

不同品牌胶体金免疫层析法试剂检测原料乳中 氟苯尼考的研究

赵 媛, 宋晓东*, 马文丽, 林立民

(内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司, 呼和浩特 011500)

摘 要: **目的** 采用一种新型快速的免疫学检测技术, 胶体金免疫层析法试剂检测原料乳中氟苯尼考药物残留量。**方法** 选用阴性原料乳为研究样本, 向其中加入不同浓度水平的氟苯尼考标准物质, 制成不同浓度水平的样本, 样本不需要前处理, 直接进行检测, 按照所购买的 5 种不同品牌氟苯尼考快速检测试纸条的操作方法进行验证比对。**结果** 选用 5 种不同品牌试剂检测时, 发现品牌 C、D 试剂检出限均达到了 0.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 20 组样本重复检测阳性率均为 100%; 检测时间较短, 均在 10 min 之内; 检测交叉反应率均为 0%; 检测无干扰。在检出限、重复性、特异性、干扰性等方面, 品牌 C、D 试剂方法较好, 满足检测要求。**结论** 品牌 C、D 试剂具有简单快速、灵敏度高、特异性强等特点, 能够作为乳制品企业一种快速初筛原料乳中氟苯尼考药物残留的定性检测方法。

关键词: 氟苯尼考; 胶体金免疫层析法; 原料乳; 不同品牌

Research on the detection of florfenicol in raw milk by different brands of colloidal gold immunochromatographic reagents

ZHAO Yuan, SONG Xiao-Dong*, MA Wen-Li, LIN Li-Min

(Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Hohhot 011500, China)

ABSTRACT: Objective To detect the residual amount of florfenicol in raw milk, a new type of rapid immunological detection technology—colloidal gold immunochromatographic reagents, was used. **Methods** The negative raw milk was selected as the research sample, which was added with different concentration of fluorfenicol standard substances to make samples of different concentration levels. The samples did not need pre-treatment, but directly tested. Verification and comparison were conducted according to the operation method of the fast test strip of fluorfenicol purchased from 5 different reagent manufacturers. **Results** When 5 different reagents were selected for testing, it was found that the detection limits of brand C and D reagents both reached 0.05 g/kg. The positive rates of repeated detection in 20 groups were both 100%. The detection time was short, both within 10 min. The cross reaction rates were both 0%. No interference was detected. In terms of detection limit, repeatability, specificity, and interference, the brand C and D reagent methods were better and meet the testing requirements. **Conclusion** The brand C and D reagents are characterized by simple, rapid, high sensitivity and high specificity, they can be used as a qualitative detection method for florfenicol residues in the raw materials of dairy products.

KEY WORDS: florfenicol; colloidal gold immunochromatography; raw milk; different brands

*通讯作者: 宋晓东, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为乳品检测技术和产品质量控制研究。E-mail: songxiaodong@mengniu.cn

*Corresponding author: SONG Xiao-Dong, Master, Senior Engineer, Inner Mongolia Mengniu Dairy Industrial Co. Ltd., Hohhot 011500, China. E-mail: songxiaodong@mengniu.cn

1 引言

氟苯尼考(florfenicol),又名氟甲砜霉素,是一种新的兽医专用氯霉素类的广谱抗菌药,具有吸收好、体内分布广、广谱抗菌、安全高效等特点,对敏感菌所致的畜禽细菌性疾病治疗效果显著,作为氯霉素的替代物,广泛应用于治疗畜禽及水产品的细菌性疾病^[1]。研究表明,氟苯尼考具有胚胎毒性和耐药性,在畜禽生产上的大量应用也导致其在畜禽产品中残留,危害人体健康^[2,3]。欧盟、日本等国家均制定了动物食品中氟苯尼考的最大残留量标准,我国农业部 235 号公告也对其残留量做了严格规定,在牛、羊泌乳期禁用^[2-4]。

目前,检测动物源性食品中氟苯尼考残留的检测方法主要有电位法、分光光度法、色谱法、免疫分析法等^[5-12]。其中免疫分析法中胶体金免疫层析技术是一种新型快速发展的免疫学检测技术,其检测原理是滴加在膜一端的标本受膜的毛细管作用向另一端移动,犹如层析一般,被分析物与固定于载体膜上某一区域的抗原或抗体结合,无关物则越过该区域而被分离,然后通过胶体金的呈色条带来判定实验结果^[13-16]。该检测技术因为成本低廉,应用范围广,检测速度快,操作简便,特异性强,灵敏度高,结果可靠性高,无需特殊仪器设备等优点而被广泛关注^[14-16]。因此,常被乳制品企业用于定性筛查方法。但对于不同品牌胶体金免疫层析法试剂之间的比较研究较少。本研究对于市售不同品牌胶体金免疫层析法试剂在检出限、重复性、特异性、干扰性等方面检测原料乳中氟苯尼考残留对比,以期乳制品企业选择试剂品牌提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

单道移液器(20~200 μL , 德国 BRAND 公司)。

氟苯尼考标准物质(纯度>99.8%, 德国 DR 公司)。

5 个不同品牌的氟苯尼考快速检测试纸条(品牌 A, B, C, D, E); 5 个不同品牌的读数仪(品牌 A, B, C, D, E); 2 个不同品牌恒温金属加热器(品牌 A, B); 2 个不同品牌温育器(品牌 C, D)。

2.2 实验方法

依据不同品牌氟苯尼考快速检测试纸条说明书操作。

选取市售 5 种不同品牌的试剂厂家进行实验,品牌名称分别用 A、B、C、D、E 代替。

2.2.1 品牌 A 试剂检测方法

- (1) 连接读数仪;
- (2) 开启恒温金属加热器;
- (3) 从原包中取出检测条,在 1 h 内应尽快地使用;
- (4) 取 100 μL 奶样加入到试剂微孔中,1 min 后抽吸

5~10 次,混合均匀;

(5) 45 $^{\circ}\text{C}$ 下第 1 次温育 4 min,听到加热器提示音后将测试条“MAX”端插入到试剂微孔中;

(6) 45 $^{\circ}\text{C}$ 下第 2 次温育 5 min; 听到加热器提示音后将测试条“MAX”端插入读数仪中读数;

(7) 结果判断: T/C 线数值>1.05, 读数仪检测结果自动显示为(-)阴性; T/C 线数值 $\leq$ 1.05, 读数仪检测结果自动显示为(+)阳性。

2.2.2 品牌 B 试剂检测方法

(1) 从原包装中取出试剂桶,打开后取出所需数目的微孔试剂和试纸条,并做好标记,请在 60 min 内尽快使用,检测试剂取出后,请立即盖好试剂桶盖;

(2) 用微量移液器吸取 100 μL 待检样品加入加样微孔中,缓慢抽吸 10 次以上使奶样充分与微孔中试剂混匀;

(3) 室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)孵育 5 min 后,将标记好的试纸条插入微孔中—印有“MAX”标示线的一端朝下,使之充分浸入溶液中;

(4) 再次室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)孵育 5 min 后,取出试纸条并插入读数仪中读数;

(5) 结果判断: 将试纸条插入读数仪中读数,结果以读数仪显示为准,读数仪结果显示为阴性,结果报出阴性; 读数仪结果显示为阳性,结果报出阳性。

2.2.3 品牌 C 试剂检测方法

(1) 取 200 μL 奶样加入红色试剂微孔中,抽吸 5~10 次直至微孔试剂混合均匀;

(2) (40 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 温育 3 min;

(3) 将试纸条插入到红色试剂微孔中;

(4) (40 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min;

(5) 从微孔中取出试纸条,轻轻刮去试纸条下端的样品垫,将试纸条插入读数仪中读数;

(6) 结果判断: 读数仪判读结果显示,阴性结果 $R>1.1$, 阳性结果 $R\leq 1.1$ 。

2.2.4 品牌 D 试剂检测方法

(1) 打开试纸筒,取所需量金标微孔和试纸条,做好标记并置于桌面上;

(2) 将待检奶样充分摇匀后,吸取 200 μL 于金标微孔中,小心吹打至孔底的紫红色颗粒完全溶解,并将金标微孔置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 温育器中,温育 3 min;

(3) 将试纸条插入金标微孔中,使样品垫充分浸入奶样中,并反应 5 min;

(4) 从金标微孔中取出试纸条,弃去试纸条下端的样品垫,将试纸条插入读数仪中读数;

(5) 结果判断: 仪器判读为阴性(-),则试纸条检测结果为阴性(-); 仪器判读为阳性(+),试纸条检测结果为阳性(+).

2.2.5 品牌 E 试剂检测方法

(1) 打开样品杯,加入 150 μL 待测样品,充分溶解、

混匀,置室温;

(2) 从试纸筒内取出检测条,按箭头向下插入样品杯中,孵育 6 min;

(3) 6 min 结束,取出试纸条吸干下端液体,放入读数仪中读取结果;

(4) 结果判断: 读数仪读取结果显示,阳性反应: 判定结果提示+或++, 判为阳性; 阴性反应: 判定结果提示-, 判为阴性。

2.3 样品制备及检测

样品不需要前处理,回温至室温后,直接检测,按照不同品牌试剂的操作方法进行,并根据结果判断要求用读数仪判断检测结果。

2.4 检出限实验

选取阴性原料乳样品 6 份,向其中 5 份样品中各加入氟苯尼考标准品,分别配制成不同浓度水平样品,其中 1 份做阴性对照,按照不同品牌试剂操作方法进行检测,并计算各个试剂的样品阳性率。

2.5 重复性实验

选取阴性原料乳样品,加入氟苯尼考标准品,配制成 0.1 μg/kg 浓度水平样品,按照不同品牌试剂操作方法进行检测,每种试剂重复检测 20 组,并计算各个试剂的样品阳性率。

2.6 特异性实验

选取阴性原料乳样品,加入氯霉素、甲矾霉素等同类药物标准品,分别配制成 0.1 μg/kg 浓度水平样品,按照不同品牌试剂操作方法进行检测,每种试剂检测 6 组,并测定是否存在交叉反应。

2.7 干扰性实验

选取阴性原料乳样品,加入干扰性物质后,分别配制成 0.1 μg/kg 浓度水平样品,按照不同品牌试剂操作方法进行检测,每种试剂检测 6 组,并测定试剂是否存在干扰。

3 结果与分析

3.1 检出限

根据不同品牌试剂方法检出样品的阳性率不同,由此可得出各个品牌试剂的检出限浓度值,检出限结果对比如表 1 所示,添加浓度水平为 0.05 μg/kg 时,品牌 B、C、D 试剂阳性率均为 100%,可知品牌 B、C、D 试剂检出限均为 0.05 μg/kg; 添加浓度水平为 0.07 μg/kg 时,品牌 A 试剂阳性率为 100%,可知品牌 A 试剂检出限为 0.07 μg/kg; 添加浓度水平为 0.1 μg/kg 时,品牌 E 试剂阳性率为 100%,可知品牌 E 试剂检出限为 0.1 μg/kg。因此,品牌 B、C、D

试剂灵敏度比较高。

表 1 检出限实验结果对比(n=6)
Table 1 Comparison of detection limits (n=6)

品牌名称	添加浓度/(μg/kg)	阳性率/%	检出限/(μg/kg)
A	0.03	0	0.07
	0.05	0	
	0.07	100	
	0.1	100	
B	0.03	83.33	0.05
	0.05	100	
	0.07	100	
	0.1	100	
C	0.03	33.33	0.05
	0.05	100	
	0.07	100	
	0.1	100	
D	0.03	16.67	0.05
	0.05	100	
	0.07	100	
	0.1	100	
E	0.03	0	0.1
	0.05	0	
	0.07	83.3	
	0.1	100	

3.2 重复性

通过检测同一浓度水平的 20 组样品,可知品牌 A、B 试剂阳性率均低于 100%,品牌 C、D、E 试剂阳性率均为 100%。因此,品牌 C、D、E 试剂具有良好的重复性,试剂检测稳定性较好,重复性实验结果见表 2。

3.3 特异性

根据各个品牌试剂检测同一水平的氯霉素、甲矾霉素等同类氯霉素药物,可知各个品牌试剂阳性率均为 0%,而且交叉反应率均为 0%。因此,各个品牌试剂均无交叉反应,试剂特异性良好,特异性实验结果见表 3。

3.4 干扰性

根据各个品牌试剂检测同一水平的干扰物质,结果显示,除品牌 E 试剂阳性率为 50%,存在干扰外,其余 4 个品牌试剂阳性率均为 0%,而且均无干扰。因此,品牌 A、B、C、D 试剂具有良好的抗干扰性,干扰性实验结果见表 4。

表 2 重复性实验结果(n=20)
Table 2 Results of repetitive (n=20)

重复次数/次	添加浓度 /(μg/kg)	品牌 A	品牌 B	品牌 C	品牌 D	品牌 E
		检测结果	检测结果	检测结果	检测结果	检测结果
1	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
2	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
3	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
4	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
5	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
6	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
7	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
8	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
9	0.1	阴性(-)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
10	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
11	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
12	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
13	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
14	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
15	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
16	0.1	阳性(+)	阴性(-)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
17	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
18	0.1	阴性(-)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
19	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
20	0.1	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)	阳性(+)
阳性率/%		90	95	100	100	100

表 3 特异性实验结果(n=6)
Table 3 Results of specificity (n=6)

重复次数/次	同类药物添加浓度 /(μg/kg)	品牌 A	品牌 B	品牌 C	品牌 D	品牌 E
		检测结果	检测结果	检测结果	检测结果	检测结果
1	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
2	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
3	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
4	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
5	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
6	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
阳性率/%		0	0	0	0	0
交叉反应率/%		0	0	0	0	0

表 4 干扰性实验结果(n=6)
Table 4 Results of interference (n=6)

重复次数/次	干扰物添加浓度 /(μg/kg)	品牌 A	品牌 B	品牌 C	品牌 D	品牌 E
		检测结果	检测结果	检测结果	检测结果	检测结果
1	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
2	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阳性(+)
3	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阳性(+)
4	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
5	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阳性(+)
6	0.1	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)	阴性(-)
阳性率/%		0	0	0	0	50
干扰性		无	无	无	无	有

3.5 各项指标综合比对

根据各个品牌试剂检测结果显示, 品牌 B、C、D 试剂灵敏度比较高, 检出限均达到了 0.05 μg/kg; 品牌 C、D、E 试剂检测时间较短, 均在 10 min 之内; 5 种品牌试剂均无交叉反应; 品牌 A、B、C、D 试剂干扰性较好。综上所述, 可以得出, 品牌 C、D 试剂具有灵敏度高、检测速度快、特异性强等特点, 具体各项指标综合比对见表 5。

表 5 各项指标综合比对
Table 5 Comprehensive comparison of various indicators

品牌名称	检出限/(μg/kg)	检测时间/min	交叉反应率/%	干扰性
A	0.07	10	0	无
B	0.05	10	0	无
C	0.05	8	0	无
D	0.05	8	0	无
E	0.1	6	0	有

4 结 论

通过对 5 种不同品牌胶体金免疫层析法试剂的研究, 发现品牌 C、D 试剂方法灵敏度高, 重复性好, 特异性强, 抗干扰性强, 在乳制品企业实际检测工作中, 可以作为一种快速初筛原料乳中氟苯尼考药物残留的方法, 提高了实验效率, 提供了技术保障。

参考文献

[1] 冯才茂, 贾瑜, 马孝斌, 等. 氟苯尼考残留的酶联免疫检测方法的研究[J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(4): 50–53.
Feng CM, Ja Y, Ma XB, et al. Detection of florfenicol residues by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Beijing Technol Busin, 2012, 30(4): 50–53.
[2] 孙素玲, 徐园芳. 动物组织中氟苯尼考残留的半定量快速检测胶体金

试纸条的研制—氟苯尼考抗原的合成与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(23): 7757–7758.
Sun SL, Xu YF. Development colloidal gold test strip of rapid semi-quantitative detection of florfenicol residues in animal tissues—synthesis and identification of florfenicol antigen [J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(23): 7757–7758.
[3] 潘红艳, 宫智勇. 氟苯尼考的研究进展及临床应用[J]. 湖北农业科学, 2011, (2): 46–48.
Pan HY, Gong ZY. Advance in the research and clinical application of florfenicol [J]. J Hubei Agric Sci, 2011, (2): 46–48.
[4] 中华人民共和国农业部公告第 235 号[EBOL]. [2008-03-04]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/nybz/200803/t20080304_1028649.htm.
Ministry of Agriculture, Ministry of Agriculture Announcement No. 235 [EBOL]. [2008-03-04]. http://jiuban.moa.gov.cn/zwllm/nybz/200803/t20080304_1028649.htm.
[5] 李艺, 李孝文, 孙志良. 氟苯尼考检测技术研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 32(9): 89–93.
Li Y, Li XW, Sun ZL. Advance in detection techniques of florfenicol [J]. Pro Vete Med, 2011, 32(9): 89–93.
[6] 刘传发, 杨帆. 动物源性食品中氟苯尼考及氟苯尼酰胺残留检测方法的研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2015, 40(3): 1–5.
Liu CF, Yang F. Research progress on detection methods of florfenicol and florfenicol residues in animal source foods [J]. Guangdong J Anim Vet Sci, 2015, 40(3): 1–5.
[7] 李鹏, 邱月明, 蔡慧霞, 等. 气相色谱-质谱联用法测定动物组织中氯霉素、氟甲砜霉素和甲砜霉素的残留量[J]. 色谱, 2006, 24(1): 14–18.
Li P, Qiu YM, Cai HX, et al. Simultaneous determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in animal tissues by gas chromatography/mass spectrometry [J]. Chin J Chromatogr, 2006, 24(1): 14–18.
[8] 孙法良, 刁有祥, 孙宁, 等. 鸡肉中氟苯尼考 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1813–1819.
Sun FL, Diao YX, Sun N, et al. Establishment and application of detecting the residues of florfenicol in chicken muscle by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Sci Agric Sin, 2009, 42(5): 1813–1819.

- [9] 谢恺舟, 姚宜林, 李洋静, 等. 高效液相色谱荧光检测法同时检测鸡肉中氟苯尼考及氟苯尼考胺残留[J]. 中国兽医学报, 2010, 47(8): 74-77.
Xie KZ, Yao YL, Li YJ, *et al.* Simultaneous determination of residues of for fenicol and forfenicol amine in chicken muscle by HPLC with fluorescence detection [J]. Chin J Vet Sci, 2010, 47(8): 74-77.
- [10] 邹芸, 王国民, 李贤良, 等. 动物源性食品中胺苯醇类兽药残留检测研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 32-35.
Zou Y, Wang GM, Li XL, *et al.* Progress of the detection of amphenicols residues in animal-derived foods [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2009, 36(4): 32-35.
- [11] 张晶, 杨晓健, 周伟靓. 氟苯尼考粉中氟苯尼考含量测定方法的比较[J]. 福建畜牧兽医, 2006, 28(4): 11-12.
Zhang J, Yang XJ, Zhou WL. Determination of florfenicol content in florfenicol powder with different methods [J]. Fujian J Anim Husb Vet, 2006, 28(4): 11-12.
- [12] 庄宛, 叶玫. 动物性食品中氯霉素(CAP)残留检验方法概述[J]. 福建畜牧兽医, 2004, 26(1): 8-10.
Zhuang W, Ye M. Summarize of analyzing methods of hloramphenicol residue in animal foods [J]. Fujian J Anim Husb Vet, 2004, 26(1): 8-10.
- [13] 任娟. 胶体金免疫层析技术研究现状及进展[J]. 新疆畜牧业, 2011, (12): 22-24.
Ren J. Research status and development of colloidal gold immunochromatography [J]. Xinjiang Anim Husb, 2011, (12): 22-24.
- [14] 蒋旭, 李青竹, 邱月红, 等. 胶体金免疫层析技术研究进展[J]. 畜禽业, 2015, (5): 28-30.
Jiang X, Li QZ, Qiu YH, *et al.* Research progress on colloidal gold immunochromatography [J]. Live Poul Ind, 2015, (5): 28-30.
- [15] 袁志杰, 杨柳, 郑文杰, 等. 胶体金免疫层析技术的研究现状与前景[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, (1): 84-85.
Yuan ZJ, Yang L, Zheng WJ, *et al.* Research status and prospects of colloidal gold immunochromatography [J]. J Qiqihar Med Coll, 2015, (1): 84-85.
- [16] 龚频, 王思远, 陈雪峰, 等. 胶体金免疫层析试纸条技术及其在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, (13): 358-364.
Gong P, Wang SY, Chen XF, *et al.* Research progress of colloidal gold immunochromatographic test strip technology in food safety testing [J]. Sci Technol Food Ind, 2019, (13): 358-364.

(责任编辑: 王 欣)

作者简介



赵 媛, 硕士, 主要研究方向为乳品分析。

E-mail: zhaoyuan1@mengniu.cn



宋晓东, 硕士, 高级工程师, 主要研究方向为乳品检测技术和产品质量控制研究。

E-mail: songxiaodong@mengniu.cn