

胶体金免疫层析法检测禽蛋中氯羟吡啶残留

王兆芹^{1,2}, 陈姗姗³, 赵义良⁴, 惠光朋^{1,2}, 王志恒⁴, 崔廷婷^{1,2}, 万宇平^{1,2*}

(1. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206; 2. 北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 北京 102206; 3. 陕西省产品质量监督检验研究院, 西安 710048; 4. 石家庄市畜产品质量监测中心, 石家庄 050041)

摘要: 目的 建立胶体金免疫层析法检测禽蛋中氯羟吡啶残留的分析方法。**方法** 在用间接竞争酶联免疫吸附法分析氯羟吡啶单克隆抗体灵敏度和交叉反应性的基础上, 以胶体金标记单克隆抗体作为示踪标志物, 以包被氯羟吡啶半抗原-卵清蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜作为载体, 制备了氯羟吡啶胶体金免疫层析试纸条。**结果** 氯羟吡啶单克隆抗体的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)为 1.6 μg/L, 与地克珠利、二硝托胺、尼卡巴嗪、磺胺喹噁啉、磺胺二甲嘧啶、癸氧喹酯、盐酸氨丙啉和盐酸氯苯胍 8 种药物均无交叉反应。制备的胶体金免疫层析试纸条肉眼判定禽蛋中氯羟吡啶的检出限为 15 μg/kg, 灵敏度为 98%、特异性为 93%、假阴性率为 2%、假阳性率为 7%。**结论** 制备的试纸条具有操作简单、检测快速、成本低等优点, 可用于大批量禽蛋样本中氯羟吡啶残留的初步筛选。

关键词: 氯羟吡啶; 胶体金免疫层析法; 试纸条; 单克隆抗体; 禽蛋

Determination of clopidol residues in poultry eggs by colloidal gold immunochromatography

WANG Zhao-Qin^{1,2}, CHEN Shan-Shan³, ZHAO Yi-Liang⁴, HUI Guang-Peng^{1,2},
WANG Zhi-Heng⁴, CUI Ting-Ting^{1,2}, WAN Yu-Ping^{1,2*}

(1. Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., Beijing 102206, China; 2. Beijing Engineering Research Centre of Food Safety Immunodetection, Beijing 102206, China; 3. Shaanxi Product Quality Supervision and Inspection Institute, Xi'an 710048, China; 4. Shijiazhuang City Animal Product Quality Monitoring Center, Shijiazhuang 050041, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of clopidol residues in poultry eggs by colloidal gold immunochromatography. **Methods** Based on the analysis of the sensitivity and cross reactivity of clopidol monoclonal antibody by indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, the clopidol colloidal gold immunochromatographic test strip was prepared with the colloidal gold labeled monoclonal antibody as the tracer marker and the nitrocellulose membrane coated with clopidol hapten ovalbumin conjugate and goat anti-mouse IgG as the carrier. **Results** The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of clopidol monoclonal antibody was 1.6 μg/L, there was no cross reaction with 8 kinds of drugs, including diclazuril, dinitolmide, nicarbazin, sulfaquinoxaline, sulfadimidine, decoquinat, amprolium hydrochloride and robenidine hydrochloride. The limit of detection of clopidol in poultry eggs was 15 μg/kg, the sensitivity was 98%, the specificity was 93%, the false

基金项目: 河北省重点研发计划项目(20327504D)

Fund: Supported by the Key Research and Development Program of Hebei Province (20327504D)

*通信作者: 万宇平, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: beijingqinbang@163.com

*Corresponding author: WAN Yu-Ping, Senior Engineer, Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., No.8, High-tech Fourth Street, Huilongguan International Information Industry Base, Changping District, Beijing 102206, China. E-mail: beijingqinbang@163.com

negative rate was 2%, and the false positive rate was 7%. **Conclusion** The prepared test strip has the advantages of simple operation, rapid detection and low cost, and can be used for the preliminary screening of clopidol residues in a large number of poultry egg samples.

KEY WORDS: clopidol; colloidal gold immunochromatography; test strip; monoclonal antibody; poultry eggs

0 引言

氯羟吡啶(clopidol)又名克球酚,是一种抗球虫药,对鸡 9 种艾美耳球虫均有良好的防治效果,是国内使用最广泛的鸡用抗球虫药之一^[1-3]。但在畜禽养殖过程中长期不合理使用,会产生抗药性^[4-5],贸然停用该药物,就可能会导致球虫病爆发^[6]。并且随着氯羟吡啶的广泛使用,其残留问题也逐渐凸显,有研究发现,氯羟吡啶具有一定的致畸性和胚胎毒性^[7],对人类健康构成了极大威胁。我国 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》中规定了鸡/火鸡的肌肉、肝、肾中氯羟吡啶的最大残留限量分别为 5000、15000、15000 $\mu\text{g}/\text{kg}$,没有对鸡蛋中的残留量做出规定。但禽蛋中氯羟吡啶残留风险现状却不容乐观,辛丽娜等^[8]对广西不同地区禽蛋中兽药残留水平进行测定和风险分析,结果 82 批次禽蛋中检出氯羟吡啶超标产品 3 批次,检出率 3.7%,残留较为明显。为此,2020 年 2 月,农业农村部发布的《2020 年饲料兽药生鲜乳质量安全监测计划》中指出鸡蛋中氯羟吡啶的残留限量为 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[9]。可见,建立快速、准确检测禽蛋中氯羟吡啶残留的方法,对于保障禽蛋产品质量安全、保障消费者健康至关重要。

目前已报道的检测氯羟吡啶残留的方法主要有色谱法^[10-12]和色谱-质谱法^[3,13-15]。但这些方法需要在实验室使用昂贵的仪器设备、由专业的技术人员来完成,检测成本高、耗时长,难以在基层推广使用。因此,开发一种快速检测禽蛋中氯羟吡啶残留的方法,可满足量大、范围广的抽检工作要求,提高监管效率,为禽蛋质量安全监控提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

氯羟吡啶、地克珠利、二硝托胺、尼卡巴嗪、磺胺喹噁啉、磺胺二甲嘧啶、癸氧喹酯、盐酸氨丙啉、盐酸氯苯胍

(纯度 $\geq 98.0\%$)、4-马来酰亚胺酚酰肼、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、3-(2-吡啶二巯基)丙酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 [N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionate, SPDP]、三(2-酰乙基)磷盐酸盐[tris(2-carboxyethyl) phosphine, TCEP](ACS 级)、牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、氯金酸(纯度 98%)、羊抗鼠 IgG(美国 Sigma 公司);柠檬酸三钠、碳酸钾(分析纯,广州化学试剂厂);氢氧化钠、碘化亚铜、盐酸、1,2-二氯乙烷、无水乙醇、乙腈、甲醇(分析纯,北京化学试剂公司);硝酸纤维素膜(NC 膜)、样品垫、吸水垫、PVC 底板(上海捷宁生物科技有限公司)。

碳酸缓冲液(carbonic acid buffer, CB): 0.1 mol/L 的 CB, pH 9.5。

磷酸缓冲液(phosphate buffer, PB): 0.5 mol/L 的 PB, pH 7.0。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS): 0.02 mol/L 的 PBS, pH 7.4。

1.2 仪器与设备

2000SBL 电子天平(感量 0.01 g, 美国 Setra 公司); SBCJ 磁力搅拌加热器(河南圣亚仪器仪表有限公司); TGL16C 台式高速冷冻离心机(湖南湘立科学仪器有限公司); XYZ3050 胶体金点样系统(美国 BioDot 公司); CT300 数控切条机(上海金标生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 半抗原和抗原的合成

氯羟吡啶半抗原的合成如图 1 所示。取氯羟吡啶 1.92 g 加 40 mL 2 mol/L 氢氧化钠水溶液溶解,再加入 20 mL 含有 4-马来酰亚胺酚酰肼 4.93 g 的 DMF 溶液、1.9 g 碘化亚铜,加热,100 $^{\circ}\text{C}$ 反应 4 h; 停止反应,加 100 mL 去离子水,用 6 mol/L 盐酸调节 pH 至 7,用 1,2-二氯乙烷萃取 3 次,每次 200 mL; 合并有机相,蒸干,加 120 mL 无水乙醇重结晶,即得到氯羟吡啶半抗原。

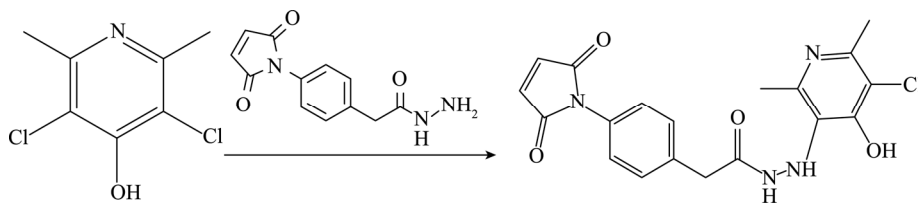


图 1 氯羟吡啶半抗原合成图

Fig.1 Composite diagram for clopidol hapten

将氯羟吡啶半抗原与 BSA 偶联作为免疫原, 与 OVA 偶联作为包被原。取 BSA 50 mg, 加 6 mL CB 缓冲液溶解, 加含有 SPDP 11.6 mg 的 DMF 溶液 1 mL, 室温反应 4 h, 停止反应, 用 PBS 缓冲液透析纯化, 除去未反应的 SPDP, 得到引入二硫吡啶基的 BSA 溶液, 记为 A 液; 取 TCEP 11 mg, 加 2 mL PB 缓冲液溶解, 滴加到 A 液中, 4 °C 反应 30 min, 得到巯基化 BSA, 记为 B 液; 取氯羟吡啶半抗原 15 mg, 加 1 mL DMF 溶解, 加入到 B 液中, 室温反应 3 h, 用 PBS 缓冲液透析纯化 3 d, 每天换液 3 次, 离心分装, 得到氯羟吡啶半抗原-BSA 偶联物, 即为免疫原。采用同样的方法制备包被原。

1.3.2 单克隆抗体的制备和鉴定

按照常规方法^[16], 用 1.3.1 制备的免疫原免疫 Balb/c 小鼠制备腹水抗体, 用饱和硫酸铵法纯化后备用, 以间接竞争酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)分析抗体的灵敏度和交叉反应性。

1.3.3 胶体金的制备

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒^[17]。在锥形瓶中加热 100 mL 0.01% 氯金酸溶液至完全沸腾, 快速搅拌下向其中加入 2.5 mL 1% 柠檬酸三钠溶液, 随着溶液的持续沸腾, 其颜色逐渐变为酒红色, 再继续搅拌 15 min, 然后冷却到室温, 4 °C 保存备用。

1.3.4 金标抗体的制备

在磁力搅拌下, 用 0.2 mol/L 碳酸钾溶液调节胶体金的 pH 至 7.2, 在 2 mL 胶体金溶液中加入 50 μg 氯羟吡啶单克隆抗体, 室温搅拌 30 min, 放置 10 min; 再加入 10% BSA 溶液至其终浓度为 1% 封闭游离的胶体金颗粒, 继续放置 10 min; 4 °C 下 12000 r/min 离心 40 min, 舍弃上清, 沉淀用含 2% BSA 的 PBS 缓冲液洗涤 2 次后重悬, 置 4 °C 备用。按 100 μL/孔的标准向微孔板中加入金标抗体, 冷阱温度 -50 °C 预冻 3 h, 真空干燥 15 h^[18], 即得到包含金标抗体的微孔试剂, 密封保存。

1.3.5 胶体金试纸条的组装

胶体金试纸条由 NC 膜、样品垫、吸水垫和 PVC 底板组成。将包被原(1 mg/mL)和羊抗鼠 IgG (0.5 mg/mL)以 1 μL/cm 的喷量分别喷于 NC 膜上作为检测线(T 线)和质控线(C 线), 包被好的 NC 膜于 37 °C 干燥 2 h, 备用; 将样品垫置于样品垫展开剂中浸泡 2 h, 37 °C 干燥 2 h 备用。依次将 NC 膜、样品垫、吸水垫粘贴于 PVC 底板上, 然后切成 3.95 mm 宽的试纸条, 装在特制的塑料制卡中密封保存, 与 1.3.4 制备的冻干有金标抗体的微孔试剂配合使用。

1.3.6 样品前处理及检测

将鲜蛋破碎至烧杯中, 充分混匀; 称取(2.00±0.05) g 混匀的样本至 10 mL 离心管中, 加入 0.5 mL NaCl 溶液, 涡旋 2 min, 再加入 3 mL 样本提取剂, 涡旋 2 min, 室温条件下 3000 r/min 离心 5 min; 取 2 mL 上层溶液至离心管中, 于 50~60 °C 水浴氮气流下吹至近干; 向其中加入 300 μL 样

本复溶液, 涡旋 30 s 后即为本待测液。

吸取 100 μL 待测液于微孔中, 反复抽吸 4~5 次, 使微孔中试剂充分混匀, 室温孵育 3 min; 吸取 100 μL 混匀液垂直滴于试纸条加样孔中, 反应 8 min, 肉眼观察结果。若 T 线显色比 C 线显色深或与 C 线颜色相当, 表明样品中氯羟吡啶含量低于检出限, 判为阴性(-); 若 T 线显色比 C 线显色浅或几乎不显色, 则判为阳性(+); 若 C 线不显色, 表明操作不正确或试纸条无效。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体的特性

采用间接竞争 ELISA 方法分析单克隆抗体的灵敏度和交叉反应性。分别测定质量浓度梯度为 0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5 μg/L 的氯羟吡啶标准溶液 450 nm 处的吸光度值(A), 计算百分吸光率(A/A₀)。以标准品百分吸光率的 logit 值为纵坐标, 氯羟吡啶浓度的对数值(lgC, lg mol/L)为横坐标, 绘制标准曲线, 线性方程为 $Y = -2.3559X + 0.5275$, $r^2 = 0.9998$ 。以竞争抑制率达到 50% 时所对应的氯羟吡啶浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)表征抗体的灵敏度, 即 1.6 μg/L。

分析氯羟吡啶单克隆抗体对类似物的交叉反应率, 结果见表 1, 其对氯羟吡啶类似物的交叉反应率均小于 1%, 与地克珠利、二硝托胺、尼卡巴嗪、磺胺喹噁啉、磺胺二甲嘧啶、癸氧喹酯、盐酸氨丙啉和盐酸氯苯胍 8 种药物均无交叉反应, 说明对氯羟吡啶具有高度专一性。

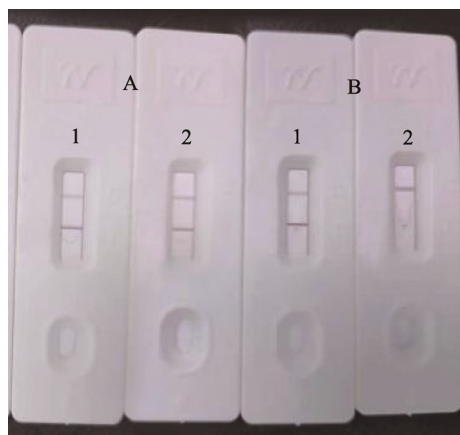
表 1 间接竞争 ELISA 法测定的氯羟吡啶单克隆抗体交叉反应性
Table 1 Determination of cross reactivities of clopidol monoclonal antibody by indirect competitive ELISA

类似物	IC ₅₀ /(μg/L)	交叉反应率/%
氯羟吡啶	1.6	100
地克珠利	>160	<1
二硝托胺	>160	<1
尼卡巴嗪	>160	<1
磺胺喹噁啉	>160	<1
磺胺二甲嘧啶	>160	<1
癸氧喹酯	>160	<1
盐酸氨丙啉	>160	<1
盐酸氯苯胍	>160	<1

2.2 样本提取剂的筛选

参考已报道的文献方法^[12,19]及 GB/T 20362—2006《鸡蛋中氯羟吡啶残留量的检测方法 高效液相色谱法》, 分别采用甲醇和乙腈作为样本提取剂, 按照 1.3.6 所述进行样品前处理

后,用试纸条进行检测,考察浓度分别为 0、15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 2 个浓度梯度鸡蛋样本在 2 种提取剂下的显色效果,结果见图 2。对于氯羟吡啶浓度为 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样本,甲醇组的 T 线条带颜色浅于乙腈组;当氯羟吡啶浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,甲醇组的 T 线条带颜色与 C 线相当,为阴性结果,而乙腈组的 T 线条带几乎消失,判为阳性。可见,乙腈组的 T 线抑制效果更好,提取液中氯羟吡啶含量更高,表明乙腈提取效率更好。因此,选择乙腈作为本方法的提取液。



注: C 线在 T 线上方,下同; 样本提取剂: A 组为甲醇, B 组为乙腈; 氯羟吡啶质量浓度: 1 为 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2 为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

图 2 样本提取剂筛选

Fig.2 Screening of sample extractants

2.3 试纸条的检出限

在空白新鲜鸡蛋中添加氯羟吡啶标准品至浓度分别为 0、5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 用试纸条检测, 每个浓度做 5 次平行, 结果见表 2。按照 1.3.6 所述方法判定结果发现, 在氯羟吡啶浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, 试纸条上的 T 线显色比 C 线显色深, 为阴性结果; 随着浓度的上升, T 线显色逐渐变浅, 到浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时, T 线显色明显比 C 线显色浅, 为阳性结果。因此, 肉眼判定禽蛋中氯羟吡啶的检出限为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.4 试纸条的其他性质

随机取空白新鲜鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋样品共 50 份, 分别添加氯羟吡啶标准品至浓度为 7.5、15、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 共计样品 200 份, 用试纸条进行检测, 根据《食品快速检测方法评价技术规范》^[20] 计算灵敏度、特异性、假阴性率、假阳性率, 结果见表 3, 得到灵敏度为 98%、特异性为 93%、假阴性率为 2%、假阳性率为 7%。

2.5 试纸条的重复性

以鸡蛋为测试基质, 采用空白样本及氯羟吡啶添加浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的加标样本, 用 3 个批号的试纸条进行检测, 每一水平 10 平行, 计算检出阳性结果次数占所有检测结果的比率。结果发现, 3 批试纸条的检测结果中, 仅批次 1 出现了假阳性现象, 其他无明显差异, 表明方法重复性较好。

表 2 胶体金试纸条检出限

Table 2 Limits of detection of colloidal gold test strip

添加浓度/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$	检测结果
0	
5	
10	
15	
20	

表 3 胶体金试纸条性能指标计算方法及结果

Table 3 Calculation method and results of performance indexes of colloidal gold test strip

样品情况 ^a	检测结果 ^b		总数
	阳性	阴性	
阳性	98	2	100
阴性	7	93	100
总数	105	95	200
灵敏度 p+/%	p+=98/100×100=98		
特异性 p-/%	p-=93/100×100=93		
假阴性率 pf-/%	pf-=100-p+=2		
假阳性率 pf+/%	pf+=100-p-=7		
相对准确度/%	(98+93)/200×100=95.5		

注: a 表示样品中实际的结果, 实验中共计样品 200 份, 其中阴性 100 份(包括空白样品和添加浓度为 0.5 倍检出限的样品各 50 份), 阳性 100 份(包括添加浓度为检出限和 2 倍检出限的样品各 50 份); b 表示由该方法检验得到的结果。

2.6 实际样品的测试

对购自市场的鸡蛋、鸭蛋、鹌鹑蛋样品各 10 份, 分别用上述胶体金免疫层析法和 SN/T 3144—2011《出口动物源

食品中抗球虫药物残留量检测方法 液相色谱-质谱/质谱法》进行检测, 比对两种方法检测结果, 见表 4。结果表明, 本方法与仪器检测结果相符, 结果准确可靠、实用性强。

表 4 实际样品测试结果
Table 4 Test results of actual samples

样品编号	鸡蛋		鸭蛋		鹌鹑蛋	
	试纸条结果	仪器结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	试纸条结果	仪器结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	试纸条结果	仪器结果/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1	-	未检出	-	未检出	-	未检出
2	-	未检出	-	未检出	-	未检出
3	+	23.5	-	未检出	-	未检出
4	-	未检出	-	未检出	-	未检出
5	-	未检出	+	35.1	-	未检出
6	-	未检出	-	未检出	+	18.9
7	+	30.7	-	未检出	-	未检出
8	-	未检出	-	未检出	-	未检出
9	-	未检出	-	未检出	+	24.6
10	-	未检出	-	未检出	-	未检出

3 结论与讨论

选择合适的提取剂, 既能有效提取待测组分, 还能阻止干扰成分进入提取液, 降低基质干扰^[21]。氯羟吡啶不溶于水、丙酮、乙醚、苯, 但在甲醇和乙腈中有一定的溶解度^[22], 为此本研究考察了甲醇和乙腈作为提取剂对检测结果的影响。结果表明, 乙腈组的 T 线抑制效果更好, 这可能是因为禽蛋含有大量的脂肪和蛋白质, 乙腈能沉淀蛋白, 减少其对氯羟吡啶的吸附^[23], 所以选择乙腈作为提取剂。

胶体金免疫层析技术作为近年最快速的新型检测技术之一, 在农兽药残留^[24-25]、真菌毒素^[26]、重金属^[27]、非法添加剂^[28]、病原微生物^[29]等检测领域应用广泛。该技术方便快捷、成本低、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观且灵敏度高、稳定性强, 非常适合作为初筛手段用于仪器确证方法的补充。但目前还没有关于氯羟吡啶的胶体金免疫层析方法的报道, 仅是在制备氯羟吡啶抗原基础上开发针对其的抗体^[30-32]。本研究在用间接竞争酶联免疫吸附法分析氯羟吡啶单克隆抗体灵敏度和交叉反应性的基础上, 以胶体金标记单克隆抗体作为示踪标志物, 以包被氯羟吡啶半抗原-卵清蛋白偶联物和羊抗鼠 IgG 的硝酸纤维素膜作为载体, 制备了氯羟吡啶胶体金免疫层析试纸条, 可特异性地快速检测禽蛋中的氯羟吡啶, 检出限为 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 灵敏度为 98%、特异性为 93%、假阴性率为 2%、假阳性率为 7%。而 SN/T 3144—2011 中的净化过程采用固相萃取法, 要经过活化、平衡、上样、淋洗、洗脱 5 个步骤, 操

作复杂, 与之相比, 本方法操作简单、检测速度快, 适合作为禽蛋中氯羟吡啶残留检测的初筛方法。但由于胶体金免疫层析技术的工作原理和技术水平的局限, 与 GB/T 20362—2006 中的高效液相色谱法相比, 检出限虽有所提高, 但仍无法满足《2020 年饲料兽药生鲜乳质量安全监测计划》中对于鸡蛋氯羟吡啶残留限量的要求, 且因为人眼判读主观性较大, 容易出现假阳性、假阴性等问题, 因此可配套胶体金读数仪使用, 通过建立标准曲线来实现结果的定量检测, 提高灵敏度和准确性。

参考文献

- [1] ALI AM, SEDDIEK SA, KHATER HF. Effect of butyrate, clopidol and their combination on the performance of broilers infected with *Eimeria maxima* [J]. Brit Poult Sci, 2014, 55(4): 474-482.
- [2] 李丽方, 董亚娟, 李广波, 等. 肉鸡球虫常见治疗药物及有效投药方法 [J]. 畜牧兽医学(电子版), 2020, (21): 53-54.
LI LF, DONG YJ, LI GB, et al. Common therapeutic drugs and effective methods of administration for coccidiosis in broiler chickens [J]. Graziery Vet Sci (Electron Vers), 2020, (21): 53-54.
- [3] 梁飞燕, 林小莹, 辛丽娜, 等. RSPE-UPLC-MS/MS 法测定禽蛋中氯羟吡啶残留 [J]. 广西大学学报(自然科学版), 2020, 45(6): 1492-1497.
LIANG FY, LIN XY, XIN LN, et al. Determination of the clopidol residues in poultry eggs by RSPE-UPLC-MS/MS [J]. J Guangxi Univ (Nat Sci Ed), 2020, 45(6): 1492-1497.
- [4] 黄仪娟, 王新秋, 刘丽丹, 等. 鸡艾美耳球虫福建龙岩田间虫株的耐药性调查 [J]. 养禽与禽病防治, 2020, (6): 7-16.
HUANG YJ, WANG XQ, LIU LD, et al. Investigation on drug resistance of *Eimeria coccidiosis* strains in Longyan, Fujian Province [J]. Poult Husb

- Dis Contrl, 2020, (6): 7–16.
- [5] 黄仪娟, 王新秋, 林瑞庆, 等. 四川部分地区鸡球虫分离株对 11 种抗球虫药物的耐药性调查[J]. 动物医学进展, 2019, 40(3): 133–139.
HUANG YJ, WANG XQ, LIN RQ, *et al.* Research on drug resistance of chicken *Eimeria* isolates from Sichuan to 11 coccidiostats [J]. Prog Vet Med, 2019, 40(3): 133–139.
- [6] 熊剑秋. 肉鸡球虫药物防治作用以及存在的问题[J]. 中国动物保健, 2021, 23(7): 46, 53.
XIONG JQ. Drug control effect and existing problems of coccidiosis in broiler chickens [J]. Chin Anim Health, 2021, 23(7): 46, 53.
- [7] 姜中其, 包鸿俊, 史晓丽. 氯羟吡啶的特殊毒性——致畸作用[J]. 中国兽医学报, 1999, (4): 390–392.
JIANG ZQ, BAO HJ, SHI XL. Teratogenic effect of clopidol in rats [J]. Chin J Vet Sci, 1999, (4): 390–392.
- [8] 辛丽娜, 谭喜梅, 梁飞燕, 等. 2018 年广西禽蛋中兽药残留风险检测结果分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(17): 5621–5627.
XIN LN, TAN XM, LIANG FY, *et al.* Analysis of the detection results of veterinary drug residues in poultry eggs in Guangxi in 2018 [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(17): 5621–5627.
- [9] 中华人民共和国农业农村部. 关于印发 2020 年饲料兽药生鲜乳质量安全监测计划的通知[EB/OL]. [2020-05-11]. http://www.moa.gov.cn/nygb/2020/202004/202005/t20200511_6343646.htm [2021-11-10].
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Notice on the monitoring plan for the quality and safety of fodderveterinary drugs and raw milk in 2020 [EB/OL]. [2020-05-11]. http://www.moa.gov.cn/nygb/2020/202004/202005/t20200511_63_43646.htm [2021-11-10].
- [10] 栾庆祥, 黄鑫, 孙鹏, 等. 超高效液相色谱法测定鸡肉中氯羟吡啶和磺胺类药物残留的方法研究[J]. 中国家禽, 2018, 40(11): 33–36.
LUAN QX, HUANG X, SUN J, *et al.* Determination method of clopidol and sulfonamides residues in chicken muscle by ultra performance liquid chromatography [J]. Chin Poult, 2018, 40(11): 33–36.
- [11] 赵清华, 王伟, 包凤琳, 等. 高效液相色谱法测定牛奶中氯羟吡啶的残留量[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(6): 52–54.
ZHAO QH, WANG W, BAO FL, *et al.* Determination of residual chlorine in milk by high performance liquid chromatography [J]. Chin Dairy Ind, 2016, 44(6): 52–54.
- [12] 贾涛. 超高效液相色谱法测定饲料中氯羟吡啶的方法研究[J]. 饲料与畜牧, 2014, (11): 46–49.
JIA T. Determination of chlorine in feed by ultra high performance liquid chromatography [J]. Anim Agric, 2014, (11): 46–49.
- [13] 黄梅英, 王华珍, 卢军, 等. 应用 QuEChERS-HPLC/MS/MS 法测定鸡蛋中的氯羟吡啶和阿维菌素[J]. 浙江农业科学, 2020, 61(9): 1872–1875.
HUANG MY, WANG HZ, LU J, *et al.* Determination method of clopidol and abamectin residues in egg by QuEChERS-HPLC/MS/MS [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2020, 61(9): 1872–1875.
- [14] SONG W, HU YY, HAN F, *et al.* Simultaneous determination of clopidol, sulfonamide and quinolone residues in chickens by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2013, 31(12): 1161–1166.
- [15] 陈树兵, 刘忠义, 李露青, 等. 气相色谱-串联质谱法快速测定鸡肉组织中氯羟吡啶残留量[J]. 分析测试学报, 2017, 36(5): 689–692.
CHEN SB, LIU ZY, LI LQ, *et al.* Determination of clopidol residues in chicken muscle by gas chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2017, 36(5): 689–692.
- [16] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998.
YANG LG, HU SC, WEI PH, *et al.* Enzyme immunoassay technique [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1998.
- [17] 曹涤非, 薛佳莹, 崔向红, 等. 柠檬酸三钠法制备胶体金及其应用[J]. 化学工程师, 2019, (12): 12–14, 24.
CAO DF, XUE JY, CUI XH, *et al.* Preparation and application of colloidal gold by trisodium citrate [J]. Chem Eng, 2019, (12): 12–14, 24.
- [18] 刘正才, 吴小胜, 冯才伟, 等. 胶体金免疫层析法测定牛羊肉中掺杂鸡肉[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(2): 519–524.
LIU ZC, WU XS, FENG CW, *et al.* Determination of chicken adulteration in beef and mutton by colloidal gold immunochromatography [J]. J Food Saf Qual, 2021, 12(2): 519–524.
- [19] CHAO MJ, LIU LQ, SONG SS, *et al.* Development of a gold nanoparticle-based strip assay for detection of clopidol in the chicken [J]. Food Agric Immunol, 2020, 31(1): 489–500.
- [20] 国家食品药品监督管理总局. 关于印发食品快速检测方法评价技术规范的通知(食药监办科〔2017〕43号)[EB/OL]. [2017-03-31]. <http://law.foodmate.net/show-190696.html> [2021-11-10].
State Food and Drug Administration. Notice on the issuance of technical specifications for the evaluation of rapid food testing methods (Food and Drug Administration Bureau [2017] No. 43) [EB/OL]. [2017-03-31]. <http://law.foodmate.net/show-190696.html> [2021-11-10].
- [21] 王立丹. QuEChERS 结合超高效液相色谱-高分辨质谱法测定畜禽产品中兽药残留的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2019.
WANG LD. Determination of veterinary drug residues in livestock and poultry products by QuEChERS combined with ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2019.
- [22] 张慧林. 五类非磺胺类抗原虫药及在兽医临床上的应用[J]. 畜牧兽医科技信息, 2019, (1): 153.
ZHANG HL. Five kinds of non-sulfonamide antiprotozoal drugs and their clinical application in veterinary medicine [J]. Chin J Anim Husbandry Vet Med, 2019, (1): 153.
- [23] 廖艳华, 周劭桓, 林文斯, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定鸡蛋中 11 种喹诺酮类抗生素残留的样品前处理方法优化[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(8): 910–914, 921.
LIAO YH, ZHOU SH, LIN WS, *et al.* Optimization of sample pretreatment method for determination of 11 quinolone antibiotic residues in eggs by UPLC-MS/MS [J]. Chin J Health Lab Technol, 2018, 28(8): 910–914, 921.
- [24] 杨琳芬, 万宇平, 崔廷婷, 等. 胶体金免疫层析法快速检测水果中三氯杀螨醇残留[J]. 农药, 2021, 60(2): 131–134.
YANG LF, WAN YP, CUI TT, *et al.* Rapid determination of dicofol residues in fruits by colloidal gold immunochromatography [J]. Agrochemicals, 2021, 60(2): 131–134.
- [25] 白宇, 张井, 胡景炎, 等. 牛奶中雌二醇胶体金试纸条快速检测技术研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(11): 3351–3357.
BAI Y, ZHANG J, HU JY, *et al.* Study on colloidal gold immunochromatographic assay for rapid detection of estradiol in milk [J].

- Chin Anim Husb Vet Med, 2017, 44(11): 3351–3357.
- [26] 范妙璇, 傅欣彤, 陈奕菲, 等. 三线定量胶体金免疫亲和试纸法定量中药饮片中的黄曲霉毒素 B₁ 及 B₁、B₂、G₁、G₂ 总量的研究[J]. 中草药, 2021, 52(17): 5275–5286.
- FAN MX, FU XT, CHEN YF, *et al.* Quantitative study of total amount of aflatoxins B₁ and B₁, B₂, G₁ and G₂ in Chinese herbal pieces by colloidal gold immunoaffinity method [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(17): 5275–5286.
- [27] 邢常瑞, 王曦如, 陆晨浩, 等. 基于胶体金试纸条定量快速检测系统的粮食中重金属铅检测和验证[J]. 粮食科技与经济, 2019, 44(9): 60–64.
- XING CR, WANG XR, LU CH, *et al.* Colloid gold strip quantitative detection system based lead detection and verification in grain [J]. Grain Sci Technol Econ, 2019, 44(9): 60–64.
- [28] 潘声旺, 和珏, 何茂萍, 等. 胶体金免疫层析技术在检测乳制品中三聚氰胺的应用[J]. 四川农业大学学报, 2020, 38(3): 346–352.
- PAN SW, HE Y, HE MP, *et al.* A rapid colloidal gold-based immunochromatographic strip assay for monitoring melamine in dairy products [J]. J Sichuan Agric Univ, 2020, 38(3): 346–352.
- [29] LIU B, WANG LL, TONG B, *et al.* Development and comparison of immunochromatographic strips with three nanomaterial labels: Colloidal gold, nanogold-polyaniline-nanogold microspheres (GPGs) and colloidal carbon for visual detection of salbutamol [J]. Biosens Bioelectron, 2016, 85: 337–342.
- [30] 冯才伟, 郭鑫. 氯羟吡啶抗原合成和多克隆抗体制备[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(4): 173–176.
- FENG CW, GUO X. Synthesis of clopidol artificial antigen and development of its polyclonal antibody [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2011, 38(4): 173–176.
- [31] 张海棠, 杨鑫攀, 王自良, 等. 氯羟吡啶人工抗原的合成及抗体特性[J]. 西北农业学报, 2014, 23(2): 15–20.
- ZHANG HT, YANG XP, WANG ZL, *et al.* Synthesis of artificial antigen and characteristics of polyclonal antibody of clopidol [J]. Acta Agric Boreali Occidentalis Sin, 2014, 23(2): 15–20.
- [32] 谢忠良, 李文, 何计国. 氯羟吡啶人工抗原合成和鉴定[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 228–231.
- XIE ZL, LI W, HE JG. Synthesis and characterization of artificial antigen of clopidol [J]. Food Sci, 2009, 30(1): 228–231.

(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



王兆芹, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: wangzhaoqin@kwinbon.com



万宇平, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: beijingqinbang@163.com