

荧光定量法快速检测鲜奶中四环素类总量残留

唐海波, 齐维, 唐时幸

(广州万孚生物技术股份有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 以荧光纳米微球标记抗体, 建立免疫层析检测方法, 配合荧光定量仪, 可高灵敏度地检测样本中 4 种四环素类药物的残留含量, 实现鲜奶中所含四环素类药物的总量检测。结果表明, 本方法对四环素的检测下限达 10 $\mu\text{g/L}$, 对金霉素、土霉素、多西环素回收率均达 70% 以上, 除了与链霉素有 0.32% 的交叉反应率外, 与其他药物没有交叉反应, 整个检测过程只需 15 min 左右。通过建立的荧光定量免疫层析法, 实现了四环素总量的快速定量检测。

关键词: 四环素类; 荧光定量免疫层析法; 检测

文章编号: 1673-9078(2012)11-1600-1602

Rapid Detection of Tetracyclines Residue in Fresh Milk using Quantitative Fluorescent Assay

TANG Hai-bo, QI Wei, TANG Shi-xing

(Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

Abstract: A immunochromatographic method was developed by antibody labeled by fluorescent nanoparticles and using fluorescent immunoassay (FIA) meter of Guangzhou Wondfo Biotech Co., Ltd. With this method, the concentration of four kinds of tetracyclines residue could be detected highly-sensitively with the purpose of determination of total amount of tetracyclines in fresh milk. The results showed that the limit of detection for tetracycline was 10 $\mu\text{g/L}$ and the recovery rates for chlortetracycline, oxytetracycline and doxycycline were more than 70%. The kit had no cross-reactivity with other drugs besides that the cross-reactivity towards streptomycin was 0.32%. The whole detection process could be performed in about 15 minutes. The rapid quantitative determination of total amount of tetracyclines was realized by means of fluorescent quantitative immunochromatographic method developed.

Key words: tetracyclines; fluorescent quantitative immunochromatographic method; detection

四环素类 (tetracyclines, TCs) 抗生素是由放线菌产生的一类广谱抗生素, 包括金霉素 (chlortetracycline, CTC)、土霉素 (oxytetracycline, OTC)、四环素 (tetracycline, TC) 及半合成衍生物甲烯土霉素、强力霉素、二甲氨基四环素等, 其结构均含并四苯基本骨架, 已被广泛应用于畜禽、水产和蜜蜂养殖中, 用于预防和治疗多种感染性疾病。在乳业生产过程中, 四环素类抗生素随动物进食饲料后进入体内, 在牛乳中有较高残留, 被人体摄入后, 其不良反应主要体现在对肝脏、肾脏以及骨骼发育的危害上, 也可使牙齿形成“黄牙”。许多国家和地区已对四环素类药物残留进行监控, 我国规定牛奶中四环素、金霉素、土霉素的最高残留限量为 100 $\mu\text{g/kg}$ ^[1]。所以, 建立快速灵敏的四环素类检测方法是一个必要措施。

目前, 检测四环素类药物残留的方法主要有微生物法、色谱仪器法和免疫学检测法。微生物法检测灵

敏度低, 检测耗时长, 定量不准确。常用的色谱仪器法, 如 HPLC、LC-MS 等的特异性、灵敏度及定量准确度均较好, 但仪器设备昂贵、技术性强, 不便于基层推广应用。且样本一般需要复杂的处理, 耗时也较长。免疫学法检测牛奶中四环素类残留, 主要有酶联免疫吸附法 (ELISA)、胶体金免疫层析法等, 这些方法可以不对牛奶样本进行复杂的处理, 可直接加样检测或仅需简单稀释即可。但是 ELISA 需要多次洗涤、加液、显色等多个操作步骤, 比较繁琐, 而胶体金免疫层析法检测灵敏度只能达到 50~100 $\mu\text{g/L}$ 左右。

本研究应用荧光定量免疫层析法, 配以荧光定量仪进行信号读取和数据结果处理, 可同时检测鲜奶中 4 种四环素类药物的残留量。且不需对样本进行特殊处理, 反应时间仅需 15 min 左右, 同时兼有高灵敏度、快速、多组分检测等优点, 在产品应用推广中具有极高的价值。

1 材料与方法

收稿日期: 2012-07-12

作者简介: 唐海波 (1983-), 男, 研究方向为免疫检测技术

1.1 试剂

四环素、土霉素、金霉素、多西环素标准品, 购自中国药品生物制品检定所; 四环素类荧光定量检测试剂盒, 由万孚公司研制; 实验所用鲜牛奶样本均购自当地市场。

1.2 仪器与设备

荧光定量仪, 由万孚公司研制; 计时器。

1.3 测定原理

采用竞争性免疫荧光层析法检测鲜奶中四环素类药物浓度, 将牛奶样本与各试剂混合后滴加至检测卡的加样孔中, 在层析作用下反应复合物沿着硝酸纤维素膜向前移动, 包被在膜上的抗原与样本中的四环素类小分子竞争结合荧光标记的抗体。样本中所含药物越多, 膜上聚集的复合物则越少, 荧光信号强度便越弱。通过荧光定量仪扫描荧光信号强度, 与标准曲线所拟合的方程进行换算, 可得出四环素类药物的浓度。

1.4 实验方法

1.4.1 样本与试剂盒准备

(1) 样本: 本地市场采购 10 份鲜奶, 经 ELISA 法测定为阴性 (四环素类药物浓度小于 $2 \mu\text{g/L}$)。

(2) 试剂盒: 含检测卡、ID 芯片和缓冲液。检测卡类似于胶体金测试卡, 其上硝酸纤维素膜上包被有抗原, 缓冲液中含有荧光标记的抗体。

1.4.2 检测步骤

实验前, 将缓冲液和样本平衡至室温, 取检测卡水平放置待加样。

根据试剂盒使用说明书操作, 检测在室温下进行, 取 $50 \mu\text{L}$ 牛奶样本, 与 $200 \mu\text{L}$ 缓冲液充分混合, 然后取 $80 \mu\text{L}$ 混合液滴加至检测卡加样孔中, 室温下水平放置 15 min 后将检测卡插入荧光定量仪 (确保已插入 ID 芯片) 中, 仪器将自动读取并显示测试结果。

1.4.3 灵敏度测试

按 2.4.2 中的检测步骤, 测试 10 份阴性牛奶, 检测限等于阴性样本测定均值加上 3 倍标准差。

1.4.4 回收率测试

取 10 份阴性牛奶, 每份分别添加低、中、高 3 个浓度的四环素标准品, 分别为 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $40 \mu\text{g/L}$ 、 $160 \mu\text{g/L}$, 按 2.4.2 中的方法检测, 计算各样本的回收率与测试精密度。

1.4.5 总量测试

取 10 份阴性牛奶, 添加金霉素标准品使其浓度为 $40 \mu\text{g/L}$, 同样的方法制备土霉素、多西环素添加的牛奶样本各 10 份, 浓度均为 $40 \mu\text{g/L}$ 。按 2.4.2 中的方法检测, 计算各样本的回收率与各药物测试的精密度。

1.4.6 特异性测试

在阴性鲜奶中添加恩诺沙星、依诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、氯霉素、链霉素、新霉素、庆大霉素、潮霉素 B、苯甲酸雌二醇、三聚氰胺等 13 种药物, 添加浓度均为 $10000 \mu\text{g/L}$ 。添加黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 M1 于阴性鲜奶中, 添加浓度为 $1000 \mu\text{g/L}$ 。按 2.4.2 中的检测步骤, 测试以上添加样本。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的建立

使用标准品稀释液, 配制 0、10、20、40、80、160、 $320 \mu\text{g/L}$ 梯度浓度的四环素标准品, 测试信号值, 并采用构建拟合计算方程式。

表 1 标准点测试结果

Table 1 Results of the detection of substance solution

标准品浓度/ $(\mu\text{g/L})$	0	10	20	40	80	160	320
测试信号值	7.104	6.456	5.662	4.553	3.347	2.118	1.543

其中, 拟合曲线方程为 $y=2.47596+11.1574x-8.90761x^2+1.7173x^3$, y 代表测试信号值, x 代表对应标准品浓度的对数值 $\lg C$, 曲线相关系数 R 为 0.999747。

2.2 灵敏度测试

灵敏度以检测限表示, 结果见表 2。10 份阴性牛奶样本的平均值为 $3.19 \mu\text{g/L}$, 标准差为 $0.94 \mu\text{g/L}$, 检测限等于平均值加上 3 倍标准差, 为 $6.01 \mu\text{g/L}$, 试剂盒对四环素类药物的检测限可定为 $10 \mu\text{g/L}$ 。

表 2 阴性样本检测结果 ($n=10$)

Table 2 Results of the detection of negative samples

样本编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
测试结果/ $(\mu\text{g/L})$	3.71	2.21	2.76	5.22	2.89	2.04	3.77	2.43	3.32	3.57

2.3 回收率测试

结果见表 3, 10 份阴性鲜奶中分别添加 $10 \mu\text{g/L}$ 、 $40 \mu\text{g/L}$ 、 $160 \mu\text{g/L}$ 的四环素标准品, 平均回收率范围在 93.0%~112.6%, 准确度较好, 变异系数均小于 8.6%, 试剂盒的精密度良好。

2.4 总量测试

将最常用的其他 3 种四环素类抗生素金霉素、土霉素、多西环素添加至阴性鲜奶中, 浓度均为 $40 \mu\text{g/L}$ 。由表 4 可知, 多西环素回收率最好, 为 92.5%, 回收率最低的为土霉素, 为 76.4%, 3 种药物的回收率均为 70% 以上, 3 种药物的变异系数 (CV 值) 均小于 8.3%。该试剂盒以 100% 交叉反应率的四环素为基准

物做标准曲线,对金霉素、土霉素及多西环素也有较高的交叉反应率,由此可见,本试剂盒对四环素类常见的4种药物可实现总量检测。

表3 添加回收试验结果 (n=10)

Table 3 Results of recovery test

添加浓度	10 μ g/L	40 μ g/L	160 μ g/L
平均值/(μ g/L)	11.26 \pm 0.95	43.32 \pm 3.12	148.76 \pm 10.31
平均回收率/%	112.6 \pm 6.01	108.3 \pm 7.14	93.0 \pm 5.22
(精密性/CV)%	7.8	4.1	8.6

表4 金霉素、土霉素、多西环素的准确度试验结果 (n=10)

Table 4 Results of accuracy test for chlortetracycline, oxytetracycline and doxycycline

添加药物	金霉素	土霉素	多西环素
平均值/(μ g/L)	35.44 \pm 2.68	30.56 \pm 1.04	37.00 \pm 1.71
平均回收率/%	88.6 \pm 3.19	76.4 \pm 3.54	92.5 \pm 4.01
(精密性/CV)%	7.2	8.3	5.1

2.5 特异性测试

对15种样本中可能存在的药物进行了测试,其中恩诺沙星、依诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、氯霉素、新霉素、庆大霉素、潮霉素B、苯甲酸雌二醇、三聚氰胺测试结果均小于10 μ g/L,为阴性,交叉反应率小于0.1%,与试剂盒没有交叉反应。黄曲霉毒素B1、黄曲霉毒素M1的测试结果均小于10 μ g/L,为阴性,交叉反应率小于1%,与试剂盒也没有交叉反应。

表5 交叉反应试验结果

Table 5 Results of cross-reactivity test

添加药物	测试结果/(μ g/L)	交叉反应率/%
恩诺沙星	<10	<0.1
依诺沙星	<10	<0.1
诺氟沙星	<10	<0.1
环丙沙星	<10	<0.1
磺胺嘧啶	<10	<0.1
磺胺二甲嘧啶	<10	<0.1
氯霉素	<10	<0.1
链霉素	32	0.32
新霉素	<10	<0.1
庆大霉素	<10	<0.1
潮霉素B	<10	<0.1
苯甲酸雌二醇	<10	<0.1
三聚氰胺	<10	<0.1
黄曲霉毒素B1	<10	<1
黄曲霉毒素M1	<10	<1

链霉素测试结果为32 μ g/L,为阳性,交叉反应率为0.32%,与试剂盒有一定交叉反应。

结果表明,本试剂盒对以上药物抗干扰能力较好,仅发现链霉素存在一定的干扰,故若测试样本结果为阳性,需要排除链霉素干扰或其他方法进一步确证。

3 结论

3.1 本研究对建立的四环素总量的免疫荧光检测方法进行了初步的性能评价。结果显示,该荧光定量检测试剂盒对常见的4种四环素类药物四环素、金霉素、土霉素、多西环素的检测下限可达10 μ g/L,对4种药物的回收率均在76.4%~112.6%之间,样本的添加回收率与ELISA试剂盒相当,与其他药物的交叉反应率低,可用于四环素类残留的总量检测。

3.2 免疫荧光检测方法操作和样本处理均很简单,反应时间仅为15 min左右,灵敏度、准确度和精密性接近于酶联免疫法,但灵敏度高于胶体金法。檀尊社^[2]等建立了用于快速检测水产品中四环素类药物残留的胶体金检测试剂,灵敏度为100 ng/mL。汪善良^[3]等用胶体金试纸条和LC-MS/MS法对牛奶中四环素类药物残留进行了对比检测,胶体金法对四环素、强力霉素和金霉素的检测限均为40 μ g/L,对土霉素的检测限为80 μ g/L,LC-MS/MS法对4种药物的检测限均为50 μ g/L。胶体金法的灵敏度均低于免疫荧光法。洪武兴^[4]等用液质联用法检测水产品中四环素类残留,检测限可达20 μ g/kg。各种方法灵敏度的差异与样本类型及其处理方法不同有关,但与方法本身也有很大关系。免疫荧光检测法同时具有快速简便、灵敏度高、准确度和精密性好的特点,同时鲜奶样本无需处理,并能实现四环素类的多残留检测,是一种检测牛奶中四环素类药物的较好方法。

3.3 本研究选用的牛奶样本数量较少,且只测试了鲜奶,但目前牛奶与奶制品种类与品牌繁多,故对其他种类的牛奶样本是否能使用本方法,以及对水产品、肉类、肝脏、肾脏、蛋类等的检测结果,尚有待做进一步的评价。

参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部.动物性食品中兽药最高残留限量[Z].农业部公告第235号,2002
- [2] 檀尊社,陆恒,邵伟,等.胶体金免疫层析法快速检测水产品中四环素类药物残留[J].西北农业学报,2010,19(8):32-37
- [3] 汪善良,吴鹏,刘琳,等.胶体金试纸条法和液相色谱-串联质谱法检测牛奶中四环素类药物残留比较[J].乳业科学与技术,2011,34(6):268-271
- [4] 洪武兴,孙良娟,刘益峰,等.液质联用法检测水产品中四环素类残留[J].现代食品科技,2010,7(26):756-758

现代食品科技