

牛奶中 β -内酰胺和四环素类抗生素 二联检测试纸条的初步研究

陈玲, 万宇平^{*2}, 邵兵¹, 杨志昆¹, 牛华星¹, 张琦¹

(1. 山东省兽药质量检验所, 山东 济南 250022; 2. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206)

摘要: 抗生素越来越多地被应用于畜牧业中, 其在乳制品中的残留问题也备受关注。乳品中残留抗生素不仅危害人体的健康, 而且影响经济贸易的正常进行。为适应基层检测牛奶中抗生素残留的需求, 作者采用胶体金免疫层析方法, 建立了可以同时测定牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素的二联胶体金试纸条。该方法简单可靠, 可同时检测牛奶中 12 种 β -内酰胺类抗生素和 4 种四环素类抗生素, 是一种值得推广的定性筛选方法, 可作为液相色谱等定量检测仪器法的补充。

关键词: 牛奶; β -内酰胺类抗生素; 四环素类抗生素; 胶体金; 二联试纸条

中图分类号: TS 201.6 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)07-0776-08

Study about Combo Detection Strip of β -Lactams and Tetracyclines in Milk

CHEN Ling¹, WAN Yu-ping^{*2}, SHAO Bing¹,
YANG Zhi-kun¹, NIU Hua-xing¹, ZHANG Qi¹

(1. Institute of Veterinary Drug Quality Inspection of Shandong Province, Jinan 250022, China; 2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102206, China)

Abstract: Antibiotics were increasingly used in animal husbandry, the residue in the dairy products got more attention, the antibiotics residue in milk products not only harmful to human health, but also affect the economic trade. In order to adapt to the requirement of the antibiotic residues detection in milk, a combo strip that detect β -lactams and Tetracyclines in milk simultaneously was developed based on the colloidal gold immunochromatographic assay method in this study. The results present here demonstrated that 12 kinds of β -lactams and 4 kinds of tetracyclines antibiotics can be detected, and the method is simple, reliable.

Key words: milk, β -lactams, tetracyclines, colloidal gold, combo strip

β -内酰胺类抗生素(β -lactams)是指化学结构中含有 β -内酰胺环的一类抗生素, 主要包括青霉素类和头孢菌素类, 其作用特点是能够抑制细菌黏肽转

肽酶的活性, 从而阻断细菌细胞壁的合成而呈现杀菌^[1]。在奶牛养殖业中常用于医治奶牛的乳腺炎, 尤其是青霉素 G, 因其广谱并廉价而被大量地使

收稿日期: 2012-03-03

作者简介: 陈玲(1969-), 女, 山东茌平人, 研究员, 主要从事兽药及畜产品质量安全检测工作。E-mail: 1969chenling@163.com。

*通信作者: 万宇平(1982-), 男, 四川眉山人, 助理研究员, 主要从事食品安全快速检测技术研究。E-mail: hjp5233@126.com

用,但由于使用方法不当或不遵守休药期规定等原因,导致了牛奶中含有高浓度的残留物。虽然 β -内酰胺类抗生素本身对机体没有很强的毒性,但是青霉素类会使一些个体产生十分剧烈的过敏反应。如果长期摄入含有抗生素的牛奶会使人体肠道内的正常菌群受到抑制,从而导致致病菌、条件致病菌大量繁殖引起全身或局部的感染^[2-4]。许多国家对牛奶中的 β -内酰胺类抗生素尤其是青霉素G残留的管理十分严格。世界卫生组织推荐的青霉素G在牛奶中的限量为 $0.004\ \mu\text{g}/\text{mL}$,美国为 $0.005\ \mu\text{g}/\text{mL}$,我国规定所有食品中青霉素最高残留限量(MRL)为 $50\ \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[5]。常用于检测牛奶中青霉素的方法有分光光度法、生物传感器法、液相色谱法和气相色谱法等^[6]。

四环素类(Tetracyclines, TCs)是由链霉菌产生的一类广谱抗生素,在化学结构上都属于多环并四苯羧基酰胺母核的衍生物。四环素类可分为天然品和半成品两大类,天然品由不同链霉菌的培养液中提取获得,有四环素、土霉素、金霉素和去甲金霉素^[7]。半成品有强力霉素、美他环素和米诺环素等。在畜禽生产中,四环素类抗生素被广泛作为抗生素添加剂,用于防治肠道感染、促生长和提高奶牛产奶量,同时也被广泛应用于水产养殖和养蜂中预防和治疗多种感染性疾病^[8]。但是研究发现该类抗生素具有致突变性和潜在的致癌性,被许多国家列为限量药物。我国《动物性食品中兽药最高残留限量》规定牛奶和肌肉组织中四环素、土霉素及金霉素(单体或复合物)及多西环素最高残留限量为 $100\ \mu\text{g}/\text{L}$ ^[9]。目前,TCs残留检测方法主要有微生物法、薄层色谱法、酶联免疫法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法和ELISA法^[10]。

由于牛奶中的抗生素会影响牛奶的进一步发酵加工,许多国家,以及联合国粮农组织(FAO)和世界卫生组织(WHO)等国际机构都作出规定:奶牛在接受抗生素治疗期间及用药后数日内挤出的乳汁不得用于生产商品乳^[11]。尽管如此,仍有不少农场或奶农不顾抗生素的危害,不遵守相关规定,向乳品加工企业提供含有抗生素的原奶。因此,对乳品加工企业来说,抗生素已经是原奶收购环节必不可少的检测项目^[12]。胶体金免疫层析技术因其简便、快速、准确,是可用于现场检测的定性快速检测方法。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

牛奶:市售; β -内酰胺类抗生素、四环素类抗生素: sigma 公司产品;氯金酸:上海化学试剂有限公司产品;结合物释放垫、PVC 背板:上海金标生物科技有限公司产品;硝酸纤维素膜、吸收垫、样品垫:普利来基因技术公司产品; β -内酰胺单克隆抗体、四环素类单克隆抗体:自制;其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 仪器

电子天平 FA2104:上海良平仪器仪表有限公司产品;磁力搅拌器 90-2:上海振荣科学仪器有限公司产品;低速离心机 L500:湘仪集团产品;数控切条机 CT300:上海金标生物科技有限公司产品;XYZ3000 点膜仪:BioDot 公司产品;冷冻干燥机 FD-1A-50:北京博医康产品;分光光度计 752S:上海棱光技术有限公司产品;生化培养箱 DHP-600:天津市中环实验电炉有限公司产品;Milli-Q Reference 纯水仪:美国 Millipore 产品;液相色谱-串联质谱系统:日本岛津产品。

2 方 法

2.1 胶体金的制备

用双蒸去离子水将质量分数 1% 氯金酸稀释成质量分数至 0.01%,置磁力加热棒搅拌器上搅拌煮沸,煮沸后每 100 mL 氯金酸加入 2.5 mL 质量分数 1% 柠檬酸三钠,溶液的颜色会由浅黄变兰色,然后变深兰,最后变为红色,当溶液的颜色完全变为透明的红色时,继续回流,10 min 后停止加热,冷却至室温后用双蒸去离子水补充至原体积并于 4℃ 避光保存^[13]。

2.2 胶体金质量鉴定

将制备好的胶体金分别进行肉眼观察和紫外扫描测量其颜色、颗粒大小和最大吸收波长。

2.3 单克隆抗体-胶体金标记物制备

以目测法确定胶体金与待标记抗体用量比例,用 0.1 mol/L 的碳酸钾调节胶体金溶液至 7.2,将抗体用 pH 7.6,0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液逐级稀释为 5~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,各取 0.1 mL 按顺序加入一系列装有 1 mL 胶体金的试管中,5 min 后在上述试

管内分别加入 0.1 mL 质量分数 10% 氯化钠, 混匀, 静置 2 h 后观察结果。结果表明, 从加入抗体浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的试管开始, 胶体金溶液的颜色基本一致, 这是由于加入抗体量达到或超过了稳定胶体金的最适抗体量所致, 因此稳定 1 mL 胶体金最适抗体量是 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在此基础上再加上 20% 为稳定 1 mL 胶体金实际抗体用量即 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[14]。

在磁力搅拌下, 用 0.1 mol/L 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 7.2, 抗体按 24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准向胶体金溶液中加入 β -内酰胺单克隆抗体, 继续搅拌混匀 10 min, 加入 10% BSA 至 BSA 在胶体金溶液中的体积分数为 1%, 静置 30 min。12 000 r/min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀物用含质量分数 0.5% 的牛血清白蛋白、0.3% 的表面活性剂, pH 7.2 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤两次, 用体积为初始胶体金体积 1/10 的金标抗体稀释液将沉淀重悬, 即可得到已纯化的金标抗体溶液, 置 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。按同样的方法制备四环素类抗生素单克隆抗体-胶体金标记物。

2.4 微孔试剂制备

向微孔条的微孔中加入 50 μL β -内酰胺类抗生素单克隆抗体-胶体金标记物和 50 μL 四环素类抗生素单克隆抗体-胶体金标记物, 放入冷冻干燥机中, 冷阱温度为 -70 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 预冻 4 h 后, 再冻干 14 h, 即可取出, 得到的微孔条中冻干有 β -内酰胺类抗生素单克隆抗体-胶体金标记物和四环素类抗生素单克隆抗体-胶体金标记物。

2.5 试纸条制备与组装

用磷酸缓冲液将 β -内酰胺类抗生素-牛血清白蛋白偶联物稀释到 10 mg/mL, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线 (B), 包被量为 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 用磷酸缓冲液将四环素类抗生素半抗原-牛血清白蛋白偶联物稀释到 10 mg/mL, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线 (T), 包被量为 1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; 用 0.01 mol/L、pH 7.4 PBS 缓冲液将羊抗鼠 IgG 抗体稀释到 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 用 Biodot 点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线 (C), 包被量为 1.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。将包被好的反应膜置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下干燥 2 h, 备用。

将样品吸收垫、反应膜、吸水垫和保护膜依次按顺序黏贴在所述底板上, 样品吸收垫的末端与反应膜始端相连, 反应膜的末端与吸水垫相连, 样品

吸收垫的始端与底板的始端对齐, 吸水垫的末端与底板的末端对齐, 试纸两端黏贴有保护膜, 手柄端保护膜覆盖在吸水垫上, 为手柄端, 反应端保护膜覆盖在样品吸收垫上, 为检测端, 在检测端保护膜上印有 MAX 标记线, 用数控切条机 CT300 切割成 4 mm 宽的试纸条。

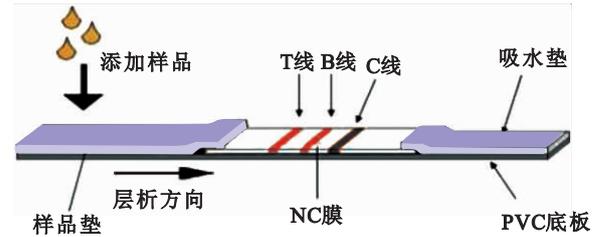


图 1 微孔式试纸条作用原理图
Fig. 1 Principle of the rapid test combo strip

2.6 胶体金结合垫制备与试纸卡组装

将玻璃纤维用 XYZ3000 三维点喷平台系统以 15 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 将胶体金标记的 β -内酰胺类抗生素单克隆抗体和四环素类抗生素单克隆抗体分别点喷在玻璃纤维上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h, 即为胶金垫。用 XYZ3000 三维点喷平台系统以 1.5 $\mu\text{L}/\text{cm}$ 将四环素类抗生素-OVA 偶联抗原 (0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$) 点喷在硝酸纤维素膜上, 即为检测线 (T); 在离检测线 (T) 4 mm 处喷上 β -内酰胺类抗生素-OVA 偶联抗原 (0.3 $\mu\text{g}/\text{L}$), 即为检测线 (B); 在离检测线 (B) 4 mm 处喷上羊抗鼠 IgG (0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$), 即为质控线 (C), 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 h^[13]。取出一块胶板, 将喷有检测线和质控线的硝酸纤维素膜粘贴在中央区, 分别将吸水纸和胶金垫粘贴于硝酸纤维素膜的上方和下方。两者之间重叠约 2 mm; 再在胶金垫的下方粘贴玻璃纤维作为样本垫, 组装成胶体金免疫层析试纸。用数控切条机 CT300 切割成 4 mm 宽的试纸条, 再安装塑料卡壳, 组成试纸卡。

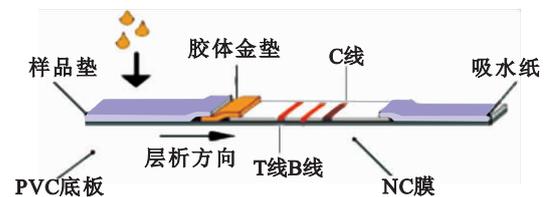


图 2 胶体金结合垫式试纸卡工作原理图
Fig. 2 Principle of the colloidal gold test card

2.7 检测方法

2.7.1 试纸卡 用吸管吸取牛奶溶液垂直滴加 3

~4滴于加样孔。液体流动时开始计时,反应5 min,观察颜色,判定结果。

2.7.2 微孔试纸条 用微量移液器吸取200 μL 待检牛奶样品溶液于微孔中,缓慢抽吸且充分与微孔中试剂混匀。将试纸条插入微孔中-印有“MAX”线端朝下,使之充分浸入溶液中。室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)孵育5 min后,取出试纸条观察颜色,判定结果。

2.8 结果判断

阴性(-):T线和C线都显色,无论颜色深浅均表示牛奶样品中 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素浓度低于检测限。

β -内酰胺类阳性(+):C线和T线显色,B线无显色,表示牛奶样品中 β -内酰胺类抗生素浓度等于或高于检测限。

四环素类阳性(+):C线和B线显色,T线无显色,表示牛奶样品中四环素类抗生素浓度等于或高于检测限。

β -内酰胺类和四环素类阳性(+):C线显色,T、B线无显色,表示牛奶样品中 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素浓度均等于或高于检测限。

无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效。

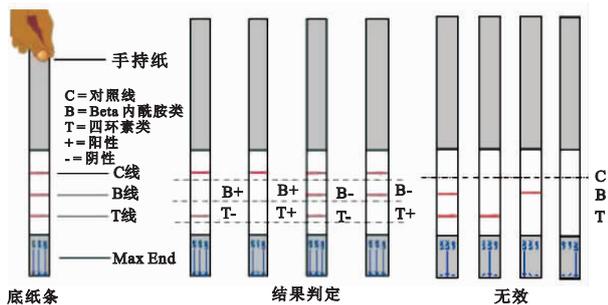


图3 试纸条结果分析示意图

Fig.3 Sketch map of the results by rapid test combo strip

3 结果

3.1 胶体金质量鉴定结果

制备好的胶体金外观纯净、透亮、无沉淀和漂浮物。将胶体金溶液用紫外/可见分光光度计在可见光范围(400~600 nm)扫描,发现仅有一个吸收峰,并且宽度较小,表明制备的胶体金颗粒较均匀,最大吸收峰波长为525.0 nm(见图4),表明其粒度

约为24.4 nm。

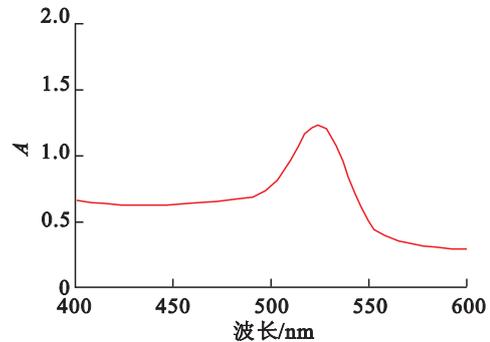


图4 胶体金紫外可见分光光度计扫描图

Fig.4 Determination of colloidal gold by spectrophotometry

3.2 试纸条组装方式选择

取空白清亮牛奶样本6份,在其中添加1、2、3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的青霉素G和40、80、160 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的四环素,分别取微孔试纸条和试纸卡进行检测,每个样本重复测定3次,结果见表1。前期研发过程中采用两种方式处理胶体金标记单克隆抗体,从表1可知,针对金标抗体涂布在结合垫上的试纸卡,用添加标准品的牛奶直接滴加到试纸卡进行测试,青霉素G添加质量浓度为3 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,代表 β -内酰胺类抗生素的B线才达到完全不显色,四环素添加质量浓度为160 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,代表四环素类抗生素的T线仍然显色;针对金标抗体冻干在微孔中的试纸条,用添加标准品的牛奶滴加到微孔试剂中,混匀后用试纸条进行测试,青霉素G添加质量浓度为2 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,代表 β -内酰胺类抗生素的B线达到完全不显色,四环素添加质量浓度为80 $\mu\text{g}/\text{L}$ 时,代表四环素类抗生素的T线达到完全不显色。

对比两种方法的灵敏度,最终确定检测方法为:把金标抗体冻干在微孔中,取牛奶样品先与微孔试剂中金标抗体混匀,再用试纸条进行检测。

3.3 试纸条的检测限

在阴性牛奶中分别添加 β -内酰胺类抗生素浓度为:青霉素G 0、1、2、4 $\mu\text{g}/\text{L}$;氨苄青霉素 0、1.5、3、6 $\mu\text{g}/\text{L}$;阿莫西林 0、2、4、8 $\mu\text{g}/\text{L}$;苯唑青霉素、邻青霉素、双青霉素 0、3、6、12 $\mu\text{g}/\text{L}$;萘夫西林、头孢唑肟 0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{L}$;头孢哌酮 0、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{L}$;头孢曲松 0、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{L}$;头孢噻吩 0、45、90、180 $\mu\text{g}/\text{L}$;头孢洛宁 0、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{L}$;分别添加四环素类抗生素浓度为:四环素、土霉素、强力霉素、氯四环素 0、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。不同浓度的各类

β -内酰胺类抗生素标准品和四环素类抗生素标准品,每个添加浓度做3次平行,然后按照2.7.2项进行检测,观察试纸,判断结果,确定检测限。以只出

现C线时的最低标准品浓度作为试纸条的检测限,试验结果见表2,部分试验结果图片如图6所示。

表1 两种试纸条组装方式检测结果

Tab.1 Detecting results of the two assembling style

金标抗体冻干在微孔中				金标抗体涂布在结合垫上			
青霉素 G 添加质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测结果	四环素添加质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测结果	青霉素 G 添加质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测结果	四环素类添加质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测结果
0	-	0	-	0	-	0	-
1	-	40	-	1	-	40	-
2	+	80	+	2	-	80	-
3	+	160	+	3	+	160	-

根据试验结果,最终确定试纸条的检测限为:青霉素 G 2 $\mu\text{g/L}$ 、氨苄青霉素 3 $\mu\text{g/L}$ 、阿莫西林 4 $\mu\text{g/L}$ 、苯唑青霉素 6 $\mu\text{g/L}$ 、邻青霉素 6 $\mu\text{g/L}$ 、双青霉素 6 $\mu\text{g/L}$ 、萘夫西林 20 $\mu\text{g/L}$ 、头孢唑肟 20 $\mu\text{g/L}$ 、头孢哌酮 40 $\mu\text{g/L}$ 、头孢曲松 50 $\mu\text{g/L}$ 、头孢噻唑 90 $\mu\text{g/L}$ 、头孢洛宁 10 $\mu\text{g/L}$;对四环素类抗生素检测灵敏度为:四环素、土霉素、强力霉素、氯四环素分别为 80 $\mu\text{g/L}$ 。

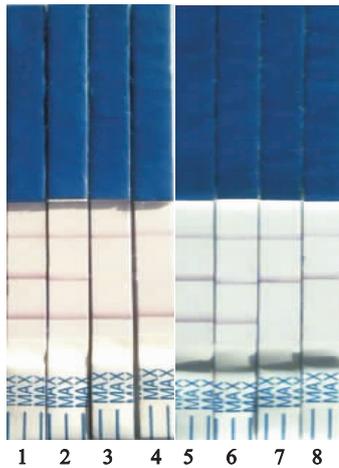
表2 二联试纸条检测限测定结果

Tab.2 Limit of detection results of the rapid test combo strip

抗生素	质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测结果
青霉素 G	0	B: - T: -
	1	B: - T: -
	2	B: + T: -
	4	B: + T: -
氨苄青霉素	0	B: - T: -
	1.5	B: - T: -
	3	B: + T: -
	6	B: + T: -
阿莫西林	0	B: - T: -
	2	B: - T: -
	4	B: + T: -
	8	B: + T: -
苯唑青霉素、邻青霉素、 双青霉素	0	B: - T: -
	3	B: - T: -
	6	B: + T: -
	12	B: + T: -

续表2

抗生素	质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	检测结果
萘夫西林、头孢唑肟	0	B: - T: -
	10	B: - T: -
	20	B: + T: -
	40	B: + T: -
头孢哌酮	0	B: - T: -
	20	B: - T: -
	40	B: + T: -
	80	B: + T: -
头孢曲松	0	B: - T: -
	25	B: - T: -
	50	B: + T: -
	100	B: + T: -
头孢噻唑	0	B: - T: -
	45	B: - T: -
	90	B: + T: -
	180	B: + T: -
头孢洛宁	0	B: - T: -
	5	B: - T: -
	10	B: + T: -
	20	B: + T: -
四环素、土霉素、 强力霉素、氯四环素	0	B: - T: -
	40	B: - T: -
	80	B: - T: +
	160	B: - T: +



注:1-4:青霉素 G 添加质量浓度依次为 0、1、2、4 μg/L;
5-8:四环素添加质量浓度依次为 0、40、80、160 μg/L

图 5 试纸条检测限试验结果

Fig. 5 The limit of detection results of the rapid test combo strip

3.4 试纸条的特异性

将牛奶中常检的其他抗生素、药物和添加剂:克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、三聚氰胺、群勃龙醋酸酯、磺胺二甲基嘧啶、氯霉素、红霉素、链霉素、恩诺沙星用 pH 为 7.2、0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液进行稀释后用所述的试纸条进行检测。每个浓度重复 3 次,判断试纸条的特异性,结果见表 3。

表 3 三联快速检测试纸条的特异性

Tab. 3 Specificity of the rapid test combo strip

检测物质	试纸条检测结果	
	B 线	T 线
青霉素 G	+	-
四环素	-	+
克伦特罗	-	-
莱克多巴胺	-	-
沙丁胺醇	-	-
三聚氰胺	-	-
群勃龙醋酸酯	-	-
磺胺二甲基嘧啶	-	-
氯霉素	-	-
红霉素	-	-
链霉素	-	-
恩诺沙星	-	-

结果显示:克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、三聚氰胺、群勃龙醋酸酯、磺胺二甲基嘧啶、氯霉素、红霉素、链霉素、恩诺沙星在添加质量浓度为 500 μg/L 时,检测结果显示,试纸条 B 线、T 线、C 线均显色明显,结果为阴性,表明试纸条与以上药物无交叉反应。

3.5 试纸条稳定实验

将制备好的试纸条置于 4 °C 和 37 °C,做稳定性试验。保存于 4 °C 的试纸条,前 6 个月每月做 1 次试验;后 9 个月每 3 个月做 1 次试验。保存于 37 °C 的试纸条,每 7 天做 1 次试验。每次试验的检测样本为:青霉素 G 添加质量浓度为 1、2、4 μg/L 的牛奶样本,四环素添加质量浓度为 40、80、160 μg/L 的牛奶样本。

保存于 4 °C 的试纸条,12 个月前,青霉素 G 在浓度为 2、4 μg/L;四环素在质量浓度为 80、160 μg/L 时,均得到阳性结果,梯度明显,试纸条的稳定性很好;12 个月后,部分试纸条的稳定性开始下降,整体颜色变浅,不能正确判定检测结果,已无法检测样品。保存于 37 °C 的试纸条,98 d 前,青霉素 G 在浓度为 2、4 μg/L;四环素在质量浓度为 80、160 μg/L 时,均得到阳性结果,梯度明显,试纸条的稳定性很好;98 d 后,部分试纸条的稳定性开始下降,整体颜色变浅,不能正确判定检测结果,已无法检测样品。最终试验结果表明,试纸条在 4 °C 干燥的条件下可存放 12 个月。

3.6 重复性观察

取快速检测试纸条检测青霉素 G 和四环素阳性和阴性牛奶样品各 3 份,每个样品重复 8 次,观察检测结果,确定试纸条重复性。

试纸条检测显示,青霉素 G 阳性样品检测结果均为阳性,阴性样品检测结果均为阴性;四环素阳性样品检测结果均为阳性,阴性样品检测结果均为阴性,试纸条检测试验并未出现错误结果,因此试纸条的假阴性率为 0,假阳性率为 0。

3.7 有效性的验证

液相色谱-串联质谱法验证试纸条检测方法的有效性。在试纸条检测中,以不含 β-内酰胺类抗生素和四环素类抗生素的空白溶液作为参照点,向阴性样品中添加系列浓度的青霉素 G 和四环素,按照本文 2.7.2 节方法处理,然后进行检测。若试纸条 B 线不显色,则表明青霉素 G 质量浓度大于等于 2

$\mu\text{g/L}$,为阳性;若试纸条 B 线与参照点颜色相同,则表明青霉素 G 质量浓度小于 $2 \mu\text{g/L}$,为阴性;若试纸条 T 线不显色,则表明四环素浓度大于等于 $80 \mu\text{g/L}$,为阳性;若试纸条 T 线与参照点颜色相同,则表明四环素浓度小于 $80 \mu\text{g/L}$,为阴性。对牛奶样品按照表 4 做添加试验,每个浓度做 3 个平行,同时进行 LC-MS/MS 和胶体金试纸条的检测,比较结果见表 4,部分试验结果图片如图 6 所示。

如表 4 所示,按照 LC-MS/MS 对快速检测胶体金试纸条结果进行有效性验证。结果显示,在试纸条检测范围内,试纸条检测结果与 LC-MS/MS 检测结果一致。

表 4 LC-MS/MS 及试纸条测定结果比较

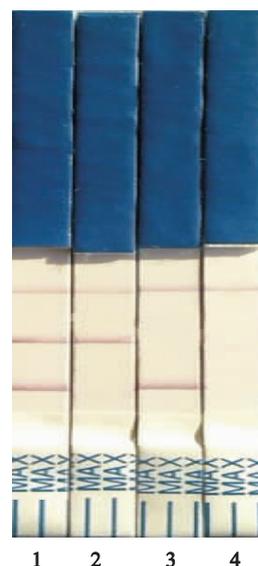
Tab. 4 Comparison of detection results between LC-MS/MS and combo strip

添加 抗生素	添加 质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	LC-MS/MS 检测结果/ ($\mu\text{g/L}$)	试纸条 检测结果	
青霉素 G	1	*	B: -	T: -
	2	1.87	B: +	T: -
	4	3.76	B: +	T: -
四环素	40	*	B: -	T: -
	80	77.61	B: -	T: +
	160	149.53	B: -	T: +
青霉素 G+ 四环素	1+40	*	B: -	T: -
	1+80	* / 76.57	B: -	T: +
	1+160	* / 151.16	B: -	T: +
	2+40	1.90 / *	B: +	T: -
	2+80	1.84 / 75.25	B: +	T: +
	2+160	1.71 / 149.10	B: +	T: +
	4+40	3.57 / *	B: +	T: -
4+80	3.60 / 75.89	B: +	T: +	
4+160	3.64 / 157.19	B: +	T: +	

注: *: 无检测结果; -: 阴性; +: 阳性。

4 结 语

近 20 年来,奶牛养殖业滥用抗生素的比例连年攀升,从而引起牛奶中严重的兽药残留,成为严重的食品安全问题。鉴于各类抗生素滥用的全球



注: 1: 青霉素 G $1 \mu\text{g/L}$ + 四环素 $40 \mu\text{g/L}$, 2: 青霉素 G $1 \mu\text{g/L}$ + 四环素 $80 \mu\text{g/L}$, 3: 青霉素 G $2 \mu\text{g/L}$ + 四环素 $40 \mu\text{g/L}$, 4: 青霉素 G $2 \mu\text{g/L}$ + 四环素 $80 \mu\text{g/L}$

图 6 部分与仪器比对试验结果图

Fig. 6 Part of results about comparison test with instrument

化趋势,检测工作就显得格外重要。目前检测 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素的主要方法为微生物法、分光光度法、薄层色谱法、酶联免疫法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法和 ELISA 法,这些方法虽然有较高的灵敏度,但需要昂贵的设备和仪器,同时检测时间相对快速检测试纸条较长,限制了其应用范围。

作者采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金。紫外扫描观察其颗粒大小均一,平均直径为 24.4 nm 。以胶体金分别标记 β -内酰胺类抗生素单克隆抗体和四环素类抗生素单克隆抗体,建立并优化胶体金免疫层析法同时快速检测 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素的方法,成功地检测牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素残留。样品中 β -内酰胺类抗生素检测限为:青霉素 G $2 \mu\text{g/L}$ 、氨苄青霉素 $3 \mu\text{g/L}$ 、阿莫西林 $4 \mu\text{g/L}$ 、苯唑青霉素 $6 \mu\text{g/L}$ 、邻青霉素 $6 \mu\text{g/L}$ 、双青霉素 $6 \mu\text{g/L}$ 、萘夫西林 $20 \mu\text{g/L}$ 、头孢唑肟 $20 \mu\text{g/L}$ 、头孢哌酮 $40 \mu\text{g/L}$ 、头孢曲松 $50 \mu\text{g/L}$ 、头孢噻吩 $90 \mu\text{g/L}$ 、头孢洛宁 $10 \mu\text{g/L}$;四环素类抗生素检测限为:四环素、土霉素、强力霉素、氯四环素分别为 $80 \mu\text{g/L}$,能够满足我国对 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素在牛奶中最高

残留量的检测要求。

在检测阳性样品时,试纸条检测线不显色,而空白对照显色很深,所以阳性样品检测线与空白对照检测线形成明显反差,通过目测即可直接判定结果。样品前处理方法简便,快速,稳定性好。由于测定操作简单,不需添加其他试剂和孵育洗涤步骤,大大地提高了检测效率,十分适合现场快速检

测。尽管此方法目前还只能达到半定量,但作为一种快速筛查的手段,可以有效地弥补广大基层单位因设备和经费问题而无法开展牛奶中多种 β -内酰胺类抗生素和多种四环素类抗生素的检测和监控,具有一定的经济价值和社会价值。可用作牛奶中 β -内酰胺类抗生素和四环素类抗生素检测的快速定性筛选,但对于阳性结果需用其他方法进一步确认。

参考文献(References):

- [1] 张守钊,刘小康. β -内酰胺类抗生素后效应的研究进展[J]. 四川生理科学杂志. 2008, 30(1): 17-20.
ZHANG Shou-chai, LIU Xiao-kang. Progressions in post antibiotics effect of the β -lactam antibiotics[J]. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2008, 30(1): 17-20. (in Chinese)
- [2] 谢会玲,陈伟,彭池方,等. 动物源食品中 β -内酰胺类抗生素多残留免疫分析方法研究进展[J]. 食品科学. 2008, 29(7): 490-494.
XIE Hui-ling, CHEN Wei, PENG Chi-fang, et al. Research progress of multi-residues immunoassay of β -lactam antibiotic in food of animal origin[J]. *Food Science*, 2008, 29(7): 490-494. (in Chinese)
- [3] 白国涛,储晓刚,潘国卿,等. β -内酰胺类抗生素残留检测技术研究进展[J]. 食品科学. 2008, 29(07).
BAI Guo-tao, CHU Xiao-gang, PAN Guo-qing, et al. Research development of detection techniques for β -lactam antibiotics residues[J]. *Food Science*, 2008, 29(07): 485-489. (in Chinese)
- [4] Kantiani L, Farre M, Sibum M et al. Fully automated analysis of β -lactams in bovine milk by online solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(11): 4285-4295.
- [5] 黄晓蓉,于竞,郑晶,等. 牛奶中 β -内酰胺类抗生素残留的快速检测方法[J]. 中国乳品工业. 2004, 32(2): 44-47.
HUANG Xiao-rong, YU Jing, ZHENG Jing, et al. The study of rapid impedance method for detecting beta-lactam antibiotic residues in milk[J]. *China Dairy Industry*, 2004, 32(2): 44-47. (in Chinese)
- [6] 王明华,叶尊忠,王剑平. β -内酰胺类抗生素残留检测的生物传感器研究进展[J]. 食品与生物技术学报. 2010, 29(006): 801-808.
WANG Ming-hua, YE Zun-zhong, WANG Jian-ping. Biosensor for β -Lactam antibiotics residue detection-A review[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(006): 801-808. (in Chinese)
- [7] 卢运战,祁克宗,朱良强. 四环素类药物残留检测方法研究进展[J]. 家禽科学. 2006, (10): 36-39.
LU Yun-zhan, Qi Ke-zong, Zhu Liang-qiang. Research progression of tetracycline residue detection[J]. *Poultry Science*, 2006, (10): 36-39. (in Chinese)
- [8] 莫玉琳. 饲料中四环素的分析方法研究[D]: 华中科技大学; 2007.
- [9] 农业部. 动物性食品中兽药残留最高限量[J]. 中国兽药杂志. 2003, 37(4): 15-20.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. The highest Limited of the veterinary drug residues in animal food[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2003, 37(4): 15-20. (in Chinese)
- [10] 闫小峰. 四环素类抗生素残留检测方法研究进展[J]. 中国兽药杂志. 2010, 44(005): 47-50.
YAN Xiao-feng. Research progress of determination methods for tetracyclines antibiotic residues[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2010, 44(005): 47-50. (in Chinese)
- [11] 郁蓉,王岁楼. 原料奶安全检测及质量控制的研究进展[J]. 乳业科学与技术. 2009, 32(006): 289-293.
YU Rong, WANG Sui-lou. Research on the safety detection and quality control of the raw milk[J]. *Journal of Dairy Science and Technology*, 2009, 32(006): 289-293. (in Chinese)
- [12] 吴芸敏,唐玉龙. 抗生素检测试纸卡把关原奶收购[J]. 食品安全导刊. 2008, (004): 48-49.
WU Yun-min, TANG Yu-long. Control antibiotics in raw milk use rapid test card[J]. *China Food Safety Magazine*, 2008, (004): 48-49. (in Chinese)
- [13] 李井泉,毛秀君,王周平,等. 纳米金标记黄曲霉毒素 B1 新型检测方法[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(5): 675-681.
LI Jing-quan, MAO Xiu-jun, WANG Zhou-ping, et al. Nanogold labeling based novel detection method for aflatoxin B1 [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2009, 28(5): 675-681. (in Chinese)
- [14] 李康,桑丽雅,卜令杰,等. 三聚氰胺单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 食品与生物技术学报. 2011, 30(1): 156-160.
LI Kang, SANG Li-ya, BO Ling-jie, et al. Production and identification of monoclonal antibodies to melamine[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2011, 30(1): 156-160. (in Chinese)