

荧光定量技术快速检测生乳中磺胺类药物残留

李征¹, 方芳¹, 郑君杰¹, 娄迎霞¹, 姚婷¹, 曹林¹, 李俊^{2*}

(1. 北京市饲料监察所, 北京 100107; 2. 中国农业科学饲料研究院, 北京 100081)

摘要: **目的** 利用荧光定量技术分析检测生乳中磺胺类药物残留, 评价该方法的可行性。**方法** 取生乳空白样品进行加标回收实验(磺胺恶唑 13.50、27.00 μg/L; 磺胺喹恶啉 5.00、10.00 μg/L; 磺胺嘧啶 0.82、1.64 μg/L), 取 200 μL 样品与金标抗体结合, 50 °C 孵育 3 min, 取 120 μL 样品加到检测卡, 反应 10 min 后进行读数。**结果** 分析结果显示回收率均在 82.18%~118.40%; 批内、批间变异系数均低于 15%, 最低检测限为 5.00 μg/L, 与 GB/T 22966—2008 相对比, 结果完全符合。**结论** 该方法具有操作简单、价格低廉、检测时间短、良好的检测效果和结果准确的优点, 具有对大批量乳制品的快速检验和质量验收的推广潜力, 能为生乳的检测工作和品质评价提供科学参考。

关键词: 磺胺类药物; 荧光定量; 生乳

Rapid detection of sulfonamides residues in raw milk by fluorescence quantitative technique

LI Zheng¹, FANG Fang¹, ZHENG Jun-Jie¹, LOU Ying-Xia¹, YAO Ting¹, CAO Lin¹, LI Jun^{2*}

(1. Beijing Institute of Feed Control, Beijing 100107, China; 2. Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To analyze and detect sulfonamides residues in raw milk by fluorescence quantitative technology, and evaluate the feasibility of this method. **Methods** The raw milk blank sample was taken for standard addition recovery experiment (sulfa oxazole 13.50, 27.00 μg/L, sulfa quinoxaline 5.00, 10.00 μg/L, sulfadiazine 0.82 and 1.64 μg/L), 200 μL sample was combined with the gold-labeled antibody, incubated at 50 °C for 3 min, and 120 μL sample was added to the detection card, which was read after reaction for 10 min. **Results** The analytical results showed that the recoveries were 82.18%–118.40%, the coefficients of variation was less than 15% within and between batches, and the limit of detection was 5.00 μg/L, which was in good agreement with the GB/T 22966–2008. **Conclusion** This method has the advantages of simple operation, low price, short detection time, good detection effect and accurate results, has the potential to promote the rapid inspection and quality acceptance of large quantities of dairy products, and can provide scientific reference for the detection and quality evaluation of raw milk.

KEY WORDS: sulfonamides; fluorescence quantitative; raw milk

0 引言

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是一类具有强效杀菌

的抗生素类药物, 被广泛应用在畜牧业养殖生产。GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中明确规定, 生乳中 SAs 残留不得超过 100 μg/kg(磺

*通信作者: 李俊, 博士, 研究员, 主要研究方向为饲料加工与质量安全。E-mail: lijun08@caas.cn

*Corresponding author: LI Jun, Ph.D, Professor, Feed Research Institute Chinese Academy of Agricultural Sciences, 12 Zhongguancun South Street, Haidian District, Beijing 100081, China. E-mail: lijun08@caas.cn

胺二甲嘧啶 $\leq 25 \mu\text{g}/\text{kg}$), 但是由于养殖过程中使用的不规范、不合理导致动物体内 SAs 残留超标, 严重影响人类健康。SAs 超标引起人类过敏反应、造血功能紊乱、肾脏损伤等^[1]。

目前 SAs 常见检测方法有免疫检测法^[2]、高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC)^[3-4]、液相色谱-质谱法 (liquid chromatography mass spectrometry, LC-MS)^[5]、微生物检测法 (microbial inhibitions test, MIT)^[6]等。HPLC 和 LC-MS 法灵敏度较高, 特异性高^[3-4,7], 但样品前处理、操作过程较为烦琐, 检测时间长, 对实验操作人员技术要求较高^[8]。MIT 法主要利用 SAs 有效抑制特异微生物生理功能和代谢, 从而定性或定量测定样品中 SAs 的残留量, 方法可操作性非常强、成本较低, 但灵敏度低、敏感性差, 易受其他抗生素干扰^[9-10]。免疫学分析法操作简单、适用范围广, 在 SAs 的定性或半定量检测中发挥着重要的作用^[11], 但易受人为因素干扰, 且灵敏度低。

以上种种弊端说明, 上述方法已经不能满足如今生乳快速、精准、高效、经济、简便的检测要求。荧光定量检测技术^[12]是采用荧光淬灭免疫层析, 抗原与金标抗体结合, 通过荧光免疫定量分析仪读取背景荧光淬灭程度的一种技术, 在临床诊断^[13-14]、生物^[15]、环境监测^[16]等领域得到广泛应用。目前, 该检测技术在生乳中卡那霉素^[17]、林可霉素^[18]、黄曲霉毒素^[19]以及 4 种大环内酯类^[20]药物残留等方面研究较多, 方法灵敏度高、操作简便、反应时间短, 可实现牛奶中药物残留的现场快速定量检测, 能够满足“即时即地”对奶源质量进行监管, 对生乳质量安全监管具有重要价值。本研究基于荧光定量检测技术, 利用荧光免疫定量分析仪内置标准曲线定量分析生乳中磺胺类药物残留, 并完成方法学验证, 为现场快速检测生乳中磺胺类药物提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

磺胺类荧光定量检测卡(批号: 18030906、18030909、18030910, 北京维德维康生物技术有限公司); 磺胺类标准物质: 磺胺恶唑、磺胺喹恶啉、磺胺嘧啶(纯度均 $\geq 98\%$, 美国 Sigma 公司)。

FQ-S1 荧光免疫定量分析仪(北京维德维康生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 空白样品

生乳: 实验前经 GB/T 22966—2008《牛奶和奶粉中 16 种磺胺类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》检测确定样品中无磺胺类检出。

1.2.2 添加阳性样品

向空白生乳样品加入磺胺喹恶啉等药物标准品至所需质量浓度(磺胺恶唑 13.50、27.00 $\mu\text{g}/\text{L}$; 磺胺喹恶啉 5.00、10.00 $\mu\text{g}/\text{L}$; 磺胺嘧啶 0.82、1.64 $\mu\text{g}/\text{L}$)。

1.2.3 操作步骤

荧光免疫定量分析仪开机预热 10 min; 吸取 200 μL 样品于金标微孔中充分溶解孔内紫红色颗粒; 50 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 3 min; 吸取 120 μL 金标微孔中样品加入到检测卡加样孔中, 准确反应 10 min 后, 插入荧光免疫定量分析仪, 通过仪器内置标准曲线计算出样品中目标物含量, 进行读数。

2 结果与分析

2.1 最低检测限确定

取 20 份生乳空白样品, 按照 1.2.3 实验方法进行样品处理, 计算出其平均值, 再加上 3 倍标准差, 即为最低检测限(limit of detection, LOD), 结果见表 1。

结果表明, 以磺胺喹恶啉为对照物建立标准曲线得出的该药物最低检出限为 4.90 $\mu\text{g}/\text{L}$, 为保证检测稳定性, 可认为磺胺类荧光定量检测卡在生乳中磺胺喹恶啉检测限为 5.00 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

2.2 准确度与精密度

用 3 批次磺胺类荧光定量检测卡对添加磺胺类药物的生乳样品进行测定, 选取其中 3 个药物作为磺胺类药物高中低交叉反应率的代表: 磺胺恶唑(20% $<$ 交叉反应率 $<$ 50%)、磺胺喹恶啉(70% $<$ 交叉反应率 $<$ 120%)及磺胺嘧啶(交叉反应率 $>$ 200%)。样品添加药物浓度为对应的 LOD 和 2LOD(表 2), 每个添加浓度做 5 个平行, 计算样品添加回收率、批内和批间变异系数。按 1.2.3 中步骤操作, 结果见表 3。

表 1 空白生乳样品测定结果统计表($\mu\text{g}/\text{L}$)
Table 1 Statistical table of determination results of blank raw milk samples ($\mu\text{g}/\text{L}$)

样品	测定值										平均值	标准差	检测限
生乳	0.46	2.79	2.43	0.75	1.90	0.29	1.37	3.55	1.68	0.38	1.78	1.04	4.90
	2.94	1.22	2.97	1.87	1.49	2.63	1.08	1.17	3.67	1.04			

表2 空白样品添加不同浓度的标准物质

Table 2 Different concentrations of standard substances were added to the blank control

样品	添加药物	添加浓度/($\mu\text{g/L}$)	
生乳	磺胺恶唑	13.50	27.00
	磺胺喹恶啉	5.00	10.00
	磺胺嘧啶	0.82	1.64

结果表明,所有样品各添加浓度的回收率均在82.18%~118.40%之间。各添加浓度的批内和批间变异系数均低于15%,满足方法学的相关要求。

2.3 与仪器方法比较

用该磺胺类荧光定量检测卡和仪器法分别对50份生乳盲样进行测定,比较测定结果,结果显示(表4),两者的符合率为100%。

表3 样品加标回收实验结果($n=5$)
Table 3 Results of the adding recovery experiment ($n=5$)

添加药物	添加浓度/($\mu\text{g/L}$)	批次	批内			批间		
			平均值 \pm 标准差/($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	变异系数/%	平均值 \pm 标准差/($\mu\text{g/L}$)	回收率/%	变异系数/%
磺胺恶唑	13.50	第一批	14.11 \pm 1.19	104.50	8.43	12.59 \pm 1.40	93.26	11.16
		第二批	12.31 \pm 1.20	91.18	9.75			
		第三批	11.34 \pm 1.05	84.00	9.30			
	27.00	第一批	27.31 \pm 1.96	101.15	7.18	24.81 \pm 2.56	91.89	10.33
		第二批	24.94 \pm 2.01	92.37	8.06			
		第三批	22.19 \pm 1.84	82.18	8.29			
磺胺喹恶啉	5.00	第一批	5.22 \pm 0.44	104.40	8.43	5.06 \pm 0.46	101.20	9.09
		第二批	5.29 \pm 0.43	105.80	8.13			
		第三批	4.66 \pm 0.25	93.20	5.36			
	10.00	第一批	9.2 \pm 0.65	92.00	7.07	10.58 \pm 1.28	105.80	12.10
		第二批	10.7 \pm 0.44	107.00	4.11			
		第三批	11.84 \pm 0.84	118.40	7.09			
磺胺嘧啶	0.82	第一批	5.22 \pm 0.44	104.40	8.43	5.06 \pm 0.46	101.20	9.09
		第二批	5.29 \pm 0.43	105.80	8.13			
		第三批	4.66 \pm 0.25	93.20	5.36			
	1.64	第一批	1.39 \pm 0.12	84.76	8.63	1.56 \pm 0.16	95.12	10.36
		第二批	1.59 \pm 0.15	96.95	9.43			
		第三批	1.71 \pm 0.14	104.27	8.19			

表4 与仪器方法比较结果($\mu\text{g/L}$)
Table 4 Comparison with instrument method ($\mu\text{g/L}$)

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
检测卡方法	-	-	-	-	-	-	9.43	-	-	-
仪器方法	ND	ND	ND	ND	ND	ND	磺胺甲氧嘧啶 8.36	ND	ND	ND
编号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
检测卡方法	-	-	-	-	14.2	-	-	-	-	-
仪器方法	ND	ND	ND	ND	磺胺二甲基嘧啶甲基 15.3	ND	ND	ND	ND	ND

表 4(续)

编号	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
检测卡方法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
仪器方法	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
编号	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
检测卡方法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
仪器方法	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
编号	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
检测卡方法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
仪器方法	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

注: 以检测限作为阴阳性判定值, 小于磺胺类荧光定量检测卡检测限的检测结果记为“-”, 仪器结果记为“ND”, 大于磺胺类荧光定量检测卡检测限以实际检测值表示。

3 讨论

在生乳质量安全检测环节当中, 检测的速度和准确性是保障及时有效开展生乳质量安全监管工作的重要因素。荧光定量检测方法操作简便, 15 min 内即可完成测定, 荧光定量检测卡无需冷藏, 大大降低了使用的局限性。酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)虽然操作相对简单, 但检测时较长, 约 1.5 h^[21], ELISA 试剂盒需要低温冷藏, 使用前需要回温处理, 多次反复对检测结果具有较大影响。MIT 法由于需要培养, 所以大大拉长了检测时间。仪器方法 GB/T 22966—2008 操作烦琐, 样品前处理复杂且时间长, 所需试剂种类繁多, 并且仪器的使用对实验者能力有较高要求。

荧光定量检测技术检测成本低, 设备携带方便, 可做到即时即地检测。ELISA 法和仪器法均属于实验室检测方法, 无法实现生乳即时即地检测要求, 并且所需仪器、试剂盒、试剂价格昂贵, 对快速检测生乳中 SAs 残留具有一定局限性。

荧光定量检测技术具有准确性高、灵敏度高、稳定性强等特点, 通过实验发现该方法检出限为 5.00 $\mu\text{g/L}$, 所有样品各添加浓度的回收率均在 82.18%~118.40%之间, 各添加浓度的批内、批间变异系数均低于 15%。ELISA 法虽然灵敏度及准确性较好, 但其易受多因素干扰, 所以稳定性、重复性较差^[21]。胶体金法(gold immunochromatographic assay, GICA)测定牛奶中 SAs 残留方法检出限为

1.00 $\mu\text{g/L}$ ^[22], 虽结果可视化, 但无法准确定量^[23]。MIT 法仅限于那些可促进或者抑制微生物生长的物质的检测, 多用于奶中 SAs 的筛选, 具备一定灵敏度和特异性等优点, 但也有检测限过高, 特异性不强的缺点^[24], 易出现假阳性, 其假阳性率达 2%^[25], 很难定性定量地测定, 从而无法达到测定标准要求。

荧光定量检测技术也存在一定局限性, 由表 3 结果可以看出, 在不同批次之间, 添加回收率有所差异, 批间变异系数仍小于 15%, 其原因可能是由于生产工艺导致批间在检测结果上有所不同, 所以也明确提出了不同批次检测卡不能混用。另一点是只能对生乳中 SAs 残留进行初筛, 如遇阳性样品, 仍需采用 GB/T 22966—2008 方法进行确证。但该方法是一项能够对生乳中 SAs 残留进行简单、快速、准确和定量, 能够即时即地检测的一种方法, 将是未来 SAs 快速检测的主要发展方向。

4 结论

本研究中使用的荧光定量检测卡测定生乳中磺胺类药物残留的检测限为 5.00 $\mu\text{g/L}$, 所有样品各添加浓度的回收率均在 82.18%~118.40%之间, 各添加浓度的批内、批间变异系数均低于 15%, 满足方法学的相关要求。通过对未知样的测定, 磺胺类荧光定量检测卡和仪器法阳性符合率为 100%。此方法为生乳中药物残留等相关物质的分析提供了技术支持, 能满足生乳样品中针对磺胺类兽药残留风险筛查要求, 可用于生乳样品中磺胺类药物残留的快速检测。

参考文献

- [1] JOSHUA MD, MOLLIEA, CAITLIN M, *et al.* Sulfonamide drug allergy [J]. *Curr All Asthm Rep*, 2018, 18(7): 1-10.
- [2] LI C, LUO X, LI Y, *et al.* A class-selective immunoassay for sulfonamides residue detection in milk using a superior polyclonal antibody with broad specificity and highly uniform affinity [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 443.
- [3] SONG YP, ZHANG L, WANG GN, *et al.* Dual-dummy-template molecularly imprinted polymer combining ultra performance liquid chromatography for determination of fluoroquinolones and sulfonamides in pork and chicken muscle [J]. *Food Control*, 2017, 82: 233-242.
- [4] PATYRA E, PRZENIOSŁO M, KWIAŁEK K. Determination of sulfonamides in feeds by high-performance liquid chromatography after fluorescamine precolumn derivatization [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 452.
- [5] SUO D, WANG P, XIAO Z, *et al.* Multiresidue determination of 27 sulfonamides in poultry feathers and its application to a sulfamethazine pharmacokinetics study on laying hen feathers and sulfonamide residue monitoring on poultry feathers [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(40): 11236-11243.
- [6] WU Q, PENG D, LIU Q, *et al.* A novel microbiological method in microtiter plates for screening seven kinds of widely used antibiotics residues in milk, chicken egg and honey [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 436.
- [7] 林天野, 张俊鸿, 陈溪, 等. UGPLC-Q-TOF-MS 法快速检测牛奶中 21 种磺胺类药物[J]. *化学分析计量*, 2019, 28(6): 98-104.
LIN TY, ZHANG JH, CHEN X, *et al.* Rapid detection of 21 sulfonamides in milk by UGPLC-Q-TOF-MS/MS [J]. *Chem Anal Meter*, 2019, 28(6): 98-104.
- [8] 于芳. 磺胺类药物残留的检测方法概述[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2020, (2): 169.
YU F. Overview of methods for the detection of sulfonamides residues [J]. *Chin J Anim Husband Vet Med*, 2020, (2): 169.
- [9] 刘兴泉, 冯震, 姚蕾, 等. 采用高通量微生物法和 HPLC 法检测猪肉中四环素和磺胺类抗生素残留[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(4): 194-197.
LIU XQ, FENG Z, YAO L, *et al.* Analysis of tetracycline and sulfonamide antibiotic residues in pig muscle using throughout microbial assay and HPLC [J]. *Food Ferment Ind*, 2011, 37(4): 194-197.
- [10] 王邦国. 动物性食品中磺胺类药物残留检测方法[J]. *今日畜牧兽医*, 2020, 36(8): 65.
WANG BG. Animal foods sulfa drug residues detection method [J]. *Today Anim Husband Vet Med*, 2020, 36(8): 65.
- [11] 宋予震, 董青, 邢广旭, 等. 免疫分析方法在磺胺类药物残留检测中的应用[J]. *河南农业科学*, 2017, 46(10): 8-12.
SONG YZ, DONG Q, XING GX, *et al.* Application of immunoassay in the sulfonamides residues detection [J]. *J Henan Agric Sci*, 2017, 46(10): 8-12.
- [12] 施青峰. 荧光免疫层析试纸条制备及定量检测关键技术研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2016.
SHI QF. Research on key technology of preparing and quantitative detecting the immune fluorescence chromatography test strip [D]. Beijing: Beijing Institute of Technology, 2016.
- [13] 刘卿. 人降钙素原单克隆抗体的制备及其荧光免疫层析法的初步研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2019.
LIU Q. Preparation of human procalcitonin monoclonal antibody and preliminary study of its fluorescence immunochromatography assay [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.
- [14] 肖立娇. 全自动荧光免疫分析仪在临床检验中的应用分析[J]. *中国医疗器械信息*, 2020, 26(9): 148-149.
XIAO LJ. Application analysis of automatic fluorescence immunoassay analyzer in clinical examination [J]. *China Med Device Inform*, 2020, 26(9): 148-149.
- [15] CAPOA, D'AURIAS, LACROIX M, *et al.* A fluorescence immunoassay for a rapid detection of *Listeria monocytogenes* on working surfaces [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 21729-21729.
- [16] DING Y, CHEN H, YANG Q, *et al.* A fluorescence polarization immunoassay for detection of thiacloprid in environmental and agricultural samples [J]. *Rsc Adv*, 2019, 9(63): 36825-36830.
- [17] 古扎力努尔·艾尔肯, 吴晓霞, 李久彤, 等. 背景荧光猝灭-免疫层析法检测牛奶中卡那霉素的方法建立[J]. *沈阳药科大学学报*, 2020, 37(8): 696-699.
ERKEN G, WU XX, LI JT, *et al.* Quantitative determination of kanamycin by utilizing the background fluorescence quenching immunochromatographic assay [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2020, 37(8): 696-699.
- [18] 马雪红. 背景荧光猝灭免疫层析测定牛奶中林可霉素[J]. *药物分析杂志*, 2019, 39(12): 2178-2183.
MA XH. Test of lincomycin in milk based on background fluorescence quenching immune chromatography [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2019, 39(12): 2178-2183.
- [19] 吴成辉. 黄曲霉毒素 M₁ 免疫层析检测方法的研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2017.
WU CH. The study of immunochromatographic assays for detection of aflatoxin M₁ [D]. Nanchang: Nanchang University, 2017.
- [20] 李向梅. 牛奶中四种大环内酯类药物残留免疫检测技术研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
LI XM. Immunoassay techniques for the determination of four macrolides residues in milk [D]. Beijing: China Agricultural University, 2016.
- [21] 杨华生. 酶联免疫法测定畜产品及牛奶中磺胺类药物残留[J]. *今日畜牧兽医*, 2019, 35(5): 5-7.
YANG HS. Enzyme-linked immunoassay for determination of sulfonamide residues in animal products and milk [J]. *Today Anim Husband Vet Med*, 2019, 35(5): 5-7.
- [22] 张佳宜, 张燕, 王硕. 胶体金免疫层析法快速检测猪肉及牛奶中磺胺二甲嘧啶残留[J]. *中国食品学报*, 2010, 10(1): 181-185.
ZHANG JY, ZHANG Y, WANG S. Rapid detection of sulphamethazine residues in pig muscle and milk by colloidal gold-based immuno chromatographic assay [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2010, 10(1): 181-185.
- [23] 韩静, 刘恩梅, 王帅, 等. 胶体金免疫层析法检测食品中的磺胺类药物

残留[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 603-606.

HAN J, LIU EM, WANG S, *et al.* Detection of sulfonamides residues in food by colloidal gold immunochromatographic method [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(5): 603-606.

- [24] 陈曦, 朱良强, 祁克宗. 微生物法检测动物源性食品中抗生素残留的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2008, 25(9): 53-55.

CHEN X, ZHU LQ, QI KZ. Research progress on the detection of antibiotic residues in animal-derived food by microbiological methods [J]. China Anim Health Inspect, 2008, 25(9): 53-55.

- [25] 李海龙, 万宇平, 冯才茂, 等. 应用胶体金免疫层析法测定牛奶中的磺胺类药物残留[J]. 山东畜牧兽医, 2012, 33(6): 6-8.

LI HL, WAN YP, FENG CM, *et al.* Determination of sulfonamide residues in milk by colloidal gold immunochromatography [J]. Shandong J Anim Sci Vet Med, 2012, 33(6): 6-8.

(责任编辑: 张晓寒)

作者简介



李 征, 硕士, 畜牧师, 主要研究方向为饲料及农产品质量安全检测, 动物营养与饲料科学。

E-mail: xiaosiye@aliyun.com



李 俊, 博士, 研究员, 主要研究方向为饲料加工与质量安全。

E-mail: lijun08@caas.cn