6 个月。

表 2 三聚氰胺试纸条保质期实验

Table 2 Experiment of shelf life for melamine test strip

The number of days	No melamine			Amount added (μg/L)	
	Negative	Negative	Negative	200	400
1	—	—	—	+	+
2	—	—	—	+	+
3	—	—	—	+	+
4	—	—	—	+	+
5	—	—	—	+	+
6	—	—	—	+	+
7	—	—	—	+	+
8	—	—	—	+	+
9	—	—	—	+	+
10	—	—	—	+	+
11	—	—	—	+	+
12	—	—	—	+	+

“—” negative; “+” positive.

## 3 结论

基于抗原抗体结合原理的免疫分析技术以其特异、便捷、快速的优点,在小分子有害残留监测中被广泛应用。目前针对三聚氰胺的免疫分析技术也有报道,主要为酶联免疫吸附法和胶体金免疫层析法。其中介绍三聚氰胺的 ELISA 检

测法主要为论文,研制方法详尽;介绍三聚氰胺胶体金免疫层析法主要为专利<sup>[22-24]</sup>,还处于知识产权保护中。

在本研究中,详细介绍了 MEL 胶体金免疫层析检测试纸条的研制过程:NC 膜、金标三聚氰胺抗体喷膜量、包被抗原(检测线)MEL-OVA 包被量和二抗(质控线)包被量的工艺参数为:硝酸纤维素膜采用 Whatman NC 膜、胶体金标记 MEL 单克隆抗体最佳喷膜量为 60 μL/cm<sup>2</sup>、包被抗原 MEL-OVA 最佳包被量为 1200 mg/L、样品垫采用 0.01 mol/L PBS (pH 7.5) 进行前处理。三聚氰胺胶体金试纸条肉眼可视最低检测限为 50 μg/L;试纸条在牛奶、奶粉和饲料中的肉眼可视最低检测限分别为 100 μg/L、100 ng/g 和 200 ng/g,与 LC-MS/MS 法比对,具有较高的准确性;试纸条常温干燥环境下可保质 6 个月。能够检测出三聚氰胺含量大于 50 μg/L 的样品,适用于现场实际样品三聚氰胺残留水平监测,为三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸条的研制及产品化提供了参考,具有良好的应用前景。

## REFERENCES

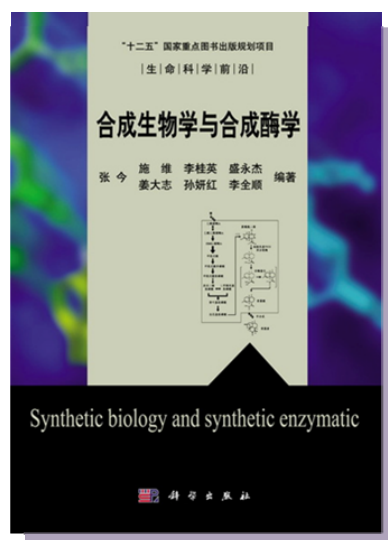
- [1] Wang YJ. Raw Material of Organic Chemicals. Beijing: Chemical Industry Press, 2004: 727–728.  
王延吉. 有机化工原料. 北京: 化学工业出版社, 2004: 727–728.
- [2] Lang L. FDA issues statement on diethylene glycol and melamine food contamination. Gastroenterology, 2007, 133(1): 5–6.
- [3] Ingelfinger J R. Melamine and the global implications of food contamination. N Engl J Med, 2008, 359(26): 2745–2748.
- [4] Sugita T, Ishiwata H, Yoshihira K, et al. Determination of melamine and three hydrolytic



- products by liquid chromatography. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1990, 44(4): 567–571.
- [5] Mniiz VR, Cbballos SG, Rosales MD, et al. Method development and validation for melamine and its derivatives in rice concentrates by liquid chromatography. Application to animal feed samples. *Anal Bioanal Chem*, 2008, 392(3): 523–531.
- [6] Yu H, Tao YF, Chen DM, et al. Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with pressurized liquid extraction for simultaneous quantification and confirmation of cyromazine, melamine and its metabolites in foods of animal origin. *Anal Chim Acta*, 2010, 682(1/2): 48–58.
- [7] FDA/ORA. Forensic Chemistry Center GC-MS screen for the presence of melamine and cyanuric acid[EB/OL]. [2007-04-10]. <http://www.fda.gov/cvm/Melamine-Presence.htm>.
- [8] Vail T, Jail PR, Sparkman OD. Rapid and unambiguous identification of melamine in contaminated pet food based on mass spectrometry with four degrees of confirmation. *J Anal Toxicol*, 2007, 31(6): 304–312.
- [9] Filigenzi MS, Puschner B, Aston LS, et al. Diagnostic determination of melamine and related compounds in kidney tissue by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(17): 7593–7599.
- [10] Varelis P, Jeskelis R. Preparation of [(13)C(3)]-melamine and (13)C(3)]-cyanuric acid and their application to the analysis of melamine and cyanuric acid in meat and pet food using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2008, 25(10): 1208–1215.
- [11] Garber EAE. Detection of melamine using commercial enzyme-linked immunosorbent assay technology. *J Food Prot*, 2008, 71(3): 590–594.
- [12] Choi JH, Kim YT, Lee JH. Rapid quantification of melamine in milk using competitive 1, 10-oxalyldiimidazole chemiluminescent enzyme immunoassay. *Analyst*, 2010, 135(9): 2445–2450.
- [13] Wang ZY, Ma X, Zhang LY, et al. Screening and determination of melamine residues in tissue and body fluid samples. *Anal Chim Acta*, 2010, 662(1): 69–75.
- [14] Zhu K, Li JC, Wang ZH, et al. Simultaneous detection of multiple chemical residues in milk using broad-specificity antibodies in a hybrid immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(5): 2716–2719.
- [15] Tang MJ, Zhang H, Zheng XY, et al. Rapid detection of melamine in different matrixes of food samples by ELISA. *Chin J Food Hyg*, 2010, 22(4): 340–343.  
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. *中国食品卫生杂志*, 2010, 22(4): 340–343.
- [16] Zhang MZ, Wang MZ, Chen ZL, et al. Development of a colloidal gold based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection of clenbuterol and ractopamine in swine urine. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 395(8): 2591–2599.
- [17] Wang TC, Zhang T, Yang ST, et al. Preparation and application of a colloidal gold strip to detect the rabies antibody. *Chin J Biotech*, 2011, 27(5): 799–804.  
王铁成, 张涛, 杨松涛, 等. 狂犬病病毒抗体胶体金检测试纸的制备. *生物工程学报*, 2011, 27(5): 799–804.
- [18] Zhang JY, Zhang Y, Wang S. Rapid detection of sulphamethazine residues in pig muscle and milk by colloidal gold-based immunochromatographic assay. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2010, 10(1): 181–185.  
张佳宜, 张燕, 王硕. 胶体金免疫层析法快速检测猪肉及牛奶中磺胺二甲嘧啶残留. *中国食品学报*, 2010, 10(1): 181–185.
- [19] Lin T, Shao JJ, Cong GZ, et al. Establishment of colloidal gold-immunochromatography assay strip for detection of type A swine foot-and-mouth disease virus. *Chin J Biotech*, 2009, 25(5): 767–772.

- 林彤, 邵军军, 丛国正, 等. Asial 型口蹄疫病毒胶体金免疫层析检测方法的建立. 生物工程学报, 2009, 25(5): 767-772.
- [20] Gong YF, Wang WF, Zhang MZ, et al. Preparation of artificial antigen of melamine and polyclonal antibody. China Univ Metrol, 2011, 22(1): 73-79.  
龚云飞, 王维芬, 张明洲, 等. 三聚氰胺人工抗原及多克隆抗体的制备. 中国计量学院学报, 2011, 22(1): 73-79.
- [21] Wang MZ, Ying YF, Gong YF, et al. Preparation and identification of anti-melamine monoclonal antibody. J Anhui Agric Sci, 2012, 40(5): 2574-2576.  
王旻子, 应永飞, 龚云飞, 等. 三聚氰胺单克隆抗体制备与鉴定. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2574-2576.
- [22] Qian JH, Liao YY. Establishment of colloidal gold-immunochromatography assay strip for detecting melamine: CN, 200910060513, 2009-01-14.  
钱金宏, 廖园园. 三聚氰胺胶体金免疫层析检测试纸及制备方法: CN, 200910060513, 2009-01-14.
- [23] He FY, Wan YP, Feng CW, et al. A special test strip for detecting melamine: CN, 200810240316.2, 2008-12-17.  
何方洋, 万宇平, 冯才伟, 等. 一种检测三聚氰胺的方法及其专用试纸: CN, 200810240316.2, 2008-12-17.
- [24] Zhang SE, Sang LY, Bu LJ, et al. A colloidal gold-immunochromatography assay strip for detection of melamine: CN, 201020107992.5, 2010-02-01.  
张少恩, 桑丽雅, 卜令杰, 等. 一种检测三聚氰胺的免疫胶体金试剂板: CN, 201020107992.5, 2010-02-01.

## 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介



### 合成生物学与合成酶学

ISBN: 978-7-03-033988-1

编著者: 张今等

定价: 168

装帧: 平装

读者对象: 本书可供从事生命科学研究与教学的人员参考, 也可用作生命科学学科专业高年级本科生及研究生的教材和参考用书。

内容提要: 合成生物学的兴起是 21 世纪生命科学领域的大事件。合成生物学的快速发展为其他学科注入了新的研究理念, 提供了强有力的工具。分子酶学工程与合成生物学的交叉和整合出现了新的研究领域——合成酶学。本书共分 7 章。第 1 章合成生物学概述, 使读者对合成生物学有一个全面的认识; 第 2 章分子酶学工程概要, 使读者对分子酶学工程与合成生物学的关系有基本的了解; 第 3 章、第 4 章和第 5 章详细介绍了合成生物元件、装置、基因网路和系统; 第 6 章介绍合成代谢途径; 第 7 章介绍合成酶学。

获取更多图书信息请您关注 <http://www.lifescience.com.cn/>

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

联系人: 科学出版社科学销售中心 周文宇电话: 010-64017301

E-mail: [zhouwenyu@mail.sciencep.com](mailto:zhouwenyu@mail.sciencep.com)