

李鹏, 李嘉豪, 张春洋, 等. 基于胶体金免疫层析技术的“瘦肉精”三联检测卡研制 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 53-60.

LI P, LI J H, ZHANG C Y, et al. Development of a triple detection card for lean meat powder based on the colloidal gold immunochromatographic technology [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 53-60.

## 基于胶体金免疫层析技术的“瘦肉精”三联检测卡研制

李鹏<sup>1</sup>, 李嘉豪<sup>2</sup>, 张春洋<sup>1</sup>, 宋书意<sup>1</sup>, 曹又文<sup>1</sup>, 王米拉<sup>1</sup>,  
温墩<sup>3</sup>, 储蕊<sup>3</sup>, 单衍可<sup>1\*</sup>, 刘斐<sup>1</sup>

(1. 南京农业大学动物医学院单分子生物化学与生物医学实验室, 江苏 南京 210014;

2. 江苏省农业科学院兽医研究所, 江苏 南京 210014;

3. 南京农业大学动物科技学院, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 旨在建立一种现场快速同时检测猪尿液中沙丁胺醇、盐酸克仑特罗和莱克多巴胺残留的瘦肉精三联侧流免疫层析方法。采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液, 并优化免疫探针制备过程中偶联溶液的 pH 值和检测抗体添加量, 以制备瘦肉精胶体金免疫层析三联检测卡, 并对三联检测卡的检测限、特异性、加速稳定性、重复性及检测临床样本的准确性进行评价。结果: 成功制备了 3 种胶体金免疫探针, 所建立的方法对沙丁胺醇、盐酸克仑特罗和莱克多巴胺的检测限分别为 3、3 和 1 ng/mL; 测试西马特罗、硫酸特布他林和苯乙醇胺 A 等常见瘦肉精加标样本时均未发生交叉反应。此外, 三联检测卡在 37 °C 加速老化 4 周后稳定性优良, 且批内重复性和批间重复性均良好, 未出现假阳性和假阴性反应。临床样本检测结果表明, 该方法与液相色谱-质谱联用方法的检测结果一致。综上, 本研究建立的瘦肉精胶体金免疫层析三联检测卡灵敏度和特异性高, 操作简便, 检测时间短且稳定性良好, 适用于猪尿液中沙丁胺醇、盐酸克仑特罗和莱克多巴胺的现场快速检测。

**关键词:** 沙丁胺醇; 盐酸克仑特罗; 莱克多巴胺; 猪尿液; 免疫层析; 现场检测

中图分类号: S859.84

文献标志码: A

文章编号: 0529-5130(2025)10-0053-08

## Development of a triple detection card for lean meat powder based on the colloidal gold immunochromatographic technology

LI Peng<sup>1</sup>, LI Jiahao<sup>2</sup>, ZHANG Chunyang<sup>1</sup>, SONG Shuyi<sup>1</sup>, CAO Youwen<sup>1</sup>, WANG Mila<sup>1</sup>,  
WEN Dun<sup>3</sup>, CHU Rui<sup>3</sup>, SHAN Yanke<sup>1\*</sup>, LIU Fei<sup>1</sup>

(1. Single Molecule Biochemistry & Biomedicine Laboratory, College of Veterinary Medicine,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China;

2. Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** This study was to develop a triple lateral flow immunoassay method for the rapid, on-site simultaneous detection of salbutamol, clenbuterol hydrochloride, and ractopamine residues in swine urine. A colloidal gold solution was prepared using the trisodium citrate reduction method. The pH value of the conjugation solution and the detection antibody dosage for the immune probe preparation were optimized to create a triple detection card for detecting lean meat powder. The detection limit, specificity, stability, repeatability, and accuracy of testing clinical samples of the triple detection card were evaluated. The results showed that this study successfully developed three colloidal gold-based immune probes, and the established method achieved detection limits of 3 ng/mL for salbutamol, 3 ng/mL for clenbuterol hydrochloride, and 1 ng/mL for ractopamine. The triple detection card showed no cross-reactivity with common lean meat powders such as simatrol, terbutaline sulfate, and phenylethanolamine A. After accelerated aging at 37 °C for one month, the triple detection card showed good stability, with intra- and inter-batch reproducibility being both good, and with no false positives or false negatives. The clinical sample testing results demonstrated that this method was consistent with the detection results of LC-MS. These results indicated that the colloidal gold-based

收稿日期: 2025-02-17; 修回日期: 2025-07-12

基金项目: 南京农业大学新进博士科研启动项目 (804006)

第一作者: 李鹏, 男, 博士研究生

\* 通信作者: 单衍可, 助理研究员, 主要从事核酸代谢机制及动物源食品安全快速现场检测技术方面的研究, E-mail: shanyk26@njau.edu.cn.

immunochromatography triple detection card developed in this study was highly sensitive and specific, easy to operate, and it require a short detection time and possessed high stability; all of which made it suitable and appropriate for rapid on-site detection of salbutamol, clenbuterol hydrochloride, and ractopamine in swine urine.

**Keywords:** salbutamol; clenbuterol hydrochloride; ractopamine; swine urine; lateral flow immunoassay; point-of-care testing

$\beta$ -受体激动剂 ( $\beta$ -adrenoceptor agonist) 是一类能够结合并激活  $\beta$ -肾上腺素能受体的药物, 临床上主要用于治疗有哮喘症状的患者<sup>[1]</sup>。然而, 一些非法养殖者将其添加到畜禽饲料中, 通过抑制脂肪合成、刺激脂肪分解、增加蛋白质合成和胴体瘦肉率, 以促进动物生长和提高饲养效率<sup>[2-3]</sup>, 引发食品中瘦肉精残留的安全问题。瘦肉精是一类  $\beta$ -受体激动剂的统称, 国内常见的瘦肉精种类主要为盐酸克仑特罗 (clenbuterol, CLEN), 沙丁胺醇 (salbutamol, SAL) 和莱克多巴胺 (ractopamine, RAC)。近年来, 动物体内瘦肉精残留对人类健康的潜在危害受到广泛关注<sup>[4-6]</sup>。2010年, 农业部第1519号公告明令禁止在动物饲料和饮用水中使用一系列新型  $\beta$ -受体激动剂。2021年, 农业农村部进一步加强“瘦肉精”监管, 开展了为期3个月的专项整治行动, 旨在切实保障畜产品的质量安全。

目前, 瘦肉精的检测方法主要包括仪器分析法和免疫测定法。仪器分析法以液相色谱-质谱联用 (LC-MS)<sup>[7-8]</sup> 和气相色谱-质谱联用 (GC-MS)<sup>[9-10]</sup> 为主。然而, 这些传统的仪器分析方法通常需经过繁琐的样品预处理步骤, 且操作过程依赖专业技术人员和精密仪器设备。相比之下, 免疫测定法以其快速、便携、高特异性及操作简便等优势, 在生物学、医学和食品科学领域广泛应用。免疫测定法主要包括酶联免疫吸附测定法 (ELISA)<sup>[11-12]</sup> 和免疫层析法 (ICA)<sup>[13-15]</sup>。尽管 ELISA 具有较高的灵敏度, 但其操作过程相对复杂, 且结果读取需依赖特定仪器, 这在一定程度上限制了其在一些资源有限地区的应用。此外, 随着动物源食品生产及体育领域中非法使用的  $\beta$ -受体激动剂类物质数量不断增加, 开发一种适用于多种分析物同时现场快速检测的分析技术显得尤为迫切。侧流免疫层析方法因其操作简便、检测快速, 尤其适合多指标联合检测及低成本现场筛查的需求, 其中, 胶体金 (AuNPs) 溶液的制备方法简单易行, 无需特殊设备, 且胶体金试纸条的检测结果直观, 非常适合于现场即时检测的应用。

本研究旨在开发一种胶体金免疫层析平台, 用于现场同时检测猪尿液中的瘦肉精残留 (SAL、CLEN、RAC), 为我国动物源食品中多兽药残留的高通量快速检测及食品安全提供科学支持和技术保障。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

猪尿液样本采集于江苏省南通市屠宰场; 阴性猪尿液样本由南京农业大学单分子生物化学与生物医学实验室保存。

SAL、CLEN、RAC、西马特罗、硫酸特布他林和苯乙醇胺 A 标准品溶液, 均购自北京普天同创生物科技有限公司。

牛血清白蛋白 (BSA), 磷酸盐缓冲液 (PBS), 氯化金三水合物 ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $\geq 99.9\%$ ) 和柠檬酸三钠, 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 检测抗体 (兔源 Anti-SAL 抗体、鼠源 Anti-RAC 抗体、兔源 Anti-CLEN 抗体) 和检测抗原 (BSA-SAL、BSA-CLEN、BSA-RAC), 均购自杭州华葵金配生物科技有限公司; 其他试剂为分析级或更高级别, 均购自国药集团化学试剂有限公司; 试验用水均为超纯水。

样品垫、硝化纤维素 (NC) 膜、结合垫、聚氯乙烯 (PVC) 底板和吸水垫, 购自上海杰一生物技术有限公司。

### 1.2 主要仪器

5424R 台式高速冷冻离心机购于德国 Eppendorf 公司; infinite M200 Pro 多功能酶标仪为瑞士 Tecan 公司生产; Milli-Q 超纯水仪购自美国 Millipore 公司; SPT300 自动可编程切条机和 HM3260 三维划线喷金仪购自上海金标生物科技有限公司; FiveEasy Plus pH 计和 ME203E 电子天平购自梅特勒-托利多国际贸易有限公司 (上海); DZF-6030A 真空干燥箱购自一恒科技有限公司 (上海)。

### 1.3 胶体金溶液制备及质量鉴定

参考文献 [16] 制备胶体金溶液。在温和搅拌条件下, 将 1 mL 新制备的柠檬酸三钠溶液 (1%) 迅速加入 100 mL 沸腾的  $\text{HAuCl}_4$  溶液 (0.01%) 中。持续加热混合溶液 10 min, 待其冷却至室温 (25 °C)。随后, 使用超纯水定容至 100 mL, 于 4 °C 避光保存备用。为验证胶体金批次间的稳定性, 进行 3 次胶体金溶液的制备试验。通过紫外-可见光谱 (UV-Vis)、动态光散射 (DLS) 技术对所得胶体金的紫外吸收峰、颗粒形态、平均水合粒径、Zeta 电位进行表征。

### 1.4 胶体金免疫探针的制备

在成功制备胶体金溶液的基础上, 进一步制备免

疫探针，具体步骤如下：首先，在 1 mL AuNPs 溶液中分别加入 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  溶液，调节溶液的 pH 值至优化后的设定值。随后，在室温条件下，分别加入适量体积的检测抗体（Anti-SAL 抗体、Anti-RAC 抗体和 Anti-CLEN 抗体），与 AuNPs 溶液反应 20 min。接着，向反应体系中分别加入 100  $\mu$ L BSA 溶液（10%），继续反应 10 min，以稳定反应体系并封闭非特异性结合位点。最后，将反应混合物在 10 000 r/min 的条件下离心 10 min，以沉淀 AuNPs-抗体复合物；小心移除上清液并弃置。将沉淀物重新溶解在 10 mmol/L pH=7.4 的 PBS 溶液中，并于 4  $^{\circ}C$  避光保存，以备后续使用。

### 1.5 瘦肉精三联检测卡的制备与组装

本研究设计的三联检测卡由 3 条基于 AuNPs 的免疫层析试纸条并行排列组成。每条免疫层析试纸条由吸水垫、NC 膜、样品垫、结合垫和 PVC 底板组成。首先，使用自动可编程切条机将样品垫切割成 1.7 cm $\times$ 30 cm 的尺寸，并用含有 2% 吐温和 2% BSA 的 PBS 溶液（0.01 mol/L，pH = 7.4）进行预处理，随后置于 37  $^{\circ}C$  真空干燥箱中干燥 3 h，并于室温下保存备用。接着，使用三维划线喷金仪以 1  $\mu$ L/cm 的密度将检测抗原（BSA-SAL、BSA-CLEN、BSA-RAC）分别分配到 NC 膜上，以形成 T 线。同时，以相同密度将羊抗兔 IgG 分别分配到 SAL、CLEN 检测通道的 NC 膜上，将羊抗鼠 IgG 分配到 RAC 检测通道的 NC 膜上，以形成 C 线。随后，将制备好的胶体金免疫探针均匀固定于 8 mm 宽的结合垫上，并将 NC 膜和结合垫置于 37  $^{\circ}C$  下干燥 3 h。最后，依次将处理过的 NC 膜、吸水垫、结合垫和样品垫组装到 PVC 底板上，各组件之间相互重叠约 2 mm。将组装好的

检测大板切割成 3 mm 宽的试纸条，并将其组装至配套的瘦肉精三联检测卡卡槽中，密封保存备用。

### 1.6 检测方法基于的原理

所建立的瘦肉精三联检测卡基于抗原抗体竞争性免疫层析原理设计。在该方法中，首先将检测抗体与胶体金偶联制备免疫探针，然后将偶联后的免疫探针与结合垫共同孵育，并进行干燥处理；同时，在 NC 膜上，T 线预先包被检测抗原，而 C 线则包被抗检测抗体的二抗。当样本中目标抗原浓度较高时，T 线上的检测抗原与免疫探针结合数量减少，T 线显色减弱；当目标抗原浓度高于某一临界值时，T 线上的检测抗原无法与免疫探针结合，T 线不显色；当样本中目标抗原浓度较低时，T 线上的检测抗原与免疫探针结合较多，T 线颜色较深。样本中的目标抗原与免疫探针竞争性结合，抑制 T 线上的检测抗原与免疫探针结合，从而导致 T 线颜色变化。通过比较 T 线和 C 线的颜色深浅，可对样本中的药物残留进行定性判定。无论样本中是否含有目标抗原，过量的免疫探针或目标抗原与免疫探针的结合物均会与 C 线上的抗 IgG 的二抗结合，从而在 C 线显色。

### 1.7 样品分析与结果判定

将瘦肉精三联检测卡取出并置于水平面上。使用塑料滴管吸取待测猪尿液样本，将 60  $\mu$ L 样本滴加至检测卡的加样区，在室温下进行反应，持续时间为 5 min。采用目视检测法对结果进行判读（图 1）。若 T 线显色（有清晰可见条带）则判读为阴性，样本中不含目标抗原或目标抗原浓度低于检测限；T 线不显色或条带基本消失则判读为阳性，样本溶液中目标抗原浓度大于检测限；若 C 线未显色，则判定该检测结果无效，需重新进行测试。

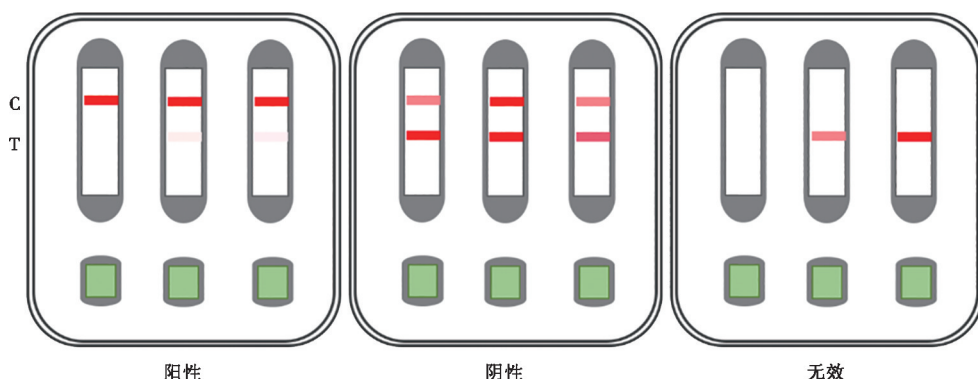


图 1 SAL、CLEN、RAC 三联检测卡的判定示意

### 1.8 检测条件的优化

免疫探针制备时偶联溶液 pH 值的优化：分别向 1 mL AuNPs 溶液中加入不同体积（0、1、3、5、7、

9、11、13、15  $\mu$ L）的 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  溶液，混匀后加入过量的检测抗体，充分颠倒混匀。随后进行盐沉试验观察 AuNPs 溶液颜色变化，并同时吸光

度光谱测量。以 AuNPs 溶液颜色无明显变化且吸光度稳定的条件作为最佳 pH 值的判断标准。

检测抗体添加量的优化：为提高检测方法的灵敏度，对 SAL、CLEN 的检测抗体偶联量进行优化。具体步骤：分别在 1 mL 调整至最佳 pH 值的 AuNPs 溶液中加入不同量（1、3、5、7 μg）的检测抗体。按照 1.4 节所述方法制备免疫探针并进行检测分析。通过观察 T 线和 C 线的显色情况，确定免疫探针制备的最佳检测抗体添加量。

### 1.9 三联检测卡的性能评价

#### 1.9.1 灵敏度测定

以阴性猪尿液为基质，对 3 种目标药物进行系列梯度加标试验，加标浓度分别为 10、5、3、1、0 ng/mL。待三联检测卡反应充分后进行分析与结果判定，将 T 线颜色基本消失时的最低浓度确定为本方法的检测限<sup>[17-18]</sup>。

#### 1.9.2 特异性试验

以阴性猪尿液为基质，开展药物交叉反应试验。将 SAL、CLEN、RAC、西马特罗、硫酸特布他林和苯乙醇胺 A 标准品分别用阴性猪尿液稀释至 10 ng/mL，将稀释液滴加至样品孔内，待三联检测卡反应充分后进行结果判定，以验证本方法的特异性。

#### 1.9.3 重复性试验

随机选取 3 个批次的试纸条以及同一批次内的试纸条，分别选用阳性加标样本（SAL：5 ng/mL，CLEN：5 ng/mL，RAC：1 ng/mL）和阴性样本进行

分析与结果判定，以评估本方法的批内重复性和批间重复性。

#### 1.9.4 稳定性试验

将制备的检测卡干燥密封后置于 37 ℃ 条件下储存，每周进行一次检测。分别选用阳性加标样本（SAL：3 和 5 ng/mL，CLEN：3 和 5 ng/mL，RAC：1 和 3 ng/mL）和阴性样本进行分析与结果判定，以评估本方法的稳定性。

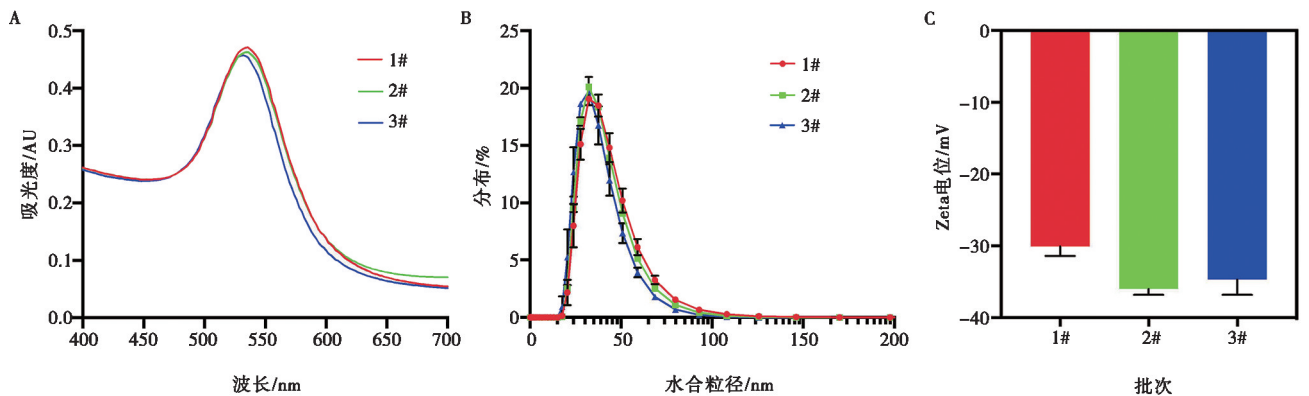
### 1.10 三联检测卡与 LC-MS 对比试验

随机选取实验室保存的 3 份阴性猪尿液样本和 3 份经 LC-MS 法检测确认含有 SAL、RAC、CLEN 的猪尿液样本，采用本研究建立的方法进行测定。根据试验结果分析该方法与国家现行有效标准<sup>[19]</sup>的一致性，从而评价三联检测卡的准确性。

## 2 结果与分析

### 2.1 胶体金溶液质量鉴定

目视观察显示，所制备的胶体金溶液呈酒红色，且溶液清澈透明。UV-Vis 分析结果显示（图 2A），胶体金溶液的最大吸收波长均位于 532~534 nm 范围内，吸收峰值的稳定性和一致性表明胶体金溶液具有良好的稳定性和重复性。此外，DLS、Zeta 电位测量结果（图 2B、C）表明，胶体金颗粒的尺寸分布均匀，平均直径为 34.87 nm，具有良好的分散性，未观察到颗粒聚集现象。以上结果证实胶体金溶液的成功制备，且不同批次间具有良好的稳定性。



A. 紫外吸收光谱；B. 不同水合粒径分布；C. Zeta 电位。

图 2 3 批次胶体金溶液表征

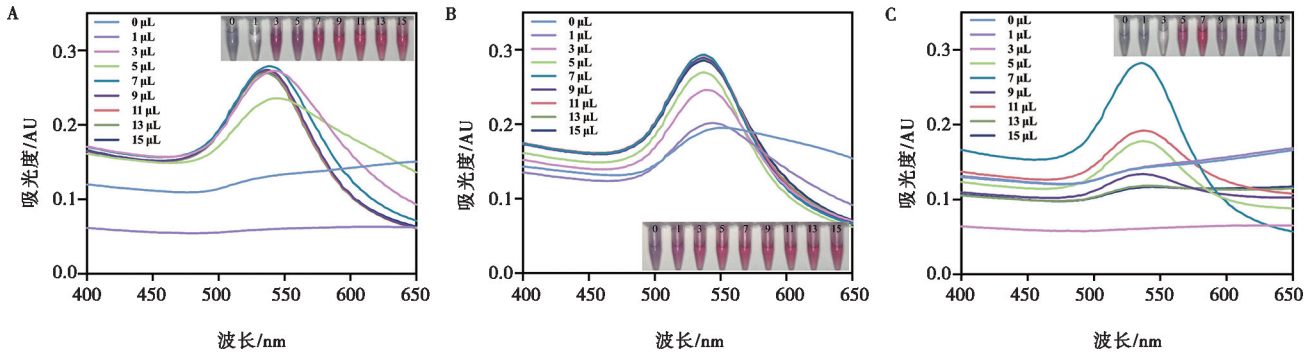
### 2.2 三联检测卡检测条件的优化

#### 2.2.1 免疫探针制备时偶联溶液 pH 值的优化

如图 3 所示，在 1 mL AuNPs 溶液中标记 Anti-SAL 抗体，当加入 0.1 mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液大于 5 μL 时，AuNPs 溶液颜色无明显变化且吸光度稳定，表

明 Anti-SAL 抗体可实现成功标记；标记 Anti-RAC 抗体，当加入 0.1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液大于 5 μL 时，AuNPs 溶液颜色无明显变化且吸光度稳定，表明 Anti-RAC 抗体可实现成功标记；标记 Anti-CLEN 抗体时，虽未出现逐渐稳定的趋势，但当加入 0.1 mol/L

$K_2CO_3$ 溶液为  $7 \mu L$  时, AuNPs 溶液颜色最为正常且吸收峰值最高。因此, 本试验均选用  $7 \mu L$  的  $K_2CO_3$  溶液为检测抗体偶联时的最优 pH 值加入量。



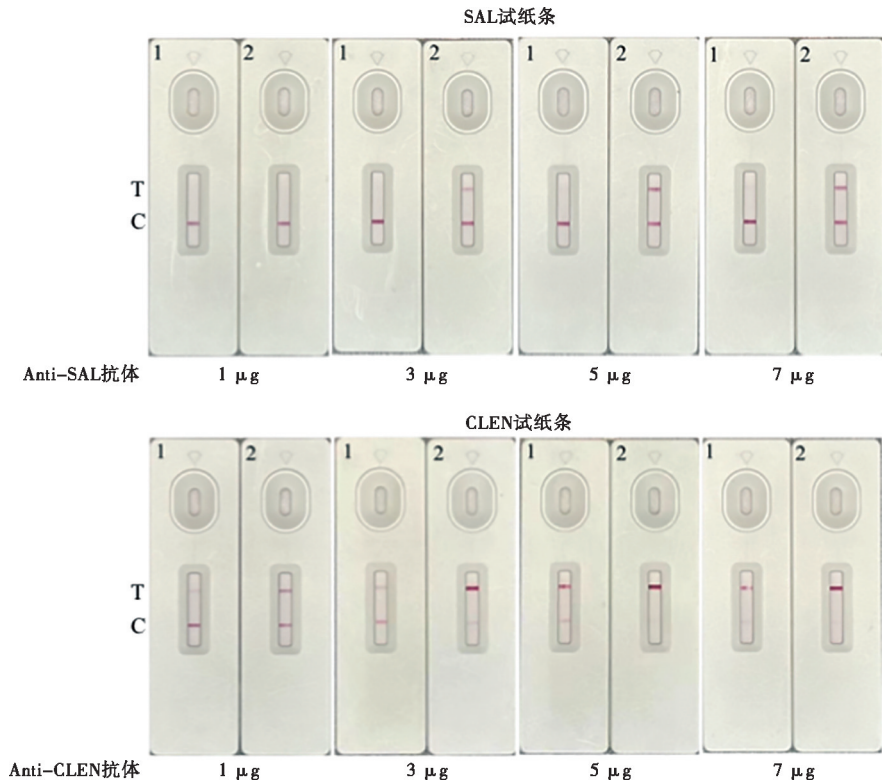
注: 插图为 AuNPs-抗体偶联反应溶液,  $0.1 \text{ mol/L } K_2CO_3$  的加入量从左到右分别为  $0、1、3、5、7、9、11、13、15 \mu L$ 。  
A. Anti-SAL 抗体; B. Anti-RAC 抗体; C. Anti-CLEN 抗体。

图3 免疫探针制备时 pH 值的优化

2.2.2 检测抗体添加量的优化

分别制备了偶联不同添加量 ( $1、3、5、7 \mu g$ ) 的 Anti-SAL 抗体和 Anti-CLEN 抗体的免疫探针, 并将其引入试纸条进行检测分析, 以比较 T 线和 C 线的显色情况。如图 4 所示, 在  $1 \text{ mL AuNPs}$  溶液中,

当 Anti-SAL 抗体、Anti-CLEN 抗体的添加量分别为  $5 \mu g$  和  $1 \mu g$  时, 阴性对照的 T 线、C 线显色清晰, 且阳性对照的抑制效果良好, 未发生非特异性显色, 满足目视法判定的要求。



1. 阳性样本; 2. 阴性对照。

图4 检测抗体偶联添加量的优化

### 2.3 三联检测卡的性能评价

#### 2.3.1 灵敏度测定和重复性试验

本研究采用阴性猪尿液稀释后的 SAL、CLEN 和 RAC 标准品进行灵敏度测定。结果如图 5 所示，当 SAL、CLEN 标准品的浓度为 1 ng/mL 时，T 线的显色强度较 0 ng/mL 相比明显减弱，随着 SAL、CLEN

标准品浓度升高至 3 ng/mL 时，T 线显色基本消失。对于 RAC 标准品，当其浓度为 1 ng/mL 时，T 线显色已完全消失。因此，所建立的方法对猪尿液中沙丁胺醇、盐酸克仑特罗和莱克多巴胺的检测限分别为 3、3 和 1 ng/mL。

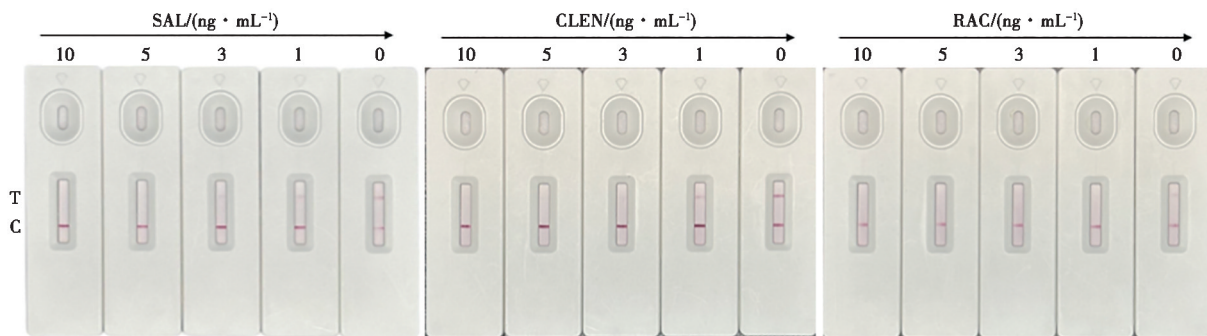
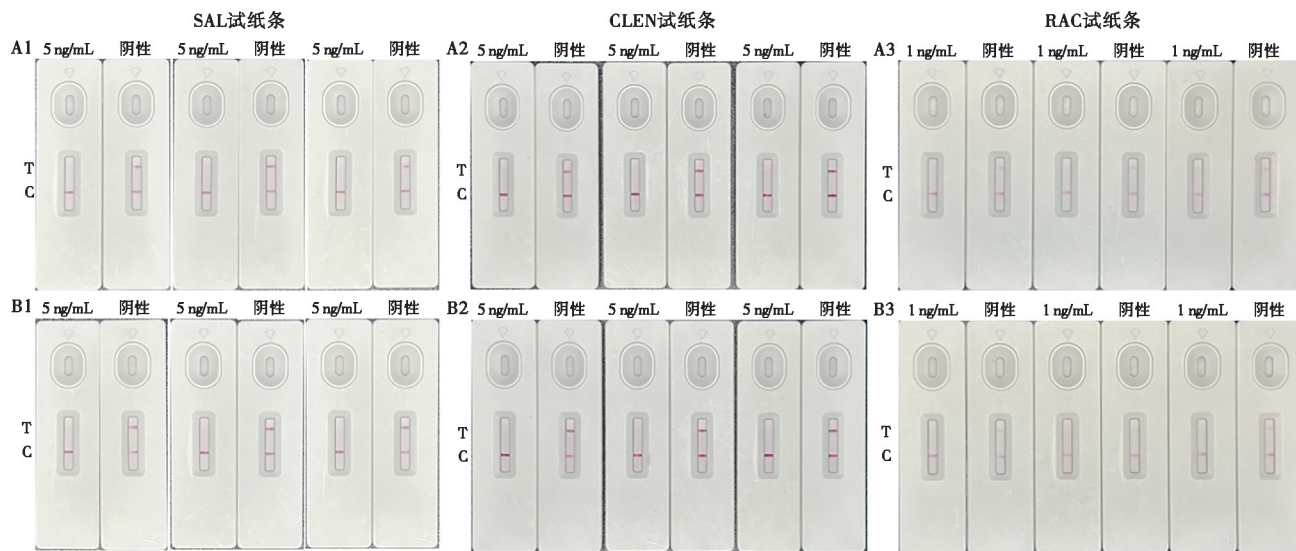


图 5 瘦肉精三联检测卡的检测限

采用本方法对 3 个批次的试纸条进行阳性加标样本和阴性样本检测，以评估其批间重复性；对同一批次的试纸条进行阳性加标样本和阴性样本检测，以评估其批内重复性。结果如图 6 所示，加入阴性猪尿液检测后，三联检测卡的 T 线、C 线均显色清晰。加入

低浓度的阳性样品（SAL: 5 ng/mL, CLEN: 5 ng/mL, RAC: 1 ng/mL）检测后，T 线均未显色，而 C 线显色正常，假阳性率和假阴性率均为 0，以上结果表明所制备的三联检测卡在批次间和批次内均展现出良好的重复性。



A1、A2、A3. 批次间重复；B1、B2、B3. 批次内重复。

图 6 SAL、CLEN 和 RAC 试纸条重复性检测结果

#### 2.3.2 特异性试验和稳定性试验

本研究将制备好的三联检测卡对 SAL、CLEN、RAC、西马特罗、硫酸特布他林和苯乙醇胺 A（浓度均为 10 ng/mL）进行测定。结果显示，本研究所建

立的方法仅与相应的靶标物质产生反应，与其他瘦肉精标准品均无特异性结合，表明该方法具有良好的特异性。

选用加标样本和阴性样本验证三联检测卡在

37 ℃加速老化4周的稳定性。由表1可知,在第7、15、22和30天进行检测时,当瘦肉精标准品的添加水平高于检测限时,检测结果均呈阳性,且阴性样本的显色稳定。这表明三联检测卡在37 ℃加速老化条件下,能够保持1个月的稳定检测性能。根据经验Arrhenius方程<sup>[20]</sup>,试纸条在37 ℃下为期4周的稳定性相当于在4 ℃下约1年的稳定性,从而证实了所建立方法的长期可靠性。

表1 稳定性检测结果 ( $n=3$ )

试纸条	添加水平/ ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	检测结果 (37 ℃条件下)			
		第7天	第15天	第22天	第30天
SAL	0	+	+	+	+
	3	+/-	+/-	+/-	+/-
	5	-	-	-	-
CLEN	0	+	+	+	+
	3	+/-	+/-	+/-	+/-
	5	-	-	-	-
RAC	0	+	+	+	+
	1	-	-	-	-
	3	-	-	-	-

注:“+”表示T线显色,“-”表示T线不显色,“+/-”表示T线显色不清晰。

### 2.3.3 三联检测卡与LC-MS对比试验

为验证本方法的准确性,本研究比对了所建立的瘦肉精三联检测卡与国标方法(LC-MS)的检测结果。如表2所示,本方法在阳性样本中均成功检出SAL(1号)、CLEN(2号)和RAC(3号)残留,而在阴性样本中均未检出上述残留。本方法与LC-MS方法的检测结果一致,说明本研究建立的瘦肉精三联检测卡检测结果准确,可以应用于实际样品中SAL、CLEN和RAC残留的检测。

表2 与LC-MS测定结果比对 ( $n=3$ )

序号	SAL/ ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		CLEN/ ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )		RAC/ ( $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	
	本方法	LC-MS	本方法	LC-MS	本方法	LC-MS
1	+	75.58	-	ND	-	ND
2	-	ND	+	11.44	-	ND
3	-	ND	-	ND	+	34.57
4	-	ND	-	ND	-	ND
5	-	ND	-	ND	-	ND
6	-	ND	-	ND	-	ND

注:“+”表示阳性,“-”表示阴性,“ND”表示未检出。

## 3 讨论

胶体金因其制备简便、成本可控,已被广泛应用于生物检测、医学诊断及纳米技术领域。其制备方法有多种,不同方法可根据具体应用需求进行选择。其中,化学还原法因其操作简单、易于规模化生产而备受关注。然而,胶体金的具体制备方法需要根据试验目的和实验室条件进行选择。在制备过程中,必须严格控制试验条件,以确保获得所需粒径且稳定性良好的胶体金溶液。本研究结果表明,氯金酸溶液和还原剂(柠檬酸钠)的用量及比例、持续沸腾时间、搅拌转速以及器皿的清洁程度等因素均直接影响胶体金的质量及其批次间重复性。此外,加热仪器的性能稳定性亦是影响胶体金质量的关键因素。

在胶体金免疫探针制备过程中,胶体金溶液的pH值和检测抗体的标记量是两个关键因素<sup>[21]</sup>。通常,pH值过低或过高均可能影响免疫探针的性能,无法保证其稳定性和有效性。此外,优化检测抗体的偶联量是提高免疫检测灵敏度和特异性的关键步骤。这一过程通常需要通过优化来确定最佳的抗体偶联量,即在确保抗体活性的前提下,实现最高信号强度与最佳抑制率之间的平衡。本研究通过优化各项检测条件,建立了猪尿液中SAL、CLEN和RAC残留的三联侧流免疫层析检测方法。在对Anti-RAC抗体筛选以及该抗体添加量的优化过程中,发现即使T线的抗原的包被浓度高达2 mg/mL,增加Anti-RAC抗体的添加量也未能显著提升T线的显色强度,推测其原因可能是Anti-RAC抗体亲和力较弱。优化结果显示,当抗体添加量分别为3  $\mu\text{g}$ 和5  $\mu\text{g}$ 时,阴性样本的T线显色差异不明显,但相比之下,5  $\mu\text{g}$ 添加量的阴性样本的T线和C线更清晰,且阴性与阳性样本的对比更为明显,便于判读。基于上述结果,最终确定Anti-RAC抗体的偶联量为5  $\mu\text{g}$ 。在未来研究中,可以尝试更多不同来源的抗体原料,以进一步探索其对检测性能的影响。

目前,已有多种针对瘦肉精联检的免疫层析方法被开发。柳海燕等<sup>[22]</sup>研制的瘦肉精胶体金快速检测二联卡对于肉制品中CLEN检测限为3 ng/mL、SAL检测限为5 ng/mL。王森等<sup>[23]</sup>研制的瘦肉精三合一胶体金快速检测板,在经过精细处理的猪肉样本中,对SAL、CLEN和RAC的检测限均为1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。罗奕铭<sup>[24]</sup>研制的多残留胶体金检测卡能够同时检测10种瘦肉精,其中CLEN、RAC和SAL的检测限分别为3、5和3 ng/mL。本研究所建立的瘦肉精胶体金免疫层析三联检测卡具有低成本、快速、灵敏和稳定等优点,可在5 min内完成结果判定,适用于养殖户、屠

宰场、海关和检验检疫部门的现场操作。本方法对猪尿液中 SAL、CLEN 和 RAC 的检测限分别为 3、3 和 1 ng/mL，具有较高的检测灵敏度。本方法特异性良好，SAL、CLEN 和 RAC 三种瘦肉精抗原之间无交叉反应，且在使用其他类型结构的瘦肉精进行特异性检测时，未出现非特异性反应。此外，本方法稳定性好，在 37 °C 加速老化 4 周后，所制备的检测卡表现出卓越的稳定性，确保了产品在实际应用中的可靠性。本方法的重复性良好，同一批次内多次测试的结果高度一致，表明试纸条的批内重复性良好，生产过程可控，产品质量稳定；不同批次的试纸条间检测结果亦表现出良好的重复性，确保了不同批次产品的检测性能一致性。本方法与国标方法（LC-MS）的检测结果一致，表明该方法在实际样品中对 SAL、CLEN 和 RAC 检测的可行性。

综上所述，本研究制备的三联检测卡为猪尿液中瘦肉精多残留的快速、准确检测提供了有力保障。然而，鉴于临床样本的复杂性与多样性，本方法在实际应用中的检测性能可通过扩大样本量进行进一步验证与优化。目前，本研究所搭建的胶体金技术应用平台仅针对瘦肉精成分建立了检测方法，其在食品安全和病毒现场检测领域的应用潜力尚待深入开发。

### 参考文献：

[1] 周敬奎, 曹娟, 张娜. 胸腺肽  $\alpha$ -1 辅助吸入糖皮质激素/长效  $\beta_2$  受体激动剂对哮喘-慢性阻塞性肺疾病重叠综合征的疗效 [J]. 西北药学杂志, 2024, 39 (2): 144-148.

[2] 张笑男. 牛肉中非法添加瘦肉精的危害及其检测方法研究 [J]. 食品安全导刊, 2024 (7): 152-154.

[3] 陈赛赛, 徐民, 吴琼, 等. 几种常见食品快检项目的发展现状及展望 [J]. 粮食与饲料工业, 2023 (2): 58-61, 71.

[4] CAO J, LIANG S, ZHANG H, et al. Sodium 4-styrenesulfonate functionalized nanofibers mat as 96-well plate solid-phase extraction adsorbent for quantitative determination of multiple  $\beta$ -agonists residues in pork samples [J]. Food Chem, 2021, 335: 127631.

[5] YIKILMAZ Y, KUZUKIRAN O, ERDOGAN E, et al. The determination of  $\beta$ -agonist residues in bovine tissues using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Biomed Chromatogr, 2020, 34 (10): e4926.

[6] ZHANG W, WANG P, SU X. Current advancement in analysis of  $\beta$ -agonists [J]. Trac Trends Anal Chem, 2016, 85: 1-16.

[7] 张丽燕, 袁梅, 王美荣, 等. SinCHERS-RA 柱 HPLC-MS/MS 法快速检测猪肉中十种瘦肉精药物残留 [J]. 当代畜牧, 2024 (4): 41-46.

[8] 伊淑平. 动物毛发中  $\beta$ -受体激动剂 LC-MS/MS 检测方法概论

[J]. 天津农业科学, 2021, 27 (11): 32-35.

[9] 陈小妹, 高云慨, 肖璇, 等. HPLC-MS/MS 法测定猪肉中齐帕特罗残留量及不确定度评定 [J]. 广东化工, 2023, 50 (8): 181-183, 159.

[10] LIU H, OUSMANE D, GAN N, et al. Novel stir bar array sorptive extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for simultaneous determination of three  $\beta_2$ -agonist residues in pork [J]. Chromatographia, 2017, 80 (3): 473-482.

[11] LI Y, ZHANG H, CUI Z, et al. Chemical staining enhanced Enzyme-linked immunosorbent assay for sensitive determination of Clenbuterol in food [J]. Food Chem, 2023, 400: 134012.

[12] CONG Y, DONG H, WEI X, et al. A novel murine antibody and an open sandwich immunoassay for the detection of clenbuterol [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 182: 109473.

[13] 喻俊磊, 陈沙, 李雨露, 等. 动物源性食品中克伦特罗、莱克多巴胺和沙丁胺醇快速检测产品的稳健性评价 [J]. 江西农业学报, 2019, 31 (11): 105-110.

[14] ZHANG H, WANG L, YAO X, et al. Developing a simple immunochromatography assay for clenbuterol with sensitivity by one-step staining [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68 (52): 15509-15515.

[15] LUO H, LIU S, SHI L, et al. Paper-based fluidic sensing platforms for  $\beta$ -adrenergic agonist residue point-of-care testing [J]. Biosensors, 2022, 12 (7): 518.

[16] LING S, DONG M, XU Y, et al. Development of sensitive and portable immunosensors based on signal amplification probes for monitoring the mercury (II) ions [J]. Biosens Bioelectron, 2022, 217: 114676.

[17] 姜金庆, 杨雪峰, 王自良, 等. 克伦特罗和莱克多巴胺多残留胶体金免疫层析试纸条的研制 [J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44 (1): 87-94.

[18] 王亚楠, 王晓斐, 丁菡, 等. 铬离子单克隆抗体的制备及食品总铬含量检测胶体金免疫层析试纸条的研制 [J]. 食品工业科技, 2016, 37 (18): 63-69.

[19] 农业农村部, 国家市场监督管理总局, 国家卫生健康委员会. 食品安全国家标准 动物性食品中  $\beta$ -受体激动剂残留量的测定液相色谱-串联质谱法: GB 31658.22-2022 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.

[20] WANG Y, XU H, WEI M, et al. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay [J]. Materials Science and Engineering: C, 2009, 29 (3): 714-718.

[21] 贾立春, 周嘉明, 智军海, 等. 胶体金免疫层析高通量测定动物肌肉组织中多兽药残留 [J]. 南京农业大学学报, 2024, 47 (5): 967-978.

[22] 柳海燕, 侯景, 曾学斌. 瘦肉精胶体金快速检测二联卡的研制 [J]. 现代食品, 2019, 25 (7): 133-136, 142.

[23] 王森, 周亚莲, 盛慧萍, 等. 瘦肉精三合一胶体金快速检测板的研制及在畜肉中的应用 [J]. 浙江农业科学, 2012, 53 (12): 1715-1719.

[24] 罗奕铭. 新型瘦肉精多残留胶体金检测卡的研制 [J]. 现代食品科技, 2018, 34 (1): 233-238, 133.