

高通量快速检测三聚氰胺的方法



最近从三鹿奶粉引发的毒奶粉事件让大家谈奶色变，同时也让食品中三聚氰胺的快速可靠检测迫在眉睫。目前市场上对三聚氰胺的检测方法主要有高效液相色谱法（HPLC）、气相色谱串联质谱法（GC-MS）以及液相色谱串联质谱法（LC-MS）。在去年的毒猫粮、毒狗粮事件之后，美国 FDA 就相继公布了用 GC-MS 和 HPLC 检测三聚氰胺的详细流程。同样受这一事件的影响，去年 6 月 14 日，中国农业部也发布了编号为 NY/T1372-2007 的《饲料中三聚氰胺的测定》的行业标准。

这几种方法相比较，HPLC 法的检测灵敏度为 2.0 mg/kg，而 GC-MS 则达到了 0.05 mg/kg。此外，在定量的同时，GC-MS 法还能明确被检测成分的分子式，因此被农业部确定为饲料中三聚氰胺检测的确证法。但是，这些方法中用到的仪器动辄上百万，甚至上千万，不要说个人，甚至一些小的企业或奶站都无力购买，只能望之兴叹。另外，它对样品处理和操作的要求也相对较高。既然要在各个环节中加强三聚氰胺的检测，那么普及如此昂贵复杂的仪器显然不符合中国国情。还有没有其他廉价又可靠的替代方法呢？

幸好，现在市场上也涌现出不少检测三聚氰胺的酶联免疫吸附分析（ELISA）试剂盒。进口的有 Beacon Analytical Systems 公司的 Beacon Melamine Plate Kit、Abraxis 公司的 Melamine Plate kit、Strategic Diagnostics 公司的 EnviroGard Triazine Plate kit 等，国产的有中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所开发的检测三聚氰胺的酶联免疫试剂盒等。

ELISA 检测试剂盒可是高通量检测三聚氰胺的有力工具。每个酶标板有 96 个孔，除去空白孔和对照孔，每次能检测 80 多个样品，这是其他方法所无法比拟的。且 ELISA 方法

不需要大笔的仪器投入和复杂的样品制备过程，操作人员很快就可以上手。因此美国 FDA 的研究员也在考察用 ELISA 方法检测三聚氰胺的可靠性。其中生物化学部的 Eric Garber 就将 Abraxis 和 Strategic Diagnostics 公司的试剂盒进行了比较，根据他的实验结果，Abraxis 公司的 Melamine Plate kit 检测灵敏度为 9 ng/ml，相比之下，Strategic Diagnostics 公司提供的 EnviroGard Triazine Plate kit 的灵敏度则为 1.5 mg/ml。而且他认为 Abraxis ELISA 方法可靠、快速，可以替代其他繁琐的检测方法。

下面就以 Beacon Melamine Plate Kit 为例，说明 ELISA 试剂盒的原理。利用萃取液通过均质及振荡的方式提取样品中的三聚氰胺进行免疫测定。先将三聚氰胺酶标记物，样品萃取物及标准加入到已经包被有三聚氰胺抗体的微孔中开始反应。在 30 分钟的孵育过程中，样品萃取物中的三聚氰胺与三聚氰胺酶标记物竞争结合微孔中的三聚氰胺抗体，之后洗掉小孔中所有没有结合三聚氰胺及三聚氰胺酶标记物。用去离子水洗涤，每孔中加入清澈的底物溶液，结合的酶标记物将无色的底物转化为蓝色的物质。孵育 30 分钟后停止此反应，根据各孔颜色深浅进行数据读取。依据标准的颜色得出样品中三聚氰胺的浓度值。

从上面的过程可以估算出,整个过程不超过 2 小时,检测范围为 20-500 ng/ml。这样一个试剂盒的市场价格在 3800 元左右,那么平均下来,每个样品的成本不到 50 元。这应该是很多地方质检机构和小型企业所能接受的。难怪 Beacon 的销售人员说最近一段时间试剂盒的销路特别好,不仅是企业,有些个人都买回去自己检测。



很多企业也认识到 ELISA 检测的经济快速。广东雅士利集团在检出三聚氰胺后,向大众发布的承诺书中表示已经购买了多台美国 BioTek 公司的 ELX800 酶标仪(下图),发放到各奶源收购点及生产基地。酶标仪就是 ELISA 实验所配套的检测仪器,不过它的价钱可平实很多,ELX800 的价格约为 3 万多。

如果你想要高通量快速检测三聚氰胺,ELISA 方法确实是很好的选择。它成本低、快速、通量高、对技术人员的要求低,满足了地方质检部门、小型企业及奶站的需求。

不过,如果你不满足于定量结果,还需要定性分析,那只能借助于高灵敏度的质谱和色谱仪了。ELISA 试剂盒不能定性分析,如果样品中存在与三聚氰胺类似的物质,有可能会干扰实验结果,呈现假阳性。因此国家权威质检机关也主要采用以下几种质谱和色谱仪器来进行检测。

赛默飞世尔科技的 Thermo Scientific

Accela 高速液相系统和 TSQ Quantum Ultra 三重四极杆质谱仪,建立监测加工食品中的三聚氰胺及其水解产物的液相色谱——串联质谱方法。TSQ Quantum 是唯一可以使用高度选择反应监测(H-SRM)模式的仪器,这种模式使动物组织等复杂样品的快速和有效分析更容易。这个方法用 Thermo Scientific 的 LC-MS/MS,得出的精密度和准确度值,完全满足食品药品监督管理局关于分析方法建立和确证的指导原则的要求。这套仪器也早在 2007 年就被美国国家食品安全与技术中心作为高优先级的三聚氰胺分析工作中关键的部分。“TSQ Quantum Ultra 在 H-SRM 模式下能够给我们提供非常高的信噪比,让我们获得很高的检测限。”Varelis 博士解释说,“它具有非常神奇的、非常卓越的灵敏度。并且非常耐用,因此每天可以给我们可靠和一致性的结果。”

安捷伦也推出了基于不同仪器平台的三聚氰胺检测方案,以满足不同客户对于食品及其原材料中三聚氰胺筛查,确认和准确定量的需要。安捷伦公司全面的气质联用、液相色谱和液质联用产品,为食品及其原材料中三聚氰胺的筛查、确认及准确定量提供多元化的选择。安捷伦 5975 系列 GC/MS 和 DB5-ms 毛细管色谱柱可用于各种基质中三聚氰胺的筛查;安捷伦 1200SL 液相色谱系统可用于三聚氰胺的定量分析,其中有关 Zorbax Rx-sil C8 LC column 更是美国 FDA 所采用的液相色谱柱。安捷伦 6410 三重四极杆 LC/MS 可以为三聚氰胺定性定量分析提供简单,灵敏和高选择性的一体化解决方案。

珀金埃尔默(PerkinElmer)推出用于检测食品中三聚氰胺的气质联用仪 包括利用自动进样器和 TurboMass 软件的 Clarus 600 T

气相色谱质谱联用仪。“在此系统的帮助下，实验室可以确保其分析的精确性，同时也符合美国 FDA 最新的检验淀粉，大米蛋白，玉米粉和大豆蛋白的相关标准。”此次三聚氰胺分析仪的技术是与 Flora Research 研究中心共同开发的，此研究中心是一家在 FDA 注册的擅长对天然产品进行检验的独立实验室。珀金埃尔默也是首家提供全套三聚氰胺检验用气相色谱质谱联用仪系统的公司。

具有讽刺意味的是，三鹿公司的质检部门也配备了 Waters 高效液相色谱仪，这么高端的仪器应该不会检测不出奶粉中高达 2563 mg/kg 的三聚氰胺吧。不知是质检人员的疏忽，还是这台仪器根本是形同虚设。免检、免检，连它自己都忘了检了。希望其他的知名企业和质检部门不会再有类似的问题发生。