

胶体金免疫层析法定量检测鱼和虾中苯巴比妥残留

黄佳佳¹, 李燕杰¹, 梁志理¹, 杨慧晴², 雷洪涛³, 徐振林³

(1. 广东食品药品职业学院, 广东广州 510520) (2. 广东省绿色产品认证检测中心有限公司, 广东广州 510440)
(3. 华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 建立了一种快速定量检测水产品鱼和虾中苯巴比妥残留的胶体金免疫层析方法。采用胶体金纳米粒标记苯巴比妥单克隆抗体, 研究了胶体金免疫层析条件如标记体系 pH 值、标记抗体浓度、检测 T 线包被原浓度、质控 C 线羊抗鼠 IgG 浓度、样品前处理方法等对胶体金灵敏度的影响, 并借助胶体金试纸条读数仪进行定量检测。结果表明: 方法检出限为 0.07 ng/mL, 线性范围 0.08~0.94 ng/mL, 裸眼消线值 (cut-off 值) 为 10.0 ng/mL。方法特异性良好, 与巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥三种结构类似物交叉反应率小于 10%。选择罗非鱼、草鱼、鲈鱼和虾进行添加回收试验, 样品回收率在 73.50%~114.17% 之间, 相对标准偏差小于 15%, 且结果与 UPLC-MS/MS 法一致。该方法具有准确、灵敏、简便、快速等特点, 非常适用于水产品鱼和虾中苯巴比妥残留现场快速筛查。

关键词: 苯巴比妥; 胶体金免疫层析; 定量检测; 鱼; 虾

文章编号: 1673-9078(2020)07-313-320

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.7.0304

Development of a Colloidal Gold Immunochromatographic Assay for the Quantitative Determination of Phenobarbital Residues in Fish and Shrimp

HUANG Jia-jia¹, LI Yan-jie¹, LIANG Zhi-li¹, YANG Hui-qing², LEI Hong-tao³, XU Zhen-lin³

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

(2. Guangdong Test Center for Green Labelling Co., Ltd, Guangzhou 510440, China)

(3. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, a colloidal gold immunochromatography assay for the quantitative determination of phenobarbital residue in fish and shrimp was developed. Anti-phenobarbital monoclonal was labelled with colloidal gold nanoparticles as tracers. The assay conditions, including pH value of labelling, concentrations of antibody for labeling, concentration of the coating antigen (T line) and the goat-anti-mouse IgG (C line), as well as the sample pretreatment were optimized. By using a colloidal gold strip reader, the assay was able to achieve quantitative determination of phenobarbital. Under the optimal condition, the assay showed a limit of detection and detection range were 0.07 ng/mL and 0.08~0.94 ng/mL, respectively. The cut-off value by naked eyes was 10.0 ng/mL. The cross-reaction rates with barbital, pentobarbital and amobarbital were less than 10%, indicating a good specificity of the proposed assay. Recovery test was done by using tilapia, grass carp, perch and shrimp sample and the recoveries ranged from 73.50% to 114.17% with RSDs below 15%. The results had a good agreement with those of UPLC-MS/MS. In conclusion, the proposed assay was accurate, sensitive, convenient and rapid. It can be suitable for rapid screening of phenobarbital residues in aquatic products of fish and shrimp.

Key words: phenobarbital; colloidal gold immunochromatography; quantitative detection; fish; shrimp

引文格式:

黄佳佳, 李燕杰, 梁志理, 等. 胶体金免疫层析法定量检测鱼和虾中苯巴比妥残留[J]. 现代食品科技, 2020, 36(7): 313-320

HUANG Jia-jia, LI Yan-jie, LIANG Zhi-li, et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic assay for the quantitative determination of phenobarbital residues in fish and shrimp [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(7): 313-320

收稿日期: 2020-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31801667); 广东省普通高校重点研究项目 (2019KJDXM002); 广东省普通高校青年创新人才类项目 (2019GKQNCX063); 广东食品药品职业学院科研项目 (2017ZR024); 广东食品药品职业学院大学生创新创业训练计划项目 (2018DC06)

作者简介: 黄佳佳 (1985-), 女, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 徐振林 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量与安全

苯巴比妥 (Phenobarbital) 属于巴比妥类安眠镇静药物。在畜牧业生产中被添加在饲料中, 以减少动物的运动量和营养消耗, 达到快速增肥增重的效果^[1]。然而苯巴比妥在动物体内具有蓄积性, 若在动物食用组织中残留量大, 将给食用者的健康及生命安全带来极大威胁^[2]。世界各国均严禁苯巴比妥用于食品动物^[3]。我国在《中华人民共和国农业部公告第 176 号》中已经禁止其在饲料和动物饮用水中使用。然而早期有发现苯巴比妥被用于辅助活鱼运输, 将活鱼饲养于含一定浓度苯巴比妥水中或直接肌肉注射^[4], 可麻醉活鱼但不导致死亡; 也被用于活鱼苗运输过程以降低死亡率, 提高经济效益^[5]。目前国家尚未出台动物组织中苯巴比妥测定的相关标准。动物性水产品是人民生活主要消费产品, 因此, 有必要建立水产品中苯巴比妥残留检测方法, 对其食用组织安全性实施有效监控。

目前用于检测苯巴比妥的方法主要有大型仪器如高效液相色谱法^[6-8]、超高效液相色谱法^[9,10]、液相色谱-质谱联用法^[11,12]、气相色谱-质谱法^[2,13], 毛细管电泳法^[14], 荧光分析法^[15]。基于抗原抗体特异性结合反应的免疫分析快速检测方法也在不断开发。其中胶体金免疫层析法 (Colloidal gold immunochromatography assay, GICA) 操作简便快速、灵敏度高、检测通量高, 被广泛应用于食品安全快速筛查检测^[16-18]。王江录^[19]开发的胶体金试纸条可检测 10 种保健食品原料中的苯巴比妥, 检测限为 30 ng/mL。2019 年我国市场监管总局发布的公告 (2019 年第 41 号) 中, 保健食品中苯巴比妥胶体金免疫层析法方法检测限为 40 mg/kg。目前已建立的胶体金免疫分析方法多集中在饲料和猪尿^[20]以及保健食品原料中, 针对水产品中残留苯巴比妥胶体金免疫层析定量检测方法鲜有报道。本研究主要以市场常见易购的鲜活水产品罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 和刀额新对虾 (*Metapenaeus*) 等样品为研究对象, 优化样品前处理过程及胶体金免疫层析检测条件, 建立适用于测定水产品鱼和虾中苯巴比妥的胶体金免疫层析检测方法, 同时借助免疫层析读数仪, 实现样品中苯巴比妥含量定量分析。为进一步研制适用于现场鲜活水产品中残留苯巴比妥的快速检测产品提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜 (NC 膜)、吸水

垫和 PVC 底板, 上海金标生物技术有限公司; 样品垫处理液和金标复溶液, 广州万联生物科技有限公司; 金纳米粒子、苯巴比妥包被原、单克隆抗体 (参考文献^[20], 抗体亲和力 6.03×10^9 L/mol, 抗体亚型为 IgG1), 实验室自制; 羊抗鼠 IgG, 天津三箭生物技术有限公司; 苯巴比妥, 萨恩化学技术 (上海) 有限公司; 巴比妥、扑米酮, 美国 CATO 公司; 戊巴比妥、异戊巴比妥, 美国 Cerilliant 公司; 罗非鱼、草鱼、鲈鱼和刀额新对虾 (沙虾) 均购于本地市场; 其余试剂均为分析纯。

HGS510 划膜喷金标仪、HGS210 高速切条机, 杭州峰航科技有限公司; X1R 高速冷冻离心机, Thermo Fisher 公司; MD-100 金标荧光二合一免疫检测仪 (读数仪), 南京微测生物科技有限公司; 1290 Infinity II 超高效液相色谱仪、6470 Triple Quad LC/MS 三重四极杆质谱仪, 美国 Agilent 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胶体金制备

取 100 mL 双蒸水, 持续搅拌且加热至沸腾后, 加入 4.0 mL 1.0% 的氯金酸溶液, 待溶液再次沸腾, 加入 1.0% 柠檬酸三钠水溶液 4.5 mL, 继续搅拌加热 10 min 直至溶液呈透亮的红色。室温冷却, 用双蒸水恢复至 100 mL, 4℃ 保存备用。

1.2.2 最适标记胶体金 pH 值确定

分别向 1.0 mL 胶体金溶液中加入 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液 5.0、10.0、15.0、20.0、25.0 μ L, 混匀后加入适量抗体, 静置 10 min。加入 20.0 μ L 20% 的 BSA 混匀静置 15 min。4℃, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 使用金标抗体复溶液 200 μ L 进行复溶。

1.2.3 最适标记抗体浓度

在已确定的 pH 值条件下, 分别向 1.0 mL 胶体金中加入苯巴比妥抗体 (IgG 为 1.56 mg/mL) 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 μ L, 终浓度分别为 1.56、3.12、4.68、6.24、7.80 μ g/mL。静置 10 min。加入 20.0 μ L 20% 的 BSA 混匀静置 15 min。4℃, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 使用金标抗体复溶液 200 μ L 进行复溶。

1.2.4 胶体金免疫层析法的建立

1.2.4.1 试纸条组装和金标抗体微孔制备

取适量苯巴比妥包被原和羊抗鼠 IgG, 使用喷金仪以 0.80 μ L/cm 的喷量喷涂于 NC 膜上, 分别作为检测 T 线和质控 C 线, T 线和 C 线的间距为 8 mm。将包被好的 NC 膜置于 37℃ 干燥箱中静置过夜。在底板 (PVC 板) 上依次粘贴样本垫、烘干 NC 膜、吸水垫, 并切成 3.0 mm 宽的试纸条。将金标抗体按每孔 3.0 μ L

铺于微孔板中,振荡均匀,37℃过夜烘干备用。

1.2.4.2 检测步骤和结果判定

取100 μL 0.02 mol/L PB 缓冲液或样品提取液加入金标微孔中吹打混匀,孵育3 min后,将试纸条插入微孔中反应5 min。裸眼结果判定:T线和C线显色接近判定为阴性;T线显色浅于C线判定为弱阳性;T线不显色C线显色判定为强阳性;C线不显色判定为试纸条失效(图1)。通过读数仪测定,建立标准曲线,对样品中苯巴比妥含量进行测定。

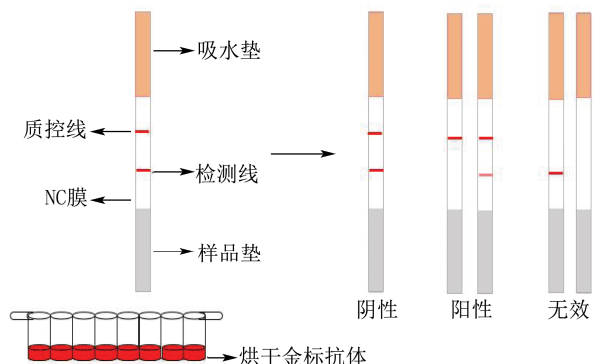


图1 胶体金免疫层析检测结果判定示意图

Fig.1 Schematic diagram of Colloidal gold immunochromatography strip

1.2.4.3 T线检测浓度优化

在已确定的抗体标记 pH 值和浓度条件下,将苯巴比妥包被原分别以 0.83、0.66、0.55、0.44 mg/mL 喷涂于 NC 膜的 T 线上,0.10 mg/mL 羊抗鼠 IgG 喷涂 NC 膜的 C 线,37℃包被过夜。按 1.2.4.2 步骤,分别对阴性(0.02 mol/L PB 缓冲液)和阳性(0.4 ng/mL 苯巴比妥溶液)进行检测。使用读数仪测定,选择阴性时 T 线和 C 线显色明显且 T/C 值≈1.0,阳性抑制率高的 T 线检测条件。

1.2.4.4 C线检测浓度优化

在已确定的抗体标记 pH 值和浓度条件下,将 0.66 mg/mL 苯巴比妥包被原分别喷涂于 NC 膜的 T 线上,羊抗鼠 IgG 以 0.17、0.13、0.10、0.08 mg/mL 喷涂 NC 膜的 C 线,37℃包被过夜。按 1.2.4.2 步骤,分别对阴性(0.02 mol/L PB 缓冲液)和阳性(0.4 ng/mL 苯巴比妥溶液)进行检测。使用读数仪测定,选取阴性时 T 线和 C 线显色明显且 T/C 值≈1.0,阳性抑制率高的 C 线检测条件。

1.2.4.5 抑制率

采用读数仪分别读取胶体金免疫层析试纸条上 T 线和 C 线的信号值进行计算。抑制率按公式(1)计算, B_x 为阳性样品 T 线和 C 线信号强度比值, B_0 为阴性样品 T 线和 C 线信号强度比值。

$$\text{抑制率}(\%) = 1 - \frac{B_x}{B_0} \quad (1)$$

1.2.5 样品前处理优化

本试验所有样品,均购自本地农贸市场。罗非鱼、草鱼和鲈鱼每批均购3条或以上,刀额新对虾(沙虾)每批购20只以上,所有样品分别取其食用组织,绞肉机绞碎,待用。

1.2.5.1 提取溶剂

对比乙酸乙酯、乙腈和无水甲醇提取效果。取空白及加标 0.4 ng/g 匀浆罗非鱼肉 2.0 g,分别加入 2.0 mL 提取溶剂,振荡 5 min,室温下 4000 r/min 离心 5 min。取 1.0 mL 上层有机相,氮吹仪 50℃吹干,加入 0.02 mol/L PB 缓冲液 1.0 mL 涡旋混匀复溶,再加入正己烷 1.0 mL 涡旋混匀除脂,室温静置或 4000 r/min 离心 2 min。弃上层有机相,取下层溶液用于检测。

1.2.5.2 提取时间

取空白及加标 0.4 ng/g 匀浆罗非鱼肉 2.0 g,各加入 2.0 mL 乙酸乙酯,分别振荡 3 min,5 min 和 7 min。室温下 4000 r/min 离心 5 min。取 1.0 mL 上层有机相,氮吹仪 50℃吹干,加入 0.02 mol/L PB 缓冲液 1.0 mL 涡旋混匀复溶,再加入正己烷 1.0 mL 涡旋混匀除脂,室温静置或 4000 r/min 离心 2 min。弃上层有机相,取下层溶液用于检测。

1.2.6 试纸条的性能评价

1.2.6.1 灵敏度

使用 0.02 mol/L PB 溶液配制系列标准品溶液(0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、10.0、20.0 ng/mL),以优化试纸条检测条件进行测定并使用读数仪采集结果。以苯巴比妥标准溶液浓度为横坐标, B_x/B_0 为纵坐标绘制标准曲线。检出限通过 20 个阴性样品检测平均值减去 3 倍标准偏差计算^[21]。

1.2.6.2 特异性

使用 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液将巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥和扑米酮标准品配制成 0、0.1、1.0、5.0、10.0、100.0、1000.0 ng/mL 的系列标准浓度,按 1.2.4.2 步骤检测,使用读数仪进行测定。交叉率反应率 CR(%)按公式(2)计算,评价抗体特异性。

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}(\text{苯巴比妥})}{IC_{50}(\text{交叉药物})} \times 100\% \quad (2)$$

1.2.6.3 实际样品检测

对阴性罗非鱼、草鱼、鲈鱼及虾进行苯巴比妥添加回收试验。线性检测范围中选择三个不同添加浓度 0.2、0.4、0.8 ng/g,曲线范围以外至胶体金裸眼消线值之间(3.2~10.0 ng/mL)两个浓度 5.0、8.0 ng/g,用

本实验所优化的样品前处理方法和胶体金免疫层析方法测定。并将结果与 UPLC-MS /MS 方法检测结果比较。

1.2.7 数据处理

使用 Excel 2013 软件处理数据,所有实验均重复 3 次。使用 Origin 9.0 进行标准曲线拟合作图,以及检出限、线性范围及 IC_{50} 值计算。

2 结果与讨论

2.1 胶体金的鉴定

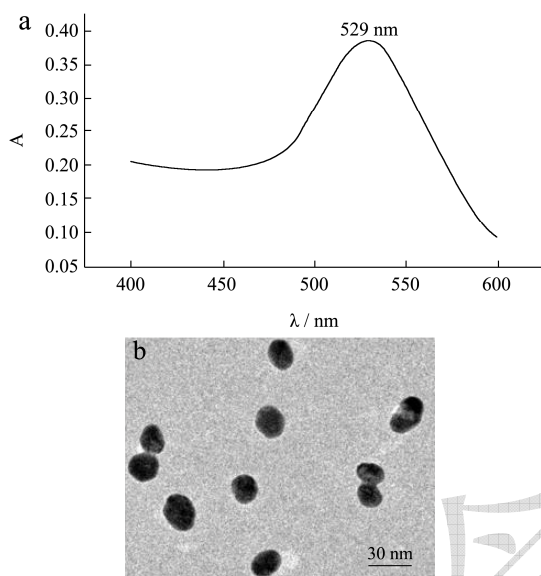


图2 胶体金颗粒性质

Fig.2 Properties of colloidal gold nanoparticles

注: a: 紫外吸收光谱; b: 透射电镜图。

经紫外扫描,本实验所制备的胶体金溶液最大吸收波长为 529 nm,最大吸收峰峰宽较窄,说明制备的胶体金颗粒均匀。金纳米粒径为 30~40 nm 之间最适合应用于胶体金免疫层析检测^[22]。通过透射电镜扫描,本实验所制备的胶体金平均粒径为 30 nm,适合用于抗体标记。

2.2 标记胶体金最佳 pH 和抗体浓度

抗体标记过程胶体金溶液 pH 值影响结合效率和抗体活性^[23]。但由于金粒子易损坏普通 pH 计电极^[24],本实验采用不同体积的 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液调节标记过程胶体金溶液 pH 值。如图 3a 所示,随着 K_2CO_3 溶液使用量增加,金标抗体的颜色由蓝紫色变为酒红色,通过同样条件检测 (T 线 0.66 mg/mL, C 线 0.10 mg/mL, 阴性为 0.02 mol/L PB 缓冲液,阳性为 10.0 ng/mL 苯巴比妥溶液),选择阴性 T 线显色明显,阳性 T 线褪色明显的条件。如图 3b,选择 1.0 mL 胶体

金溶液中加入 0.2 mol/L 的 K_2CO_3 溶液 15.0 μ L。

抗体标记浓度影响胶体金试纸条检测效果。在 1.0 mL 胶体金中加入不同体积苯巴比妥抗体,通过同样条件检测 (同上),由图 3c 可知,标记的抗体加入体积小于 4.0 μ L 时阴性 T 线显色不明显,当抗体加入量为 4.0 μ L 和 5.0 μ L 时阴性 T 线均显色明显,且阳性 T 线褪色明显。当 T 线和 C 线显色明显,抗体用量越少, T 线上包被的抗原与待测物质的竞争越激烈,免疫层析试纸条检测的灵敏度越高^[25]。实验中标记抗体使用量 4.0 μ L 能满足检测要求且后期实验中稳定性良好,因此选择 1.0 mL 胶体金溶液中加入 4.0 μ L 抗体,即 6.24 μ g/mL 进行标记。

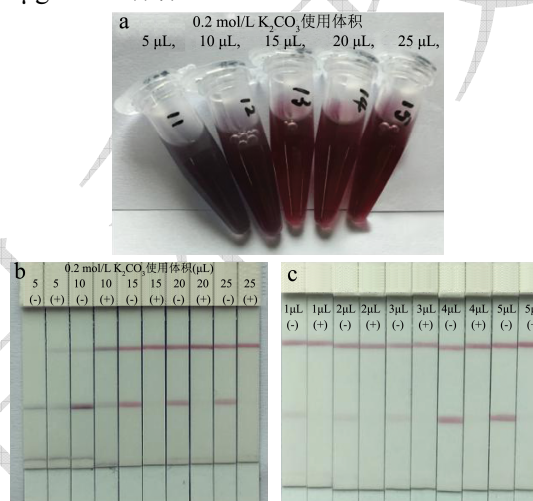


图3 胶体金标记抗体条件优化

Fig.3 Optimization of colloidal gold labeling conditions

注: a: 不同 pH 值胶体金标抗体溶液; b: 不同 pH 值胶体金标抗体检测结果; c: 抗体标记浓度优化。

2.3 T 线和 C 线包被浓度优化

随着包被原浓度的下降,肉眼观察阴性试纸条 T 线颜色逐渐下降,使用读数仪测定,阴性的 T/C 值及抑制率呈现先上升逐渐下降趋势 (图 4a)。包被浓度为 0.55 mg/mL 阴性 T/C 值为 0.998,抑制率为 53.56%;包被浓度为 0.66 mg/mL 时阴性 T/C 值为 1.07,抑制率为 51.71%,且肉眼观察阴性试纸条 T 线较明显。故选择 0.66 mg/mL 为 T 线检测浓度。

在最佳 T 线检测浓度下,对 C 线检测浓度进行优化,随着羊抗鼠 IgG 稀释倍数的增大,肉眼观察阴性试纸条 C 线颜色逐渐下降,在 0.08 mg/mL 时显色不明显。使用读数仪测定,阴性的 T/C 值先下降后上升,抑制率先上升后下降 (图 4b)。相比较 C 线检测浓度 0.13 mg/mL, 0.10 mg/mL 时 T/C 值更接近 1.0,抑制率较高。故选择 0.10 mg/mL 为 C 线检测浓度。

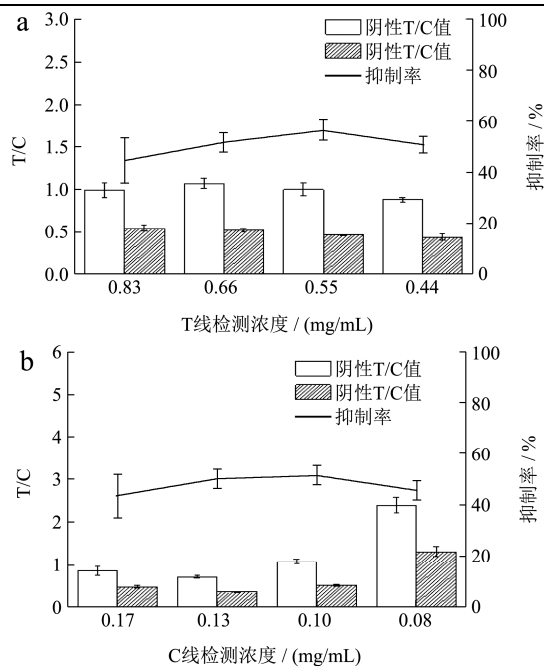


图4 检测条件优化结果

Fig.4 Optimization of experimental conditions

注: a: T 线检测浓度优化; b: C 线检测浓度优化。

2.4 样品前处理优化

2.4.1 提取溶剂

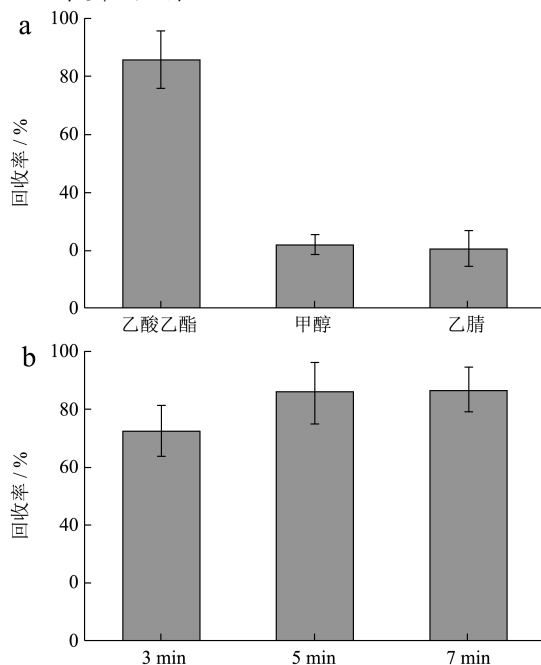


图5 样品前处理优化

Fig.5 Optimization of extracting conditions

注: a: 提取溶剂; b: 提取时间。

使用 0.02 mol/L 的 PB 缓冲液、乙酸乙酯、无水甲醇和乙腈提取样品。PB 缓冲液直接提取的样品液基质干扰大, 阴性样品 T 线显色不明显。对比三种有机溶剂, 无水甲醇和乙腈提取的阴性罗非鱼样品液基质

干扰较大, T 线显色较浅, 且加标 0.4 ng/g 的样品提取率均低于 30% (图 5a), 乙酸乙酯提取效果较好, 基质干扰小, 与戴晓欣等^[6]实验结果相似。试纸条检测显示阴性样品 T 线和 C 线显色明显, T/C 值接近 1.0, 罗非鱼样品添加回收率高于 75%。

2.4.2 提取时间

使用乙酸乙酯为提取溶剂, 分别对比振荡 3 min、5 min 和 7 min 时加标 0.4 ng/g 罗非鱼肉提取效果, 由图 5b 可知, 振荡 3 min 样品回收率为 70%左右, 当提取时间为 5 min 以上时回收率可达 85%。提取时间延长样品添加回收率偏差较小。为保证苯巴比妥的提取效果且控制处理时间适用于快速检测的特点, 确定样品提取时间为 5 min。

2.4.3 样品基质干扰试验

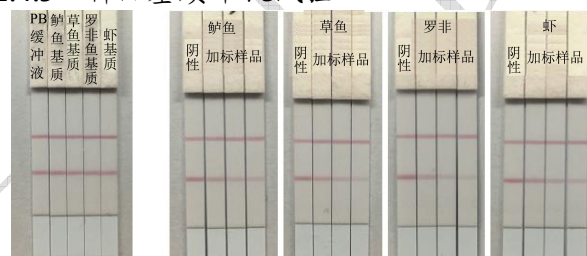


图6 阴性样品基质和加标样品检测

Fig.6 Test of negative sample matrix and spiked samples

使用上述优化方法对阴性的草鱼、鲈鱼和虾进行样品前处理, 验证不同样品基质对试纸条检测结果的影响, 如图 6 所示。各空白样品 T 线和 C 线颜色接近 (T/C 值 $\approx$ 1.0), 且与加标样品区分明显。优化的样品前处理方法可减少样品基质的干扰, 同时空白基质测定结果与缓冲液接近。

基于此, 使用乙酸乙酯提取样品, 氮气吹干, 再使用 PB 缓冲液进行样品复溶检测, 可以消除样品基质干扰。

2.5 试纸条性能评价

2.5.1 灵敏度

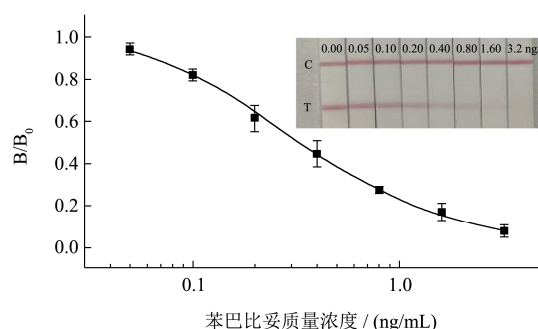


图7 苯巴比妥胶体金免疫层析标准曲线

Fig.7 Standard curve of the GICA of Phenobarbital

在优化条件下进行检测, 确定苯巴比妥试纸条裸

眼消线值 (cut-off 值) 为 10.0 ng/mL, 灵敏度高于目前已报道的苯巴比妥胶体金试纸条^[19]。使用读数仪采集 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 ng/mL 系列标准品浓度下胶体金试纸条 T/C 值, 通过 origin 9.0 拟合绘制曲线 (图 7), 所得方法检出限为 0.07 ng/mL, 线性范围 (IC₂₀~IC₈₀) 为 0.08~0.94 ng/mL, IC₅₀ 为 0.28 ng/mL。

2.5.2 特异性

表 1 交叉反应率

Table 1 The detection of the cross-reactivity (n=3)

药物	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应率/%
苯巴比妥 Phenobarbital	0.28	100
巴比妥 Barbitol	15.34	1.83
戊巴比妥 Pentobarbital	10.27	2.73
异戊巴比妥 Amobarbital	5.70	4.91
扑米酮 Primidone	>1000	<0.01

表 2 样品添加回收检测结果

Table 2 Recoveries of spiked samples (n=3)

样品	添加量/(ng/g)	GICA			UPLC-MS/MS		
		检测值/(ng/g)	回收率/%	RSD/%	检测值/(ng/g)	回收率/%	RSD/%
罗非	0.20	0.20±0.02	97.83	8.18	-	-	-
	0.40	0.36±0.03	89.75	9.42	-	-	-
	0.80	0.78±0.07	97.13	8.06	-	-	-
	5.00	3.68±0.20	73.50	5.56	4.90±0.11	98.00	2.15
	8.00	7.22±0.73	90.21	10.14	7.65±0.32	95.62	4.15
草鱼	0.20	0.19±0.03	95.33	14.00	-	-	-
	0.40	0.34±0.04	84.17	10.92	-	-	-
	0.80	0.71±0.1	88.42	13.86	-	-	-
	5.00	4.88±0.26	97.50	5.43	5.70±0.45	113.97	7.83
	8.00	6.40±0.13	80.00	2.07	8.48±1.03	106.00	12.18
鲈鱼	0.20	0.21±0.02	104.67	11.84	-	-	-
	0.40	0.34±0.05	85.42	13.39	-	-	-
	0.80	0.66±0.03	82.33	4.51	-	-	-
	5.00	5.33±0.42	106.67	7.93	5.19±0.09	103.77	1.74
	8.00	6.77±0.96	84.58	14.22	7.29±0.29	91.07	4.04
虾	0.20	0.19±0.03	92.50	13.79	-	-	-
	0.40	0.46±0.04	114.17	8.63	-	-	-
	0.80	0.67±0.07	83.46	10.56	-	-	-
	5.00	4.38±0.52	87.67	12.02	4.57±0.59	91.48	12.98
	8.00	6.40±0.73	80.00	11.38	7.65±0.61	95.58	8.03

注: a 为低于定量限。

3 结论

本实验建立了快速定量检测水产品中苯巴比妥的胶体金免疫层析方法, 并对样品前处理过程进行优化。

按 1.2.4.2 步骤检测, 使用 Origin 9.0 拟合, 得到巴比妥类药物的 IC₅₀ 和交叉反应率如表 1 所示。本方法与扑米酮无交叉反应, 与其它三种结构类似药物交叉反应率小于 10%, 方法特异性良好。

2.5.3 实际样品检测

UPLC-MS/MS 检测参考 Tian 等^[12]的方法, 实际样品检测苯巴比妥定量限为 10.0 ng/g, 因此仅选取加标浓度为 5.0 ng/g 和 8.0 ng/g 的样品进行方法比对。样品提取液浓缩后进行 UPLC-MS/MS 测定, 稀释后进行胶体金免疫层析定量检测。

如表 2 所示, 胶体金免疫层析法检测样品添加回收率在 73.50%~114.17%之间, RSD<15%。5.0 ng/g 和 8.0 ng/g 检测结果与 UPLC-MS/MS 检测基本一致, 表明所建立的胶体金免疫层析检测方法准确可靠, 可应用于水产品中苯巴比妥残留检测。

结合免疫层析读数仪的测定, 得到方法检出限为 0.07 ng/mL, 线性范围 0.08~0.94 ng/mL, IC₅₀ 为 0.28 ng/mL。方法特异性良好, 与结构类似药物交叉反应率小于 10%, 在不具备读数仪的条件下可定性判断样品中苯

巴比妥药物残留情况。水产品食用组织使用乙酸乙酯振荡提取 5 min, 样品添加回收率在 73.50%~114.17% 之间, 相对标准偏差小于 15%, 与 UPLC-MS/MS 法检测结果基本一致。本方法操作简单快速、可定量, 检测过程约 25 min, 适用于水产品鱼和虾中苯巴比妥残留现场快速筛查。

参考文献

- [1] 张海棠,王自良,王艳荣.苯巴比妥在动物生产中的非法使用及毒性作用[J].山西农业科学,2008,36(4):29-31
ZHANG Hai-tang, WANG Zi-liang, WANG Yan-rong. Illegal use and safety evaluation of phenobarbital in animal production [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2008, 36(4): 29-31
- [2] 赵瑛博,关丽,周艳明.QuEChERS 结合气质联用法测定猪肉中苯巴比妥残留量[J].现代食品科技,2015,31(8):329-333
ZHAO Ying-bo, GUAN Li, ZHOU Yan-ming. Detecting phenobarbital residue in pork via the combination of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with quick-easy-cheap-effective-rugged-and-safe (QuEChERS) [J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(8): 329-333
- [3] 李桂平,张海棠,王自良.动物性食品中苯巴比妥残留检测研究进展[J].山西农业科学,2007,35(12):3-6
LI Gui-ping, ZHANG Hai-tang, WANG Zi-liang. Study on residues and measurement methods of phenobarbital in animal food [J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2007, 35(12): 3-6
- [4] 任洁.巴比妥钠盐类辅助活鱼运输方法[J].中国农村科技,2000,4:37
REN Jie. The use of sodium barbiturates assist to fish transportation [J]. China Rural Science and Technology, 2000, 4: 37
- [5] 陈鹏,范兴刚,张庭芳.中枢抑制药物苯巴比妥对鱼苗运输成活率的影响试验[J].贵州畜牧兽医,2012,36(6):66-68
CHEN Peng, FAN Xing-gang, ZHANG Ting-fang. Detection of the effect of phenobarbital on the survival rate of fish seedling in transportation [J]. Guizhou Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2012, 36(6): 66-68
- [6] 戴晓欣,朱新平,吴仕辉,等.固相萃取-高效液相色谱法测定水产品中的苯巴比妥[J].食品科学,2012,33(18):232-235
DAI Xiao-xin, ZHU Xin-ping, WU Shi-hui, et al. Determination of phenobarbital residues in fishery products by SPE-HPLC [J]. Food Science, 2012, 33(18): 232-235
- [7] Serralheiro A, Alves G, Fortuna A, et al. First HPLC-UV method for rapid and simultaneous quantification of phenobarbital, primidone, phenytoin, carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide,10,11-trans-dihydroxy-10,11-dihydrocarbamazepine, lamotrigine, oxcarbazepine and licarbazepine in human plasma [J]. Journal of Chromatography B, 2013, 925: 1-9
- [8] 王铁杰,韩东岐,鲁艺,等.HPLC 法同时测定安神类保健食品中 17 种添加的化学成分[J].药物分析杂志,2015,35(7):1223-1230
WANG Tie-jie, HAN Dong-qi, LU Yi, et al. HPLC determination of 17 additive chemical components in traditional Chinese medicines and health food [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2015, 35(7): 1223-1230
- [9] 林芳,李涛,李继,等.UPLC-DAD 法快速测定改善睡眠类保健食品中违法添加的 14 种精神药物[J].食品科学,2013,34(22):218-223
LIN Fang, LI Tao, LI Ji, et al. Rapid determination of 14 psychoactive drugs in sleep-improving health-care foods by ultra-high performance liquid chromatography-photodiode array detection [J]. Food Science, 2013, 34(22): 218-223
- [10] 鲁静,陈天朝.超高效液相色谱法测定血清中苯妥英钠、苯巴比妥和卡马西平的浓度[J].中国临床药理学杂志,2015,31(2):119-121
LU Jing, CHEN Tian-chao. Determination of phenytoin sodium, phenobarbital and carbamazepine in human serum by ultra performance liquid chromatography [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2015, 31(2): 119-121
- [11] 沈国芳,励炯,裘一婧,等.UPLC-MS/MS 法检测抗癫痫中成药中非法添加苯巴比妥和卡马西平[J].药物分析杂志,2014,34(1):146-150
SHEN Guo-fang, LI Jiong, QIU Yi-jing, et al. Detection of phenobarbital and carbamazepine illegally added in traditional Chinese anti-epileptic drugs by UPLC-MS/MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2014, 34 (1): 146-150
- [12] Tian H X, Zhou X X, Chen C, et al. Simultaneous determination of phenobarbital, pentobarbital, amobarbital and secobarbital in raw milk via liquid chromatography with electron spray ionization tandem mass spectrometry [J]. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 2017, 37(6): 847-854
- [13] 赵海香,杨素萍,刘海萍,等.微波辅助衍生化/气相色谱串联质谱同时测定猪肝与猪肾中 4 种巴比妥药物残留[J].分析测试学报,2012,31(12):1525-1530
ZHAO Hai-xiang, YANG Su-ping, LIU Hai-ping, et al. Determination of four barbiturates in pig liver and kidney by

- gas chromatography-tandem ion trap mass spectrometry with microwave assisted derivatization [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(12): 1525-1530
- [14] 谢华,贾正平,王荣,等.高效毛细管电泳法测定苯巴比妥片中苯巴比妥的含量[J].*医药导报*,2008,27(12):1500-1501
XIE Hua, JIA Zheng-ping, WANG Rong, et al. Determination the concentration of phenobarbital in phenobarbital tables by HPCE [J]. *Herald of Medicine*, 2008, 27(12): 1500-1501
- [15] 程定玺,杨璐,梁宇.荧光探针法快速检测苯巴比妥含量[J].*分析试验室*,2012,31(12):32-35
CHENG Ding-xi, YANG Lu, LIANG Yu. Rapid determination of phenobarbital content by fluorescent probe [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2012, 31(12): 32-35
- [16] Yao J J, Sun Y N, Li Q M, et al. Colloidal gold-McAb probe-based rapid immunoassay strip for simultaneous detection of fumonisins in maize [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017, 97(7): 2223-2229
- [17] Hu S R, Dou X W, Zhang L, et al. Rapid detection of aflatoxin B₁ in medicinal materials of radix and rhizome by gold immunochromatographic assay [J]. *Toxicon*, 2018, 150: 144-150
- [18] Guo L L, Wu X L, Liu L Q, et al. Gold immunochromatographic assay for rapid on-site detection of lincosamide residues in milk, egg, beef, and honey samples [J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 15(1): 1900174
- [19] 王江录.食品中苯巴比妥快速检测方法的研究[D].南昌:南昌大学,2015
- WANG Jiang-lu. The development of rapid detection of method for phenobarbital in food [D]. Nanchang: Nanchang University, 2015
- [20] 王自良.苯巴比妥残留免疫学快速检测技术研究[D].咸阳:西北农林科技大学,2006
WANG Zi-liang. Studies of immunological rapid determination of phenobarbital residues in animal food [D]. Xianyang: Northwest A&F University, 2006
- [21] Anfossi L, Baggiani C, Giovannoli C, et al. Optimization of a lateral flow immunoassay for the ultrasensitive detection of aflatoxin M₁ in milk [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 772(8): 75-80
- [22] Byzova N A, Smirnova N I, Zherdev A V, et al. Rapid immunochromatographic assay for ofloxacin in animal original foodstuffs using native antisera labeled by colloidal gold [J]. *Talanta*, 2014, 119: 125-132
- [23] Chen Y, Xin Y, Yang H L, et al. Immobilization and stabilization of cholesterol oxidase on modified sepharose particles [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2013, 56: 6-13
- [24] 胡淑荣.黄曲霉毒素 B₁ 胶体金免疫层析技术在中药中应用研究[D].长春:吉林农业大学,2018
HU Shu-rong. Application of aflatoxin B₁ colloidal gold immunochromatography in traditional Chinese medicine [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2018
- [25] Zhang D H, Li P W, Zhang Q, et al. Ultrasensitive nanogold probe-based immunochromatographic assay for simultaneous detection of total aflatoxins in peanuts [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26(6): 2877-2882

(上接第 288 页)

- [22] 杨欢,马有宁,秦美玲,等.氯虫苯甲酰胺和毒死蜱在水稻中的分布降解研究[J].*农业资源与环境学报*,2018,35(4):342-348
YANG Huan, MA You-ning, QIN Mei-ling, et al. Distribution and degradation of chlorantraniliprole and chlorpyrifos in rice [J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(4): 342-348
- [23] 应兴华,徐霞,杨仕华,等.水稻籽粒农药残留的品种间差异性[J].*中国水稻科学*,2011,25(2):227-230
YING Xing-hua, XU Xia, YANG Shi-hua, et al. Difference of pesticide residue in grains among rice cultivars [J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(2): 227-230
- [24] 陈振德,陈建美,韩明三,等.苹果果实中毒死蜱残留的品种间差异及套袋对毒死蜱残留的影响[J].*农业环境科学学报*, 2011,30(11):2197-2201
CHEN Zhen-de, CHEN Jian-mei, HAN Ming-san, et al. Difference of chlorpyrifos residue in fruits of various apple cultivars and bagging effect on the residue [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(11): 2197-2201