

胶体金免疫层析法测定牛奶中 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留

孙志文¹, 陶光灿², 罗晓琴², 赵正苗², 崔廷婷²

(1.北京市兽药监察所, 北京 100107; 2.北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206)

摘要: 应用胶体金免疫层析法对牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留进行检测, 考察该法的灵敏度、假阳性率、假阴性率、特异性及准确性。结果表明: 用胶体金免疫层析法测定牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺, 检测限分别为青霉素 G 2 μ g/L、氨苄青霉素 3 μ g/L、阿莫西林 4 μ g/L、苯唑青霉素 6 μ g/L、邻氯青霉素 6 μ g/L、双氯青霉素 6 μ g/L、萘夫西林 20 μ g/L、头孢唑肟 20 μ g/L、头孢哌酮 40 μ g/L、头孢曲松 50 μ g/L、头孢噻吩 90 μ g/L、头孢洛宁 10 μ g/L、三聚氰胺 50 μ g/L, 假阳性率不大于 5%, 假阴性率为 0; 方法特异性较好, 与牛奶中常见的其他抗生素无交叉反应; 结果准确可靠, 对实际样本的检测方法与液相色谱-质谱/质谱法基本一致。该方法简便、快速、准确、稳定, 可作为牛奶中 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留现场快速检测的一种有效手段。

关键词: 牛奶; β -内酰胺类抗生素; 三聚氰胺; 胶体金免疫层析法

Detection of β -Lactam Antibiotics and Melamine Residues in Milk by Colloidal Gold Immunochromatographic Assay

SUN Zhi-wen¹, TAO Guang-can², LUO Xiao-qin², ZHAO Zheng-miao², CUI Ting-ting²

(1. Beijing Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100107, China;

2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co. Ltd., Beijing 102206, China)

Abstract: A colloidal gold immunochromatographic assay (GICA) was used to detect the residues of β -lactam antibiotics and melamine in milk. The sensitivity, false positive rate (FPR), false negative rate (FNR) and specificity of the method were studied. The results showed that the detection limit of the method was 2 μ g/L for penicillin G, 3 μ g/L for ampicillin, 4 μ g/L for amoxicillin, 6 μ g/L for oxacillin, 6 μ g/L for cloxacillin, 6 μ g/L for dicloxacillin, 20 μ g/L for nafcillin, 20 μ g/L for cefquinome, 40 μ g/L for cefoperazone, 50 μ g/L for ceftriaxone, 90 μ g/L for ceftiofur, 10 μ g/L for cefalonium, and 50 μ g/L for melamine. The FPR was less than 5%, and FNR was 0. The specificity was good and there was no cross-reactivity with any other antibiotics in milk. The results of GICA and liquid chromatographic tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) were basically consistent. This method is simple, rapid, accurate and stable, and suitable for the on-site rapid detection of β -lactam antibiotics and melamine residues in milk.

Key words: milk; β -lactam antibiotics; melamine; gold immunochromatographic assay

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-5187(2012)03-0039-04

β -内酰胺类抗生素(β -lactam)是一类化学结构中具有抗菌活性基团“四元 β -内酰胺环”的抗生素的总称, 主要包括青霉素类和头孢菌素类, 常用于控制奶牛的乳房炎, 治疗和预防动物尿道、胃肠道和呼吸道感染^[1]。但管理混乱或使用不当等原因容易使其残留在食用组织中, 进而通过食物链危害人类健康, 人体长期摄入含有该残留的食物易导致细菌耐药性增加、过敏反应和体内菌群失调等症^[2-3]。目前, β -内酰胺类抗生素

的检测方法依据原理不同, 大致可分为微生物分析法^[4]、仪器分析法^[5-7]和免疫分析法^[8]。三聚氰胺(melamine)是一种三嗪类含氮杂环有机化合物, 被用作化工原料。具有肾毒性, 可导致肾脏结石及急性肾脏疾病, 还可能对来自其他器官的细胞产生毒性作用, 包括神经系统^[9], 因此不可用于食品加工或食品添加物。但由于其分子中含有大量氮元素, 不法商家将其添加在食品和饲料中以提高蛋白质含量, 进而对人体造成严重危害。目前食

收稿日期: 2012-03-20

作者简介: 孙志文(1976—), 男, 兽医师, 硕士, 主要从事兽药残留检测研究。E-mail: sunzw673@sohu.com

品中三聚氰胺残留的检测方法主要为仪器分析法^[10-11]和免疫分析法^[12]。

在以上检测方法中,微生物法由于具备抑菌作用的抗生素种类繁多,且食品基质中的干扰物质多,容易出现假阳性结果,且缺乏特异性;仪器分析法主要包括高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatographic-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)等,灵敏度高,但存在检测成本高、仪器设备复杂、对操作人员要求较高、耗时长等缺点;现常用的免疫分析法包括酶联免疫检测法和放射免疫分析法,由于具有快速、灵敏、特异等特点常用于检测 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺,但两者前处理过程较为复杂,对于现场大规模筛查样品还存在着一定局限性。胶体金免疫层析技术(gold immunochromatographic assay, GICA)是近年来发展迅速的一项免疫标记技术,它以抗原抗体特异性结合为基础、大孔径微孔滤膜为载体、胶体金为固相标记物来定性检测样本中的待测物质^[13]。因快速、便捷,已逐渐被广泛应用于食品中有害物质残留检测中。目前,已有关于 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的胶体金免疫层析研究^[14-15],但尚未有两者同时检测的报道。本实验利用胶体金免疫层析法对牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留同时进行检测,为这两类物质的残留监控提供依据,为保证我国乳制品质量提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛奶 市售; β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测试纸条(其中包括冻干有 β -内酰胺类药物单克隆抗体-胶体金标记物和三聚氰胺单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂和试纸条) 北京勤邦生物技术有限公司; β -内酰胺类抗生素标准品(青霉素G、氨苄青霉素、阿莫西林、苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素、萘夫西林、头孢唑肟、头孢哌酮、头孢曲松、头孢噻吩、头孢洛宁)和三聚氰胺标准品(纯度 $\geq 99\%$) 美国Sigma公司。

1.2 仪器与设备

微量移液器(单道20~200 μ L、100~1000 μ L,多道50~300 μ L) 美国Thermo公司;Acquity液相色谱串联质谱仪(配有电喷雾离子源) 美国Waters公司。

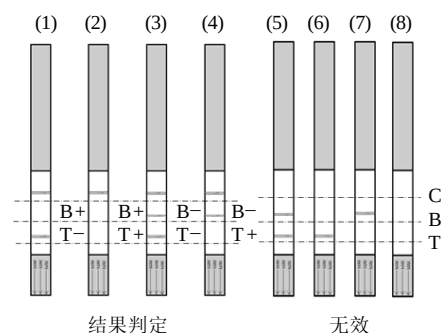
1.3 方法

1.3.1 液相色谱-质谱/质谱检测方法

按标准方法SN/T 2050—2008《进出口动物源食品中14种 β -内酰胺类抗生素残留量检测方法:液相色谱-质谱/质谱法》^[16]和GB/T 22388—2008《原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法》^[17]中的第二法——液相色谱-质谱/质谱法进行操作。

1.3.2 β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测试纸条检测方法

用微量移液器吸取200 μ L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,室温(20~25 $^{\circ}$ C)孵育5min,将标记好的试纸条插入微孔中(印有“max”线端朝下),使之充分浸入溶液中,再次室温孵育5min后,液体会沿着试纸条垂直向上依次通过试纸条的检测线和质控线,根据3条线是否出现红色条带即可判定结果。检测结果示意图及其说明见图1。



- (1). β -内酰胺类抗生素阳性(+): C线和T线显色, B线不显色; (2). β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺阳性(+): C线显色, B线和T线不显色; (3). 阴性(-): C线、B线和T线都显色; (4). 三聚氰胺阳性(+): C线和B线显色, T线不显色; (5)~(8). 无效: 未出现C线。

图1 β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测结果示意图

Fig.1 Schematic diagram of rapid test strips for detection of β -lactam antibiotics and melamine

2 结果与分析

2.1 样本检测限实验

由3个实验室对制得的不同标准品、不同质量浓度的加标牛奶各平行检测3次,结果见表1。

β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测试纸条测定牛奶中 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺的检测限分别为:青霉素G 2 μ g/L、氨苄青霉素3 μ g/L、阿莫西林4 μ g/L、苯唑青霉素6 μ g/L、邻氯青霉素6 μ g/L、双氯青霉素6 μ g/L、萘夫西林20 μ g/L、头孢唑肟20 μ g/L、头孢哌酮40 μ g/L、头孢曲松50 μ g/L、头孢噻吩90 μ g/L、头孢洛宁10 μ g/L、三聚氰胺50 μ g/L。

2.2 假阳性率实验

用3个批次的 β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测试纸条对50份阴性牛奶样品(用LC-MS/MS法确认 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺均为阴性)进行检测,以1.3.2节的检测结果示意图进行判定,结果见表2。该50份阴性牛奶样品中有2份为阳性,其余均为阴性,假阳性率为4%(表2)。

2.3 假阴性率实验

用3个批次的 β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测试纸条对50份添加50 μ g/L三聚氰胺,且随机添加2 μ g/L青霉

表1 试纸条检测限实验
Table 1 Detection limits of rapid test strips

药物	质量浓度/($\mu\text{g/L}$)	结果(n=9)	药物	质量浓度/($\mu\text{g/L}$)	结果(n=9)
青霉素 G	0	B: (-) T: (-)	氨苄青霉素	0	B: (-) T: (-)
	1	B: (-) T: (-)		1.5	B: (-) T: (-)
	2	B: (+) T: (-)		3	B: (+) T: (-)
	4	B: (+) T: (-)		6	B: (+) T: (-)
阿莫西林	0	B: (-) T: (-)	苯唑青霉素、邻氯青霉素、双氯青霉素	0	B: (-) T: (-)
	2	B: (-) T: (-)		3	B: (-) T: (-)
	4	B: (+) T: (-)		6	B: (+) T: (-)
	8	B: (+) T: (-)		12	B: (+) T: (-)
萘夫西林、头孢唑肟	0	B: (-) T: (-)	头孢哌酮	0	B: (-) T: (-)
	10	B: (-) T: (-)		20	B: (-) T: (-)
	20	B: (+) T: (-)		40	B: (+) T: (-)
	40	B: (+) T: (-)		80	B: (+) T: (-)
头孢曲松	0	B: (-) T: (-)	头孢噻吩	0	B: (-) T: (-)
	25	B: (-) T: (-)		45	B: (-) T: (-)
	50	B: (+) T: (-)		90	B: (+) T: (-)
	100	B: (+) T: (-)		180	B: (+) T: (-)
头孢洛宁	0	B: (-) T: (-)	三聚氰胺	0	B: (-) T: (-)
	5	B: (-) T: (-)		25	B: (-) T: (-)
	10	B: (+) T: (-)		50	B: (-) T: (+)
	20	B: (+) T: (-)		100	B: (-) T: (+)

素 G、 $3\mu\text{g/L}$ 氨苄青霉素、 $4\mu\text{g/L}$ 阿莫西林、 $6\mu\text{g/L}$ 苯唑青霉素、 $6\mu\text{g/L}$ 邻氯青霉素、 $6\mu\text{g/L}$ 双氯青霉素、 $20\mu\text{g/L}$ 萘夫西林、 $20\mu\text{g/L}$ 头孢唑肟、 $40\mu\text{g/L}$ 头孢哌酮、 $50\mu\text{g/L}$ 头孢曲松、 $90\mu\text{g/L}$ 头孢噻吩、 $10\mu\text{g/L}$ 头孢洛宁的阳性牛奶样品进行检测, 以 1.3.2 节检测结果示意图进行判定, 结果见表 2。该 50 份阳性牛奶样品的检测结果均为阳性, 假阴性率为 0。

表2 假阳性率、假阴性率实验

Table 2 False positive rate and false negative rate of rapid test strip detection

检测项目	样品编号	检测结果
假阳性	1~10	3 号为阳性, 其余全为阴性
	11~20	全为阴性
	21~30	全为阴性
	31~40	37 号为阳性, 其余全为阴性
假阴性	41~50	全为阴性
	1~50	全为阳性
		假阴性率为 0

2.4 稳定性实验

由 3 个实验室对制得的含 $2\mu\text{g/L}$ 青霉素 G 和 $50\mu\text{g/L}$ 三聚氰胺的牛奶各平行检测 10 次, 结果均为阳性。对上述样品每隔 3 天测定一次, 连续 7 次, 各平行检测 2 次, 检测结果均为阳性。可见, β -内酰胺类和三聚氰胺快速检测试纸条日内、日间稳定性较好。

2.5 特异性实验

将牛奶中常见的其他抗生素(四环素、金霉素、庆

大霉素、链霉素、新霉素、氯霉素、红霉素、泰乐菌素、林可霉素、螺旋霉素、盐霉素、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、恩诺沙星、氧氟沙星等)添加至阴性牛奶样本中, 使其质量浓度为 $500\mu\text{g/L}$, 由 3 个实验室进行检测, 每个平行检测 6 次。结果显示, 牛奶中添加这些抗生素时, 试纸条的 C 线、B 线和 T 线均显色, 为阴性结果, 表明试纸条对这些抗生素无交叉反应, 具有较好的特异性。

2.6 与仪器方法的比较

用试纸条方法和液相色谱-串联质谱法分别对阴性牛奶样本及不同浓度组青霉素 G(质量浓度分别为 0、0.5、2、 $4\mu\text{g/L}$)和三聚氰胺(质量浓度分别为 0、10、50、 $100\mu\text{g/L}$)的加标样本进行测定, 每组做 3 个平行, 结果见表 3。

由表 3 可知, 青霉素 G 添加质量浓度为 0、 $0.5\mu\text{g/L}$ 时, 试纸条检测结果为 B 线显色, β -内酰胺类显示阴性(-), 液相色谱-串联质谱法检测结果为未检出, 即低于仪器方法检测限; 添加质量浓度为 2、 $4\mu\text{g/L}$ 时, 试纸条检测结果为 B 线不显色, β -内酰胺类显示阳性(+), 液相色谱-串联质谱法检测结果也为阳性。三聚氰胺添加质量浓度为 0、 $10\mu\text{g/L}$ 时, 试纸条检测结果为 T 线显色, 三聚氰胺显示阴性(-), 液相色谱-串联质谱法检测结果为未检出, 即低于仪器方法检测限; 添加质量浓度为 50、 $100\mu\text{g/L}$ 时, 试纸条检测结果为 T 线不显色, 三聚氰胺显示阳性(+), LC-MS/MS 法检测结果也为阳性。

表3 试纸条检测与液相色谱-串联质谱法的检测结果比较
Table 3 Comparison of analytical results from LC-MS/MS and rapid test strip

青霉素 G 添加质量浓度/($\mu\text{g/L}$)	三聚氰胺添加质量浓度/($\mu\text{g/L}$)	试纸条检测结果($n=2$)	LC-MS/MS 检测结果/($\mu\text{g/kg}$) ($n=2$)
0	0	B: (—) T: (—)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: < 10
	10	B: (—) T: (—)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: < 10
	50	B: (—) T: (+)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: 50.1
	100	B: (—) T: (+)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: 91.4
0.5	0	B: (—) T: (—)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: < 10
	10	B: (—) T: (—)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: < 10
	50	B: (—) T: (+)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: 47.3
	100	B: (—) T: (+)	青霉素 G: < 1, 三聚氰胺: 89.2
2	0	B: (+) T: (—)	青霉素 G: 1.78, 三聚氰胺: < 10
	10	B: (+) T: (—)	青霉素 G: 1.63, 三聚氰胺: < 10
	50	B: (+) T: (+)	青霉素 G: 1.72, 三聚氰胺: 49.7
	100	B: (+) T: (+)	青霉素 G: 1.59, 三聚氰胺: 101.5
4	0	B: (+) T: (—)	青霉素 G: 3.43, 三聚氰胺: < 10
	10	B: (+) T: (—)	青霉素 G: 3.36, 三聚氰胺: < 10
	50	B: (+) T: (+)	青霉素 G: 3.51, 三聚氰胺: 49.6
	100	B: (+) T: (+)	青霉素 G: 3.28, 三聚氰胺: 95.2

可见, 试纸条方法和液相色谱-串联质谱法的检测结果基本一致, 可用于牛奶中 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留的现场快速筛选。

3 结 论

本研究采用胶体金免疫层析法对牛奶中的 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺残留进行检测, 灵敏度高, 对牛奶的检测限分别为青霉素 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 $6\mu\text{g/L}$ 、邻氯青霉素 $6\mu\text{g/L}$ 、双氯青霉素 $6\mu\text{g/L}$ 、萘夫西林 $20\mu\text{g/L}$ 、头孢噻肟 $20\mu\text{g/L}$ 、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 $10\mu\text{g/L}$ 、三聚氰胺 $50\mu\text{g/L}$; 特异性强, 与牛奶中常见的其他抗生素不发生交叉反应; 准确度高, 检测结果与液相色谱-串联质谱法基本一致; 操作简单, 牛奶样品无需前处理, 可直接检测, 整个操作过程仅 10min, 大大缩短了检测周期, 提高了检测效率。

本研究所使用的胶体金试纸条将胶体金标记的 β -内酰胺类单克隆抗体和三聚氰胺单克隆抗体同时冻干在微孔试剂中, 一方面使试纸条可以同时检测 12 种 β -内酰胺类抗生素和三聚氰胺, 满足了乳品加工企业、政府部门对乳制品的监管需要; 另一方面在检测过程中, 能够使金标抗体与待检样品液充分接触, 充分反应, 从而减少误差, 增加整个体系的反应灵敏度, 易于对样品中的药物残留情况进行分析。但由于胶体金免疫层析法主要通过目测颜色来判断结果, 比较主观, 可能出现假阳性问题, 因此对于阳性样本, 还需要用液相色谱-串联质谱法等仪器方法进行确证。

参考文献:

- [1] 袁萍, 刘亚凤, 祝伟霞, 等. 动物源性食品中 β -内酰胺类药物残留检测研究进展[J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(3): 65-68.
- [2] 张琦, 叶能胜, 谷学新, 等. β -内酰胺类抗生素分析检测技术及其应用研究进展[J]. 化学通报, 2009(5): 394-400.
- [3] HERSHKOVICH J, BROIDES A, KIRJNER L, et al. Beta lactam allergy and resensitization in children with suspected beta lactam allergy [J]. Clinical & Experimental Allergy, 2009, 39(5): 726-730.
- [4] 李延华, 王伟军, 张兰威, 等. 微生物法检测牛乳中 β -内酰胺类抗生素残留的对比研究[J]. 中国抗生素杂志, 2009, 34(1): 63-64.
- [5] 黄百芬, 吴丹青, 蔡增轩, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛奶中 19 种 β -内酰胺类抗生素[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(1): 1-6.
- [6] 叶能胜, 谷学新, 张琦. 固相萃取-高效液相色谱法检测牛奶和猪肉中 5 种 β -内酰胺类抗生素[J]. 分析实验室, 2010, 29(6): 73-77.
- [7] STRAUB R F, LINDER M, VOYKSNER R D. Determination of beta-lactam residues in milk using perfusive-particle liquid chromatography combined with ultrasonic nebulization electrospray mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(21): 3651-3658.
- [8] 姜佩, 陈宇鹏, 金燕飞, 等. 应用酶联免疫法快速检测乳品中 β -内酰胺类抗生素残留[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(1): 51-54.
- [9] 韦月娇. 三聚氰胺毒性的最新研究进展[J]. 科技信息, 2012(11): 86.
- [10] YOKLEY R A, MAYER L C, REZAAIYAN R. Analytical method for the determination of cyromazine and melamine residues in soil using LC-UV and GC-MS[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48(8): 3352-3358.
- [11] 江鑫. 食品及环境样品中三聚氰胺的液质联用分析技术研究[D]. 南昌: 南昌航空大学, 2010.
- [12] 陈锡龙, 黄瑾, 钱莘莘. 使用酶联免疫吸附法测定奶粉中三聚氰胺的研究[J]. 奶粉工业, 2008, 29(18): 53-55.
- [13] 徐欢. 胶体金免疫层析方法快速检测食品中氯霉素的残留研究[D]. 广州: 广东药学院, 2010.
- [14] 罗晓琴, 刘琳, 刘文芳, 等. 乳品中 β -内酰胺类抗生素快速检测试纸条研制[J]. 食品工业科技, 2012, 33(3): 309-312.
- [15] 万宇平, 高东微, 冯才伟, 等. 检测三聚氰胺胶体金免疫层析试验的建立[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(10): 46-47; 51.
- [16] 中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局. SN/T 2050—2008 进出口动物源食品中 14 种 β -内酰胺类抗生素残留量检测方法: 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- [17] 中国检验检疫科学研究院, 国家食品质量监督检验中心. GB/T 22388—2008 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.