

# 一种新型定量检测恩诺沙星量子点免疫层析方法的建立

肖有玉, 卢菲, 张弛, 王辰, 祝晨辰, 李东元, 唐伟  
(南京市产品质量监督检验院, 江苏南京 210028)

**摘要:** 恩诺沙星作为一种应用较为广泛的抗生素, 因在实际抽检中出阳率较高引起了广泛的重视。本研究建立了一种可以快速定量检测恩诺沙星, 采用量子点进行标记和示踪的免疫层析方法。通过对新型的纳米荧光材料量子点结合抗原抗体等活性材料的技术研究、样本前处理试剂的研发、浓度的筛选优化等技术实现量子点材料与食品基质的适配, 建立定量检测恩诺沙星免疫层析的平台。通过对试剂盒整体的相关优化, 本检测方法线性范围为 2~1000 ng/mL, 最低检测限为 1.80 ng/mL, 精密度可控在 10%以内, 热加速稳定性为 37 °C 可稳定放置 10 d, 性能优越。与传统液相色谱方法比较, 简便快捷, 整体检测时间可控在 20 min 内, 检测结果相关性较好, 相关系数为 0.98。本研究弥补国内对量子点与免疫层析技术相结合定量检测食品类抗生素残留方面研究的空缺, 可实现大批量现场原材料的快速筛查, 推动食品快检技术的发展。

**关键词:** 恩诺沙星; 量子点; 免疫层析技术; 定量检测

文章编号: 1673-9078(2020)12-252-258

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.12.0474

## A Novel Quantum Dot Immunochromatographic Assay for Quantitative Detection of Enrofloxacin

XIAO You-yu, LU Fei, ZHANG Chi, WANG Chen, ZHU Chen-chen, LI Dong-yuan, TANG Wei  
(Nanjing Institute Of Product Quality Inspection, Nanjing 210028, China)

**Abstract:** Enrofloxacin as a widely used antibiotic has attracted widespread attention due to its high positive rate in actual sampling. In this study, an immunochromatographic assay was developed for rapid and quantitative detection of enrofloxacin using quantum dot labeling and tracking. Quantitative detection of enrofloxacin was achieved through investigating the fluorescent quantum dot nanomaterials combined with active materials, developing reagents for sample pretreatment, and screening and optimizing concentrations to achieve the compatibility of quantum dot materials and food substrates. Through the optimization of the whole kit, the linear range of this detection method was 2~1000 ng/ml, the minimum detection limit was 1.80 ng/ml, and the precision was within 10%, with superior performance in accelerated thermal stability tests (stable for 10 days at 37 °C). Compared with conventional liquid chromatography methods, this established method is simple and rapid with a good correlation among the detection results within the entire detection period of 20 min (correlation coefficient: 0.98). This research fills up the knowledge gap in quantitative detection of antibiotic residues in foods by combining quantum dots and immunochromatography technique, which allows rapid on-site screening of large-scale raw materials and promote the development of rapid food inspection technology.

**Key words:** enrofloxacin; quantum dot; immunochromatography; quantitative detection

引文格式:

肖有玉, 卢菲, 张弛, 等. 一种新型定量检测恩诺沙星量子点免疫层析方法的建立[J]. 现代食品科技, 2020, 36(12): 252-258

XIAO You-yu, LU Fei, ZHANG Chi, et al. A novel quantum dot immunochromatographic assay for quantitative detection of enrofloxacin [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(12): 252-258

收稿日期: 2020-05-19

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFF0215200; 2018YFF0215206); 南京市局重点科技项目 (Kj2019002)

作者简介: 肖有玉 (1979-), 女, 高级工程师, 研究方向: 食品快速检测、食品工程、转基因等检测技术的研究和实践工作

通讯作者: 张弛 (1979-), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向: 食品中未知物精准识别、微生物分子检测、食品接触材料风险监测等

恩诺沙星是目前应用较为广泛的喹诺酮类抗菌药物,根据农业部 235 号公告的要求,限量要求为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结合地区抽检检测的实际情况,动物组织中恩诺沙星项目检出的阳性率较高,尤其是体现在夏季的水产项目抽检中,水产养殖户抗菌药物滥用及产品上市前夕超标使用的现象比较严重,检测时需要得知较为准确的具体浓度来对原产地养殖进行针对性的指导和查处<sup>[1,2]</sup>。根据食品快速检测的国家标准,目前市场上大多数为胶体金检测试剂盒,灵敏度低且因胶体金颗粒会随反应时间发生颜色变化极不稳定而仅能定性检测<sup>[3]</sup>。传统的恩诺沙星定量检测多为液相色谱法和酶联免疫法等<sup>[4]</sup>,耗时较长且对操作人员要求高,已不能满足大批量原料筛选的要求,所以亟需研发一种新型的定量检测方法<sup>[5]</sup>。

量子点作为一种新型的纳米荧光材料具有一元激发多元发射、激发光谱宽、发射光谱窄、光稳定性好和抗漂白能力强等特点。量子点标记的免疫层析试纸条较传统的胶体金试纸条具有明显较高检测灵敏度和特异性<sup>[6]</sup>,但灵敏度高的标记材料也会受检测基质的基质效应影响较大,尤其是食品基质,多样且复杂。本项目拟通过研究抗体与量子点标记技术、活性材料的浓度优化、原材料筛选等一系列技术,建立一种恩诺沙星量子点免疫层析的检测方法,并对减少基质干扰及简化样品前处理方法进行研究,进一步提高检测方法的简便性<sup>[7]</sup>。目前国内对此方面较为系统的研究较少,所以本研究具有较大的创新性,并且本研究适用于大批量筛查原料肉中恩诺沙星的含量,对食品快检技术的发展也有一定的推动作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

硝酸纤维素膜(NC膜)购于 Millipore; 玻璃纤维纤维素膜购买于 Ahlstrom、特定类型的样品垫、吸水垫、PVC 底板购买于上海杰一生物技术有限公司; 恩诺沙星抗体和抗原都由深圳三方圆生物科技有限公司提供; 两株抗体分别为鼠单克隆抗体-ENRAB01(浓度为 5.7  $\text{mg}/\text{mL}$ , 简称为抗体 1) 和鼠单克隆抗体 IgG-ENRAB02(浓度为 3.6  $\text{mg}/\text{mL}$ , 简称为抗体 2); 两株抗原分别为恩诺沙星抗原-ENRAG01-BSA(浓度为 8.2  $\text{mg}/\text{mL}$ , 简称为 ENR-BSA) 和恩诺沙星抗原-ENRAG02-OVA(浓度为 7.3  $\text{mg}/\text{mL}$ , 简称为 ENR-OVA); 量子点微球由南京诺唯赞生物科技有限公司合作研发; 恩诺沙星标准物质购自于上海源叶生物科技有限公司; 其他缓冲物质以及甲醇、二甲基甲

酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)、牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白、乙醇胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)等试剂购自于阿拉丁公司; 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)试剂购自于 AAT Bioquest 公司。

### 1.2 设备

单维往复式划膜仪、三维平面喷膜仪、压壳机、数控高速斩切机、滚切机等购自上海金标生物技术有限公司; 恒温培养箱购自上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; 免疫荧光检测仪购自广东蓝勃生物科技有限公司。

### 1.3 方法

首先完成恩诺沙星标准样品的配置,根据商业化产品说明书再添加 3%牛血清白蛋白(BSA)作为保护蛋白,对标准品进行稀释完成配置。然后在查阅相关资料以及原有实验室研究基础上,研究量子点与抗体的标记方法,使量子点优点与活性材料可以更好结合,以达到发挥最大检测功效且受食品基质影响最小的目的。同时优化样品前处理方法,使之简单有效且对量子点和活性材料影响较小。本研究主要目的是通过优化和创新技术使样本前处理以及活性材料包被 NC 膜、量子点标记活性材料技术相融合,减少相互之间的影响,使量子点可以较好地适配到恩诺沙星的检测方法中<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.1 筛选抗原抗体

以同一浓度相同工艺对两株抗原 ENR-BSA 和 ENR-OVA 进行 96 孔板的包被,分别来检测抗体滴度,根据抗原抗体反应性,选择反应性最好的一对抗原抗体以进行后续实验的研究。

#### 1.3.2 建立竞争法反应模式

竞争法分为抗原金标法和抗体金标法,抗原金标法即量子点标记抗原并附着在特定的标记垫上,NC 膜上包被抗体,样本中残留的恩诺沙星与标记抗原竞争结合到包被有抗体的 NC 膜 T 线上,建立起正向竞争法; 抗体金标法是量子点标记抗体,包被抗原,样本中的恩诺沙星先结合标记垫上的抗体占据位点,再上行与 T 线抗原竞争,建立起反向竞争法。根据不同样品中恩诺沙星含量不同,竞争残留在 T 线活材量的不同所得到检测荧光强度的不同,使用相关检测机器将荧光信号转换为发光值数字,计算 T/C 值,绘制标准曲线,检测样本时,根据 T/C 值进行反算,从而对样本中的恩诺沙星含量进行定量检测。在实验室原有

基础上建立初步数字模型, 根据标样的检测情况信噪比等选择竞争法模式。

### 1.3.3 选择样本前处理方法

为减少基质效应的影响, 依照以往经验和实验室研究, 以 pH 为 9.50, 浓度为 0.1 mol/L 的磷酸氢二钠-氢氧化钠为样本处理缓冲液, 为配适量量子点反应体系加入 2% 的聚乙二醇, 加入一定量的牛血清白蛋白作为保护蛋白, 浓度变量为 5% 和 10%, 分别以 5% 和 10% 的甲醇、二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMSO) 作为溶解剂, 做四因素二水平正交实验, 以法检已定量为 120 ng/mL 的黑鱼样本作为实验检测样本, 以上不同条件进行前处理后离心取上清, 过固相萃取柱继续后续法检液相色谱检测, 以检测浓度的偏差大小, 选择最优的前处理条件。

### 1.3.4 量子点标记方法的建立

量子点作为一种较为灵敏的荧光纳米材料, 食品基质对其影响也会更加灵敏复杂, 所以标记方法的建立也就极其重要。经过研究确定量子点标记方法为: 取 50  $\mu$ L 超声分散后的量子点原液, 与 450  $\mu$ L 0.1 M pH 7.4 的 PBS 缓冲液混匀, 进行微球活化, 然后加入 5  $\mu$ L 100 mg/mL 的 SMCC 试剂, 垂直混匀 15 min; 将得到的混合液 10000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 500  $\mu$ L 0.1 M pH 6.4 的 MES 缓冲液重悬; 再次超声分散后, 向得到的分散液中加入一定量的抗体, 混匀偶联 0.5 h; 再加入 10  $\mu$ L 10% 乙醇胺混匀后, 加入 500  $\mu$ L 5% 的酪蛋白溶液, 室温垂直混匀 0.5 h 来封闭多余位点; 最后将得到的混合液 10000 r/min 离心 5 min, 加入 500  $\mu$ L 0.1 M pH 7.4 的 PBS 缓冲液定容到 1 mg/mL, 超声分散并 4  $^{\circ}$ C 保存<sup>[9]</sup>。

### 1.3.5 抗体浓度确定以及性能验证

因为竞争检测体系的建立与 NC 膜上包被的 T 线抗原浓度, 量子点标记的抗体浓度以及标记后喷到标记垫上的喷垫浓度密切相关, 所以建立正交实验, 以 500 ng/mL 浓度的质控品作为阳性样本检测每个组合的精密性、最低检测限、 $IC_{50}$  等相关性能, 选择最优浓度组合。

对已优化组合好的试剂盒进行整体的性能验证, 包括最低检测限, 精密性, 线性范围, 回收率, 热稳定性以及与液相色谱法的对比检测结果等<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 活材配对

将抗原 ENR-BSA 和 ENR-OVA 以相同工艺相同浓度 1  $\mu$ g/mL 包板, 抗体 1 和抗体 2 以 1  $\mu$ g/mL 浓度

作为初始浓度, 分别与两株抗原反应做正交实验, 抗体浓度以 2 倍作为稀释梯度, 稀释 15 次, 最后为稀释液上样作为空白对照, 结合实验曲线, 计算  $IC_{50}$  值, 根据  $IC_{50}$  的数值选择抗原抗体的配对。结果见表 1。

表 1 活材反应性结果

Table 1 Results of Pairing antigen-antibody reaction

实验条件	$IC_{50}$ 浓度/(ng/mL)	
ENOR-BSA	抗体 1	366.72
	抗体 2	738.04
ENOR-OVA	抗体 1	223.38
	抗体 2	528.37

以计算所得的  $IC_{50}$  值可得, ENR-OVA 与抗体 1 的组合为 223.38 ng/mL, 浓度数值最小, 说明两者反应性最好, 可作为本实验活材进行后续技术的研究和开发; ENR-BSA 和抗体 1 组合  $IC_{50}$  值为 366.72 ng/mL, 反应性较好, 可作为备选。

### 2.2 竞争法反应模式建立

按照 NC 膜上 T 线包被 0.6 mg/mL 抗体, C 线包被 1 mg/mL DNP 单抗, 量子点标记抗原 0.4 mg/mL 建立抗原金标法。按照相同浓度 T 线包被抗原 0.4 mg/mL, C 线包被 1 mg/mL DNP 单抗, 量子点标记相同浓度 0.6 mg/mL 的抗体, 建立抗体金标法。将恩诺沙星标准物质按说明书要求的稀释液, 稀释浓度为 500、300、100、50、10、5、2 ng/mL, 根据两种模型的 T/C 结果, 选择建立合适的竞争法方法。

表 2 竞争模式实验结果

Table 2 Results of Selecting the competitive reaction mode

浓度值/(ng/mL)	T/C 结果	
	抗原金标法	抗体金标法
500	0.58	0.21
300	0.60	0.31
100	0.63	0.87
50	0.71	1.43
10	0.81	5.38
5	0.83	10.99
2	0.86	19.56

从表格结果可得, 抗原金标法在量子点反应体系中 T/C 值最大为 0.86, 最小为 0.58, 倍数为 1.48 倍, 与浓度值难成比例, 抗体金标法则具有优化的可能, T/C 倍数为 93.14, 所以选择抗体金标法: 量子点标记抗体, NC 膜上包被抗原, 作为本研究的反应模式。

### 2.3 样本前处理优化

样本前处理优化结果如表 3 所示, 为配适量量子点

体系,需加入一定浓度的牛血清白蛋白,可起到一定的保护和封闭作用,但会对前处理有一定的影响,通过以上实验数据可知,5% BSA 和 10% DMF 组合时,检测浓度为 122.37 ng/mL,与定值为 120.00 ng/mL 的样品检测浓度相对偏差最小,可作为前处理的最优组合,并以此作为基础进行后续研究的优化。

表 3 前处理优化结果

**Table 3 Preprocessing optimization results**

实验条件	检测浓度/(ng/mL)	相对偏差/%	
5% BSA	5% 甲醇	142.29	18.58
	10% 甲醇	145.82	21.52
	5% DMF	130.06	8.38
	10% DMF	122.37	1.98
	5% DMSO	150.24	25.20
	10% DMSO	132.25	10.21
10% BSA	5% 甲醇	165.32	37.77
	10% 甲醇	162.63	35.53
	5% DMF	154.56	28.80
	10% DMF	142.77	18.98
	5% DMSO	165.32	37.77
	10% DMSO	159.44	32.87

### 2.4 量子点的制备及标记方法的建立

实验室选择水热法和微波法两种不同的方法,研发制备较为先进的石墨碳量子点。其中水热法产率较低,但过程可控制度较高。微波法简单易操作产率较高,但得到的量子点粒径不均匀,易成团结块,会对后续的检测实验造成极大的误差。经过多次的探索和试验,在传统水热法基础上,用有机试剂代替水,全程控制制备过程在一个碱性环境中,即得到了分散较为均匀、粒径较一致的石墨碳量子点且产率也得到了提高。针对研发的原材料量子点的特性,实验室采用目前应用较为广泛的 EDC-NHS 交联剂方法和单一的 SMCC 试剂方法,对量子点的标记进行研究。结果发现在预实验阶段 SMCC 试剂标记恩诺沙星活性材料的效果较 EDC-NHS 交联剂方法标记效果稳定,有效值较高,且量子点粒径及分散系数较小,说明在标记恩诺沙星活性材料技术上,SMCC 试剂法对本研究研发的石墨碳量子更为适用。在原有标记方法基础上,经过后期不断的性能验证和优化,确定在活性材料与量子点 SMCC 试剂作用下偶联后,加入 5% 的酪蛋白和 10% 的乙醇胺可以更好的封闭未标记的位点,减少特异性反应。另外在操作过程中适用离心等会使量子点聚集的步骤后,要及时加入后续溶液超声分离,用粒径分析仪等相关仪器对粒径和分散系数进行检测,保证数

值在一定的范围内,确保量子点与活性材料标记均匀,减小检测实验误差。最后将量子点标记物稀释到最优浓度,使用喷金仪喷到处理后的标记物垫上,即可完成量子点的标记。

### 2.5 浓度优化结果

以浓度为 500 ng/mL 的质控品作为阳性样本,检测 IC<sub>50</sub> 值,按照以上优化结果,结合新的标记工艺,活材浓度正交实验结果如表 4 所示。

表 4 活材浓度正交实验结果

**Table 4 Results of screening appropriate concentrations**

包被浓度/(mg/mL)	标记浓度/ $\mu$ g	喷垫浓度/(mg/mL)	精密性/%	最低检测限/(ng/mL)	IC <sub>50</sub> /(ng/mL)	
1.0	75	0.6	26.72	22.72	402.55	
		100	0.4	16.30	17.40	363.57
		0.2	12.77	10.31	300.82	
		0.6	22.62	12.62	322.75	
	50	0.4	10.68	7.31	276.34	
		0.2	16.62	4.74	241.72	
		0.6	17.88	11.4	324.62	
		0.4	8.51	5.86	252.52	
	100	0.2	14.35	2.16	202.45	
		0.6	18.96	10.63	331.85	
		0.4	16.37	7.74	274.36	
		0.2	15.58	3.21	220.97	
0.5	75	0.6	17.67	5.17	278.92	
		0.4	10.25	3.13	253.62	
		0.2	10.88	1.45	204.22	
		0.6	14.36	3.23	258.21	
	50	0.4	6.64	1.23	202.36	
		0.2	9.12	1.67	193.27	
		0.6	13.31	9.28	264.14	
		0.4	10.24	4.43	238.92	
	100	0.2	14.33	3.24	205.36	
		0.6	25.57	7.45	305.15	
		0.4	10.67	3.75	224.31	
		0.2	18.33	1.31	195.46	
50	0.6	25.52	5.53	286.42		
	0.4	18.31	2.18	233.62		
	0.2	20.44	0.75	205.14		

包被浓度直接决定反应抗原的浓度,喷垫浓度直接决定量子点的浓度,标记浓度和喷垫浓度共同作用于反应抗体的浓度。根据以上实验检测数据可知,喷垫浓度过高或过低会造成 CV 过高,检测的准确性不能满足,所以选择 0.2、0.4、0.6 mg/mL 三个浓度点

进行试验;竞争法的建立与抗原抗体的浓度密切相关,所以标记浓度或包被浓度过高就会影响最低检测限浓度,导致最低检测限无法下降;包被浓度过低减少了竞争抗原浓度,同样会对精密性有影响。

综合以上,包被浓度0.5 mg/mL,标记浓度50 μg,喷垫浓度0.4 mg/mL时性能最优:最低检测限为1.23 ng/mL、精密性最小为6.64%、IC<sub>50</sub>浓度值为202.36 ng/mL,并存在可以继续优化的可能,所以选择包被抗原浓度0.5 mg/mL,标记抗体浓度50 μg,喷垫到标记垫上的浓度0.4 mg/mL的反应模式。

### 2.6 定量检测

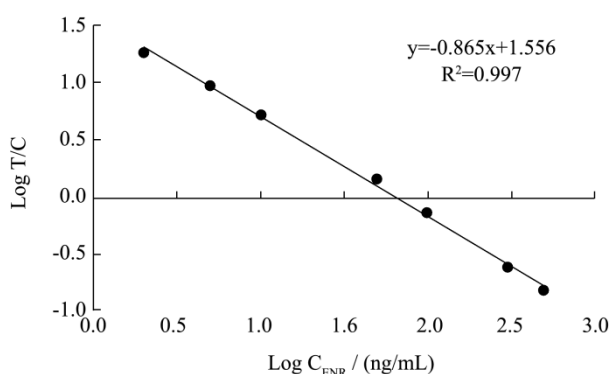


图1 浓度对数标准曲线

Fig.1 The logarithmic standard concentration curve

通过检测浓度为500 ng/mL、300 ng/mL、100 ng/mL、50 ng/mL、10 ng/mL、5 ng/mL、2 ng/mL的恩诺沙星标准物质,为了减少系统或检测偏差的影响,增加准确度,采用浓度值与T/C值分别取以e为底的对数值的方法对标准曲线进行处理,计算公式为

$y = -0.865x + 1.556$ ,  $R^2$ 为0.997如图1所示,定量检测即将样本检测相关数值带入曲线和计算公式中,换算得到检测浓度<sup>[11]</sup>。

### 2.7 性能验证分析

根据优化后的整合结果,对组合好的试剂盒进行性能评测:最低检测限,精密性,线性范围,回收率,热稳定性以及与法检的对比检测结果如下所示。

#### 2.7.1 最低检出限

按照相关检测技术要求,检测20次空值样本所得最低检测限浓度为1.80 ng/mL。

#### 2.7.2 精密性以及线性范围

精密性以及线性范围结果如表5所示。

根据图表可知,标准物质检测精密性 $CV < 10\%$ ,满足检测要求。各浓度点的检测浓度与实际浓度线性如图2所示, $R^2$ 为0.9993,线性关系较好,检测较为准确。

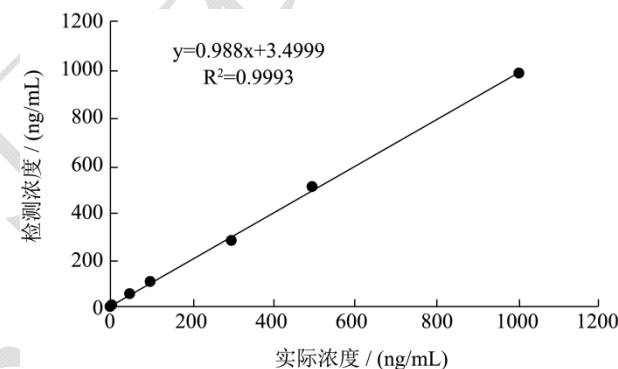


图2 检测浓度与实际浓度线性结果

Fig.2 Linear concentration comparison result

表5 精密性及线性结果

Table 5 Results of precision and linearity

实验次数	线性点浓度值/(ng/mL)							
	1000	500	300	100	50	10	2	
T/C值及反算浓度/(ng/mL)								
1	0.053	0.13	0.24	0.68	1.33	7.58	14.21	25.84
2	0.057	0.14	0.25	0.76	1.51	7.04	14.40	26.69
3	0.055	0.15	0.24	0.73	1.53	7.02	14.00	23.03
AV	0.055	0.14	0.24	0.72	1.46	7.21	14.20	25.19
SD	0.0019	0.0096	0.0051	0.039	0.11	0.317	0.19	1.91
CV/%	3.49	6.96	2.09	5.32	7.24	6.08	1.38	7.60
检测浓度	987.52	512.31	285.45	107.36	63.57	8.56	4.71	1.98

#### 2.7.3 回收率

分别将浓度为10、100、500 ng/mL的低、中、高值恩诺沙星标准物质溶液添加到黑鱼空白样品中,作为阳性的添加样本进行添加回收实验,考察试剂盒的

回收率以及整体回收率。

根据结果可知整体回收率在85.16%~115.38%之间,在可接受范围内,检测较为准确,说明建立的检测方法较为科学。

表 6 回收实验结果

Table 6 Results of recovery experiment

项目	检测浓度/(ng/mL) (n=10)		
	低值质控 10 ng/mL	中值质控 100 ng/mL	高值质控 500 ng/mL
	9.87	89.77	514.77
	8.85	103.28	529.84
	9.35	85.76	472.92
	11.25	112.74	484.63
	11.55	107.58	552.74
	9.54	110.25	462.93
	9.62	95.33	533.73
	10.72	98.53	467.68
	10.32	84.62	459.28
	10.28	114.84	554.14
平均值	10.14±1.41	100.27±15.38	503.27±50.87
回收率/%	85.5~111.5	85.16~115.38	89.17~108.14
整体回收率/%	85.16%~115.38%		

### 2.7.4 热稳定性

根据稳定后工艺制作一批试剂盒，保存条件分别为 4 °C 对照组，37 °C 保存 3 d、37 °C 保存 6 d，37 °C 保存 10 d 为实验组，进行热加速破坏实验，热稳定性结果如表 7 所示。由数据可知，热加速实验中，各实验组最低检出限、线性以及质控品检测值均在可控范围内，热加速可稳定在 10 d 以内，根据换算 4 °C 可稳定保存 1 年<sup>[12]</sup>。

表 7 稳定性考核结果

Table 7 Results of stability assessment

实验条件	最低检出限 (ng/mL)	R <sup>2</sup>	质控品检测值/(ng/mL)	
			低值 10 ng/mL	高值 500 ng/mL
4 °C	1.52	0.9992	9.62	490.28
37 °C 3 d	1.36	0.9987	10.73	525.58
37 °C 6 d	1.62	0.9881	11.11	554.27
37 °C 10 d	1.84	0.9832	11.48	576.91

### 2.7.5 相关性

选用液相色谱法作为参比方法，对 110 个样本同时进行液相色谱法和本方法的对比检测，其结果如图 3 所示，相关系数为 0.98，相关性较好，证明本方法定量检测性能可满足要求。与传统胶体金试剂盒相比，量子点试纸条具有更高的检测灵敏度和更强的稳定性，可实现恩诺沙星的定量分析。市面上的部分胶体金试剂盒为减少胶体金颜色变化不明显、灵敏度低等缺点对检测带来的影响，需要 SPE 小柱等装置进行固相萃取的前处理步骤，检测时间通常在 40 min 以

上。本方法仅需简单的均质、离心处理即可上样检测，整个检测过程可控制在 20 min 以内并可定量检测恩诺沙星的含量，较传统的胶体金试剂盒也有一定的检测优势。

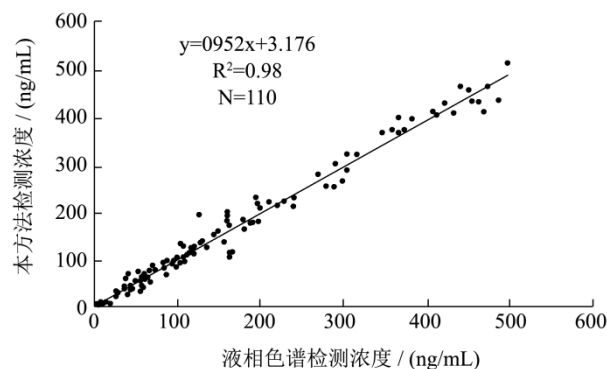


图 3 本方法与参比方法对比测定结果

Fig.3 Comparison of measurement results between this method and the reference method

## 3 结论

恩诺沙星作为一种喹诺酮类兽用专药，应用较为广泛，在近期的各省、市、国抽通报中，包括禽畜肉、鸡蛋在内，尤其是水产项目多次查出恩诺沙星超标，引起了各方面的重视。结合市场抽查情况，多个地区已将恩诺沙星做为专项检测项目，急需研发和采用具体有效的检测手段来满足快速精准的实时大批量现场检测的实际需求<sup>[13,14]</sup>。本研究采用新型的纳米荧光材料量子点材料作为示踪物质，将量子点灵敏度高、荧光稳定性强和免疫层析简便快捷、背景值低的优点相结合，进行了前处理试剂方法、抗体标记技术、NC 膜固着技术、定量检测等检测相关的技术配适和研究，并对整体的试剂盒进行的浓度和试剂的优化，对检测性能进行的研究和验证，本研究检测方法性能较为优越，检测时间 20 min 以内，且操作简单，人员要求低且定量检测准确，与液相色谱仪器检测相关系数为 0.98，能满足大批量现场快速检测的要求。在技术方面，国内对荧光纳米材料量子点与恩诺沙星等抗生素的食品检测项目技术配适以及食品基质配适方面研究较少，具有一定的创新性。本研究拟以恩诺沙星量子点检测方法为基础导向，后期逐步建立喹诺酮类量子点免疫层析检测项目平台，以及将量子点运用于更多种兽药残留、农药残留的检测项目中，推动食品快速检测相关技术的发展。

## 参考文献

[1] Trouchon T, Lefebvre S. A review of enrofloxacin for veterinary use [J]. Open Journal of Veterinary Medicine, 2016,

- 6(2): 40-58.
- [2] Wegener H C, Watts J L, Salmon S A, et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus hyicus* isolated from exudative epidermitis in pigs [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 32(3): 793
- [3] Ellerbrock R E, Canisso I F, Roady P J, et al. Diffusion of enrofloxacin to pregnancy fluids and effects on fetal cartilage after intravenous administration to late pregnant mares [J]. *Equine Veterinary Journal*, 2018, 51(4): 48-55
- [4] Panzenhagen P H N, Aguiar W S, Gouv A R, et al. Investigation of enrofloxacin residues in broiler tissues using ELISA and LC-MS/MS [J]. *Food Additives & Contaminants*, 2016, 33(4): 639-643
- [5] 李诗洁, 生威, 王俊平, 等. 量子点标记免疫亲和凝胶柱快速检测动物组织中恩诺沙星[J]. *中国食品学报*, 2018, 18(10): 229-233
- LI Shi-jie, SHENG Wei, WANG Jun-ping, et al. Rapid detection of the enrofloxacin reduce in animal tissues using immunophilic gel column of quantum dots tags [J]. *Chinese Journal of Food*, 2018, 18(10): 229-233
- [6] 丁乔棋, 李丽, 范文韬, 等. 基于新型量子点荧光微球的氯霉素免疫层析试纸条的制备和应用[J]. *分析化学*, 2017, 11: 105-112
- DING Qiao-Qi, LI Li, FAN Wen-Tao, et al. Development of quantum dot submicrobeads-based fluorescent immunochromatographic test strip for rapid detection of chloramphenicol [J]. *Analytical Chemistry*, 2017, (11): 105-112
- [7] 张鑫磊, 隋建新, 陈静, 等. 水产品中恩诺沙星胶体金免疫层析毛细管检测及其前处理[J]. *食品科学*, 2017, 22: 329-336
- ZHANG Xin-lei, SUI Jian-xin, CHEN Jing, et al. Development of a nano-gold capillary immunochromatographic assay and comparison of different sample pretreatments for detection of enrofloxacin in aquatic products [J]. *Food Science*, 2017, 22: 329-336
- [8] 杨昉, 王作欢, 蒋小武, 等. 基于量子点标记的赭曲霉毒素 A 快速、高灵敏荧光免疫层析检测方法的建立及应用[J]. *菌物学报*, 2019, 38(6): 79-84
- YANG Dan, WANG Zuo-huan, JIANG Xiao-wu, et al. Rapid and sensitive detection of ochratoxin a by using a quantum dots-based immunochromatographic assay [J]. *Journal of Strains*, 2019, 38(6): 79-84
- [9] ZHANG C, CUI H, HAN Y, et al. Development of a biomimetic enzyme-linked immunosorbent assay based on molecularly imprinted polymers on paper for the detection of carbaryl [J]. *Food Chemistry*, 2017, 240: 893-897
- [10] 陈泓序, 屈锋. 毛细管电泳技术在单克隆抗体药物分析中的应用[J]. *色谱*, 2018, 36(3): 195-208
- CHEN Hong-xu, QU Feng. Applications on therapeutic monoclonal antibody analysis by capillary electrophoresis [J]. *Chromatography*, 2018, 36(3): 195-208
- [11] 彭鹏. 硝基咪唑类兽药胶体金免疫层析检测方法研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2016
- PENG Peng. Study of the colloidal gold-basic immunochromatographic assay for the detection of nitrofurans [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2016
- [12] 宋翠翠, 李昕, 卢菲, 等. 25-羟基维生素 D 化学发光检测试剂盒的研发[J]. *生物学杂志*, 2017, 34(5): 108-112
- SONG Cui-cui, LI Xin, LU Fei, et al. The development of chemiluminescent immunoassay detection kit for 25-hydroxy vitamin D [J]. *Journal of Biology*, 2017, 34(5): 108-112
- [13] Zikowski H, Jaroszewski J, Malanka T, et al. Influence of oral co-administration of a preparation containing calcium and magnesium and food on enrofloxacin pharmacokinetics [J]. *Research in Veterinary Science*, 2014, 97(1): 99-104
- [14] WANG Y, YANG Y, NIU R, et al. Development and application of an immunoaffinity column clean-up for enrofloxacin determination in food samples [J]. *Food & Agricultural Immunology*, 2017, 28(2): 248-259