

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241023006

胶体金免疫层析法快速检测动物肌肉组织中 喹乙醇代谢物

柳义茂, 张瑾如, 林长虹, 陈晓丹, 罗晓丹, 古丽君*

(深圳市计量质量检测研究院, 深圳 518000)

摘要: **目的** 优化胶体金免疫层析法快速检测动物肌肉组织中喹乙醇代谢物。**方法** 样品中的喹乙醇残留标志物 3-甲基喹噁啉-2-羧酸经盐酸水解、乙腈提取、磷酸缓冲盐溶液复溶, 用于胶体金试纸条的检测。依据 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》拟定检出限, 筛选符合要求的快速检测产品, 根据《市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见》(国市监食检规〔2023〕1号)对快速检测产品进行评价, 初步确定该方法的性能指标和交叉反应率要求, 并与液相色谱-质谱法进行一致性分析。**结果** 该方法适用于猪、鸡、鱼和虾肌肉组织的检测, 猪肉的检出限为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 鸡肉、鱼肉、虾肉的检出限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 方法灵敏度 $\geq 95\%$ 、特异性 $\geq 95\%$ 、假阴性率 $\leq 5\%$ 、假阳性率 $\leq 5\%$; 卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸的交叉反应率 $\leq 8.0\%$, 喹乙醇、卡巴氧、乙酰甲喹、乙酰甲喹代谢物 2-(1-羟乙基)-3-甲基喹噁啉-1,4-二氧化物的交叉反应率 $< 0.1\%$ 。该方法测定结果与液相色谱-质谱法一致。**结论** 该方法前处理简单、快速准确, 适用于喹乙醇残留物的快速筛查与确证, 为喹乙醇残留物快速检测的研发与监测提供综合性的技术手段。

关键词: 喹乙醇; 3-甲基喹噁啉-2-羧酸; 胶体金免疫层析法; 快速检测; 液相色谱-质谱法

Rapid detection of quinol metabolites in animal muscle tissue by colloidal gold immunochromatography

LIU Yi-Mao, ZHANG Jin-Ru, LIN Chang-Hong, CHEN Xiao-Dan,
LUO Xiao-Dan, GU Li-Jun*

(Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518000, China)

ABSTRACT: Objective To optimize a colloidal gold immunochromatographic assay for the rapid detection of quinol metabolites in animal muscle tissues. **Methods** The quinol residue marker 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid in the sample was hydrolyzed by hydrochloric acid, extracted by acetonitrile, and re-solubilized by phosphate buffer salt solution, and used for the detection of colloidal gold test strips. The limit of detection was formulated based on GB 31650—2019 *National standard for food safety-Maximum residue limits of veterinary drugs in food*, and the screening of the rapid test products that met the requirements was carried out, and the rapid test products were evaluated according to the *Opinions of the general administration of market supervision on the standardization of the*

基金项目: 国家市场监督管理总局研究委托任务资助项目(2022-WA03)

Fund: Supported by the State Administration for Market Regulation (2022-WA03)

*通信作者: 古丽君, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 249032279@qq.com

*Corresponding author: GU Li-Jun, Senior Engineer, Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, No.114, Mingkang Road, Longhua District, Shenzhen 518000, China. E-mail: 249032279@qq.com

use of rapid tests for foods (Guoshiheng Jianshi Food Inspection Regulation [2023] No.1), which preliminarily determined the performance indexes of the method and the requirement of the cross-reactivity rate, the consistency analysis with liquid chromatography-mass spectrometry was carried out. **Results** The method was applicable to the detection of pig, chicken, fish and shrimp muscle tissue, the limit of detection of pork was 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the limit of detection of chicken, fish and shrimp was 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the method sensitivity $\geq 95\%$, specificity $\geq 95\%$, false-negative rate $\leq 5\%$, false-positive rate $\leq 5\%$; the cross-reactivity rate of the carbachol metabolite quinoxaline-2-carboxylic acid was $\leq 8.0\%$, the cross-reactivity rate of quinolol, carbacholol and acetylmethoquine, acetylmethoquine metabolite 2-(1-hydroxyethyl)-3-methylquinoxaline-1,4-dioxide was $< 0.1\%$. The results of this method were consistent with those of liquid chromatography-mass spectrometry. **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate in pretreatment, suitable for the rapid screening and confirmation of quinol residues, and provides a comprehensive technical means for the research and development and monitoring of quinol residue rapid detection.

KEY WORDS: quinol; 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid; colloidal gold immunochromatography; rapid detection; liquid chromatography-mass spectrometry

0 引言

喹乙醇是一种化学合成的喹噁啉类化合物,属于广谱抗菌剂,对于治疗猪痢疾等疾病具有显著疗效,不仅如此,喹乙醇具备提升蛋白质合成的特性,对猪、牛、鸡和淡水鱼等动物有促生长作用^[1-4]。多项研究显示,喹乙醇在体内具有中等至明显的蓄积毒性和遗传毒性风险,长期使用会促使其在动物体内的累积,其残留还可能引起耐药菌株的出现,从而对人类健康构成威胁^[5]。为此,欧盟自1999年以来完全禁止使用喹乙醇^[6]。我国农业部的兽药国家标准《中华人民共和国兽药典》及2001年发布的《饲料药物添加剂使用规范》均已清晰规定,喹乙醇仅被允许作为促生长的抗菌药物,适用于体重在35 kg以下的猪以促进其生长,并治疗仔猪的黄痢、白痢及沙门氏菌感染,且应遵守至少35d的停药期;同时,严禁用于超过35 kg体重的猪、禽类和鱼类等其他动物^[7-8]。此外,根据2018年的中华人民共和国农业部公告第2638号,自2019年5月1日起,停止经营、使用喹乙醇的原料药及各种制剂^[9]。但由于其低廉的价格和有效缩短畜禽育肥周期的能力,喹乙醇不仅能够节省饲料,还被允许用于仔猪身上,这种高性价比的特性导致了喹乙醇在使用上存在超范围的现象,违规现象屡禁不止,养殖水产的死亡事件也时有发生。

喹乙醇在动物体内被迅速吸收并广泛传播,同时形成超过10种不同的代谢产物,其中3-甲基喹噁啉-2-羧酸(3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid, MQCA)在体内相对稳定,且消除速度慢,世界粮食和农业组织、世界卫生组织、国际食品法典委员会及我国的GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》均认定其为喹乙醇的残留标志物^[10-13]。目前,喹乙醇的检测标准有GB/T 21322—2007《动物源食品中3-甲基喹噁啉-2-羧酸残留的测定 高效液相色谱法》、农业部781号公告-3—2006

《动物源食品中3-甲基喹噁啉-2-羧酸和喹噁啉-2-羧酸残留量的测定 高效液相色谱法》和DB43/T 789—2013《饲料中喹乙醇的测定 酶联免疫吸附法》等,包含高效液相色谱法、高效液相色谱-质谱联用法和酶联免疫吸附法^[14-19]。高效液相色谱法检测周期长、费用昂贵;酶联免疫吸附法对试剂储存条件、检测人员操作要求高,易造成交叉污染,均难满足市场监管中的实时快速现场检测需求。

胶体金法灵敏度高,不需要依赖大型仪器设备,操作简便,检测时间短、可直接判读,重复性好,已广泛应用于市场监管中的快速筛查。目前市场上的喹乙醇快速检测产品的检出限、前处理方法和检测步骤各不相同,且缺乏相应的食品快速检测方法标准,使得检测结果难以进行有效的比较和验证,从而降低检测结果的可靠性,检测产品的质量也良莠不齐,监管质量无法得到保障。本文优化了喹乙醇代谢物快速检测的前处理方法,更换提取试剂,省去净化步骤,大大缩短处理时间,并依据《市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见》(国市监食检规〔2023〕1号)对两个品牌的喹乙醇代谢物快速检测产品进行评价,根据评价结果初步制定了食品快速检测方法《动物源性食品中喹乙醇残留标志物MQCA的快速检测 胶体金免疫层析法》的技术指标,为建立快速检测方法标准提供了理论依据,同时为喹乙醇药物使用的有效监管提供强有力的技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新鲜猪肉、鱼肉、鸡肉、虾肉,由本单位食品检测所农产品检测实验室提供;有残留未超标黑鱼样品由实验室喂养所得;模拟阳性样品猪肉由北京微标标物科技有限公司提供。

MQCA 标准品溶液(纯度 $\geq 99\%$, 上海安谱实验科技股份有限公司); 乙腈(色谱纯, 上海星可高纯溶剂有限公司); 甲醇、乙酸乙酯(色谱纯, 德国默克股份两合公司); 甲酸、三氯乙酸(纯度 $\geq 99\%$, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 盐酸(质量浓度 36%~38%, 珠海市华成达化工有限公司); 磷酸(质量浓度 85%, 上海凌峰化学试剂有限公司); 氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾(纯度 $\geq 99\%$, 上海凌峰化学试剂有限公司); A 品牌喹乙醇代谢物快速检测试纸条(批号: 20220701, 深圳市绿诗源生物科技有限公司); B 品牌喹乙醇代谢物快速检测试纸条(批号: 22T112200105, 深圳市易瑞生物技术股份有限公司); C 品牌喹乙醇代谢物快速检测试纸条(批号: 0221113B10, 北京勤邦生物技术有限公司); MAX 混合型阴离子交换柱(COMAX360, 60 mg, 深圳逗点生物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

TRACE 1310-TSQ 9000 液相色谱-质谱仪、Hypersil GOLD (100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μ m) 色谱柱(美国赛默飞世尔科技公司); Sartorius CPA225D 电子分析天平(精度 0.01 mg, 德国赛多利斯公司); CommaMix 多功能混匀仪(深圳逗点生物技术有限公司); H1850 湘仪高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司); SFYNSY-3 样品浓缩仪(深圳市三方圆生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试样前处理

(1) 胶体金免疫层析法

准确称取试样 3 g(精确至 0.1 g)至 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 1 mol/L 盐酸水溶液, 再加入 4 mL 饱和氯化钠溶液, 涡旋振荡 2 min。加入 4 mL 乙腈, 涡旋振荡 2 min。4000 r/min 离心 5 min, 移取 3 mL 上清液于 50~60 $^{\circ}$ C 浓缩至近干, 加入 1 mL 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液复溶(鸡肉、鱼肉和虾肉加入 400 μ L 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液复溶), 复溶液即为待测液, 用于胶体金方法检测。

(2) 液相色谱-质谱法

准确称取试样 3 g(精确至 0.1 g)至 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 1 mol/L 盐酸水溶液, 再加入 4 mL 饱和氯化钠溶液, 涡旋振荡 2 min。加入 4 mL 乙腈, 涡旋振荡 2 min。4000 r/min 离心 5 min, 移取 3 mL 上清液备用。6 mL 甲醇和 6 mL 水活化 MAX 柱, 上清液经过 MAX 固相萃取柱萃取, 6 mL 甲醇淋洗, 3 mL 2% 甲酸乙酸乙酯溶液洗脱, 收集洗脱液。洗脱液用浓缩仪在 50~60 $^{\circ}$ C 吹干, 残余物用 1.0 mL 的 0.1% 甲酸水复溶, 复溶液过 0.22 μ m 滤膜, 随后用于液相色谱-质谱仪的分析检测。

1.3.2 液相色谱-质谱条件

(1) 液相色谱条件:

色谱柱: Hypersil GOLD (100 mm \times 2.1 mm, 1.9 μ m);

柱温: 35 $^{\circ}$ C; 流动相 A: 0.1% 甲酸水; 流动相 B: 乙腈; 流速: 0.3 mL/min; 进样体积: 1 μ L; 梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱
Table 1 Gradient elution mode of mobile phases

时间/min	0.1%甲酸水/%	乙腈/%
初始	90.0	10.0
0.20	40.0	10.0
5.00	40.0	90.0
5.50	10.0	90.0
7.00	90.0	10.0

(2) 质谱条件

离子化方式: 加热电喷雾电离; 离子源温度 300 $^{\circ}$ C; 蒸发器温度 350 $^{\circ}$ C; 鞘气流速 50 L/min; 辅助气流 10 L/min; 速; 扫描气体流速 1 L/min; 扫描模式为多重反应检测扫描(multiple reaction monitoring, MRM)模式。采集条件如下: 定量离子对 189.1/145.1, 碰撞能量 13 eV, 定性离子对 189.1/143.1, 碰撞能量 16 eV。

1.4 确定方法检出限

依据市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见(国市监食检规〔2023〕1号), 对禁用物质或者无残留限量的物质, 检出限设置(最低检出水平)应尽量与参比方法的定量限(若无定量限则选择检出限)一致; 对存在国家标准限值规定的物质, 应尽量与限值一致。本方法根据 GB 31650—2019 设定猪肉检出限为 4 μ g/kg, 根据参比方法 SN/T 0197—2014《出口动物源性食品中喹乙醇代谢物残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法》等设定鸡肉、鱼肉、虾肉的方法检出限为 0.5 μ g/kg。

1.5 方法性能指标评价

基于前期优化的前处理方法, 参照 GB/T 20746—2006《牛、猪的肝脏和肌肉中卡巴氧和中喹乙醇及代谢物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法》建立检测喹乙醇代谢标志物 MQCA 的液相色谱-串联质谱法, 作为参比方法进行分析研究。依据《食品快速检测产品符合性评价程序》(国市监食检规〔2023〕1号)评估快检方法的性能指标, 即灵敏度、特异性、假阴性率和假阳性率。根据要求, 喹乙醇为禁用物质, 对有限量要求的猪肉测试 4 个浓度水平, 即空白、0.5 倍检出限、1 倍检出限和 2 倍检出限, 每个浓度水平测试 50 个样品; 没有限量要求的鸡肉、鱼肉和虾肉测试两个浓度水平(空白和 1 倍检出限), 每个浓度水平测试 50 个样品, 评价结果可用于初步制定快速检测方法的性能指标。

1.6 两种方法一致性分析

根据市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见(国市监食检规〔2023〕1号), 实际阳性样品可以采用模拟阳性样品。选取 4 种具有代表性的空白基质和 2 种有喹乙醇残留的样品, 分别使用胶体金免疫层析技术与液相色谱串联质谱技术进行检测, 并基于检测结果对这两种方法开展一致性分析。

1.7 交叉反应分析

交叉反应率表示, 采用快检方法及其相关产品的交叉反应率反映产品的特异性, 即目标物质检出限与干扰物质(同系物或衍生物)检出阳性的最小浓度的比值(以百分比计)。经参比方法验证的空白样品分别加入不同浓度水平干扰物质的标准溶液进行测试, 记录检测结果为阳性的最小浓度。当加入干扰物浓度水平大于或等于检出限的 1000 倍时, 特异性(交叉反应率)视为小于 0.1%。选取与 MQCA 结构相似的喹乙醇、卡巴氧、乙酰甲喹、卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸和乙酰甲喹代谢物 2-(1-羟乙基)-3-甲基喹噁啉-1,4-二氧化物来测试交叉反应率, 实验以猪肉为研究对象, 测试不同干扰物质的加标样品。

1.8 数据处理

液相色谱-质谱方法的实验数据由 Thermo Scientific™ Xcalibur™ 软件进行定性、定量分析, 采用面积归一化法定量, 文中色谱图使用 Origin 8 绘图软件进行绘制; 快速检测产品性能评价数据采用 Excel 2024 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 前处理方法的改进

A 品牌的前处理步骤为: 称取(3.00±0.05) g 粉碎均匀待测样品于 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 提取剂 A(酸解试剂), 再加入 4 mL 蒸馏水, 剧烈振荡 2 min。加入 6 mL 乙酸乙酯与 2 mL 无水乙醇, 振荡 2 min, 4000 r/min 室温离心 5 min, 取上清液 2 mL 于 5 mL 离心管中, 于 65 °C 水浴吹干。吹干后加入 2 mL 正己烷, 振荡 30 s, 再加入 2 mL 提取剂 B(缓冲盐溶液), 振荡 30 s, 静置或者 4000 r/min 离心 5 min, 下层液体即为待测液。该方法的酸解过程需添加酸解试剂和蒸馏水, 提取过程采用乙酸乙酯和无水乙醇两种有机溶剂, 吹干后的待测液还需正己烷净化, 方法使用的检测试剂过多, 增加了处理步骤的复杂性和耗时。本研究经过实际研究发现, 前处理的酸解、提取过程均采用单一试剂即可, 且提取试剂选取乙腈可以省去正己烷的净化过程, 大大缩短了前处理时间。因此, 本研究经过优化采用盐酸水解、乙腈提取、磷酸缓冲盐溶液复溶的前处理方法, 耗时约为 20~30 min。

2.2 水解方式的选择

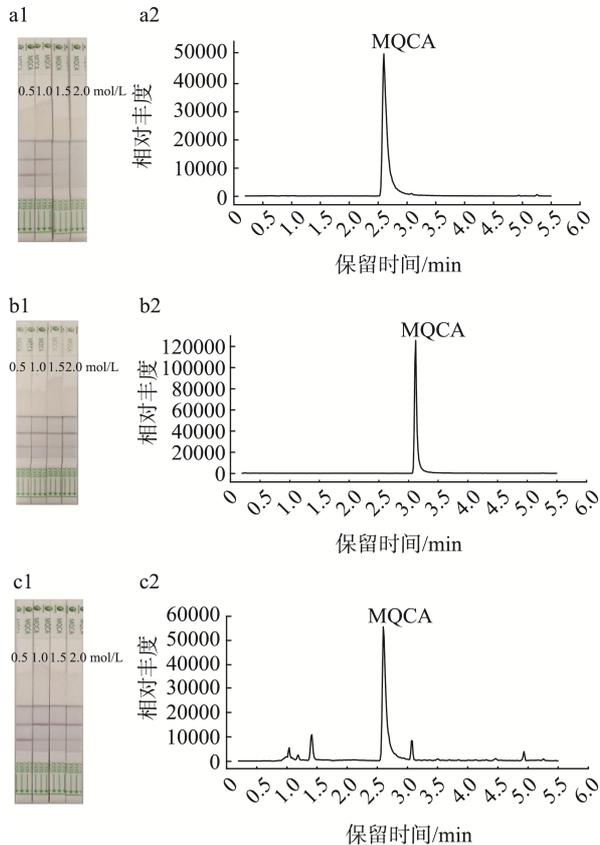
研究发现, MQCA 主要以与蛋白质结合的形式存在于动

物组织中, 使得常规的提取液难以有效地将其分离出来^[20]。虽然关于常规酸性提取溶液和有机溶剂提取, 以及固相或液相萃取净化的相关研究较多, 但这些方法仅能提取出极少量的自由 MQCA。为了更好地提取, 通常采用酶解、酸解或碱解等水解技术, 从而破坏 MQCA 与组织之间的共价连接, 使其转变为游离状态, 以便于后续的提取与净化^[21-24]。依据标准 GB/T 20746—2006 和 SN/T 0197—2014, 样品前处理采用的是酶解方式, 酶解时长 16~18 h。碱解的研究相对较少, 李二粉等^[24]采用 1 mol/L NaOH 溶液对鸡肉样品进行碱解, 需在 50 °C 恒温水浴锅中振荡水解 1 h。两种水解方式都耗时较长, 无法满足快速检测的应用需求。

标准 GB/T 21322—2007 和农业部 781 号公告-3-2006 的样品前处理采用的是偏磷酸酸性溶液水解, 文献中也有较多的酸解研究: ZHANG 等^[25]采用盐酸水解鱼肉样品, 并对盐酸的浓度进行了优化, 发现采用 2 mol/L 盐酸酸解样品时效果最好, 回收率可达 92.7%~104.3%; 霍如林等^[26]采用 150 g/L 三氯乙酸处理猪肉、猪肝样品, 用酶联免疫吸附测定方法检测加标回收率可达到 87.6%; 杨艳玲等^[10]对猪肉和牛肉样本进行了水解, 使用了 2 mol/L 的盐酸, 经过十倍稀释后采用间接竞争酶联免疫吸附测定检测, 结果显示两种样品的回收率均在 90%~100%之间; 徐艳清等^[27]发现加入浓度为 1 mol/L 的盐酸溶液 8 mL 效果最好, 回收率高; 郑玲等^[28]在研究中找到最佳的水解液即甲醇与 50 g/L 偏磷酸混合液, 经过水解后可直接使用乙酸乙酯从水解液中提取需要分析的物质, 而无需进行 pH 的调整。采用酸性水解方法, 不仅显著减少了内源性成分的干扰, 还能够有效地缩短样品的前处理时间。因此, 本研究选取酸解作为样品的水解方式。

2.3 酸解试剂的选择

基于 2.2 调研的标准及文献资料所使用的酸解试剂, 对本方法的酸解条件进行研究和优化。选取三氯乙酸、盐酸、磷酸进行水解对比及优化。配制浓度为 0.5、1.0、1.5 和 2.0 mol/L 的盐酸、磷酸和三氯乙酸水溶液, 以空白基质猪肉作为研究对象, 测试一倍检出限(4 μg/kg)加标样品, 按 1.3.1 步骤移取 200 μL 待测液至金标微孔孵育 3 min, 将试纸条下端插入到金标微孔溶液底部, 室温(20~25 °C)反应约 8 min, 比较试纸条显色效果, 如图 1。根据试纸条结果可以看出, 三氯乙酸对猪肉中的 MQCA 提取效果较差, 当酸的浓度大于 1 mol/L 时会出现试纸条显色过浅甚至无效的情况, 而盐酸和磷酸浓度达到 1 mol/L 后试纸条都可以呈现阳性结果, 其中盐酸从 0.5 mol/L 浓度开始试纸条结果就呈阳性, 代表可以有效提取猪肉样品中的 MQCA。同时, 经参比方法验证 1 mol/L 的三氯乙酸、盐酸和磷酸对猪肉中的 MQCA 按步骤提取后的回收率分别为 72.38%、101.82%、79.46%, 其中盐酸的回收率最高。两种结果都显示盐酸水解后的提取效果最好, 因此, 本研究选取 1 mol/L 盐酸前处理方法的水解试剂。



注: a1、b1、c1从左至右分别为0.5、1.0、1.5和2.0 mol/L的三氯乙酸、盐酸、磷酸水解样品的快速检测试纸条结果; a2、b2、c2分别为1.0 mol/L的三氯乙酸、盐酸、磷酸水解样品的色谱图结果。

图1 不酸解试剂条件下的胶体金免疫层析法和液相色谱-质谱法检测结果

Fig.1 Detection results of colloidal gold immunochromatography and liquid chromatography-mass spectrometry without acidolytic reagents conditions

2.4 提取试剂的选择

采用酸水解后的样品溶液中仍含有油脂等诸多杂质,且酸性溶液会破坏胶体金中的抗体活性,不能直接用于胶体金卡的检测,需采用有机溶剂进一步提取,常用提取MQCA的有机溶剂有甲醇、乙腈和乙酸乙酯^[26,29-31]。A品牌快检产品选取乙酸乙酯和无水乙醇进行提取,乙酸乙酯会溶解油脂,需要增加除脂步骤才能用于检测。本研究选取甲醇、乙腈溶剂提取酸溶液中的MQCA,并加入氯化钠溶液使有机溶剂较好地分层。实验发现,甲醇加入氯化钠溶液会降低盐的溶解度,使盐析出,而乙腈可以达到很好的提取效果且复溶液没有杂质干扰。因此,本研究选取乙腈溶剂提取MQCA,并结合涡旋振动技术以提升效果并减少所需时间。

2.5 方法性能指标评价

为考察本方法的假阴性率和假阳性率,选取猪肉、鸡肉、草鱼和基围虾作为研究对象,同时增加了鲳鱼基质以考察本方法是否适用于高脂肪含量的鱼肉样品,5种基质均为经参比方法验证的空白样品,通过加标进行验证。猪肉测试了4个浓度水平,即空白、0.5倍检出限、1倍检出限和2倍检出限,每个浓度水平测试50个样品;鸡肉、草鱼、鲳鱼和基围虾测试两个浓度水平(空白和1倍检出限),每个浓度水平测试50个样品。根据测试结果计算可得,A品牌的灵敏度为99.00%,特异性为98.67%,假阴性率为1.00%,假阳性率为1.33%;B品牌的灵敏度为98.00%,特异性为100.00%,假阴性率为2.00%,假阳性率为0%。A品牌的灵敏度优于B品牌,B品牌特异性优于A品牌,两种产品均存在假阴或假阳的情况。为保证方法具有较宽的适用范围,且各品牌胶体金检测卡的生产工艺有差异,结合本研究结果,初步将本方法的性能指标设置为灵敏度 $\geq 95\%$ 、特异性 $\geq 95\%$ 、假阴性率 $\leq 5\%$ 、假阳性率 $\leq 5\%$ 。

表2 方法性能指标计算表

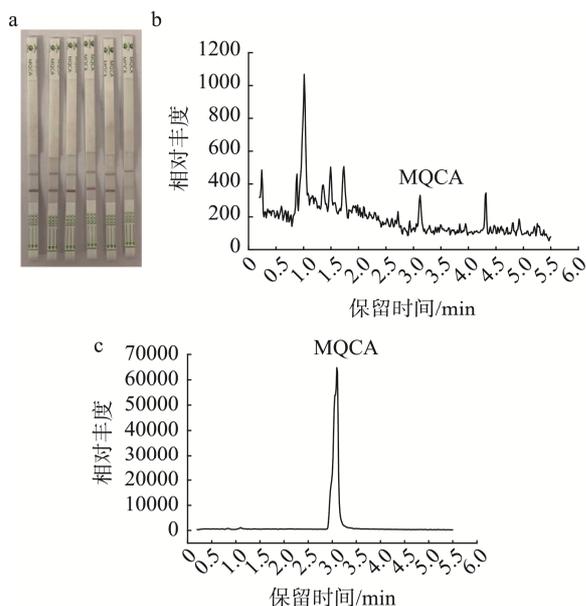
Table 2 Calculation table of method performance metrics

样品情况 a	A 品牌		总数	B 品牌		总数
	检测结果 b			检测结果 b		
	阳性	阴性		阳性	阴性	
阴性(空白、0.5倍检出限)	4	296	300	0	300	300
阳性(1倍检出限、2倍检出限)	297	3	300	294	6	300
总数	301	299	600	294	306	600
灵敏度(p+)/%		99.00			98.00	
特异性(p-)/%		98.67			100.00	
假阴性率(pf-)/%		1.00			2.00	
假阳性率(pf+)/%		1.33			0	

注: a 为由参比方法检验得到的结果或者样品中实际的公认值结果; b 为由待确认方法检验得到的结果。p+通常指的是灵敏度(sensitivity),也称为真阳性率(true positive rate, TPR),它表示在所有实际为阳性的样本中,测试正确识别为阳性的比例。p-通常表示特异性(specificity),也称为真阴性率(true negative rate, TNR),它衡量的是在所有实际为阴性的样本中,测试正确识别为阴性的比例。pf-表示负预测值(negative predictive value, NPV),即预测为阴性的结果中,实际为阴性的比例,用于衡量预测模型在阴性结果中的准确性。pf+表示正预测值(positive predictive value, PPV),即预测为阳性的结果中,实际为阳性的比例,用于衡量预测模型的准确性,特别是在阳性结果中的正确性。

2.6 方法一致性分析结果

选取 4 种具有代表性的新鲜猪肉、鸡肉、鱼肉和虾肉及有残留未超标黑鱼样品、模拟阳性猪肉样品, 分别进行胶体金免疫层析法和液相色谱-质谱法分析。新鲜猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉和有残留未超标黑鱼样品快检结果均为阴性, 模拟阳性猪肉样品快检结果为阳性, 检测结果见图 2a。



注: a中依次为新鲜猪肉、鸡肉、鱼肉和虾肉、有残留未超标黑鱼样品、模拟阳性猪肉样品6种基质的胶体金免疫层析法结果图; b为有残留未超标黑鱼样品的色谱图结果; c为模拟猪肉样品的色谱图结果。

图2 实际阳性样品测试结果

Fig.2 Testing results of actual positive samples

方法一致性分析结果如表 3, 新鲜猪肉、鸡肉、鱼肉和虾肉液相色谱质谱法定量结果为未检出, 有残留未超标黑鱼样品定量结果为 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 模拟猪肉阳性样品定量结果为 7.90 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。因此, 快速检测方法与液相色谱-质谱法检测结果保持一致。

2.7 交叉反应分析结果

根据前期产品调研情况, C 品牌的交叉反应率较高, 选取经参比方法确证的猪肉空白基质为研究对象, 对 C 品牌的喹乙醇代谢物快检试剂盒进行验证, 确认符合本方法的技术指标, 并进行交叉反应测试。由表 4 可知, 3 个品牌快速检测产品对喹乙醇、卡巴氧、乙酰甲喹和乙酰甲喹代谢物 2-(1-羟乙基)-3-甲基喹噁啉-1,4-二氧化物的交叉反应率均小于 0.1%, 品牌 A、B、C 快检产品对卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸的交叉反应率结果分别为: 2%、<0.1%、8%。因此, 为了方法具有良好的普适性, 设定方法与卡巴氧代谢物喹噁啉-2-羧酸的交叉反应率为 $\leq 8\%$ 。

表 3 方法一致性分析结果
Table 3 Results of methodological consistency analysis

样品名称	快检结果	定量结果/ $(\mu\text{g}/\text{kg})$
猪肉	—	N/A
鸡肉	—	N/A
鱼肉	—	N/A
虾肉	—	N/A
黑鱼样品	—	0.25
模拟猪肉样品	+	7.90

注: —为阴性, +为阳性, N/A 为未检出。

表 4 MQCA 交叉反应分析结果
Table 4 Results of MQCA cross-reactivity analysis

干扰物质	A 品牌		B 品牌		C 品牌	
	加标浓度/ (mg/kg)	交叉反应率/%	加标浓度/ (mg/kg)	交叉反应率/%	加标浓度/ (mg/kg)	交叉反应率/%
喹乙醇	50	<0.1	50	<0.1	50	<0.1
卡巴氧	50	<0.1	50	<0.1	50	<0.1
乙酰甲喹	50	<0.1	50	<0.1	50	<0.1
2-(1-羟乙基)-3-甲基喹噁啉-1,4-二氧化物	50	<0.1	50	<0.1	50	<0.1
喹噁啉-2-羧酸	0.2	2	50	<0.1	0.05	8

3 结论

本研究制定盐酸水解、乙腈提取、磷酸缓冲盐溶液复溶的前处理方法, 用于检测动物源性食品中喹乙醇残留物的胶体金免疫层析方法。通过对两个品牌快检产品的评价, 初步设定快速检测方法《动物源性食品中喹乙醇残留标志

物 MQCA 的快速检测 胶体金免疫层析法》的性能指标为灵敏度 $\geq 95\%$ 、特异性 $\geq 95\%$ 、假阴性率 $\leq 5\%$ 、假阳性率 $\leq 5\%$ 。该方法的前处理简单、快速、准确, 方法灵敏度和精确度均满足日常喹乙醇残留物的快速筛查与确证, 大大缩短了整体检测周期, 提高了检测效率, 为喹乙醇的市场监管提供有力的技术手段。

参考文献

- [1] 陈俊秀, 刘玲, 李文廷, 等. 不同样品中喹噁啉类药物及其代谢物残留检测技术研究进展[J]. 实验室检测, 2023, 1(2): 11–15.
CHEN JX, LIU L, LI WT, *et al.* Progress of quinoxaline and its metabolite residue detection techniques in different samples [J]. Lab Test, 2023, 1(2): 11–15.
- [2] 谢洁, 龚晓云, 翟睿, 等. 动物源性食品中喹噁啉类药物及其代谢物残留检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(15): 3958–3963.
XIE J, GONG XY, ZHAI R, *et al.* Research progress on detection technology of quinoxaline and its metabolite residues in food of animal origin [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(15): 3958–3963.
- [3] 李道稳, 邬良贤, 李斌, 等. 喹乙醇残留检测研究进展[J]. 中国饲料, 2016(22): 25–28, 36.
LI DW, WU LX, LI B, *et al.* Research progress of quinol residue detection [J]. China Feed, 2016(22): 25–28, 36.
- [4] 张卫. 3·15 再敲警钟食品安全任重道远[J]. 中国食品, 2017, 7: 10–19.
ZHANG W. 3.15 to sound the alarm again food safety is a long way to go [J]. China Food, 2017, 7: 10–19.
- [5] 杨盼盼. 喹噁啉类遗传毒性分子机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
YANG PP. Molecular mechanisms of quinoxaline genotoxicity [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.
- [6] WU CM, LI Y, SHEN JZ, *et al.* LC-MS-MS quantification of four quinoxaline-1,4-dioxides in swine feed [J]. Chromatographia, 2009, 70(11/12): 1605–1611.
- [7] 农业部. 中华人民共和国农业部公告: 第 2638 号[EB/OL]. [2018-01-11]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201801/t20180112_6134888.Htm [2023-04-11].
Ministry of Agriculture. Announcement of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China: No. 2638 [EB/OL]. [2018-01-11]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201801/t20180112_6134888.htm [2023-04-11].
- [8] 邬溪芮, 张珍珍. 喹乙醇的危害及其检测方法[J]. 兽医导刊, 2017(9): 52–53.
WU XR, ZHANG ZZ. Hazards of quinol and its detection method [J]. Vet Med Guide, 2017(9): 52–53.
- [9] 吕勇, 沈兆艳, 吴世林. 不同类型植物精油替代喹乙醇对保育仔猪生长性能的影响[J]. 广东饲料, 2019, 28(6): 20–22.
LV Y, SHEN ZY, WU SL. Effects of different types of plant essential oils replacing quinol on growth performance of nursery piglets [J]. Guangdong Feed, 2019, 28(6): 20–22.
- [10] 杨艳玲. 喹乙醇免疫分析方法的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020.
YANG YL. Research on the immunoassay method of quinol [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2020.
- [11] 雷韵, 吴民富, 李莎. 喹乙醇及其主要代谢物的检测技术研究进展[J]. 现代食品, 2018(8): 13–16.
LEI Y, WU MF, LI S. Research progress of detection technology of quinol and its main metabolites [J]. Mod Food, 2018(8): 13–16.
- [12] World Health Organization. Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food [J]. WHO Food Addit Series, 1994, 33(67): 804–817.
- [13] World Health Organization. Evaluation of certain veterinary drug residues in food eighty-first report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives [Z]. 1999.
- [14] 黄鸾玉, 杨妹丽, 韦信贤, 等. 超高效液相色谱法测定水产品中喹乙醇的残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(4): 427–431.
HUANG LY, YANG SL, WEI XX, *et al.* Determination of quinol residues in aquatic products by ultra performance liquid chromatography [J]. Phys Test Chem Anal (Part B: Chem Anal), 2019, 55(4): 427–431.
- [15] 董玲玲, 于晓辉, 杨星, 等. HPLC-PDA 法测定兽药中非法添加的喹乙醇、乙酰甲喹检查方法[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(3): 36–43.
DONG LL, YU XH, YANG X, *et al.* HPLC-PDA method for the determination of illegally added quinquefoil and acetamiprid check in veterinary drugs [J]. Chin J Vet Med, 2020, 54(3): 36–43.
- [16] SIN DWM, CHUNG LPK, LAI MMC, *et al.* Determination of quinoxaline-2-carboxylic acid, the major metabolite of carbadox, in porcine liver by isotope dilution gas chromatography–electron capture negative ionization mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2004, 508(2): 147–158.
- [17] 彭艳, 刘煜. 气质联用法分析动物肌肉、肝脏和肾脏中喹噁啉—2 羧酸的含量[J]. 食品科学, 2006(2): 223–226.
PENG Y, LIU Y. Gas chromatography analysis of quinoxaline-2 carboxylic acid in animal muscle, liver and kidney [J]. Food Sci, 2006(2): 223–226.
- [18] 何悦, 严华, 崔凤云, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定动物肌肉组织中喹乙醇及卡巴氧代谢物[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 4989–4994.
HE Y, YAN H, CUI FY, *et al.* Determination of quinol and carbachol metabolites in animal muscle tissues by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(15): 4989–4994.
- [19] 刘新辉, 纪祥龙, 孙艳丽, 等. QuEChERS 净化结合 UHPLC-MS/MS 同时测定饲料中 β -受体激动剂类和喹噁啉类药物[J]. 饲料工业, 2020, 41(10): 55–59.
LIU XH, JI XL, SUN YL, *et al.* QuEChERS cleanup combined with UHPLC-MS/MS for the simultaneous determination of beta-agonists and quinoxalines in feed [J]. Feed Ind, 2020, 41(10): 55–59.
- [20] ŠESTÁKOVÁ I, KOPANICA M. Determination of cyadox and its metabolites in plasma by adsorptive voltammetry [J]. Talanta, 1988, 35(10): 816–818.
- [21] 张静余, 杨卫军, 严敏鸣, 等. 液相色谱-串联质谱法测定水产品中喹乙醇和卡巴氧的代谢物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(14): 3788–3793.
ZHANG JY, YANG WJ, YAN MM, *et al.* Determination of olaquinox and carbadox metabolite residues in aquatic products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(14): 3788–3793.
- [22] 张小军, 郑斌, 陈雪昌, 等. 高效液相色谱法测定动物组织中喹乙醇标示残留物[J]. 食品科学, 2010, 31(24): 289–292.
ZHANG XJ, ZHEN B, CHEN XC, *et al.* Detection of olaquinox marker residue in animal tissues by high performance liquid chromatography [J]. Food Sci, 2010, 31(24): 289–292.
- [23] 刘迪, 韩莉, 曾妮, 等. 碱水解-SPE-LC-MS/MS 法快速测定动物源食品中喹乙醇代谢物残留量[J]. 食品与机械, 2019, 35(11): 70–74.
LIU D, HAN L, ZENG N, *et al.* Quick determination of 3-methyl-quinoxaline-2-carboxylic acid residues animal-derived food by

- alkali hydrolysis-solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Food Mach*, 2019, 35(11): 70–74.
- [24] 李二粉, 张媚玉, 马合勤, 等. 液相色谱-串联质谱测定鸡肉中喹乙醇残留标示物 3-甲基喹啉-2-羧酸[J]. *色谱*, 2018, 36(5): 446–451.
LI ERF, ZHANG MY, MA HQ, *et al.* Determination of 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid of olaquinox marker residue in chicken muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2018, 36(5): 446–451.
- [25] ZHANG XJ, ZHENG B, ZHANG H, *et al.* Determination of marker residue of Olaquinox in fish tissue by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Sep Sci*, 2011, 34(4): 469.
- [26] 霍如林, 朱爱荣, 张林, 等. 胶体金免疫层析法快速检测动物组织中残留的喹乙醇[J]. *食品工业科技*, 2014, 35(21): 297–300.
HUO RL, ZHU AIR, ZHANG L, *et al.* Rapid detection of quinol residues in animal tissues by colloidal gold immunochromatography [J]. *Food Ind Sci Technol*, 2014, 35(21): 297–300.
- [27] 徐艳清, 施远国, 罗燕, 等. 喹乙醇代谢残留物 3-甲基喹啉-2-羧酸检测方法的优化[J]. *国外畜牧学(猪与禽)*, 2015, 35(8): 74–76.
XU YQ, SHI YG, LUO Y, *et al.* Optimization of a method for the determination of 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid, a metabolic residue marker of quinol [J]. *Anim Sci Abroad (Pigs Poult)*, 2015, 35(8): 74–76.
- [28] 郑玲, 吴玉杰, 李湧, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定动物源食品中 3-甲基喹啉-2-羧酸和喹啉-2-羧酸残留[J]. *色谱*, 2012, 30(7): 660–664.
ZHENG L, WU YJ, LI Y, *et al.* Determination of 3-methylquinoxaline-2-carboxylic acid and quinoxaline-2-carboxylic acid residues in foods of animal origin by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chin J Chromatogr*, 2012, 30(7): 660–664.
- [29] 李丽珍, 张丽姬, 何春慧, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中喹乙醇残留量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2018, 9(18): 4988–4992.
LI LZ, ZHANG LJ, HE CH, *et al.* Determination of quinol residue in aquatic products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2018, 9(18): 4988–4992.
- [30] 何悦, 严华, 崔凤云, 等. QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法测定动物肌肉组织中喹乙醇及卡巴氧代谢物[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(15): 4989–4994.
HE Y, YAN H, CUI FY, *et al.* Determination of quinol and carbachol metabolites in animal muscle tissues by QuEChERS-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(15): 4989–4994.
- [31] 李婷婷, 张小军, 陈雪昌, 等. 酶联免疫法快速检测水产品中喹乙醇代谢物[J]. *分析实验室*, 2018, 37(8): 914–916.
LI TT, ZHANG XJ, CHEN XC, *et al.* Rapid enzyme immunoassay for the determination of quinol metabolites in aquatic products [J]. *Anal Lab*, 2018, 37(8): 914–916.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)

作者简介

柳义茂, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 114034317@qq.com

古丽君, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: 249032279@qq.com