

用于牛奶中三聚氰胺测定的纸芯片研究

吕聪聪 张柳 侯越 刘伟

(陕西师范大学 化学化工学院、陕西省生命分析化学重点实验室, 陕西 西安 710119)

摘要 在纸芯片上利用辣根过氧化物酶(HRP)-3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)-过氧化氢显色体系实现了牛奶中三聚氰胺含量的测定.以纸芯片为反应载体,三聚氰胺可以使HRP-TMB-H₂O₂的显色反应增强,在选择的最佳实验条件下,测定三聚氰胺的线性范围为10 μM-1.0 mM,检出限为5 μM.测定牛奶样品中三聚氰胺的加标回收率在95%-102%之间.本文构建一种低成本、简单、快速检测三聚氰胺的比色分析法.

关键词 辣根过氧化物酶;3,3',5,5'-四甲基联苯胺;比色法;三聚氰胺;纸芯片

中图分类号 O65

文献标识码 A

0 引言

三聚氰胺(C₃H₆N₆)中的含氮量非常高(通常按照质量计为66.6%),且有成本低的^[1]特性.近年来,三聚氰胺被非法添加在婴幼儿配方奶粉、牛奶和宠物食品中,在检测时,其蛋白质的含量可以高于我们用凯氏定氮法测定的蛋白质含量,使消费者被误导.而这些产品在奶制品市场上获得廉价的价格.但三聚氰胺在和它的水解产物三聚氰酸结合后,却造成肾小管中不溶性结晶生成,这可能会使肾功能衰竭^[2].因此,奶制品和其它食品中三聚氰胺的量需要严格控制.我国政府规定,三聚氰胺在婴幼儿食品和其它食品中的最大允许残留量分别为1.0 mg/kg和2.5 mg/kg^[3].目前测定三聚氰胺含量的主要方法有色谱法^[4]、毛细管电泳-质谱联用法^[5]、电化学法^[6]、表面增强拉曼散射光谱法^[7,8]、荧光光谱法^[9,10],比色法^[11]等.

而在这些检测方法中,目视比色法具有简单、快速、可适合现场检测及易普及的特点而引起人们的广泛关注.在纳米金比色法中,2011年前后,酶联免疫分析和胶体金免疫层析试纸^[12]是主要的检测方法.通过合成未修饰或修饰过的Au纳米粒子,利用其与三聚氰胺发生团聚显色而发展了一系列的纳米金测定三聚氰胺含量的目视比色法^[13,14].在近三年的研究中,利用其他方法修饰或适配体功能化的纳米金及未修饰的纳米银^[15-18],也达到对三聚氰胺检测的目的.但胶体金免疫层析试纸会涉及到喷金等操作,实验成本比较高,将纳米粒子滴涂在纸上会使其团聚,因此发展纳米粒子测定的纸芯片具有一定的难度.在利用3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)-H₂O₂显色体系^[22-26]来检测三聚氰胺的相关工作中,一般实验孵育时间比较长,且需要加热等操作,因此发展孵育时间短的TMB显色体系有一定的优势.近年来,纸芯片^[19-21]以其具有成本低、易操作、可携带等优点而受到关注.本文旨在建立一种纸上测定三聚氰胺的快速测定方法,以辣根过氧化物酶(HRP)-TMB-H₂O₂显色体系^[27-29]为基础,利用三聚氰胺可以使该显色体系的显色增强的现象,建立了一种比色法测定三聚氰胺的纸芯片.该显色方法不需加热等操作,室温孵育5 min即可测定,反应所需的试剂量很少,且具有即用即抛、不会产生样品交叉污染的特点.该方法测定三聚氰胺的检出限为5 μM,可实现牛奶样品中的三聚氰胺含量的快速测定.

收稿日期:2020-02-05

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(21005048);陕西省自然科学基金项目(2018JM2002)资助

通讯作者:刘伟,女,汉族,博士,副教授,研究方向:化学发光与纸分析芯片,E-mail:weiliu@126.com.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器:富士施乐蜡打印机(8570,富士施乐有限公司,美国);佳能数码相机(Canon EOS 550D,日本);TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(UV-1800,日本岛津仪器有限公司)。

试剂及材料:Whatman 1号滤纸(200.0 mm×200.0 mm, Sigma);辣根过氧化物酶(HRP)(上海雪满生物科技有限公司)(纯度:R. Z>3.1%);3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)(北京索莱宝科技有限公司)(纯度:>98%);过氧化氢(国药集团化学试剂有限公司);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司)(纯度:AR);牛奶样品购于本地超市,试剂用水均为超纯水(18.2 MΩ·cm)。

1.2 纸芯片的制作

采用文献报道过的蜡打印法制作纸芯片^[21,30,31],首先用 CorelDRAW X5 画图软件设计直径为 6 mm 的纸芯片微区域,将设计的纸芯片按 DXF 格式保存后用切割控制软件(ROBO Master-Pro)打开后,将纸张放在模型版上,用切割机(Graphtec Craft Robo-S)切出所要的图形,将设计好的图案用蜡打印机打印,将打印好的纸芯片放在烘箱中,在 150 °C 下加热 150 s,蜡圈在高温下会融化并且渗透到纸纤维的内部,这样就会在纸芯片上形成疏水区域。

1.3 储备液的制备

20.0 mM 的 TMB 的制备:准确称取 0.0480 g 粉末状的 TMB,用无水乙醇定容至 10 mL,涡旋振荡 1 min,超声 15 min. 避光保存,备用。

1.0 mM 三聚氰胺标准溶液的制备:准确称取 0.0126 g 的三聚氰胺,用超纯水溶解后转移定容至 100 mL. 使用时逐级稀释。

1.4 三聚氰胺的检测

将 1.6 μL 的浓度为 1.2 μM 的 HRP,3.0 μL 浓度为 7.0 mM 的 TMB 及 2 μL 的浓度为 0.7 mM 的 H₂O₂ 按顺序滴加到直径为 6 mm 的纸芯片上,室温反应 5 min. 作为对照组. 按上述同样的方法,最后再将 1.0 μL 不同浓度的三聚氰胺标准溶液滴加到纸芯片上,室温反应 5 min. 以三聚氰胺的浓度为横坐标,以相对强度(加入三聚氰胺前后,所测灰度的变化)为纵坐标,绘制工作曲线。

1.5 市售牛奶样品处理

参照文献^[32]的方法对市售牛奶处理. 分别取 5.0 mL 牛奶(牛奶样品 1,牛奶样品 2,牛奶样品 3),加入 1.5 mL 2.0 M 的三氯乙酸,涡旋振荡 1min,超声处理 10 min 后,混合物以 13000 r/min 离心 10 min. 取上清液过滤,用 1 mol/L Na₂CO₃ 调至 pH 8.0,再以 3000 r/min 离心 3 min,取上清液,待用。

2 结果与讨论

2.1 比色法检测三聚氰胺的原理

实验中考查了 HRP-TMB-H₂O₂ 及三聚氰胺加入该体系中的紫外可见吸收曲线,如图 1 所示,HRP-TMB-H₂O₂ 溶液呈浅蓝色(插图 a),吸收光谱为图 1 中黑线,652 nm 可产生特征吸收峰. 向 HRP-TMB-H₂O₂ 溶液中加入三聚氰胺后,溶液的颜色加深,变为较深的蓝色(插图 b),652 nm 处的吸收强度增加,且吸收位置不变(图 1,红线),并未出现新的吸收带. HRP 催化 H₂O₂ 氧化 TMB 成为 ox-TMB 而显蓝色,在 HRP-TMB-H₂O₂ 体系中添加三聚氰胺前后,吸收强度有所增加,是因为三聚氰胺可以提高过氧化物酶的催化速度^[33],在同样时间内,反应速度加快,在立即添加三聚氰胺后,使同一时间点颜色加深,表明反应中三聚氰胺可以增强 HRP-TMB-H₂O₂ 的显色反应,起到催化的作用,并没有新的物质产生。

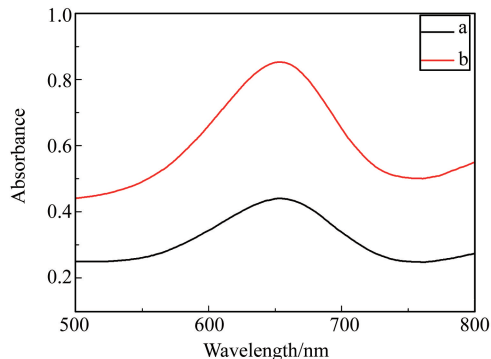


图 1 三聚氰胺对 HRP+TMB+H₂O₂ 体系的影响 (a: HRP+TMB+H₂O₂; b: HRP+TMB+H₂O₂+三聚氰胺)

2.2 反应时间对体系的影响

对于 TMB 显色体系,显色时间长短会影响测定结果,因此首先考察显色时间的影响. 在 TMB、 H_2O_2 和 HRP 的浓度为 7.0 mM、0.7 mM 和 1.2 μ M 时,在室温条件下,用一定浓度的三聚氰胺,测定了 1-11 min 内显色反应的相对强度变化值,结果如图 2(a)所示,当显色时间达到 5 min 时,反应具有最佳的显色效果. 因此,选择显色反应时间为 5 min.

2.3 pH 对体系的影响

已有研究表明,pH 对实验显色反应的效果起着重要作用^[11],当 pH 值低于 3 时,会影响到 TMB- H_2O_2 的性质,反应受到抑制. 然而,如果 pH 过高,HRP 会失活. 因此在 pH 为 3.0-7.0 的范围内考察了 pH 对该显色反应的影响,结果如图 2(b)所示. 实验结果表明该体系在 pH 为 4.5 时体系有最佳的显色效果.

2.4 HRP、TMB、 H_2O_2 浓度对体系的影响

为了在最佳的显色体系下检测三聚氰胺,HRP、TMB、 H_2O_2 的浓度也需要优化,优化结果如图 2(c)-(e)所示. 在 pH 为 4.5,反应时间为 5 min,TMB 浓度为 7.0 mM、 H_2O_2 浓度为 0.7 mM 的条件下,在 0.1-1.5 μ M 浓度范围内考察了 HRP 对显色体系的影响. 随着 HRP 的浓度 0.2-1.2 μ M 不断增大,所测的相对强度逐渐增大,当浓度大于 1.2 μ M 时,相对强度逐渐减小,所以在以后的实验中,选择 1.2 μ M 的 HRP,结果如图 2(c)所示.

在 pH 为 4.5,反应时间为 5 min,HRP 浓度为 1.2 μ M、 H_2O_2 浓度为 0.7 mM 的条件下,在 1-10 mM 浓度范围内考察了 TMB 对显色体系的影响. 随着 TMB 的浓度从 1.0 mM 到 7.0 mM 不断增大,所测的相对强度逐渐增大,当浓度大于 7.0 mM 时,相对强度逐渐减小,所以在以后的实验中,选择 7.0 mM 的 TMB,结果如图 2(d)所示.

在 pH 为 4.5,反应时间为 5 min,HRP 浓度为 1.2 μ M、TMB 浓度为 7.0 mM 的条件下,在 0.1-1.0 mM 浓度范围内考察了 H_2O_2 对显色体系的影响. 随着 H_2O_2 的浓度从 0.1 mM 到 0.7 mM 不断增大,所测的相对强度逐渐增大,当浓度大于 0.7 mM 时,过氧化氢的分解对实验结果有影响,会使测定的相对强度逐渐减小,所以在以后的实验中,选择 0.7 mM 的 H_2O_2 ,结果如图 2(e)所示.

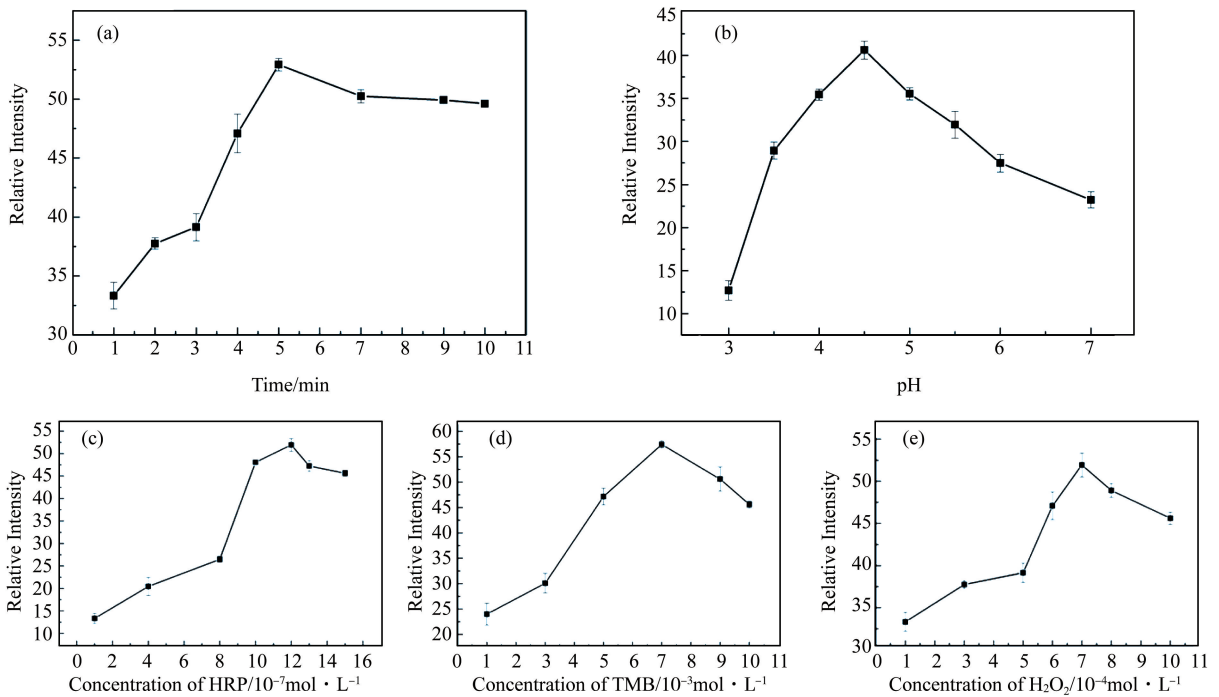
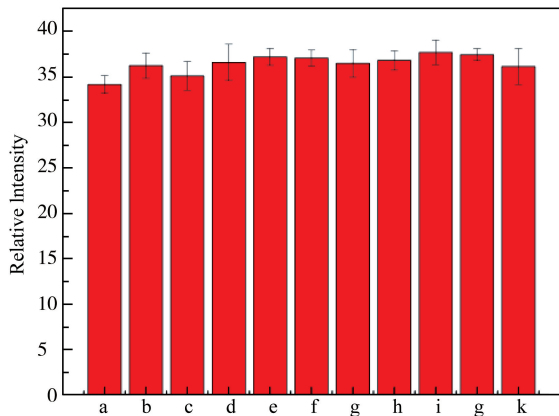


图2 不同条件对吸光度的影响 (a)反应时间;(b) pH;(c) HRP 的浓度;(d)TMB 的浓度;(e) H_2O_2 的浓度

2.5 干扰实验

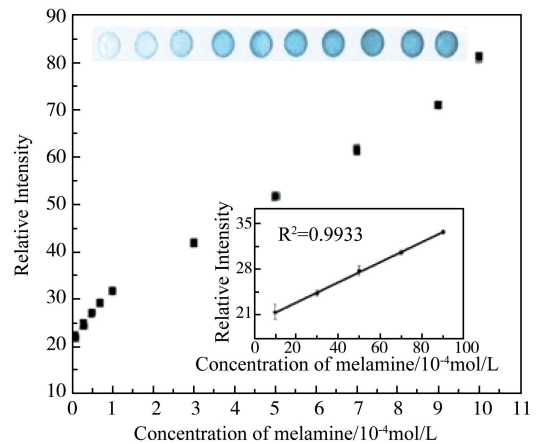
为了将本方法用于实际样品的检测,考察了牛奶中可能出现的物质^[11]对三聚氰胺测定的影响. 在上述所选的最佳实验条件下进行,即 HRP 的浓度为 1.2 μ M,TMB 的浓度为 7.0 mM, H_2O_2 的浓度为 0.7 mM,pH 值为 4.5 这一条件下,进行干扰实验的测定.

在对照组和实验组中三聚氰胺的含量相等,进行干扰测定的实验组中逐一添加各干扰物,当干扰物质的浓度为三聚氰胺浓度的 20 倍时(实验中三聚氰胺的浓度为 $100 \mu\text{M}$,其它物质浓度均为 2 mM),测其相应强度,再与对照组中只有三聚氰胺的响应信号进行对比,发现响应基本相当,说明该反应体系对三聚氰胺测定,其他物质并不会明显的增加或者减弱响应信号,所以结果表明,20 倍的 Zn^{2+} 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、乳糖、葡萄糖、半胱氨酸、赖氨酸、甘氨酸、维生素 C 和胸腺嘧啶均不会影响牛奶中三聚氰胺的测定。



注:a: Zn^{2+} ; b: K^+ ; c: Thymine; d: Ca^{2+} ; e: Lysine; f: Lactose; g: Glucose; h: cysteine; i: Glycine; g: Vitamin C; k: Melamine.

图3 各干扰物质对三聚氰胺测定的影响



注:纸芯片上的三聚氰胺浓度从左到右依次为 0、10、30、50、70、100、300、500、700、1000 μM 。

图4 三聚氰胺标准曲线的绘制

2.6 三聚氰胺标准曲线的绘制及线性分析

在所选择的最佳实验条件下,本研究利用比色法,通过观察纸芯片颜色的变化与三聚氰胺的浓度存在一定的线性关系,将纸芯片的颜色利用 Image-J 软件处理转化成灰度,在添加三聚氰胺前后灰度的差值即为相对强度.实验结果发现相对强度值与三聚氰胺的浓度在 $10 \mu\text{M}$ - 1.0 mM 呈现线性关系.为了获得更好的线性关系,我们采用分段线性的方法.针对 $10 \mu\text{M}$ - $100 \mu\text{M}$ 和 $100 \mu\text{M}$ - 1.0 mM 两个不同的线性范围,线性回归方程分别为 $y=15.7x+19.7$ ($R^2=0.9933$) 和 $y=4.7x+26.3$ ($R^2=0.9843$) (其 x 单位为 10^{-4} M) 如图 4 所示.随着三聚氰胺浓度的增大,其相对强度也逐渐增强.对不同浓度梯度的三聚氰胺进行了 5 次平行测定,相对标准偏差为 3.1 %。

表 1 三聚氰胺检测各比色方法的对比

方法	线性范围	检出限	反应条件	参考文献
纳米金免疫层析试纸	-	$100 \mu\text{g/L}$	室温	12
标记和免标记的纳米金显色	标记(41.7 - 417 nM) 未标(46.5 nM - $46.5 \mu\text{M}$)	41.7 nM	95°C 孵育 5 min	13
半胱氨酸修饰的纳米金显色	1 - 200 mg/L	1 mg/L	室温	14
非对称 PEG 修饰的纳米金显色	1.05 nM - 1 mM	1 nM	45°C 孵育 30 min	15
适配体功能化的纳米金显色	0 - $1 \mu\text{M}$	22 nM	室温下孵育一整夜	16
尿嘧啶 5'-磷酸钠修饰的纳米金显色	200 - 950 nM	-	室温下孵育 5 min	17
未修饰的纳米银显色	0.1 - 2 mg/L	0.04 mg/L	室温下孵育 20 min	18
$\text{PW}_{11}\text{MO}_{39}^{n-}/\text{PW}_9\text{M}_3\text{O}_{34}^{n-}$ -TMB- H_2O_2 显色	2×10^{-4} - $8 \times 10^{-3} \text{ mM}$	$0.02 \mu\text{M}$	25°C 下孵育 4 min	22
Cu^{2+} -TMB- H_2O_2 显色	1 - $100 \mu\text{M}$	$0.5 \mu\text{M}$	40°C 下孵育 60 min	23
$\text{Cu}_{2-x}\text{Se}@PSS^-$ -TMB- H_2O_2 显色	4.7 - 29.7 nM	1.2 nM	室温下孵育 20 min	24
汞(II)-HRP 功能化金纳米簇-TMB 显色	0.2 - $1.5 \mu\text{M}$	72 nM	室温下孵育 50 min	25
hemin G-quadruplex-DNAzyme-TMB- H_2O_2 显色	0.2 - 24 mM	80 nM	室温下孵育 50 min	26
HRP-TMB- H_2O_2 显色	$10 \mu\text{M}$ - 1 mM	$5 \mu\text{M}$	室温下孵育 5 min	本法

该方法的检出限为 $5 \mu\text{M}$,且选取几种不同的比色方法从检出限,线性,反应条件,所用方法这几个方面

进行对比,该研究所需时间短,不需加热,并列表对其检出限进行对比,如表 1 所示。

2.7 样品加标回收测定

为了评价本实验方法的可靠性和实用性^[34-36],我们将本方法用于测定牛奶中三聚氰胺的含量.将一定量的三聚氰胺标准溶液加入到样品溶液中,实验数据如表 2 所示,观察样品溶液中加入三聚氰胺标准品前后的回收率变化,结果表明该方法可靠且本方法可以用于实际牛奶样品的检测。

表 2 三聚氰胺加标回收样品测定结果

牛奶样品	本底值/ μM	加入值/ μM	测定值/ μM	回收率/%	RSD/%
1	0.0	50.0	47.8	95.6	1.47
2	0.0	70.0	68.2	96.9	2.31
3	0.0	90.0	91.8	102.0	3.05

3 结论

本研究在纸芯片上利用 HRP-TMB-H₂O₂ 显色体系成功实现了牛奶中的三聚氰胺含量的检测,未加入三聚氰胺时,纸芯片呈现浅蓝色,加入三聚氰胺后,显色反应增强,基于上述现象,以纸芯片为反应载体,通过比色法可以建立快速测定三聚氰胺的比色分析方法.该方法测定三聚氰胺的检出限为 5 μM .由于纸芯片具有反应所需的试剂量很少、即用即抛及样品不会交叉污染的特点,因此该方法开辟了一种简单快速、低成本的纸上检测三聚氰胺新途径。

参 考 文 献

- [1] 崔照军. 三聚氰胺生产技术与市场分析[J]. 化工管理, 2018 (4): 28-30.
- [2] 张丽丽, 李洁, 陈长宝, 等. 三聚氰胺分子印迹表面等离子体共振传感器的制备及分析应用[J]. 分析化学, 2018, 46(1): 88-93.
- [3] 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法. 中华人民共和国国家标准. GB/T 22388-2008, 2008.
- [4] 蔡勤仁, 欧阳颖瑜, 钱振杰, 等. 超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法测定饲料中残留的三聚氰胺[J]. 色谱, 2008, (3): 339-342.
- [5] Cook H A, Klampfl C W, Buchberger W. Analysis of melamine resins by capillary zone electrophoresis with electrospray ionization-mass spectrometric detection[J]. Electrophoresis, 2005, 26(7/8): 1576-1583.
- [6] Jing W, Li S Y, Li X J, et al. Determination of melamine in dairy products and melamine, tableware by inhibition electrochemiluminescent method[J]. Chinese Journal of Chemistry, 2011, 29(8): 1601-1605.
- [7] 王海波, 覃文霞, 余婉松, 等. Au@Ag NPs 表面增强拉曼快速测定奶粉中的三聚氰胺[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(12): 200-205.
- [8] 雷皓宇, 陈小曼, 李攻科, 等. 表面增强拉曼光谱法同时检测奶粉中三聚氰胺和二聚氰胺[J]. 分析科学学报, 2017, 33(3): 312-316.
- [9] Li Z Y, Li Y, Li L, et al. Aquamarine blue emitting silver nanoparticles as fluorescent sensor for melamine detection[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019, 217: 51-59.
- [10] Ren S H, Liu S G, Ling Y, et al. Fluorescence detection of melamine based on inhibiting Cu²⁺-induced disaggregation of red-emitting silver nanoclusters[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2018, 201: 112-118.
- [11] Ni P, Dai H, Wang Y, et al. Visual detection of melamine based on the peroxidase-like activity enhancement of bare gold nanoparticles [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 60: 286-291.
- [12] 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[J]. 生物工程学报. 2012, 28(7): 887-898.
- [13] Huang H, Li L, Zhou G H, et al. Visual detection of melamine in milk samples based on label-free and labeled gold nanoparticles [J]. Talanta, 2011, 85(2): 1013-1019.
- [14] Liang X S, Wei H P, Cui Z Q, et al. Colorimetric detection of melamine in complex matrices based on cysteamine-modified gold nanoparticles[J]. Analyst, 2011, 136(1): 179-183.
- [15] Chen X Y, Ha W, Shi Y P. Sensitive colorimetric detection of melamine in processed raw milk using asymmetrically PEGylated gold nanoparticles[J]. Talanta, 2019, 194: 475-484.
- [16] Hu X R, Chang K K, Wang S, et al. Aptamer-functionalized AuNPs for the high sensitivity colorimetric detection of melamine in milk samples[J]. Plos One, 2018, 13(8): e02016262018.
- [17] Liang L J, Zhen S J, Huang C Z. Visual and light scattering spectrometric method for the detection of melamine using uracil 5'-triphosphate sodium modified gold nanoparticles[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2017, 173: 99-104.
- [18] Kumar N, Kumar H, Mann B, et al. Colorimetric determination of melamine in milk using unmodified silver nanoparticle[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2016, 156: 89-97.

- [19] Martinez A W, Phillips S T, Butte M J, et al. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(8): 1318-1320.
- [20] Sun L, Jiang Y, Pan R, et al. A novel, simple and low-cost paper-based analytical device for colorimetric detection of *Cronobacter* spp[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1036: 80-88.
- [21] Carrilho E, Martinez A W, Whitesides G M. Understanding wax printing: A simple micropatterning process for paper-based microfluidics [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(16): 7091-7095.
- [22] Li Y M, Wang S G, Tang Z G. Visual detection of H_2O_2 and melamine based on $PW_{11}MO_{39}n$ ($M=Cu^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}$) and $PW_9M_3O_{34}n$ ($M=Cu^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{3+}$) [J]. *New Journal of Chemistry*, 2019, 43(46): 18018-18026.
- [23] Han X, Qin Z X, Zhao M Y, et al. Convenient and sensitive colorimetric detection of melamine in dairy products based on Cu(II)- H_2O_2 -3,5,-tetramethylbenzidine system[J]. *RSC Advances*, 2018, 8(61): 34877-34882.
- [24] Deng X Q, Hongyan Zou, Jing Lan, et al. Aggregation-induced superior peroxidase-like activity of Cu_2-x -Se nanoparticles for melamine detection[J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(41): 7516 -7521.
- [25] Cao G X, Wu X M, Dong Y M, et al. Colorimetric determination of melamine based on the reversal of the mercury(II) induced inhibition of the light-triggered oxidase-like activity of gold nanoclusters[J]. *Microchimica Acta*, 2016, 183(1):441-448.
- [26] Wang G F, Zhu Y H, He Y P, et al. Colorimetric and visual determination of melamine by exploiting the conformational change of hemin G-quadruplex-DNAzyme[J]. *Microchimica Acta*, 2014, 181(3/4): 411-418
- [27] Zhang X, Bi X, Di W, et al. A simple and sensitive $Ce(OH)CO_3/H_2O_2/TMB$ reaction system for colorimetric determination of H_2O_2 and glucose[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, 231: 714-722.
- [28] 符蓉, 张小翠. HRP 与 TMB 显色用于流式细胞仪 MoFlo Astrios-(EQ) 单细胞分选的方法探索[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(12): 2059-2064.
- [29] Wang X, Yao Q, Tang X, et al. A highly selective and sensitive colorimetric detection of uric acid in human serum based on MoS_2 -catalyzed oxidation TMB[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(4): 943-952.
- [30] Lu Y, Shi W W, Qin J H, et al. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30(9): 1497-1500.
- [31] Lu Y, Shi W W, Qin J H, et al. Fabrication and characterization of paper-based microfluidics prepared in nitrocellulose membrane by wax printing [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82(1): 329-335.
- [32] 刘颖, 张建锋, 杜晶晶. 基于表面增强拉曼的三聚氰胺在线检测[J]. *光散射学报*, 2015, 27(2): 154-158.
- [33] Karasyova, E. I, Naumchik, I. V, Metelitz, D. I. Activation of peroxidase-catalyzed oxidation of aromatic amines with 2-aminothiazole and melamine[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68(1): 54-62.
- [34] Zhai C, Qiang W, Sheng J, et al. Pretreatment-free fast ultraviolet detection of melamine in milk products with a disposable microfluidic device[J]. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(5): 785-789.
- [35] 贺习文. 有关乳制品中三聚氰胺检测方法的改进与探讨[J]. *中国奶牛*, 2018, (6): 42-45.
- [36] Huang P C, Gao N, Li J F, et al. Colorimetric detection of methionine based on anti-aggregation of gold nanoparticles in the presence of melamine[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 225(3): 2779-2784.

Paper-based Chip for Detection of Melamine in Milk

LV Cong-cong ZHANG Liu HOU Yue LIU Wei

(School of Chemistry and Chemical Engineering, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

Abstract In this work, horseradish peroxidase (HRP)-3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)-hydrogen peroxide colorimetric system was used to detection melamine in milk. On the paper-based chip, melamine can enhance the color reaction of HRP-TMB- H_2O_2 . Under the best experimental conditions, the linear range of melamine determination was 10 mM-1.0 mM, and the detection limit is 5 μ M. The recoveries of melamine in milk samples were 95%-102%. A low cost, simple and fast colorimetric method for the detection of melamine was established.

Key words Horseradish peroxidase; 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; colorimetry; melamine; paper-based chip