

胶体金免疫层析法检测水产品中孔雀石绿总量残留

王文珺^{1*}, 韩承义², 聂丽¹, 谢艳红³, 芦彩霞¹, 刘磊¹, 李俊⁴, 桑华春^{1*}

(1. 北京智云达科技股份有限公司, 北京 100085; 2. 中国渔业协会大黄鱼分会, 宁德 352100;
3. 北京众检四方检验检测技术有限公司, 北京 102200; 4. 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

摘要: **目的** 建立胶体金免疫层析法快速检测水产品中孔雀石绿总量的残留。**方法** 用柠檬酸三钠还原法制备胶体金并标记孔雀石绿单克隆抗体。基于竞争抑制反应原理, 在优化条件下建立胶体金免疫层析法。**结果** 水产品中孔雀石绿总量的检测限为 2 $\mu\text{g/mL}$, 与结构类似物结晶紫的交叉反应不明显。实际样本检测结果与液相色谱-串联质谱法检测结果的差异较小。**结论** 该方法快速、有效, 可满足现场检测水产品中隐性孔雀石绿及孔雀石绿的残留。

关键词: 孔雀石绿; 隐性孔雀石绿; 胶体金免疫层析技术; 水产品

Determination of total malachite green residues in aquatic products by colloidal gold immunochromatographic assay

WANG Wen-Jun^{1*}, HAN Cheng-Yi², NIE Li¹, XIE Yan-Hong³, LU Cai-Xia¹, LIU Lei¹,
LI Jun⁴, SANG Hua-Chun^{1*}

(1. Beijing Zhiyunda Technology Company Limited, Beijing 100085, China; 2. Large Yellow Croaker Branch of China Fisheries Association, Ningde 352100, China; 3. Beijing ZJSF Inspection & Testing Technology Co. Ltd., Beijing 102200, China; 4. Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: Objective To develop a method for the rapid determination of total malachite green (MG) residues in aquatic products by colloidal gold immunochromatography assay (GICA). **Methods** Colloidal gold was prepared by sodium citrate reduction method, which was marked malachite green monoclonal antibody. Under optimized conditions, a sensitive GICA was developed based on competitive binding immunoassay. **Results** The limit of detection was 2 $\mu\text{g/mL}$ for total amount of leucomalachite green (LMG) residues in aquatic products, and the cross-reaction with the structural analog crystal violet was not obvious. The difference between the actual sample test results and the liquid chromatography-mass spectrometry results was small. **Conclusion** This method is rapid and efficient, which can meet the need of on-site rapid detection of LMG and MG residues in aquatic products.

KEY WORDS: malachite green; leucomalachite green; colloidal gold immunochromatography assay; aquatic products

基金项目: 十三五“国家重点研发计划专项资助”(2018YFC1603402)

Fund: Supported by the China National Key R&D Program during the 13th Five-year Plan Period (2018YFC0705300)

*通讯作者: 王文珺, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品质量安全的免疫检测技术及应用研究。E-mail: wwj107@163.com

桑华春, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全快检仪器及应用方法研究。E-mail: shc@zhiyunda.com

*Corresponding author: WANG Wen-Jun, Ph.D, Associate Professor, Beijing Zhiyunda Technology Company Limited, Beijing 100085, China. E-mail: wwj107@163

SANG Hua-Chun, Ph.D, Senior Engineer, Beijing Zhiyunda Technology Company Limited, Beijing 100085, China. E-mail: shc@zhiyunda.com

1 引言

孔雀石绿(malachite green, MG)属于三苯甲烷类,最初主要作为工业染料用于纺织、制陶及食品着色中。后来,人们又将孔雀石绿作为杀菌剂用于水产养殖业中,并取得明显的效用。但随着研究的深入, MG 的危害开始逐步被揭示,如 MG 在生物体内很快代谢成脂溶性的隐性孔雀石绿(leucomalachite green, LMG), LMG 不易分解,具有致癌、致畸、致突变等危害;因此,在水产品质量安全监管中,人们主要关注 LMG 的含量。目前,包括我国在内的许多国家禁止在水产养殖中使用 MG^[1]。但因为 MG 药效明显、价格低廉,在水产品的养殖和流通环节中仍存在违法使用的情况,从而影响我国水产品质量安全。2016 年底,国内媒体“热搜”的北京超市“活鱼下架事件”,社会普遍认为与孔雀石绿等的滥用有关。

我国水产品中 MG 检测方法主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[2,3]、液相色谱-串联质谱法(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[4,5]、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[6-8]、化学发光免疫检测法(chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA)^[9,10]等,但这些方法费时、对操作人员的技术要求较高。近年来发展迅速的胶体金检测技术,具有快速、简单,不需要昂贵的检测仪器等优点,被认为是目前最具有应用价值和发展潜力的分析技术之一^[11]。原国家食品药品监督管理局颁布实施的快检标准 KJ 201701《水产品中孔雀石绿的快速检测胶体金免疫层析法》^[12],规定了水产品和养殖用水中 LMG 和 MG 的快速检测方法为胶体金免疫层析法,检测限为 2 $\mu\text{g/L}$ 。近年来,开展水产品中孔雀石绿胶体金免疫层析检测是应用研究的热点^[11,13,14],但市场上很多产品检测结果的准确度不高、灵敏度差,可从历年农业部办公厅公布的“水产品中禁用药物残留快速检测产品现场验证结果”^[15]的通知可知。孔雀石绿是水产品药物残留监管的必检项目之一,为配合农业农村部对水产品质量监管采取的市场准入与质量追溯试点工作及各级食药局的市场监管工作,开发准确、快速、稳定、有效的孔雀石绿快速检测产品是非常有必要的。本研究选用对 LMG 交叉率很高(>100%)的抗原-抗体开展研究工作,可同时实现对孔雀石绿总量的检测;在产品开发上,提高了检测灵敏度,满足市场的监测需要。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

孔雀石绿抗原、单克隆抗体由北京智云达科技股份有限公司自制;孔雀石绿标准品(纯度 96.0%)、氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 纯度 >99.9%)(美国 Sigma 公司);氘代孔雀石绿(D5-MG, 纯度 99.0%)、氘代隐性孔雀石绿(D5-LMG, 纯度 99.0%)(德国 DR 公司);隐性孔雀石绿(纯度 99.6%)标准品、

结晶紫(crystal violet, CV, 纯度 93.0%)标准品、隐性结晶紫(leucocrystal violet, LCV, 纯度 98.6%)标准品(北京坛墨质检科技有限公司);牛血清白蛋白 V 组分(bovine serum albumin, BSA)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC 膜)(美国 Millipore 公司);样品垫、吸水垫、PVC 底板(上海金标生物科技有限公司);柠檬酸三钠、碳酸钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2.2 仪器与设备

CT 300 数控切条机(上海金标生物科技有限公司);XYZ 3000 点膜仪(美国 Bio-Dot 公司);TDL-40B 低速大容量离心机(上海安亭科学仪器厂);3-18K 高速冷冻离心机(美国 sigma 公司);90-2 磁力搅拌器(上海振荣科学仪器有限公司);BSA 3202S 百分之一感量电子天平(德国赛多利斯科学仪器公司);BSA 万分之一感量电子天平(德国赛多利斯科学仪器公司);MIX 200 多管涡旋混匀仪(上海净信多科技发展有限公司);20~200 μL 、100~1000 μL 移液器(德国 Eppendorf 公司);1290 Infinity-G6460C 液相色谱质谱联用仪(美国 Agilent 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 孔雀石绿胶体金免疫层析试纸条的制备

(1) 胶体金的制备

将 1%(W/V, g/mL)的氯金酸用纯水稀释至 0.01%(W/V, g/mL),加热搅拌至煮沸,滴加 1%的柠檬酸三钠,继续搅拌加热至液体呈红色,冷却至室温后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

(2) 金标抗体的制备

选用 526~527 nm 为最大吸收峰的胶体金(粒径在 40 nm 左右),在搅拌条件下用 0.2 mol/L K_2CO_3 溶液调 pH 值至 7.5。在 20 mL 胶体金中逐滴加入 2 mL 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 MG 单克隆抗体,搅拌反应 1 h 后,加入 2 mL 10%的 BSA,磁力搅拌 1 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀用重悬液复溶,将复溶好的金标抗体 20 倍稀释后在 96 孔酶标板中冷冻干燥,每孔体积为 50 μL , -80 $^{\circ}\text{C}$ 预冻 4 h 后真空干燥 6 h。

(3) 免疫层析试纸条的制备

在 NC 膜上包被 MG 偶联抗原(0.2 mg/mL, 0.74 $\mu\text{L/cm}$)和质控线(0.5 mg/mL, 0.74 $\mu\text{L/cm}$)。喷好后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜干燥。将 NC 膜、样品垫、吸水纸及 PVC 底板组装好后(本产品不需要金标垫),切成 4 mm 宽后装卡,置于锡箔袋中,加干燥剂密封保存。试纸条的结构见图 1。

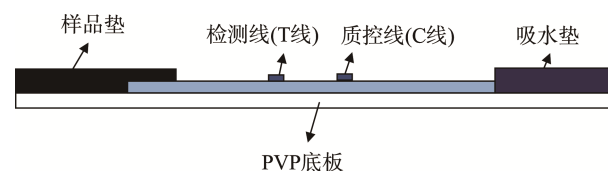


图 1 试纸条剖面结构图

Fig.1 Profile of rapid detection strip

2.3.2 孔雀石绿标准品的配制

称取适量的 LMG 标准品, 用乙腈溶解, 配制成 100 $\mu\text{g/L}$ 的标准储备液。移取一定量的标准储备液, 加入 1×PBS(phosphate buffer saline)缓冲溶液, 分别配制 0、1、2、4、10 $\mu\text{g/L}$ 系列梯度质量浓度的标准工作溶液, 现用现配。

2.3.3 前处理方法

称取(2.0±0.05) g 均质组织样本至 50 mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 2 mL 乙酸铵缓冲液, 混匀。再加入 5 mL 乙酸乙酯, 混匀。加入 1 g 净化剂, 充分混匀后, 室温下 4000 r/min 离心 3 min。取 3 mL 上清液至 10 mL 聚苯乙烯离心管中, 加入 20 μL 氧化铝, 充分混匀, 于 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气流下吹干; 加入 0.4 mL 0.1 mol/L PBS 缓冲液溶解, 即得待测液。

2.3.4 检测与结果判定

用移液器吸取 80 μL 待测液于微孔中, 使其与微孔中试剂充分混匀, 孵育 3 min 后, 吸取混匀液约 80 μL 垂直滴于检测卡的加样孔中。反应 5~8 min 后判定结果。因为 MG 的抗原为绿色, 所以 T 线不能完全消线。

2.3.5 检测卡性能指标的确定

检测限: 取空白的均质样本, 分别添加 LMG 至终浓度为 0、1、2、4 $\mu\text{g/kg}$ 。检测卡测试, 重复 3 次。

准确性: 取已知 MG 含量大于等于检测限的加标阳性样本 20 份、阴性样本 20 份及 2 个实际阳性样本。用 MG 检测卡分别检测, 计算假阳性率和假阴性率。

特异性: 分别向空白鱼肉、虾肉样本中添加三苯甲烷类药物 MG、CV、LCV 至浓度为 0、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/kg}$ 。每个浓度的不同药物重复 3 次检测, 根据试验结果判定检测卡的特异性。

对比试验: 30 份鱼、虾盲样(由中国渔业协会提供), 分别用胶体金免疫层析法(colloidal gold immunochromatography assay, GICA)和 LC-MS 法测定其中 LMG 残留量。当样品中 LMG 含量低于检测卡检测限浓度, 判为阴性, 用“-”表示, LC-MS 阴性结果用“-”表示。当样品中 LMG 含量高于检测卡检测限浓度, 判为阳性, 用“+”表示; LC-MS 阳性结果用实测值表示。

2.3.6 LC-MS 检测条件

检测条件参考田秀慧等^[16]的方法, 在北京众检四方检验检测技术有限公司完成。

(1) 色谱条件

色谱柱: C_{18} (50 mm×2.1 mm, 3 μm); 流动相: 乙腈和含有 0.1% 甲酸的乙腈水溶液; 流速: 0.25 mL/min; 进样量: 10 μL ; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

(2) 质谱条件

电离方式: ESI^+ ; 扫描方式: 多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)。雾化气、帘帘气、辅助加热气、

碰撞气均为高纯氮气; 喷雾电压、去集旗电压、碰撞能等电压值优化至最优灵敏度。监测离子对: 孔雀石绿 m/z 329/313(定量离子)、329/208; 隐色孔雀石绿 m/z 331/316(定量离子)、331/239; 结晶紫 m/z 372/356(定量离子)、372/251; 隐色结晶紫 m/z 374/359(定量离子)、374/238; 氘代孔雀石绿 m/z 334/318(定量离子); 氘代隐色孔雀石绿 m/z 337/322(定量离子)。

3 结果与分析

3.1 灵敏度

为提高检测灵敏度, 本研究采用样品提取液中待测物先与微孔中的金标抗体反应, 得到的反应液再滴加到检测卡上与 T 线的包被抗原和 C 线的二抗反应。使得检测灵敏度得到有效提高。因此本研究开发的检测卡没有金标垫, 是与传统胶体金检测卡不同的地方。

3.2 检出限

用检测卡检测 LMG 浓度分别为 0、1、2、4 $\mu\text{g/kg}$ 的水产样本。当测试 LMG 浓度为 0 $\mu\text{g/kg}$ 和 1 $\mu\text{g/kg}$ 的样本时, 检测结果呈阴性; 当检测 LMG 浓度为 2 $\mu\text{g/kg}$ 和 4 $\mu\text{g/kg}$ 的水产品样本时, 检测结果呈阳性。该实验重复多次, 重现性好, 可判定本研究开发的检测卡的检出限为 2 $\mu\text{g/kg}$ 。考虑胶体金免疫层析技术存在的不确定度区间范围, 没有再做进一步的细化检测。

3.3 准确性

取 2 个批号的检测卡, 分别检测空白水产品样本、加标阳性水产品样本各 20 份及 2 份实际阳性水产品样本; 肉眼观察检测结果, 计算试纸条假阴性率和假阳性率。测试结果显示加标阳性样本及实际阳性样本判断均为阳性。对阴性样本的检测, 出现了一个有争议的阳性结果(不同人判断结果不同), 假阳性率为 5%。由于胶体金免疫层析法主要通过 T 线与 C 线颜色的变化来确定样本阴阳性, 而 MG 包被抗原为浅绿色, 致使 T 线不能完全消线, 受产品熟悉度及个人经验影响, 可能会出现假阳性判断的问题。

3.4 特异性

用该试纸条检测浓度分别为 0、2、5、10、20、50 $\mu\text{g/kg}$ 的其他三苯甲烷类药物及代谢物, 确定检测卡的特异性, 检测结果表明(见表 1), 检测卡与水产品中 GM 的结构类似物存在不同程度的交叉反应, GM 的样品检测限为 2 $\mu\text{g/kg}$, 因此该检测卡可同时检测水产品中的 GM 残留。

3.5 比对试验

以 MG 检测卡的检测限(2 $\mu\text{g/kg}$)为阳性判定线, 低于检测限的以“-”表示, 高于或等于检测限的以“+”表示; LC-MS 法低于该检测限的以“-”表示, 高于该检测限的

以实测值表示,检测结果见表 2。30 份盲样经检测卡检测后,检测出 7 份阳性样本。用 LC-MS 法检测上述 30 份盲样,检测出 7 份阳性样本,且编号与检测卡一一对应。说明了本研究工作开发的胶体金检测卡可对水产品

中 LGM 污染情况准确定性。但即使这样,考虑免疫检测的固有属性,仍不能完全排除出现假阳性的可能性,因此对于检测结果中出现的阳性样本,还需要复检或用仪器方法进行确证。

表 1 隐性孔雀石绿检测卡特异性
Table 1 Specificity of LGM rapid test strip

结构类似物	浓度/(μg/kg)					
	0	2	5	10	20	50
孔雀石绿(GM)	—	+	+	+	+	+
结晶紫(CV)	—	—	—	—	+	+
隐性结晶紫(LCV)	—	—	—	—	—	+

注:“—”表示阴性,“+”表示阳性。

表 2 胶体金免疫层析法与液质联用检测结果比对(μg/kg, n=3)
Table 2 Comparison of detecting results between GICA and LC-MS (μg/kg, n=3)

样本号	检测方法		样本号	检测方法	
	GICA	LC-MS		GICA	LC-MS
1	—	—	16	—	—
2	—	—	17	+	3.96±1.30
3	—	—	18	—	—
4	—	—	19	—	—
5	+	2.76±2.10	20	—	—
6	—	—	21	—	—
7	—	—	22	—	—
8	—	—	23	—	—
9	+	2.18±1.25	24	+	3.28±1.25
10	+	3.04±1.84	25	+	5.20±0.97
11	—	—	26	—	—
12	—	—	27	—	—
13	—	—	28	—	—
14	—	—	29	—	—
15	+	2.51±1.58	30	—	—

4 结 论

本研究开发的孔雀石绿胶体金检测卡,可实现对鱼、虾等水产品中孔雀石绿总量的有效检测,检测卡的准确性、检测限、特异性满足了原国家食品药品监督管理局颁布实施的快检标准 KJ 201701《水产品中孔雀石绿的快速检测胶体金免疫层析法》的技术参数要求,为快检作为一种执法手段提供了技术上的依据。本研究采用提取液微孔孵育的办法,使提取液先与微孔中的金标抗体充分反应后再加

到检测卡上与 T 线上的抗原和 C 线上的二抗反应,提高了检测灵敏度;且前处理步骤的氧化过程可将样本中 LMG 氧化成 MG 后检测,实现对 LMG 和 MG 的同时检测。为减少基质干扰和提高检测灵敏度,前处理采取氮吹后复溶的方法,为缩短前处理时间,计划后续开发净化柱的前处理办法,但无疑会极大增加使用者的检测成本。

参考文献

[1] 翟毓秀, 张翠, 宁劲松, 等. 水产品中孔雀石绿残留及其研究概况[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(1): 101–108.
Zhai YX, Zhang C, Ning JS, *et al.* Survey of malachite green residue in aquatic product [J]. Mar Fish Res, 2007, 28(1): 101–108.

[2] GB/T 19857-2005 水产品中孔雀石绿和结晶紫残留量的测定[S].
GB/T 19857-2005 Determination of malachite green and crystal violet residues in aquatic product [S].

[3] 王丽博, 苏立强, 韩超男, 等. 分子印迹固相萃取-高效液相色谱法检测水产品中的孔雀石绿[J]. 分析科学学报, 2018, 34(2): 229–233.
Wang LB, Su LQ, Han CN, *et al.* Determination of malachite green in aquatic products by molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography [J]. J Anal Sci, 2018, 34(2): 229–233.

[4] Nebot C, Iglesias A, Barreiro R, *et al.* A simple and rapid method for the identification and quantification of malachite green and its metabolite in hake by HPLC-MS/MS [J]. Food Control, 2013, 31(1): 102–107.

[5] 张艺蓓, 岳田利, 乔海鹏, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测鱼中孔雀石绿、结晶紫及其代谢物[J]. 食品科学, 2014, 35(10): 179–184.
Zhang YB, Yue TL, Qiao HO, *et al.* Determination of malachite green, crystal violet and their metabolites in fishes by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Food Sci, 2014, 35(10): 179–184.

[6] 吕芳, 徐锐, 隋建新, 等. 水产品中孔雀石绿残留酶联免疫检测的基质干扰及消除方法[J]. 中国渔业质量与标准, 2013, 3(1): 59–64.
Lv F, Xu R, Sui JX, *et al.* Enzyme-linked immunoassay of malachite green in aquatic products: Elimination source of matrix interference and elimination strategy [J]. Chin Fish Qual Stand, 2013, 3(1): 59–64.

[7] Dong JX, Xu C, Wang H, *et al.* Enhanced sensitive immunoassay:

- Noncompetitive phage anti-immune complex assay for the determination of malachite green and leucomalachite green [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, (62): 8752–8758.
- [8] 王宇, 杨金易, 徐振林, 等. 孔雀石绿单克隆抗体制备和酶联免疫检测方法的建立[J]. *分析化学*, 2016, 44(9): 1385–1393.
- Wang Y, Yang JY, Xu ZL, *et al.* Synthesis of novel hapten and development of monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for malachite green in fish samples [J]. *Chin J Anal Chem*, 2016, 44(9): 1385–1393.
- [9] Zhang Y, Yang JY, Lei HT, *et al.* Development of chemiluminescent enzyme immunoassay for the determination of malachite green in seafood [J]. *Food Agric Immun*, 2015, 26(2): 204–217.
- [10] 龚倩, 郗存显, 裴福平, 等. 水产品中孔雀石绿 AlphaLISA 检测方法的建立[J]. *食品与发酵工业*, 2017, 43(2): 206–210.
- Gong Q, Xi CX, Nie FP, *et al.* Quantitative determination of malachite green in aquatic products using amplified luminescent proximity homogeneous assay [J]. *Food Ferment Ind*, 2017, 43(2): 206–210.
- [11] 山珊, 彭涛, 杨万春, 等. 胶体金免疫层析法定量检测孔雀石绿[J]. *食品科学*, 2013, 34(16): 160–163.
- Shan S, Peng T, Yang WC, *et al.* Development of colloidal gold lateral flow assay for quantitative detection of malachite green [J]. *Food Sci*, 2013, 34(16): 160–163.
- [12] KJ 201701 水产品中孔雀石绿的快速检测胶体金免疫层析法[S].
- KJ 201701 Rapid detection of malachite green in aquatic products by colloidal gold immunochromatography [S].
- [13] Xu NF, Li LQ, Song SS, *et al.* Development of a lateral flow immunoassay for the detection of total malachite green residues in fish tissues [J]. *Food Agric Immun*, 2015, 26(6): 870–879.
- [14] 桑丽雅, 朱晓华, 郑百芹, 等. 水产品孔雀石绿和隐性孔雀石绿快速定量检测研究[J]. *食品研究与开发*, 2014, (10): 92–95.
- Sang LY, Zhu XH, Zheng BQ, *et al.* Study on rapid and quantitative detection for malachite green and leucomalachite green in aquatic product [J]. *Food Res Dev*, 2014, (10): 92–95.
- [15] 农业部办公厅关于公布 2016 年水产品中禁用药物残留快速检测产品现场验证结果的通知[EB/OL]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/tfw/201612/t20161214_5407110.htm.
- Notice of the General Office of the Ministry of Agriculture on the publication of on-site verification results for the rapid detection of banned drug residues in aquatic products in 2016 [EB/OL]. http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/tfw/201612/t20161214_5407110.htm.
- [16] 田秀慧, 于召强, 陈 玮, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产苗种中孔雀石绿及其代谢物隐性孔雀石绿[J]. *食品科学*, 2013, 34(12): 171–177.
- Tian XH, Yu ZQ, Chen W, *et al.* Determination of malachite green and its metabolite leucomalachite green in aquatic fingerlings by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2013, 34(12): 171–177.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介



王文珺, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品质量安全的免疫检测技术及应用研究。

E-mail: wwj107@163.com



桑春华, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全快检仪器及应用方法研究。

E-mail: shc@zhiyunda.com