

DB34

安 徽 省 地 方 标 准

DB 34/T 1374—2011

生鲜乳中三聚氰胺的测定 ——酶联免疫吸附法

Determination of Melamine in Raw Milk Enzyme Linked immunosorbent assay

2011 - 03 - 16 发布

2011 - 04 - 16 实施

安徽省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由安徽省畜牧兽医局提出。

本标准由安徽省农业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：安徽省兽药饲料监察所(安徽省畜产品质量安全检测中心)。

本标准主要起草人：许世富、丁作坤、汤春莲、陶小平、吴昊、陈文帮、李瑋。

生鲜乳中三聚氰胺的测定—酶联免疫吸附法

1 范围

本标准规定了生鲜乳中三聚氰胺检测的酶联免疫吸附测定方法。

本标准适用于生鲜乳中三聚氰胺的常规快速测定，阳性样品需用气相色谱—质谱法（GC/MS）或液相色谱质谱法（LC/MS-MS）确证。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 试样制备

采集的生鲜乳应密闭保存于-18℃的冰柜中，用前恢复至室温，摇匀，备用。

4 原理

本方法是酶联免疫法中的竞争性测定法，其主要原理是：样品中游离的三聚氰胺与酶标板上固定的三聚氰胺抗原竞争特异性抗体，通过酶标 II 抗的反应，洗掉游离的酶标物，再通过酶的专一性显色剂显色，根据显色的深浅来判断样品中三聚氰胺的含量。根据竞争性原理，样品中游离的三聚氰胺少，则酶标 II 抗结合多，显色就深，相反，则显色浅。结果可以通过在 450 nm 处测定吸收值计算，颜色变化的程度反映样品中三聚氰胺的含量，在一定浓度范围内吸光度的高低与样品中三聚氰胺的含量成反比。

5 试剂和材料

5.1 除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的二级水。

5.2 竞争酶标免疫法三聚氰胺试剂盒，2℃～8℃冰箱中保存。

5.2.1 微孔板：包被有三聚氰胺抗原。

5.2.2 三聚氰胺标准溶液：0 ng/mL、10 ng/mL、30 ng/mL、90 ng/mL、270 ng/mL、810 ng/mL。

5.2.3 三聚氰胺酶标 II 抗工作液。

5.2.4 三聚氰胺抗体工作液。

5.2.5 浓缩样本稀释液。

5.2.6 浓缩洗涤液。

5.2.7 底物 A 液。

5.2.8 底物 B 液。

5.2.9 终止液。

5.3 洗涤液：用水 20 倍稀释厂商提供的浓缩洗涤液。

5.4 样本稀释液：用水 4 倍稀释厂商提供的浓缩样本稀释液。

6 仪器和设备

6.1 酶标仪（配备 450 nm 滤光片）。

6.2 分析天平：感量 0.00001 g，感量 0.001 g。

6.3 振荡器。

6.4 恒温干燥箱。

6.5 微量加样器及配套吸头：单道 20 μL，50 μL，100 μL，1000 μL，多道 50 μL~300 μL。

7 测定步骤

7.1 样品处理

取生鲜乳样品 100 μL，加入 900 μL 样本稀释液，充分混匀，取 50 μL 用于检测。

7.2 测试程序

7.2.1 测定在室温 20℃~25℃ 条件下操作，测定之前将试剂盒以及所有试剂在室温（20℃~25℃）下放置 1 h~2 h。

7.2.2 将足够标准和样品所用数量的孔条插入微孔架，标准和样品做两个平行实验，记录下标准和样品的位置。

7.2.3 分别在各孔中加 50 μL 的标准品溶液或样品溶液。

7.2.4 分别在各孔中加 50 μL 的抗体工作液。

7.2.5 盖好盖板膜，轻轻晃动反应板数秒，(25±2)℃ 反应 30 min。

7.2.6 倾出微孔中的液体，加 250 μL 洗涤工作液，轻轻振荡 30 s，倾出微孔中的洗涤液，在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡，重复上述操作 3 遍。

7.2.7 立即在每孔中加入 100 μL 酶标 II 抗工作液。

7.2.8 盖好盖板膜，轻轻晃动反应板数秒，(25±2)℃ 反应 30 min。

7.2.9 倾出微孔中的液体，加 250 μL 洗涤工作液，轻轻振荡 30 s，倾出微孔中的洗涤液，在吸水纸上拍打，彻底清除微孔中的残留液和气泡，重复上述操作 3 遍。

7.2.10 立即在每孔中加入 100 μL AB 混合液（用前 5 min 内按体积比 1:1 配制），轻轻晃动反应板数秒，(25±2)℃ 避光反应 (10~15)min。

7.2.11 每孔加 50 μL 终止液（推荐使用多通道加样器），轻轻振荡混匀，10 min 内在 450 nm 下检测吸光度。

8 结果判定和表述

按下式计算百分吸光度值：

$$\text{百分吸光度值 (\%)} = \frac{B}{B_0} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

B —— 为标准溶液或供试样品的平均吸光度值；

B_0 ——为零标准的标准溶液平均吸光度值。

用专业计算机软件求出供试样品中三聚氰胺的浓度，乘以稀释系数即得检测结果。或计算出的标准相对吸光度值绘成为一个对应浓度(ng/mL)的半对数坐标系统曲线图，校正曲线在 10 ng/mL~810 ng/mL 范围内应当成为线性。相对应每一个样品的浓度 (ng/mL) 可以从校正曲线上读出。

9 检测方法灵敏度、准确度、精密度

9.1 灵敏度

本方法在生鲜乳中的检测限为 100 ng/mL。

9.2 准确度

本方法在 200 ng/mL 添加浓度水平上的回收率为 70%~120%。

9.3 精密度

本方法的批内变异系数 $CV\% \leq 10\%$ ，批间变异系数 $CV\% \leq 15\%$ 。
