

胶体金免疫层析法快速检测动物源食品中的诺氟沙星

陈文硕¹, 温宇浩², 娄婷婷³, 潘红蕊^{*1}, 李金花^{*2}(1.天津海关工业产品安全技术中心,天津 300457;2.中国科学院烟台海岸带研究所
海岸带生态环境监测技术与装备山东省工程研究中心 山东省海岸带环境过程重点实验室,
山东 烟台 264003;3.天津科技大学 生物工程学院,天津 300222)

摘要:胶体金免疫层析法具有高特异性、高灵敏度、高重复性等特点,能够准确地检测出样品中的目标物,在快速检测领域具有广泛应用。本研究将胶体金免疫层析法用于快速检测动物源食品(猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉、鸡蛋)中的诺氟沙星(Norfloxacin, NOR)残留,对方法进行验证,相对准确度为 97.0%。方法的检出限为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,检测性能强。在上述 5 种不同基质样品中,NOR 胶体金快速检测方法的灵敏度为 99%、特异度为 98%、假阳性率为 2%、假阴性率为 1%。该方法简单快速、灵敏准确,适于复杂基质中 NOR 的快速精准检测。

关键词:胶体金免疫层析法;诺氟沙星;方法验证;动物源食品;快速检测

中图分类号: O657.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-3283(2025)01-0092-05

DOI: 10.13822/j.cnki.hxsj.2024.0329

Rapid Detection of Norfloxacin in Animal-Derived Foods by Colloidal Gold Immunochromatography CHEN Wen-shuo¹, WEN Yu-hao², LOU Ting-ting³, PAN Hong-rui^{*1}, LI Jin-hua^{*2} (1.Industrial Product Safety Technology Center, Tianjin Customs, Tianjin 300457, China; 2.Shandong Key Laboratory of Coastal Environmental Processes, Coastal Zone Ecological Environment Monitoring Technology and Equipment Shandong Engineering Research Center, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China; 3.School of Bioengineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300222, China)

Abstract: Colloidal gold immunochromatography has the characteristics of high specificity, high sensitivity, and high repeatability, which can accurately detect the targeted analytes in the samples, and has a wide range of applications in the field of rapid detection. This study used colloidal gold immunochromatography to rapidly detect norfloxacin (NOR) residues in animal-derived foods (pork, chicken, fish, shrimp, and eggs) and validated the method with a relative accuracy of 97.0%. The limit of detection was down to 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, showing high detectability. By testing the above-mentioned five different matrix samples, the NOR colloidal gold rapid detection method attained a sensitivity of 99%, specificity of 98%, false positive rate of 2%, and false negative rate of 1%. This method proved simple, rapid, sensitive, and accurate, and thereby was practically applicable for the rapid, precise detection of NOR in complicated matrices.

Key words: colloidal gold immunochromatography; norfloxacin; method validation; animal-derived foods; rapid detection

诺氟沙星(Norfloxacin, NOR)是第三代氟喹诺酮类药物(化学名:1-乙基-6-氟-1,4-二氢-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-3-喹啉羧酸),属于广谱类抗生素^[1-3]。NOR在动物体内很难完全降解,大部分会在动物体内聚集、残留,人们食用含有NOR抗生素的肉制品和乳制品会引起包括致畸致癌等一系列不良反应^[4-7]。2015年9月1日,农业部发布第2292号公告,禁止在食品动物中使用洛美沙星(Lomefloxacin, LOM)、培氟沙星(Pefloxacin, PEF)、氧氟沙星(Ofloxacin, OFL)、NOR等4种原料药的各种盐、脂及其各种制剂。《食品安全国家标准 食品中 41 种兽药最大残留限量》

(GB 31650.1)^[8]中规定NOR等的最大残留限量为2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

NOR现行检测方法以高效液相色谱法(HPLC)^[9-13]和超高效液相色谱串联质谱法

收稿日期:2024-06-12;修回日期:2024-08-07

基金项目:海关总署课题项目(2023HK084);天津市科技支撑重点项目(20YFZCSN00630);国家自然科学基金项目(22176210);山东省自然科学基金项目(ZR2020KC032)。

作者简介:陈文硕(1985-),男,天津人,硕士,高级工程师,主要研究方向为食品安全检测技术。

通讯作者:潘红蕊, E-mail: lizzy@sina.com; 李金花, E-mail: jhli@yic.ac.cn。

(UHPLC-MS/MS)^[14,15]等仪器方法为主。例如,李存等^[9]使用 HPLC-荧光-紫外法测定了动物肌肉组织中的 NOR 残留,Zhang 等^[15]使用 UHPLC-MS/MS 测定了鸡肉和鸡蛋中的 NOR 含量。然而,色谱质谱法检测 NOR,所需仪器设备较为昂贵复杂,检测周期较长,不适用于现场检测。因此,迫切需要发展针对 NOR 残留现场检测的快速、准确的方法和技术。

胶体金免疫层析法,基于抗原抗体特异性结合的免疫学反应原理,利用有颜色的纳米金为标记物,在层析过程中,样品中的 NOR 经提取与胶体金标记的特异性抗体结合,抑制了抗体和检测卡中检测 T 线上抗原的结合,从而导致 T 线颜色深浅的变化。通过 T 线与固定颜色的控制 C 线颜色深浅比较,对样品中 NOR 进行定性和定量判定,以实现快速检测^[16-20]。

本文建立了动物源食品中 NOR 的胶体金快速检测方法。选择鸡肉、猪肉、鱼肉、虾肉、鸡蛋等食品基质,按照国家市场监督管理总局《总局关于规范食品快速检测方法使用管理的意见》对方法的检出限(Limit of detection, LOD)、精密度、准确度、假阳性率、假阴性率、交叉反应率以及参与参比方法的一致性进行评价。本方法的使用可以满足基层监管部门和生产企业对动物源性食品中 NOR 的控制要求。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Mettler Toledo XPR105 型电子天平(瑞士 Toledo 公司);NOR 胶体金免疫层析试剂盒(包含金微孔、胶体金检测卡及配套的试剂,山东美正生物科技有限公司)。

乙腈(CH_3CN , 美国默克公司);磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、一水柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)(天津市光复科技发展有限公司);所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的二级水。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NOR 标准储备液:精密称取 10 mg NOR 参考物质置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀。 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,有效期 3 个月。

1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NOR 标准工作液:精密量取 1 mL NOR 标准储备液置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇

稀释至刻度,摇匀。临用新制。

1.2.2 稀释液的配制

称取 28.4 g Na_2HPO_4 加水溶解,移入 1 000 mL 容量瓶,加水稀释至刻度混匀,得 0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液;称取 21.01 g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 加水溶解,移入 1 000 mL 容量瓶,加水稀释至刻度混匀,得 0.1 mol/L 柠檬酸溶液;取 136.3 mL(0.2 mol/L)的 Na_2HPO_4 溶液和 73.7 mL(0.1 mol/L)的柠檬酸溶液混匀制成稀释液。

1.2.3 试样制备

鱼虾等水产品、畜禽:去皮、脂肪,取组织均质;禽蛋:样本去壳,取蛋黄与蛋清混匀,称取 3.0 g 试样置于 50 mL 离心管中;加入 4 mL CH_3CN 溶液,剧烈振荡 2 min,于室温、4 000 r/min 离心 2 min。移取 1.5 mL(虾蟹、禽蛋:2 mL)上层溶液,60 $^\circ\text{C}$ 吹干;加入 0.5 mL(虾、禽蛋:0.2 mL)稀释液,涡旋 2 min,即为待测液。同法制备空白试样溶液

1.2.4 测定

取 100 μL 待测液于微孔试剂中,缓慢抽吸约 5~6 次,至样品与微孔试剂混匀,开始计时;室温(20~25 $^\circ\text{C}$)孵育 2 min,吸取微孔中全部液体于加样孔中或插入试纸条,操作同时开始计时,室温反应 5 min 后即可判读结果。

1.2.5 质控试验

质控试验包括空白试验和加标质控试验。空白试样经参比方法检测且未检出恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)、PEF、LOM 和 OFL。

加标质控试验:称取 3 g(精确至 0.1 g)空白试样置于 50 mL 离心管中,加入 6 μL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) NOR 标准工作液,使样品中 NOR 浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$,按照 1.2.4 步骤与样品同法操作。更换快检试剂品牌、批次时,均应进行空白试验和加标质控试验。

2 结果与讨论

2.1 制备/合成条件优化

在规定时间内,通过比较 T 线与 C 线的颜色深浅进行结果判定。检测卡目视判定结果如图 1 所示,试纸条目视判定结果方法与检测卡相同。

当 C 线不显色,表示存在不正确的操作过程或检测卡已变质失效,结果无效。在此情况下,应再次仔细阅读说明书,并用新的检测卡重新测试。当 T 线显色比控制线 C 线浅,或 T 线无显色,表

示样品中 NOR 残留的浓度高于 LOD, 为阳性结

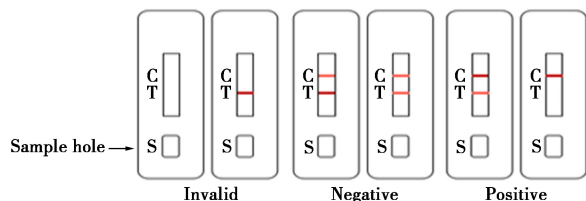


图 1 检测卡结果目视判定示意图

Fig.1 Schematic diagram for visual judgment of test card results

果。T 线显色比 C 线越浅, 表示样品中 NOR 残留的浓度越高。

2 条紫红色条带出现表示阴性结果。T 线显色比 C 线深或一样深, 表示样品中无 NOR 残留或其浓度低于 LOD。

2.2 两种方法结果比对

我国现行 NOR 检测标准包括 GB/T 20366—2006《动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[21]、农业部 1077 号公告-1-2008《水产品中 17 种磺胺类及 15 种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》^[22] 等。本实验选取 GB/T 20366—2006 标准作为参比方法, 定量限为 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在市场随机抽取鸡肉、猪肉、鱼肉、虾肉、鸡蛋各 20 份, 分别使用 GB/T 20366—2006 和 NOR 胶体金免疫层析法进行检测, 考察不同基质样品中 2 种方法结果的一致性和相对准确度。

为考察 NOR 快速检测方法与参比方法的一致性, 采用卡方检验, 自由度为 1, 分位数为 0.05。当 $\chi^2 < 3.84$ 时, 表示快速检测方法与参比方法的阳性确证比率在 95% 的置信区间内没有显著性差异; 当 $\chi^2 > 3.84$ 时, 表示 2 种方法的阳性确证比率在 95% 的置信区间内有显著性差异。卡方值的计算方法如公式 (1) 所示。

$$\chi^2 = (|N_{12} - N_{21}| - 1)^2 / (N_{12} + N_{21}) \quad (1)$$

其中: N_{12} 是阳性样品检出阴性结果数; N_{21} 是阴性样品检出阳性结果数。

相对准确度计算公式为:

$$AC = [(N_{11} + N_{22}) / (N_1 + N_2)] \times 100\% \quad (2)$$

其中: AC 是相对准确度; N_{11} 是 2 种方法均检出阳性结果数; N_{22} 是 2 种方法均检出阴性结果数; N_1 是阳性样品数; N_2 是阴性样品数。

快速检测方法与参比方法 (GB/T 20366—2006) 所测结果的统计如表 1 所示。

对 5 种不同基质检测了 100 批次样品, 只有

表 1 2 种方法对 5 种不同基质中 NOR 残留的检测统计结果

Tab.1 Statistics of detection results of NOR residues in five different matrices by two methods

Chi-square test		Rapid detection method		Total
		positive(+)	negative(-)	
Reference method	positive(+)	4	0	4
	negative(-)	3	93	96
Total		7	93	100

3 批次样品的快检方法与参比方法检测结果不一致, 3 批次均为假阳性, 因此相对准确度为 97.0%。假阳性可能由于环境因素和操作因素等多方面造成。同时, 通过计算得 $\chi^2 = 1.33 < 3.84$, 即两种方法无显著差异, 具有一致性, 证明所构建的方法具有良好的准确度。

2.3 方法性能评价

2.3.1 灵敏度

测定 NOR 不同浓度 (0、0.5、1、2、4、6 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 的标准品, 结果如图 2 所示。当浓度 $< 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, T 线产生明显色差, 而 C 线几乎无颜色变化, 此时无法通过颜色确定 NOR 的精准浓度。当测定 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 NOR 标准品时, T 线与 C 线呈现明显色差, 因此灵敏度确定为 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。



图 2 灵敏度实验结果

Fig.2 Experimental results of sensitivity test

2.3.2 检出限

在经验证结果为阴性的样品中, 分别加入适量的 NOR 标准溶液, 使得加标浓度分别为 0、0.5、1、1.5、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每个浓度水平检测 10 批次样品, 计算其灵敏度, 当灵敏度达到 100% 时, 对应的浓度即为本方法的 LOD。计算公式如下:

$$p_+ = (N_{11} / N_1) \times 100\% \quad (3)$$

其中: p_+ 是灵敏度; N_{11} 是检出阳性结果数; N_1 是阳性样品检测实验的总检测数。

NOR 胶体金免疫层析快速检测方法的 LOD 与灵敏度的检测结果如表 2 所示。在 5 种不同基质样品中, 当在样品中添加 NOR 标准液浓度 $< 2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 无法检测到任何阳性结果, 此时灵

敏度均为 0%。当加入 NOR 标准液浓度为 2 μg/kg 时,灵敏度为 100%。因此,本方法的 LOD 为 2 μg/kg。

表 2 LOD 与灵敏度的检测结果

Tab.2 LOD and sensitivity detection results				
Matrix	Concentration/ (μg·kg ⁻¹)	Detection results		Sensitivity/ %
		positive(+)	negative(-)	
Chicken	0	0	10	0
	0.5	0	10	0
	1.0	0	10	0
	1.5	4	6	40
	2.0	10	0	100
Pork	0	0	10	0
	0.5	0	10	0
	1.0	2	8	20
	1.5	7	3	70
	2.0	10	0	100
Fish	0	0	10	0
	0.5	0	10	0
	1.0	3	7	30
	1.5	8	2	80
	2.0	10	0	100
Shrimp meat	0	0	10	0
	0.5	0	10	0
	1.0	2	8	20
	1.5	6	4	60
	2.0	10	0	100
Egg	0	0	10	0
	0.5	0	10	0
	1.0	1	9	10
	1.5	6	4	60
	2.0	10	0	100

2.3.3 特异度、假阳性率与假阴性率

通过对本方法的特异性、假阳性率和假阴性率进行评价。灵敏度的计算公式如下:

$$p = [a / (a + b)] \times 100\% \tag{4}$$

其中:p 是灵敏度;a 是真阳性数;b 是假阴性数。

特异性的计算公式如下:

$$q = [c / (c + d)] \times 100\% \tag{5}$$

其中:q 是特异性;c 是真阴性数;d 是假阳性数。

在 ENR、PEF、LOM、OFL 结果均为未检出的鸡肉、猪肉、鱼肉、虾肉、鸡蛋样品中,添加 LOD 水平的 NOR 标准溶液进行检测,每种基质中加标样品 20 批、阴性样品 20 批,结果如表 3 所示。

在 5 种不同基质样品中,NOR 胶体金快速检测层析法的灵敏度为 99%、特异性为 98%、假阳性率为 2%、假阴性率为 1%。证明该方法具有良好的灵敏度、特异性和准确性。

表 3 对不同样品中 NOR 的检测结果

Tab.3 Detection results of NOR in different samples			
Sample	Add concentration/ (μg·kg ⁻¹)	Detection results	
		positive(+)	negative(-)
Chicken	0	0	20
	1	20	0
Pork	0	1	19
	1	19	1
Fish	0	0	20
	1	20	0
Shrimp meat	0	1	19
	1	20	0
Egg	0	0	20

3 结论

通过胶体金免疫层析法快速检测动物源性食品猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉、鸡蛋中 NOR 残留,对 NOR 胶体金免疫层析法进行了方法验证。因此,胶体金免疫层析法可以作为现场或者基层实验室的大采样量快速初筛方法,有效避免含有此类物质的动物源性食品的流通威胁人们的健康。同时,该研究也为快速检测复杂基质中的抗生素提供了普适性思路和产品。该研究仅利用比色法进行可视化检测,暂未利用仪器进行精准定量,后续可以对可疑样品加强仪器分析。该方法不仅可以针对食品分析,而且可以拓展到环境和生物样品等其他复杂样品的分析,前景广阔。

参考文献:

[1] Wen Y H, Sun D N, Zhang Y, Zhou N, Liu H T, Li J H, Zhuang X M. *Chem. Reagents*, 2022, **44**(9): 1 334-1 341.
温宇浩, 孙大妮, 张悦, 周娜, 刘惠涛, 李金花, 庄旭明. *化学试剂*, 2022, **44**(9): 1 334-1 341.

[2] Qiu Y S, Wu J. *Chin. J. Veterin. Med.*, 1998, **3**: 47-49.
邱银生, 吴佳. *中国兽药杂志*, 1998, **3**: 47-49.

[3] Zhao G L, Zhang Y, Sun D N. *Molecules*, 2023, **28**(1): 335.

[4] Liu X, Steele J C, Meng X Z. *Environ. Pollut.*, 2017, **223**: 161-169.

[5] Wang Y N, Jason C K K, Chan W. *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**(21): 4 255-4 261.

[6] Takahashi M, Iizuka S, Watanabe T. *Cancer Lett.*, 2000, **156**(2): 177-184.

[7] Auro A, Sumano H, Ocampo L. *Pharmacogenomics J.*, 2004, **4**(1): 24-28.

[8] GB 31650.1—2022. National Food Safety Standard—Max-

- imum Residue Limits for 41 Veterinary Drugs in Foods, 2023-02-01.
- GB 31650.1—2022.食品安全国家标准食品中 41 种兽药最大残留限量, 2023-02-01.
- [9] Li C, Jiang H Y, WU Y L. *Anal. Chem.*, 2009, **37**(8): 1 102-1 106.
- 李存, 江海洋, 吴银良. 分析化学, 2009, **37**(8): 1 102-1 106.
- [10] Rodziew L. *J. Chromatogr. B*, 2008, **864**(1/2): 156-160.
- [11] Chu P S, Lopez M I. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**(6): 2 129-2 135.
- [12] Chen J, Qiu H D. *Hydrography*, 2023, **41**(10): 825-834.
- 陈佳, 邱洪灯. 色谱, 2023, **41**(10): 825-834.
- [13] Aldeed F, Hsieh K C, Ugochukwu O N. *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **66**(20): 5 018-5 030.
- [14] Zhang Y B, Qiao H O, Chen C. *Food Chem.*, 2016, **192**: 612-617.
- [15] Zhang Z W, Wu Y P, Li X W. *Food Chem.*, 2017, **217**: 182-190.
- [16] Qian S Z, Bau H H. *Anal. Biochem.*, 2004, **326**(2): 211-224.
- [17] Bahadr E B, Sezgintürk M B. *TrAC-Trends Anal. Chem.*, 2016, **82**: 286-306.
- [18] Sajid M, Kawde A N, Daud M. *J. Saudi Chem. Soc.*, 2015, **19**(6): 689-705.
- [19] Wei D, Liu Y. *J. Nuclear Agricul. Sci.*, 2012, **26**(9): 1 278-1 283.
- 魏东, 刘英. 核农学报, 2012, **26**(9): 1 278-1 283.
- [20] Chen Y M. *Chin. J. Animal Husband. Veterin. Med.*, 2017, **33**(5): 215.
- 陈一鸣. 中国畜牧兽医文摘, 2017, **33**(5): 215.
- [21] GB/T 20366—2006. Method for the Determination of Quinolones in Animal Tissues-LC-MS/MS Method, 2006-09-01.
- GB/T 20366—2006. 动物源产品中喹诺酮类残留量的测定 液相色谱-串联质谱法, 2006-09-01.
- [22] GB 1077-1—2008. Simultaneous Determination of 17 Sulfonamides and 15 Quinolones Residues in Aquatic Products by LC-MS/MS Method, 2008-08-12.
- GB 1077-1—2008. 水产品中 17 种磺胺类及 15 种喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法, 2008-08-12.