

动物源性食品中5类兽药残留的生物芯片试剂盒检测准确性评估

朱静怡¹, 陈泓帆², 汤迪朋³, 陆慧媛^{1*}, 沈伟健¹, 丁涛¹, 许丹科³

(1. 南京海关动植物与食品检测中心, 江苏南京 210019)(2. 南京医科大学公共卫生学院, 江苏南京 211166)(3. 南京祥中生物科技有限公司, 江苏南京 210022)

摘要: 该研究基于微阵列生物芯片试剂盒法评估了动物源性食品中多种兽药残留检测的结果准确性。使用微阵列生物芯片试剂盒法分别对鸡肉、鱼肉、猪肉、乳制品、蜂蜜5种动物源性食品基质中的喹诺酮类、四环素类、氟苯尼考、磺胺类和甲氧苄啶残留量进行测定, 考察生物芯片试剂盒法的检出限和定量限, 对结果进行准确性评估。结果显示, 该方法对5种食品基质中5类兽药残留的检出限和定量限均满足要求, 选用鱼肉、蜂蜜和乳制品3种基质加标进行检测, 5类兽药残留的加标回收率结果均在72.58%~119.87%之间, RSD均在0.21%~22.49%内, 与确证方法进行比较, 未出现假阳性或假阴性结果, 准确性较好。结果表明, 生物芯片试剂盒法检测速度快、成本低、结果准确可靠, 在动物源性食品多兽药残留同时筛检中具有广阔应用前景。

关键词: 生物芯片; 兽药残留; 动物源性食品; 评估

文章编号: 1673-9078(2024)09-333-345

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.9.1005

Evaluation of Accuracy of Biochip Kit for Detecting Five Types of Veterinary Drug Residues in Animal-derived Foods

ZHU Jingyi¹, CHEN Hongfan², TANG Dipeng³, LU Huiyuan^{1*}, SHEN Weijian¹, DING Tao¹, XU Danke³

(1.Nanjing Customs Animal, Plant and Food Inspection Center, Nanjing 210019, China)(2.Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)(3.Nanjing Xiangzhong Biotechnology Co. Ltd., Nanjing 210022, China)

Abstract: In the study, the accuracy of the detection results of multiple veterinary drug residues in animal-derived foods was evaluated based on the microarray biochip kit method. The microarray biochip kit method was used to determine the residues of quinolones, tetracyclines, florfenicol, sulfonamides, and trimethoprim in five animal-derived food matrices, including chicken, fish, pork, dairy products, and honey. The detection and quantification limits of the biochip kit method were examined, and the accuracy of the results was evaluated. The results showed that the detection limit and quantification limit of the 5 types of veterinary drug residues in the 5 food matrices all met the requirements. Three matrices including fish, honey, and dairy products were selected for spiking detection, and the spiked recovery rates of the 5 types of veterinary

引文格式:

朱静怡,陈泓帆,汤迪朋,等. 动物源性食品中5类兽药残留的生物芯片试剂盒检测准确性评估[J]. 现代食品科技, 2024,40(9):333-345.

ZHU Jingyi, CHEN Hongfan, TANG Dipeng, et al. Evaluation of accuracy of biochip kit for detecting five types of veterinary drug residues in animal-derived foods [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(9): 333-345.

收稿日期: 2023-08-25

基金项目: 南京海关科技计划 (2022KJ26)

作者简介: 朱静怡, 女 (1996-), 硕士, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: 13721063207@163.com

通讯作者: 陆慧媛, 女 (1984-), 博士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量安全, E-mail: hylu_njmu@126.com

drug residues were in the range of 72.58%~119.87%, with RSD values ranging from 0.21% to 22.49%. Compared with the confirmation method, there were no false positive or false negative results, and the accuracy was good. The results indicate that the biochip kit method is rapid, requires low cost, and has accurate and reliable results and broad application prospects in simultaneous screening of multiple veterinary drug residues in animal-derived foods.

Key words: biochip; veterinary drug residues; animal derived foods; evaluation

兽药是防治动物疾病,提高养殖效益不可或缺的重要手段,在动物源性食品生产、加工和消费等环节中均可能存在^[1]。随着市场上兽药种类及数量不断增加,不法商贩为提高产量,滥用兽药现象层出不穷^[2],导致动物源性食品中兽药残留问题频发。兽药可在人体内产生蓄积,引发中毒、过敏,甚至致畸、致癌、致突变等安全问题,同时还会引发耐药性、生态环境毒性等一系列问题^[3]。

喹诺酮类^[4,5]、四环素类^[6]、磺胺类^[7]、氟苯尼考^[8]、甲氧苄啶^[9]等兽药具有较强抗菌效果,广泛用于实际生产中,对畜牧业的发展和生态环境影响较大^[10-12],受到众多国家和地区的高度重视^[13,14]。目前,食品中喹诺酮类、四环素类、氟苯尼考、磺胺类、甲氧苄啶兽药残留的检测方法有酶联免疫法^[15]、高效液相色谱法^[16]及高效液相色谱-串联质谱法^[17-19]等。这些方法虽然可以精确提供目标物的定性和定量信息,但前处理操作繁杂,设备要求高,价格昂贵,批量分析周期长,且对技术人员水平要求高。因此,建立快速、准确、高通量、低成本的兽残快检方法迫在眉睫。

近年来,应用于兽药残留检测中的快检技术主要有生物传感器^[20]、近红外光谱^[21]、拉曼光谱^[22]、量子点信号^[23]等。微阵列生物芯片技术基于竞争免疫法对样本中目标物进行检测,并引入纳米催化显色原理,通过芯片分析仪检测各斑点灰度变化,实现待测物的高通量和高精度快速检测^[24,25]。因此,本研究拟对微阵列生物芯片试剂盒法在动物源性食品中多种兽药残留的检测进行方法学验证,以评价该方法对上述常用5大类兽药进行同时、跨类、高通量、快速检测时的准确性和可行性,从而为生物芯片技术在兽药残留快速检测领域的应用提供数据支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

鸡肉、鱼肉、猪肉、乳制品、蜂蜜样品均购自南京的零售市场。

生物芯片检测试剂盒(包含96孔生物芯片微

孔板、兽药标准溶液、纳米标记抗体工作液、样品复溶液、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液)购自南京祥中生物科技有限公司。

兽药标准品均购自Sigma公司,纯度 $\geq 98\%$;乙腈(分析纯),上海安谱实验科技股份有限公司;正己烷(分析纯),上海安谱实验科技股份有限公司;氯化钠(纯度99.8%),南京化学试剂股份有限公司。

1.2 仪器与设备

Q-array 2000 可视化微阵列芯片分析仪,南京祥中生物科技有限公司;AB SCIEX 6500 QTRAP 三重四极杆液相色谱质谱联用仪,美国SCIEX公司;WH-3 微型旋涡混合仪,上海沪西分析仪器厂有限公司;TDZ4-WS 低速离心机,湖南赫西仪器装备有限公司;Auto Vap S60 全自动氮吹仪,上海力德生物科技有限公司;ThermoMultifuge X1R 台式高速离心机,美国Thermo Fisher公司;ES2000 电子天平(精度0.01 g),天津市德安特传感技术有限公司;MTS-2 微孔板恒温振荡仪,南京祥中生物科技有限公司;Finnpipette F3 微量移液器,美国Thermo Fisher公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品前处理

蜂蜜样本:称取 (1.00 ± 0.05) g均质的蜂蜜样本至50 mL离心管中,加入2 mL饱和氯化钠溶液将样品全部溶解,再加入5 mL乙腈,2 500 r/min振荡3 min,5 000 r/min离心5 min。离心后取1 mL上清液,55 °C氮吹。吹干后加入1 mL样品复溶液,1 500 r/min振荡2 min,取50 μ L用于分析。

乳制品样本:称取 (1.00 ± 0.05) g的乳制品样本至50 mL离心管中,加入5 mL样本复溶液将样品溶解,取100 μ L溶液加入400 μ L样本复溶液,混匀后用于检测。

肉类样本:称取 (1.00 ± 0.05) g的肉类样本至50 mL离心管中,加入5 mL乙腈,2 500 r/min振荡3 min,5 000 r/min离心5 min。离心后取500 μ L上清液,55 °C氮吹。吹干后加入1 mL正己烷和1 mL

样品复溶液, 1 500 r/min 振荡 2 min, 5 000 r/min 离心 5 min。离心后, 除去上层有机相, 取下层清液 100 μ L 转移到 1 mL 离心管中, 加入 200 μ L 复溶液用于分析。

1.3.2 试剂盒检测步骤

移取 50 μ L 标准溶液或样品至生物芯片微孔板的微孔内, 再加入 50 μ L 混合抗体工作液。贴上盖板膜, 将芯片板置于恒温孔板振荡仪振荡器中, 37 $^{\circ}$ C 条件下 600 r/min 振荡反应 15 min。反应完成后, 甩干孔内液体, 每孔用纯水洗涤 3 次。洗涤完成后, 每孔继续加入 50 μ L 显色液 (显色液 A 和 B 按体积比 1:1 混合, 现配现用), 将芯片板至于振荡仪中, 37 $^{\circ}$ C 条件下 600 r/min 振荡反应 12 min。显色完成后, 重复洗板步骤。将显色后的芯片板放入芯片分析仪中获取图像, 使用芯片专用软件 MiELISA 进行自动化分析, 结果报告将自动生成。

1.3.3 确证方法的仪器条件

色谱柱: SEVA C18 2.6 μ m, 4.6 mm \times 100 mm; 流动相: A-0.1% 甲酸水溶液, B- 甲醇; 流量: 0.25 mL/min; 洗脱梯度: 0~1.0 min 10%B, 3.0~3.6 min 30% B, 6.0~8.5 min 95% B, 9.5~11 min 10% B; 进样量: 50 μ L; 柱温: 室温。离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子模式; 毛细管温度: 350 $^{\circ}$ C; 电力电压: 3.0 kV; 鞘气流量: 35 L/h; 辅助气流量: 5 L/h。

1.4 结果计算

1.4.1 百分比灰度值计算

读取阵列点灰度值, 按式 (1) 计算每一标准溶液和样品的百分比灰度值 (B):

$$B = \frac{B_1}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

B —百分比灰度值;

B_1 —标准品或样品溶液的平均灰度值;

B_0 —0 μ g/kg 标准溶液的平均灰度值。

1.4.2 样品中兽药残留含量计算

以标准品百分比灰度值为纵坐标 (%), 兽药标准溶液浓度 (μ g/L) 对数为横坐标, 绘制标准工作曲线, 将样品的百分比灰度值代入拟合的标准曲线方程中, 根据标准曲线计算样品所对应的浓度对数后, 再转化成兽药残留的浓度。结果按式 (2) 计算:

$$X = C \times f \quad (2)$$

式中:

X —样品中兽药的含量, μ g/kg;

C —从标准工作曲线上得到的样品中兽药浓度, μ g/kg;

f —样品的稀释倍数。

1.5 数据分析

实验数据用平均值 \pm 标准偏差方式表示, 使用 Excel 2016 软件制图。

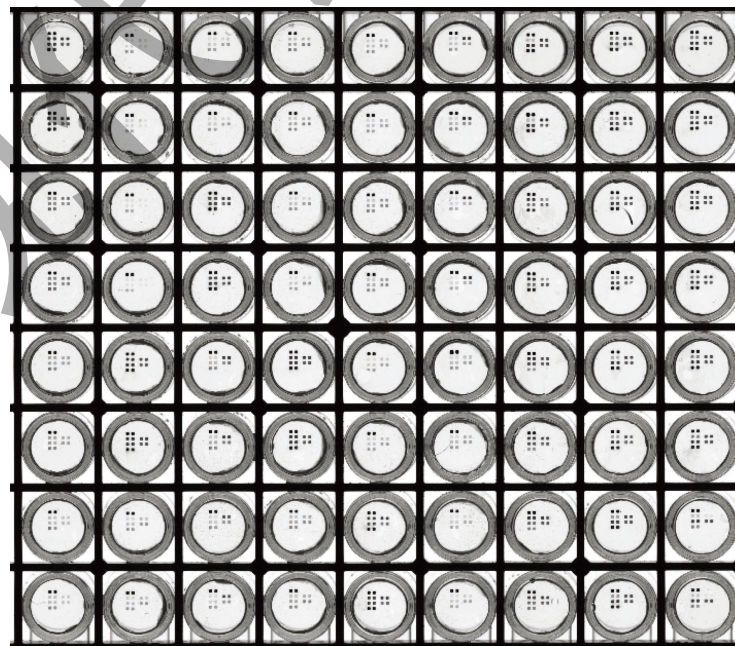


图 1 微阵列生物芯片试剂盒检测 5 种兽药残留含量的扫描结果图

Fig.1 Scanning results of detecting 5 types of veterinary drug residues using microarray biochip kit

2 结果与讨论

2.1 标准曲线的建立

生物芯片试剂盒基于间接竞争免疫的原理，在一定范围内，固定的抗体结合抗原的含量随着竞争对照品浓度的增加而减少，信号值降低；超出该范围后，检测信号则不随竞争对照品浓度的增加而变化^[26-28]。研究选用恩诺沙星、四环素、氟苯尼考、磺胺二甲基嘧啶、甲氧苄啶标准溶液为代表，进行竞争抑制试验。根据检测信号值计算不同浓度标准溶液平均灰度值 (B_1) 与 $0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 标准溶液的平均灰度值 (B_0) 的百分比灰度值，以标准品百分比灰度值为纵坐标 (%), 兽药标准溶液浓度 ($\mu\text{g}/\text{L}$) 对数为横坐标，绘制标准工作曲线^[29]。生物芯片图像示例图见图 1，标曲和线性方程结果见图 2 和表 1。

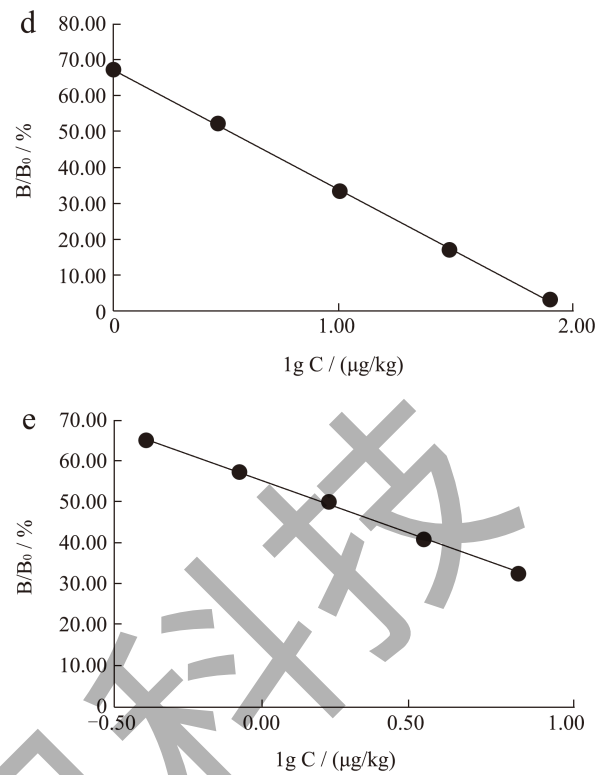
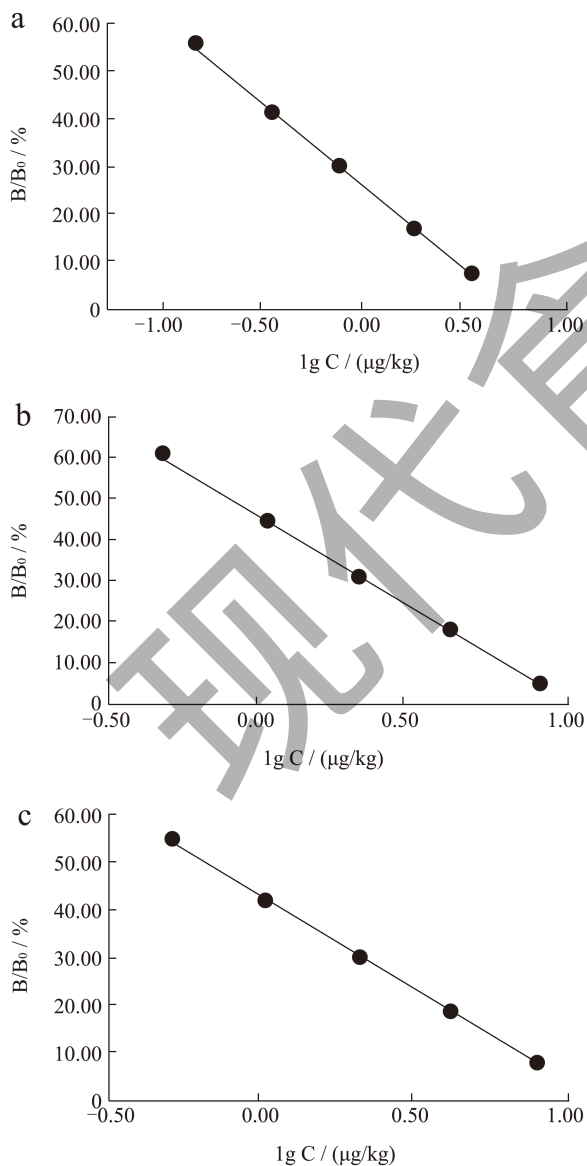


图 2 生物芯片测得 5 种兽药的标准曲线

Fig.2 Standard curves of 5 veterinary drugs measured by biochip

注：(a) 恩诺沙星；(b) 四环素；(c) 氟苯尼考；(d) 磺胺二甲基嘧啶；(e) 甲氧苄啶。

表 1 5 种兽药标准溶液的线性回归方程、相关系数和线性范围

Table 1 Linear regression equation, correlation coefficient and linear range of five veterinary drug standard solution

兽药	线性回归方程	相关系数	线性范围 / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
恩诺沙星	$y = -39.891x + 30.295$	0.991 7	0.25~4.00
四环素	$y = -44.910x + 44.990$	0.995 5	0.50~8.00
氟苯尼考	$y = -38.868x + 42.436$	0.997 2	0.50~8.00
磺胺二甲基嘧啶	$y = -34.389x + 67.343$	0.992 9	1.00~81.00
甲氧苄啶	$y = -26.752x + 54.582$	0.994 6	0.40~6.40

上述结果显示，在一定的线性范围内，喹诺酮类、四环素类、氟苯尼考、磺胺类、甲氧苄啶的含量与生物芯片试剂盒所测灰度值的相关性均良好，试剂盒法结果可靠。

2.2 检出限和定量限

研究选取了鸡肉、鱼肉、猪肉、乳制品、蜂蜜 5 种动物源性食品基质进行检出限和定量限的测定。

依据 GB/T 27417-2017《合格评定化学分析方法和确认指南》中方法验证的相关规定，5类兽药的检出限通过测定20个不同阴性样品的平均值并加上3倍标准偏差 ($\bar{x}+3SD$) 计算得出，定量限以3倍检出限计算。5种基质的检出限和定量限结果详见表2~6。

表2 鸡肉基质的检出限和定量限测定结果 (μg/kg)

Table 2 Detection limit and quantitative limit determination results of chicken matrix

编号	喹诺酮	四环素	氟苯尼考	磺胺	甲氧苄啶
1	0.16	1.30	2.20	1.32	0.33
2	0.24	1.10	1.80	1.35	0.20
3	0.23	2.70	3.00	0.81	0.39
4	0.16	2.70	1.70	0.12	0.05
5	0.15	2.60	2.90	0.45	0.36
6	0.23	1.20	1.10	1.35	0.04
7	0.20	0.90	1.20	1.89	0.33
8	0.16	1.40	2.50	0.75	0.45
9	0.27	2.10	1.80	1.29	0.36
10	0.26	2.90	2.90	1.23	0.26
11	0.19	1.30	2.10	0.06	0.36
12	0.31	2.50	2.00	1.35	0.33
13	0.20	2.90	2.50	1.56	0.20
14	0.25	0.80	1.80	0.36	0.29
15	0.18	1.50	1.80	1.05	0.04
16	0.31	2.20	1.20	0.33	0.39
17	0.16	2.40	3.00	1.98	0.23
18	0.17	0.60	1.90	1.71	0.28
19	0.15	2.90	2.70	1.17	0.36
20	0.24	1.50	1.80	0.63	0.33
标准偏差/%	0.05	0.77	0.59	0.56	0.11
检出限/(μg/kg)	0.36	4.20	3.87	2.71	0.62
定量限/(μg/kg)	1.09	12.59	11.60	8.14	1.87

表3 鱼肉基质的检出限和定量限测定结果 (μg/kg)

Table 3 Detection limit and quantitative limit determination results of fish matrix

编号	喹诺酮	四环素	氟苯尼考	磺胺	甲氧苄啶
1	0.23	1.78	3.26	1.98	0.24
2	0.27	0.59	1.73	1.63	0.20
3	0.14	2.97	3.78	1.13	0.50
4	0.19	3.29	1.26	0.13	0.06
5	0.21	3.61	2.29	0.58	0.26
6	0.19	1.13	1.58	0.85	0.04
7	0.12	0.79	0.68	2.36	0.24
8	0.24	1.36	3.75	0.61	0.68
9	0.20	1.55	1.87	0.70	0.49
10	0.39	4.26	2.73	0.71	0.13
11	0.10	0.85	1.53	0.06	0.18
12	0.29	2.45	2.06	1.17	0.45
13	0.21	3.94	2.43	1.50	0.17
14	0.33	0.65	0.95	0.32	0.20
15	0.17	0.75	1.15	0.56	0.05
16	0.28	2.20	0.78	0.42	0.50
17	0.19	2.23	1.86	1.15	0.28
18	0.12	0.79	2.81	1.16	0.28
19	0.11	2.44	2.67	1.64	0.47
20	0.34	1.76	2.18	0.32	0.49
标准偏差/%	0.08	1.13	0.89	0.61	0.18
检出限/(μg/kg)	0.45	5.37	4.73	2.79	0.82
定量限/(μg/kg)	1.36	16.11	14.19	8.37	2.47

由表2~6可知，生物芯片试剂盒方法的定量限均低于现有国家标准对相应食品基质的1/2容许限要求，可以很好的满足兽药定量检测需求，汇总结果详见表7。

表4 猪肉基质的检出限和定量限测定结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 4 Detection limit and quantitative limit determination results of pork matrix

编号	喹诺酮	四环素	氟苯尼考	磺胺	甲氧苄啶
1	0.23	1.44	4.56	2.16	0.15
2	0.41	0.58	1.14	1.05	0.22
3	0.11	3.00	2.04	1.02	0.54
4	0.29	3.66	0.96	0.07	0.08
5	0.23	3.83	3.37	0.31	0.16
6	0.27	1.16	2.15	0.50	0.03
7	0.12	1.02	1.01	2.76	0.14
8	0.32	1.06	2.06	0.39	0.49
9	0.22	1.63	2.30	0.58	0.51
10	0.51	6.18	3.95	0.73	0.18
11	0.14	1.26	1.33	0.04	0.15
12	0.34	1.98	2.72	0.62	0.40
13	0.30	3.51	1.62	0.97	0.09
14	0.47	0.56	0.85	0.48	0.20
15	0.23	0.46	1.67	0.57	0.03
16	0.32	1.63	1.17	0.40	0.50
17	0.10	2.66	1.08	0.59	0.36
18	0.06	0.40	1.74	0.63	0.23
19	0.07	2.58	1.71	1.06	0.54
20	0.23	2.02	2.22	0.36	0.66
标准偏差/ 差/%	0.12	1.42	0.99	0.64	0.19
检出限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.62	6.29	4.94	2.68	0.86
定量限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	1.87	18.87	14.82	8.04	2.58

表5 乳制品基质的检出限和定量限测定结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

Table 5 Detection limit and quantitative limit determination results of dairy products matrix

编号	喹诺酮	四环素	氟苯尼考	磺胺	甲氧苄啶
1	0.54	1.03	2.22	2.69	0.43
2	0.61	0.97	0.02	3.16	0.23
3	0.73	1.13	0.90	2.43	0.30
4	0.61	1.94	2.61	1.11	0.07
5	0.53	2.38	2.18	1.24	0.48
6	0.57	0.25	0.47	2.16	0.04
7	0.43	0.18	0.86	2.27	0.61
8	0.41	0.32	1.78	1.43	0.50
9	0.83	0.09	0.83	2.37	0.67
10	0.80	3.58	2.44	3.26	0.19
11	0.42	0.04	1.90	1.05	0.28
12	0.53	3.50	2.08	3.34	0.28
13	0.55	2.51	1.38	3.31	0.37
14	0.60	0.38	3.06	1.42	0.22
15	0.53	1.49	1.87	1.88	0.02
16	0.46	0.58	0.53	1.46	0.29
17	0.44	3.03	1.09	2.39	0.17
18	0.43	0.18	1.74	2.18	0.52
19	0.45	1.29	0.63	2.16	0.70
20	0.66	1.18	2.59	1.72	0.53
标准偏差/ 差/%	0.12	1.13	0.83	0.72	0.20
检出限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0.92	4.68	4.04	4.32	0.94
定量限/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	2.77	14.04	12.13	12.95	2.82

表 6 蜂蜜基质的检出限和定量限测定结果 (μg/kg)

Table 6 Detection limit and quantitative limit determination results of honey matrix

编号	喹诺酮	四环素	氟苯尼考	磺胺	甲氧苄啶
1	0.12	0.64	0.41	2.06	1.06
2	0.21	0.66	0.36	2.02	1.56
3	0.08	0.63	0.47	0.10	1.94
4	0.15	1.25	0.46	1.18	0.61
5	0.17	1.00	0.71	1.17	1.74
6	0.27	0.63	0.26	2.19	0.94
7	0.19	0.63	0.24	0.09	1.98
8	0.13	0.63	0.49	2.10	0.69
9	0.11	0.97	0.30	0.22	0.60
10	0.19	0.92	0.43	1.10	0.92
11	0.14	0.82	0.56	0.07	0.94
12	0.23	0.85	0.44	1.12	1.13
13	0.19	1.03	0.54	0.04	1.19
14	0.13	0.62	0.32	2.15	0.82
15	0.11	0.80	0.45	0.09	1.17
16	0.16	0.85	0.36	2.06	0.58
17	0.12	1.09	0.49	0.25	1.17
18	0.09	0.66	0.39	1.20	0.85
19	0.09	1.02	0.41	2.19	1.75
20	0.18	0.65	0.26	0.24	1.35
标准偏差/%	0.05	0.19	0.11	0.86	0.43
检出限/(μg/kg)	0.30	1.38	0.75	3.65	2.44
定量限/(μg/kg)	0.91	4.14	2.25	10.96	7.33

表 7 生物芯片试剂盒的检出限和定量限结果汇总 (μg/kg)

Table 7 Summary of detection limit and quantification limit results for biochip kits

参数	基质	喹诺酮类	四环素类	氟苯尼考	磺胺类	甲氧苄啶
检出限	鸡肉	0.36	4.20	3.87	2.71	0.62
	鱼肉	0.45	5.37	4.73	2.79	0.82
	猪肉	0.62	6.29	4.94	2.68	0.86
	乳制品	0.92	4.68	4.04	4.32	0.94
定量限	蜂蜜	0.30	1.38	0.75	3.65	2.44
	鸡肉	1.09	12.59	11.60	8.14	1.87
	鱼肉	1.36	16.11	14.19	8.37	2.47
	猪肉	1.87	18.87	14.82	8.04	2.58
	乳制品	2.77	14.04	12.13	12.95	2.82
	蜂蜜	0.91	4.14	2.25	10.96	7.33

表 8 蜂蜜中的加标回收率结果

Table 8 Results of spiked recovery rate in honey

兽药种类	添加水平/(μg/kg)	实测值/(μg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
恩诺沙星	5	5.83	115.73	2.09
		5.65		
	10	5.88	106.77	18.02
		8.56		
	5	11.15	116.80	3.14
		12.32		
	10	6.00	118.87	11.58
		5.64		
	5	5.88	116.93	5.91
		13.30		
	10	10.55	109.27	7.81
		11.81		
5	6.23	111.67	9.85	
	5.75			
10	10.15	119.87	4.87	
	10.79			
四环素	11.84	111.67	9.85	
	4.96			
5	6.00	111.67	9.85	
	5.79			
10	12.65	119.87	4.87	
	11.55			
		11.76		

续表 8

兽药种类	添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率/%	RSD/%
氟苯尼考	5	5.72	112.53	8.48
		5.11		
		6.05		
	10	10.30	117.50	10.79
		12.65		
		12.30		
	5	5.45	114.40	4.81
		6.00		
		5.71		
	10	11.04	117.60	5.31
		12.15		
		12.09		
磺胺二甲基 嘧啶	10	11.84	108.97	9.73
		9.75		
		11.10		
	20	17.75	94.05	8.07
		20.55		
		18.13		
	10	11.36	119.53	4.50
		12.41		
		12.09		
	20	21.73	107.25	1.95
		21.65		
		20.97		
甲氧苄啶	10	11.30	113.20	7.60
		10.47		
		12.19		
	20	13.96	82.23	13.19
		17.95		
		17.43		
	10	10.05	109.43	7.24
		11.56		
		11.22		
	20	20.35	101.18	1.75
		19.84		
		20.52		

2.3 准确度和精密度

为评估生物芯片试剂盒法对实际样品的分析能力, 选用蜂蜜、鱼肉和乳制品的阴性样品基质进行了5类兽药的2水平3平行加标实验, 加标浓度包括限量值^[30,31]。蜂蜜中恩诺沙星、四环素、氟苯尼考的加标水平为5、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 磺胺二甲基嘧啶、甲氧苄啶的加标水平为10、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 鱼肉中恩诺沙星、四环素、氟苯尼考、磺胺二甲基嘧啶、甲氧苄啶的加标水平为50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。乳制品中的兽药残留限量参考牛奶基质的限量要求。乳制品中恩诺沙星、四环素、氟苯尼考、磺胺二甲基嘧啶、甲氧苄啶的加标水平为50、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。各基质的加标水平及回收率见表8~10。

表 9 鱼肉中的加标回收率结果

Table 9 Results of spiked recovery rate in fish

兽药种类	添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率/%	RSD/%	
恩诺沙星	50	65.50	109.76	22.49	
		41.34			
		57.80			
	100	90.49	91.05	2.50	
		89.10			
		93.55			
	50	35.94	83.35	12.27	
		43.34			
		45.75			
	100	89.07	73.60	85.06	11.84
		73.60			
		92.50			
四环素	50	39.65	85.03	6.10	
		43.20			
		44.70			
	100	96.80	84.40	89.65	7.16
		84.40			
		87.75			
50	47.72	42.64	89.21	6.12	
	47.72				
	43.45				
100	95.22	112.64	107.85	10.24	
	112.64				
		115.70			

续表 9

兽药种类	添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率/%	RSD/%
氟苯尼考	50	55.58	92.59	17.51
		40.65		
		42.65		
	100	86.41	90.94	4.56
		94.55		
		91.85		
	50	35.61	75.73	9.17
		36.12		
		41.86		
	100	71.57	78.65	7.90
		83.19		
		81.20		
磺胺二甲基 嘧啶	50	47.92	87.55	12.01
		37.86		
		45.55		
	100	90.19	91.19	0.96
		91.58		
		91.80		
	50	42.21	95.62	11.72
		53.42		
		47.80		
	100	107.53	106.25	1.69
		107.01		
		104.20		
甲氧苄啶	50	45.78	92.68	2.83
		45.40		
		47.84		
	100	93.63	108.94	12.23
		117.94		
		115.25		
50	39.11	96.62	16.82	
	51.32			
	54.50			
	100	93.76	114.61	17.77
		134.46		
		115.60		

表 10 乳制品中的加标回收率结果

Table 10 Results of spiked recovery rate in dairy products

兽药种类	添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率/%	RSD/%
恩诺沙星	50	38.62	82.85	5.88
		43.00		
		42.65		
	100	67.64	72.58	5.92
		74.68		
		75.42		
	50	57.46	116.15	0.96
		58.22		
		58.55		
	100	76.51	86.40	9.93
		91.83		
		90.87		
四环素	50	36.87	72.84	5.80
		34.12		
		38.27		
	100	86.83	84.25	4.27
		80.14		
		85.79		
	50	44.42	85.91	8.39
		38.85		
		45.60		
	100	72.22	73.93	2.05
		74.46		
		75.11		
氟苯尼考	50	56.09	108.49	4.55
		51.44		
		55.20		
	100	122.49	116.46	4.89
		111.18		
		115.70		
50	57.19	112.27	1.83	
	56.07			
	55.14			
	100	106.22	103.27	2.86
		100.32		
		103.28		

续表 10

兽药种类	添加水平/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测值/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均回收 率/%	RSD/%	
磺胺二甲基 嘧啶	50	57.20	108.22	6.05	
		50.68			
	100	54.45	102.11	0.21	
		102.36			
	50	101.98	119.21	3.04	
		102.00			
	100	58.85	105.94	5.14	
		61.67			
	甲氧苄啶	50	58.29	108.12	16.83
			112.00		
100		101.44	116.30	8.55	
		104.39			
50		61.42	117.83	5.89	
		43.89			
100		56.87	107.26	8.01	
		105.46			
50		125.00	117.83	5.89	
		118.43			
100	61.84	107.26	8.01		
	59.82				
50	55.08	107.26	8.01		
	97.45				
100	113.40	107.26	8.01		
	110.94				

表8~10结果显示,在蜂蜜、鱼肉、乳制品基质中,生物芯片试剂盒方法测得的喹诺酮类物质加标回收率范围为72.58%~118.87%,RSD为0.96%~22.49%;四环素类的加标回收率范围为72.84%~119.87%,RSD为2.05%~10.24%;氟苯尼考的加标回收率范围为75.73%~117.60%,RSD为1.83%~17.51%;磺胺类兽药的加标回收率范围为87.55%~119.53%,RSD为0.21%~12.01%;甲氧苄啶的加标回收率范围为82.23%~117.83%,RSD为1.75%~16.83%,均满足GB/T 27417-2017中对定量方法相应添加水平的要求。这表明生物芯片方法对不同基质样品中兽药残留的检测结果均有较好的准确度和精密度。

2.4 确证方法比较

本研究分别使用生物芯片试剂盒法和国家标准方法对同一批样品进行了分析对比。喹诺酮类、四环素类、磺胺类、氟苯尼考、甲氧苄啶兽药残留分别依据标准方法GB 31658.17-2021《食品安全国家标准动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法》、GB 31659.2-2022《食品安全国家标准禽蛋、奶和奶粉中多西环素残留量的测定液相色谱-串联质谱法》、GB/T 21316-2007《动物源性食品中磺胺类药物残留量的测定液相色谱-质谱/质谱法》、GB 31658.5-2021《食品安全国家标准动物性食品中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留量的测定液相色谱-串联质谱法》和GB/T 21316-2007中的方法进行确证。该批样本均含有一种或多种兽药残留,确证方法图谱示例如图3所示,两种方法分析比较结果见表11。

表 11 生物芯片法与确证方法测试结果对比

Table 11 Comparison of test results between biochip method and confirmatory method

兽药类型	兽药名称	基质	国标方 法结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	生物芯片 法结果 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD /%
喹诺酮类	恩诺沙星	鸡肉 1	254.55	241.55	2.57
		草鱼 1	9.10	6.93	13.48
		草鱼 2	14.18	11.75	9.41
		鳊鱼 1	10.93	11.50	2.70
		蜂蜜 1	2.37	< LOD	/
四环素类	多西环素	蜂蜜 2	1.62	< LOD	/
		蜂蜜 3	1.24	< LOD	/
		蜂蜜 4	1.33	< LOD	/
		蜂蜜 5	6.49	5.55	7.88
		鸡肉 2	30.30	27.07	5.62
甲氧苄啶	甲氧苄啶	四环素 蜂蜜 5	25.04	29.25	7.79
		鸡肉 3	66.83	78.13	7.76
		鸡肉 4	48.16	40.44	8.81
		蜂蜜 5	9.98	9.63	1.87

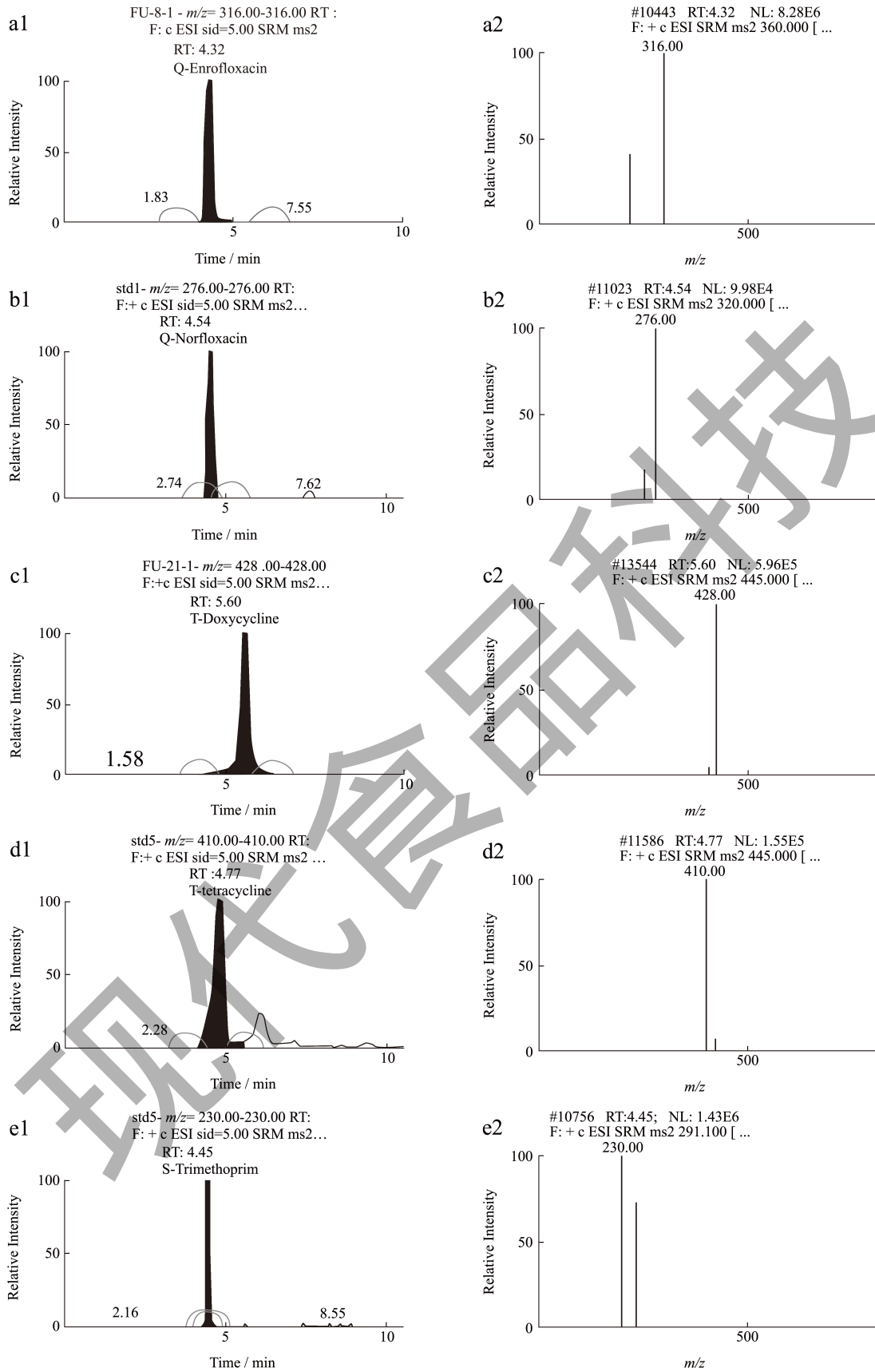


图 3 5 种兽药液相色谱-质谱/质谱法色谱图和离子碎片图谱

Fig.3 Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry chromatograms and ion fragment spectra of five veterinary drugs

注: (a) 恩诺沙星; (b) 诺氟沙星; (c) 多西环素; (d) 四环素; (e) 甲氧苄啶。

结果表明, 与国家标准方法比较, 生物芯片试剂盒法未出现假阳性或假阴性结果。对于有数值的结果, 两种方法的 RSD 均 < 15%, 符合 GB/T 27417-2017 对相应含量水平的要求, 表明该方法具有较高的准确性。本研究检测的样品涵盖了多种常见动物源性食品基质, 说明本方法对多类样品都具有较好的适用性。

生物芯片试剂盒法分析以上样品的前处理和数据分析时间约为 4 h, 而液相色谱-质谱/质谱法则需要 3~4 d。此外, 通过调查可知, 一个生物芯片试剂盒的定价约 5 000 元, 为 96 孔, 平均约为 50 元/孔, 可以同时检测五类兽药各自的总量。而液质方法的收费标准一般为 400 元/项目。因此, 采用生物芯片试剂盒法不仅大大提高了检测效率, 且显著降低了检测成本, 适用于进行高通量样品的快速筛查。

3 结论

本研究将微阵列生物芯片试剂盒用于动物源性食品中喹诺酮类、四环素类、氟苯尼考、磺胺类、甲氧苄啶多种兽药残留的同时测定。通过对该方法的检出限、定量限、准确度、精密度、以及与确证方法的一致性分析, 对微阵列生物芯片试剂盒法进行了准确性评估。实验选取了鸡肉、鱼肉、猪肉、乳制品和蜂蜜 5 种动物源性食品基质, 进行了检出限和定量限的测定, 结果表明, 生物芯片试剂盒方法测得的 5 种食品基质中兽药残留量的定量限, 可以较好的满足兽药残留定量检测的需求。该方法测得的喹诺酮类、四环素类、氟苯尼考、磺胺类和甲氧苄啶加标回收率范围分别为 72.58%~118.87%、72.84%~119.87%、75.73%~117.60%、87.55%~119.53%、82.23%~117.83%, RSD 均小于 22.49%。通过对实际样品的检测, 并与确证方法进行结果比较, 表明生物芯片试剂盒法具有较高的准确性和精确性, 对样品有较好的普适性。综上所述, 生物芯片试剂盒法检测动物源性食品中多种兽药残留量具有较好的准确性, 结果精确可靠, 可应用于实际检测中。

相比于液相色谱-质谱/质谱法, 生物芯片试剂盒法具有快速、高通量、价格低廉的优势, 适合进行大规模样品的快速筛查, 在食品安全检测领域中具有实际应用前景。但因生物芯片检测的是一类化合物的总量, 如需确定具体化合物, 或

检测出阳性样品时, 建议采用大型仪器方法进行确证。

参考文献

- [1] SHI R, YU Z, WU W, et al. A survey of 61 veterinary drug residues in commercial liquid milk products in China [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(7): 1227-1233.
- [2] DAO A Q, NHI L T T, NGUYEN D M, et al. A review on the determination of veterinary drug residues in food products [J]. *Biomed Chromatogr*, 2022, 36(6): e5364.
- [3] BACANL M, BAŞARAN N. Importance of antibiotic residues in animal food [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 125: 462-466.
- [4] MILLANAO A R, MORA A Y, VILLAGRA N A, et al. Biological effects of quinolones: a family of broad-spectrum antimicrobial agents [J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7153.
- [5] MAJDINASAB M, MITSUBAYASHI K, MARTY J L. Optical and electrochemical sensors and biosensors for the detection of quinolones [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37(8): 898-915.
- [6] CARMILLERI G, PULVIRENTI A, VELLA A, et al. Tetracycline residues in bovine muscle and liver samples from sicily (Southern Italy) by LC-MS/MS method: a six-year study [J]. *Molecules*, 2019, 24(4): 695.
- [7] 王佳,陶晓奇. 动物源食品中磺胺类药物残留的免疫分析方法研究进展[J]. *食品与发酵工业*, 2018, 44(10): 260-7.
- [8] SHI M, LIU R, ZHANG F, et al. Screening of single-stranded DNA aptamer specific for florfenicol and application in detection of food safety [J]. *Biosensors*, 2022, 12(9): 701.
- [9] 李红婵,段凯,汪聪勇,等. 氟苯尼考药理学及残留检测研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(21): 9-12.
- [10] 周迎春,刘少博,华向美. 我国动物源性食品中兽药残留的危害及现状[J]. *粮食与油脂*, 2021, 34(6): 18-20.
- [11] NA T W, SEO H J, JANG S N, et al. Multi-residue analytical method for detecting pesticides, veterinary drugs, and mycotoxins in feed using liquid- and gas chromatography coupled with mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1676: 463257.
- [12] RAHMAN M M, LEE D J, JO A, et al. Onsite/on-field analysis of pesticide and veterinary drug residues by a state-of-art technology: a review [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44(11): 2310-2327.
- [13] 孙星雅,李强,王战辉,等. 中国与欧盟和美国禽肉、禽蛋中兽药残留限量标准的对比研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(6): 2362-2375.
- [14] MEHL A, HUDEL L, BÜCKER M, et al. Validated screening method for 81 multiclass veterinary drug residues in food via online-coupling high-throughput planar solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography-orbitrap tandem mass spectrometry [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(35): 10886-10898.

- [15] TAO X Q, HE Z F, CAO X Y, et al. Approaches for the determination of florfenicol and thiamphenicol in pork using a chemiluminescent ELISA [J]. *Anal Methods*, 2015, 7(19): 8386-8392.
- [16] WANG N, WANG Y F, OMER A M, et al. Fabrication of novel surface-imprinted magnetic graphene oxide-grafted cellulose nanocrystals for selective extraction and fast adsorption of fluoroquinolones from water [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(28): 6643-6653.
- [17] JUNG H N, PARK D H, YOO K H, et al. Simultaneous quantification of 12 veterinary drug residues in fishery products using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Chem*, 2021, 348: 129105.
- [18] 王聪,赵晓宇,王海燕,等.高效液相色谱-三重四极杆质谱法测定动物肌肉中73种兽药残留[J].*应用化学*,2021, 38(12):1663-1675.
- [19] 杨兆甜,吴亚婕,王莹,等.超高效液相色谱-串联质谱法检测猪肉中多兽药残留[J].*食品与生物技术学报*,2020, 39(7):44-50.
- [20] MIN J, ZHONG E, FEI Z, et al. Rapid multi-residue detection methods for pesticides and veterinary drugs [J]. *Molecules*, 2020, 25(16): 3590.
- [21] LUIZ L, BELL M, ROCHA R, et al. Detection of veterinary antimicrobial residues in milk through near-infrared absorption spectroscopy [J]. *J Spectrosc*, 2018, 6: 5152832.
- [22] ZHOU J W, ZOU X M, SONG S H, et al. Quantum dots applied to methodology on detection of pesticide and veterinary drug residues [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(6): 1307-1319.
- [23] ZHAO Y, XU Y, JING X, et al. SERS-active plasmonic metal NP-CsPbX₃ films for multiple veterinary drug residues detection [J]. *Food Chem*, 2023, 412: 135420.
- [24] 李周敏,王颖,冷寒雪,等.蛋白芯片法同时检测食品中克伦特罗与莱克多巴胺的残留量[J].*分析测试学报*,2019, 38(8):913-919.
- [25] MORLOCK G E, MORLOCK J A, CARDAK A D, et al. Potential of simple, rapid, and non-target planar bioassay screening of veterinary drug residues [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1679: 463392.
- [26] 孟东,王波,陈蕾,等.可视化微阵列蛋白芯片法同时检测蜂蜜中3种农药残留[J].*食品安全质量检测学报*,2021, 12(5):1928-1935.
- [27] WANG B, XIE K, LEE K. Veterinary drug residues in animal-derived foods: sample preparation and analytical methods [J]. *Foods*, 2021, 10(3): 555.
- [28] GAUDIN V, HEDOU C, SOUMET C, et al. Evaluation and validation of a multi-residue method based on biotech technology for the simultaneous screening of six families of antibiotics in muscle and aquaculture products [J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2016, 33(3): 403-419.
- [29] GAO H, TA L, LI ZM, et al. Simultaneous detection of four mycotoxins in cereals and edible oils by using a colorimetric protein microarray [J]. *ACS Food Sci Technol*, 2022, 2(6): 993-999.
- [30] ZHAN J, SHI X Z, DING Y, et al. A generic and rapid analytical method for comprehensive determination of veterinary drugs and other contaminants in raw honey [J]. *J Chromatogr A*, 2022, 1665: 462828.
- [31] LI G, LI H, ZHAI J, et al. Microfluidic fluorescent platform for rapid and visual detection of veterinary drugs [J]. *Rsc Adv*, 2022, 12(14): 8485-8491.